



Caractérisation Spectrale et Temporelle par Quenching de Fluorescence des Interactions Matière Organique-Eléments Métalliques

Ayoub Nouhi

► To cite this version:

Ayoub Nouhi. Caractérisation Spectrale et Temporelle par Quenching de Fluorescence des Interactions Matière Organique-Eléments Métalliques. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université de Toulon, 2017. Français. NNT : 2017TOUL0017 . tel-01838456

HAL Id: tel-01838456

<https://theses.hal.science/tel-01838456>

Submitted on 13 Jul 2018

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.

École doctorale n° 548 : Mer et Sciences

Laboratoire PROTEE

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de L'université de Toulon

Spécialité: Physique – Optique et Lasers

Caractérisation Spectrale et Temporelle par Quenching de Fluorescence des interactions Matière Organique–Éléments Métalliques

présentée et soutenue publiquement par

Ayoub Nouhi

le 13 décembre 2017

Directeur de thèse : **Stéphane Mounier**

Co-Encadrant de thèse : **Roland Redon**

Jury

Mme	Edith Parlanti, Chercheur CNRS HDR, <i>Université de Bordeaux</i>	Rapportrice
M.	Pierre-François Brevet, Professeur des universités, <i>Université Claude Bernard Lyon 1</i>	Rapporteur
Mme	Claire Richard, Directrice de recherche CNRS, <i>Institut de Chimie de Clermont-Ferrand</i>	Examinatrice
Mme	Madeleine Goutx, Directrice de recherche CNRS, <i>Institut Méditerranéen d'Océanologie</i>	Examinatrice
M.	Frédéric Coppin, Chercheur IRSN, <i>Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire</i>	Invité
M.	Stéphane Mounier, Maître de conférences HDR, <i>Université de Toulon</i>	Directeur de thèse
M.	Roland Redon, Maître de conférences, <i>Aix-Marseille Université</i>	Co-Encadrant

Remerciements

Le moment tant attendu de chaque doctorant, après des mois et des mois de rédaction... la petite touche finale !

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Mme Edith Parlanti et M. Pierre-François Brevet d'avoir accepté de rapporter ce travail ainsi que Mme Claire Richard et Mme Madeleine Goutx d'avoir accepté de juger la qualité de mes recherches. Mes sincères remerciements s'adressent également à Frédéric Coppin, de m'avoir prêté son précieux Tecan pour effectuer les mesures de fluorescence complémentaires.

Une thèse de doctorat représente trois longues années d'une tranche de vie remplie de bonheur mais malheureusement, la vie n'est pas un kiwi... Il y a des périodes difficiles à surmonter et heureusement qu'on peut compter sur de nombreuses personnes (rencontrées de manière fortuite ou non) pour y parvenir. Ce sont ces personnes que je souhaiterai mettre en avant ici.

D'une manière générale, je tiens à remercier les membres du laboratoire PROTEE. Parmi eux, je remercie chaleureusement Stéphane Mounier, mon directeur de thèse et directeur du laboratoire, de m'avoir appris à être très autonome mais également pour son altruisme, la qualité de son encadrement et sans qui, l'élaboration de ce long travail acharné n'aurait pas vu le jour. Je remercie également Roland Redon, d'abord en sa qualité de co-encadrant de thèse ainsi que pour ses conseils et sa disponibilité, même les jours fériés et dimanches après-midi. Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'accueil chaleureux et la bonne ambiance que m'ont témoignés tous les membres de l'équipe CAPTE. Je tiens à remercier parmi eux, Véronique Lenoble pour sa bonne humeur et son rire titanesque à s'en décrocher les oreilles, que j'entends même quand je bois mon petit thé à la menthe au bled. Cédric Garnier, pour les nombreuses blagues qu'il a fait sur mes cheveux et pas que... et surtout pour nos échanges scientifiques sur la chimie et tant d'autres sujets, je les remercie tous les deux de m'avoir invité chez eux et d'avoir partagé un moment très agréable. Gaël Durrieu, qui a toujours laissé ce qu'il avait entre les mains pour m'aider quand j'en avais besoin. Marie-christine Davy, pour son attention, sa disponibilité et notamment de m'avoir prêté sa clim quand il faisait 40° dans mon bureau l'été. Christian Martino, le super héros du bâtiment R, d'avoir toujours été disponible et pour les nombreux échanges que nous avons eus autour de sujets "sensibles". Mes remerciements s'adressent également à Sylvie Villain de m'avoir initié et fait découvrir l'enseignement. Je remercie particulièrement Houssam et Carmen de m'avoir accueilli chaleureusement à de nombreuses reprises, je les remercie pour les nombreux conseils qu'ils m'ont donnés et d'avoir partagé avec moi leur expérience et je leur souhaite une très bonne continuation dans leur carrière.

Au cours de ces trois années, j'ai également fait des rencontres inoubliables, je ne peux finir ces quelques lignes sans remercier des personnes qui me sont chers. Mes remerciements s'adressent à Sébastien D'onofrio, qui ramène de la joie et de la bonne humeur au labo tous les jours, t'inquiète ! Mes copains doctorants avec qui j'ai partagé pleins de fous rires pendant nos soirées cinéma et pas que.. Cyril aka Cyril Lignac du poulet, Nicolas Champagne pour toutes les fois où il a été disponible quand j'en avais besoin, Marie et Pomme les inséparables, Clément aka Ricardo le Zeuss du Ricard, Nadège Meyer et Rawa El Fallah avec qui j'ai partagé tous mes moments difficiles et qui ont toujours été à l'écoute. Sans oublier les anciens : Rabia Cherfouh, Cheikh, Tanalou et Madi.. et tous ce que j'ai pu oublier.. J'ai partagé plein de bons moments et appris beaucoup avec eux. Un merci spécial à mon frère et compatriote Youssef Elouardi d'avoir toujours été présent et pour tous les échanges que nous avons eus sans oublier les soirées couscous.

Je remercie enfin celles et ceux qui me sont proches et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois. Mes parents et frère et sœurs, pour leur encouragement et leur soutien moral ainsi que pour leur confiance indéfectible dans mes choix, souvent à distance à cause de l'éloignement. Mes remerciements s'adressent également à ma grande famille de Nancy, de m'avoir accueilli pendant mes deux années de Master. Mes attentions se portent également vers ma belle famille pour leur encouragement.

Pour finir, un grand merci à Floriane, pour son soutien quotidien inépuisable. Notre couple a grandi en même temps que l'aboutissement de ce travail. Merci pour tout !

Table des matières

1	La Spectroscopie de Fluorescence	3
1.1	Rappels historiques	4
1.2	Mécanisme d'absorption	5
1.2.1	Nature de la lumière	5
1.2.2	Spectre d'absorbance et loi de Beer-Lambert	5
1.3	Grandeurs caractéristiques de la spectroscopie de fluorescence	7
1.3.1	La durée de vie de fluorescence	7
1.3.2	Rendement quantique de fluorescence	9
1.4	Caractéristiques de l'émission de fluorescence	10
1.4.1	Transition entre état électronique et mécanisme de désexcitation	10
1.4.2	Mesure de spectres de fluorescence	12
1.4.2.1	Fonctionnement du spectrofluorimètre	12
1.4.2.2	Spectres d'excitation et d'émission	14
1.5	Principe du quenching de Fluorescence	16
1.5.1	Quenching physique par collision (Dynamique)	16
1.5.2	Quenching par complexation (Statique)	18
1.5.3	Combinaison du quenching statique et dynamique	20
1.6	Transfert d'énergie par résonance : FRET	22
1.7	La diffusion	24
1.8	La fluorescence résolue en temps	26
1.8.1	Fluorimétrie impulsionnelle et fluorimétrie de phase	27
1.8.1.1	Fluorimétrie impulsionnelle	27
1.8.1.2	Fluorimétrie de phase	28
1.8.1.3	Analyse de données	29
1.9	Problématique générale	30
2	Étude de l'interaction MOD – EM	32
2.1	Généralités	33
2.2	Matière organique naturelle (MON)	33
2.2.1	Origine de la MON	33
2.2.2	Composition générale	34
2.2.3	Caractérisation de la matière organique	35
2.2.3.1	Description générale des propriétés de la matière organique	35
2.2.3.2	Propriétés optiques de la matière organique	35

2.3	Interaction Matière organique - éléments métalliques	37
2.3.1	Rôle dans le transport des métaux et complexation MO - métaux . . .	37
2.3.2	Choix des métaux	38
2.3.2.1	Métaux non-fluorescents	38
2.3.2.1.1	Le Cuivre :	38
2.3.2.1.2	L'Aluminium :	39
2.3.2.1.3	L'Arsenic :	40
2.3.2.2	Métaux fluorescents	40
2.3.2.2.1	L'Europium :	40
2.3.2.2.2	L'Uranium :	42
2.4	Conclusion	43
3	Approches Expérimentales & Méthodes de Mesure	45
3.1	Matériels	46
3.1.1	Le modèle d'étude : l'Acide Salicylique	46
3.1.2	Extraction de la matière organique	47
3.1.3	Étude du tampon HEPES	48
3.1.4	Préparation des solutions métalliques	50
3.1.5	Caractérisation par une source d'excitation continue	52
3.1.5.1	Spectrofluorimètre HITACHI F4500	53
3.1.5.2	Spectrophotomètre TECAN M1000	54
3.1.6	Caractérisation par une source d'excitation impulsionnelle	56
3.1.6.1	Laser nanoseconde Spectra Physics Quanta-RAY INDI	56
3.2	Méthodes	59
3.2.1	Ajouts logarithmiques	59
3.2.1.1	HITACHI F4500	60
3.2.1.1.1	Protocole de nettoyage des cuves	60
3.2.1.2	TECAN M1000	61
3.2.1.2.1	Protocole de nettoyage de la microplaque	61
3.2.2	Procédure expérimentale pour les mesures de temps de vie	62
3.2.3	Traitement de données	63
3.2.3.1	Modèle de complexation 1:1	63
3.2.3.2	Décomposition CP/PARAFAC	65
3.2.3.2.1	Pré-traitements	67
3.2.3.3	Algorithme de déconvolution temporelle	68
3.3	Conclusion	69
4	Résultats des interactions MOD-EM	70
4.1	Acide Salicylique	71
4.1.1	Étude de la variabilité de l'AS	71
4.1.2	Quenching et temps de vie de fluorescence	72
4.1.2.1	Cuivre	72
4.1.2.2	Aluminium	75
4.1.2.3	Arsenic	78
4.1.2.4	Europium	81

4.1.2.5	Uranium	85
4.2	Acide Humique	92
4.2.1	Étude de la variabilité de l'AH	92
4.2.2	Quenching et temps de vie de fluorescence	92
4.2.2.1	Cuivre	92
4.2.2.2	Aluminium	97
4.2.2.3	Arsenic	100
4.2.2.4	Europium	104
4.2.2.5	Uranium	109
4.3	Acide Fulvique	116
4.3.1	Étude de la variabilité de l'AF	116
4.3.2	Quenching et temps de vie de fluorescence	116
4.3.2.1	Cuivre	116
4.3.2.2	Aluminium	120
4.3.2.3	Arsenic	124
4.3.2.4	Europium	126
4.3.2.5	Uranium	130
4.4	Conclusion	135
I	Article	139
II	Conclusion & Perspectives	148
III	Annexes	168
A	Poster EGU 2016	169
B	Données complémentaires sur l'AS, l'AH et l'AF sans métal	171
B.1	Acide salicylique	172
B.1.1	MEEFs Brutes	172
B.1.2	MEEFs corrigées	172
B.1.3	Décomposition CP/PARAFAC	173
B.2	Acide humique	174
B.2.1	MEEFs brutes	174
B.2.2	MEEFs corrigées	174
B.2.3	Décomposition CP/PARAFAC	175
B.3	Acide fulvique	176
B.3.1	MEEFs brutes	176
B.3.2	MEEFs corrigées	176
B.3.3	Décomposition CP/PARAFAC	177
C	Protocole expérimental des solutions métalliques	178

Liste des figures

1.1	Schéma du chemin optique pour une mesure d'absorption	5
1.2	Spectre d'absorption du sulfate de quinine	7
1.3	à gauche, une excitation de Dirac classique ; à droite, le diagramme simplifié de Perrin – Jablonski pour illustrer la signification des rendements quantiques et du temps de vie de fluorescence.	8
1.4	Diagramme de Perrin – Jablonski des états électroniques	10
1.5	Principe de fonctionnement d'un spectrofluorimètre standard	13
1.6	Incidence et diffraction	13
1.7	Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence non corrigée	15
1.8	Interaction d'une molécule excitée F* avec une autre molécule Q	16
1.9	Processus d'interaction entre F* et Q lors d'un quenching dynamique	17
1.10	Processus d'interaction entre F* et Q lors d'un quenching statique	19
1.11	Comparaison entre le quenching statique et dynamique	19
1.12	Illustration du quenching statique	20
1.13	Comparaison entre le quenching statique et dynamique Valeur and Berberan-Santos (2012)	21
1.14	Illustration du recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.	22
1.15	Dépendance de l'efficacité de transfert par rapport à la distance.	23
1.16	Diffusions élastique et inélastique : schéma énergétique des transitions électroniques	25
1.17	Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence corrigée	25
1.18	Principe de la fluorimétrie résolue en temps	28
1.19	Principe de la fluorimétrie impulsionnelle et la fluorimétrie fréquentielle	29
2.1	Structure hypothétique d'un acide humique selon Stevenson (1994) et sites (en rouge) de complexation potentiel	34
2.2	Spectre 3D des pics identifiés par Coble	36
2.3	Exemple de changement de la spéciation de l'uranium en présence de matière organique (issu de Moulin et al. (1992))	37
2.4	Transitions de luminescence de Eu^{3+}	41
2.5	Spectre d'émission de l'ion uranyle UO_2^{2+} à $4,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ HNO_3 2%	43
3.1	Structure chimique de l'acide salicylique	46
3.2	Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'acide salicylique	47

3.3	Estuaire du Saint-Laurent	48
3.4	Les MO extraites du St.-Laurent	49
3.5	Spectre d'excitation et d'émission des acides humiques	49
3.6	Spectre d'excitation et d'émission des acides fulviques	49
3.7	Courbe de titration du tampon HEPES à 0.1 M	50
3.8	Spectrofluorimètre HITACHI F4500	53
3.9	Tourelle à 16 porte-échantillons	54
3.10	Spectrophotomètre TECAN M1000	55
3.11	Module d'injecteur du TECAN M1000	55
3.12	Laser nanoseconde Quanta-Ray INDI	57
3.13	Montage expérimental de spectroscopie laser résolue en temps	57
3.14	schéma du système d'acquisition	59
3.15	Représentation des ajouts logarithmiques en échelle linéaire (à gauche) et en échelle semi-log (à droite)	59
3.16	Schéma du procédé expérimental des ajouts métalliques	60
3.17	Exemple d'ajouts logarithmiques avec la microplaque en quartz du TECAN	61
3.18	Chronologie de l'analyse temporelle d'un spectre d'émission	63
3.19	Exemple d'une optimisation 1:1 entre $I_{F_i,mesurée}$ et $I_{F_i,ajustée}$	66
3.20	Droite de dilution de l'AS	68
3.21	Courbe du profil temporel avec une porte de 35ns	69
4.1	Variabilité $I(f)$ de l'AS	72
4.2	HITACHI —Contribution du composant et MEEF de AS—Cu(II)	73
4.3	TECAN —Contribution du composant et MEEF de AS—Cu(II)	74
4.4	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et le Cu(II)	74
4.5	Diagramme de répartition des différentes espèces de l'aluminium (issu de Cathalifaud et al. (1997))	76
4.6	HITACHI —Contribution du composant et MEEF de AS—Al(III)	77
4.7	TECAN —Contribution du composant et MEEF de AS—Al(III)	77
4.8	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et l'Al(III)	78
4.9	HITACHI —Contribution du composant et MEEF de AS—As(V)	79
4.10	TECAN —Contribution du composant et MEEF de AS—As(V)	79
4.11	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et l'As(V)	80
4.12	HITACHI —Contributions des composants et MEEFs de AS—Eu(III)	82
4.13	TECAN —Contributions des composants et MEEFs de AS—Eu(III)	84
4.14	Graphique de Stern–Volmer de l'AS—Eu(III)	85
4.15	HITACHI —Contributions des composants et MEEFs de AS—UO ₂ (II)	87
4.16	TECAN —Contributions des composants et MEEFs de AS—UO ₂ (II)	88
4.17	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et l'uranium	90
4.18	Graphique des spectres 3D issus des interactions AS—métaux	90
4.19	Variabilité $I(f)$ de l'AH	92
4.20	HITACHI —Contribution des composants et MEEFs de AH—Cu(II)	94
4.21	TECAN —Contribution des composants et MEEFs de AH—Cu(II)	96
4.22	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et le Cu(II)	96
4.23	HITACHI —Contribution du composant et MEEF de AH—Al(III)	98

4.24	TECAN –Contributions des composants et MEEFs de AH–Al(III)	99
4.25	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et l'Al(III)	100
4.26	HITACHI –Contributions des composants et MEEFs de AH–As(V)	101
4.27	TECAN –Contributions des composants et MEEFs de AH–As(V)	102
4.28	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et l'As(V)	103
4.29	Graphique 2D de la fluorescence de l'Eu en interaction avec AH	105
4.30	HITACHI –Contributions des composants et MEEFs de AH–Eu(III)	106
4.31	TECAN –Contributions des composants et MEEFs de AH–Eu(III)	108
4.32	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et l'Eu(III)	109
4.33	HITACHI –Contributions des composants et MEEFs de AH–UO ₂ (II)	111
4.34	Modèle modifiée du deuxième composant AH–UO ₂ (II)	112
4.35	TECAN –Contributions des composants et MEEFs de AH–UO ₂ (II)	113
4.36	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et l'UO ₂ (II)	114
4.37	Graphique des spectres 3D issus des interactions AH–métaux	115
4.38	Variabilité I(f) de l'AF	116
4.39	HITACHI –Contribution des composants et MEEFs de AF–Cu(II)	118
4.40	TECAN –Contribution des composants et MEEFs de AF–Cu(II)	119
4.41	Graphique de Stern–Volmer de l'AF–Cu(II)	120
4.42	HITACHI –Contribution du composant et MEEF de AF–Al(III)	122
4.43	TECAN –Contribution du composant et MEEF de AF–Al(III)	122
4.44	Graphique de Stern–Volmer de l'AF–Al(III)	123
4.45	HITACHI –Contribution du composant et MEEF de AF–As(V)	124
4.46	TECAN –Contribution du composant et MEEF de AF–As(V)	125
4.47	Graphique de Stern–Volmer de l'AF–As(V)	126
4.48	HITACHI –Contributions des composants et MEEFs de AF–Eu(III)	127
4.49	TECAN –Contributions des composants et MEEFs de AF–Eu(III)	128
4.50	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AF et l'Eu(III)	129
4.51	HITACHI –Contributions des composants et MEEFs de AF–UO ₂ (II)	131
4.52	Contribution modifiée du deuxième composant de AF–UO ₂ (II)	132
4.53	TECAN –Contributions des composants et MEEFs de AF–UO ₂ (II)	133
4.54	Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AF et l'UO ₂ (II)	134
4.55	Graphique des spectres 3D issus des interactions AF–métaux	135
4.56	Graphique radar des interactions AS–Métaux	136
4.57	Graphique radar des interactions AH–Métaux	136
4.58	Graphique radar des interactions AF–Métaux	137
B.1	MEEFs brut (sans correction de la diffusion) de l'acide salicylique sans ajouts de métal	172
B.2	MEEFs corrigées de l'acide salicylique sans ajouts de métal (même ordre)	172
B.3	Décomposition CP/PARAFAC des 12 matrices de l'acide salicylique sans ajouts métal	173
B.4	MEEFs brut (sans correction de la diffusion) de l'acide humique sans ajouts de métal	174
B.5	MEEFs corrigées de l'acide humique sans ajouts de métal	174

B.6	Décomposition CP/PARAFAC des 12 matrices de l'acide humique sans ajouts de métal	175
B.7	MEEFs brut (sans correction de la diffusion) de l'acide fulvique sans ajouts de métal	176
B.8	MEEFs corrigées de l'acide fulvique sans ajouts de métal	176
B.9	Décomposition CP/PARAFAC des 12 matrices de l'acide fulvique sans ajouts de métal	177

Liste des tableaux

1.1	Rendements quantiques et temps de vie de fluorescence de quelques hydrocarbures aromatiques	9
2.1	Principaux composants fluorescents de la MON identifiés par Coble (1996) .	36
3.1	Paramètres d'acquisition des MEEFs avec l'HITACHI F4500	54
3.2	Paramètres d'acquisition des MEEFs avec le TECAN M1000	56
3.3	Caractéristiques du laser nanoseconde Quanta-Ray INDI	58
3.4	Procédure expérimentale d'ajouts logarithmiques pour les mesures en mode stationnaire	61
3.5	Procédure expérimentale d'ajouts logarithmiques pour les mesures de temps de vie	62
3.6	Paramètres d'acquisition des spectres d'émission et temps de vie de fluorescence	62
4.1	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AS-Cu(II)	74
4.2	Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-Cu(II)	75
4.3	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AS-Al(III)	76
4.4	Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-Al(III)	78
4.5	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AS-As(V)	80
4.6	Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-As(V)	80
4.7	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AS-Eu(III)	83
4.8	Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-Eu(III)	85
4.9	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AS-UO ₂ (II)	89
4.10	Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-UO ₂ (II)	89
4.11	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AH-Cu(II)	95
4.12	Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-Cu(II)	97
4.13	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AH-Al(III)	97
4.14	Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-Al(III)	98
4.15	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AH-As(V)	101
4.16	Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-As(V)	104
4.17	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AH-Eu(III)	107
4.18	Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-Eu(III)	109
4.19	λ_{ex} et λ_{em} des composants de AH-U	111
4.20	Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-UO ₂ (II)	114

4.21 λ_{ex} et λ_{em} des composants de AF-Cu(II)	119
4.22 Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-Cu(II)	120
4.23 λ_{ex} et λ_{em} des composants de AF-Al(III)	123
4.24 Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-Al(III)	123
4.25 λ_{ex} et λ_{em} des composants de AF-As(V)	125
4.26 Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-As(V)	125
4.27 λ_{ex} et λ_{em} des composants de AF-Eu(III)	128
4.28 Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-Eu(III)	129
4.29 λ_{ex} et λ_{em} des composants de AF-U	132
4.30 Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-UO ₂ (II)	134
C.1 Procédure expérimentale de préparation des différentes solutions de métal	179

Contexte global

Les activités anthropiques causées par les industries et en particulier les industries nucléaires et militaires engendrent une pollution des sols et des eaux naturelles par rejets de contaminants. Dans les écosystèmes naturels notamment les milieux estuariens, la spéciation chimique des éléments métalliques peut être conditionnée par de nombreux paramètres physico-chimiques. L'étude du comportement de ces éléments est primordiale compte tenu de leur effet souvent toxique pour la faune et la flore. Il est donc nécessaire d'avoir une meilleure compréhension de leur comportement afin de remédier à cela. Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés sur cette thématique depuis plus de 70 ans et diverses techniques analytiques ont été développées dans le but d'étudier le devenir de ces polluants dans les milieux naturels parmi elles, la spectroscopie de fluorescence. Le contexte global de ce travail de recherche porte donc sur l'étude de certains métaux qui sont présents dans l'environnement soit naturellement à l'état de trace, c'est-à-dire à des concentrations très faibles, soit résultent d'activités anthropiques telles que les applications agricoles ou industrielles. La toxicité de ces éléments peut être fortement influencée par la présence de ligands inorganiques et organiques notamment la matière organique. Celle-ci peut conditionner leur spéciation et participer à limiter leur toxicité. De ce fait, étudier son interaction est essentiel pour comprendre les différents mécanismes de complexation. Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à évaluer les propriétés de complexation entre la matière organique et certains éléments métalliques pour obtenir une meilleure compréhension de leur comportement dans l'environnement. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques différentes :

- La spectroscopie de fluorescence en mode stationnaire qui nous a permis de déterminer les différentes matrices d'excitation et d'émission de fluorescence. Son couplage avec CP/PARAFAC a permis de déterminer les différentes contributions spectrales et la modélisation des contributions par régression non-linéaire a permis de déterminer les différentes constantes de stabilité à partir des graphiques de quenching de fluorescence.
- La spectroscopie de fluorescence résolue en temps a permis grâce à un algorithme de déconvolution temporelle de caractériser temporellement les interactions étudiées et donc de déduire les temps de vie et les amplitudes relatives. Cette information complémentaire apporte un grand intérêt à ce travail car les données sont manquantes ou très peu documentées dans la littérature. L'interprétation de ces données a ensuite été effectuée en utilisant le graphique de Stern-Volmer. Cette représentation des résultats nous a permis par analyse des ratios de temps de vie de répondre à une problématique importante de cette étude : le type de quenching de fluorescence qui se produit, c'est-à-dire les mécanismes de complexation engendrés.

Pour répondre à cette problématique, cette thèse s'articule autour de quelques points importants abordés dans les chapitres suivants :

- Le chapitre 1 est consacré à quelques rappels de base sur la spectroscopie de fluorescence et en l'occurrence les mécanismes du quenching de fluorescence ainsi que les techniques de mesures existantes.

- Le chapitre 2 présente le rôle de la matière organique sur le devenir des polluants dans l'environnement au travers de ces propriétés de fluorescence. Ce chapitre met également en lumière le choix des métaux étudiés ainsi que les différentes études en lien avec ce travail pour comprendre l'importance de notre étude.
- Le chapitre 3 concerne les différents instruments utilisés notamment les deux spectrofluorimètres et le système de mesure impulsionnel nanoseconde. Le protocole expérimental est également détaillé et pour clore ce chapitre, une description complète des méthodes d'analyse des données est présentée.
- Le chapitre 4 s'applique à assembler les différentes données obtenues à partir des interactions étudiées et les différentes approches mises en œuvre. Il décrit d'abord les résultats de l'acide salicylique, qui a été choisi comme modèle en tant que ligand fluorescent pour valider les méthodologies et comparer les résultats à la littérature. Sont présentés ensuite successivement les résultats obtenus avec la matière organique notamment l'acide humique et l'acide fulvique.

Chapitre 1

La Spectroscopie de Fluorescence

"Light (...) gives color and brilliance to all works of nature and of art ; it multiplies the universe by painting it in the eyes of all that breathe."

Abbé Nollet, 1783

1.1 Rappels historiques

Le phénomène de la luminescence qui vient du latin (*lumen* = lumière) a été introduit par Eilhardt Wiedemann en 1888 [Wiedemann (1888)], pour décrire tous les phénomènes de la lumière qui ne sont pas uniquement produits par l'augmentation de la température, par opposition au phénomène d'incandescence. On peut définir la luminescence comme étant l'émission de photons ultra-violet, visibles ou infrarouges qui se produit à partir de l'excitation électronique de la matière. On distingue deux types de luminescence selon le mode d'excitation de la matière, c'est-à-dire le mode d'absorption de l'énergie par les atomes ou les molécules. Lorsque l'excitation se produit par absorption de photons, l'émission de photons accompagnant la désexcitation est appelée la photoluminescence. Ce phénomène englobe la fluorescence, la fluorescence retardée et la phosphorescence. Un autre mécanisme très important peut se produire suite à l'interaction de la lumière avec d'autres objets, il s'agit de la diffusion.

Ces phénomènes facilement observables dans la nature ont fasciné l'humanité depuis plusieurs siècles. En effet, les aurores boréales, les lucioles, les vers luisants.. sont tous des exemples de luminescence naturelle.

Le terme phosphorescent qui veut dire ("qui transporte de la lumière") a été attribué depuis le Moyen Âge aux objets qui rayonnent dans l'obscurité après exposition à la lumière. Ils existent plusieurs minéraux rapportés depuis longtemps qui mettent en évidence cette propriété, le plus célèbre (mais pas le premier) est notamment la pierre de Bologne découverte en 1602 par un cordonnier de Bologne, Vincenzo Cascariolo qui, en se promenant dans les calanques de Bolognesi en direction du Monte Paterno, a ramassé quelques lourdes pierres étranges croyant pouvoir en extraire de l'or. Après calcination avec du charbon, il a observé que ces pierres émettent à l'obscurité une faible lueur rougeâtre. Il a été démontré plus tard que le minéral en question était de la barytine, un sulfate naturel de baryum, qui en le calcinant en présence de charbon, une partie du minéral se transforme partiellement en sulfure de baryum et qui a la propriété dans certaines conditions d'être phosphorescent après exposition à la lumière du jour.

Plus tard, le terme phosphore a été attribué par un autre chimiste, Christian Adolf Balduin en calcinant du nitrate de calcium. Quant à la fluorescence, le phénomène fut observé pour la première fois en 1565 par un médecin et physicien espagnol, Nicolas Monardes. Il observa une couleur bleuâtre et particulière à la surface d'une décoction de copeaux de bois de *Lignum Nephriticum*. En 1845 John Herschel, un célèbre astronome, examina de plus près les rayons dispersés par le sulfate de quinine et à la surface des *Lignum Nephriticum*, il décrit dans son article Herschel (1845) une couleur superficielle présentée par un liquide homogène, intérieurement incolore. Il a appelé ce phénomène la dispersion épipolique. Le terme 'Fluorescence' n'a été introduit qu'au milieu du dix-neuvième siècle par George Gabriel Stokes, un physicien et un professeur de mathématiques à l'université de Cambridge. Herschel ne s'est pas rendu compte que la longueur d'onde de la lumière émise est supérieure à celle de la lumière absorbée. Le phénomène a été repris et expliqué par Stokes dans son fameux article Stokes (1852) intitulé 'On the refrangibility of light' en 1852 où il prouve que l'émission bleue de la solution contenant du sulfate de quinine a pour origine l'absorption des radiations UV. On comprendra par la suite que cette émission de fluorescence est due à des impuretés que contiennent ces cristaux. Le décalage en longueur d'onde entre

l'absorption et la fluorescence est maintenant appelé 'le décalage de Stokes'. La fluorescence est donc définie comme étant la propriété que possèdent certains corps à absorber de la lumière à une certaine longueur d'onde pour l'émettre ensuite à une longueur d'onde égale (fluorescence de résonance) ou plus grande, après un intervalle de temps moyen qui va correspondre à la durée de vie de fluorescence. Elle est très utilisée car elle est rapide, facile à mettre en œuvre, non destructive et permet l'étude et la caractérisation d'un état moléculaire excité en raison des informations quantitatives et qualitatives qu'elle fournit. Nous allons donc dédier ce chapitre aux définitions relatives aux mécanismes d'absorption, d'émission et de diffusion et nous parlerons ensuite des grandeurs caractéristiques de la spectroscopie de fluorescence en particulier le rendement quantique et la durée de vie de fluorescence.

1.2 Mécanisme d'absorption

1.2.1 Nature de la lumière

Tous les objets physiques peuvent présenter des propriétés d'ondes ou de corpuscules. C'est la dualité onde-corpuscule. Ce concept fait partie des fondements de la mécanique quantique et l'exemple le plus connu est sûrement celui de la lumière.

En effet, la lumière est un phénomène physique constituée d'un ensemble d'ondes électromagnétiques caractérisées par leur fréquence ν ou leur longueur d'onde λ ($\lambda = \frac{c}{\nu}$) où c est la célérité de la lumière dans le vide. Le rayonnement d'une onde électromagnétique peut être associé en mécanique quantique à un corpuscule (photon) de masse nulle et qui est lié à l'énergie par la relation $E = h\nu$ (inversement proportionnelle à la longueur d'onde) où h est la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s)

Ainsi, la lumière présente deux aspects complémentaires selon la façon dont elle est étudiée : c'est à la fois un phénomène ondulatoire et corpusculaire.

1.2.2 Spectre d'absorbance et loi de Beer-Lambert

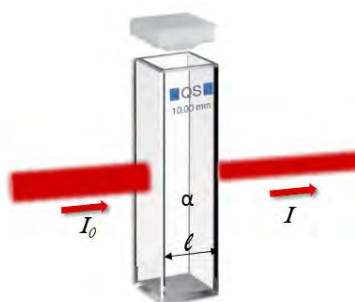


Figure 1.1 – Schéma du chemin optique pour une mesure d'absorption

Expérimentalement, la capacité d'un milieu à absorber de la lumière à une longueur d'onde λ donnée, est caractérisé par la mesure de son absorbance $A(\lambda)$ ou de sa transmittance.

tance $T(\lambda)$.

La figure 1.1 représente le principe de la mesure d'absorbance. Une étude simple de la propagation de l'onde électromagnétique dans la cuve permet de relier l'intensité transmise à l'absorbance. Supposons que chaque molécule possède une section efficace d'absorption σ (cm^{-2}) qui dépend de la longueur d'onde.

Soit une couche élémentaire de solution d'épaisseur $d\ell$ et contenant dN molécules, alors dN s'écrit :

$$dN = N_A c S d\ell \quad (1.1)$$

où :

S : est la section efficace du faisceau incident.

c : est la concentration d'une molécule donnée dans la solution.

N_A : le nombre d'Avogadro.

La section efficace d'absorption de la couche élémentaire $d\ell$ est égale à σdN . La probabilité pour capturer un photon est donc $\sigma dN/S$ qui est égale à la fraction de la lumière absorbée par la couche :

$$\frac{dI}{I} = \frac{\sigma dN}{S} = N_A \sigma c d\ell \quad (1.2)$$

En intégrant l'équation 1.2 sur une couche de solution d'épaisseur ℓ , on obtient l'évolution de l'intensité lumineuse transmise. Cette évolution est traduite par la loi de Beer-Lambert Beer (1852) définie par :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot e^{-\alpha(\lambda)\ell} \quad (1.3)$$

où $\alpha(\lambda) = N_A \sigma c$ est le coefficient d'absorption (en cm^{-1}) à la longueur d'onde λ et $I_0(\lambda)$ et $I(\lambda)$ sont les intensités incidentes et transmises à travers le milieu absorbant, respectivement. En écrivant l'équation 1.3 sous la forme :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\ell \frac{\alpha(\lambda)}{\ln(10)}} \quad (1.4)$$

Cela nous permet d'introduire donc la définition de l'absorbance $A(\lambda)$ et de la transmittance $T(\lambda)$:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right) = -\log(T(\lambda)) \quad (1.5)$$

En utilisant le logarithme népérien, les équations 1.3 et 1.5 peuvent être écrites sous la forme :

$$A(\lambda) = \ell \cdot \frac{\alpha(\lambda)}{\ln(10)} \quad (1.6)$$

$$= \epsilon(\lambda) \cdot \ell \cdot c \cdot \frac{1}{\ln(10)} = \log\left(\frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)}\right) \quad (1.7)$$

où $\epsilon(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire (généralement exprimé en $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Il est utile de faire apparaître la concentration dans la relation précédente (1.7), ainsi :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot e^{-\epsilon(\lambda) \cdot \ell \cdot c} \quad (1.8)$$

Dans le cas d'un mélange de différents composants (ϵ_i, c_i) pour N molécules différentes présentes dans le solvant, l'absorbance totale est la somme des absorbances individuelles

A_{λ}^i et l'intensité totale transmise s'écrira donc :

$$I_{\text{tot}}(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot \prod_{i=1}^N e^{-\epsilon_i(\lambda) \cdot \ell \cdot c_i} \quad (1.9)$$

Un exemple de spectre d'absorption est représenté sur la figure 1.2.

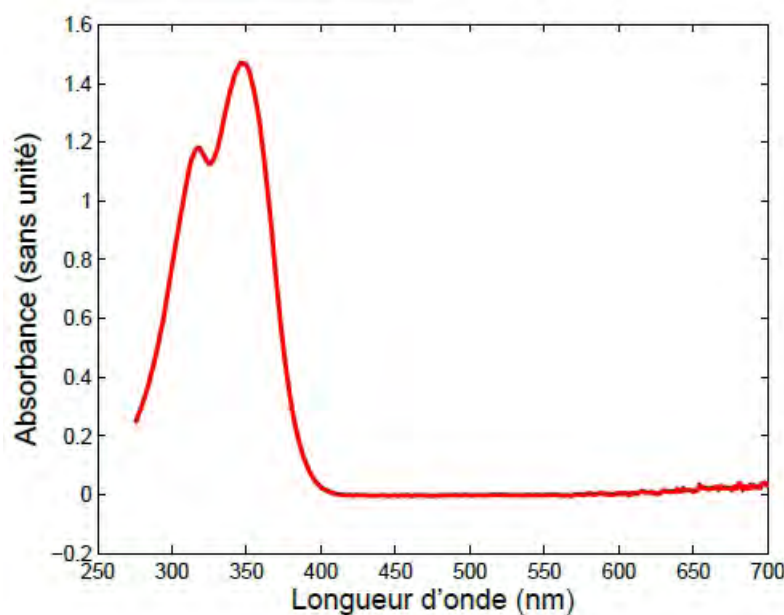


Figure 1.2 – Spectre d'absorption du sulfate de quinine [Luciani \(2007\)](#).

1.3 Grandeurs caractéristiques de la spectroscopie de fluorescence

Le temps de vie de fluorescence est défini par la durée moyenne pendant laquelle la molécule va rester à l'état excité avant son retour à l'état fondamental. Il permet donc de déterminer le temps nécessaire pour qu'il y ait interaction ou diffusion entre le fluorophore et son environnement. D'autres propriétés sont nécessaires pour caractériser l'intensité de fluorescence notamment le rendement quantique de fluorescence. Nous pouvons dire que le temps de vie de fluorescence et le rendement quantique sont probablement les caractéristiques les plus importantes d'un point de vue spectroscopique d'un fluorophore. Nous allons particulièrement nous intéresser à ces deux grandeurs dans cette partie.

1.3.1 La durée de vie de fluorescence

Une impulsion lumineuse extrêmement courte fait passer un certain nombre de molécules à l'état excité S_1 par absorption de photons. Considérons le modèle le plus simple où en

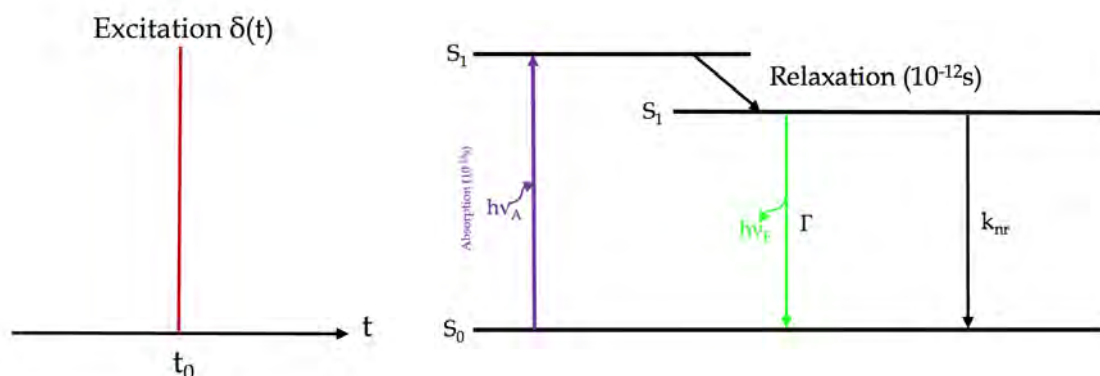


Figure 1.3 – à gauche, une excitation de Dirac classique ; à droite, le diagramme simplifié de Perrin – Jablonski pour illustrer la signification des rendements quantiques et du temps de vie de fluorescence.

toute rigueur, l'excitation est tellement brève qu'elle pourra être décrite par une distribution de Dirac (δ). Le retour à l'état fondamental peut se faire de façon radiative ou non-radiative comme représenté sur le diagramme simplifié de Jablonski (cf. figure 1.3) Lakowicz (2006).

Comme en cinétique physique classique, l'évolution de la population de photons entre les états S_1 et S_0 s'exprime par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dn(t)}{dt} = -(\Gamma + k_{nr})n(t) \quad (1.10)$$

où $n(t)$ est l'évolution de la population de photons, Γ la proportion de photons participant à l'émission par unité de temps et k_{nr} la constante de vitesse de désactivation non-radiative. Le temps de vie de fluorescence se définit donc comme le taux de décroissance de la population totale de photons n_0 , celui-ci ne reflète pas seulement les propriétés radiatives du système moléculaire excité mais il reflète aussi tous les processus de désexcitation non radiatifs. La durée de vie peut être écrite sous la forme suivante :

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (1.11)$$

La durée de vie est une valeur moyenne du temps passé dans l'état excité. Pour une décroissance mono-exponentielle (1.12), environ 63% des molécules retournent à l'état fondamental avant $t = \tau$ et 37% à $t > \tau$ Lakowicz (2006).

La résolution de l'équation 1.10 donne la population pour une seule molécule $n(t) = n_0 e^{-t/\tau}$ et donc l'intensité $I(t)$ de la fluorescence qui lui est proportionnelle pour une longueur d'onde donnée est :

$$I(t) \propto -\frac{dn(t)}{dt} \Rightarrow I(t) = I(0) e^{-(t/\tau)} \quad (1.12)$$

Dans le cas général, la contribution de plusieurs états ou espèces à la fluorescence totale est possible, chacun étant caractérisé par sa propre durée de vie. De ce fait, les contributions de toutes les molécules fluorescentes s'additionnent et l'utilisation d'une somme de fonctions

mono-exponentielles est légitime et prend la forme suivante :

$$I(t) = I(0) \sum_{i=1}^N \alpha_i e^{-(t/\tau_i)} \quad (1.13)$$

où α_i et τ_i sont la contribution relative à l'intensité totale de fluorescence et la durée de vie du fluorophore i , respectivement.

1.3.2 Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence Φ_F est la portion de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 avec émission de photons à partir de l'état excité S^* . Il peut s'exprimer à l'aide des constantes de désactivation de la façon suivante :

$$\Phi_F = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} = \tau \Gamma \quad (1.14)$$

En d'autres mots, le rendement quantique de fluorescence est le rapport du nombre total de photons émis par fluorescence par le nombre total de photons absorbés. Les substances avec le plus grand rendement quantique, ce qui implique donc un taux de désactivation non-radiative plus petit que le taux d'émission ($k_{nr} < \Gamma$) (exemple : la rhodamine [Lakowicz \(2006\)](#)), présentent une émission de fluorescence importante.

Des exemples de rendements quantiques et de durées de vie de fluorescence d'hydrocarbures aromatiques sont rapportés dans le tableau [1.1 Valeur and Berberan-Santos \(2012\)](#).

Composant	Solvant(Température °C)	Φ_F	τ_s (ns)
Benzène	éthanol(20 °)	0.04	31
Naphtalène	éthanol(20 °)	0.21	2.7
	cyclohexane(20 °)	0.19	96
Anthracène	éthanol(20 °)	0.27	5.1
	cyclohexane(20 °)	0.30	5.24
Pérylène	cyclohexane(20 °)	0.78	6
Pyrène	éthanol(20 °)	0.65	410
	cyclohexane(20 °)	0.65	450
Phénanthrène	n-Heptane(20 °)	0.16	60

Tableau 1.1 – Rendements quantiques et temps de vie de fluorescence de quelques hydrocarbures aromatiques

En fonction de l'environnement extérieur comme les variations de température, il est possible que le rendement quantique soit proportionnel au temps de vie de fluorescence de l'état excité (par exemple dans le cas du quenching dynamique ; voir section [1.5.1](#)). Cela dit, une telle proportionnalité peut être mise en défaut si les désactivations découlent d'interactions avec d'autres molécules [Valeur and Berberan-Santos \(2012\)](#). Un cas révélateur où le rendement quantique de fluorescence est affecté sans changement du temps de vie de l'état excité est celui de la formation de complexes à l'état fondamental (quenching statique ; voir section [1.5.2](#)).

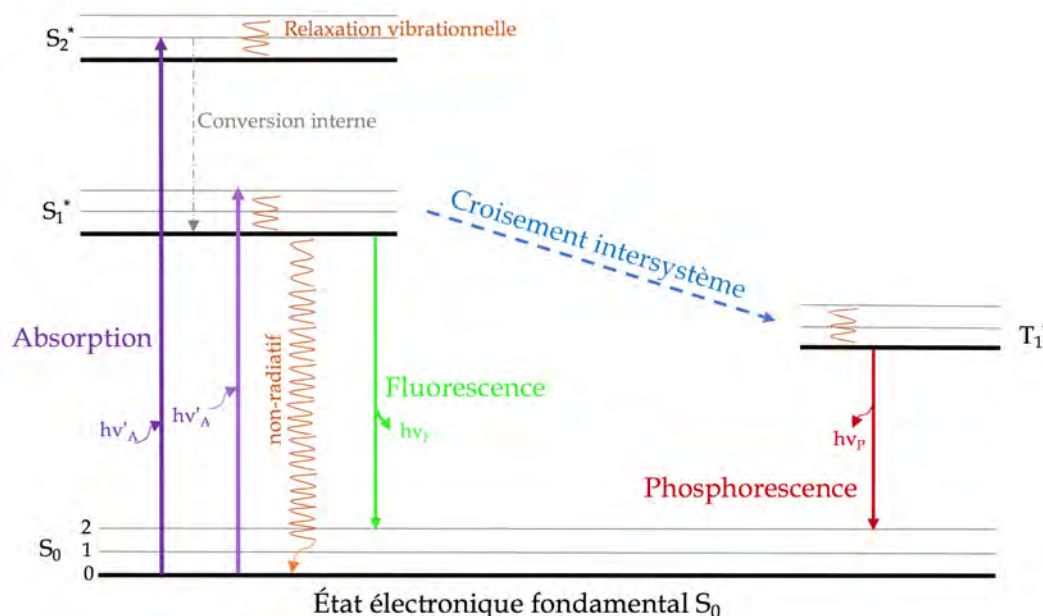


Figure 1.4 – Diagramme de Perrin – Jablonski des états électroniques
Exemple de transition électronique vers des niveaux d'énergie supérieurs après absorption de photons.

1.4 Caractéristiques de l'émission de fluorescence

1.4.1 Transition entre état électronique et mécanisme de désexcitation

Quand un photon entre en interaction avec une molécule, celle-ci se trouve dans un état excité en l'absorbant et peut restituer une partie de l'énergie sous forme de radiation. Le diagramme énergétique de Perrin-Jablonski représenté sur la figure 1.4 permet de visualiser les différents processus mis en jeu lors de l'absorption d'un photon. Sans apport d'énergie extérieure, la molécule se trouve à l'état fondamental S_0 . Cet état singulet est stable et correspond à la configuration d'énergie minimale. Un électron peut passer à un état de plus haute énergie appelé état excité S_1^* s'il reçoit une énergie suffisante, ou passer d'un état excité S_1^* à un état excité S_2^* de niveau d'énergie supérieur et ainsi de suite jusqu'aux niveaux électroniques S_n^* . La probabilité pour que l'électron se trouve dans un espace donné est traduite par la fonction d'onde qu'on appelle orbitale moléculaire. À chaque orbitale moléculaire correspond un niveau d'énergie électronique. La répartition des électrons sur les différentes orbitales détermine la configuration électronique de la molécule. Des niveaux intermédiaires d'énergie vibrationnelle et rotationnelle liés aux mouvements des atomes sont associés à chaque état électronique.

Absorption : L'absorption d'un photon peut porter une molécule dans l'un des états électroniques S_1^* , S_2^* , ..., S_n^* . Les flèches verticales correspondant à l'absorption partent du niveau vibrationnel le plus bas de S_0 car les molécules sont quasiment toutes dans ce niveau à température ordinaire selon la loi de Boltzmann. Il convient de remarquer que la conformation

de la molécule ne change pas durant l'absorption et que le processus est très rapide, il ne dure que $10^{-15} s$.

Conversion interne : Le processus de désexcitation qui s'ensuit se fait principalement par transition non radiative appelé la conversion interne (CI). En solution, la molécule excitée perd de l'énergie avant d'atteindre le niveau électronique le plus bas de même multiplicité, c'est la loi de Kasha. Cette perte d'énergie ne dure que $10^{-12} s - 10^{-9} s$.

Émission de fluorescence : Il s'agit d'une désactivation radiative et spontanée qui est aussi rapide que l'absorption d'un photon ($\approx 10^{-15} s$). Néanmoins, après excitation d'une population de molécules par une impulsion lumineuse particulièrement brève, les molécules excitées demeurent au niveau S_1^* pendant un certain moment avant d'émettre un photon ou se désexciter par d'autres voies. L'intensité de fluorescence diminue exponentiellement avec un temps caractéristique de l'ordre de quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de microsecondes voire millisecondes pour certains atomes, selon le milieu et le type de molécule. C'est le temps de vie de fluorescence τ . L'absorption et l'émission de fluorescence se produisent dans une gamme spectrale connue appelée respectivement spectre d'absorption et spectre d'émission représentant la probabilité d'absorption et émission en fonction de λ . Pour les molécules fluorescentes présentes dans un solvant, le spectre d'émission est situé à des énergies plus basses et donc à des longueurs d'onde plus grande que le spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle dans l'état excité. Cet écart est appelé le déplacement de Stokes **Stokes (1852)**. Du fait de la règle de Kasha en milieu liquide, le spectre d'émission est indépendant de l'excitation.

Croisement intersystème et phosphorescence : Une troisième voie de désexcitation de l'ordre de $10^{-9} s - 10^{-7} s$ à partir de S_1^* est possible. C'est le croisement intersystème vers l'état triplet à partir duquel une éventuelle émission de photons peut être observée. C'est une transition non radiative entre deux niveaux vibrationnels appartenant à des états électroniques de multiplicités différentes. L'émission à partir d'un état T s'appelle la phosphorescence. La transition $T_1^* \rightarrow S_0$ est en principe interdite mais le couplage entre le moment magnétique orbital et le moment magnétique de spin peut être suffisamment important pour la rendre possible. Elle se produit sur une échelle temporelle beaucoup plus grande que la fluorescence variant de $10^{-6} s$ jusqu'à quelques secondes ou minutes. Du fait que le plus bas niveau vibrationnel de l'état triplet T_1^* soit situé en dessous de l'état singulet S_1^* implique que le spectre de phosphorescence soit situé à des longueurs d'onde plus grandes que celles du spectre de fluorescence.

Fluorescence retardée : Un autre chemin de désexcitation est la fluorescence retardée. Lorsque la durée de vie de T_1^* est suffisamment longue et que la différence d'énergie entre S_1^* et T_1^* est petite, le passage intersystème inverse $T_1^* \rightarrow S_1^*$ peut se produire, ce qui entraîne une émission ayant la même distribution spectrale que la fluorescence normale mais avec une durée de vie plus importante puisque les molécules résident dans l'état T_1^* avant d'émettre un photon à partir de S_1^* . Notons que cette émission de fluorescence décalée dans le temps est activée thermiquement, c'est pourquoi son rendement croît lorsque la température augmente. Elle ne se produit pas avec les hydrocarbures aromatiques en raison de l'écart qui sépare les deux états.

1.4.2 Mesure de spectres de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une technique qui permet de mettre en évidence le phénomène de l'interaction lumière-matière et qui peut renseigner sur la structure électronique de la molécule et par conséquent, sa chimie.

La spectroscopie en mode stationnaire implique l'utilisation d'une source d'excitation continue dans le temps dont la longueur d'onde d'excitation se trouve dans la bande d'absorption des molécules excitées, elle permet ensuite de mesurer l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde à travers le spectre d'excitation, d'émission ou les deux.

1.4.2.1 Fonctionnement du spectrofluorimètre

Après avoir décrit le sens physique de la fluorescence, nous allons décrire le principe de mesure.

Pour mesurer l'intensité de fluorescence, on utilise un spectrofluorimètre. Nous pouvons distinguer trois types de spectres, les spectres d'excitation, d'émission et d'excitation-émission. Les spectres de chaque fluorophore lui sont spécifiques dans des conditions données. Ainsi, le traitement de ces signaux sera la base de l'analyse spectroscopique de fluorescence. Le principe de fonctionnement d'un spectrofluorimètre standard est schématisé sur la figure 1.5.

La source de lumière excitatrice utilisée est souvent une source continue dans le temps de type lampe au Xénon (450 W) à large bande spectrale permettant une excitation relativement stable de 200 nm jusqu'à 900 nm. L'intensité de cette lampe s'écroule en dessous de 240 nm ce qui a tendance à dégrader le rapport signal sur bruit. La longueur d'onde d'excitation est choisie grâce à un monochromateur. Ce monochromateur permet de sélectionner une longueur d'onde d'excitation avec une certaine précision grâce à un réseau de diffraction. Pour rappel, la relation fondamentale des réseaux de diffraction par réflexion (les plus couramment utilisés en spectroscopie de fluorescence) s'écrit :

$$\sin i' + \sin i = n\lambda \quad (1.15)$$

avec

i : angle incident

i' : angle diffracté

n : nombre de traits par mm

k : l'ordre de diffraction

λ : la longueur d'onde en nm

En changeant donc l'inclinaison du réseau, on sélectionne la longueur d'onde d'excitation projetée sur la fente d'excitation. Le faisceau exciteur est ensuite focalisé à l'aide d'un miroir parabolique ou toroïdal pour éviter les aberrations chromatiques puis dirigé vers la cellule en quartz contenant la solution. Le tout placé dans une chambre noire afin d'éviter la perturbation par les lumières parasites. Une partie est déviée vers un système de comptage de photons qui servira à la correction de l'intensité mesurée qui est dépendante de $I_0(\lambda)$. Le signal d'émission de fluorescence est ensuite dirigée vers un second monochromateur qui

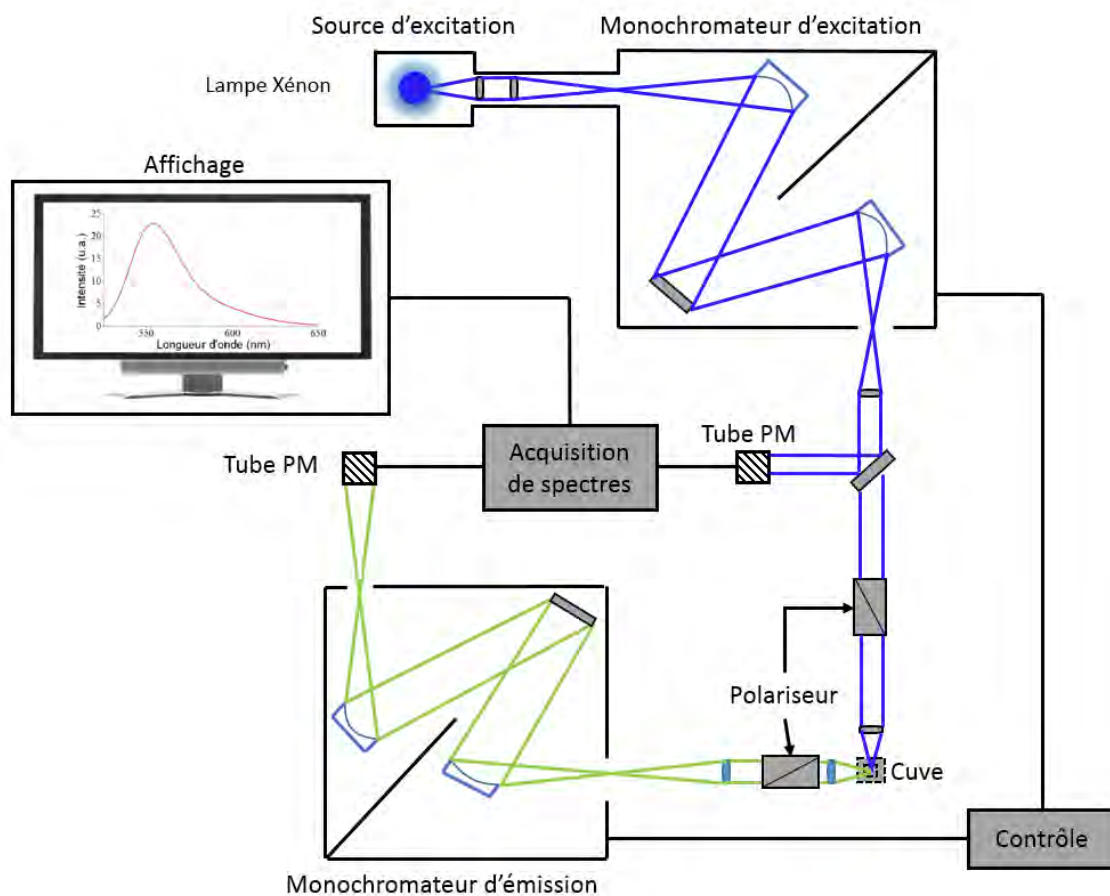
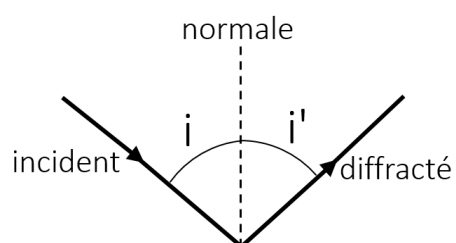


Figure 1.5 – Principe de fonctionnement d'un spectrofluorimètre standard

Figure 1.6 – Schéma représentant l'angle d'incidence i de la diffraction i'

ne laisse passer que la longueur d'onde d'émission sélectionnée. Il faut noter que les deux monochromateurs sont motorisés et balaient les gammes de longueurs d'onde définies par l'utilisateur. Ils ont des caractéristiques identiques dans la plupart des spectrofluorimètres. Le signal d'émission est ensuite collecté et amplifié par un tube photomultiplicateur (PM) perpendiculaire au faisceau incident car l'intensité de la diffusion Rayleigh par les molécules du solvant est minimale dans cette direction. Le rôle d'un tube PM est de multiplier les électrons primaires (photo-électrons) engendrés par les photons, ces photo-électrons sont accélérés par une tension de plusieurs centaines de volts et leur énergie cinétique permet de générer par collisions successives, un nombre croissant d'électrons arrachés aux dynodes qui constituent le tube PM. Son gain dépend de la tension accélératrice appliquée à ses bornes et du nombre de dynodes [Lakowicz \(2006\)](#).

1.4.2.2 Spectres d'excitation et d'émission

Le spectre d'excitation représente les variations de l'intensité de fluorescence, en fonction de la longueur d'onde d'excitation, pour une longueur d'onde d'émission fixée. Quant au spectre d'émission, il s'agit de représenter les variations de l'intensité de fluorescence, en fonction de la longueur d'onde d'émission, pour une longueur d'onde d'excitation fixée. Le rendement quantique de fluorescence (rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés), peut s'écrire de la façon suivante en remplaçant le nombre de photons par l'intensité associée :

$$\Phi = \frac{\int I_F(\lambda_{em}) d\lambda_{em}}{I_{abs}(\lambda_{ex})} \quad (1.16)$$

De ce fait, l'intensité absorbée $I_{abs}(\lambda_{ex})$ à la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} est définie à partir de l'équation (1.3) :

$$I_{abs}(\lambda_{ex}) = I_0(\lambda_{ex}) - I(\lambda_{ex}) \quad (1.17)$$

$$= I_0(\lambda_{ex})(1 - e^{-\alpha(\lambda_{ex})\ell}) \quad (1.18)$$

On définit la densité de probabilité d'émission $F_\lambda(\lambda_{em})$ d'un photon à la longueur d'onde d'émission λ_{em} dont la distribution représente le spectre d'émission, par l'équation :

$$\int_0^\infty F_\lambda(\lambda) d\lambda = 1 \quad (1.19)$$

Dans le cas le plus simple, pour une solution peu concentrée et contenant un seul fluorophore, le spectre mesuré $I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ excité à λ_{ex} et récolté à λ_{em} , est proportionnel à l'intensité absorbée et au spectre réel :

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = k \cdot I_{abs}(\lambda_{ex}) \cdot F_\lambda(\lambda_{em}) \quad (1.20)$$

$$= k \cdot F_\lambda(\lambda_{em}) \cdot I_0(\lambda_{ex})(1 - e^{-\alpha(\lambda_{ex})\ell}) \quad (1.21)$$

Le coefficient k est lié au dispositif de mesure. Il dépend de nombreux paramètres et il ne peut donc être déterminé simplement. Cependant, cela est inutile tant que la forme du spectre d'émission est conservée par la mesure.

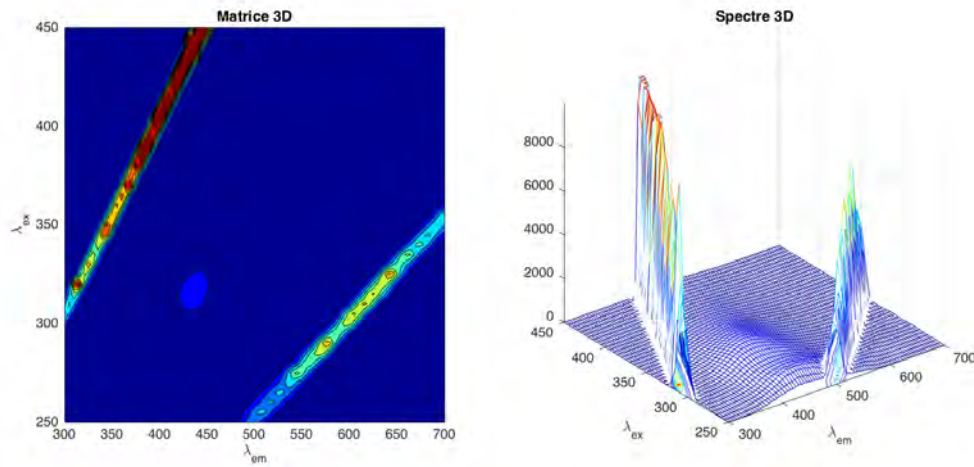


Figure 1.7 – Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence non corrigée

En prenant en compte le spectre d'émission ($\gamma(\lambda_f) = \frac{F(\lambda_f)}{\Phi}$) l'équation 1.21 peut se réécrire comme suit :

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = k \cdot \gamma(\lambda_{em}) \cdot \Phi \cdot I_0(\lambda_{ex}) (1 - e^{-\alpha(\lambda_{ex})\ell}) \quad (1.22)$$

Pour le même type de solution, l'approximation au premier ordre de l'équation précédente devient :

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \approx k \cdot \gamma(\lambda_{em}) \cdot \Phi \cdot I_0(\lambda_{ex}) \cdot \alpha(\lambda_{ex}) \cdot \ell \quad (1.23)$$

$$\approx k \cdot \gamma(\lambda_{em}) \cdot \Phi \cdot I_0(\lambda_{ex}) \cdot \epsilon(\lambda_{ex}) \cdot \ell \cdot c \quad (1.24)$$

Dans le cas d'un mélange de N fluorophores, on mesure une combinaison linéaire des spectres individuels pour le couple de longueurs d'onde d'excitation et d'émission ($\lambda_{ex}, \lambda_{em}$) par l'expression suivante :

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) \approx I_0(\lambda_{ex}) \cdot k \cdot \ell \sum_{n=1}^N \Phi_n \cdot \gamma_n(\lambda_{em}) \epsilon_n(\lambda_{ex}) \cdot c_n \quad (1.25)$$

En spectroscopie de fluorescence, l'utilisation des monochromateurs successivement permet de mesurer les spectres d'émission pour différentes longueurs d'onde d'excitation. Ainsi, l'intensité de fluorescence $I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ se nomme Matrice d'Excitation et d'Émission de Fluorescence (MEEF). Un exemple d'une MEEF est donné sur la figure 1.7.

En fixant la longueur d'onde d'excitation et en faisant varier les longueurs d'onde d'émission, on mesure le spectre d'émission :

$$I_F(\lambda_{em}) \approx k \sum_{n=1}^N \epsilon_n(\lambda_{ex}) \cdot c_n \cdot \Phi_n \cdot \gamma_n(\lambda_{em}) \quad (1.26)$$

En fixant la longueur d'onde d'émission, on mesure le spectre d'excitation en faisant varier les longueurs d'onde d'excitation :

$$I_F(\lambda_{ex}) \approx k \cdot I_0(\lambda_{ex}) \cdot \ell \sum_{n=1}^N c_n \cdot F_{\lambda,n} \cdot \epsilon_n(\lambda_{ex}) \quad (1.27)$$

Ainsi, la réponse de fluorescence en milieu dilué étant proportionnelle à l'intensité incidente, la spectroscopie de fluorescence en mode stationnaire est une méthode très utilisée pour les applications géochimiques, biologiques ou environnementales. Du fait de sa sensibilité, sa rapidité et de la facilité relative de sa mise en œuvre, elle peut être utilisée pour l'analyse des milieux dilués notamment pour des concentrations très faibles [Midorikawa and Tanoue \(1998\)](#).

1.5 Principe du quenching de Fluorescence

Le quenching de fluorescence fait référence au processus de diminution de l'intensité de fluorescence d'une solution suite à une variété d'interactions moléculaires. La plupart de ces processus mettent en jeu l'interaction d'une molécule excitée F^* avec une autre molécule Q selon le schéma [1.8 Valeur and Berberan-Santos \(2012\)](#) dans lequel k_q représente la constante de vitesse observée.

Suite à une excitation par impulsion lumineuse, la fluorescence de la molécule excitée F^* est affectée par la présence de molécules quenchers Q . Celles-ci entraînent un nouveau chemin de désactivation et une nouvelle espèce moléculaire caractérisée par un temps de vie qui lui est propre. L'analyse des phénomènes observés fournit de précieuses informations sur l'environnement de la molécule fluorescente, soit quantitativement si une analyse cinétique peut être faite sur la base d'un modèle cinétique des processus compétitifs, soit qualitativement [Valeur and Berberan-Santos \(2012\)](#).

Quand un processus impliquant F^* et Q est en compétition avec la désexcitation intrinsèque de F^* , plusieurs phénomènes peuvent être distingués, nous allons nous intéresser spécifiquement au quenching statique et au quenching dynamique.

1.5.1 Quenching physique par collision (Dynamique)

Le quenching dynamique résulte d'une interaction bimoléculaire entre F^* et Q contrôlée par la diffusion. Dans ce cas, le quenching a lieu chaque fois qu'une molécule quenseur présente une diffusion dans la zone de réaction. L'approche mutuelle des deux molécules F^* et Q est possible pendant la durée de vie de l'état excité. Le quenching dynamique est

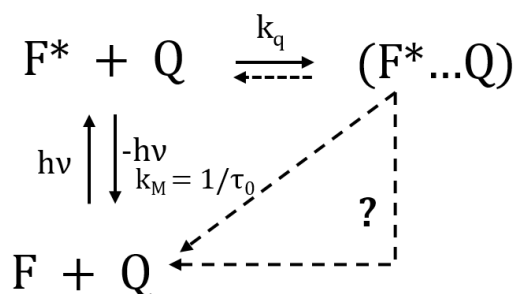


Figure 1.8 – Interaction d'une molécule excitée F^* avec une autre molécule Q

illustré par le schéma 1.9 Turro (1991). ($F^* \dots Q$) représente l'état de transition formé lors de la collision et ($F \dots Q$) représente l'état intermédiaire résultant lorsque l'excès d'énergie a été dissipé en chaleur. La première étape après excitation de F et Q est limitée par la diffusion des molécules et les constantes de vitesse k_d et k_{-d} sont les constantes diffusionnelles d'association et de dissociation du complexe ($F^* \dots Q$), respectivement. La deuxième étape est régie par le mécanisme interne de quenching dont la constante de vitesse est k_i . Le terme $k_M (= 1/\tau_0)$ est la constante de vitesse pour la désexcitation intrinsèque de F^* .

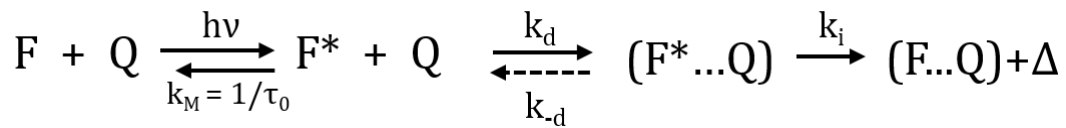


Figure 1.9 – Processus d'interaction entre F^* et Q lors d'un quenching dynamique
Les caractéristiques de fluorescence du complexe sont les mêmes que celle de F^*

Selon le schéma simplifié 1.8, l'évolution temporelle de la concentration en F^* suite à une excitation impulsionnelle satisfait l'équation différentielle suivante :

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k_M + k_q[Q])[F^*] \quad (1.28)$$

$$= -(1/\tau_0 + k_q[Q])[F^*] \quad (1.29)$$

L'intégration de cette équation différentielle avec la condition initiale $[F^*] = [F^*]_0$ à $t=0$ donne :

$$[F^*] = [F^*]_0 \exp(-(1/\tau_0 + k_q[Q])t) \quad (1.30)$$

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de F^* et est donnée par :

$$I(t) = k_r[F^*] = k_r[F^*]_0 \exp(-(1/\tau_0 + k_q[Q])t) \quad (1.31)$$

$$= I(0) \exp(-(1/\tau_0 + k_q[Q])t) \quad (1.32)$$

où k_r est le taux de désexcitation radiative de F^* . Le déclin de fluorescence est alors mono-exponentiel avec une constante de temps qui s'écrit :

$$\tau = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + k_q[Q]} = \frac{\tau_0}{1 + k_q\tau_0[Q]} \quad (1.33)$$

D'où :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (1.34)$$

Des expériences résolues en temps effectuées en absence et en présence de quenchers permettent de vérifier que le déclin de fluorescence est bien mono-exponentiel Lakowicz (2006), et dans ce cas, elles conduisent directement à la valeur de k_q . Le rendement quantique de fluorescence en présence d'inhibiteur est :

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]} = \frac{k_r}{1/\tau_0 + k_q[Q]} \quad (1.35)$$

Φ est plus petit que Φ_0 , le rendement quantique en absence d'inhibiteur, dont l'expression est :

$$\Phi_0 = k_r \tau_0 \quad (1.36)$$

Les deux relations précédentes (1.35 et 1.36) conduisent à la relation de Stern-Volmer :

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1.37)$$

où F_0 et F sont respectivement les intensités de fluorescence stationnaires en absence et en présence de quencheurs. $K_{SV} = k_q \tau_0$ est la constante de Stern-Volmer qui s'exprime en $L \cdot mol^{-1}$. Généralement, la représentation du rapport F_0/F en fonction du quencheur est appelé graphique de Stern-Volmer. Si la variation est linéaire, la pente donne la constante de Stern-Volmer Lakowicz (2006). Ainsi, k_q qui n'est, entre autres, que la constante apparente de quenching dynamique de la réaction 1.9, est égale à k_d quand l'efficacité de la réaction ζ tend vers l'unité ($k_q = \zeta \cdot k_d$). k_d représente la constante de diffusion donnée par l'équation de Smoluckowski (en négligeant le terme transitoire)

$$k_d = 4\pi \cdot D R_0 N_A / 1000 \quad (1.38)$$

où D et R_0 sont la somme des coefficients de diffusion et des rayons moléculaires respectivement, du quencheur et du fluorophore, N_A est le nombre d'Avogadro, le facteur 1000 est nécessaire pour maintenir les unités correctes lorsque la concentration est exprimée en molarité. Si l'interaction entre F^* et Q est faible, et que l'efficacité de la réaction est plus petite que 1, les caractéristiques de fluorescence de l'intermédiaire $F^* \dots Q$ sont les mêmes que celle de F^* et tous les complexes formés entre F^* et Q ne produisent pas de quenching. k_q est donc approximativement égale à $k_d k_i / k_{-d}$.

1.5.2 Quenching par complexation (Statique)

Dans la section précédente, nous avons décrit le quenching dynamique, qui est un processus dépendant du temps. Le quenching peut aussi se produire suite à la formation d'un complexe non-fluorescent à l'état fondamental entre le fluorophore et le quencheur (cf. figure 1.10) Lakowicz (2006).

Dans ce cas là, la dépendance de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des quencheurs est facilement connue en considérant la constante de stabilité du complexe. Cette constante est donnée par :

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad (1.39)$$

où $[FQ]$ est la concentration du complexe. $[F]$ est la concentration du fluorophore non complexé et $[Q]$ est la concentration du quencheur. Si le complexe formé est non fluorescent, alors le rapport F/F_0 est donnée par le rapport des fluorophores totaux qui ne sont pas complexés.

En utilisant l'expression de la constante de stabilité du complexe (1.39) et la loi de conservation de la masse :

$$[F]_0 = [F] + [FQ] \quad (1.40)$$

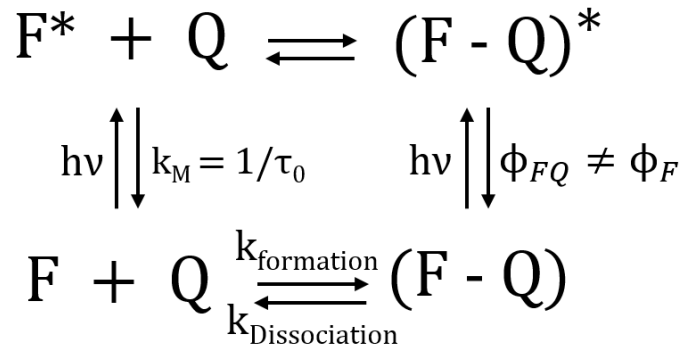
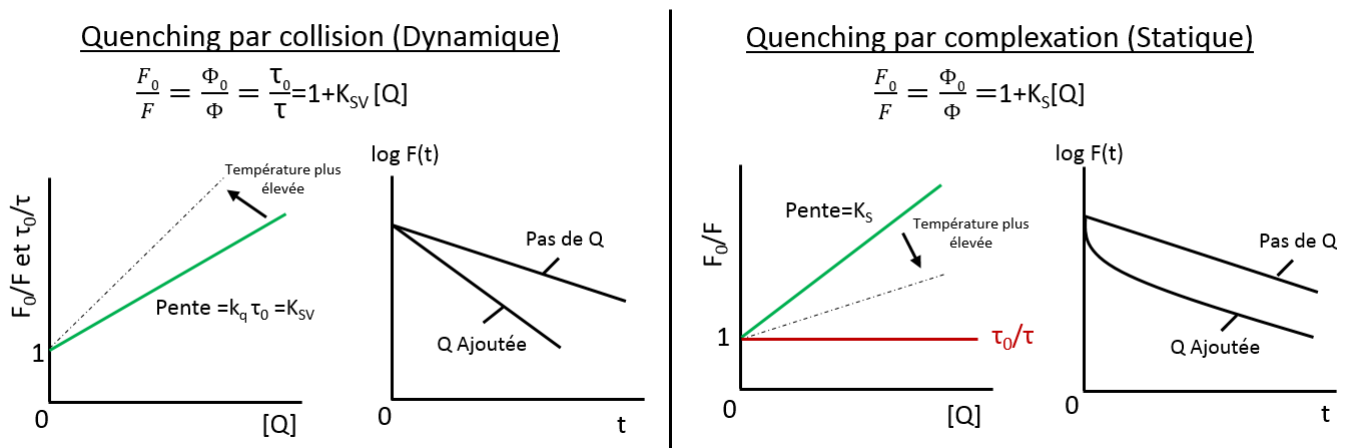
Figure 1.10 – Processus d'interaction entre F^* et Q lors d'un quenching statique

Figure 1.11 – Comparaison entre le quenching statique et dynamique

où $[F]_0$ est la concentration totale en F . En combinant les équations 1.39 et 1.40, on obtient :

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (1.41)$$

Cette relation peut être réécrite sous la forme :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q] \quad (1.42)$$

Il est à noter que F_0/F en fonction de $[Q]$ est linéaire, ce qui est identique au quenching dynamique (figure 1.11). Cependant, l'intensité de fluorescence diminue en fonction des ajouts de quenchers mais la durée de vie de l'état excité des fluorophores F non complexés n'est pas affectée alors que pour le quenching dynamique, le rapport F_0/F est proportionnel au rapport τ_0/τ des durées de vie.

Dans certaines situations, nous pouvons suivre la formation d'un complexe en suivant par exemple la variation de son spectre d'absorption lors de la complexation. Dans le cas contraire, l'interaction est non spécifique et le modèle de la sphère de quenching est plus approprié. Quand F^* et Q ne se déplacent pas l'un par rapport à l'autre pendant la durée

de vie de l'état excité, Perrin (1924) a proposé un modèle dans lequel le quenching de fluorescence d'un fluorophore est supposé total si le quenchneur se trouve à l'intérieur d'une sphère (1.12), dite sphère de quenching effective de volume V_q entourant le fluorophore F. Si Q est situé en dehors du volume, il n'affecte pas F.

La probabilité que n quenchers se retrouvent dans la sphère obéit à la distribution de Poisson :

$$P_n = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} \exp(-\langle n \rangle) \quad (1.43)$$

où $\langle n \rangle$ est le nombre moyen de quenchneur dans le volume V_q : $\langle n \rangle = V_q N_A [Q]$ (N_A est le nombre d'Avogadro). La probabilité qu'il n'y ait aucun quenchneur dans la sphère est donnée par :

$$P_0 = \exp(-\langle n \rangle) = \exp(-V_q N_A [Q]) \quad (1.44)$$

Par conséquent, vu que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à P_0 , le modèle de Perrin conduit à l'expression suivante :

$$\frac{F_0}{F} = \exp(V_q N_A [Q]) \quad (1.45)$$

Contrairement à la relation de Stern-Volmer, le rapport F_0/F n'est pas linéaire et présente une courbure vers le haut à concentration élevée en Q. Sinon, si la concentration est faible, $\exp(V_q N_A [Q]) \cong 1 + V_q N_A [Q]$, de sorte que la variation en fonction de la concentration devient quasi-linéaire et tend vers la relation de Stern-Volmer 1.37. Il est à noter que V_q peut être obtenu avec la courbe de $\ln(F_0/F)$ en fonction de $[Q]$.

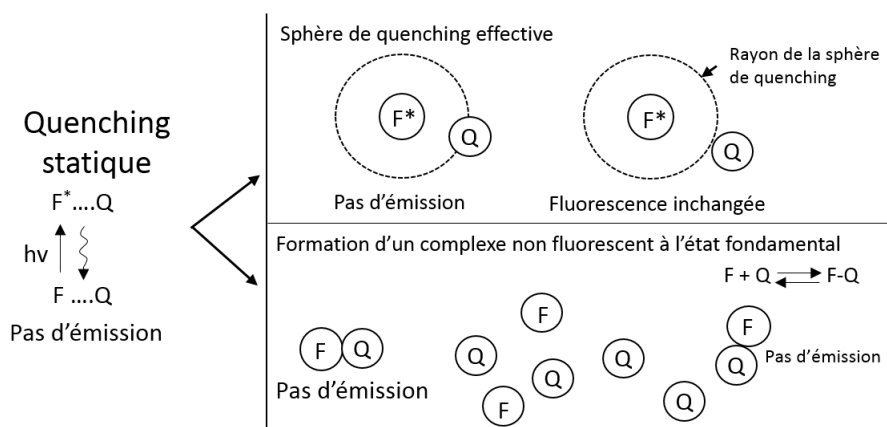


Figure 1.12 – Illustration du quenching statique

1.5.3 Combinaison du quenching statique et dynamique

Dans de nombreux cas, le quenching statique et le quenching dynamique peuvent avoir lieu simultanément. En effet, les fluorophores peuvent être quenchés à la fois par des collisions et par formation d'un complexe avec le même quenchneur. Il en résulte une déviation par rapport à la linéarité des variations de F_0/F en fonction de $[Q]$ (cf. figure 1.13).

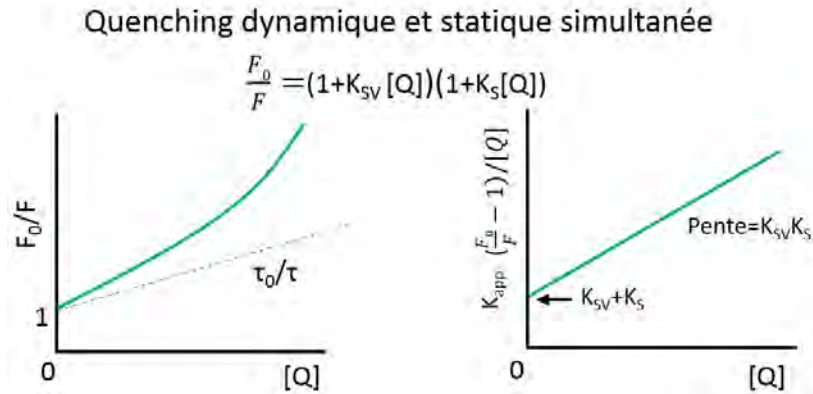


Figure 1.13 – Comparaison entre le quenching statique et dynamique [Valeur and Berberan-Santos \(2012\)](#)

Si on considère le cas d'un quenching statique où nous avons une formation d'un complexe non fluorescent, le rapport F_0/F obtenu par le quenching dynamique doit donc être multiplié par la fraction de molécules fluorescentes (non complexées) et nous avons donc :

$$\frac{F}{F_0} = f \frac{\gamma}{\gamma + k_q[Q]} \quad (1.46)$$

Où $\gamma = \tau_0^{-1}$ et $f^{-1} = 1 + K_S[Q]$. L'inversion et le réarrangement de l'équation 1.46 donnent :

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_S[Q])(1 + K_{SV}[Q]) \quad (1.47)$$

Cette forme modifiée de l'équation de Stern-Volmer est de second ordre en $[Q]$ ce qui représente la courbe (en vert) observée lorsque les deux quenching se produisent pour le même fluorophore (cf. figure 1.13) [Lakowicz \(2006\)](#).

Le quenching dynamique observé peut être déterminé par la mesure du temps de vie de fluorescence, à savoir, $\tau_0/\tau = 1 + K_{SV}[Q]$ (la courbe en pointillés sur la figure 1.13).

Si les mesures de temps de vie ne sont pas disponibles, alors l'équation 1.47 peut être modifiée et permet la séparation de K_S et K_{SV} (qui peuvent être déterminés par ajustement numérique) :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_{SV} + K_S)[Q] + K_{SV}K_S[Q]^2 \quad (1.48)$$

Une autre méthode consiste à tracer les variations de $\frac{F_0}{F} - 1/[Q]$ en fonction de $[Q]$ qui doivent être linéaires 1.13 et nous avons :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app}[Q] \quad (1.49)$$

Où

$$K_{app} = \left[\frac{F_0}{F} - 1 \right] \frac{1}{[Q]} = (K_{SV} + K_S) + K_{SV}K_S[Q] \quad (1.50)$$

La figure 1.13 résume les différents cas possibles de quenching. Il convient de souligner que les expériences résolues en temps sont nécessaires pour l'attribution des constantes de quenching dynamiques et statiques.

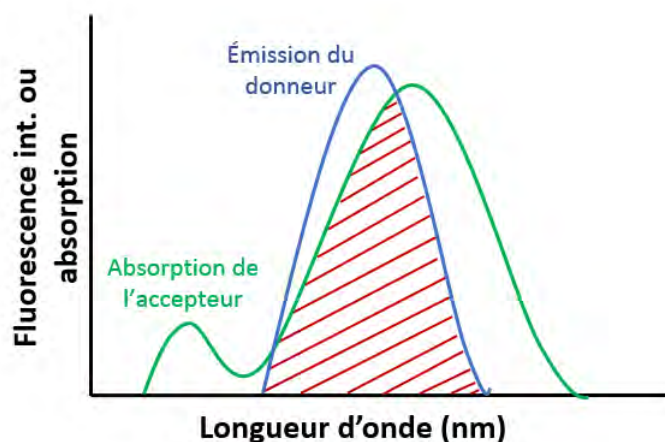


Figure 1.14 – Illustration du recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

1.6 Transfert d'énergie par résonance : FRET

Un autre processus très important qui peut avoir lieu à l'état excité est le transfert d'énergie par résonance (TER). Le TER d'une molécule excitée (donneur) à une autre molécule chimiquement différente (accepteur) est défini selon :



C'est un processus non-radiatif (sans émission de lumière) entre molécules qui peut se produire à condition que le spectre d'émission du donneur recouvre, au moins partiellement, le spectre d'absorption de l'accepteur. Un tel chevauchement est illustré sur la figure 1.14 [Valeur and Berberan-Santos \(2012\)](#). Ce recouvrement des spectres est défini par une intégrale appelée intégrale de recouvrement J :

$$J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1.52)$$

où f_D est l'intensité de la fluorescence émise par le donneur à une longueur d'onde donnée et ϵ_A le coefficient d'extinction molaire de l'accepteur. Le facteur J reflète donc la capacité d'une paire de fluorophores à émettre et absorber de l'énergie à la même longueur d'onde.

L'accepteur n'a pas besoin d'être fluorescent. Il est important de comprendre que le transfert d'énergie par résonance n'implique pas forcément l'émission de lumière par le donneur. Le transfert ne résulte pas de l'émission due à l'absorption du donneur par l'accepteur. De tels processus de réabsorption dépendent de la concentration de l'accepteur et des facteurs non-moléculaires tels que la taille de l'échantillon, et sont donc de moindre intérêt.

Il n'existe aucun photon intermédiaire dans le TER. Le donneur et l'accepteur sont couplées par une interaction dipôle-dipôle. C'est pour cette raison que le terme transfert d'énergie par résonance est mieux que le terme FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) qui est couramment utilisé.

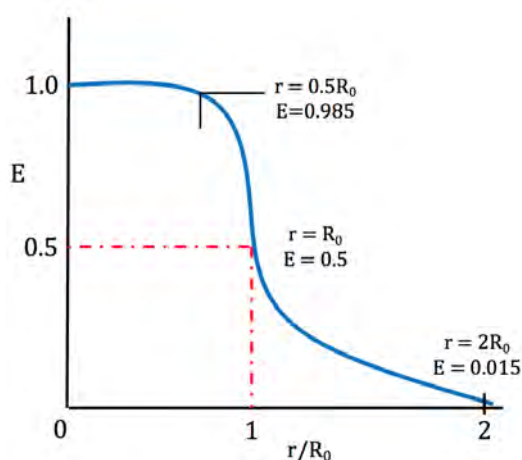


Figure 1.15 – Dépendance de l'efficacité de transfert par rapport à la distance.

L'importance du transfert d'énergie est déterminée par la distance entre le donneur et l'accepteur et l'étendue du chevauchement spectral. Le chevauchement spectral est décrit en termes de distance de Förster (R_0), c'est-à-dire la distance à laquelle le transfert et la désexcitation spontanée du donneur sont équiprobables. Förster a obtenu l'expression suivante pour la constante de vitesse de transfert par considérations classiques et par une approche utilisant la mécanique quantique :

$$K_T(r) = K_D \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 = \frac{1}{\tau_D^0} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (1.53)$$

où K_D est la constante de vitesse d'émission du donneur, r est la distance entre le donneur et l'accepteur et τ_D^0 est la durée de vie du donneur en absence de transfert.

En accord avec la théorie de Förster, le FRET est un processus qui dépend de la distance séparant les deux molécules (donneur et accepteur). L'efficacité du transfert d'énergie (E) est la fraction de photons absorbés par le donneur qui sont transférés à l'accepteur. Cette fraction est donnée par :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (1.54)$$

Cette équation montre que lorsque la distance Donneur–Accepteur (D–A) est proche de R_0 , l'efficacité de transfert dépend fortement de celle-ci (cf. figure 1.15). L'efficacité augmente rapidement à 1 quand la distance D–A passe en dessous de R_0 . Par exemple, si $r = 0,1R_0$ on peut aisément déduire que le rendement de transfert est 0,99, ce qui indique que l'émission du donneur ne serait pas observable. À l'inverse, l'efficacité du transfert diminue rapidement et atteint le zéro si r est supérieur à R_0 . Du fait que E dépende fortement de la distance, les mesures de r ne sont fiables que lorsque r est dans un domaine de $2R_0$. Si r est le double de la distance de Förster ($r = 2R_0$), alors l'efficacité de transfert est de 1,54%, et si $r = 0,5R_0$ alors l'efficacité est 98,5%. Il n'est donc pas commode d'utiliser le FRET pour mesurer les distances en dehors de $r = 0,5R_0$ à $r = 2R_0$.

1.7 La diffusion

L'absorption de photons n'est pas le seul processus issu de l'interaction lumière-matière. Un autre processus présent voire inéluctable rencontré lors des expériences de spectroscopie est la diffusion. Ce phénomène désigne les collisions entre le flux de photons et les molécules du milieu. Lorsque la lumière interfère avec des particules de taille similaire ou proche, elle est propagée dans toutes les directions. Deux types de collisions peuvent être notées : la diffusion élastique pour laquelle l'énergie est conservée et la diffusion inélastique où il y a variation d'énergie. Conséquemment, il convient d'en examiner les effets sur les mesures spectrales.

Diffusion Rayleigh [Rayleigh \(1871\)](#) : Lorsque les particules ont une taille suffisamment petite devant la longueur d'onde incidente, la lumière est diffusée dans toutes les directions sans variation d'énergie, ce qui signifie que le photon incident est dévié par la molécule sans changement de fréquence ($\Delta\nu = \nu_d - \nu_0 = 0$) où ν_0 et ν_d désignent respectivement la fréquence du photon avant et après la collision. En pratique, on observe un élargissement de la raie spectrale de quelques nanomètres autour de la longueur d'onde d'excitation.

Diffusion Raman [Raman and Krishnan \(1928\)](#) : La diffusion Raman est la diffusion inélastique d'un photon par le milieu. L'énergie du photon incident subit une perturbation. Cette perturbation peut être soit un gain d'énergie, soit une perte d'énergie correspondant à une transition vibrationnelle. On observe dans ce cas-là des raies de moindre amplitude, situées de part et d'autres de la diffusion de Rayleigh.

Pour mieux comprendre la position de ces raies, on considère que les photons excitateurs ont une fréquence ν_0 . Après collision inélastique, les photons diffusés ont une énergie $h\nu_d$ et nous avons :

$$h\nu_d - h\nu_0 = E_i - E_j \quad (1.55)$$

h : constante de Planck $\approx 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$,

E_i : énergie de la molécule avant la collision,

E_j : énergie de la molécule après la collision.

Deux cas de figure se présentent [Ferraro \(2003\)](#) :

- Le photon est diffusé avec une fréquence inférieure à la fréquence incidente ($\nu_d < \nu_0$). Il cède de l'énergie à la molécule ($E_i < E_j$) et on observe alors une raie dite "Stokes" à une longueur d'onde plus grande que la longueur d'onde du faisceau excitateur [1.16](#)
- Le photon reçoit de l'énergie de la molécule ($E_i > E_j$) en plus de son énergie initiale et dans ce cas $\nu_d > \nu_0$. D'où l'observation d'un décalage de la raie dite "anti-Stokes" vers les longueurs d'onde plus courtes [1.16](#).

Le décalage anti-Stokes est rarement observé dans les milieux liquides car aux températures ordinaires, les molécules se trouvent dans l'état électronique de plus basse énergie et ont une énergie vibrationnelle minimale. Le plus souvent, c'est le photon qui cède de l'énergie lors d'un choc inélastique.

Correction de la diffusion : En spectroscopie de fluorescence, les diffusions Raman et Rayleigh sont des éléments perturbants lors des mesures de spectres. Il convient donc de bien

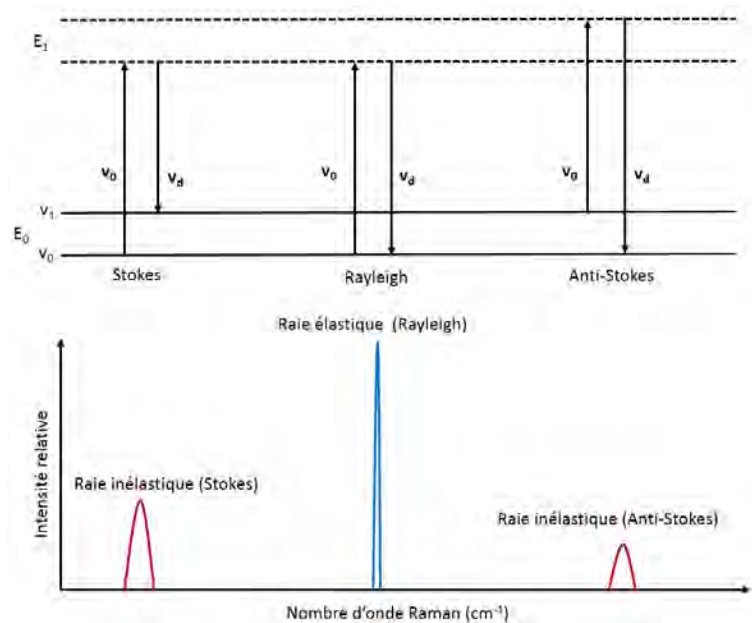


Figure 1.16 – Diffusions élastique et inélastique : schéma énergétique des transitions électroniques

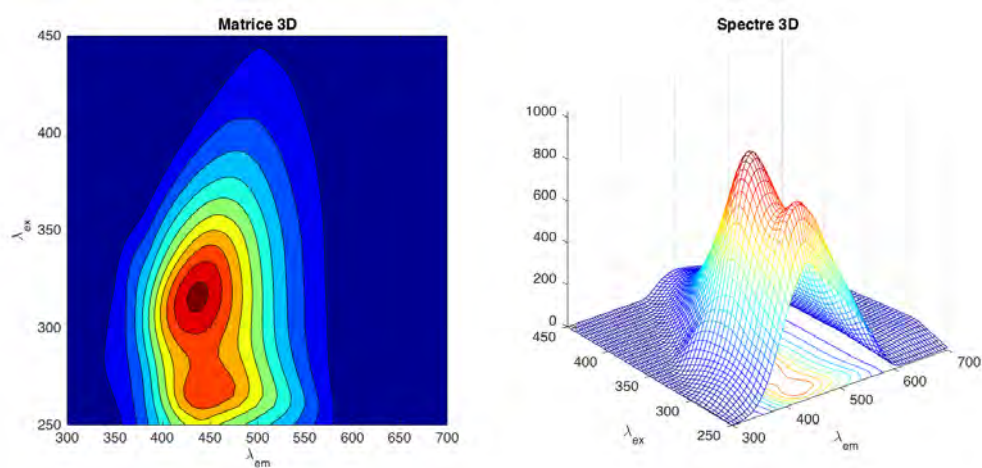


Figure 1.17 – Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence corrigée

choisir la plage spectrale d'expérimentation pour les éviter. En fluorescence stationnaire, la figure 1.7 illustre une MEEF avant correction de la diffusion. Cela représente clairement l'impact de ce phénomène qui masque le signal de fluorescence et donc l'importance de le corriger. Le décalage qui existe par la loi de Stokes minimise le risque de chevauchement entre le Rayleigh et le spectre d'émission malgré le fait que l'intensité du Rayleigh soit plus élevée que l'intensité maximale du spectre de fluorescence. Toutefois, le Rayleigh peut masquer le signal d'intérêt et cela dépend de $\Delta\lambda$. La diffusion Raman quant à elle pose le problème inverse, c'est-à-dire que son amplitude est faible, ne cache pas le signal mais sa position peut causer une importante déformation.

Les spectres de diffusion peuvent être modélisés car ils sont facilement localisables. L'approche la plus classique est de mesurer dans les mêmes conditions le spectre du solvant seul et de le soustraire à celui de la solution. D'autres façons de faire ne nécessitant aucune mesure supplémentaire sont les méthodes de filtrage numérique. Pour notre part, on procède à une coupe locale pour éliminer le Rayleigh et nous avons choisi la méthode de Zepp [Zepp et al. \(2004\)](#) qui fournit des résultats optimaux sur les MEEF pour exclure le Raman (cf. figure 1.17). En spectroscopie de fluorescence résolue en temps, on procède à une coupe locale pour exclure ces pics au niveau des longueurs d'onde d'émission délimitant la zone du signal d'intérêt. Le pic de Rayleigh est généralement situé en dehors de la plage contenant le signal de fluorescence observé, mais on l'élimine numériquement quand il se trouve dans cette zone.

1.8 La fluorescence résolue en temps

La connaissance de la dynamique des états excités est d'une importance majeure dans la compréhension de processus photophysiques, photochimiques et photobiologiques. Nous avons vu précédemment que la spectroscopie de fluorescence en mode stationnaire permet d'obtenir la fluorescence d'un échantillon. Elle implique l'utilisation d'une source continue dans le temps qui excite l'échantillon et après acquisition, enregistre le spectre d'émission ou l'intensité de fluorescence. Malgré ces atouts, cette technique possède diverses contraintes. Bien que les mesures soient simples à effectuer, certaines molécules complexes absorbent et/ou émettent à des longueurs d'ondes tellement proches qu'il est très difficile voire impossible de les séparer spectralement. En effet, considérons un échantillon qui contient deux molécules fluorescentes émettant à la même longueur d'onde d'émission, chacune avec une durée de vie distincte. En raison du chevauchement spectral de l'absorption et l'émission, il n'est généralement pas possible d'observer l'émission des deux molécules à partir des données obtenues en fluorescence stationnaire. Il se trouve que la plupart des informations moléculaires disponibles grâce à la fluorescence en mode stationnaire sont perdues au cours du temps. Toutefois, les données obtenues en fluorescence résolue en temps peuvent révéler deux temps de vie de fluorescence et les intensités relatives des deux molécules. Elles peuvent aussi révéler la façon dont chacune des molécules est affectée par les interactions avec d'autres macromolécules.

Il y a plusieurs autres situations pour lesquelles les données résultantes de la fluorescence résolue en temps fournissent des informations indisponibles en mode stationnaire, notamment pour distinguer le type de quenching (statique ou dynamique). En effet, en quenching statique, il y a formation d'un complexe non fluorescent à l'état fondamental. La diminution de

fluorescence correspond à une diminution de la concentration en molécules fluorescentes. Un tel processus provoque donc une réduction du rendement quantique sans affecter la durée de vie moyenne. Le quenching dynamique, quant à lui, est un processus agissant sur l'ensemble de la population à l'état excité, et diminue ainsi le temps de décroissance moyenne de l'ensemble de la population à l'état excité.

Ainsi, la spectroscopie de fluorescence résolue en temps (même si elle nécessite généralement une instrumentation complexe et coûteuse) est une technique particulière et puissante pour la caractérisation de molécules complexes. En effet, les molécules peuvent être identifiées par leurs durées de vie de fluorescence. On distingue deux approches dominantes pour mettre en œuvre cette technique : l'approche fréquentielle et l'approche impulsionnelle. Ces deux méthodes sont couramment utilisées pour déterminer la durée de vie de fluorescence qui est typiquement indépendante de l'intensité et de la concentration (si le rapport signal sur bruit est faible), ou plus généralement les paramètres caractérisant la fluorescence idéale recherchée $I(t)$ d'un échantillon fluorescent.

La fluorimétrie impulsionnelle est fondée sur l'excitation par une courte impulsion lumineuse et donne la fluorescence idéale $I(t)$ de l'échantillon, convoluée par la réponse de l'instrument. La fluorimétrie fréquentielle est fondée sur l'excitation par une lumière modulée à fréquence variable et donne la réponse harmonique de l'échantillon, qui est la transformée de Fourier de $I(t)$.

Ces deux techniques sont théoriquement équivalentes, mais requièrent une instrumentation et des méthodes d'analyses différentes qui sont maintenant présentées.

1.8.1 Fluorimétrie impulsionnelle et fluorimétrie de phase

Les principes de la fluorimétrie d'impulsion et de modulation de phase sont illustrés dans les figures 1.18 et 1.19.

La fluorescence idéale recherchée d'un échantillon fluorescent est dans le cas le plus simple, une mono-exponentielle dont la constante est la durée de vie à l'état excité, mais le plus souvent, c'est une somme d'exponentielles discrètes, ou une fonction plus complexe ; parfois, le système est caractérisé par une distribution de décroissances temporelles.

Mathématiquement, la fluorescence mesurée $R(t)$ est donc la convolution de la réponse impulsionnelle $E(t)$ et de la fluorescence idéale recherchée $I(t)$:

$$R(t) = E(t) \otimes I(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} E(t') I(t - t') dt' \quad (1.56)$$

1.8.1.1 Fluorimétrie impulsionnelle

L'échantillon est excité par une source laser impulsionnelle et l'intensité de fluorescence est enregistrée en fonction du temps. Dans notre étude, la largeur d'impulsion est de quelques nanosecondes. Néanmoins, comme la durée de l'impulsion n'est pas négligeable par rapport à la décroissance de fluorescence de la matière organique, la réponse est le produit de convolution donnée par l'équation 1.56 (cf. figure 1.19). Dès que l'intensité de l'impulsion lumineuse est négligeable, l'intensité de fluorescence augmente, atteint un maximum et devient identique à la réponse impulsionnelle. Dans ce cas, l'analyse des données pour

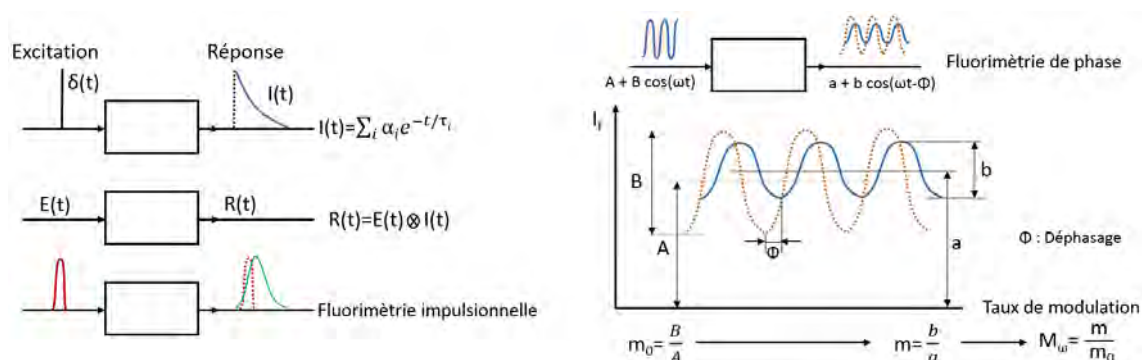


Figure 1.18 – Principe de la fluorimétrie résolue en temps

la détermination des paramètres caractérisant la fluorescence nécessite une déconvolution temporelle. (voir partie 1.8.1.3).

Tout le système de mesure par SLRT est présenté en détail dans le chapitre 3, section 3.1.6.1.

1.8.1.2 Fluorimétrie de phase

L'approche fréquentielle repose sur le principe de la modulation d'amplitude de l'excitation lumineuse représentée par la figure 1.18. L'échantillon est excité par une lumière modulée sinusoïdalement à haute fréquence ω , généralement dans la gamme des MHz ou des GHz. La réponse de fluorescence, qui est le produit de convolution (équation 1.56) de la réponse impulsionnelle par la réponse de fluorescence idéale est sinusoïdalement modulée à la même fréquence ω que l'excitation, mais retardée en phase ϕ_ω . Le déphasage ϕ_ω et le taux de modulation M_ω (égal à m/m_0), où m est le taux de modulation de la fluorescence et m_0 est le taux de modulation de l'excitation (cf. figure 1.18) caractérisant la réponse harmonique du système. Ces paramètres sont mesurés en fonction de la fréquence de modulation. La durée de vie de fluorescence peut être décrite à travers le déphasage et le facteur de modulation M_ω par :

$$\tan(\phi_\omega) = \omega\tau \quad (1.57)$$

$$M_\omega = \sqrt{\frac{1}{1 + \omega^2\tau^2}} \quad (1.58)$$

$$\tau = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{M_\omega^2 - 1}} \quad (1.59)$$

Le choix de la fréquence de modulation f définie par la relation $f = \omega/(2\pi)$ où ω est la pulsation, est primordial pour les données obtenues. Elle est liée au cycle de détection T par la relation $T = 2\pi/\omega$. De ce fait, si l'excitation est modulée à 10 MHz, cela correspondra à une période de 100 ns. Ceci implique que les fluorophores qui vont être détectés doivent avoir un temps de vie de fluorescence inférieure ou égale à 100 ns. Nous devons donc avoir une connaissance a priori sur l'ordre de grandeur des durées de vie de fluorescence des molécules présentes dans l'échantillon pour pouvoir définir la fréquence de modulation appropriée pour l'excitation. La réponse en fréquence de l'échantillon est obtenue en mesurant l'angle de

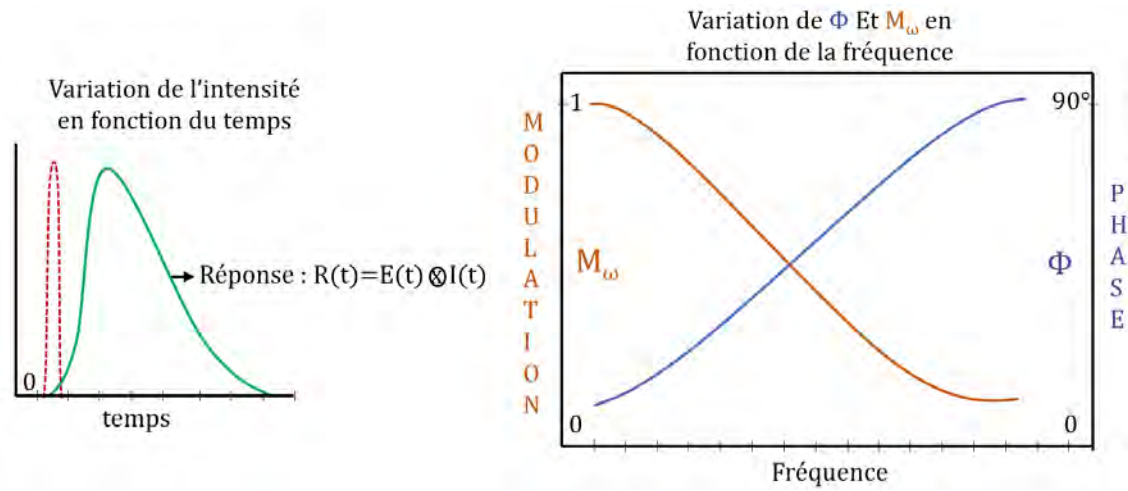


Figure 1.19 – Principe de la fluorimétrie impulsionnelle et la fluorimétrie fréquentielle

phase et la modulation à travers une gamme de fréquences de modulation (cf. figure 1.19).

1.8.1.3 Analyse de données

Fluorimétrie impulsionnelle :

Des efforts considérables ont été consacrés à résoudre le problème de déconvolution et d'ajustement d'une courbe expérimentale à une décroissance théorique qui est souvent convoluée à la réponse impulsionnelle du système de mesure. De nombreuses méthodes ont été examinées O'Connor et al. (1979), la plus largement utilisée est basée sur les moindres carrés non linéaires. Le principe de base de cette méthode consiste à minimiser une quantité qui exprime la non-concordance entre les données et la fonction ajustée. χ^2 est définie comme étant la somme pondérée des carrés des écarts de la réponse expérimentale $R(t_i)$ de celles calculées $R_c(t_i)$:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left[\frac{R(t_i) - R_c(t_i)}{\sigma(i)} \right]^2 \quad (1.60)$$

où N est le nombre total de points de données et $\sigma(i)$ est l'écart-type du jeu de données i qui affecte chaque mesure.

Il est commode de normaliser χ^2 de sorte que la valeur soit indépendante de N et le nombre p de paramètres ajustés (par exemple pour une double décroissance exponentielle, $p=3$: nous avons deux temps de décroissance et un facteur pré-exponentiel). La division de χ^2 par le nombre de degrés de liberté, $\vartheta = N - p$, conduit à χ_r^2 dont la valeur doit être proche de 1 pour un bon ajustement :

$$\chi_r^2 = \frac{1}{\vartheta} \sum_{i=1}^N \left[\frac{R(t_i) - R_c(t_i)}{\sigma(i)} \right]^2 \quad (1.61)$$

Dans la pratique, les estimations initiales des paramètres d'ajustement sont utilisées pour calculer la courbe R_c qui est le produit de convolution de la courbe de décroissance et de

la réponse impulsionnelle de l'instrument. En effet, Il est important de souligner que le traitement numérique appliqué à ces données nécessite de connaître la réponse impulsionnelle du système notée IRF (*Impulse Response Function*) notée $E(t)$ dans l'équation 1.56. La réponse impulsionnelle est la réponse du système associée à une excitation idéale de Dirac δ . Ensuite, un algorithme de minimisation est utilisé pour rechercher les paramètres donnant le meilleur ajustement, autrement dit, un χ_r^2 minimum. À chaque étape de la procédure d'itération, la décroissance calculée est reconvoluée avec la réponse de l'instrument.

Fluorimétrie de phase :

La méthode des moindres carrés est également largement appliquée à l'ajustement des courbes en fluorimétrie en phase. La principale différence avec l'analyse des données en fluorimétrie impulsionnelle est qu'aucune déconvolution n'est nécessaire : l'ajustement de courbe est effectivement réalisée dans le domaine fréquentiel, en utilisant directement les variations du déphasage Φ et la modulation de rapport M_ω en fonction de la fréquence de modulation. Les données en modulation et en phase peuvent être analysées séparément ou simultanément. Dans ce dernier cas, le χ_r^2 est donnée par :

$$\chi_r^2 = \frac{1}{\vartheta} \left[\sum_{i=1}^N \frac{[\Phi(\omega_i) - \Phi_c(\omega_i)]^2}{\sigma_\Phi(\omega_i)} + \sum_{i=1}^N \frac{[M(\omega_i) - M_c(\omega_i)]^2}{\sigma_M(\omega_i)} \right] \quad (1.62)$$

où N est le nombre total de fréquences. Dans ce cas, le nombre de points de données est le double du nombre de fréquences, de sorte que le nombre de degrés de liberté s'écrive $\vartheta = 2N - p$. L'analyse des données de fluorimétrie de phase nécessite la connaissance des sinus et cosinus de la transformée de Fourier de la fluorescence idéale recherchée. Bien sûr, cela ne pose aucun problème pour le cas le plus fréquent de décroissance multi-exponentielle, mais dans certains cas, les transformées de Fourier peuvent ne pas avoir des expressions analytiques, des calculs numériques d'intégrales pertinentes sont alors nécessaires.

1.9 Problématique générale

Nous avons décrit dans le premier chapitre le principe de la spectroscopie de fluorescence et les techniques de mesures utilisées. Ces techniques apporteront des informations nécessaires à notre étude car elles permettront d'analyser directement les échantillons sans préparation particulière.

La matière organique naturelle (MON) constitue l'objet de cette étude en raison de son importance dans le milieu naturel. Selon les environnements, 40% à 60% de la MON fluoresce [Senesi \(1993, 1990\)](#). La spectroscopie de fluorescence en mode stationnaire et la spectroscopie laser résolue en temps (SLRT) apporteront des informations complémentaires à la connaissance de la MON notamment par la caractérisation spectrale et temporelle. De plus, ces deux techniques seront utilisées dans le cadre de cette étude pour caractériser son interaction avec des éléments métalliques. En effet, la MON peut se complexer avec de nombreux métaux sous forme organique [Mantoura et al. \(1978\)](#). Cette complexation de forme chimique entraîne un comportement différent du métal dans l'environnement. Par exemple, la MON limite la toxicité du cuivre [Saar and Weber \(1980\)](#); [Ryan and Weber \(1982\)](#); [Cabaniss and Shuman \(1986\)](#); [Midorikawa and Tanoue \(1998\)](#), tandis que pour le mercure, elle engendre l'effet inverse. Le mercure sous sa forme inorganique est moins

dangereux pour la biosphère que le mercure organique [Lu and Jaffe \(2001\)](#); [Elumalai et al. \(2007\)](#). C'est pour ces raisons qu'il est nécessaire de caractériser correctement les interactions de la MON avec les métaux.

Dans notre étude, l'évaluation des propriétés de complexation de la matière organique vis-à-vis des éléments métalliques est basée sur la technique de quenching de fluorescence.

À partir des spectres d'émission mesurés par SLRT à une ou plusieurs longueurs d'onde d'excitation, nous allons déduire les temps de vie de fluorescence et les spectres d'émission de chaque composant fluorescent à l'aide d'une décomposition multilinéaire, telle que CP ou Candecomp/PARAFAC (Canonical Polyadic Decomposition/Parallel Factor analysis). Ces caractéristiques temporelles et spectrales (les temps de vie et les spectres d'émission) sont nécessairement rattachées à des transitions énergétiques qui sont elles-mêmes liées à des composants fluorescents physiquement présents dans l'échantillon mesuré. Or, la caractérisation temporelle des composants fluorescents ne peut pas être obtenue à partir de mesures de MEEF et il n'est pas possible d'affirmer que les spectres d'émission calculés par une décomposition de type CP correspondent à des composants physiques. Pour cette raison, l'approche SLRT doit être associée si on souhaite suivre l'évolution temporelle des fluorophores d'un échantillon à un autre et ainsi déterminer l'existence physique des fluorophores à condition d'avoir la résolution temporelle en longueur d'onde (association τ, λ_{em}). Ainsi, l'étude des lois de décroissance de la fluorescence induite par impulsion laser nanoseconde en l'occurrence permettra de qualifier précisément le type d'interaction MO-métal. L'algorithme de déconvolution temporelle sera appliqué à chaque décroissance de fluorescence mesurée. Cet algorithme utilisera différents modèles physiques associés, chacun étant associé à un type particulier d'interaction entre la MO et l'ETM présent dans l'échantillon. Le point crucial de la déconvolution temporelle sera l'évaluation de la qualité de l'ajustement entre les différents modèles physiques et les décroissances mesurées car c'est à partir du modèle de décroissance temporelle le plus adapté qu'il sera possible de déduire le type de quenching qui modifie le phénomène de fluorescence. Le prochain chapitre présente tout d'abord la composition générale de la MON et ses propriétés optiques. Nous discutons ensuite des métaux que nous avons choisis dans le cadre de cette étude qui permettront de connaître d'un point de vue mécanistique le type d'interactions qu'ils ont avec la MO afin de transposer leur comportement dans l'environnement.

Chapitre 2

Étude de l'interaction MOD – EM

*"If you want to change the world, pick
up your pen and write.."*

Martin Luther

Ce chapitre est dédié aux rappels concernant la matière organique et son rôle principal sur le devenir des polluants dans l'environnement. Pour une meilleure fluidité de lecture de cette partie, certains documents de littérature en lien avec ce travail seront cités dans ce chapitre mais les comparaisons avec nos données seront détaillées dans le chapitre consacré aux résultats.

2.1 Généralités

La connaissance de l'interaction entre la matière organique et les éléments métalliques est d'une importance primordiale pour les études environnementales comme celles qui, par exemple, concernent les activités nucléaires. En effet, les activités anthropiques liées aux industries entraînent une pollution des sols et des eaux naturelles (mer, rivière, estuaire...) par les rejets de contaminants comme les polluants organiques ou les métaux lourds. De fait, une meilleure compréhension du comportement de ces rejets est donc nécessaire pour contrôler leurs toxicités.

Les différents complexants présents dans l'environnement vont fortement impacter l'évolution des éléments métalliques. Les ligands inorganiques telles que les hydroxydes, les oxydes, les sulfures... et les ligands organiques telles que les acides aminés, acides benzoïques et phénoliques, les substances humiques... ont un effet sur la spéciation des métaux dans l'environnement. La matière organique constitue l'objet de cette étude en raison de son importance pour les organismes vivants [Thomas \(1997\)](#). En fonction de sa concentration, elle peut être un élément perturbateur comme elle peut être un élément régulateur [Aitkenhead-Peterson et al. \(2003\)](#). Pour ces raisons, caractériser son interaction avec les éléments métalliques est un point crucial pour une meilleure compréhension du devenir des métaux polluants.

2.2 Matière organique naturelle (MON)

La MON est une composante importante dans les eaux naturelles souterraines et de surface (rivières, mers, océans...). Elle est issue de la décomposition de molécules organiques provenant des résidus de plantes, d'une fraction de biomasse de sol [Buffle \(1988\)](#); [de Souza Sierra \(1992\)](#); [Hedges et al. \(1988\)](#) et d'une fraction d'humus stable. Sa participation aux échanges des espèces chimiques entre les végétaux, animaux, micro-organismes et les milieux en fait un élément clef dans de nombreux échanges, réactions et transformations ce qui lui procure un rôle central dans le cycle de nombreux éléments.

2.2.1 Origine de la MON

La matière organique naturelle peut être d'origine terrestre ou marine. Elle peut être présente soit à l'état solide comme les sédiments, le sol, les pâturages..., soit à l'état liquide comme les rivières, estuaires, océans... La MON observable dans les eaux naturelles possède une très grande variété de propriétés physiques, chimiques et biologiques et est constituée d'un mélange extrêmement complexe de composés dont au moins 80% ne sont pas structurellement identifiables. [Stevenson \(1994\)](#) a donné une structure hypothétique

d'un acide humique représenté sur la figure 2.1 montrant la complexité de cette macromolécule aromatique. Les groupes aromatiques sont substitués par des composés aliphatiques et la liaison de sucres aminés et peptides justifie la présence de l'azote dans cette structure. Les propriétés de la MON sont étroitement liées à l'origine des macromolécules organiques la constituant et aux processus de dégradation. En effet, puisque que les sources de ces MON sont nettement différentes, une matière organique d'origine marine présente des propriétés différentes d'une matière organique d'origine terrestre [Coble et al. \(2014\)](#). Parmi ces différences, on note l'acidité, les propriétés de complexation, le rapport C/N qui dépendent de l'environnement géochimique dans lequel elle évolue.

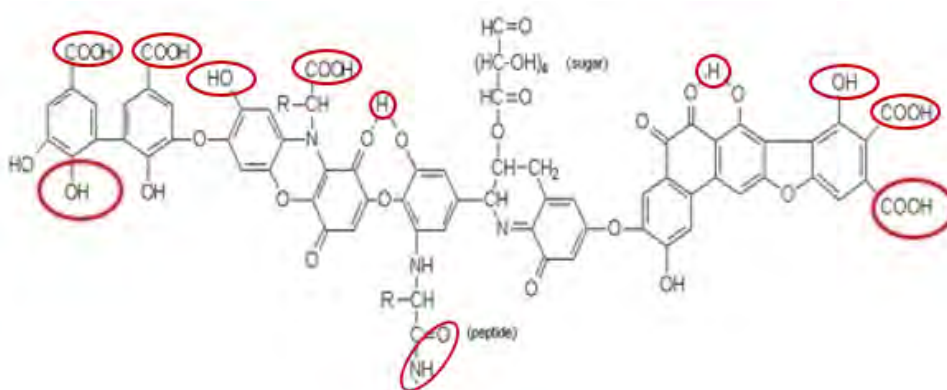


Figure 2.1 – Structure hypothétique d'un acide humique selon [Stevenson \(1994\)](#) et sites (en rouge) de complexation potentiel

2.2.2 Composition générale

La composition de la MON est le résultat des multiples réactions qu'elle a subies au cours de son histoire. Du fait des origines variées de ces sources, la composition de la MON est a priori très hétérogène. On distingue systématiquement des composés identifiables (biopolymères : acides aminés, protéines, lipides, sucres, ...) et des composés difficilement identifiables (géopolymères : substances humiques, humines,...).

Les biopolymères sont des molécules de structures très simples et se dégradent rapidement par des processus d'association et de condensation et peuvent être transformés en molécules plus complexes, les géopolymères (ou substances humiques). Ces substances humiques (SH) peuvent être considérées comme représentatives de la matière organique (il y a généralement 70 à 90% de géopolymères). Elles sont réfractaires et peuvent être classées en trois groupes empiriques en fonction de leurs solubilités à différents pH :

- Les humines : insolubles quel que soit le pH.
- Les Acides Humiques (AH) : insolubles à pH acide.
- Les Acides Fulviques (AF) : solubles à tout pH.

Les géopolymères contiennent principalement des groupes fonctionnels carboxyliques et phénoliques. D'autres fonctions sont également présentes mais avec des proportions plus faibles. Par exemple, la proportion de structures aliphatiques par rapport aux aromatiques en fait un paramètre important pour expliquer certaines propriétés optiques des composés

étudiés [Coble et al. \(2014\)](#).

Les humines sont des composés d'origine essentiellement terrestre. Ils proviennent de la dégradation des composés vivants. Ils ne jouent pas un rôle nutritionnel pour les organismes vivants mais maintiennent une bonne cohésion du sol. Les AH sont les composants majeurs des SH et constituent une des fractions les plus importantes dans l'humus et dans les eaux. Une théorie commune suggère qu'ils proviennent directement de la décomposition des molécules suite à la dégradation des biopolymères [Leenheer and Croué \(2003\)](#); [Hatcher and Spiker \(1988\)](#). Ils sont moins complexants et plus stables dans le sol. Les AF sont des molécules solubles dans l'eau à n'importe quel pH. Ils contiennent 50% de carbone, environ 40% d'oxygène, 5% d'hydrogène et environ 1-5% d'azote [Schnitzer \(1978\)](#).

2.2.3 Caractérisation de la matière organique

De par sa composition, la MON possède une structure chimique hautement hétérogène, ce qui signifie potentiellement des propriétés différentes. Dans cette thèse, l'étude et la caractérisation de la matière organique se fera principalement par spectroscopie de fluorescence.

2.2.3.1 Description générale des propriétés de la matière organique

Le suivi de la MON intéresse de nombreuses équipes de recherche en chimie de l'environnement [Coble \(1996\)](#); [Hemmingsen and McGown \(1997\)](#); [Kumke et al. \(1998\)](#); [Mounier et al. \(2011\)](#). Différentes techniques analytiques ont été développées pour la caractérisation de la MON notamment la spectroscopie de fluorescence UV-Visible [Coble \(1996\)](#); [Chen et al. \(2003b,a\)](#); [Stedmon et al. \(2003\)](#); [Valencia et al. \(2014\)](#); [Lin et al. \(2017\)](#). Cette technique est basée sur l'analyse directe des propriétés optiques. En effet, parmi les groupements fonctionnels cités ci-dessus, certains ont des propriétés de fluorescence. De fait, les propriétés chimiques de la MON font des spectres de fluorescence un outil de caractérisation spectrale efficace et apporte des informations complémentaires à la connaissance de sa composition [Coble \(1996\)](#); [Parlanti et al. \(2000\)](#). D'autres groupements fonctionnels (ou les mêmes) de la MON ont des propriétés d'acidité ou de complexation, le phénomène de quenching est en particulier utilisé pour mettre en évidence ces propriétés [Ryan and Weber \(1982\)](#); [Mounier et al. \(2011\)](#).

2.2.3.2 Propriétés optiques de la matière organique

L'analyse des propriétés optiques de la matière organique par spectroscopie de fluorescence permettent de caractériser l'origine de la MO [Coble \(1996\)](#); [Smith and Kramer \(1999\)](#); [Murphy et al. \(2008\)](#). Les substances humiques, quelque soit leur origine, émettent de la lumière. Comme l'émission varie en fonction de la longueur d'onde d'excitation, plusieurs types de spectres peuvent être enregistrés : les spectres d'excitation (longueur d'émission fixée), les spectres d'émission (longueur d'excitation fixée) et les spectres synchrones (enregistrement du spectre d'émission en gardant entre les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation un écart constant). Le développement de la fluorescence en fonction de l'excitation et de l'émission abusivement appelé fluorescence 3D, est la plus en vogue de nos jours [Valencia et al. \(2014\)](#); [Lin et al. \(2017\)](#). Elle permet l'analyse globale de la MON en

enregistrant l'intensité de fluorescence et la position des maxima. À partir des pics ainsi enregistrés, il est possible de différencier l'origine terrestre, aqueuse ou marine et le caractère humique ou fulvique, car la position des maxima varie avec la nature et la structure des fluorophores et l'intensité est liée à la concentration (cf. figure 2.2).

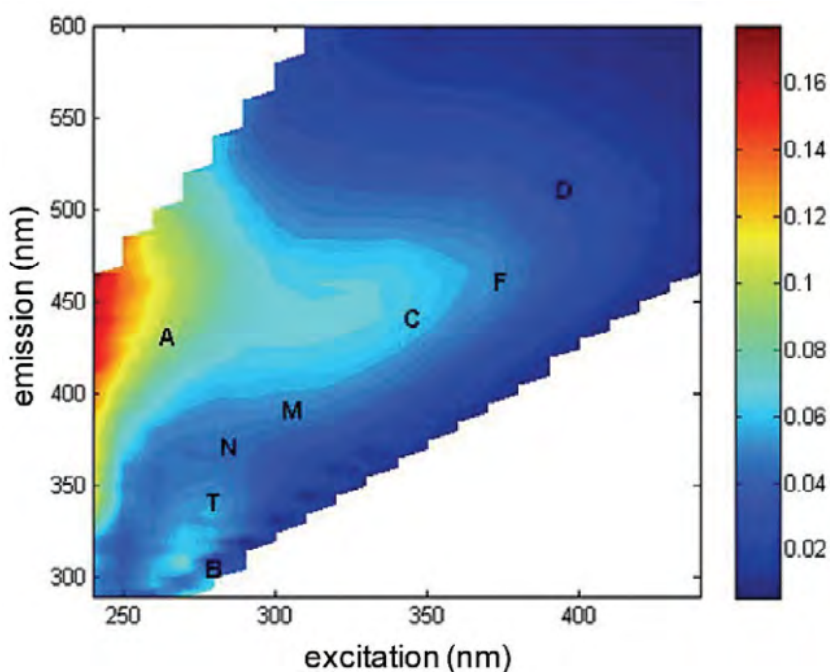


Figure 2.2 – Exemple d'un spectre 3D de fluorescence (MEEF issue de Kraus et al. (2010)) illustrant la position des pics de composés humic-like A, M et C et des pics protein-like T et B tels que décrits par Coble (1996)

En effet, Coble (1996) a identifié différents pics de fluorescence permettant de caractériser la matière organique en fonction de son origine. Aujourd'hui encore, ces nomenclatures font référence en terme de caractérisation spectrale de la MON. Cependant, l'interprétation des spectres obtenus reste difficile pour identifier des fonctions en raison de l'étalement des spectres de fluorescence de la MO, on ne peut distinguer que quelques zones dont 3 sont liés aux SH (cf. tableau 2.1)

Pic	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ém}}(\text{nm})$	Nature des fluorophores
B	275	310	Tyrosine-like, protein-like
T	275	340	Tryptophan-like, protein-like
A	260	380–460	Humic-like
M	312	380–420	Marine humic-like
C	350	420–480	Humic-like

Tableau 2.1 – Principaux composants fluorescents de la MON identifiés par Coble (1996)

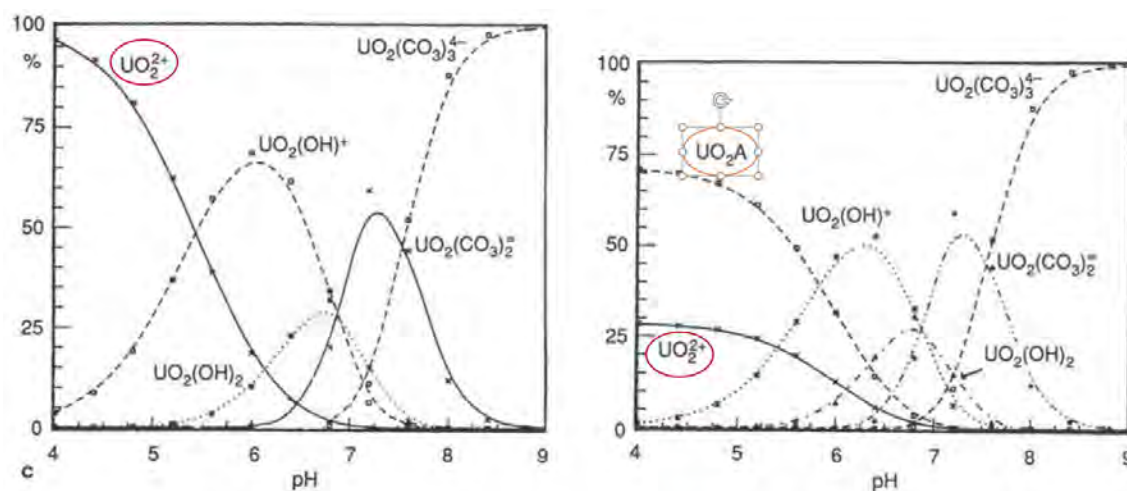


Figure 2.3 – Exemple de changement de la spéciation de l'uranium en présence de matière organique (issu de [Moulin et al. \(1992\)](#))

2.3 Interaction Matière organique - éléments métalliques

2.3.1 Rôle dans le transport des métaux et complexation MO - métaux

La nécessité d'étudier le comportement des métaux compte tenu de leur présence dans de nombreux écosystèmes est apparue évidente [Morel and Price \(2003\)](#); [Bayen \(2012\)](#). En effet, la toxicité élevée de certains métaux ainsi que le fait qu'ils ne soient pas biodégradables comme le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), en font une cause d'envergure [Buffle \(1988\)](#); [Sigg \(1992\)](#); [Bayen \(2012\)](#); [Prasad \(2013\)](#). Il a été montré que l'interaction de la matière organique avec les éléments métalliques jouent un rôle très important dans leur spéciation chimique et leur transport vis-à-vis du milieu [McCarthy et al. \(1998\)](#). La spéciation chimique d'un élément est définie comme étant l'ensemble des différentes espèces ou formes chimiques de cet élément dans un milieu naturel donné. La matière organique peut conditionner la spéciation de cet élément par la formation de complexes plus ou moins stables (cf. figure 2.3) Elle peut ainsi influencer le devenir des métaux dans l'environnement en participant à leur déplacement d'un point à l'autre et par conséquent, participer à déplacer la contamination [Kalbitz and Wennrich \(1998\)](#); [Guggenberger et al. \(1994\)](#). Comme cité précédemment, la matière organique contient des groupements fonctionnels capables de complexer les métaux. Les sites de complexation peuvent être classés en 3 catégories [Tipping \(2002\)](#) :

- Les sites de faible affinité : très abondants et sont principalement composés de groupements carboxyliques et phénoliques.
- Les sites de forte affinité : peu abondants, composés majoritairement d'oxygène, d'azote et de soufre.
- Les sites non spécifiques : les cations se fixent de manière électrostatique du fait de la charge négative et variable des substances humiques.

L'analyse de la complexation peut être réalisée de manière directe par différentes techniques analytiques parmi elles, le quenching de fluorescence [Lavrik and Mulloev \(2010\)](#); [Mounier et al. \(2011\)](#); [Chen et al. \(2013\)](#); [Zhu and Ryan \(2016\)](#). Cette technique permet d'illustrer la fixation des sites de complexation par une constante thermodynamique conditionnel de complexation. Pour chaque ligand, la complexation entre un métal M et un ligand L peut être décrite par la réaction d'équilibre suivante :



Cette réaction est caractérisée par la constante thermodynamique de complexation ou stabilité qui correspond à la formation de complexe, notée K (mol.L⁻¹), exprimée par l'équation :

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (2.2)$$

Dans cette équation, [ML] correspond au complexe ligand-métal, et M et L se réfèrent au métal et ligand libre, respectivement. La concentration du métal lié [ML] diminue la concentration de ligand libre qui possède des propriétés chimiques et optiques différentes du complexe et un rendement quantique de fluorescence généralement plus élevé.

2.3.2 Choix des métaux

Du fait de l'ubiquité de la matière organique, les métaux présents dans l'environnement à l'état de trace ou rejetés par les industries dans l'environnement pourront interagir avec elle dans les milieux naturels. On dénomme communément 'éléments traces métalliques' (ETM) les métaux lourds et métalloïdes naturels dont la teneur est inférieure à 1% dans la croûte terrestre. Certains sont toxiques ou toxiques au-delà d'un certain seuil. Certains sont radioactifs, c'est le cas des radionucléides. Leurs concentrations environnementales résultent d'apports anthropiques et naturels et ils sont susceptibles de changer de degré d'oxydation et de spéciation en fonction du milieu et donc d'être plus ou moins assimilables par les êtres vivants. Le terme générique ETM permet donc de rassembler le cuivre, l'arsenic, l'euporium et l'uranium. L'aluminium, quant à lui, est un métal qui ne peut être assimilé aux ETM car il est plus abondant et représente 8% de la croûte terrestre. Certains de ces éléments ont été choisis comme modèle d'étude et d'autres pour le manque d'informations dans la littérature. Leur étude dans ce travail va donc permettre de connaître d'un point de vue mécanistique le type d'interaction avec la matière organique dissoute (MOD) ce qui permettra d'améliorer la prédiction de leur comportement dans le milieu naturel. Deux types de métaux ont été sélectionnés. Ceux qui ne présentent pas de fluorescence atomique, c'est le cas du cuivre, de l'aluminium et de l'arsenic et ceux qui fluorescent : l'euporium et l'uranium. L'étude des propriétés de complexation pour les métaux fluorescents a été effectuée par observation et analyse des spectres d'émission des ligands fluorescents uniquement.

2.3.2.1 Métaux non-fluorescents

2.3.2.1.1 Le Cuivre : Le cuivre, de symbole Cu, est un métal naturellement présent dans la croûte terrestre [Bowen \(1985\)](#) à faible dose et est essentiel au développement de

toute forme de vie [Chan et al. \(1998\)](#). Le degré d'oxydation le plus courant à l'état naturel est le Cu^{2+} (dans le détail : $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O}_6)]^{2+}$). Il possède des conductivités électrique et thermique particulièrement élevées qui lui confèrent des usages variés. En effet, Il a été estimé que 66% des émissions du cuivre dans l'environnement résultaient d'activités anthropiques [Nriagu \(1989\)](#); [Pacyna and Pacyna \(2001\)](#). Parmi les sources d'émission humaines, les rejets dans le sol provenant de l'agriculture où ce dernier est utilisé comme fongicide, les centrales thermiques, les sources de combustions telles que les installations d'incinération, les fours de fusion, la confection de câbles électriques [Lenoir \(2011\)](#), etc. C'est le métal le plus ancien utilisé par l'Homme [Lifset et al. \(2002\)](#).

La biodisponibilité (aptitude à être assimilée par l'organisme) du cuivre dépend de sa spéciation et de ses conditions physico-chimiques dans le milieu naturel qui peut conduire à des formes chimiques assimilables ou non. Il s'associe à la matière organique du fait de sa forte affinité et présente pour les organismes vivants une toxicité remarquable sous forme libre Cu^{2+} à des concentrations très faibles ($10 \text{ pM} = 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ [Sunda and Hanson \(1987\)](#)). La concentration de Cu^{2+} peut également être moindre voire nulle lorsqu'il est complexé par un ligand organique [Buffle \(1988\)](#). Sa toxicité ne dépend pas uniquement de sa concentration mais également des conditions physico-chimiques et le pH qui sont des paramètres déterminants pour l'atténuation de sa contamination. Par conséquent, l'étude de son interaction avec la MON est nécessaire pour comprendre ses propriétés de complexation. De ce fait, plusieurs études ont alors été effectuées depuis plus de 20 ans [Ryan and Weber \(1982\)](#); [Cabaniss and Shuman \(1986\)](#); [Saar and Weber \(1980\)](#); [Mounier et al. \(2011\)](#); [Midorikawa \(1998\)](#); [Da Silva et al. \(1998\)](#); [Plaza et al. \(2005\)](#) car c'est un métal qui forme des complexes stables avec les substances humiques. Il a été choisi dans le cadre de ce travail en tant qu'exemple pour valider notre modèle d'étude et comparer nos résultats avec ceux obtenus dans la littérature.

2.3.2.1.2 L'Aluminium : L'aluminium, symbolisé par le symbole Al, est l'un des métaux les plus abondants sur Terre. Il représente 8% de l'écorce terrestre. Il est naturellement présent sous forme d'aluminosilicates (famille des minéraux contenant de l'alumine et de la silice). L'aluminium est un élément constitutif des minéraux du sol et son affinité avec la matière organique peut conduire à une altération partielle comme les podzols au Brésil [Juste \(1964\)](#); [Boyer \(1976\)](#). Pour ces raisons, connaître le type d'interaction qu'il forme avec la matière organique est crucial d'un point de vue fondamental. Il conduit à une intoxication en cas d'exposition prolongée. Les différentes études de toxicité montrent que cet élément n'est pas sans incidence pour l'environnement [Kochian \(1995\)](#); [Ma et al. \(2001\)](#). Il est à la fois malléable, conducteur d'électricité et de chaleur et inaltérable par l'eau. Il est utilisé pur ou sous forme d'alliages dans l'industrie des transports, le bâtiment, les ustensiles et emballages de cuisine, les panneaux de signalisation, etc. Le degré d'oxydation le plus courant sous lequel se trouve l'aluminium en solution est généralement Al^{3+} (dans le détail : $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O}_6)]^{3+}$). La connaissance de ses formes chimiques est primordiale pour son impact sur l'environnement. Ses concentrations aux pH rencontrés dans la nature restent généralement faibles à cause de sa solubilité réduite (formation d' $\text{Al}(\text{OH})_3$). Toutefois, certains facteurs peuvent augmenter sa teneur dans les milieux aqueux comme la baisse du pH ou sa complexation avec la MO. En effet, il forme de bons complexes avec la matière organique [Elkins and Nelson \(2001\)](#); [Lambert et al. \(1995\)](#). Ces complexes jouent un rôle important dans sa

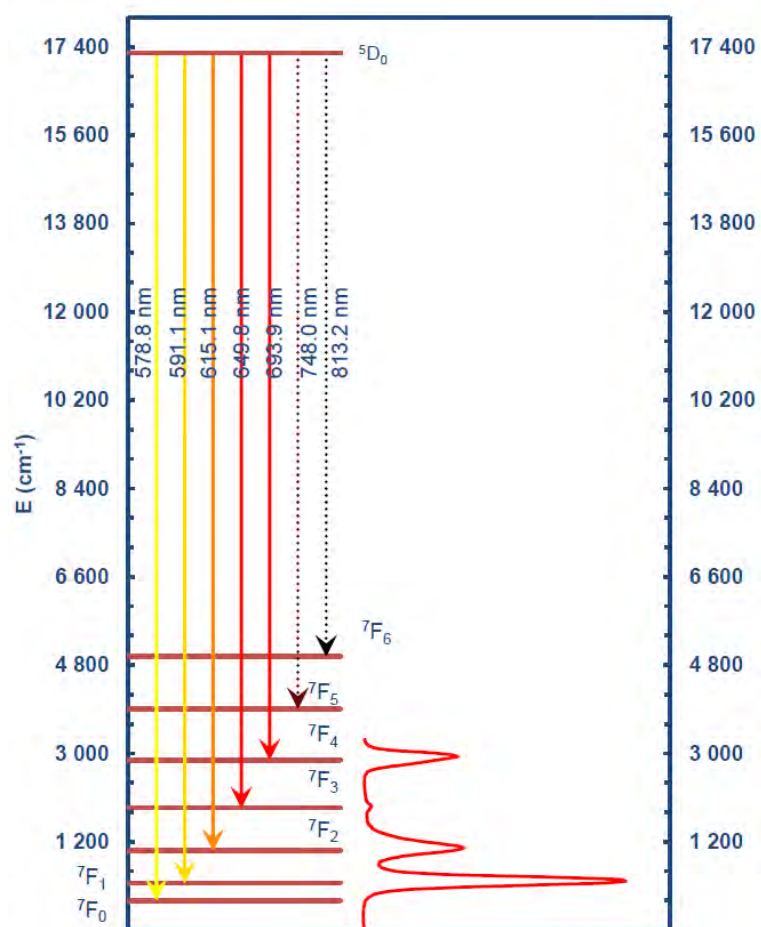
mobilité dans l'eau. Plusieurs études ont été élaborées afin de déterminer les constantes de stabilité de l'interaction matière organique-Aluminium qui s'avère être aux alentours de $\log K=4$ formant un complexe 1 : 1 [Martell et al. \(1990\)](#); [Driscoll et al. \(1994\)](#); [Luster et al. \(1996\)](#); [Elkins and Nelson \(2002\)](#); [Gauthier \(2002\)](#). Des études ont également été menées à partir de molécules considérées comme modèles de la matière organique tels que l'acide salicylique [Cathalifaud et al. \(1997\)](#). Ils ont étudié cette interaction à pH 4,6 et ont montré qu'un complexe 1 : 1 se formait avec une constante de stabilité égale à $\log K=4$.

2.3.2.1.3 L'Arsenic : L'arsenic (As) est un oligo-élément naturel. Dans la partie superficielle de l'écorce terrestre, les concentrations moyennes sont évaluées entre 1 et 5 mg/kg [Mandal and Suzuki \(2002\)](#). C'est un élément de préoccupation mondiale car, en fonction de sa concentration et de sa spéciation, il peut présenter une toxicité très importante. À faibles doses, une exposition chronique atteint la santé et cause de graves problèmes. Ses propriétés toxiques se révèlent également lors d'une exposition à fortes concentrations. Dans certains milieux, les fortes concentrations retrouvées peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Il est présent sous diverses formes ioniques et peut être divisé en deux groupes : l'arsenic organique qu'on trouve principalement dans les tissus végétaux et animaux, et l'arsenic inorganique, trouvé dans les roches, le sol ou dans l'eau. Cette dernière est la forme la plus toxique. Les principales sources de pollution de l'arsenic par l'Homme comprennent certains pesticides et herbicides, engrais phosphatés, les activités d'exploitation minière, combustion et les déchets industriels.

En solution, l'arsénite (As(III), AsO_2^-) est la forme la plus toxique. Sa toxicité est 10 à 60 fois plus élevée que celle de l'arséniate (As(V), AsO_4^{3-}) [Campredon \(2013\)](#). Le comportement de la matière organique sur la mobilité de l'arsenic est complexe. Son transport dépend de l'ensemble des réactions qu'il a subies et son interaction avec la MO peut soit augmenter sa mobilité en formant des complexes [Wang and Mulligan \(2006a\)](#) ou au contraire participer à sa rétention par adsorption ou précipitation [Wang and Mulligan \(2006b\)](#). Une étude de [Achard et al. \(2013\)](#) a démontré que la mobilité de l'arsenic est fortement liée à la dynamique de la matière organique. Bien que la mobilité de l'arsenic semble en partie contrôlée par la MO [Dang et al. \(2014\)](#), les affinités MO-AS ne sont pas à ce jour correctement décrites en particulier à cause des charges négatives de l'arsenic et de la MO. Une meilleure compréhension de leur interaction est donc nécessaire et fera partie de ce travail.

2.3.2.2 Métaux fluorescents

2.3.2.2.1 L'Europium : L'euporium (Eu) est un lanthanide qui fait partie de la famille des terres-rares. Bien qu'il possède d'autres degrés d'oxydation, le majoritaire est (III) mais ne se trouve pas naturellement dans l'environnement en tant qu'élément libre. Son utilisation est croissante dans le domaine industriel. En effet, les composés Europium (III) trouvent des applications répandues dans les marqueurs luminescents et dans les analyses biomédicales. Cependant, les applications commerciales de l'euporium sont limitées. Les propriétés spectroscopiques d'autres ions lanthanides sont valorisées dans des applications technologiques, comme par exemple les lasers Nd : YAG. Cependant, l' Eu^{3+} est vraiment unique en tant que sonde spectroscopique grâce à sa configuration électronique très spéciale. La bande d'excitation la plus intense est aux alentours de 396 nm [Buenzli and Yersin \(1979\)](#).

Figure 2.4 – Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie de l' Eu^{3+}

Le diagramme de Jablonski des niveaux énergétiques de l' Eu^{3+} est reporté sur la figure 2.4. Les principaux pics de luminescence observés de l' Eu^{3+} après excitation correspondent à des désexcitations radiatives $^5\text{D}_0 \rightarrow ^5\text{F}_0$ ($\lambda_{\text{max}} = 579.80\text{nm}$), $^5\text{D}_0 \rightarrow ^5\text{F}_1$ ($\lambda_{\text{max}} = 591.12\text{nm}$), $^5\text{D}_0 \rightarrow ^5\text{F}_2$ ($\lambda_{\text{max}} = 615.12\text{nm}$) et $^5\text{D}_0 \rightarrow ^5\text{F}_4$ ($\lambda_{\text{max}} = 693.88\text{nm}$) Carnall et al. (1968) (Fig. 2.4 Kouhail (2016)). Les autres transitions observées sur la figure 2.4 ($^7\text{F}_3$, $^7\text{F}_5$ et $^7\text{F}_6$) sont très peu énergétiques. $^5\text{D}_0 \rightarrow ^5\text{F}_0$ est un dipôle magnétique et ne dépend pas de la spéciation Binnemans (2015). Toutefois, lors de la complexation dans certains cas, elle peut démontrer une modification majeure Heller et al. (2012); Colette et al. (2004). La transition $^5\text{D}_0 \rightarrow ^5\text{F}_1$ est dite transition hypersensible Jørgensen and Judd (1964) car c'est un dipôle électrique qui varie fortement en présence de ligands. La formation de complexes entre l'euporium et les ligands peut induire des variations de la forme du pic mais provoque peu de déplacement en longueur d'onde des maximas.

Nombreuses sont les équipes de recherche qui se sont intéressées à l'étude de l'euporium du fait de ses propriétés physico-chimiques que ce soit sa spéciation Moulin et al. (1999); Plancque et al. (2003); Zhang et al. (2004) ou son interaction avec la matière organique par SLRT Bidoglio et al. (1991); Tiseanu et al. (1998); Shin and Choppin (1999); Fellows et al. (2003); Chung et al. (2005); Saito et al. (2010); Brevet et al. (2009); Lukman et al. (2012) en raison de son analogie avec les actinides trivalents. Il a l'avantage de ne pas subir de décroissance radioactive ce qui facilite sa manipulation et son utilisation comme sonde fluorescente dans les domaines biologique et environnemental Horrocks Jr and Sudnick (1979); Tanaka and Yamashita (1984); Soini et al. (1987); Bünzli and Choppin (1989).

2.3.2.2 L'Uranium : L'uranium (U) fait partie de la famille des actinides. Il ne se retrouve que dans des composés oxygénés sous forme d'oxycation, en raison de sa forte électropositivité Bonin and Blanc (2001). C'est l'élément le plus lourd présent naturellement dans les eaux à des concentrations très faibles (à l'état de trace : $0,02$ à $6 \mu\text{g.L}^{-1}$). Ces concentrations peuvent s'accroître à cause des activités anthropogéniques et atteindre environ $20000 \mu\text{g.L}^{-1}$. En solution aqueuse, il est préférentiellement à la valence VI, sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} Madic and Genet (2001). Cependant, l'atome d'U possède 6 électrons périphériques facilement extractibles. De ce fait, il peut se présenter aux valences III, IV, V et VI également. L'uranium était principalement utilisé comme colorant dans la verrerie et la céramique Landa and Cuncell (1992). La découverte de sa radioactivité en 1896 par Henri Becquerel marque le début de l'histoire de la radioactivité et notamment en 1939 après la découverte de sa fission. Il a d'abord été utilisé pour des applications militaires dans la fabrication de bombes nucléaires, puis dans la production d'énergie électrique. Aujourd'hui il reste toujours exploité pour de nombreuses activités industrielles et sa dispersion dans l'environnement génère des inquiétudes.

L'uranium est un élément radioactif et fluorescent. Il présente une bande d'excitation maximale à 270 nm et des pics d'émission majoritaires aux alentours de 480 , 510 , 530 et 560 nm . En raison de leur grande affinité avec les groupes phosphates, carboxyles et hydroxyles et les molécules organiques, les composés uranyles ont tendance à former facilement des complexes stables avec la matière organique. Plusieurs études ont été faites sur la spéciation de l'uranium Moulin et al. (1995); Meinrath et al. (2000); Drobot et al. (2015) et son

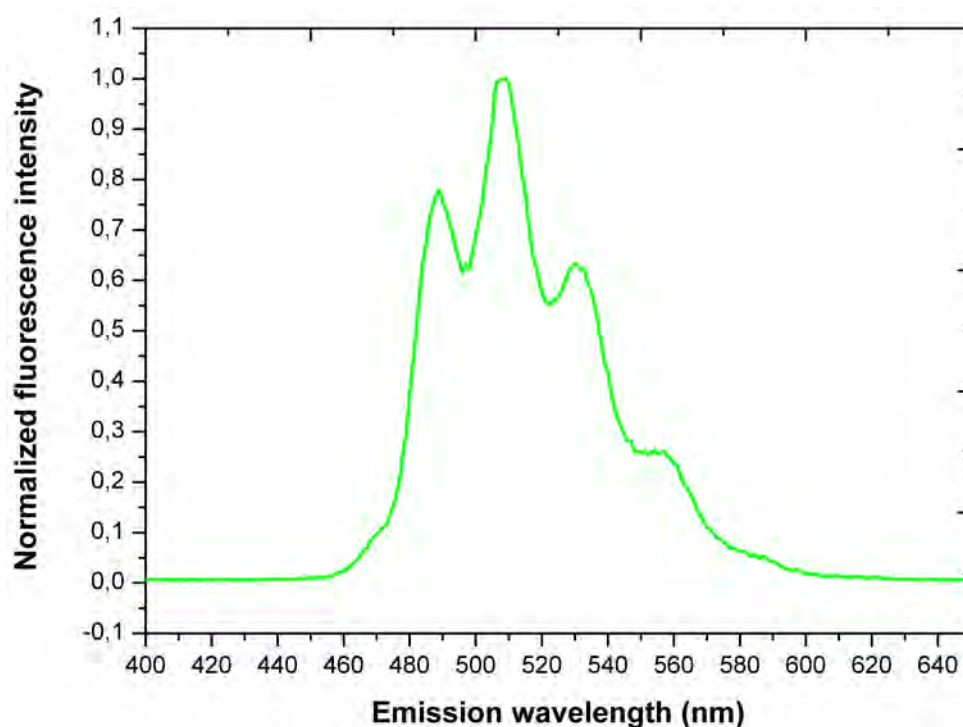


Figure 2.5 – Spectre d'émission de l'ion uranyle UO_2^{2+} à $4,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1} \text{ HNO}_3$ 2%

interaction avec la MON [Idiz et al. \(1986\)](#); [Shin et al. \(2001\)](#); [Lehmann et al. \(2009\)](#); [Beltrami et al. \(2014\)](#); [Zhu et al. \(2014\)](#); [Zhu and Ryan \(2016\)](#). Ceci montre l'intérêt de la connaissance de sa distribution parmi ses multiples formes physicochimiques, son accumulation et sa toxicité pour comprendre son devenir pour les organismes vivants et sa dispersion dans l'environnement.

2.4 Conclusion

En conclusion de ce chapitre, ce travail a pour objectif principal de caractériser l'interaction entre la matière organique et les métaux cités ci-dessus (Cu, Al, As, Eu et U) par quenching de fluorescence en utilisant des techniques spectroscopiques. L'enjeu est d'importance car différents travaux montrent que ces éléments, en fonction de leur concentration et leur spéciation, peuvent être très toxiques pour les organismes vivants et pour l'environnement. La forme ion libre (M^{n+}) est généralement considérée comme la forme la plus biodisponible, comme par exemple envers les phytoplanctons [Bruland et al. \(2003\)](#). Trois métaux qui ne possèdent pas de fluorescence propre (comme l'Eu ou l'U) font partie de ce travail : le Cu, l'Al et l'As. Ils sont connus pour modifier l'intensité de fluorescence de la MO lorsqu'ils sont complexés, et ce, en fonction de leur concentration, ils atténuent ou augmentent (c'est le cas de l'aluminium par exemple) la fluorescence de la matière organique. Par conséquent, l'utilisation du quenching de fluorescence permettra de déterminer leurs pouvoirs complexants et leurs constantes de stabilité. Dans le cas de l'Eu et l'U, il est

possible d'observer en même temps la luminescence des atomes métalliques. La plupart des études de quenching se font uniquement en mode stationnaire en observant notamment la fluorescence de l'Eu et l'U à fortes concentrations et en procédant à des ajouts de MO à différentes concentrations. Dans notre étude, nous avons procédé différemment et ce, en variant les concentrations en métal et en maintenant celle de la MO constante pour essayer de se rapprocher des conditions environnementales. De plus, il existe peu d'informations sur le type d'interaction (statique ou dynamique) avec la MO et en particulier pour l'arsenic qui présente une entité de charge négative (comme la MO). L'utilisation de la spectroscopie laser résolue en temps est en l'occurrence importante car chaque espèce se distingue par sa propre signature spectrale et temporelle [Clark et al. \(2002\)](#); [Drobot et al. \(2015\)](#); [Nouhi et al. \(2017\)](#). Ainsi, en étudiant ses propriétés, il sera possible de déterminer le quenching qui modifie le phénomène de fluorescence. Nous allons donc utiliser ces deux techniques pour tenter de répondre à ces questions. Les techniques et méthodes utilisées sont détaillées dans le chapitre suivant.

Chapitre 3

Approches Expérimentales & Méthodes de Mesure

"Experiments never deceive. It is our judgement that deceives itself because it expects results which experiments do not give."

Leonardo da Vinci, 15th century

Dans ce travail de recherche, l'interaction entre la matière organique et les éléments métalliques est étudiée selon deux approches complémentaires et différentes. Les matériels et méthodes utilisées sont donc séparés en deux parties. L'étude du quenching par mesure d'intensité de fluorescence, d'une part, avec une source continue dans le temps, c'est-à-dire en mode stationnaire ou communément appelé Steady-State et d'autre part, en utilisant une source impulsionnelle, la spectroscopie laser résolue en temps. Ce chapitre présente le protocole expérimental et les paramètres utilisés pour l'acquisition des données, la procédure d'utilisation de CP/PARAFAC et son importance pour la correction de l'effet d'écran et la détermination des nombres de composants tout en s'affranchissant des mesures aberrantes. Il présente également les outils nécessaires pour l'interprétation des données obtenues avec le laser afin d'extraire les temps de vie de fluorescence.

3.1 Matériels

Dans cette partie, nous détaillons le matériel utilisé dans ce travail. Nous expliquons d'abord le ligand modèle de cette étude (l'acide salicylique) ainsi que ses propriétés optiques. Ensuite, nous présentons les propriétés de fluorescence de la matière organique utilisée et le procédé de préparation des éléments métalliques. Ensuite nous abordons en deux parties distinctes des spectrofluorimètres utilisés avec une source continue dans le temps et une source impulsionnelle. Enfin, nous expliquons les différentes méthodes utilisées ainsi que le traitement de données appliquées pour l'obtention des résultats.

3.1.1 Le modèle d'étude : l'Acide Salicylique

Afin de mieux connaître les différentes interactions des métaux avec la matière organique, il est envisageable d'étudier en premier lieu leurs interactions avec un ligand fluorescent qui représente une petite molécule modèle comportant un site chélateur présent dans les substances humiques. L'acide Salicylique (AS) ou acide 2-hydroxybenzoïque de formule brute $C_7H_6O_3$ est un très bon modèle utilisé dans de nombreuses études de complexation [Ley and Englehardt \(1910\)](#); [Joshi et al. \(1997\)](#); [Weller \(1955\)](#); [Lavrik and Mulloev \(2010\)](#); [Kim et al. \(1974\)](#). Son pouvoir complexant et sa capacité à imiter les mêmes propriétés

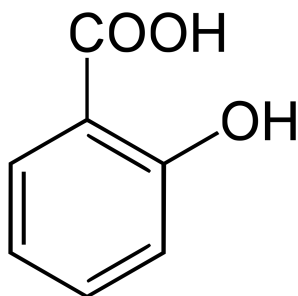


Figure 3.1 – Structure chimique de l'acide salicylique

que celles des substances humiques [Stevenson \(1994\)](#) en font un très bon analogue d'étude. L'acide salicylique et ses dérivés sont des ligands organiques aromatiques fournissant des

groupements fonctionnels carboxyliques et hydroxydes. Il est constitué d'un noyau benzénique substitué par un groupe carboxyle et un groupe hydroxyle. Ces derniers lui confèrent ses propriétés en tant que bon complexant avec les métaux. Bien qu'une structure exacte de substances humiques ne soit pas connue, la structure chimique de l'AS (représentée sur la figure 3.1) indique clairement la différence de complexité avec la structure moléculaire d'un acide humique (voir section 2.2.1). Il est très utilisé en tant que substitut de la matière organique.

Les propriétés optiques de l'AS sont représentées en spectre 2D sur la figure 3.2. Sa longueur d'onde d'émission est à 410 nm pour une longueur d'onde d'excitation à 300 nm **Tauler et al. (1998)** et son $\epsilon(\lambda_{\max})$ est de $4,2 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans du méthanol.

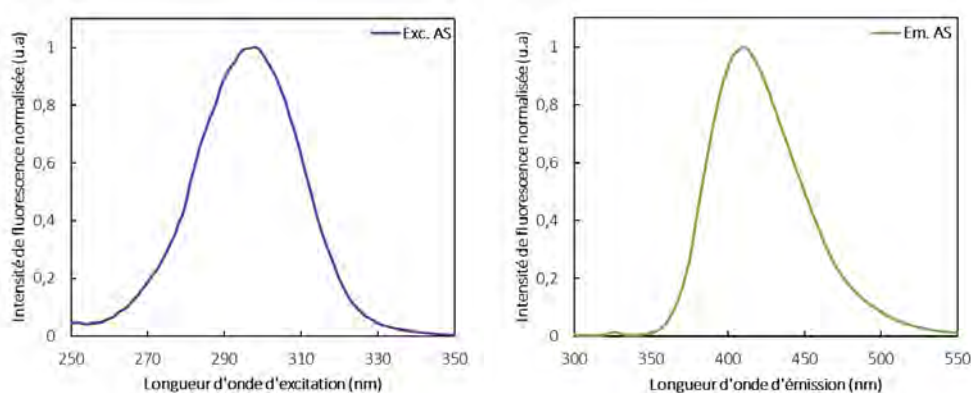


Figure 3.2 – Spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de l'acide salicylique

Une concentration initiale à $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a été préparée à l'aide d'une solution pure (NormaPur, Prolabo) en diluant 138 mg dans 1L de tampon HEPES à $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ à pH=7. Une seconde dilution a été ensuite effectuée à partir de la solution préparée précédemment avec le même tampon pour atteindre une concentration finale de $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ au même pH. L'AS a été utilisé sans aucune purification supplémentaire.

3.1.2 Extraction de la matière organique

La matière organique utilisée dans cette étude a été prélevée (dans le cadre d'une collaboration) de l'estuaire du Saint-Laurent au Canada représentée sur la figure 3.3. Le Saint-Laurent est un estuaire semi-clos, avec des connexions à l'Océan Atlantique et est un excellent laboratoire naturel puisqu'il fournit, sur une échelle relativement petite, un large gradient de conditions hydrographiques **Nieke et al. (1997)**. Cette matière organique a été choisie, non seulement pour les nombreux avantages que présente le Saint-Laurent, mais également parce qu'en principe, nous devrions nous attendre à la même réponse de la part de matières organiques dissoutes d'origine estuarienne. Cela est bien évidemment une hypothèse qui est à vérifier.

L'extraction de la matière organique dissoute a été effectuée par le Pr. Gagné Jean-Pierre de l'université du Québec à Rimouski en se basant sur le protocole d'extraction de l'IHSS (International Humic Substance Society) **Janoš (2003)**. Ce protocole est utilisé depuis

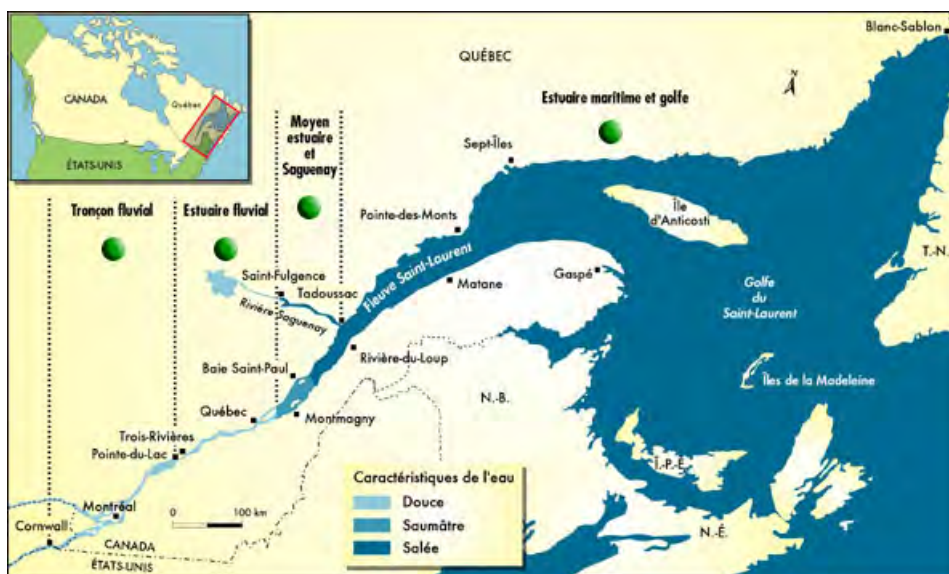


Figure 3.3 – Estuaire du Saint-Laurent, Québec, Canada ; Source : Centre Saint-Laurent, Environnement Canada.

des années par les géochimistes car il permet une extraction chimique fractionnée de MON essentiellement en fonction du pH. En effet, les substances humiques sont extraites suivant leur solubilité en solution acide ou basique pour diverses applications [Webb et al. \(2004\)](#). Des résines macroporeuses non ioniques telles que la XAD-8 et la XAD-4 sont également utilisées pour le fractionnement de MON par adsorption [Peuravuori and Pihlaja \(1997\)](#). Cette technique consiste à retenir de façon sélective certains composants organiques selon leur hydrophobicité. Deux substances humiques ont été utilisées : les acides humiques et les acides fulviques avec des concentrations initiales respectives de $110,54 \text{ mg.L}^{-1}$ et $168,93 \text{ mg.L}^{-1}$ (cf. figure 3.4). Afin d'évaluer les propriétés de fluorescence des acides humiques et des acides fulviques étudiés, des spectres d'excitation et d'émission ont été réalisés en 2D et sont représentés sur les figures 3.5 et 3.6. Leurs longueurs d'onde d'excitation respectives sont 370 nm pour les AH et 330 nm pour les AF. Les longueurs d'onde d'émission associées présentent des spectres larges avec des maximums de pic vers 490 nm pour les AH et 440 nm pour les AF. Les matrices d'excitation et d'émission brutes et corrigées ainsi que les décompositions CP/PARAFAC relatives sont représentées en annexe B Le conditionnement des échantillons de matière organique a été respecté. Les échantillons ont été conservés dans un réfrigérateur à 4°C pour une meilleure conservation et éviter leur dégradation.

3.1.3 Étude du tampon HEPES

Au cours de toutes les expériences, le pH a été mesuré au moyen d'un pH-mètre Cyberscan pH310 ([EUTECH instruments](#)). Le pH-mètre est calibré avant d'être utilisé. Les solutions dont le pH a été ajusté ont été agitées en continu en rajoutant des volumes contrôlés en acide (HCl) et en soude (NaOH). Ces ajouts ont entraîné une augmentation du volume de la solution finale et donc une dilution des échantillons. Par conséquent, les



Figure 3.4 – À gauche, AHSLE : les acides humiques extraits du St. Laurent. À droite, AFSLE : les acides fulviques extraits du St. Laurent

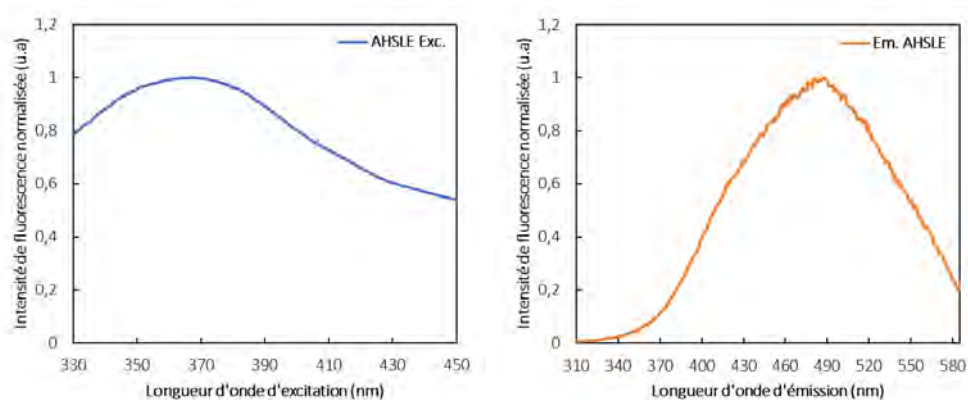


Figure 3.5 – Spectre d'excitation et d'émission des acides humiques

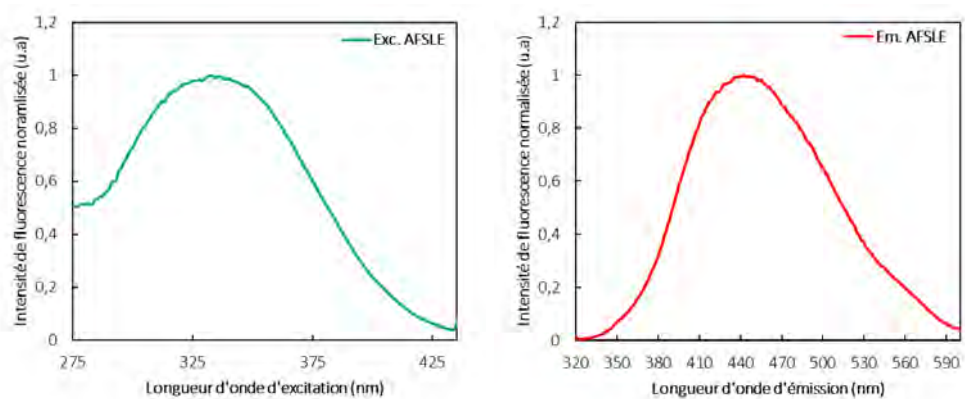


Figure 3.6 – Spectre d'excitation et d'émission des acides fulviques

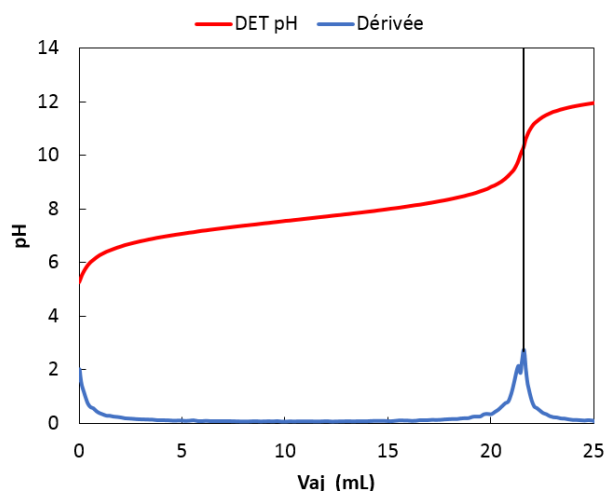


Figure 3.7 – Courbe de titration du tampon HEPES à 0.1 M

volumes ajoutés ont été pris en compte dans le calcul des concentrations finales (voir Annexe C) Afin d'assurer un bon suivi du protocole de préparation des solutions contenant le métal, nous avons dans un premier temps utilisé l'acétate comme tampon. Nous avons remarqué que l'acétate entrainait en compétition avec l'acide salicylique que nous avons choisi comme modèle dans cette étude ainsi qu'avec la matière organique. Par conséquent, l'acétate a été remplacé par le tampon HEPES. Celui-ci est un composé organique couramment utilisé sous forme de solution tampon pour sa facilité de préparation, sa haute solubilité dans l'eau et sa très faible absorption dans l'UV et le Visible. Il est également connu pour ne pas interagir avec les métaux [Witter et al. \(1998\)](#)

Une calibration préliminaire avec du Phtalate de Sodium a permis de vérifier la bonne concentration à utiliser en l'occurrence $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Après calibration de notre appareil, nous avons procédé à une titration du tampon HEPES pour vérifier la concentration mais également afin de s'assurer de la zone tampon. La courbe de pH en fonction du volume ajouté indique que la gamme de pH de l'utilisation du tampon HEPES est entre 6.8 et 8.1 avant d'atteindre le point d'équivalence représenté par la droite (cf. figure 3.7). Lors des expériences, le tampon HEPES a été préparé à une concentration de $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et le pH a été fixé à 7,10.

3.1.4 Préparation des solutions métalliques

La préparation des solutions contenant les métaux a été effectuée dans le tampon HEPES afin de garder le pH constant aux alentours de 7 pendant les mesures. Une première préparation dans de l'eau UHQ, au début de ce travail, nous a permis de nous rendre compte de l'abaissement du pH au fur et à mesure de l'augmentation des ajouts en métal à cause de la libération de proton et de l'acidité des solutions concentrées permettant d'éviter les précipitations. Plus de détails concernant le tampon et le pH sont donnés dans la section 3.1.3. Trois solutions à différentes concentrations en métal ont été préparées pour tous les métaux

choisis afin de couvrir une large gamme de concentrations final après ajouts. Pour partir des concentrations avoisinantes celles trouvées dans l'environnement, nous avons procédé par ajouts logarithmiques de métal (voir méthodes d'ajouts 3.2.1) en diluant la concentration initiale dans un flacon contenant un volume prédéfini de tampon pour atteindre une concentration finale de 10^{-3} mol.L⁻¹ à pH=7,06. Deux dilutions successives ont été réalisées à partir de la solution à 10^{-3} mol.L⁻¹ pour obtenir une concentration moyenne de 10^{-5} mol.L⁻¹ et une concentration faible en métal de 10^{-7} mol.L⁻¹. Tous les métaux ont été préparés sous hotte.

Pour chaque solution, des mesures de pH ont été effectuées pour s'assurer de la stabilité de ce dernier et un ajustement avec du NaOH et du HCl à 1 mol.L⁻¹ a été réalisé selon la nécessité.

Le Cuivre Le Cu a été préparé en utilisant une solution de CuSO₄ préalablement diluée dans l'eau UHQ pour une concentration de $1,45 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹. À partir de cette solution mère, trois solutions ont été préparées dans le tampon HEPES à 0,1 mol.L⁻¹ et pH=7,10. Cependant, une précipitation a été observée à [Cu]= $5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ car le produit de solubilité du Cu(OH)₂ est de $5 \cdot 10^{-19}$ mol.L⁻¹. Théoriquement, à pH=7, pour une concentration en dessous de $5 \cdot 10^{-19} / 5 \cdot 10^{-14} = 1 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹, nous observons une précipitation. Pour ces raisons, le cuivre a été préparé dans le tampon acétate à pH=6,08 dont la concentration doit être supérieure ou égale à $5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ pour éviter les problèmes de précipitation. Aucun ajustement en pH n'a été nécessaire et les 3 concentrations finales utilisées sont :

Cu-2 : 25 mL de CuSO₄ ($1,45 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹) dans 25 mL de tampon acétate (1 mol.L⁻¹ pH=6) pour une concentration finale de $7,25 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ à pH=6,15

Cu-1 : 0,5 mL de Cu-2 dans 49,5 mL de tampon acétate (1 mol.L⁻¹ pH=6) pour une concentration finale de $7,25 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ à pH=6,20

Cu-0 : 0,5 mL de Cu-1 dans 49,5 mL de tampon acétate (1 mol.L⁻¹ pH=6) pour une concentration finale de $7,25 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ à pH=6,22

L'Aluminium L'Al a également été préparé dans le tampon acétate pour éviter les problèmes liés à la précipitation. Une solution mère composée de 2,4 mg d'AlCl₃ a été diluée dans 1L d'eau UHQ pour une concentration finale de $1,8 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹. À partir de celle-ci, les 3 concentrations finales utilisées ont été préparées :

Al-2 : 25 mL de AlCl₃ ($1,8 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹) dans 25 mL de tampon acétate (1 mol.L⁻¹ pH=6) pour une concentration finale de $9 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ à pH=5,89

Al-1 : 0,5 mL de Al-2 dans 49,5 mL de tampon acétate (1 mol.L⁻¹ pH=6) pour une concentration finale de $9 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ à pH=5,95

Al-0 : 0,5 mL de Al-1 dans 49,5 mL de tampon acétate (1 mol.L⁻¹ pH=6) pour une concentration finale de $9 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ à pH=5,99

Aucun ajustement en pH n'a été nécessaire.

L'Arsenic L'Arsenic (V) a été utilisé à une concentration initiale de 10^{-2} mol.L⁻¹. À partir de celle-ci, les 3 concentrations utilisées pour les ajouts ont été réalisées :

As-2 : 25 mL d'As(V) (10^{-2} mol.L⁻¹) dans 25 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $6,67 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ à pH=6,90

As-1 : 0,5 mL de As-2 dans 49,5 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $6,67 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ à pH=7,05

As-0 : 0,5 mL de As-1 dans 49,5 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $6,67 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ à pH=7,17

Aucune précipitation n'a été observée et aucun ajustement en pH n'a été nécessaire.

L'Europium Les 3 concentrations de l'Eu ont été faites à partir d'une solution mère liquide (SPEX CertiPrep) à 1000 mg.L⁻¹ dans 2% de HNO₃. La concentration en molaire correspondante est de $6,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹. Suite au conditionnement de la solution dans l'acide, un ajustement en pH à la soude a été nécessaire pour avoir un pH constant aux alentours de 7. Le volume ajouté en soude a été pris en compte et les concentrations finales utilisées sont :

Eu-2 : 25 mL d'Eu ($6,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹) dans 25 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $2,89 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ à pH=6,94

Eu-1 : 0,5 mL de Eu-2 dans 49,5 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $2,89 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ à pH=7,02

Eu-0 : 0,5 mL de Eu-1 dans 49,5 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $2,89 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ à pH=7,11

l'Uranium Une solution d'U standard (SPEX CertiPrep) contenant 1000 mg.L⁻¹ préparée dans 2 à 5 % de HNO₃ a servi pour préparer les 3 concentrations d'Uranium. Comme pour l'Eu, l'U a été conditionné dans de l'acide nitrique et un ajustement en pH a été obligatoire pour atteindre le pH souhaité. La concentration en molaire de la solution initiale était de $4,2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹. Après ajustement à la soude, les 3 concentrations finales utilisées sont :

U-2 : 25 mL d'U ($4,2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹) dans 25 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $1,46 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ à pH=6,85

U-1 : 0,5 mL de U-2 dans 49,5 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $1,46 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ à pH=6,82

U-0 : 0,5 mL de U-1 dans 49,5 mL de tampon HEPES (0,1 mol.L⁻¹ pH=7) pour une concentration finale de $1,46 \cdot 10^{-7}$ mol.L⁻¹ à pH=6,86

L'ajout de ces solutions métalliques a été effectué de façon logarithmique pour couvrir une large gamme de concentration. La caractérisation de leurs interactions avec la matière organique a été étudiée par quenching de fluorescence à l'aide de spectrofluorimètre en mode stationnaire et impulsionnelle et sont décrits dans ce qui suit. Tout le protocole expérimental est détaillé sous forme de tableau en annexe C.

3.1.5 Caractérisation par une source d'excitation continue

Deux spectrofluorimètres ont été utilisés dans le cadre de ce travail et sont présentés séparément ci-dessous. Le but de l'utilisation de deux appareils avec une source continue

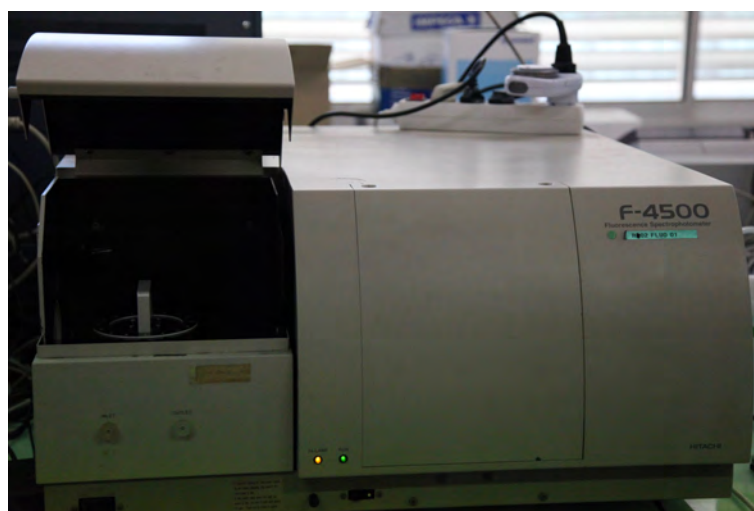


Figure 3.8 – Spectrofluorimètre HITACHI F4500

était dans un premier temps, de comparer leurs sensibilités, ensuite, de vérifier les données acquises de deux façons différentes et s'assurer de la bonne concordance entre les deux appareils.

3.1.5.1 Spectrofluorimètre HITACHI F4500

Les propriétés de fluorescence ont été analysées à l'aide du spectrofluorimètre HITACHI F4500 équipé d'une lampe Xénon (450 W) qui corrige automatiquement la variation de l'intensité lumineuse en excitation. Le fonctionnement d'un spectrofluorimètre standard est décrit dans le Chapitre 1 section 1.4.2.1.

L'Hitachi (cf. figure 3.8) a été modifié de façon à ce qu'il soit capable de faire des mesures de MEEFs consécutives grâce à une tourelle entièrement automatisée et un logiciel de pilotage (FL2012). Ce dispositif, représenté sur la figure 3.9, permet un gain de temps considérable en disposant d'un porte-échantillons de 16 places numérotées permettant d'effectuer des mesures individuelles.

Pour rappel, les mesures de MEEF apportent une information plus complète sur la fluorescence totale des échantillons. Cette mesure permet des comparaisons qualitatives entre les différents pics de fluorescence. Les paramètres d'acquisition des MEEF ont été standardisés. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, les vitesses de balayage, les largeurs de fente, les pas, les résolutions spectrales, le temps de réponse et la tension du photomultiplicateur ont été fixés et les mêmes paramètres ont été appliqués sur l'ensemble des échantillons. Les paramètres d'acquisition des MEEF sont regroupés dans le tableau 3.1.

Le choix de ces paramètres a été réalisé à l'issue de mesures préalables pour un meilleur compromis entre la résolution des mesures et le temps d'acquisition d'une MEEF. Les données obtenues à l'aide du programme développé pour contrôler la tourelle sont au format

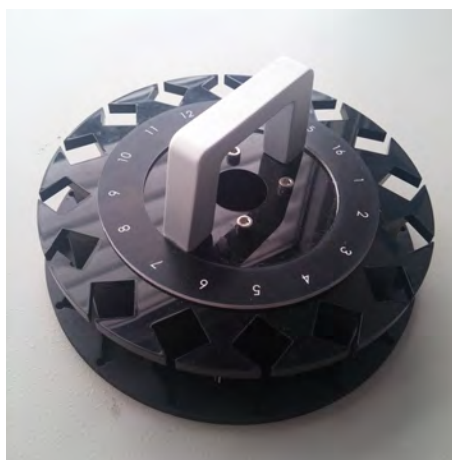


Figure 3.9 – Tourelle à 16 porte-échantillons

Début λ_{Ex}	250.0 nm	Fin λ_{Ex}	450.0 nm
Début λ_{Em}	300.0 nm	Fin λ_{Em}	700.0 nm
Intervalle de λ_{Ex}	5.0 nm	Intervalle de λ_{Em}	5.0 nm
Fente Ex	5.0 nm	Fente Em	5.0 nm
Vitesse	2400 nm.min ⁻¹	PMT	700 V

Tableau 3.1 – Paramètres d'acquisition des MEEFs avec l'HITACHI F4500

texte (.txt), ce qui facilite le traitement des données par la suite (voir section traitement de données 3.2.3)

Les échantillons de MOD et d'ETM sont placés dans une cuve en quartz Suprasil de 10 mm de largeur pour un volume de 3,5 mL (cf. figure 1.1). Comparé au verre, le quartz suprasil n'absorbe pas les UV et ne contient pas d'impuretés fluorescentes, ce qui permet l'analyse des propriétés optiques des échantillons dans ce domaine de rayonnement.

3.1.5.2 Spectrophotomètre TECAN M1000

Le second spectrophotomètre permettant de faire des mesures en mode stationnaire est le modèle TECAN infinite M1000 (cf. figure 3.10) équipé d'une lampe flash Xénon avec une fréquence de 400 Hz. Ce modèle est équipé d'un lecteur de microplaque et a la particularité d'avoir un module d'injecteurs (cf. figure 3.11) ce qui facilite les ajouts de solutions et limite les erreurs liées aux micropipettes. Le module est équipé de deux pompes séparées, de fines aiguilles permettant l'injection de solution liquide dans tous les puits et de seringues d'un volume standard de 1000 μ L. Avant d'utiliser le système d'injection, une première étape de remplissage est nécessaire pour éliminer tout l'air et pour remplir complètement le système avec les solutions. Toutes les étapes d'injections et de mesures sont effectuées sur un logiciel très facile d'utilisation et entièrement automatisé (i-control).

Ce système peut être utilisé avec différents modes de mesures notamment en absorbance, fluorescence, ou fluorescence résolue en temps. L'excitation par la lumière et la lecture de



Figure 3.10 – Spectrophotomètre TECAN M1000

la microplaque peuvent être réalisées par le dessous ou le dessus. Le mode choisi pour nos mesures en l'occurrence est le mode de lecture par le dessous.

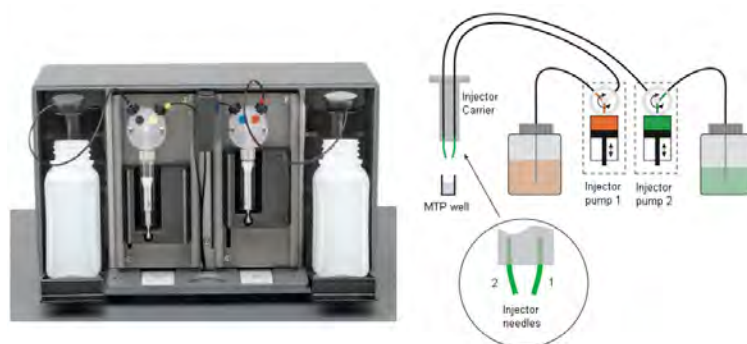


Figure 3.11 – Module d'injecteur du TECAN M1000

La microplaque utilisée est une microplaque en quartz noircie de 96 puits (Hellma, 730.009B-QG). Lors des ajouts, le volume final a été ajusté pour atteindre 300 μL . La microplaque a été couverte avec un morceau de silicone et un couvercle en quartz attaché par du scotch (cf. figure 3.10), secouée pendant 60 secondes et laissée en attente pendant 15 minutes avant le début des mesures des MEEF. Les paramètres d'acquisition des MEEF ont été fixés pour tous les échantillons et sont représentés sur le tableau 3.2

Des mesures d'absorbance et de fluorescence point par point ont été effectuées avant et après pour comparer et s'assurer de la non-dégradation des échantillons par la lampe à cause du temps de mesure (estimé à 12h).

Début λ_{Ex}	250.0 nm	Fin λ_{Ex}	550.0 nm
Début λ_{Em}	300.0 nm	Fin λ_{Em}	700.0 nm
Intervalle de λ_{Ex}	5.0 nm	Intervalle de λ_{Em}	5.0 nm
Fente Ex	10.0 nm	Fente Em	10.0 nm
Gain	100	Temps d'intégration	20 μ s
Nombres de flash	50		

Tableau 3.2 – Paramètres d'acquisition des MEEFs avec le TECAN M1000

Les données obtenues sont enregistrées par le logiciel sous format Excel (.xlsx). Ce type de format a été adapté et modifié pour le traitement des données.

3.1.6 Caractérisation par une source d'excitation impulsionnelle

L'utilisation de sources d'excitation continues dans le temps permet de faire des mesures simples à effectuer et de caractériser spectralement les fluorophores d'un échantillon. Malgré ces atouts, la caractérisation temporelle des composants fluorescents ne peut pas être obtenue à partir de mesures de MEEF. Il n'est donc pas possible d'affirmer que les spectres d'émission estimés après traitement de données par PARAFAC correspondent à des composants physiques. De plus, certains fluorophores possèdent des propriétés spectrales similaires émettant à la même longueur d'onde d'émission. Grâce aux mesures des temps de vie, il est donc possible de procéder à une séparation de sources car chaque fluorophore a sa propre signature temporelle. La SLRT permet également de distinguer le type de quenching qui se produit en analysant les données spectrales et temporelles, ce qui représente un point crucial dans ce travail basé sur l'étude des interactions à l'échelle moléculaire par quenching de fluorescence. Pour ces raisons, l'approche SLRT est une technique complémentaire qui doit être privilégiée si on souhaite obtenir plus d'informations sur la composition d'une solution et suivre l'évolution des composants fluorescents d'un échantillon à l'autre. Un laser picoseconde devait initialement être utilisé dans ce travail. Cependant, ce modèle a été remplacé par un laser nanoseconde (cf. Figure 3.12) (présenté dans la section suivante) à cause de problèmes techniques.

3.1.6.1 Laser nanoseconde Spectra Physics Quanta–RAY INDI

Bien que la spectroscopie laser résolue en temps nécessite généralement une instrumentation complexe et coûteuse, c'est une technique particulièrement puissante pour la caractérisation de molécules complexes. Deux approches ont été présentées dans le chapitre 1 section 1.8.1 et celle utilisée dans ce travail est l'approche temporelle.

Le système pour la spectroscopie résolue en temps est composé d'une source laser excitatrice, d'un spectromètre pour la sélection des longueurs d'onde d'intérêt, d'une caméra ICCD (Intensified Charge Coupled Device) et d'un générateur de fonctions comme indiqué sur la figure 3.13

Le laser utilisé dans cette étude est un laser nanoseconde (Spectra Physics Quanta–Ray INDI) Nd: YAG¹ et alimenté par des lampes flash émettant à une longueur d'onde typique

1. Acronyme du nom anglais : Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet, en Français : grenat



Figure 3.12 – Laser nanoseconde Quanta-Ray INDI

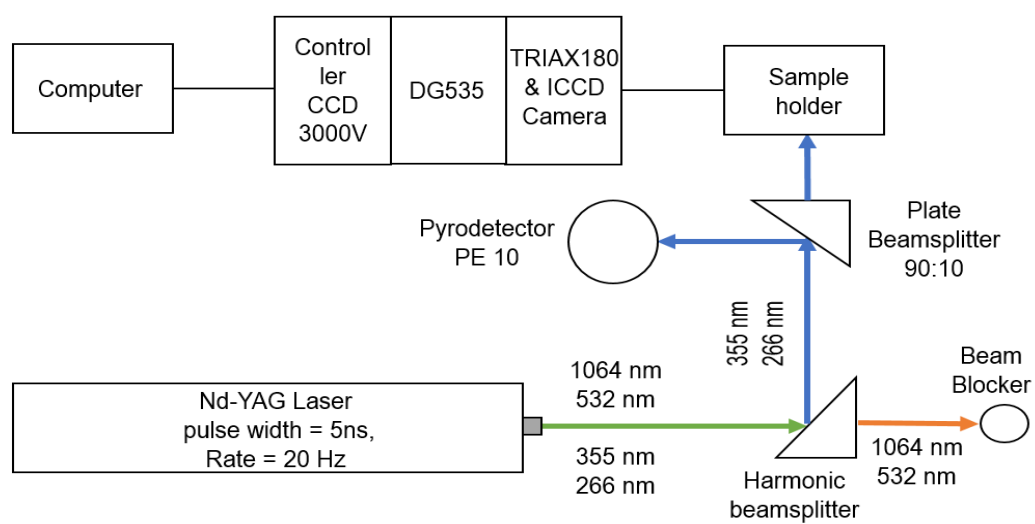


Figure 3.13 – Montage expérimental de spectroscopie laser résolue en temps

Longueur d'onde (nm)	Énergie (J)	Éclairement (KJ/m ²)	E (W/m ²)	Puissance crête (MW)	Puissance moyenne (W)
1064	420	5,35	$1,07 \cdot 10^{+12}$	84	8,4
532	160	2,04	$4,07 \cdot 10^{+11}$	32	3,2
355	100	1,27	$2,55 \cdot 10^{+11}$	20	2
266	40	0,51	$1,02 \cdot 10^{+11}$	8	0,8

Tableau 3.3 – Caractéristiques du laser nanoseconde Quanta-Ray INDI

de 1064 nm dans l'infrarouge. Il fonctionne principalement en mode Q-switching à l'aide d'une cellule de Pockels placée dans la cavité laser. Des cristaux permettent de générer dans certaines conditions, le deuxième, troisième et quatrième harmonique du faisceau optique incident de fréquence fondamentale. Ce qui permet d'obtenir des longueurs d'onde de 532, 355 et 266 nm, respectivement. Le laser fournit un faisceau de 10 mm de diamètre, une impulsion de 5 ns de large avec une fréquence de tir de 20 Hz. L'énergie en sortie du laser de pompe est de l'ordre de 420 mJ. Un sélecteur de faisceau harmonique permet d'obtenir la longueur d'onde d'excitation souhaitée en l'occurrence le troisième harmonique à 355 nm pour une énergie de 100 mJ. Le tableau 3.3 rassemble les valeurs d'énergies, d'éclairements et de puissance pour les longueurs d'ondes capable d'être émises par le laser.

Une partie minime du faisceau incident est dirigée vers un capteur de puissance laser pyroélectrique (PE10, Ophir Optronics) pour effectuer les corrections et normalisations nécessaires en terme de fluctuations d'énergie. L'autre partie du faisceau est dirigée vers un porte-échantillon entièrement automatisé et permettant de se positionner à la sortie souhaitée grâce à un système de platines de translation micrométriques pas à pas (Newport, IMS600PP). Suite à l'excitation, la lumière émise de façon isotrope par l'échantillon est collectée à 90° à travers un faisceau de 16 fibres optiques de 200 µm de diamètre vers la fente d'entrée d'un spectromètre de type Czerny-Turner (TRIAX 180, Horiba Jobin-Yvon). Ce spectromètre possède une distance focale de 180 mm pour une ouverture d'angle de $f/3.9$ ainsi que trois réseaux de diffraction UV-Visible² permettant d'obtenir différentes résolutions spectrales allant de 0,27 nm/pixel à 0,034 nm/pixel. Le spectromètre est relié à une caméra ICCD (Horiba Jobin-Yvon). Ces caméras ont la particularité d'associer un capteur matriciel à transfert de charges (CCD) avec un amplificateur (ou intensificateur) de lumière et sont refroidies grâce à une cellule à effet Peltier afin de réduire le bruit thermique du détecteur. Il est également relié à un générateur de fonctions (DG535, Stanford Research Systems) qui produit une impulsion électrique définie par une largeur et un décalage temporel. Le signal recueilli est ensuite traité, amplifié et converti en données numériques par le contrôleur de détection (CCD 3000V, Horiba Jobin-Yvon). Tous les détails concernant la fonction de chaque système sont dans la section 3.2.1.

L'obtention des spectres résolus en temps requiert une bonne synchronisation entre l'ensemble de ces systèmes de mesures pour pouvoir détecter et enregistrer correctement les signaux de fluorescence.

d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd :Y3Al5O12)

2. Les trois réseaux de diffraction de 300 traits.mm⁻¹, 900 traits.mm⁻¹ et 2400 traits.mm⁻¹



Figure 3.14 – schéma du système d'acquisition

3.2 Méthodes

Cette partie se propose de développer l'approche méthodologique et expérimentale afin de caractériser les interactions entre la matière organique et les éléments métalliques. Le suivi de leurs évolutions spectrales et temporelles permet une meilleure appréhension de leurs impacts sur l'environnement. Une seconde partie présente les différentes approches analytiques appliquées pour le traitement de données dans le but d'atteindre les objectifs de ce travail.

3.2.1 Ajouts logarithmiques

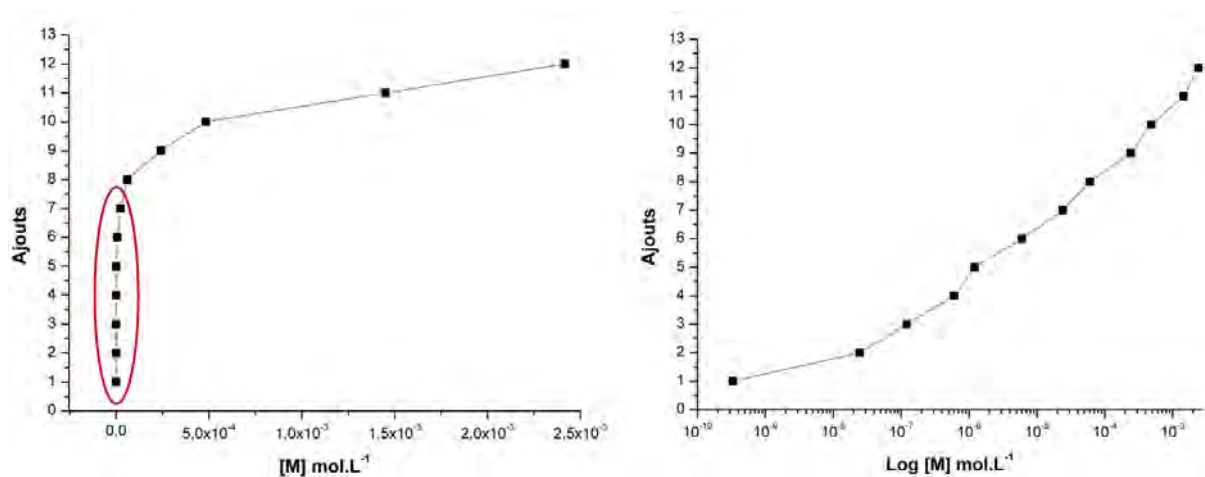


Figure 3.15 – Représentation des ajouts logarithmiques en échelle linéaire (à gauche) et en échelle semi-log (à droite)

Le quenching de fluorescence est obtenu par ajouts de volume en métal de sorte que la concentration totale en métal varie de façon logarithmique dans les solutions analysées à chaque ajout. Ce type d'ajouts permet d'atteindre des gammes de concentrations beaucoup plus étendues que dans le cas d'ajouts linéaires (cf. figure 3.15). Il permet également d'atteindre des sites de complexation agissant à faibles concentrations. Nous procédons donc à

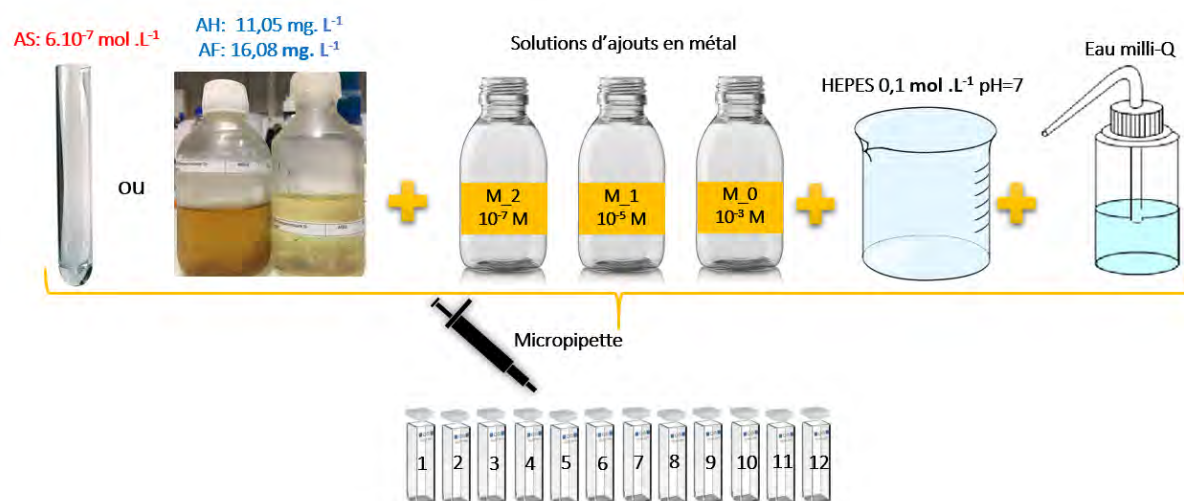


Figure 3.16 – Schéma du procédé expérimental des ajouts métalliques

des ajouts logarithmiques pour pouvoir balayer plusieurs ordres de grandeurs de concentrations dont les faibles concentrations au niveau environnemental.

3.2.1.1 HITACHI F4500

Douze cuves ont été préparées pour chaque métal à l'aide de micropipettes graduées. Chaque cuve contient un volume constant de 1 mL d'acide salicylique ou 300 μL de matière organique, un volume variable de métal à différentes concentrations, un volume constant de 1 mL de tampon HEPES à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH}=7,10$. Un volume variable en eau UHQ a servi pour atteindre un volume total de 3 mL dans chaque cuve. Un schéma représentant les différents ajouts est représenté sur la figure 3.16.

Les expériences de quenching sont effectuées en premier lieu avec l'acide salicylique. Comme mentionné dans la section 3.2.3.2.1 (cf. figure 3.20), la concentration optimale d'AS est de $6.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$. La concentration finale des AH et AF utilisée a été maintenue constante à 11,05 et 16,89 mg.L^{-1} respectivement. Le tableau récapitulatif 3.4 représente la procédure d'ajouts logarithmiques. Les pH mesurés des différentes solutions contenant le métal uniquement sont représentés sur le tableau C.1.

3.2.1.1.1 Protocole de nettoyage des cuves Après chaque utilisation, les cuves ont été nettoyées à l'aide d'une pompe selon le protocole suivant :

- Deux fois à l'acide chloridrique HCl à 10%.
- Trois fois à l'eau UHQ.

Les cuves ont été ensuite mises à sécher dans une centrifugeuse pendant 3 minutes. Ce protocole a été répété avant chaque utilisation.

Cuve	Volumes en métal (mL)			AS ou MOD (mL)	HEPES (mL)	Eau UHQ (mL)
	$10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$, $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$			AS : $6.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ AH : 11.05 mg.L^{-1} AF : 16.89 mg.L^{-1}	0.1M pH 7,10	
1	0			1 - 0.3	1	1 - 1.7
2	0.1			1 - 0.3	1	0.9 - 1.6
3	0.5			1 - 0.3	1	0.5 - 1.2
4		0.025		1 - 0.3	1	0.975 - 1.675
5		0.05		1 - 0.3	1	0.95 - 1.65
6		0.25		1 - 0.3	1	0.75 - 1.45
7		1		1 - 0.3	1	0 - 0.7
8			0.025	1 - 0.3	1	0.975 - 1.675
9			0.1	1 - 0.3	1	0.9 - 1.6
10			0.2	1 - 0.3	1	0.8 - 1.5
11			0.6	1 - 0.3	1	0.4 - 1.1
12			1	1 - 0.3	1	0 - 0.7

Tableau 3.4 – Procédure expérimentale d'ajouts logarithmiques pour les mesures en mode stationnaire

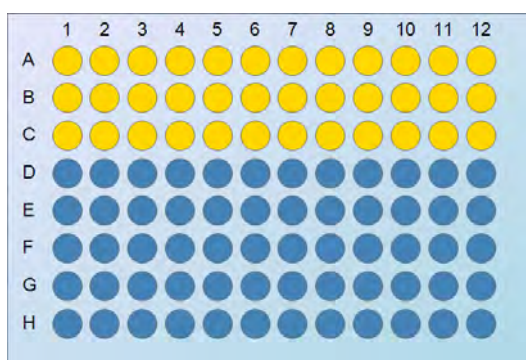


Figure 3.17 – Exemple d'ajouts logarithmiques avec la microplaque en quartz du TECAN

3.2.1.2 TECAN M1000

En ce qui concerne le TECAN M1000, le même protocole d'ajouts logarithmiques a été appliqué à la microplaque en quartz. Le volume total d'ajout est de $300 \mu\text{L}$ et les volumes utilisés dans le cas de l'HITACHI ont été adaptés au TECAN. La microplaque permet d'effectuer 96 mesures avec A1 correspondant à la première cuve dans le cas de l'HITACHI et A12 la dernière cuve. Des triplicats A1–B1 et C1 (cf. figure 3.17) ont été effectués pour s'assurer de la concordance entre les différents résultats.

3.2.1.2.1 Protocole de nettoyage de la microplaque Après chaque utilisation, chaque puits de la microplaque a été nettoyée la veille trois fois à l'hellmanex à 2% et trois fois à l'eau UHQ et mise à sécher toute la nuit.

Cuve	Volumes en métal (mL)			AS ou MOD (mL)	HEPES (mL)	Eau UHQ (mL)
	10^{-7} mol.L ⁻¹ ,	10^{-5} mol.L ⁻¹ ,	10^{-3} mol.L ⁻¹	AS : 6.10^{-7} mol.L ⁻¹ AH : 11.05 mg.L ⁻¹ AF : 16.89 mg.L ⁻¹	0.1M pH 7,10	
1	0			1 - 0.3	1	1 - 1.7
4		0.025		1 - 0.3	1	0.975 - 1.675
7		1		1 - 0.3	1	0 - 0.7
8			0.025	1 - 0.3	1	0.975 - 1.675
9			0.1	1 - 0.3	1	0.9 - 1.6
10			0.2	1 - 0.3	1	0.8 - 1.5
11			0.6	1 - 0.3	1	0.4 - 1.1
12			1	1 - 0.3	1	0 - 0.7

Tableau 3.5 – Procédure expérimentale d'ajouts logarithmiques pour les mesures de temps de vie

Pulse Delay start :	220.0 ns	Pulse Delay end :	340.0 ns
Pulse width :	35.0 ns	Pulse counting :	40
Increment :	0.2 ns	Spectra accumulation :	700

Tableau 3.6 – Paramètres d'acquisition des spectres d'émission et temps de vie de fluorescence

3.2.2 Procédure expérimentale pour les mesures de temps de vie

Sur les 12 cuves préparées initialement pour les mesures de fluorescence en mode stationnaire, 8 cuves (voir tableau 3.5) ont été sélectionnées pour les mesures de temps de vie à partir des courbes de quenching de façon à couvrir une large gamme de concentrations. Avant chaque mesure, les échantillons sont d'abord dégazés pendant 10 min au moins par un flux d'azote pour éliminer les molécules d'oxygène et éviter la photodégradation. L'échantillon est ensuite placé dans le porte-échantillon et le diaphragme qui collecte la lumière et qui se trouve devant la fibre optique est placé à 5 cm de la cuve. La longueur d'onde d'excitation sélectionnée et qui a été utilisée pour étudier tous les métaux d'intérêts est le troisième harmonique à 355 nm.

Un jeu d'instructions spécifiques permet de modifier aisément les deux paramètres (durée d'intensification et retard à l'ouverture) pour obtenir l'évolution temporelle du spectre d'émission. Initialement, le laser déclenche un signal électrique à t_0 en avance sur l'impulsion laser qui arrive à $t_0 + 220$ ns comme indiqué sur la figure 3.18. Ce signal est envoyé par le générateur de fonctions. La fluorescence résolue en temps est ensuite obtenue en augmentant le décalage temporel à petit pas en l'occurrence 0,2 ns. En effet, à différents décalages entre le signal optique reçu et le front montant du signal déclencheur et en faisant varier la porte d'intensification de l'ICCD qui a été fixé à 35 ns, la fluorescence est enregistrée un certain nombre de fois. Pour récapituler, en fixant donc la durée de l'intensification et en augmentant progressivement le retard d'une impulsion laser à une autre, il est possible d'obtenir l'évolution temporelle du spectre d'émission. Pour l'ensemble des paramètres définis, 700 spectres d'émission ont été enregistrés en mode accumulation de spectres pour chaque échantillon. Le tableau 3.6 rassemble les différents paramètres pour l'acquisition des données. Le retard pour avoir le maximum de signal a été sélectionné pour faire des mesures de spectres d'émission avant et après les mesures afin de mesurer une diminution du signal due à une éventuelle photodégradation.

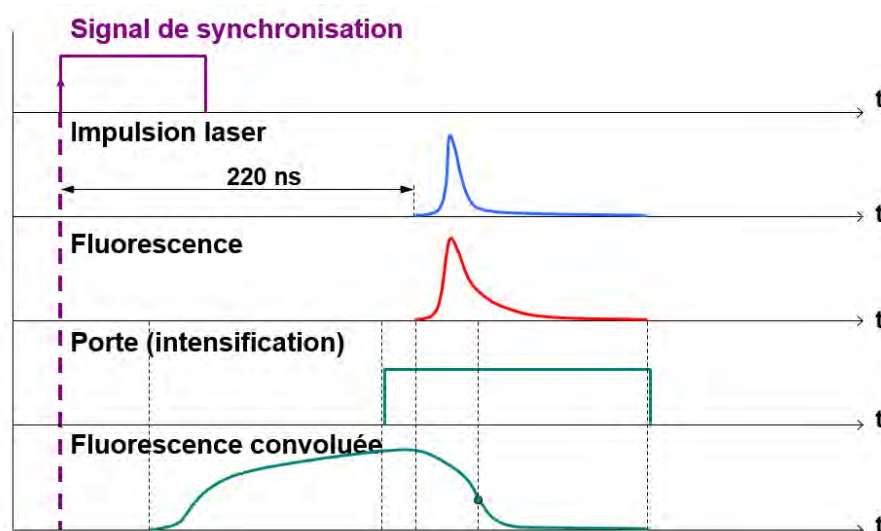


Figure 3.18 – Chronologie de l'analyse temporelle d'un spectre d'émission

Comme mentionné auparavant, une partie du signal est déviée pour mesurer les fluctuations en énergie et effectuer les corrections nécessaires. La description du procédé expérimental pour retrouver les temps de vie de fluorescence est décrite dans la partie 3.2.3.3.

3.2.3 Traitement de données

Cette partie présente les différents traitements de données nécessaires pour l'exploitation de nos résultats. Un modèle simple de complexation 1 : 1 en l'occurrence est d'abord décrit, le modèle 1 : 1 a été choisi car la modélisation a montré en général un bon ajustement par rapport aux résultats expérimentaux. Nous abordons ensuite la technique de décomposition trilineaire CP/PARAFAC pour estimer le nombre de fluorophores contenu dans un mélange ainsi que les pré-traitements effectués sur les MEEF. Pour finir, une description de l'algorithme de déconvolution temporelle pour obtenir les différents temps de vie est détaillée.

3.2.3.1 Modèle de complexation 1 : 1

Dès les années 80, l'utilisation de la fluorescence de la matière organique naturelle a été utilisée pour déterminer ces paramètres de complexation vis-à-vis des métaux [Saar and Weber \(1980\)](#); [Seitz \(1981\)](#). En supposant un modèle de complexation 1 : 1 entre un ligand fluorescent et le métal, [Ryan and Weber \(1982\)](#) ont alors rapidement proposé une équation reliant la fluorescence d'une solution à la concentration totale en métal. Reprenons l'équation d'équilibre 2.1 :



La constante d'équilibre 2.2 s'écrit :

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \iff K[L][M] = [ML] \quad (3.2)$$

Les équations du ligand et du métal libre :

$$\begin{cases} C_L = [L] + [ML] \\ C_M = [M] + [ML] \end{cases} \quad (3.3)$$

On remplace (3.2) dans (3.3) et on obtient :

$$\begin{cases} C_L = [L] + K[L][M] \Rightarrow C_L = [L](1 + K[M]) \\ C_M = [M] + K[L][M] \end{cases} \quad (3.4)$$

On en déduit que :

$$\begin{cases} [L] = \frac{C_L}{1 + K[M]} \\ C_M = [M] + \frac{K[M]C_L}{1 + K[M]} \end{cases} \quad (3.5)$$

En remplaçant $[L]$ dans C_M de l'équation (3.4) on obtient C_M de l'équation (3.5). Après développement de l'équation (3.5) on obtient l'équation du second degré suivante :

$$K[M]^2 + (1 + K(C_L - C_M))[M] - C_M = 0 \quad (3.6)$$

Les deux solutions de l'équation (3.6) sont :

$$[M] = \frac{-b \pm \sqrt{\Delta}}{2a} = \frac{-(1 + K(C_L - C_M)) \pm \sqrt{(1 + K(C_L - C_M))^2 + 4KC_M}}{2K} \quad (3.7)$$

Seul la solution qui a un sens physique est retenue. Le rapport entre la concentration du ligand lié sur la concentration du ligand total est calculé en utilisant la constante de complexation et la concentration de l'ion métallique libre :

$$\frac{[ML]}{C_L} = \frac{K[M]}{K[M] + 1} \quad (3.8)$$

En augmentant la concentration en métal, la proportion de sites complexés augmente par rapport au nombre de site total. L'intensité de fluorescence totale mesurée est égale à la somme de l'intensité des ligands libres I_L et l'intensité des complexes I_{ML}

$$I = I_0 \cdot \ell \cdot k \cdot (\phi_L \cdot \epsilon_L [L] + \phi_{ML} \cdot \epsilon_{ML} [ML]) \quad (3.9)$$

Le quenching d'un ligand fluorescent complexé par un métal peut être décrit en utilisant les différentes intensités de fluorescence individuelles de chaque espèce.

$$I = I_L + I_{ML} \quad (3.10)$$

Les quantités I_L et I_{ML} sont liées à la concentration par leur efficacité de fluorescence. Comme le ligand passe de la forme libre à la forme complexé, l'efficacité quantique varie linéairement en donnant lieu à la relation suivante :

$$[ML]/C_L = (I_L - I)/(I_L - I_{ML}) \quad (3.11)$$

Le rapport $[ML]/C_L$ est la fraction du ligand total lié exprimée en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée I .

La concentration du complexe et le coefficient de complexation peuvent alors être calculés :

$$[ML] = C_L \cdot (I_L - I) / (I_L - I_{ML}) \quad (3.12)$$

L'équation 3.11 prend en compte la concentration du métal ajouté et la concentration du ligand :

$$[ML]/C_L = \frac{1}{(2KC_L)} \left[(KC_L + KC_M + 1) - \sqrt{(KC_L + KC_M + 1)^2 - 4K^2 C_L C_M} \right] \quad (3.13)$$

De façon simple, si l'intensité du ligand seul est ramenée à 100, nous pouvons obtenir l'intensité de fluorescence mesurée décrite par [Ryan and Weber \(1982\)](#) au moyen des équations précédentes :

$$I = \frac{(I_{ML} - 100)}{(2KC_L)} \left[(KC_L + KC_M + 1) - \sqrt{(KC_L + KC_M + 1)^2 - 4K^2 C_L C_M} \right] + 100 \quad (3.14)$$

Cette relation est délicate car les fluorophores se comportent de manière indépendante vis-à-vis des propriétés de complexation. Les données des graphiques de quenching sont modélisées en optimisant les paramètres d'équilibre K , C_L et I_{ML} qui sont déterminés à partir du meilleur ajustement obtenu grâce à l'équation 3.14 considérant que la concentration en métal initial est négligeable dans le cas d'échantillons préparés au laboratoire. L'ajustement a été effectué dans un premier temps, sur une feuille de calcul Excel par régression non-linéaire via le Solveur, ensuite via un programme développé sous Matlab™ en utilisant l'algorithme simplex. Les constantes d'équilibre sont représentées par $\text{Log } K$ ou $\text{Log } K_1$ et $\text{Log } K_2$ lorsque nous retrouvons deux valeurs de constantes pour un complexe 1 : 1. L'optimisation entre les valeurs mesurées et ajustées est définie par l'évaluation du BIAS qui est égal à la somme de la soustraction au carré des intensités de fluorescence mesurées et ajustées 3.15. Un exemple est illustré sur la figure 3.19.

$$\text{BIAS} = \sum_{i=1}^{12} [(I_{F,i,\text{mesurée}} - I_{F,i,\text{ajustée}}) / I_{F,i,\text{mesurée}}]^2 \quad (3.15)$$

3.2.3.2 Décomposition CP/PARAFAC

La connaissance des spectres d'émission permet d'identifier un fluorophore. Dans le cas où le mélange est constitué de plusieurs fluorophores, nous n'avons accès qu'à la mesure des spectres du mélange. Comme évoqué précédemment, il arrive des fois que les pics de fluorescence 3D soient superposés et aient une influence mutuelle sur leur profil et donc sur la position de leur maximum. Cette superposition est en fait une combinaison linéaire de pics de fluorescence propres à chaque fluorophore. [Bro \(1997\)](#) a adapté une méthode numérique permettant la séparation de sources connue sous le nom de CP/PARAFAC (Canonical Polyadic Decomposition/PARALLEL FACTors analysis). Inspiré à la base d'un algorithme développé par Harshman et utilisé dans les années 70 dans le domaine de la psychométrie

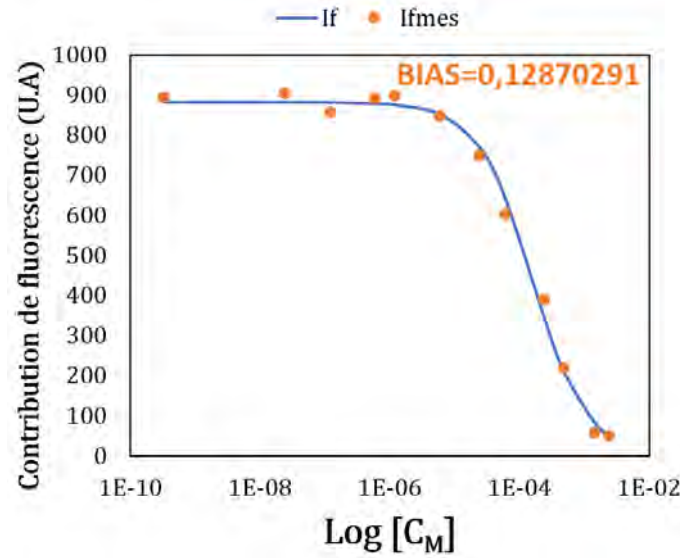


Figure 3.19 – Exemple d'une optimisation 1 : 1 entre $I_{F_i, \text{mesurée}}$ et $I_{F_i, \text{ajustée}}$

Harshman and Lundy (1994, 1984), il est devenu incontournable pour traiter les données multidimensionnelles Bro and Kiers (2003). En effet, CP/PARAFAC est une méthode d'analyse de données consistant à construire un modèle trilineaire, le plus proche possible d'un jeu de données expérimentales. Le principe est simple, l'algorithme utilise un jeu de données noté $\underline{\mathbf{X}}$, contenant les mesures d'une grandeur physique $x_{i,j,k}$ fonction de trois paramètres, i, j, k .

Un modèle trilineaire de $\underline{\mathbf{X}}$ consiste en une combinaison linéaire de trois variables a, b, c dépendant respectivement de i, j, k et d'un paramètre commun n , de telle sorte que :

$$\forall i, j, k \quad x_{i,j,k} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} \quad (3.16)$$

Dans le cas d'analyse de MEEF, chaque élément de $x_{i,j,k}$ de $\underline{\mathbf{X}}$ correspond à l'intensité de fluorescence du i -ème échantillon obtenue pour la j -ième longueur d'onde d'émission et la k -ième longueur d'onde d'excitation. $\underline{\mathbf{X}}$ dépend de trois matrices A, B et C , appelées modes et contient les MEEF de I échantillons correspondant à des mélanges de N fluorophores. La colonne $a_{.n}$ de la matrice A représente l'évolution du produit de la concentration et du rendement quantique du fluorophore n au travers des échantillons. La colonne $b_{.n}$ de la matrice B représente le spectre d'émission du fluorophore n et la colonne de $c_{.n}$ de la matrice C représente le spectre d'excitation du fluorophore n .

Dans le cas d'un jeu de données obtenues à partir de mesures de MEEF, il est rare que $\underline{\mathbf{X}}$ suive parfaitement le modèle trilineaire. L'erreur due à la mesure notée $y_{i,j,k}$ et au modèle nécessite donc l'introduction d'un écart résiduel noté $e_{i,j,k}$. En pratique, on a alors :

$$\forall i, j, k \quad y_{i,j,k} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{i,j,k} \quad (3.17)$$

CP/PARAFAC n'est rien d'autre qu'une routine numérique permettant d'estimer les va-

riables a_{in} , b_{jn} et c_{kn} des matrices A, B et C à partir des seules mesures $y_{i,j,k}$, en utilisant la méthode ALS "Alternating Least Squares". Cette méthode consiste dans un premier temps, en l'initialisation des matrices A, B et C par des coefficients aléatoires, puis d'estimer de façon successive ces trois matrices. Le calcul de l'écart quadratique $e_{i,j,k}$ entre les valeurs de $y_{i,j,k}$ mesurées et $x_{i,j,k}$ calculées à partir des matrices estimées doit être répété jusqu'à l'obtention d'un minimum de cet écart. Cependant, il faut noter que, comme tout algorithme, l'ALS n'exclut pas le problème des minima locaux au cours de la résolution, ce qui peut impliquer une mauvaise estimation des matrices. Dans ce cas-là, une solution simple consiste à relancer plusieurs fois le programme pour réinitialiser les coefficients aléatoires des matrices A, B et C et faire en sorte que les matrices estimées soient associées à l'écart quadratique le plus faible jusqu'à obtenir la meilleure convergence.

Le principal problème lié à cet algorithme concerne une étape décisive du traitement : le choix du nombre N de composants qui doit être choisi par l'utilisateur. Cette étape est très importante et conditionne toute la suite du traitement. C'est pourquoi il faut définir un critère pour estimer ce paramètre N, qui ne peut être connu a priori dans le cas d'échantillons contenant la matière organique. Lorsqu'on ne connaît pas le nombre réel de composants fluorescents, le risque est d'utiliser un modèle de rang sous-estimé ou sur-estimé.

3.2.3.2.1 Pré-traitements Pour appliquer la méthode CP/PARAFAC aux MEEF mesurées, il est nécessaire de :

- S'assurer que les signaux de fluorescence 3D vérifient le modèle trilinéaire.
- Corriger ces signaux du phénomène de diffusion.
- S'affranchir de l'effet d'écran interne.

Affranchissement de l'effet d'écran :

Avant d'entreprendre l'étude des interactions par spectroscopie de fluorescence, il a été nécessaire de déterminer le domaine de linéarité du signal de fluorescence de l'acide salicylique et de la matière organique en fonction de la concentration pour s'affranchir de l'effet d'écran. Cet effet non-linéaire est causé soit par l'absorption progressive du faisceau exciteur soit par l'absorption de la lumière de fluorescence par la solution. La limite de linéarité de l'acide salicylique en l'occurrence est obtenue pour une concentration de 10^{-5} mol.L⁻¹. Dans toute la zone précédant cette valeur, nous pouvons considérer que l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration, ce qui nous permet de choisir la concentration optimale qui sera utilisée à partir de la droite linéaire (cf. figure 3.20).

Après avoir tracé les droites de dilution et choisi la concentration optimale d'utilisation, aucune correction n'a été nécessaire lors du traitement par CP/PARAFAC car toutes les concentrations choisies se trouvaient dans la zone linéaire de fluorescence pour l'AS, l'AH et l'AF.

Correction de la diffusion :

Nous avons présenté dans le Chapitre 1 les phénomènes physiques de diffusion élastique (Rayleigh) et inélastique (Raman). Ces pics de diffusion ne vérifient pas le modèle sur lequel est basé CP/PARAFAC et sont présents dans toutes les MEEF mesurées. Tant qu'ils sont présents dans le signal de fluorescence, CP/PARAFAC n'est pas capable de séparer correctement les différentes contributions spectrales des fluorophores. Il est donc primordial

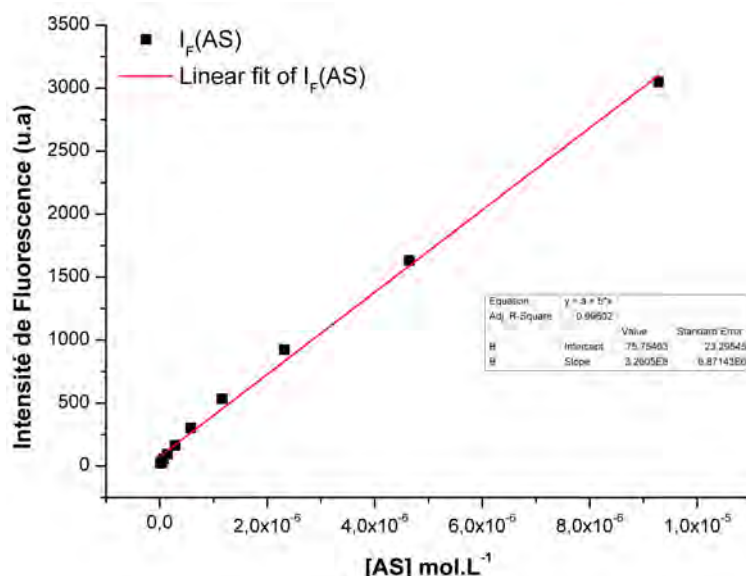


Figure 3.20 – Droite de dilution de l'acide salicylique montrant la linéarité du signal de fluorescence en fonction de la concentration. Spectre d'émission est enregistré à 410 nm avec une longueur d'onde d'excitation à 295 nm et des fentes d'excitation et d'émission fixées à 5 nm

de les éliminer avant de procéder à une déconvolution. Pour ce faire, il existe plusieurs méthodes notamment la méthode décrite par Zepp et al. (2004) qui est rapide et offre une bonne qualité de filtrage. La procédure consiste à "nettoyer" les MEEF des diffusions en coupant les bandes de diffusion Rayleigh aux alentours 20 nm et ensuite appliquer la méthode pour supprimer la diffusion.

3.2.3.3 Algorithme de déconvolution temporelle

L'évolution de l'intensité de fluorescence observée $R(t)$ représentée sur la figure 3.21 correspond à un signal qui évolue dans le temps de façon plus ou moins complexe. Cette courbe ne montre pas la vraie évolution temporelle de fluorescence. Celle-ci est déformé par la réponse IRF de toute la chaîne de détection électronique et optique. $R(t)$ est donc le produit de convolution de $I(t)$ par l'IRF, la réponse de l'appareil.

$$R(t) = I(t) \otimes \text{IRF} \quad (3.18)$$

$I(t)$ représente la fluorescence intrinsèque du déclin.

L'estimation de $I(t)$ est obtenue par déconvolution temporelle pour avoir les amplitudes et temps de vie correspondants. Les données expérimentales du déclin de fluorescence présentent un bruit électronique important. Pour remédier à cela, une correction par réduction de pics est d'abord effectuée pour réduire les pics parasites. Puis une élimination du bruit de fond est ensuite appliquée. L'étape suivante consiste à réduire le bruit et corriger les spectres des fluctuations d'énergie grâce aux mesures obtenues avec le capteur pyroélectrique. Nous procédons ensuite à l'ouverture de la réponse de l'instrument IRF qui est obtenue en mesurant la diffusion du solvant uniquement avec une porte d'intensification de 35 ns. L'IRF est

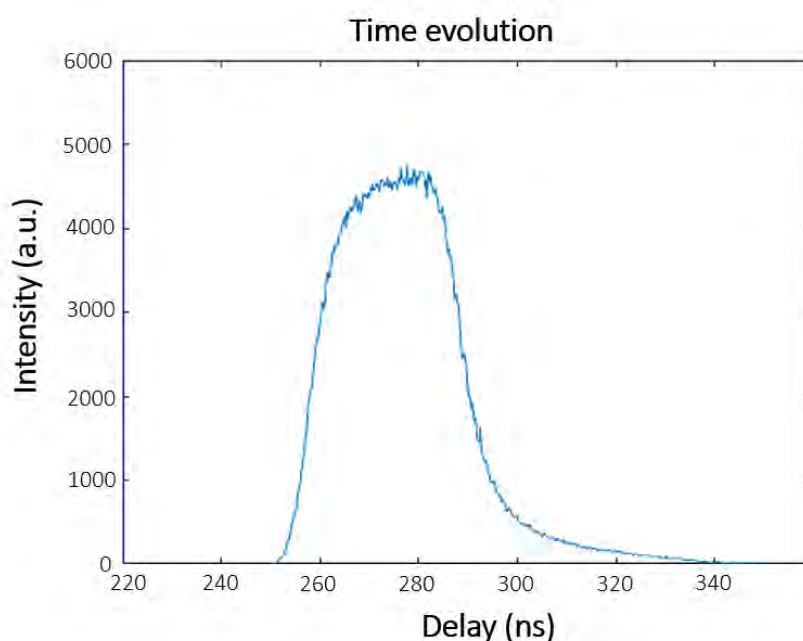


Figure 3.21 – Courbe du profil temporel avec une porte de 35ns

nécessaire pour obtenir les données d'amplitude et temps de vie de fluorescence. La dernière étape est la déconvolution temporelle. Cette étape cruciale consiste en l'initialisation des valeurs d'amplitudes et de temps de vie, ainsi que le choix du modèle de fit, mono, bi, tri-exponentielle etc. Il est possible également avec notre algorithme développé sous MatlabTM de choisir le nombre de lancement du programme pour minimiser l'erreur quadratique et s'approcher du meilleur ajustement possible.

3.3 Conclusion

Ce chapitre est dédié à la description des différentes techniques utilisées notamment les sources continues dans le temps comme les spectrofluorimètres standards HITACHI F4500 et TECAN M1000, et les sources impulsionsnelles telles que le laser nanoseconde Quanta-RAY. Il présente également les méthodologies de mesures, les différentes approches analytiques appliquées et les outils de modélisation permettant le traitement des données obtenues. La combinaison des ajouts logarithmiques avec le quenching de fluorescence 3D, CP/PARAFAC et les mesures de temps de vie ont permis de déterminer respectivement, les constantes de stabilités et les quantités de sites à l'aide d'une modélisation simple 1 : 1, le nombre de fluorophores et les contributions relatives à l'aide d'une décomposition trilineaire PARAFAC et les temps de vie associés à chaque composant à l'aide d'un algorithme de déconvolution temporelle. Pour la première fois, ces cinq outils sont appliqués consécutivement pour caractériser l'interaction entre la matière organique et les éléments métalliques. Les résultats obtenus pour atteindre l'objectif de ce travail sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Résultats des interactions MOD–EM

*"Un pessimiste voit la difficulté dans
chaque opportunité, un optimiste voit
l'opportunité dans chaque difficulté."*

Winston Leonard Spencer Churchill

Ce chapitre est consacré à l'ensemble des résultats obtenus avec les différentes techniques employées ainsi que les résultats obtenus avec le laser nanoseconde Spectra Physics Quanta-Ray pour les temps de vie de fluorescence. Il présente également une comparaison de nos données avec la littérature. Des mesures pour étudier la variabilité en intensité de fluorescence des molécules complexantes notamment l'acide salicylique (AS) et les substances humiques (SH) ont d'abord été effectuées sans ajouts de métal. Ensuite, les résultats en fonction des ajouts sont représentés pour chaque métal (Cu, Al, As, Eu, U). Les décompositions CP/PARAFAC et les contributions spectrales en fluorescence de chaque composant sont normalisées et présentées séparément pour les deux spectrofluorimètres. Le pourcentage du quenching de fluorescence correspond à la diminution en fluorescence mesurée. L'analyse des décompositions CP/PARAFAC se fait donc en cherchant à caractériser chaque composant à partir de son spectre 3D. Le principal critère de comparaison pour les MO porte sur la position des pics de fluorescence décrits par Coble (1996). L'optimisation des paramètres du modèle 1 : 1 permet d'obtenir les paramètres d'équilibre notamment la constante de stabilité Log K et la quantité de site C_L . Une modélisation de chaque contribution spectrale des différents pics calculés par CP/PARAFAC a été effectuée et est montrée sur les graphiques de contributions par les courbes hachurées. Enfin, les résultats de temps de vie de fluorescence sont discutés pour qualifier le type de quenching de fluorescence caractéristique de chaque interaction. Ces résultats sont interprétés par les graphiques de Stern-Volmer qui seront utilisés dans l'interprétation de toutes les données de temps de vie de fluorescence. Il a été démontré que l'interprétation des données via ce graphique représentant I_0/I et τ_0/τ en fonction de la concentration du quencheur, est utile pour déterminer le processus de quenching qui s'opère dans l'hypothèse d'une stœchiométrie de liaison 1 : 1 et également pour déterminer la constante de formation de complexe Log K_S . Les ratios d'intensité dans les graphiques de Stern-Volmer correspondent aux intensités trouvées avec l'HITACHI. Dans ce cas, les contributions C1 et C2 sont utilisées pour déterminer les constantes Log K_{S1} et Log K_{S2} qui sont une manière différente d'estimer la constante de complexation. À noter également que toutes les mesures de temps de vie ont été effectuées avec une seule longueur d'onde d'excitation (355 nm) et que la fluorescence observée et mesurée correspond à celles des ligands fluorescents et non celles des métaux (fluorescents).

4.1 Acide Salicylique

4.1.1 Étude de la variabilité de l'AS

Une étude préalable de la variabilité de l'acide salicylique a été effectuée. Elle consiste à suivre la variation de l'intensité de fluorescence de celui-ci en appliquant notre protocole expérimental sans métal. Ce suivi a permis de s'assurer qu'il n'existe aucune compétition entre le tampon utilisé et le ligand fluorescent et que l'inhibition de fluorescence est due uniquement aux ajouts de métal. Le résultat est représenté sur la figure 4.1 qui montre que l'intensité de fluorescence en fonction des ajouts demeure constante.

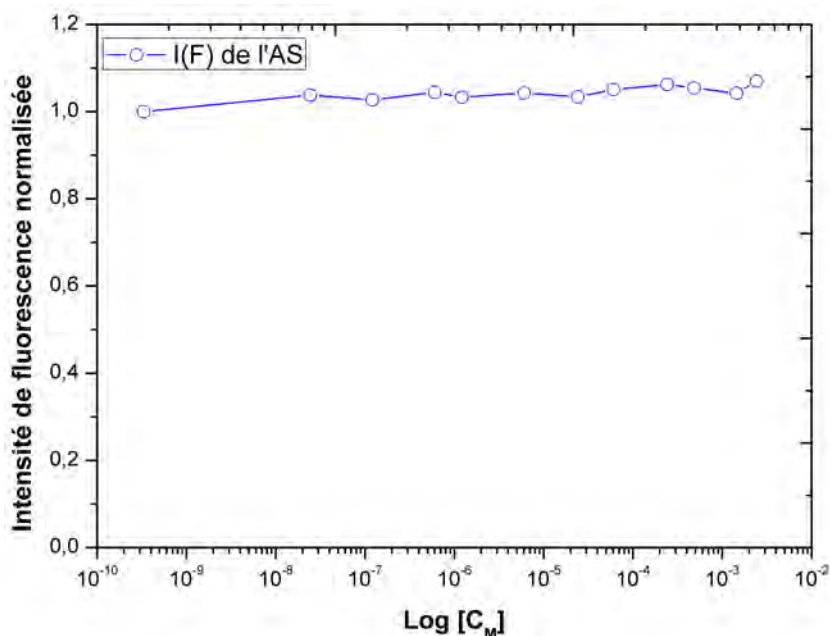


Figure 4.1 – Variabilité de l'intensité normalisée de fluorescence de l'AS sans ajouts en volume de métal

4.1.2 Quenching et temps de vie de fluorescence

Après vérification de la variabilité de l'intensité de fluorescence sans ajouts de métal, nous avons procédé aux ajouts logarithmiques des métaux. Les résultats des interactions entre l'acide salicylique et les différents métaux étudiés ainsi qu'une comparaison avec la littérature sont présentés ci-dessous.

4.1.2.1 Cuivre

En raison de l'importance du complexe AS-Cu(II), de nombreux travaux [Babko \(1947\)](#); [Perrin \(1958\)](#); [Hsiu-Chin \(1966\)](#); [Habashy \(1969\)](#); [Ventry et al. \(1991\)](#); [Lavrik and Mulloev \(2010\)](#) ont déjà été publiés sur ce système car les composés phénoliques et carboxyliques de l'AS permettent une bonne complexation du cuivre. [Ventry et al. \(1991\)](#) ont élaboré en 1991 une méthode rapide pour étudier le quenching de fluorescence. Celle-ci consiste à préparer les échantillons dans le tampon à pH fixe. L'utilisation d'un système tamponné permet l'automatisation des titrages. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée. L'étape finale a consisté en l'ajout de titrant en l'occurrence le Cu^{2+} à pH=6 puis le processus a été répété pour tous les points. Les données collectées ont été traitées en utilisant le modèle 1 : 1 pour déterminer les paramètres d'équilibre notamment la constante de stabilité K dont la valeur est discutée ci-dessous.

Il est à noter qu'aucune étude sur cette interaction combinant une décomposition CP/PARAFAC et des mesures de temps de vie n'a été effectuée. Toutefois, dans leur étude de quenching entre le salicylate de sodium (sel de sodium et de l'acide salicylique de formule $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$) avec le cuivre, [Lavrik and Mulloev \(2010\)](#) ont déterminé la constante de formation K_S et

le type de quenching qui s'opère à partir de l'analyse des courbes de Stern-Volmer. Les résultats sont discutés dans la partie 4.1.2.1 dédiée à nos résultats de temps de vie.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC entre l'acide salicylique et le cuivre indique la présence de 3 composants. Le premier spectre 3D présente une excitation aux alentours de 300 nm et une émission de 410 nm et correspond au pic principal de l'AS (cf. figure 4.2 de droite). Sa contribution spectrale en fonction du logarithme de la concentration associée à chaque ajout de métal est représentée sur la même figure à gauche et décrit une inhibition de fluorescence de 75%. Les contributions en fluorescence des deux autres composants sont très faibles (non montrées sur la figure) par rapport au premier, ils sont donc assimilés à du bruit. La seule fluorescence observée devrait être celle de l'AS car il n'y a qu'une seule molécule fluorescente. Cette hypothèse est appliquée également aux interactions de l'AS avec les autres métaux (Al et As) non fluorescents pour l'HITACHI et le TECAN. L'optimisation de notre modèle 1 : 1 a permis de trouver une constante de stabilité $\text{Log } K=3,68$. Cette valeur est proche de celles trouvées par Ventry et al. (1991) ($\text{Log } K=3,20\pm0,10$) et Martell and Smith (1974) ($\text{Log } K=3,21$).

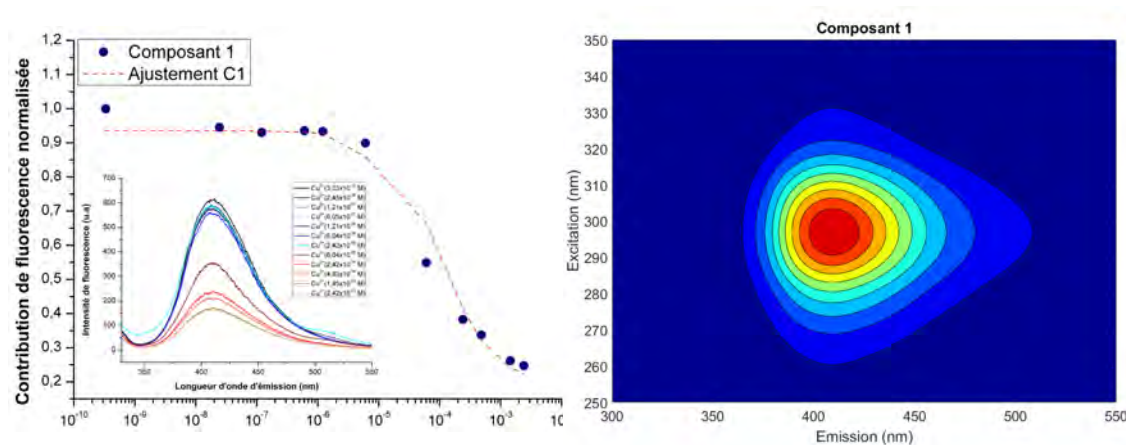


Figure 4.2 – **HITACHI**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS–Cu(II)

TECAN M1000 La décomposition CP/PARAFAC des données obtenues par le TECAN indique la présence de 3 composants également. Seul le composant le plus fluorescent (à droite de la figure 4.3) et sa contribution en fluorescence (à gauche) sont représentés. Ce composant possède un maximum de fluorescence centré sur $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=315/400$ nm et sa contribution indique une décroissance de fluorescence aux alentours de 70% et une constante de stabilité $\text{Log } K=2,90$ plus faible que celle retrouvée avec l'HITACHI.

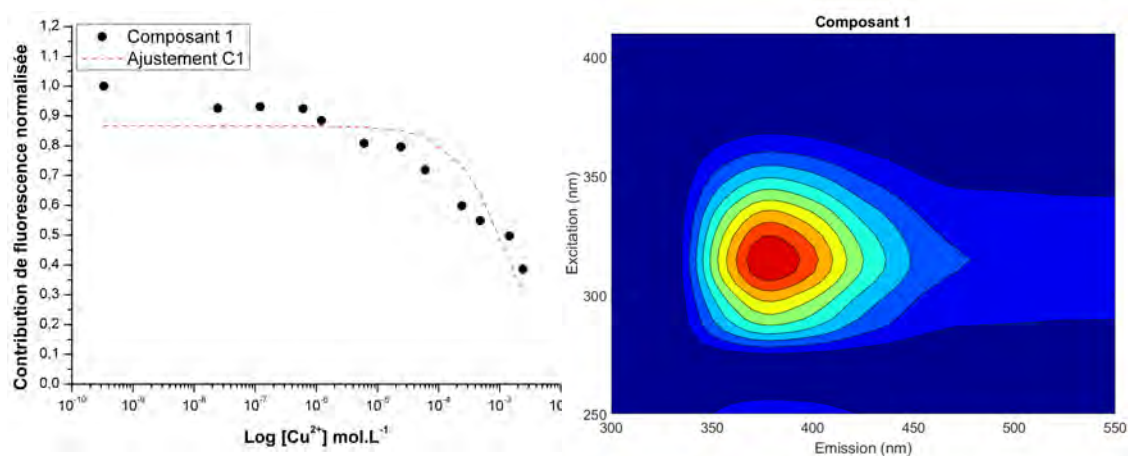


Figure 4.3 – **TECAN**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS–Cu(II)

Le tableau 4.1 présente les pics identifiés par CP/PARAFAC :

	HITACHI F4500		TECAN M1000	
Composants	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	300	410	320	370

Tableau 4.1 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'AS–Cu(II)

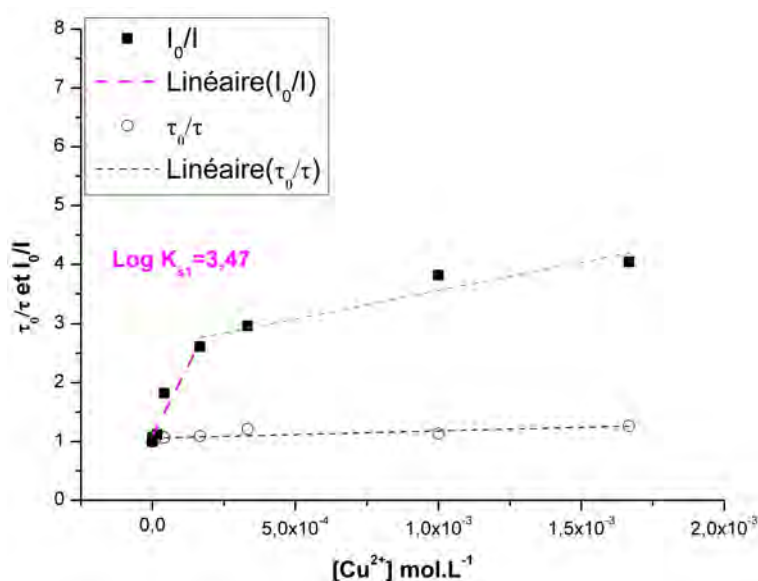


Figure 4.4 – Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et le Cu(II)

Interaction	Biblio	Technique	N° Comp.	%Corcondia	Log K	τ_{moy} (ns)
AS-Cu(II)	Cette étude	HITACHI F4500	3	68,39	3,68	2,88±0,18
		TECAN M1000	3	91,45	2,90	
		Quanta-Ray	Mono-exp		3,47	
	Martell and Smith (1974)	non communiqué			3,21	Q. statique
	Ventry et al. (1991)	Spectrofluorimétrie			3,20±0,10	
	Lavrik and Mulloev (2010)	Spectrofluorimétrie			3,16	

Tableau 4.2 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-Cu(II)

Quanta-Ray Sur la figure 4.4, le ratio du temps de vie évalué pour chaque point est constant et $\tau_0/\tau \approx 1$, ceci indique la formation d'un complexe entre l'AS et le Cu(II) et cette formation de complexe se traduit par la présence d'un quenching statique dans cette interaction. La constante $K_S=3,47$ du quenching statique a donc été calculée en utilisant la droite de régression linéaire représentée en rose sur la même figure. L'analyse du ratio d'intensité dévoile clairement une non-linéarité. Ce phénomène survient lorsque l'on atteint une forte capacité de complexation. Lavrik and Mulloev (2010) ont également trouvé un quenching statique pour cette interaction et une constante $\text{Log } K_S=3,16$. Ils ont déduit que la non-linéarité du ratio d'intensité de fluorescence est proportionnelle aux fluorophores inaccessibles pour le quenching. La déconvolution temporelle indique une décroissance mono-exponentielle de la fluorescence de l'AS en présence du Cu(II) et un temps de vie moyen égal à $\tau_{\text{moy}}=2,88$ ns. Ce temps de vie représente la moyenne des temps de vie de chaque échantillon. Tous les autres métaux (non-fluorescents et fluorescents) qui interagissent avec l'acide salicylique montrent également une décroissance mono-exponentielle. Le tableau 4.2 montre un récapitulatif des résultats obtenus entre l'interaction de l'AS-Cu(II).

4.1.2.2 Aluminium

L'interaction entre l'AS et l'Al(III) a très peu été étudiée et la plupart de ces études (Elkins and Nelson (2001); Luster et al. (1996); Elkins and Nelson (2002)) ont montré l'existence d'un décalage des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'AS en présence d'Al mais n'ont pas rapporté les paramètres d'équilibre notamment les constantes de stabilité. Toutefois, une étude de Cathalifaud et al. (1997) a montré à pH=4,6 que le complexe AS-Al(III) est formé dans une stœchiométrie 1 : 1 avec une constante de stabilité $\text{Log } K=4$. Hue et al. (1986) ont trouvé également une constante pratiquement similaire, $\text{Log } K=4,74\pm0,14$. Pour la première fois, l'étude de l'AS-Al(III) par quenching de fluorescence et temps de vie va permettre de connaître le type d'interaction responsable du quenching.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC de l'interaction entre l'AS et l'Al(III) indique la présence de 2 composants. Le composant principal (cf. figure de droite 4.6) a une longueur d'onde d'excitation et d'émission caractéristique de l'AS (300/410 nm). Sa contribution spectrale en fluorescence (cf. figure de gauche 4.6) montre une légère décroissance aux alentours de 15%. Le modèle 1 : 1 indique une constante $\text{Log } K=2,54$. Cette valeur est similaire à celle trouvée par le TECAN $\text{Log } K=2,51$ mais inférieure à la constante trouvée par Cathalifaud et al. (1997). Cette différence est probablement liée au

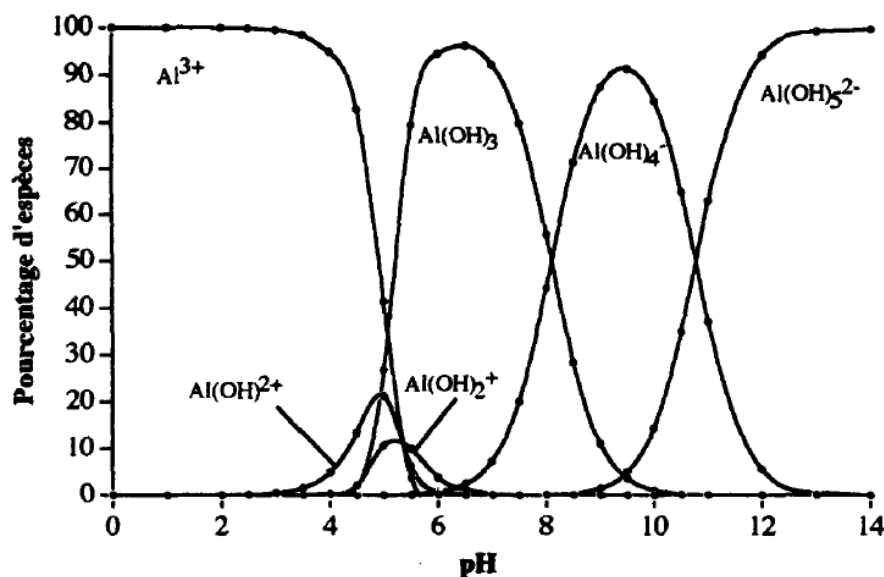


Figure 4.5 – Diagramme de répartition des différentes espèces de l'aluminium (issu de Cathalifaud et al. (1997))

pH utilisé car à pH 4,6, les ions monomères Al^{3+} sont majoritaires tandis qu'à pH=6 de notre étude, ils représentent un pourcentage moins important de l'aluminium total (cf. figure 4.5)

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés par CP/PARAFAC sont rappelées dans le tableau 4.3 :

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$
Pic 1	300	410	300	410

Tableau 4.3 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AS-Al(III)

TECAN M1000 Les données obtenues avec le TECAN sont en bonne corrélation avec celles de l'HITACHI. Le composant identifié par CP/PARAFAC est identique au spectre 3D de l'HITACHI avec les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission caractéristique de l'AS (cf. figure 4.7). La contribution en fluorescence avec le TECAN montre une décroissance supérieure à l'HITACHI aux alentours de 45%, malgré la présence d'un point aberrant. En toute logique, la décroissance devrait être similaire. Une hypothèse permettant d'expliquer un tel écart est soit liée à la sensibilité du TECAN, soit à une différence dans le protocole expérimental. Pour rappel, le TECAN dispose d'une microplaque et d'un couvercle en quartz et le protocole initialement mis au point pour l'HITACHI a été adapté pour le TECAN.

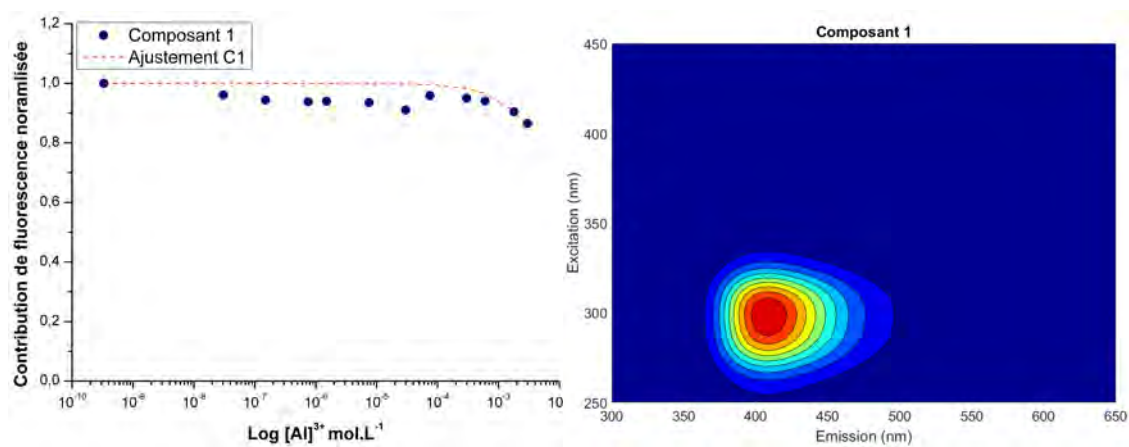


Figure 4.6 – **HITACHI**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS–Al(III)

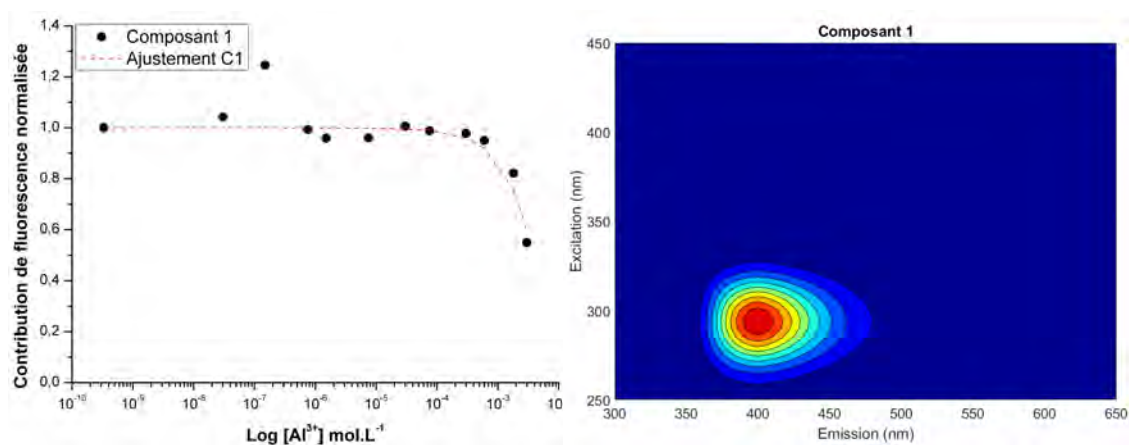


Figure 4.7 – **TECAN**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS–Al(III)

Interaction	Biblio	Spectro	N° Composants	% Concordia	Log K	τ_{moy} (ns)
AS–Al(III)	Cette étude	HITACHI F4500	2	99,45	2,54	$3,37 \pm 0,28$
		TECAN M1000	2	99,94	2,51	
		Quanta-Ray	Mono-exp		2,07	
	Hue et al. (1986)	chromatographie			$4,74 \pm 0,14$	Q. statique
	Cathalifaud et al. (1997)	spectrophotométrie			4	

Tableau 4.4 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AS–Al(III)

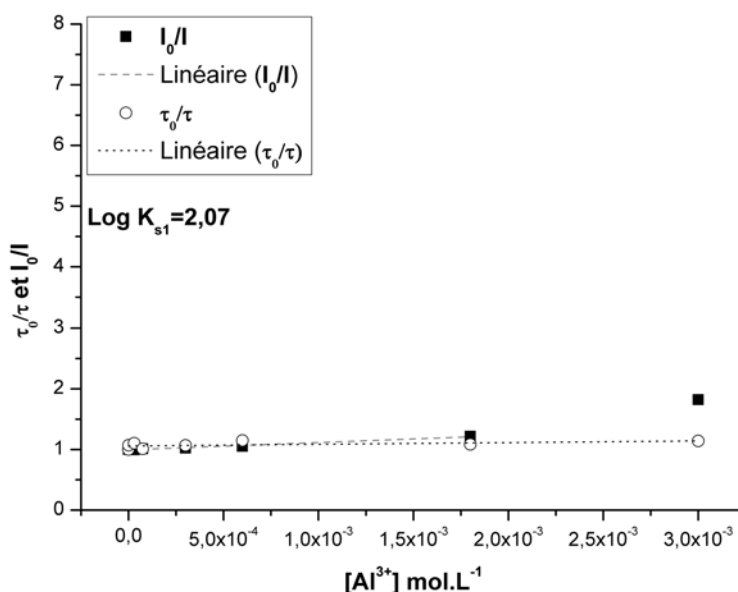


Figure 4.8 – Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et l'Al(III)

Quanta-Ray Le ratio de temps de vie fournit des valeurs constantes aux alentours de 1 (cf. figure 4.8). Le ratio d'intensité de fluorescence quant à lui indique une courbe croissante et concave différente de celle obtenue avec le cuivre. Cette allure montre que le rendement quantique du complexe est inférieur au rendement quantique du ligand et que la capacité de complexation n'est pas atteinte. Nous pouvons conclure que le quenching qui s'opère dans cette interaction est le quenching statique car $\tau_0/\tau = 1$. La constante de formation du complexe calculée est égale à $\text{Log } K_S = 2,07$. La décroissance mono-exponentielle indique un temps de vie moyen égal à $\tau_{\text{moy}} = 3,73$ ns.

Le tableau 4.4 résume les résultats de l'interaction AS–Al(III).

4.1.2.3 Arsenic

L'étude de l'interaction de l'acide salicylique avec l'arsenic sous forme d'oxycation $[\text{AsO}_4]^{3-}$ par spectroscopie de fluorescence et par spectroscopie laser n'a jamais été effectuée. Une étude de Karim et al. (2006) basée sur le comportement de l'intensité de fluorescence en présence du tri-oxyde d'arsenic As(III) et d'un détergent et tensioactif (do-décylsulfate de sodium (SDS)) a été développée. Elle a permis de mettre en évidence que l'As(III) en présence d'un tensioactif augmentait de 10 fois plus l'intensité de fluorescence de l'acide salicylique. Les concentrations du système AS–As(III)–SDS ont été optimisées

pour obtenir les plus fortes intensités d'émission avec une faible limite de détection et une gamme linéaire assez large.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC indique la présence d'un seul composant (cf. figure 4.9) avec les mêmes propriétés optiques que celles de l'AS (λ_{ex} : 300 nm/ λ_{em} : 410 nm). La contribution en fluorescence de celui-ci, représentée sur la même figure 4.9) à gauche, montre qu'aucune inhibition de fluorescence n'a été observée.

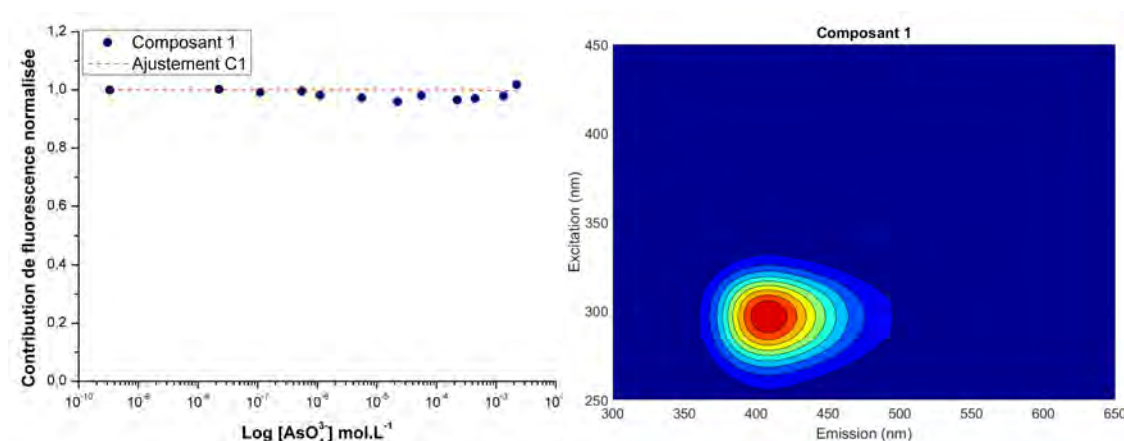


Figure 4.9 – **HITACHI**—Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS-As(V)

TECAN M1000 Un seul composant a été identifié par CP/PARAFAC 4.10 représentant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'AS(V). La linéarité de la contribution de fluorescence du composant indique également l'absence de quenching entre l'AS et l'As(V). Les constantes de stabilities calculées sont inférieures à 0,5 (échelle logarithmique).

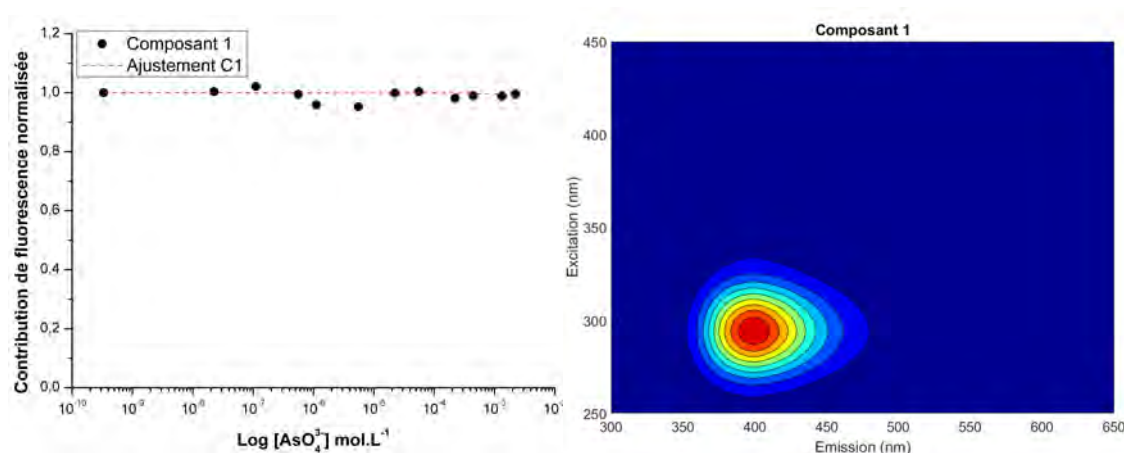


Figure 4.10 – **TECAN**—Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS-As(V)

Ci-dessous, le tableau (4.5) récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés par CP/PARAFAC :

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	300	410	300	410

Tableau 4.5 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AS-As(V)

Quanta-Ray Les analyses de temps de vie de fluorescence à travers le graphique de Stern-Volmer indiquent que le ratio du temps de vie est inchangé (aux alentours de 1) en fonction des ajouts de l'As(V). À cause des fortes fluctuations en énergie laser remarquées au cours de nos mesures, l'analyse des données récoltées pour calculer le temps de vie du 10^{ème} échantillon n'a pas pu aboutir. L'invariabilité du ratio de temps de vie nous renseigne sur l'existence d'un quenching statique lors de l'interaction entre l'AS et l'As(V).

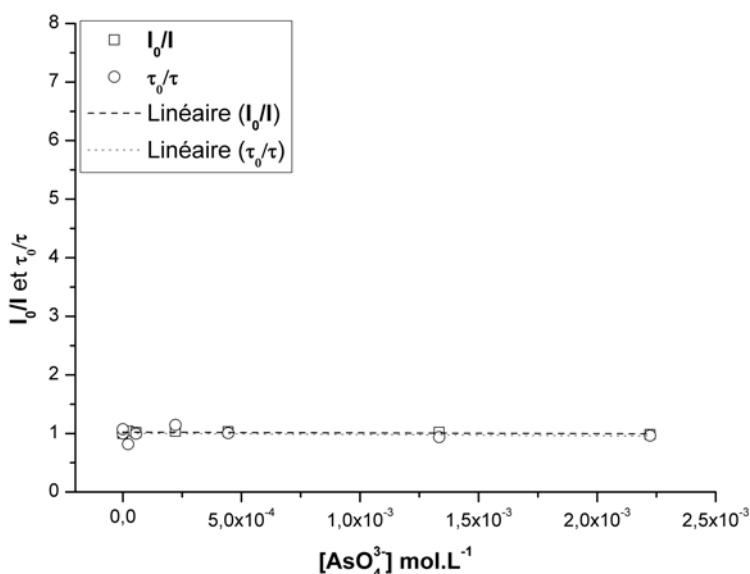


Figure 4.11 – Graphique de Stern-Volmer de l'interaction entre l'AS et l'As(V)

Le tableau 4.6 met en évidence les principaux résultats de l'interaction AS-As(V) :

Interaction	Spectro	N° Composants	%Corcondia	Log K	τ_{moy} (ns)
AS-As(V)	HITACHI F4500	1	100	–	$3,09 \pm 0,80$
	TECAN M1000	1	100	–	
	Quanta-Ray	Mono-exp		–	Q. statique

Tableau 4.6 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-As(V)

4.1.2.4 Europium

L'étude de l'interaction entre l'AS et l'Eu a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs [Hasegawa et al. \(1989, 1990\)](#); [Aoyagi et al. \(2004\)](#); [Barkleit et al. \(2013\)](#); [Kuke et al. \(2010\)](#); [Irving and Sinha \(1970\)](#); [Toraishi et al. \(2005\)](#). En effet, l'acide salicylique offre des sites de complexation impliquant les groupes COOH et OH et forment des chélatants forts avec l'Eu³⁺ [Toraishi and Grenthe \(2003\)](#); [Toraishi et al. \(2004\)](#). Une étude théorique de [Toraishi et al. \(2005\)](#) a montré que la complexation entre l'AS et l'Eu se produit dans une stœchiométrie 1 : 1 en phase aqueuse. [Toraishi et al. \(2004\)](#) ont communiqué dans leur étude la formation de deux types de complexes formés à l'état fondamental entre l'Eu(III) et l'acide sulfo-5-salicylique, Eu(HSSal)⁺ et Eu(SSal)⁰. [Hasegawa et al. \(1989\)](#) ont également déterminé les constantes de stabilité de ces complexes avec des rapports métal-ligand 1 : 1 et 1 : 2. Dans une étude récente, [Barkleit et al. \(2013\)](#) ont révélé la formation de complexes 1 : 1, 1 : 2 et 1 : 3 en phase aqueuse. Que ce soit par spectroscopie de fluorescence ou par potentiométrie, ces études ont permis d'établir des constantes de stabilité du complexe Eu(III)-AS et aussi de déterminer le type de quenching qui s'opère. Tous les résultats issus de ces travaux sont discutés ci-dessous.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC du quenching AS-Eu(III) montre la présence de 2 composants (cf. figure 4.12). Le premier composant est de toute évidence l'AS avec des ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=300/410 nm. La contribution spectrale en fluorescence est montrée sur la même figure. Une décroissance de fluorescence de 52% s'opère et on ne l'observe qu'à partir d'une concentration de $5,48 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹. La stabilité de l'intensité de fluorescence des premiers points peut-être due à une diffusion entre les molécules n'entraînant aucune inhibition de fluorescence et une plus grande concentration d'Eu(III) est nécessaire pour la formation un complexe avec l'AS. Le deuxième composant quant à lui a une très faible intensité de fluorescence et sa contribution ne présente aucune décroissance ni de pic de fluorescence significatif sur la MEEF correspondante. Par conséquent, il est associé à un facteur de bruit.

La modélisation 1 : 1 du premier composant via le modèle 1 : 1 fournit une constante de stabilité Log K=2,93. [Barkleit et al. \(2013\)](#) ont trouvé pour le complexe 1 : 1 une constante de stabilité inférieure : Log K=2,47. Une étude de [Aoyagi et al. \(2004\)](#) pratiquement similaire à notre protocole (mesures des propriétés de fluorescence du ligand) à pH=4,00 a été effectuée par SLRT. La concentration de l'AS a été maintenue constante à $1 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ et la concentration de l'Eu a été variée de $1,98 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ à $1,31 \cdot 10^{-2}$ mol.L⁻¹. À partir de la courbe de Stern-Volmer, ils ont trouvé la formation d'un complexe 1 : 1 avec une constante de stabilité Log K_S=2,08±0,02. [Hasegawa et al. \(1989\)](#) ont utilisé la méthode potentiométrique au moyen d'une électrode de verre à pH=6 et ont trouvé une constante Log K=2,02. Cette valeur s'accorde très bien avec la constante de [Aoyagi et al. \(2004\)](#). À partir de la pente de la figure de Stern-Volmer, nous avons également trouvé une valeur Log K_S=2,66 plus ou moins proche de celles annoncées dans ces deux études.

TECAN M1000 Le TECAN indique la présence de 3 composants avec CP/PARAFAC (cf. figure 4.13). Aucun des composants ne correspond aux longueurs d'excitation et d'émission de fluorescence de l'AS ni aux composants retrouvées par l'HITACHI. Les $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ du

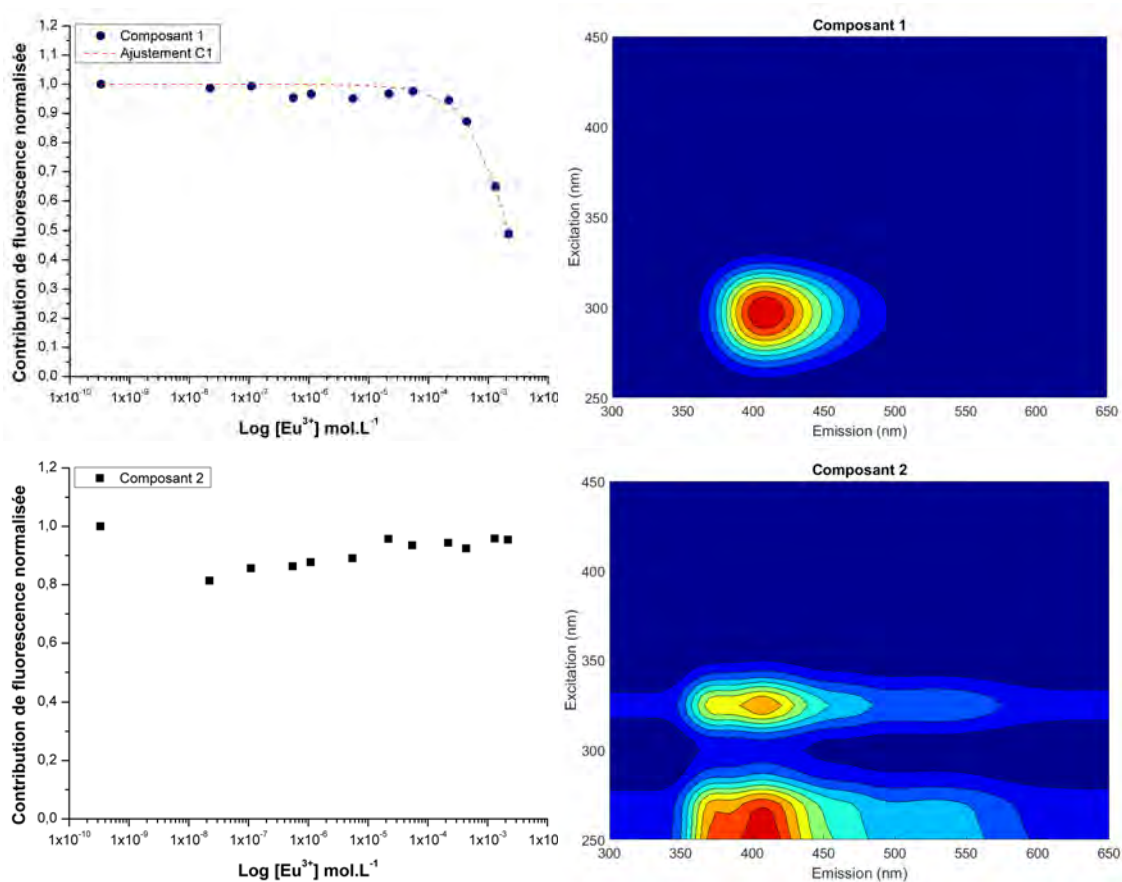


Figure 4.12 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS–Eu(III)

premier composant sont aux alentours de 275/330 nm. Le second présente un couple de $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=285/355$ nm et le troisième présente un double pic en excitation (260/360 nm) et un point à 400 nm en émission. Leurs contributions respectives en fluorescence montrent une décroissance aux alentours de 74%, 82% et 45% et les constantes de stabilité associées, qui ont été optimisées via le modèle 1 : 1 sont égales à : 3,14 ; 4,22 et 2,76. Nous pouvons néanmoins voir sur les figures de contributions la présence de quelques points aberrants à des concentrations entre 10^{-7} et 10^{-6} mol.L⁻¹ notamment sur les contributions des deuxième et troisième composants. Leur modélisation présentent un ajustement irrégulier tandis que celle du troisième composant semble assez justifiée malgré la présence de 2 points aberrants. De même, nous pouvons remarquer que la décroissance de fluorescence du premier et deuxième composant commence à partir des premiers ajouts d'Eu(III) alors que le troisième composant, qui indique une inhibition plus faible, montre une décroissance qui commence à partir de $5,48 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ curieusement similaire à l'HITACHI. Les décompositions obtenues par ces deux appareils présentent des différences en l'occurrence et les résultats ne sont pas en bonne corrélation. Les décompositions obtenues avec l'HITACHI montrent des spectres 3D qui correspondent plus ou moins à nos attentes notamment pour la molécule d'AS tandis que le TECAN présente des résultats peu pertinents et difficilement exploitables. C'est pourquoi tous les résultats obtenus avec le TECAN sont à considérer avec précaution. Le tableau suivant rappelle les longueurs d'onde d'excitation et d'émission trouvées par CP/PARAFAC, les valeurs affichées en gras indiquent les contributions les plus hautes :

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	300	410	275	330
Pic 2	–	–	285	355
Pic 3	–	–	260/360	440

Tableau 4.7 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AS-Eu(III)

Quanta-Ray Dans le cas de l'euporium qui fluoresce, les résultats de temps de vie de l'AS-Eu(III) indiquent une décroissance mono-exponentielle. Ceci est probablement dû à la seule longueur d'onde d'excitation disponible (355 nm) pour effectuer les mesures. Le temps de vie moyen mesuré est égal à $2,97 \pm 0,2$ ns. Dans le même graphique, les rapports I_0/I et τ_0/τ sont représentés en fonction de la concentration de l'Eu(III) et nous pouvons constater la diminution du temps de vie avec l'augmentation en concentration de l'Eu(III). La droite en noir et la droite hachurée indiquent les régressions linéaires du ratio d'intensité et de temps de vie de fluorescence respectivement. L'ordonnée à l'origine de ces deux droites est presque égale à un et sont pratiquement superposées (cf. figure 4.14). L'allure de la droite du ratio de temps de vie évoque la manifestation d'un quenching dynamique majoritaire qui semble être dominant dans cette interaction malgré la présence d'une déviation à fortes concentrations d'Eu(III). Dans le cas d'un quenching dynamique pur : $I_0/I = \tau_0/\tau$, or ce n'est pas ce que nous observons en l'occurrence. Cette déviation est sans doute liée à la formation d'un complexe AS-Eu(III) et provoque le début d'un quenching statique. Ce

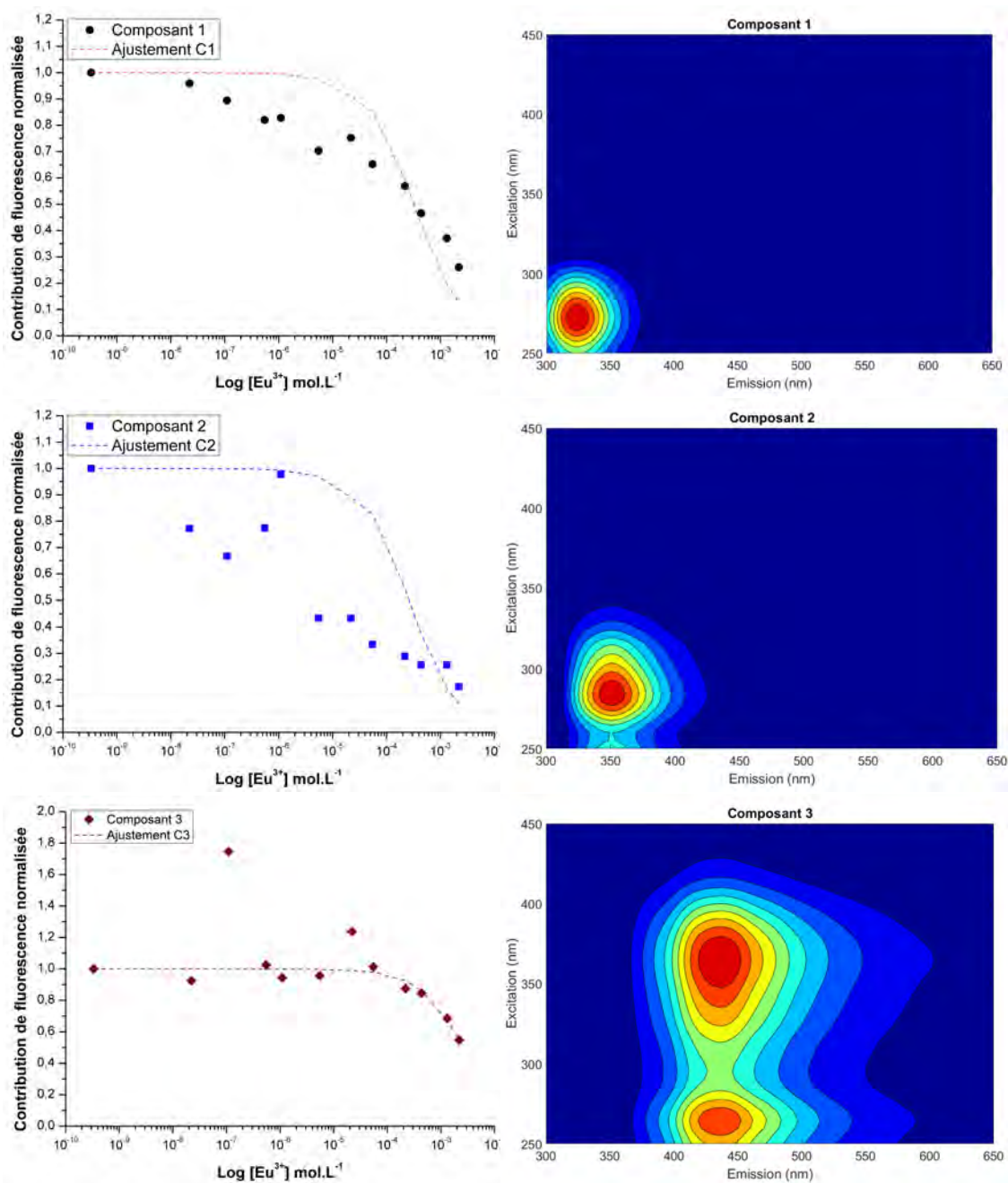


Figure 4.13 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS–Eu(III)

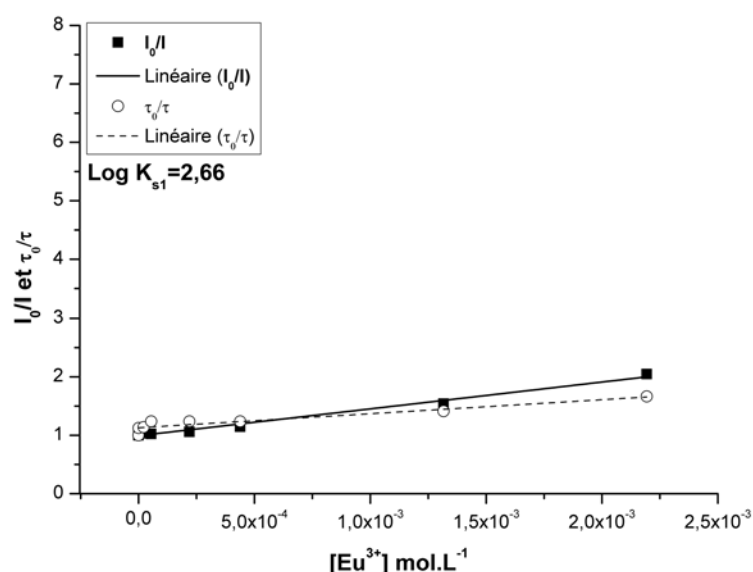


Figure 4.14 – Graphique de Stern–Volmer de l'AS–Eu(III)

résultat est également visible sur la courbe de contribution en fluorescence où l'inhibition ne se produit qu'à fortes concentrations d'Eu(III). Toutefois, Aoyagi et al. (2004) ont trouvé un temps de vie moyen de $2,02 \pm 0,01$ ns et ont constaté la formation d'un quenching statique uniquement. Cette contradiction par rapport à notre conclusion peut s'expliquer par la valeur de pH entre leur étude (pH=4,00) et la nôtre (pH≈7,00).

Le tableau 4.8 reprend les résultats de l'interaction entre l'AS et le Eu(III) :

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	τ_{moy} (ns)
AS–Eu(III)	Cette étude	HITACHI F4500	2	99,27	2,93	$2,88 \pm 0,18$
		TECAN M1000	3	69,74	3,14/4,22/2,76	
		Quanta-Ray		Mono-exp	2,66	
	Hasegawa et al. (1989)	Potentiométrie			2,02	Q. Dyn & stat
	Aoyagi et al. (2004)	SLRT			$2,08 \pm 0,02$	
	Barkleit et al. (2013)	SLRT			2,47	

Tableau 4.8 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AS–Eu(III)

4.1.2.5 Uranium

Plusieurs études des différentes espèces d'uranium en interaction avec différents ligands notamment l'acide salicylique, l'acide silicique, l'acide phtalique ou encore le dihydroxybenzoïque ont été effectuées. La capacité de l'acide salicylique à former des complexes à transfert de charge ligand–métal est bien connue sur une variété d'ions métalliques Kim et al. (1974); Reid et al. (2008). Le transfert de charge s'explique par une oxydoréduction photochimique, c'est-à-dire qu'au cours de ce transfert de charge, il y a réduction du métal et oxydation du ligand. Pour l'ion uranyle $[UO_2^{2+}]$, l'acide salicylique semble former des complexes stables da Silva et al. (1996). Les premières études ont utilisé le transfert de charge de la bande d'absorption pour le complexe acide sulfo–5–salicylique à 460 nm et ont identifié la formation d'un complexe 1 : 1 (U(VI):AS) Yousif and Faris (1989); Banks and

Singh (1960); Foley and Anderson (1949); Rao and Sessaiah (1966). Par exemple, Yousif and Faris (1989) ont rapporté dans leur étude par spectrophotométrie, une constante de stabilité $\text{Log } K=13,12$ pour le complexe 1 : 1. Sillen et al. (1964); Jahagirdar and Khanolkar (1973) ont trouvé par titrations potentiométriques, deux constantes de stabilité mono et bidentate égales à $\text{Log } K_1=12,18\pm0,02$ et $\text{Log } K_2=10,04\pm0,04$. Ces constantes sont nettement supérieures à nos valeurs car ils ne prennent pas en compte le pH dans l'estimation de la constante. Bien que des études utilisant des méthodes potentiométriques aient rapporté le complexe 1 : 1 comme espèce majeure Jahagirdar and Khanolkar (1973); Vartak and Menon (1971); Rajan and Martell (1964), la présence de complexes 1 : 2 a souvent été contestée. da Silva et al. (1996) ont trouvé une constante de stabilité égale à 2,72 pour le complexe AS- UO_2^{2+} à pH 3,5 en mesurant la fluorescence de l'AS et son quenching par les ions uranyle. Saito et al. (2002) ont trouvé une constante $\text{Log } K=3,28\pm0,07$ par spectroscopie de fluorescence et modélisation 1 : 1. Cha et al. (2012) ont également déterminé la constante de stabilité en mesurant cette fois-ci la fluorescence de l'U(VI) et son quenching par l'AS et ont montré qu'une formation 1 : 1 et 1 : 2 s'opérait avec des constantes respectives égales à $\text{Log } K_1=3,58$ et $\text{Log } K_2=2,6$. Il semble que les auteurs considèrent que le complexe 1 : 1 de l'U(VI)-AS comme étant le complexe de la forme chimique responsable du quenching de fluorescence statique. Nous comparons nos résultats avec ces études ci-dessous.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC de l'interaction entre l'AS et l'uranium indique la présence de 3 composants (cf. figure 4.15). Le premier composant représente le pic de fluorescence de l'AS. Le second présente une émission similaire au premier à 410 nm, mais une excitation à 325 nm. Le troisième composant identifié montre un pic bien marqué à 250 nm en excitation et 530 nm en émission.

Les contributions des différents composants sont représentées sur la même figure. Le quenching du premier et deuxième composant est évident et présente des diminutions de fluorescence respectives de 85% et 77% bien que la contribution en fluorescence du deuxième composant soit inférieure à celle du premier. Le troisième quant à lui ne présente pas de diminution de fluorescence mais plutôt une légère augmentation avec l'augmentation des concentrations d'uranium. Ce point correspond au pic de fluorescence de l'uranium puisque la longueur d'onde d'excitation de l'uranium est aux alentours de 270 nm et sa longueur d'onde d'émission se situe entre 490 et 560 nm. La modélisation 1 : 1 indique une constante de formation $\text{Log } K_1=3,51$ pour le premier composant et $\text{Log } K_2=3,24$ pour le deuxième composant. La première constante est identique à la première constante trouvée par Cha et al. (2012) ($\text{Log } K_1=3,58$) mais la deuxième constante de notre étude est supérieure ($\text{Log } K_2=3,24 > \text{Log } K_2=2,6$). La valeur rapporté par da Silva et al. (1996) ($\text{Log } K=2,72$) est inférieure aux constantes citées ci-dessus.

TECAN M1000 La décomposition CP/PARAFAC des données du TECAN indique la présence de 4 composants (cf. figure 4.16). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des 3 premiers composants correspondent curieusement aux composants trouvés pour l'interaction AS-Eu(III). Le 4ème composant identifié a une $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=315/385$ nm. La contribution en fluorescence de ces composants en fonction des ajouts de l'uranium est représenté sur la même figure. L'intensité de fluorescence pour les 4 composants semble être invariable tout au long des ajouts sauf le dernier point pour le composant 1 et 2 où la

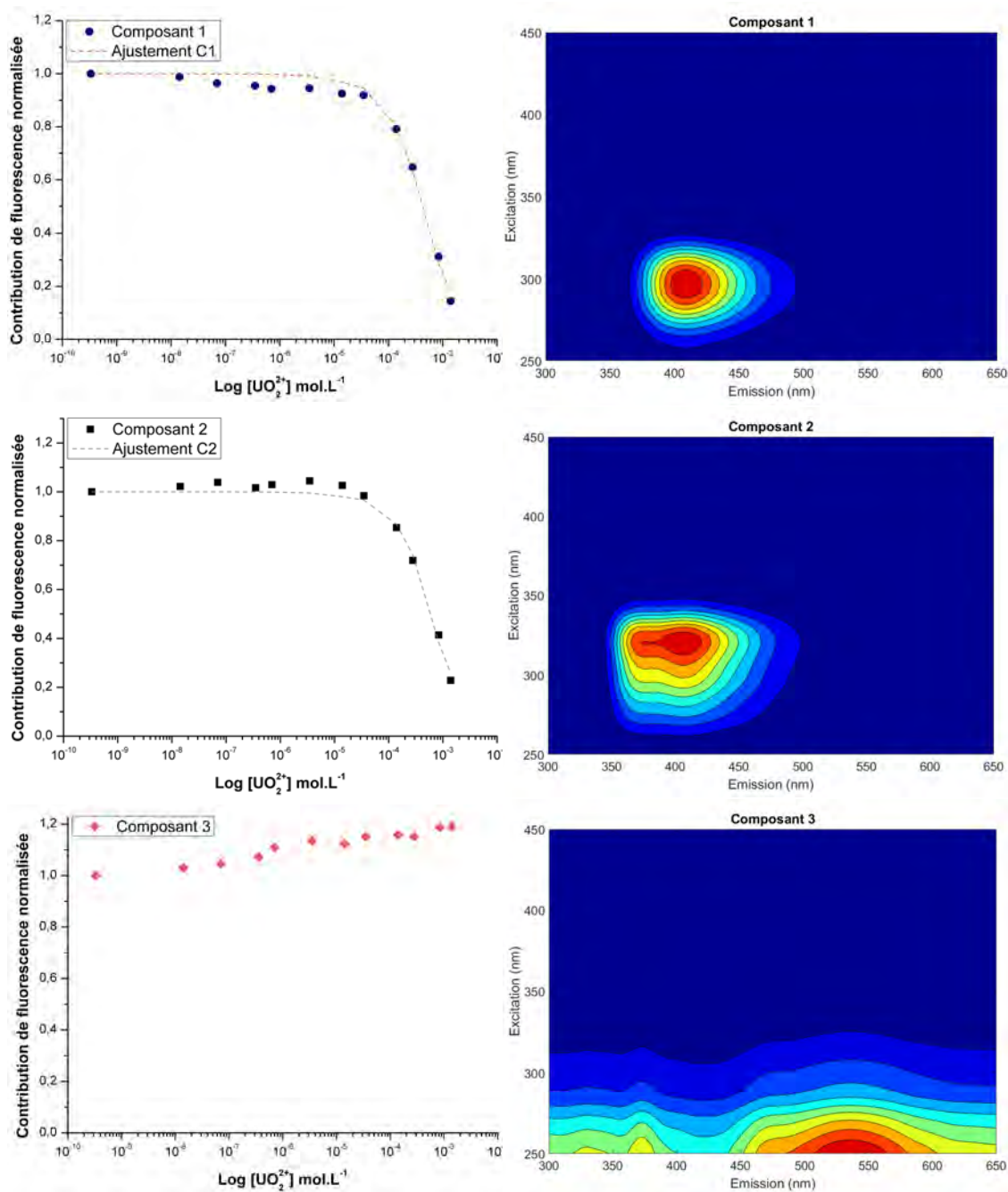


Figure 4.15 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS- $\text{UO}_2(\text{II})$

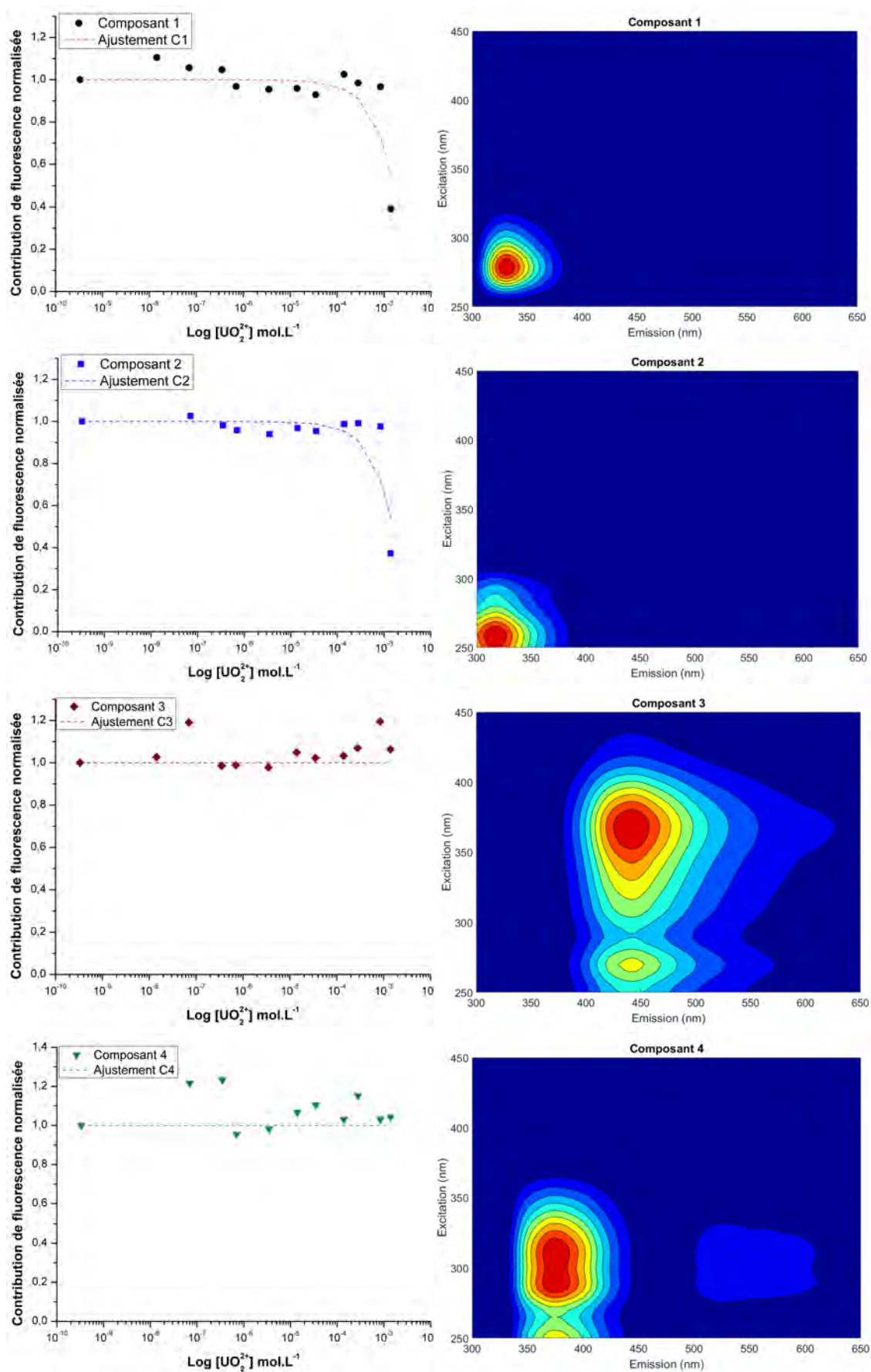


Figure 4.16 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AS- $\text{UO}_2(\text{II})$

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	300	410	275	330
Pic 2	325	410	285	355
Pic 3	–	–	260/360	440
Pic 4			315	385

Tableau 4.9 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AS-UO₂(II)

concentration est maximale. Les valeurs des constantes de stabilité modélisées ne sont pas significatives et présentent des valeurs erronées. Ces pics ne correspondent ni aux longueurs d'onde de l'AS ni à celles de l'U et sont par conséquent associés à un problème d'appareil ou de mesure. Le tableau 4.9 montre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission trouvées par CP/PARAFAC.

Quanta-Ray La déconvolution temporelle des données obtenues avec le laser indique une décroissance mono-exponentielle. Contrairement à CP/PARAFAC, nous constatons la présence d'un seul composant. Comme mentionné auparavant, le fait d'utiliser une seule longueur d'onde d'excitation (355 nm) limite la possibilité d'exciter d'autres molécules comme notamment l'uranium ($\lambda_{\text{ex}}=270$ nm). En outre, les deux composants pourraient avoir un temps de vie quasi-identiques ou très proches. Ces hypothèses sont plausibles pour justifier le résultat trouvé avec le laser. Le graphique de Stern-Volmer de la figure 4.17 présente un ratio d'intensité de fluorescence croissant et par conséquent une diminution en intensité de fluorescence significative sans modification notable du ratio de temps de vie de fluorescence. L'allure de cette courbe indique que la capacité de complexation n'est pas entièrement atteinte et que le rendement quantique du complexe est inférieur au rendement quantique du ligand. Le temps de vie moyen mesuré est $\tau_{\text{moy}} = 3,22 \pm 0,26$ ns. L'allure du ratio de temps de vie permet de déduire qu'un quenching statique s'opère puisque celui-ci est égal à $\tau_0/\tau = 1$. La constante de formation Log K_S déduite de la pente de I₀/I est égale à 3,61 et est très proche de la constante Log K₁ trouvée par optimisation du modèle 1 : 1.

Le tableau 4.9 présente un récapitulatif les résultats rapportés dans la littérature ainsi que nos résultats :

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	τ_{moy} (ns)
AS-UO ₂ (II)	Cette étude	HITACHI F4500	3	60,10	3,51/3,24	3,22±0,26
		TECAN M1000	4	99,97	–	
		Quanta-Ray		Mono-exp	3,61	Q. statique
	da Silva et al. (1996)				2,72	
	Saito et al. (2002)				3,28±0,07	
	Cha et al. (2012)				3,58/2,6	

Spectrofluorimétrie

Tableau 4.10 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AS-UO₂(II)

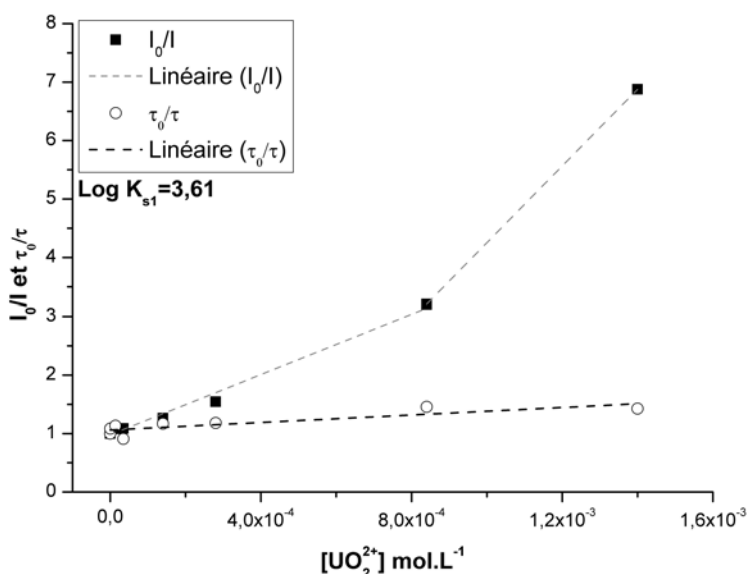


Figure 4.17 – Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AS et l'uranium

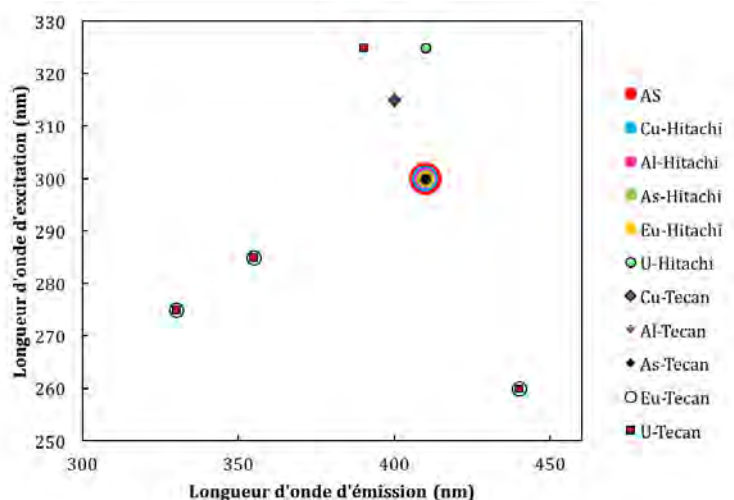


Figure 4.18 – Positions des maxima des spectres issus de CP/PARAFAC à partir des données 3D de l'HITACHI et du TECAN obtenues avec les interactions AS-(Cu/Al/As/Eu et U)

Le graphique 4.18 montre une comparaison des différents pics identifiés par CP/PARAFAC entre l'HITACHI et le TECAN. Le pic principal de l'AS seul à 300 nm en excitation et 410 nm en émission est montré. Toutes les interactions AS-(Cu/Al/As/Eu et U) mesurées avec l'HITACHI retrouvent le pic principal de l'AS. Les autres points identifiés par CP/PARAFAC correspondent à la fluorescence du métal, c'est notamment le cas de l'uranium. Le TECAN retrouve également les mêmes longueurs d'onde caractéristique de l'AS pour tous les métaux sauf pour l'Eu et l'U qui présentent des pics similaires et un pic supplémentaire pour l'uranium. Ces deux métaux ne fluorescent pas dans la même gamme de longueur d'onde

d'émission et les pics identifiés sont probablement liés à une erreur dans la mesure, à des artefacts ou à la diffusion du couvercle de la microplaque. Quoiqu'il en soit, tous les résultats obtenus avec l'HITACHI sont en bonne corrélation avec les valeurs rapportées dans la littérature ce qui valide notre protocole de mesure de constante de stabilité et nous permet donc d'étudier le comportement de la MO vis-à-vis de ces métaux.

4.2 Acide Humique

4.2.1 Étude de la variabilité de l'AH

L'étude de la variabilité des AH extraits de l'estuaire St.Laurent du Canada a également été effectuée. La figure 4.19 a permis de s'assurer de la variabilité de mesure des molécules fluorescentes de l'AH puisque l'intensité de fluorescence en fonction des ajouts doit rester inchangée. Nous observons une variabilité d'environ 2% sur l'expérience.

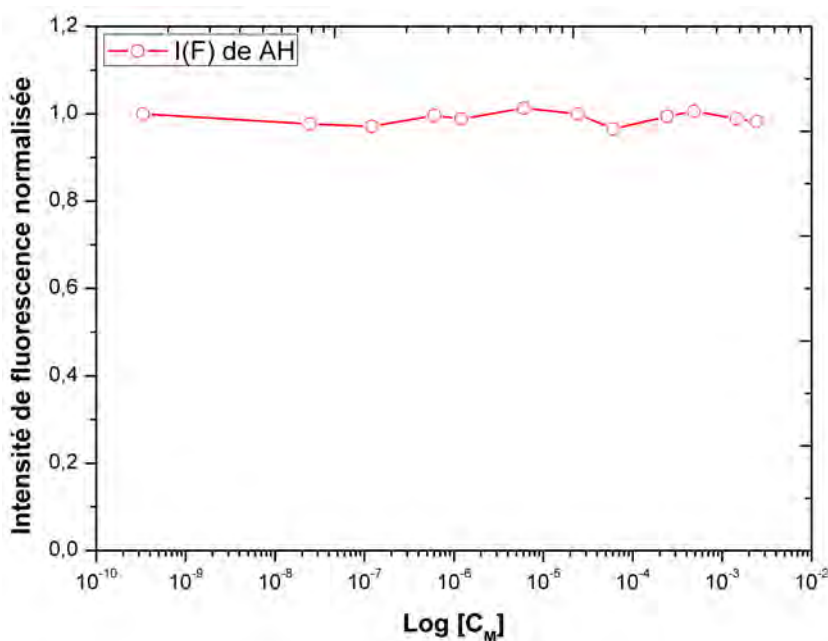


Figure 4.19 – Variabilité de l'intensité normalisée de fluorescence de l'AH sans ajouts en volume de métal

4.2.2 Quenching et temps de vie de fluorescence

Les substances humiques dissoutes ont suscité un intérêt croissant ces dernières années, non seulement en raison de leur implication dans les chaînes alimentaires marines et les cycles géochimiques organiques, mais également en raison de leur capacité à former des complexes avec des métaux grâce aux abondantes structures aromatiques qui y sont présentes. Dans ce qui suit, nous présentons les principaux résultats des interactions des AH avec les métaux choisis dans notre étude.

4.2.2.1 Cuivre

L'interaction entre les acides humiques et le Cu(II) a attiré l'attention des chercheurs depuis plusieurs années. Les groupes carboxyliques et phénoliques présents dans les structures des substances humiques peuvent être considérés comme sites de complexation faibles ou forts pour les métaux en fonction du métal [Croué et al. \(2003\)](#). Les premières études notables de l'interaction Cu(II)-MOD ont permis de déterminer les propriétés de complexation

par quenching de fluorescence [Ryan and Weber \(1982\)](#); [Cabaniss \(1992\)](#). Depuis que [Ryan and Weber \(1982\)](#) ont proposé un modèle 1 : 1 pour déterminer les paramètres d'équilibre dans leur étude d'interaction entre le Cu(II) et des MO des eaux douces, cette technique est devenue très populaire [da Silva and Machado \(1996\)](#); [Plaza et al. \(2005\)](#); [Mounier et al. \(2011\)](#); [Yan et al. \(2013\)](#); [Wei et al. \(2015\)](#). Dans cette étude, ils ont trouvé à pH=8 des constantes de stabilité Log K entre 5,3 et 8,2. [Berger et al. \(1984\)](#) se sont intéressés à l'étude de l'interaction du Cu(II) avec différentes MOD de l'estuaire de la Gironde par quenching de fluorescence. Les valeurs des constantes de stabilité Log K par modélisation 1 : 1 variaient entre 0,5 et 6,4 en fonction de l'échantillon. En effet, ces valeurs peuvent varier en fonction des différentes sources de MO pour une même méthode utilisée. Les différences également dans les gammes de concentration du métal peuvent conduire à la détection de différents ligands. Ainsi, les sites de complexation les plus forts sont généralement détectés à faible concentration du métal alors que les sites les plus abondants mais faibles en complexation se trouvent à des concentrations plus grandes [McIntyre and Guéguen \(2013\)](#). L'étude de [Hur and Lee \(2011\)](#) sur l'interaction du Cu(II) avec la MOD a permis de trouver des constantes de stabilité Log K entre 4,8 et 6,1. La complexation des acides humiques avec le Cu(II) a également été étudiée par [Plaza et al. \(2005\)](#) et les constantes de stabilité ont été calculées. Les acides humiques étudiés représentaient cinq échantillons des sols les plus répandus dans l'union européenne et ont été caractérisés par spectroscopie et modélisation 1 : 1 pour déterminer les propriétés de complexation. Les valeurs des constantes de stabilité trouvées sont aux alentours de Log K=5, en fonction de l'origine de la MO. L'étude menée par [Mounier et al. \(2011\)](#) a montré par quenching de fluorescence et décomposition CP/PARAFAC que l'interaction Cu(II)-MOD se produit dans une stœchiométrie 2 : 1. Ils ont déterminé les constantes de stabilité Log K pour les deux sites et les valeurs étaient aux alentours de 5 et 3 pour le premier et le deuxième, respectivement. Toutes ces études ont permis de calculer les constantes de stabilité par différentes techniques mais à notre connaissance, aucune étude visant à déterminer le type d'interaction par mesure de temps de vie n'a été effectuée pour l'interaction Cu(II)-AH. Les résultats sont présentés ci-dessous.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC de l'interaction entre les AH et le Cu(II) indique la présence de deux composants (cf. figure 4.20). Dans la classification des pics identifiés par [Coble \(1996\)](#), le premier composant ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)=275/500 nm n'est pas rapporté dans la littérature et présente un pic large en excitation ($\Delta\lambda_{ex} \simeq 40$ nm). Le deuxième composant est constitué par un double pic en excitation (275 et 300) et un pic en émission centré sur 430 nm. Le pic principal de ce composant ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)=300/430 nm correspond au pic M des substances humiques marines. La contribution en fluorescence sur la même figure du premier composant est plus importante que le deuxième composant mais les deux présentent des décroissances de fluorescence aux alentours de 80%. En effet, le Cuivre est un métal de transition qui possède une très grande affinité avec les AH. Les fortes décroissances de fluorescence sont liées aux groupements COOH et OH des AH qui forment des complexes stables avec celui-ci. Les paramètres d'équilibre ont été optimisés et les constantes de stabilité ont été calculées via le modèle 1 : 1. Celles-ci sont respectivement égales à Log K_1 =4,33 et Log K_2 =3,92 pour le premier et le deuxième composant et sont similaires aux constantes retrouvées dans la littérature et notamment celles rapportées par

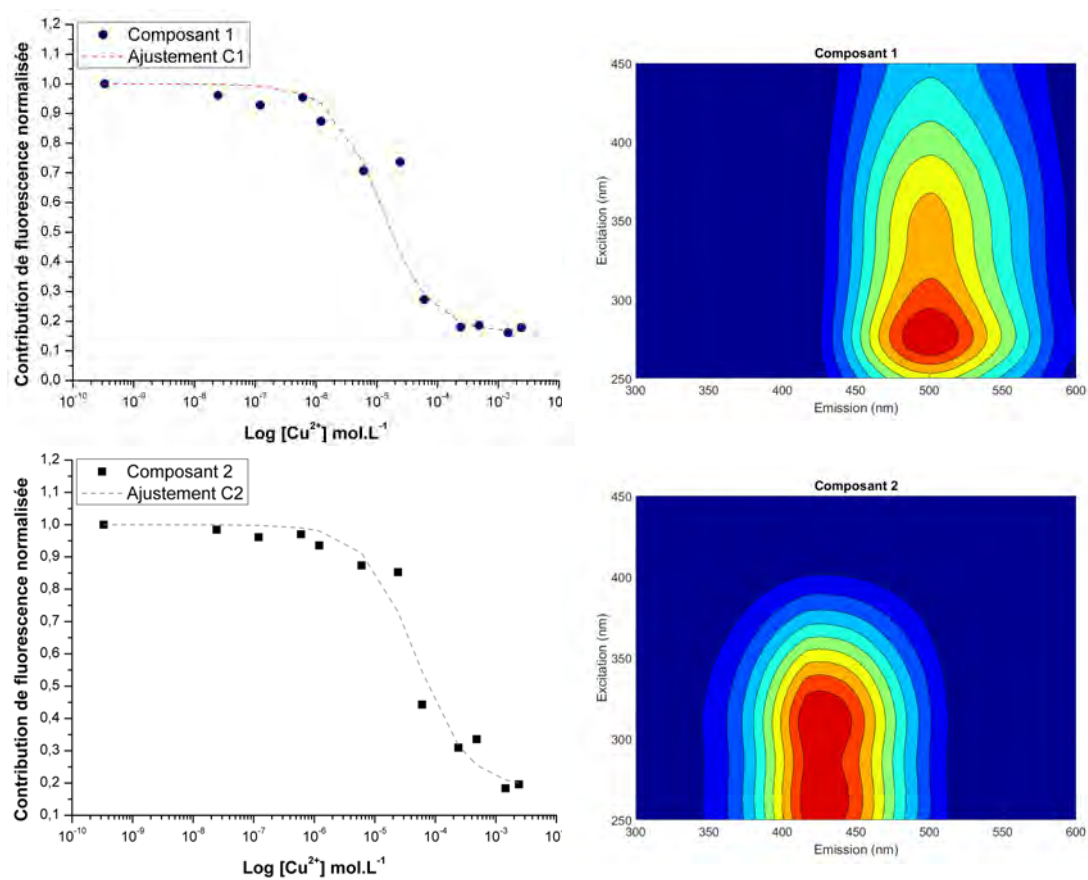


Figure 4.20 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–Cu(II)

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	275	500	270	440
Pic 2	310	430	280	370

Tableau 4.11 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AH-Cu(II)

Mounier et al. (2011). Dans le tableau 4.11 figure les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés par CP/PARAFAC. Les contributions les plus hautes sont montrées en gras.

TECAN M1000 La décomposition CP/PARAFAC des données du TECAN montre la présence deux composants également (cf. 4.21). Le premier composant est constitué d'un pic principal à 270 nm et un pic secondaire à 330 nm en excitation et 440 nm en émission. Le pic principal est proche du pic A de Coble (1996) relatif aux substances humiques de la gamme UV. Sa contribution en fluorescence est montrée sur la même figure à gauche et indique une décroissance de fluorescence importante de 97%. Le deuxième composant est formé d'un pic centré sur le point (280/370 nm) et sa contribution montre également une décroissance importante de fluorescence (96%). Nous remarquerons encore une fois que la décomposition CP/PARAFAC ne retrouve pas les mêmes composants pour l'HITACHI et le TECAN. En effet, le pic qui représente la plus forte contribution en fluorescence du TECAN s'apparente plus au deuxième composant de l'HITACHI. Le premier composant de l'HITACHI montre une longueur d'onde d'excitation proche de celle du deuxième composant du TECAN mais les longueurs d'onde d'émission sont nettement différentes. Paradoxalement, le modèle 1 : 1 appliqué aux deux contributions des composants du TECAN indiquent des constantes de stabilité $\text{Log } K_1=4,27$ et $\text{Log } K_2=3,92$ similaires à celles retrouvées par l'HITACHI pour le premier et deuxième composant respectivement. Cependant, il faut noter que l'ajustement du modèle avec les valeurs expérimentales est nettement moins bon.

Quanta-Ray Les résultats de la déconvolution temporelle indiquent une décroissance bi-exponentielle de la fluorescence liée à l'interaction AH-Cu(II). Le premier temps de vie moyen est égal à 0,88 ns et le deuxième présente un temps de vie de 13,82 ns (4.22). Le ratio d'intensité de fluorescence montre une non-linéarité. Cette allure est identique au résultat de l'interaction AS-Cu(II) montrant que la capacité de complexation est atteinte. Les constantes K_S calculées sont égales à $\text{Log } K_{S,1}=4,43$ et $\text{Log } K_{S,2}=3,85$. La première constante est plus grande que celle calculée par le modèle 1 : 1 tandis que la deuxième est plus petite mais les deux sont du même ordre grandeur que le modèle 1 : 1. L'analyse de l'évolution du ratio des temps de vie de fluorescence montre clairement la présence d'un quenching statique indiquant la formation d'un complexe AH-Cu(II).

Le tableau 4.12 reprend les principaux résultats de l'interaction entre l'AH et le Cu(II).

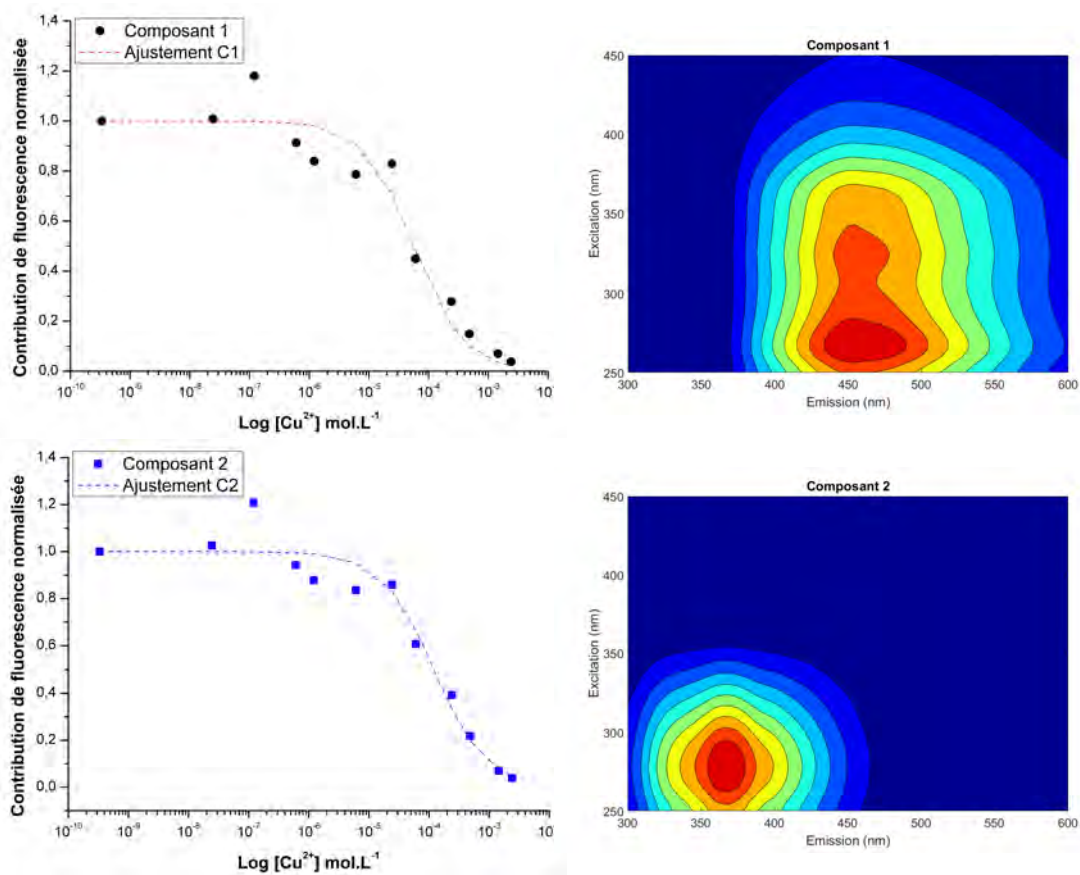


Figure 4.21 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–Cu(II)

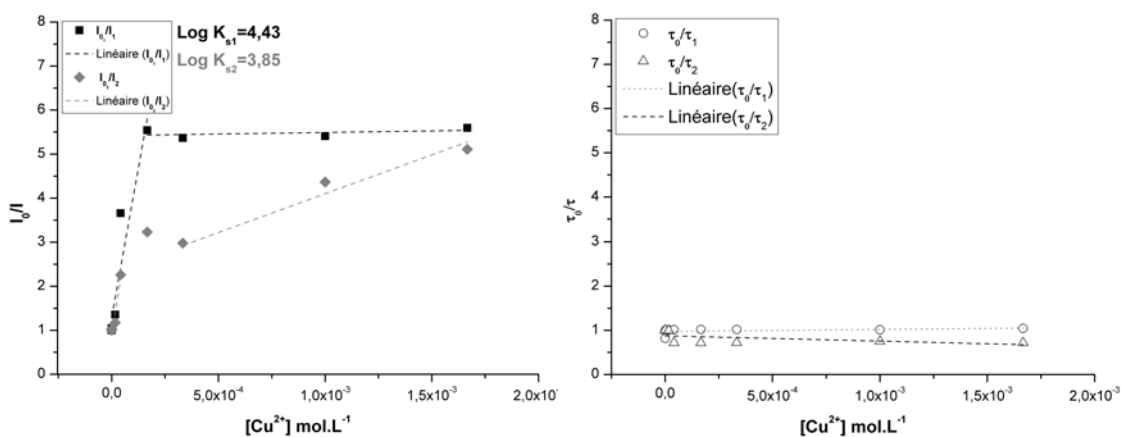


Figure 4.22 – Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et le Cu(II)

Interaction	Biblio	Spectro	N° Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AH-Cu(II)	Cette étude	HITACHI F4500	2	88,94	4,33/3,92	0,88±0,06	13,82±6,22
		TECAN M1000	2	67,97	4,27/3,92		
		Quanta-Ray		Bi-exp	4,43/3,85		
	Ryan and Weber (1982)	Spectrofluorimétrie et quenching			5,3-8,2	Q. statique	
	Berger et al. (1984)				0,5-6,4		
	Hur and Lee (2011)				4,8/6,1		
	Mounier et al. (2011)				5,5/3,92		

Tableau 4.12 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-Cu(II)

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	275	470	270	430
Pic 2	–	–	370	510
Pic 3	–	–	280	345

Tableau 4.13 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AH-Al(III)

4.2.2.2 Aluminium

Pour la première fois, l'étude de l' Al^{3+} en interaction avec les AH par quenching de fluorescence et spectroscopie laser résolue en temps est effectuée. En effet, l'interaction de l'aluminium avec les AH a très peu été étudiée contrairement aux AF. Les AH sont composés de structures plus condensées et peut-être plus complexes par rapport aux AF qui offrent une meilleure capacité de complexation. Une étude par spectroscopie RMN de Lambert et al. (1995) a révélé deux constantes de stabilité pour l'interaction SH-Al(III) en fonction du pH et sans séparation entre les AH et les AF. La première est égale à $\text{Log } K=3,5$ à $\text{pH}=2,3$ et la deuxième est égale à $\text{Log } K=4,3$ à $\text{pH}=3,2$. La majorité des études concernant les AF montrent que l'intensité de fluorescence de celui-ci est augmentée en présence d'Al(III) Elkins and Nelson (2001, 2002). Seul Philpot et al. (1984) ont montré qu'un quenching de fluorescence se produisait pour l'interaction AH-Al(III). Ils n'ont pas rapporté la valeur de la constante de stabilité. Nous avons également observé un quenching de fluorescence et la constante calculée par le modèle 1 : 1 est égale à 3,35 proche de celle retrouvée par Lambert et al. (1995).

HITACHI F4500 Le calcul CP/PARAFAC de l'interaction AH-Al(III) révèle la présence d'un seul composant dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=275/470 nm. Ceci peut être le cas si tous les composants se comportent de la même manière ou s'il n'y a qu'un type de site. Ce pic est relativement proche du pic A des types humiques de la gamme UV et sa contribution spectrale est représentée sur la figure (cf.figure 4.23). Celle-ci montre une décroissance importante de 72% et la constante de stabilité optimisée par le modèle 1 : 1 est égale à $\text{Log } K=3,35$.

Le tableau 4.13 résume les principales longueurs d'onde d'excitation et d'émission obtenues avec CP/PARAFAC.

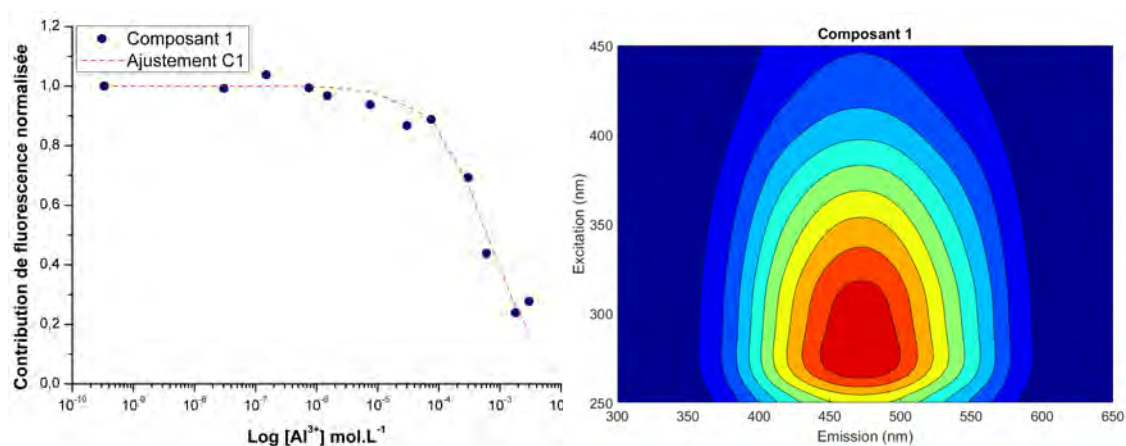


Figure 4.23 – **HITACHI**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–Al(III)

TECAN M1000 La décomposition CP/PARAFAC des données du TECAN quant à elle, montre la présence de 3 composants avec un CORCONDIA de 80%. Le premier (270/430 nm), deuxième (370/510 nm) et troisième pic (280/345 nm) sont dans la zone du pic A de la gamme UV des substances humiques, le pic C des substances humiques terrestres et le pic T des substances fluorescentes protéiques, respectivement. Leurs MEEFs et leurs contributions spectrales sont représentées sur la figure 4.24. Le modèle 1 : 1 appliqué donne une constante de stabilité $\text{Log } K=3,27$ similaire à celle trouvée par l'HITACHI pour le premier composant. La deuxième et troisième constante sont respectivement égales à $\text{Log } K=3,44$ et $\text{Log } K=2,93$ pouvant correspondre à deux types de fluorophores. Encore une fois, il est étonnant de trouver plus de composants fluorescents pour les mesures TECAN, en particulier le composant type protéine car l'analyse précédente par d'autres moyen n'en révèle point.

Quanta-Ray La déconvolution temporelle montre une décroissance bi-exponentielle. Les deux temps de vie de fluorescence moyens sont égaux à $\tau_{\text{moy},1} = 0,69 \pm 0,16$ ns et $\tau_{\text{moy},2} = 10,85 \pm 6,22$ ns. La figure des ratios de temps de vie montre des valeurs proches de 1 (4.25). Nous pouvons en déduire que l'interaction AH–Al(III) est un quenching statique et donc bien un complexe. Les droites des ratios d'intensité montrent une linéarité mise à part l'avant dernier point (probablement dû à une erreur de mesure). Les pentes permettent de retrouver les constantes de formation du complexe qui sont égales respectivement à $\text{Log } K_s=3,24$ et 3,04.

Le tableau 4.14 présente un récapitulatif de nos résultats et ceux rapportés dans la littérature :

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AH–Al(III)	Cette étude	HITACHI F4500	1	100	3,35	0,69±0,16	10,85±6,22
		TECAN M1000	3	79,30	3,27/3,44/2,93		
		Quanta-Ray		Bi-exp	3,24/3,04		
	Lambert et al. (1995)	Spectroscopie RMN			3,5–4,3		

Tableau 4.14 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AH–Al(III)

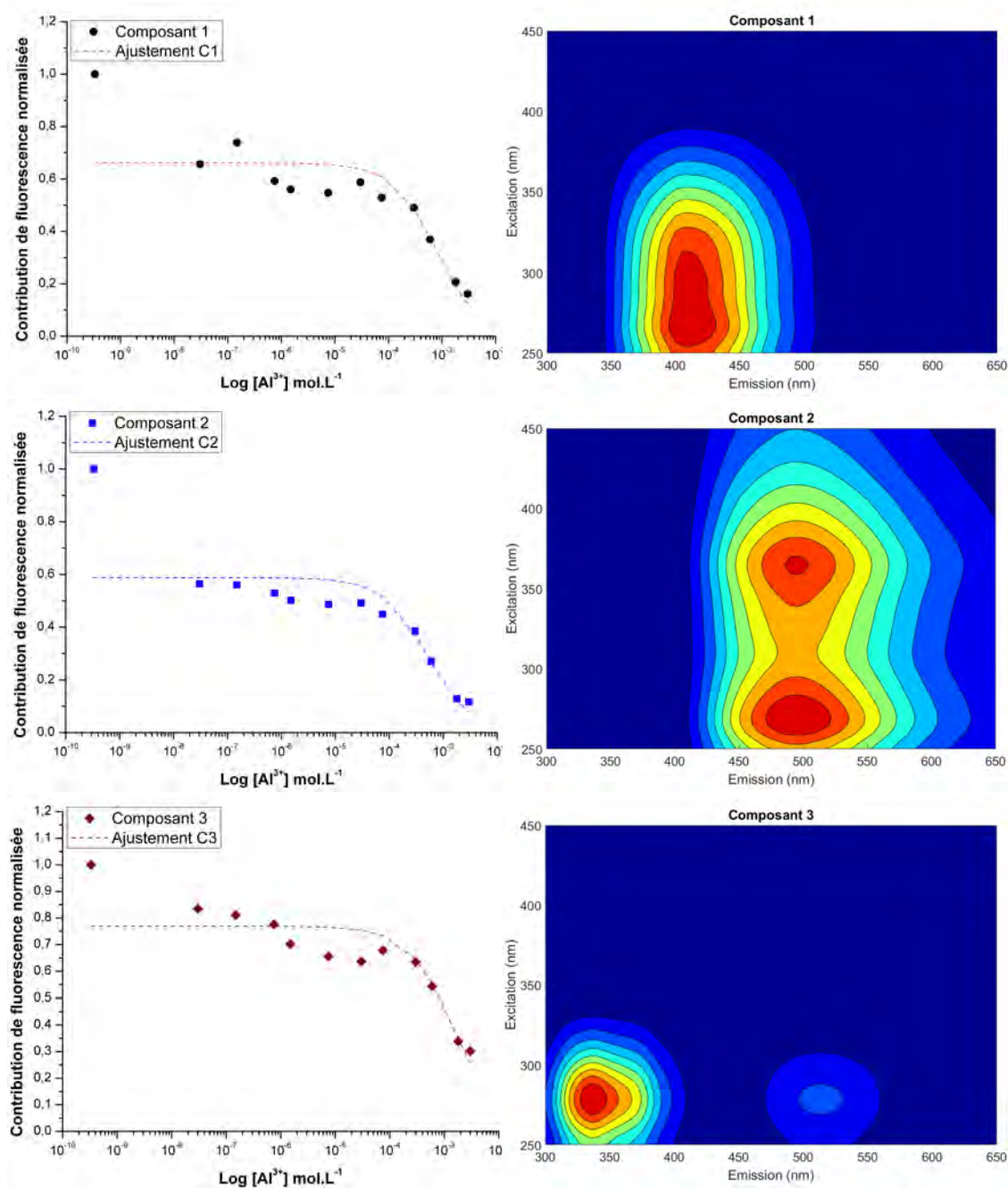


Figure 4.24 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d’excitation et d’émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l’interaction AH–Al(III)

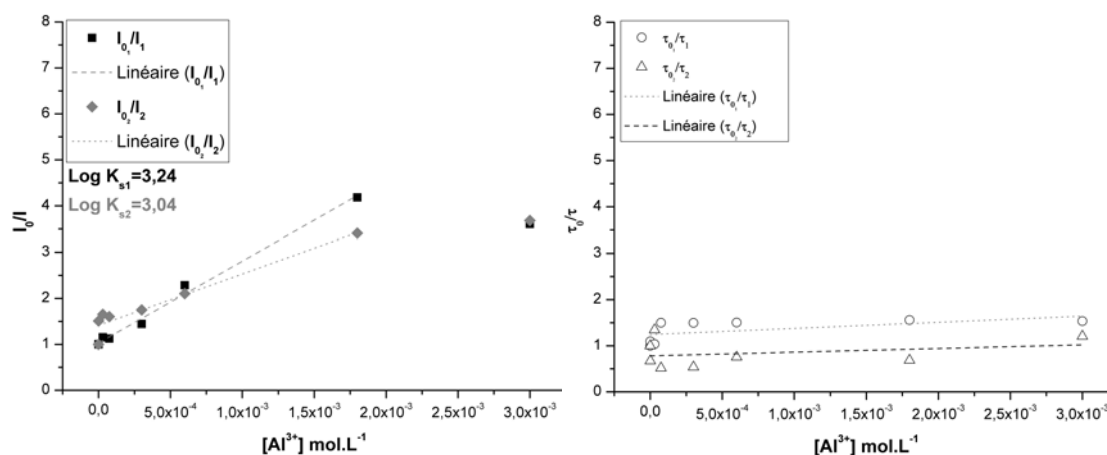


Figure 4.25 – Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AH et l'Al(III)

4.2.2.3 Arsenic

Les études d'interaction AH–As pour déterminer les paramètres d'équilibre et le type de complexation sont très peu référencées. Une étude de [Wang and Mulligan \(2009\)](#) a montré que la mobilisation de l'arsenic est principalement contrôlée par l'adsorption en surface des oxydes métalliques en particulier le fer, l'aluminium et le manganèse. Les AH peuvent interférer avec cette adsorption et par conséquent, augmenter la mobilité de celui-ci par interaction électrostatique mais le mécanisme n'est pas détaillé. L'interaction AH–As impliquerait les groupes fonctionnels déprotonés des AH et dépendrait de plusieurs paramètres notamment le pH, la force ionique et les concentrations d'arsenic. Une étude de [Warwick et al. \(2005\)](#) a permis d'établir la constante d'association $\text{Log } K = 1,97 \pm 0,02$ de AH–As(V) par spectroscopie UV–Vis. Ils ont estimé que cette valeur (discutée ci-dessous) indiquaient une formation de complexe faible dans une stœchiométrie 1 : 1.

HITACHI F4500 Les composants calculés par CP/PARAFAC à partir des spectres 3D mesurés lors de l'interaction de l'AH avec l'arsenic sont montrés sur la figure 4.26. Nous constatons dans ce cas la présence de deux composants avec un CORCONDIA de 95%. Le spectre 3D du premier composant est formé d'un pic principal centré sur le point (310/435 nm). Ce composant représente le pic M identifié par Coble. Le deuxième composant est constitué d'un double pic en excitation (275 et 370 nm) et un pic en émission centré sur 500 nm. Ce pic n'est pas identifié dans la littérature. Il faut préciser néanmoins que la présence de doubles pics dans les spectres est toujours douteuse [Luciani \(2007\)](#). Effectivement, il est difficile de déduire s'il s'agit du spectre réel du fluorophore ou du mélange de deux groupements fluorescents distincts mal séparés par l'algorithme. Par ailleurs, les profils de contributions spectrales relatives montrent une décroissance très minime notamment pour le deuxième composant. En effet, nous pouvons constater sur la même figure que la contribution des deux composants décroît de 6% et 10%, respectivement ce qui est faible. Les constantes de stabilité optimisées via le modèle 1 : 1 révèlent également des valeurs faibles. Le premier composant a une constante $\text{Log } K_1 = 0,70$ et le deuxième a une constante légèrement plus élevée $\text{Log } K_2 = 1,20$. La constante retrouvée par [Warwick et al.](#)

(2005) est égale à $\text{Log } K = 1,97 \pm 0,02$ pour un pH entre 8 et 10. Cette valeur est supérieure à ce que nous avons trouvé certainement à cause du pH utilisé. L'augmentation de pH induirait une plus grande constante de stabilité selon Buschmann et al. (2006).

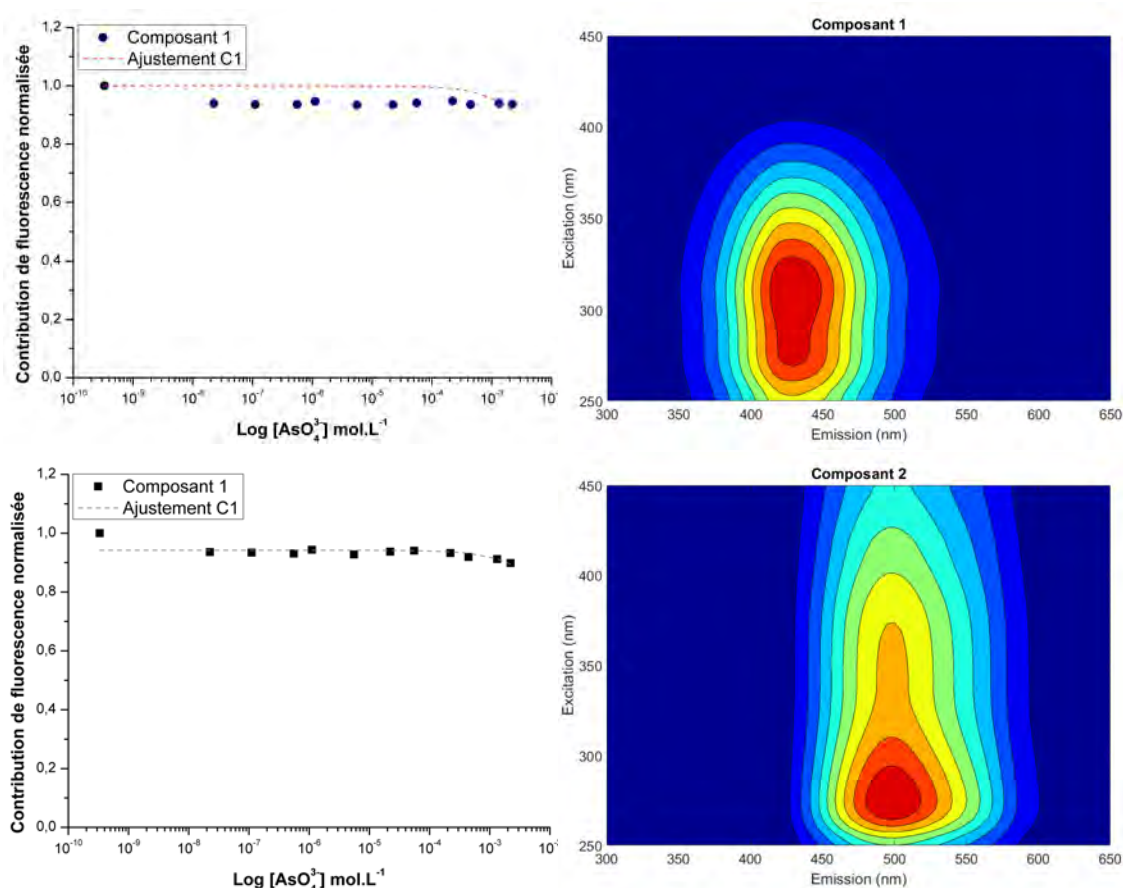


Figure 4.26 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–As(V)

Sur le tableau 4.15 sont rapportées les longueurs d'onde d'excitation et d'émission identifiées par CP/PARAFAC pour l'HITACHI et le TECAN.

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	310	435	280	370
Pic 2	275	500	365	455

Tableau 4.15 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AH–As(V)

TECAN M1000 Comme nous pouvons le voir sur la figure 4.27, deux composants sont obtenus grâce à l'analyse CP/PARAFAC des spectres 3D du quenching de AH par As. Le

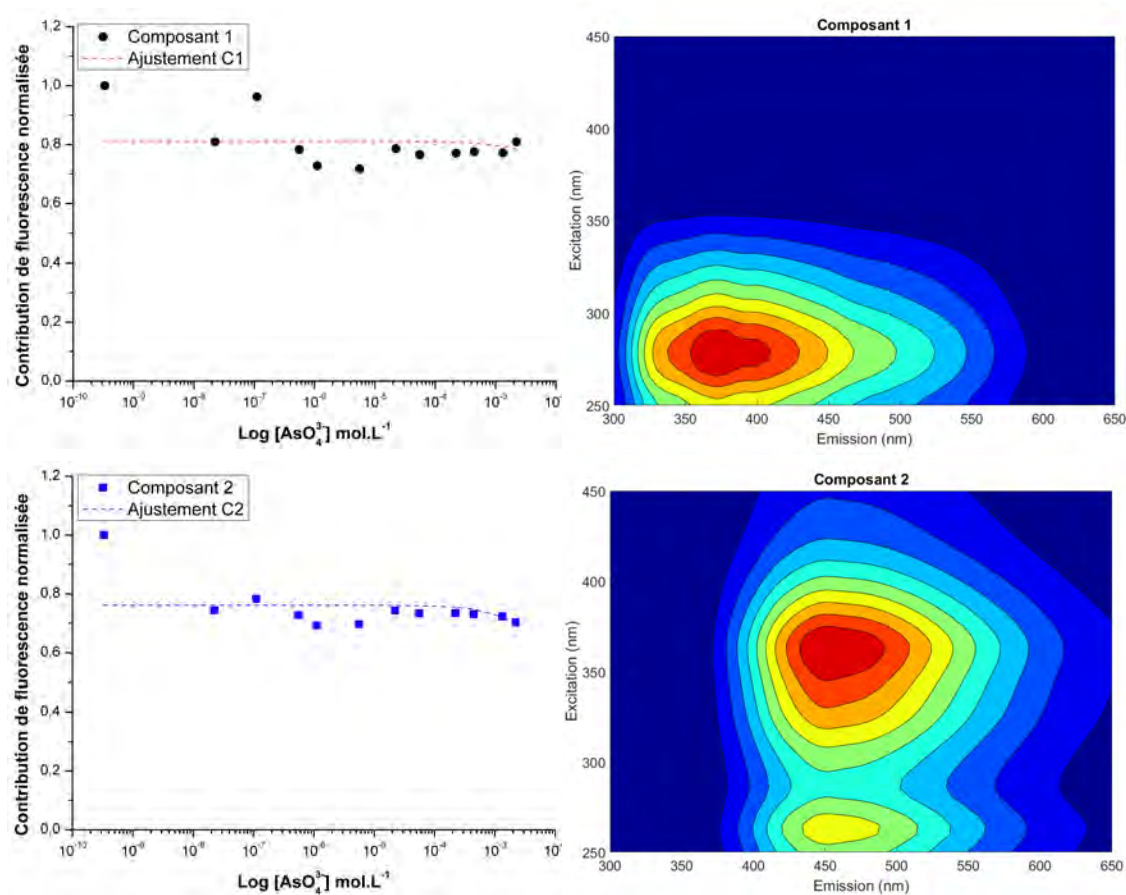


Figure 4.27 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–As(V)

premier composant est proche des substances humiques dans la gamme UV référencés en tant que pic A dans la littérature avec une position spectrale ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)=280/370 nm. Le deuxième composant est caractéristique des substances humiques terrestre de type C dont le pic principal est centré sur le point 365/455 nm. L'étude des contributions spectrales relatives montre de façon similaire à l'HITACHI, que la diminution des intensités de fluorescence est faible. En effet, les valeurs de décroissances respectives sont de l'ordre de 8 et 15%. Les constantes de stabilité calculées indiquent des valeurs $\text{Log } K_1=0,80$ et $\text{Log } K_2=1,20$ proches de celles déterminées par l'HITACHI. Une fois de plus, la comparaison entre l'HITACHI et le TECAN montre que les composants identifiés ne présentent pas les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Quanta-Ray La déconvolution temporelle révèle une décroissance bi-exponentielle et l'analyse des ratios de temps de vie des graphiques de Stern-Volmer indique qu'un quenching statique s'opère pour les deux composants puisque nous observons une droite (cf. figure 4.28). Puisque la variabilité des intensités de fluorescence est très minime, les ratios d'intensité de fluorescence varient peu. Toutefois, le deuxième composant montre une courbe légèrement croissante et linéaire tandis que le premier reste inchangé aux alentours de 1. Les temps de vie de fluorescence moyens calculés τ_1 et τ_2 sont respectivement égaux à $0,72 \pm 0,10$ ns et $12,84 \pm 6,54$ ns et les pentes ont permis de déduire des constantes de formation $\text{Log } K_{s,1}=0,92$ et $\text{Log } K_{s,2}=1,44$. Ces résultats amènent plusieurs réflexions. L'interaction AH-As a entraîné la formation d'un complexe dont le temps de vie est constant. La fluorescence observé est celle des AH uniquement ce qui explique l'invariabilité de l'intensité de fluorescence malgré les ajouts en volume d'arsenic. Toutefois, la faible décroissance observé pour les deux composants peut être due à l'augmentation de la concentration en arsenic qui induit, à cause des collisions entre les molécules non complexées, une diminution de l'intensité de fluorescence.

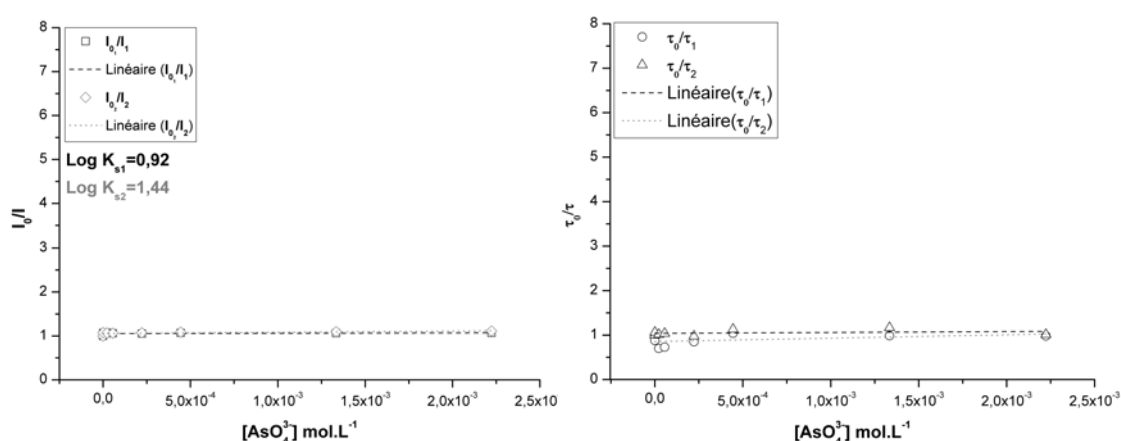


Figure 4.28 – Graphique de Stern-Volmer de l'interaction entre l'AH et l'As(V)

Le tableau 4.16 reprend les principaux résultats de l'interaction entre l'AH et l'As(V).

Interaction	Biblio	Spectro	N° Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}$ (ns)	$\tau_{\text{moy},2}$ (ns)
AH-As(V)	Cette étude	HITACHI F4500	2	95,52	0,70/1,20	0,72±0,10	12,84±6,54
		TECAN M1000	2	93,36	0,80/1,20		
		Quanta-Ray		Bi-exp	0,92/1,44		
	Warwick et al. (2005)	Spectroscopie UV-Vis			1,97±0,02	Q. statique	

Tableau 4.16 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-As(V)

4.2.2.4 Europium

L'interaction de l'AH-Eu(III) a été étudiée à de nombreuses reprises en utilisant différentes techniques afin de déterminer les paramètres d'équilibre Bertha and Choppin (1978); Torres and Choppin (1984); Carlsen et al. (1984); Caceci (1985); Tipping (1993); Moulin et al. (1999); Monsallier et al. (2001); Plancque et al. (2003); Reiller and Brevet (2010); Wei et al. (2015).

Carlsen et al. (1984) ont étudié le complexe Eu-AH à pH=4,47 et ont trouvé une seule constante 1:1 Log $\beta=6,15$. Caceci (1985) a étudié la complexation de l'Eu³⁺ par des AH standard de Sigma Aldrich par ultrafiltration. Deux constantes de complexation ont été trouvées dans une stœchiométrie 1:1 : Log $\beta_1 = 7,9 \pm 0,2$ à pH=5 et Log $\beta_2 = 6,0 \pm 0,1$ à pH=6. Il a rapporté que la capacité de complexation est passé de 33% à pH=5 à 82% à pH=6. Selon lui, le changement du pH de 6 à 5 augmente la protonation, diminue les charges négatives et cause une condensation intra et/ou intermoléculaire augmentant la rigidité des molécules d'AH ce qui diminuerait davantage le nombre de sites disponibles pour le quenching.

Monsallier et al. (2001) ont rapporté une constante de stabilité Log $\beta = 6,37 \pm 0,06$.

L'étude de Reiller and Brevet (2010) a montré une décroissance bi-exponentielle lors de la complexation de l'Eu par des AH standards de Suwannee River. Les temps de vie rapportés dans leur étude ne peuvent pas être comparés à nos valeurs puisque le temps de vie rapporté est celui de l'euporium avec et sans présence d'AH.

Wei et al. (2015) ont étudié l'interaction de la matière organique dissoute avec l'euporium par quenching de fluorescence, spectre 3D, CP/PARAFAC et modélisation 1:1 et ont rapporté deux constantes de stabilité 1:1 Log $K_1=5,51$ et Log $K_2=5,60$ à pH=6.

Une étude très récente de Hahn et al. (2017) sur des AH standards de Sigma-Aldrich en interaction avec l'euporium à pH=5,0±0,05 a révélé deux constantes de stabilité 1:1 : Log $K=6,36 \pm 0,02$ obtenue par ultrafiltration et Log $K=6,1 \pm 0,1$ obtenue par CE-ICP-MS. Toutes ces études ont rapporté deux constantes de stabilité 1:1 à des pH basiques. Certaines constantes sont représentées par Log β car elles sont calculées sans prendre en compte le pH d'où des valeurs plus grandes mais nous considérerons ici que Log $\beta \approx$ Log K. Nous avons trouvé dans notre étude à pH=7 (neutre) trois constantes de stabilité dans une stœchiométrie 1:1. La différence par rapport à la littérature peut être due à notre pH ou à l'utilisation de tampon qui affecterait la structure moléculaire des AH selon Caceci (1985). Malgré ces nombreuses études sur l'interaction AH-Eu(III), aucune n'a rapporté le type de quenching qui se produit en étudiant les temps de vie de fluorescence via le graphique de Stern-Volmer.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC des données recueillies lors de l'interaction AH-Eu(III) suggère la présence de 3 composants (cf. figure 4.30) avec un COR-

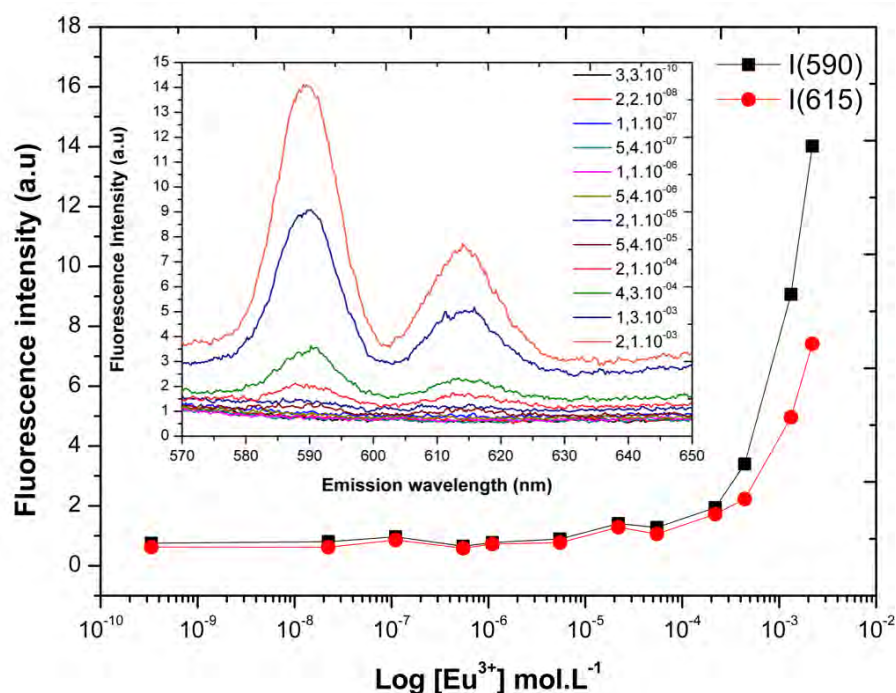


Figure 4.29 – Graphique 2D de la fluorescence de l'Eu en interaction avec AH

CONDIA de 86%. Le premier composant, qui se trouve dans la gamme UV, est localisé à $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=270/445$ nm, et a été attribué au pic A relatif aux substances humiques. Le second composant $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=270/505$ nm montre une émission de fluorescence plus large et caractéristique des structures conjuguées trouvées dans les sols habituellement. Le troisième composant quant à lui possède des longueurs d'onde d'excitation et d'émission typique des substances protéiques $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=250/395$ nm. Toutefois, la MEEF de ce composant montre un très faible signal de fluorescence entre 500 et 600 nm. Sa contribution montre une légère augmentation de l'intensité de fluorescence vers les fortes concentrations d'Eu(III). L'exploitation des données obtenues en 2D (cf. figure 4.29) permet de distinguer les deux pics caractéristiques de l'euporium et la contribution révèle une augmentation minimale du signal de fluorescence. Le premier composant présente un quenching de 88% avec une constante de stabilité égale à $\text{Log } K_1=4,43$. La contribution en fluorescence du deuxième composant montre une décroissance prépondérante de 94% et une constante de stabilité $\text{Log } K_2=4,52$. Le troisième composant indique un quenching de 50% et une constante de stabilité $\text{Log } K_3=3,63$ (inférieure par rapport aux deux premiers) qui montre que les substances protéiques sont moins affectées par la présence de l'Eu(III).

Sur le tableau 4.17 sont rapportées les longueurs d'onde d'excitation et d'émission identifiées par CP/PARAFAC pour l'HITACHI et le TECAN :

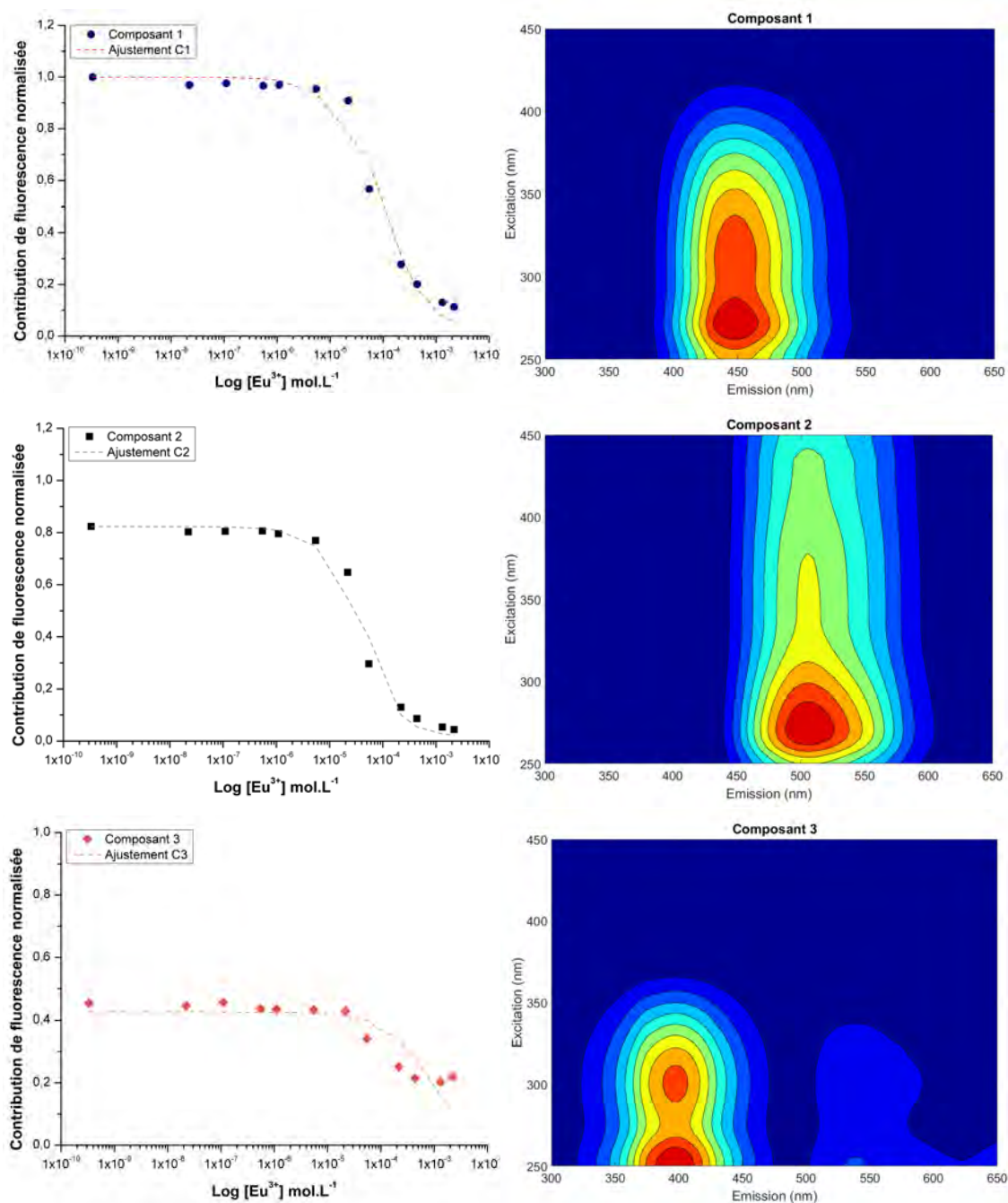


Figure 4.30 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH-Eu(III)

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	265	420	270	445
Pic 2	270	505	270	505
Pic 3	280	340	250	395

Tableau 4.17 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AH-Eu(III)

TECAN M1000 Le traitement des données du TECAN suggère également la présence de 3 composants représentés sur la figure 4.31 avec un CORCONDIA de 85%. En comparaison avec l'HITACHI, le premier composant a des longueurs d'onde d'excitation et d'émission plus ou moins semblables ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=265/420 nm avec un léger décalage vers l'UV pour celui-ci. Le pic le plus intense du second composant présente exactement les mêmes longueurs d'onde que celui de l'HITACHI ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=270/505 nm. Ces deux fluorophores sont attribués au pic A relatif aux substances humiques marines. Le troisième composant indique une longueur d'onde d'excitation plus longue que celle obtenue avec l'HITACHI (280 nm) et une longueur d'onde d'émission plus courte (340 nm). Ces positions spectrales ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=280/340 nm sont relatives aux substances fluorescentes d'origine protéiques attribué au pic T. Il est à remarquer que la fluorescence de l'euporium n'est pas détectée.

Les contributions en fluorescence des spectres 3D du TECAN sont représentées sur la même figure à gauche. La modélisation 1 : 1 du premier composant calcule une constante de stabilité $\text{Log } K_1=4,10$ et une décroissance de fluorescence égale à 92% identique à l'HITACHI. Le deuxième composant, qui décrit les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission que l'HITACHI, montre un quenching de fluorescence similaire aux alentours de 94% et une constante de stabilité égale à $\text{Log } K_2=4,28$ du même ordre de grandeur. Bien que le modèle 1 : 1 montre un meilleur ajustement pour le troisième composant, celui-ci est associé à la plus faible constante de stabilité $\text{Log } K_3=3,69$ égale à celle trouvée par l'HITACHI mais dénote une décroissance plus grande d'une valeur de 82%.

Malgré les différences retrouvées précédemment, le TECAN montre curieusement des résultats similaires à l'HITACHI dans le cas des expériences avec l'euporium. Nous pouvons néanmoins remarquer encore une fois la présence de certains points aberrants dans les contributions en fluorescence des spectres 3D du TECAN qui peuvent être liés à des erreurs dans les volumes ajoutés ou à la lecture de l'appareil.

Quanta-Ray La décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH-Eu(III) a montré l'existence de 3 composants, alors que la déconvolution temporelle suggère une décroissance bi-exponentielle et deux temps de vie noté τ_1 et τ_2 . Le premier temps de vie est très court et est égal à $0,69 \pm 0,06$ ns et le second est plus grand et égal à $11,33 \pm 7,30$ ns. Nous pouvons observer, à partir de la courbe de Stern-Volmer, que le ratio de temps de vie du premier et deuxième composant reste constant. On en déduit qu'un quenching statique se produit pour l'interaction AH-Eu(III). Toutefois, la courbure que présentent les deux ratios d'intensité de fluorescence (I_0/I_1 et I_0/I_2) indique le même comportement que celui de l'AS-Cu(II). Par conséquent, nous déduisons de la même façon, que la capacité de complexation est atteinte. Les constantes de formation K_S obtenues à partir des pentes des ratios d'intensité

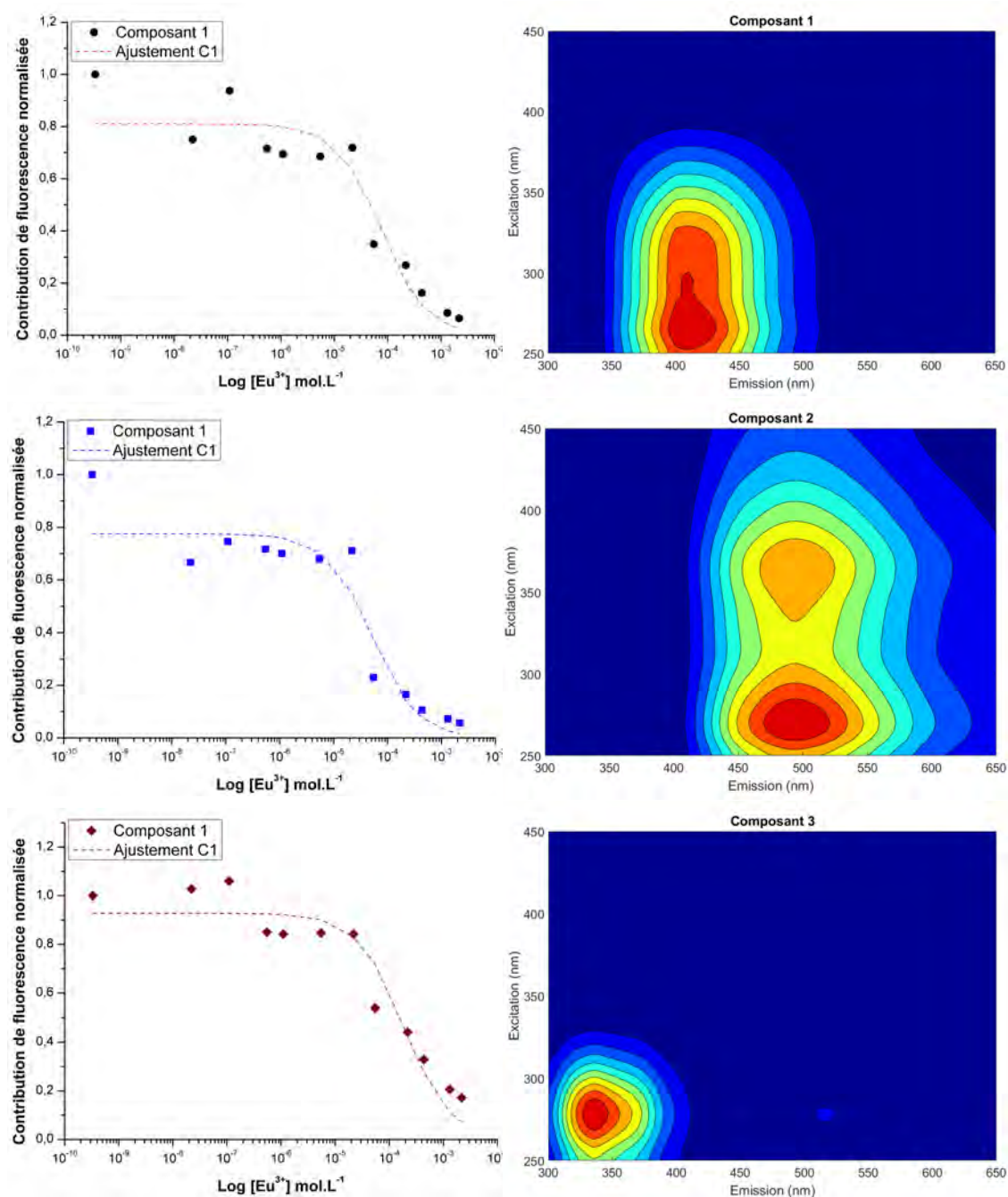


Figure 4.31 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–Eu(III)

sont inférieures aux valeurs trouvées par modélisation et sont égales à $\text{Log } K_{S,1}=3,97$ et $\text{Log } K_{S,2}=4,38$ pour le premier et deuxième composant, respectivement.

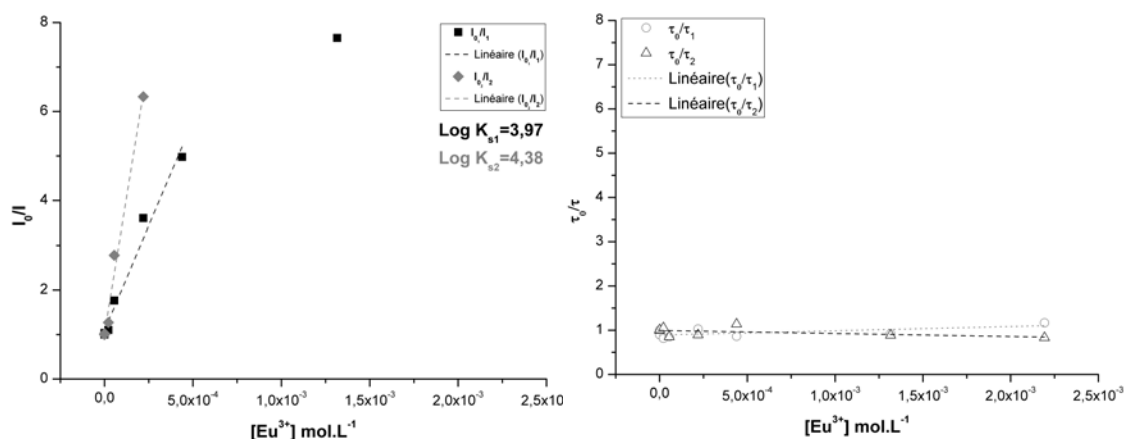


Figure 4.32 – Graphique de Stern-Volmer de l'interaction entre l'AH et l'Eu(III)

Le tableau 4.18 présente un récapitulatif de nos résultats et ceux rapportés dans la littérature, nous avons trouvé des constantes de stabilité 1 : 1 nettement plus faibles que celles rapportées dans le tableau. Seuls Wei et al. (2015) trouvent pratiquement des valeurs proches de celles que nous avons calculées.

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AH-Eu(III)	Cette étude	HITACHI F4500	3	86,08	3,98/4,52/3,63	0,60±0,06	11,33±7,30
		TECAN M1000	3	85,49	4,10/4,28/3,69		
		Quanta-Ray		Bi-exp	3,97/4,38		
	Caceci (1985)	Ultrafiltration			7,9/6	Q. statique	
	Monsallier et al. (2001)	Échangeur d'ions			6,37		
	Wei et al. (2015)	Spectroscopie de fluoescence			5,51/5,60		
	Hahn et al. (2017)	Spectroscopie de fluorescence			6,36/6,01		

Tableau 4.18 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-Eu(III)

4.2.2.5 Uranium

De nombreuses études ont été effectuées pour caractériser l'interaction AH- $\text{UO}_2(\text{II})$ parmi elles, Li et al. (1980) ont utilisé l'ultrafiltration et ont rapporté à pH=6 deux constantes de stabilité 1 : 1 de l'interaction AH- $\text{UO}_2(\text{II})$: $\text{Log } K_1=6,7$ et $\text{Log } K_2=4,7$. L'étude de Saito et al. (2002) des AH- UO_2^{2+} à pH=4 a montré la formation de deux complexes 1 : 1 également et les constantes de stabilité sont supérieures à nos résultats ($\text{Log } K_1=5,07\pm0,09/\text{Log } K_2=4,70\pm0,20$). Schmeide et al. (2003) ont étudié l'interaction de l'uranium (VI) par les AH à pH=2 pour obtenir des informations sur les groupements fonctionnels des AH qui complexent l'uranium (VI). Dans l'étude de Cha et al. (2011), ils ont utilisé l'acide 2,6-dihydroxybenzoïque DHB (constitué d'un cycle benzénique substitué par un groupe carboxyle et par deux groupes hydroxyles) comme ligand modèle des AH et ont déterminé par spectrophotométrie UV-Vis et SLRT. L'intensité de fluorescence mesurée est celle de l'uranium et les constantes de stabilité calculées via le graphique de Stern-Volmer sont égales à $\text{Log } K_1=3,9\pm0,1$ et $\text{Log } K_2=2,9\pm0,1$. Une étude très récente

citée précédemment pour l'interaction AH-Eu(III) de [Hahn et al. \(2017\)](#) s'est intéressée à l'étude l'interaction AH- UO_2^{2+} également. Ils ont révélé à $\text{pH}=5,0\pm0,05$ deux constantes de stabilité 1:1 : $\text{Log } K=5,99\pm0,01$ obtenue par ultrafiltration et $\text{Log } K=5,3\pm0,3$ obtenue par CE-ICP-MS.

HITACHI F4500 Deux composants ont été retrouvés avec CP/PARAFAC pour l'interaction AH- $\text{UO}_2(\text{II})$ (cf. figure 4.33) avec un CORCONDIA de 80%. Le composant 1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=295/425$ nm) se situe dans la position des acides humiques dits d'origine marine (pic M). Le pic du composant 2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=270/495$ nm) n'est pas rapporté dans la littérature. Nous pouvons remarquer qu'à de fortes concentrations d'uranium et notamment à 1.10^{-4} mol.L⁻¹, la courbe montre une augmentation en intensité de fluorescence du deuxième composant. Une des hypothèses de cette augmentation peut être liée à la fluorescence de l'uranium qui présente un pic d'excitation à 270 nm et un premier pic d'émission aux alentours de 490 nm également. Ce pic pourrait donc correspondre à la fluorescence de l'uranium. Une autre hypothèse de cette augmentation pourrait correspondre à l'atteinte de la capacité de complexation et donc la fluorescence mesurée correspond aux sites de fluorescence non complexés. La contribution en fluorescence de ces deux composants est représentée sur les graphiques de la même figure (à gauche). Nous pouvons constater sur la courbe de quenching une diminution importante de 71% de l'intensité de fluorescence du premier composant et une décroissance de 50% du deuxième composant. La modélisation 1:1 après optimisation a permis de calculer les valeurs des constantes de stabilité qui sont égales à $\text{Log } K_1=3,16$ et $\text{Log } K_2=2,85$ pour le premier et le deuxième composant, respectivement.

Nous avons constaté que le modèle 1:1 de la contribution du deuxième composant présente un mauvais ajustement des points mesurés. C'est pourquoi une forme modifiée de l'équation de l'intensité de fluorescence, développée par [Parker and Barnes \(1957\)](#) et réutilisée par [Luciani \(2007\)](#) dans sa méthode de dilution contrôlée, a permis de modéliser correctement cette augmentation en intensité de fluorescence en prenant en compte l'effet d'écran interne observé pour les fortes concentrations d'uranium (cf. figure 4.34). L'équation finale prend la forme suivante :

$$I_F(\lambda_{\text{ex}}, \lambda_{\text{em}}) = I_0(\lambda_{\text{ex}}) \Delta x \left(\sum_{n=1}^N c_n \epsilon_n(\lambda_{\text{ex}}) \phi_n \gamma_n(\lambda_{\text{ex}}) \right) \prod_{n=1}^N e^{-\frac{1}{2} c_n \epsilon_n(\lambda_{\text{ex}}) + c_n \epsilon_n(\lambda_{\text{em}})} \quad (4.1)$$

Le tableau 4.19 regroupe les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des spectres 3D identifiés par CP/PARAFAC, avec toujours en gras, les contributions en intensité de fluorescence les plus hautes.

TECAN M1000 Quatre composants sont calculés par CP/PARAFAC pour les résultats du TECAN avec un CORCONDIA de 77%. Leurs contributions en fluorescence en fonction de la concentration de l'uranium ainsi que les modélisations via le modèle 1:1 sont représentées sur la figure 4.35.

- Le premier composant ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=265/420$ nm) représente les substances humiques de la gamme UV (pic A) et il est présent également dans la décomposition obtenue avec

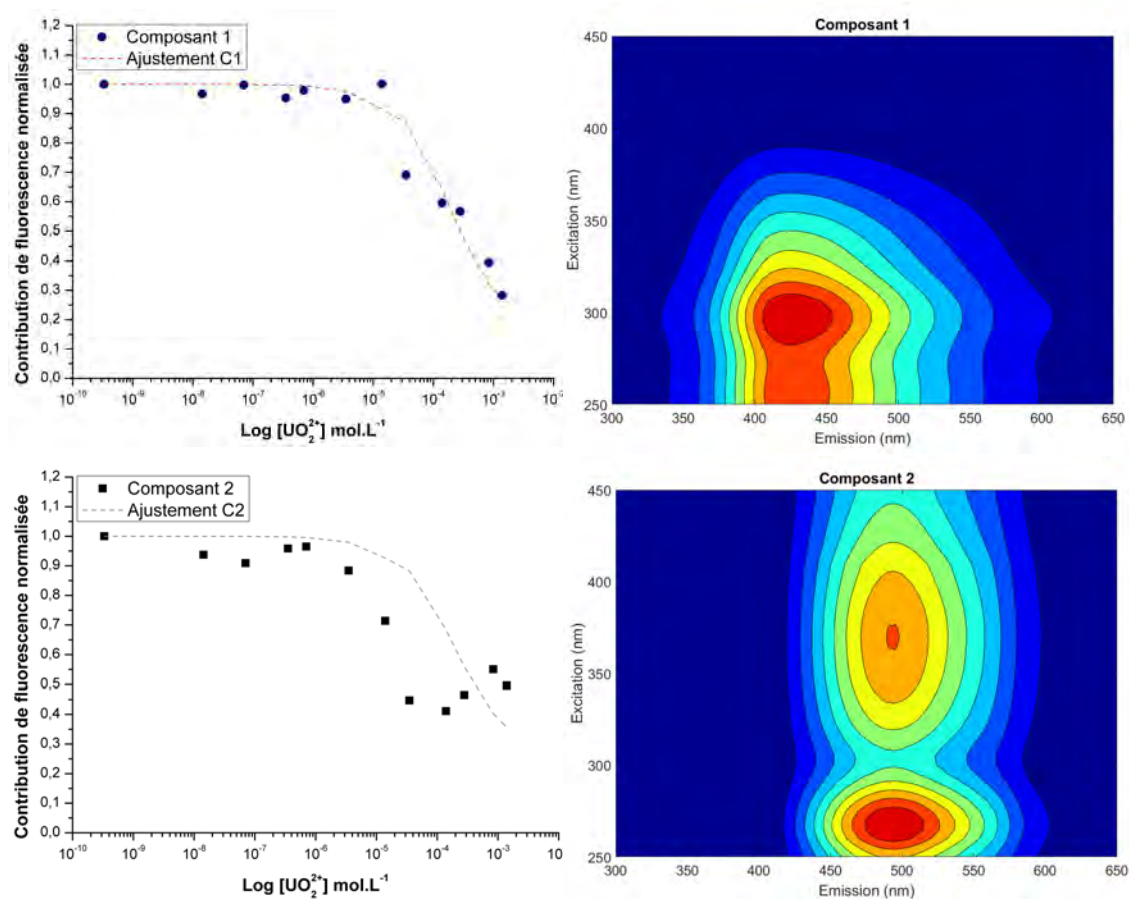


Figure 4.33 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH–UO₂(II)

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	295	425	265	420
Pic 2	270	495	280	335
Pic 3	–	–	370	460
Pic 3	–	–	420	535

Tableau 4.19 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AH–UO₂(II)

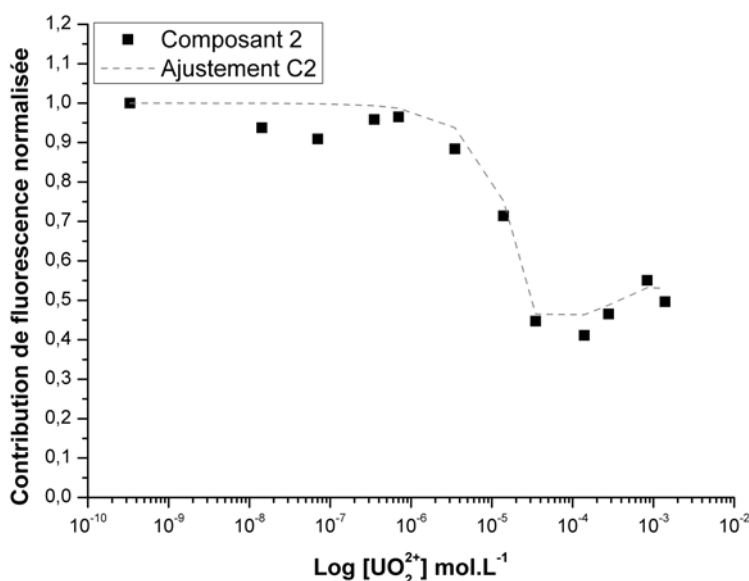


Figure 4.34 – Forme modifiée du modèle 1 : 1 de la contribution du deuxième composant AH-UO₂(II) en tenant en compte la fluorescence de l'uranium

l'HITACHI. Sa contribution en fluorescence indique une diminution de 94% en intensité de fluorescence et la constante de stabilité est égale à $\text{Log } K_1 = 4,06$.

- Le deuxième composant ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/335$ nm) indique la présence d'un fluorophore proche des substances fluorescentes de type protéique faisant référence au pic T. Une décroissance en intensité de fluorescence de 94% est constatée et la constante de stabilité calculée est égale à $\text{Log } K_2 = 4,02$.

- Le troisième composant ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 370/460$ nm) provient des substances humiques d'origine terrestre (pic C) et présente une diminution de 78% de l'intensité de fluorescence avec une constante de stabilité $\text{Log } K = 2,97$.

- Le quatrième composant ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 420/535$ nm) n'est pas rapporté dans la littérature. La diminution de fluorescence est environ égale à 75% et une constante de stabilité $\text{Log } K_3 = 3,02$ plus grande que celle du troisième composant.

Nous remarquerons une fois de plus la présence de quelques points aberrants dans la contribution en fluorescence des composants liée aux mêmes problèmes relevés précédemment pour le TECAN en particulier le premier point.

Quanta-Ray Une décroissance bi-exponentielle est obtenue après déconvolution temporelle dans l'interaction AH-UO₂(II) alors que nous retrouvons deux et quatre composants en 3D. Deux temps de vie sont retrouvés. Le premier est égal à $\tau_1 = 0,70 \pm 0,06$ ns et le deuxième est égal à $\tau_2 = 13,34 \pm 3,4$ ns. Les ratios de temps de vie sont pratiquement égaux à 1 et montre qu'un quenching statique s'opère (cf. figure 4.36) pour les deux composants identifiés. Les ratios d'intensité de fluorescence présentés à gauche montre quasi-linéarité pour le premier composant et la pente donne la constante de formation $\text{Log } K_{S,1} = 3,24$. Le ratio d'intensité de fluorescence du deuxième composant ne montre aucune linéarité. Cette non-linéarité pourrait être due à la fluorescence de l'uranium. La constante de stabilité

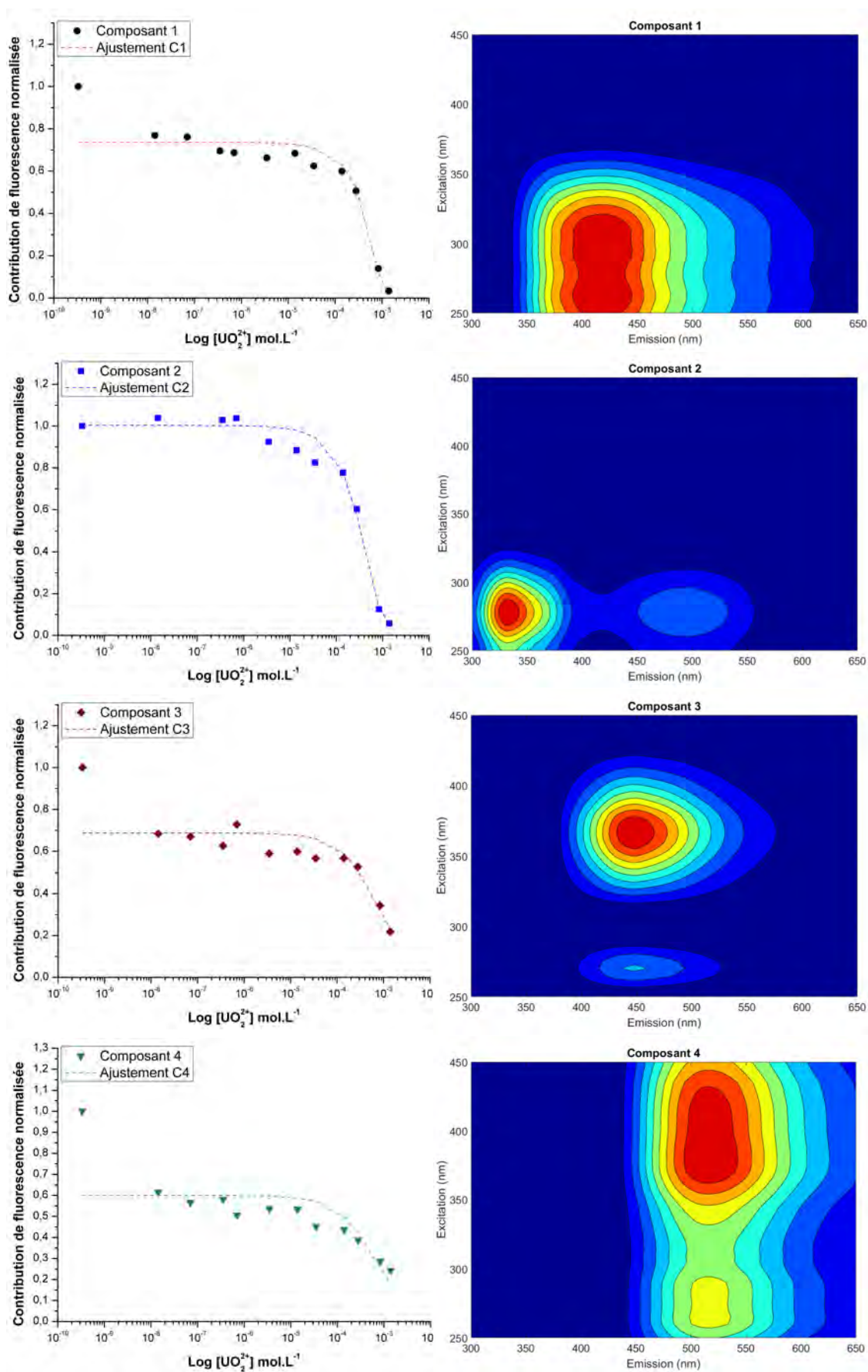


Figure 4.35 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AH- $\text{UO}_2(\text{II})$

a été calculée à partir de l'équation de Stern-Volmer et $\text{Log } K_{s,2}=2,81$. Ces valeurs se rapprochent de celles optimisées via le modèle 1 : 1 des résultats de l'HITACHI.

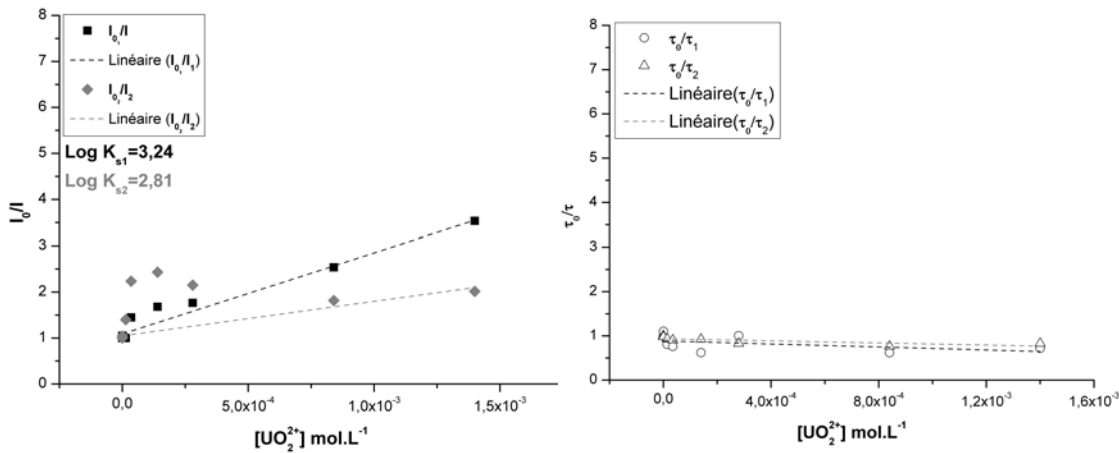


Figure 4.36 – Graphique de Stern-Volmer de l'interaction entre l'AH et l'UO₂(II)

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AH-UO ₂ (II)	Cette étude	HITACHI F4500	2	80,64	3,16/2,86	0,70±0,06	13,34±3,40
		TECAN M1000	4	77,73	4,06/4,02/2,97/3,02		
		Quanta-Ray		Bi-exp	3,24/2,81		
	Li et al. (1980)	Ultrafiltration			6,7/4,7	Q. statique	
	Saito et al. (2002)	SLRT			5,07/4,70		
	Schmeide et al. (2003)	Spectrométrie d'absorption des rayons X			—		
	Cha et al. (2011)	SLRT			3,9/2,9		

Tableau 4.20 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AH-UO₂(II)

Le tableau 4.20 reporte les résultats trouvés dans la littérature ainsi que nos résultats issus de l'interaction AH-UO₂(II). L'étude de Saito et al. (2002) montre des différences en ce qui concerne les valeurs des constantes de stabilité qui peuvent s'expliquer par les valeurs de pH qui affectent sensiblement le quenching de fluorescence et la capacité de complexation des AH. Une autre hypothèse plausible concerne la présence de sites qui forment de bons complexes avec l'UO₂(II) mais dont l'intensité de fluorescence n'est pas affectée. Dans l'étude de Cha et al. (2011), les constantes de stabilité et le type de quenching sont en bon accord avec nos résultats présentés ci-dessus.

La figure 4.37 regroupe tous les pics identifiés avec l'HITACHI et le TECAN par CP/PARAFAC issus des interactions AH-métaux. L'interaction de l'AS avec les métaux n'a pas montré de décalage en longueurs d'onde d'excitation et d'émission et nous avons retrouvé le pic principal de l'AS pour toutes les interactions (cf. figure 4.18) tandis que pour l'AH, les interactions avec les métaux montrent des longueurs d'onde d'excitation et d'émission totalement différentes induisant une modification dans la structure moléculaire et par conséquent les propriétés optiques. Les pics retrouvés sont caractérisés par Peak-Picking grâce à l'identification rapportée par Coble (1996). La nature des pics identifiés dépend du métal ajouté. Nous observons suite à ces interactions que le cuivre et l'aluminium interagissent plus avec les substances humiques d'origine marine et que les substances

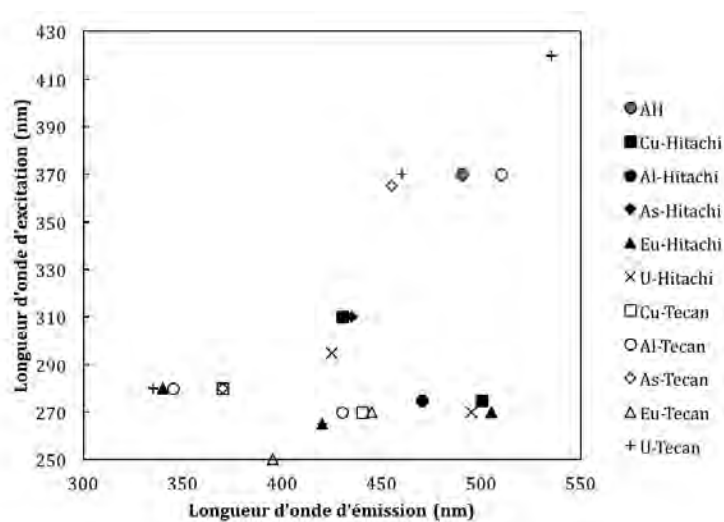


Figure 4.37 – Positions des maxima des spectres issus de CP/PARAFAC à partir des données 3D de l'HITACHI et du TECAN obtenues avec les interactions AH-(Cu/Al/As/Eu et U)

protéiques de l'interaction AH-Eu(III) sont moins affectées par l'AH que les substances humiques. Nous soulignerons une fois de plus, les résultats peu pertinents obtenus avec le TECAN.

4.3 Acide Fulvique

4.3.1 Étude de la variabilité de l'AF

L'étude de la variabilité en intensité de fluorescence de l'AF extrait de l'estuaire Saint Laurent et sans ajouts de volume en métal montre une légère variation au niveau du 6^{ème} point uniquement (cf. figure 4.38). Cette unique variation n'est pas très importante et peut être due à une erreur de manipulation pendant les ajouts puisque les autres points ne montrent aucun changement et l'intensité de fluorescence reste constante.

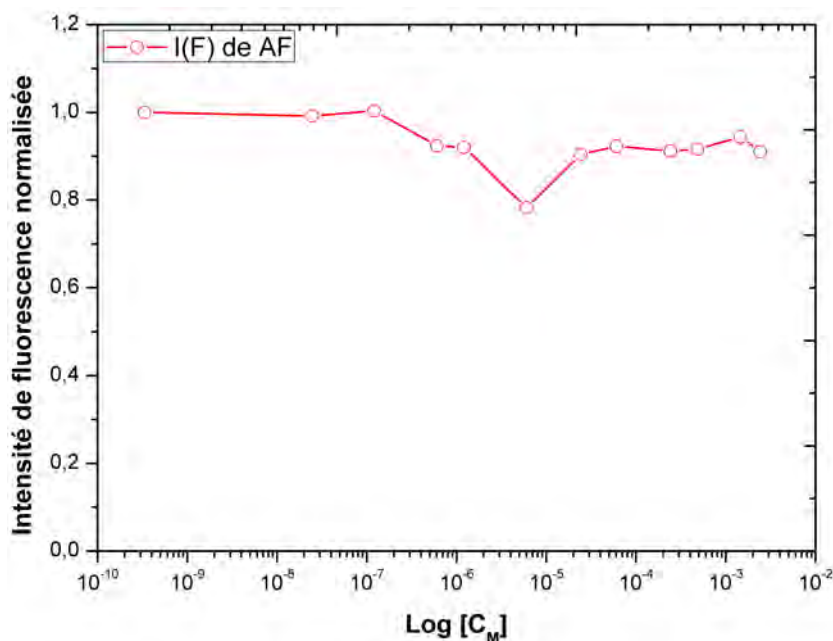


Figure 4.38 – Variabilité de l'intensité normalisée de fluorescence de l'AF sans ajouts en volume de métal

4.3.2 Quenching et temps de vie de fluorescence

La structure moléculaire des AF présente des noyaux aromatiques reliés par des chaînes aliphatiques et des groupements fonctionnels à caractère acide permettant une très bonne capacité de complexation par le métal. Les propriétés de complexation des AF sont bien référencées dans la littérature du fait que leur structure moléculaire soient moins complexe que celle des AH.

4.3.2.1 Cuivre

Très nombreux sont les chercheurs qui se sont intéressés à l'étude de l'interaction AF-Cu(II) et les constantes de stabilité de celle-ci sont assez bien rapportées dans la littérature par différentes techniques de mesures : **Shuman and Cromer (1979)** ont estimé par voltamétrie une constante Log K=4,7 à pH=7.

L'étude emblématique de [Ryan and Weber \(1982\)](#) portait sur la caractérisation d'AF standard avec le Cu(II) par quenching de fluorescence. Ils ont déterminé à pH=7 la constante de stabilité à partir de l'équation qu'ils ont proposée. Ils ont trouvé en l'occurrence une constante $\text{Log } K = 5,03 \pm 0,03$. [McKnight et al. \(1983\)](#) ont rapporté une constante de stabilité entre 5,4 et 6,6 pour des AF d'origine différentes.

[Ventry et al. \(1991\)](#) ont déterminé par quenching de fluorescence également mais à pH=6, une constante $\text{Log } K = 4,75 \pm 0,05$ plus ou moins proche de celle retrouvée par [Ryan and Weber \(1982\)](#).

[da Silva and Machado \(1995\)](#) ont révélé une constante $\text{Log } K = 5,2 \pm 0,3$ à pH=6 pour des AF d'origine marine.

[Lombardi and Jardim \(1997\)](#) ont étudié cette complexation par quenching de fluorescence et ont trouvé deux sites de complexation au sein des AF avec deux constantes de stabilité $\text{Log } K_1 = 4,70 \pm 0,13$ et $\text{Log } K_2 = 5,49 \pm 0,14$.

[Smith and Kramer \(2000\)](#) a modifié le modèle de [Ryan and Weber \(1982\)](#) et développé un nouveau modèle permettant d'ajuster les courbes de quenching de différents ligands simultanément au lieu de procéder à un ajustement individuel de chaque composant. Ils ont trouvé dans leur étude d'interaction AF-Cu(II) 5 composants. Les deux composants dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission se rapprochent le plus de nos composants (présentés ci-dessous) ont des constantes de stabilité $\text{Log } K_1 = 4,95 \pm 0,23$ et $\text{Log } K_2 = 4,98 \pm 0,23$.

[Hays et al. \(2004\)](#) ont procédé à une modification de l'équation de Stern-Volmer pour déterminer les paramètres d'équilibre d'AF issu du sol en interaction avec le cuivre à différents pH. Ils ont révélé deux constantes de stabilité à pH=7 : $\text{Log } K_1 = 5,35 \pm 0,18$ et $\text{Log } K_2 = 6,06 \pm 0,27$.

[Yan et al. \(2013\)](#) ont étudié par spectroscopie de fluorescence 3D et décomposition PARAFAC l'interaction de matière organique dissoute avec le cuivre à pH=5,00. Ils ont estimé via le modèle 1 : 1 une constante de stabilité $\text{Log } K = 5,02$.

En utilisant une électrode sélective et la titration potentiométrique, [Chen et al. \(2013\)](#) ont utilisé la spectroscopie et le quenching de fluorescence pour étudier l'interaction entre des AF standard de Suwannee River et Cu(II). Une constante de complexation $\text{Log } K = 4,25$ a été rapportée à pH=6,00.

HITACHI F4500 Dans ces expériences de mesures, la décomposition CP/PARAFAC indique la présence de deux composants présentés sur la figure 4.39. Le composant 1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 310/440$ nm) est décrit comme type fulvique et représente typiquement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'AF de notre étude (cf. figure 3.6). Il est généralement attribué au pic M des substances humiques marines selon [Coble \(1996\)](#). Le composant 2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 370/476$ nm) indique un fluorophore habituellement attribué au pic C faisant référence aux substances humiques terrestres. Bien que notre étude porte sur la matière organique dissoute, elle provient d'un estuaire et la présence de MO d'origine terrestre peut être due à la dynamique sur la marée des eaux fluviales qui se jettent dans l'océan, il n'est donc pas étonnant d'y trouver des MO d'origine terrestre. Les variations de contributions en fluorescence des deux composants sont représentées sur la même figure à gauche. Le premier composant présente une décroissance en fluorescence de 85%. Cette forte décroissance pourrait être liée au fait qu'un grand nombre de sites neutralisent les

charges négatives des molécules d'AF. La constante de stabilité optimisée via le modèle 1 : 1 est égale à $\text{Log } K_1=4,62$. Le deuxième composant indique une décroissance de 66% inférieure par rapport au premier. La constante de stabilité est égale à $\text{Log } K_2=5,89$. Nous pouvons remarquer pour le deuxième composant que, en fin de titration pour des concentrations très fortes, la fluorescence augmente. Cette tendance se manifeste généralement quand on a un résidu de fluorescence et que la capacité de complexation est amplement dépassée. Nous pouvons l'observer également sur le graphique de Stern-Volmer de la figure 4.41. Une autre proposition possible serait le changement du rendement quantique lié au changement de la structure moléculaire du fluorophore à cause des fortes concentrations en Cu(II) ou l'apparition d'interférence liée à la diffusion. Toutes ces hypothèses sont plausibles et cela pourrait expliquer l'augmentation en intensité de fluorescence vers les plus hautes concentrations de cuivre.

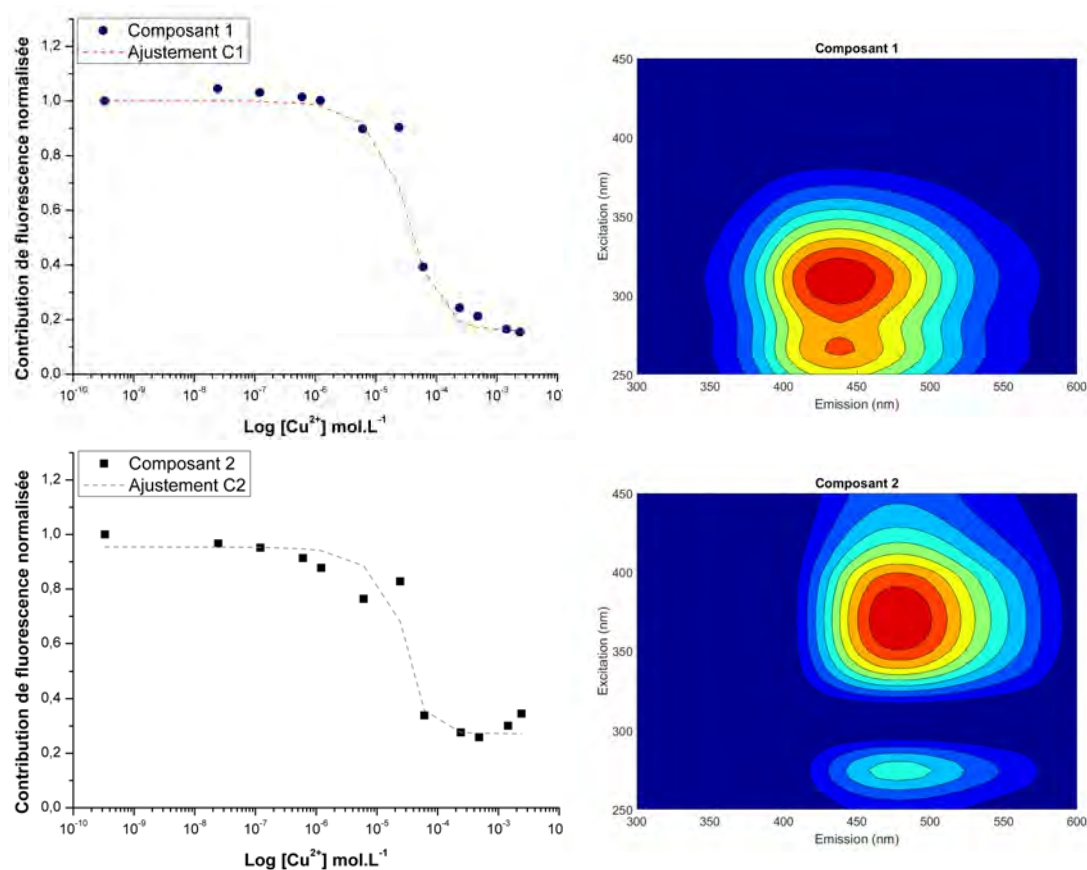


Figure 4.39 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–Cu(II)

TECAN M1000 La décomposition CP/PARAFAC des données du TECAN indique la présence d'un seul composant uniquement ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=265/420 nm (cf. figure 4.40). Ce fluorophore est attribué aux substances humiques de la gamme UV. La contribution de ce

composant montre un quenching de fluorescence aux alentours de 94% et sa modélisation via le modèle 1 : 1 fournit une constante de stabilité $\text{Log } K_1=4,09$ du même ordre de grandeur que celle obtenue pour l'HITACHI.

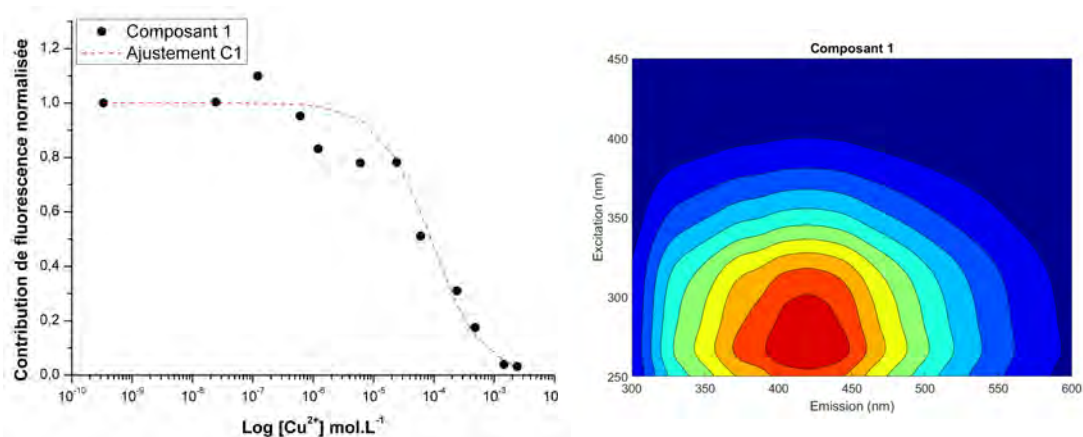


Figure 4.40 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–Cu(II)

Ci-dessous, un tableau récapitulatif des pics identifiés par CP/PARAFAC de l'interaction AF-Cu(II) avec l'HITACHI et le TECAN. Comme précédemment, les contributions les plus hautes en intensité de fluorescence entre les composants sont marquées en gras :

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	310	440	265	420
Pic 2	370	476	–	–

Tableau 4.21 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AF–Cu(II)

Quanta-Ray Une décroissance bi-exponentielle est observée pour l'interaction AF-Cu(II). Sur le graphique 4.41 figurent les deux courbes de Stern–Volmer des ratios d'intensité et de temps de vie de fluorescence. Le premier temps de vie moyen est égal à $0,75 \pm 0,07$ ns et le second est égal à $14,15 \pm 6,56$ ns. L'analyse du graphique des ratios d'intensité montre une similitude avec les résultats obtenus pour les interactions AS-Cu(II) et AH-Cu(II). Effectivement, la non-linéarité des courbes est identique aux résultats rapportés précédemment montrant la grande capacité du cuivre pour complexer les ligands fluorescents. L'analyse des ratios de temps de vie montre un comportement relativement stable aux alentours de 1. En l'occurrence, un quenching statique caractérise l'interaction AF–Cu(II). Les valeurs des constantes obtenues à partir des pentes du graphique de Stern–Volmer sont pratiquement proches de celles trouvées par modélisation 1 : 1 et sont égales à $\text{Log } K_{S,1}=4,06$ et $\text{Log } K_{S,2}=3,92$ pour le premier et le deuxième composant, respectivement.

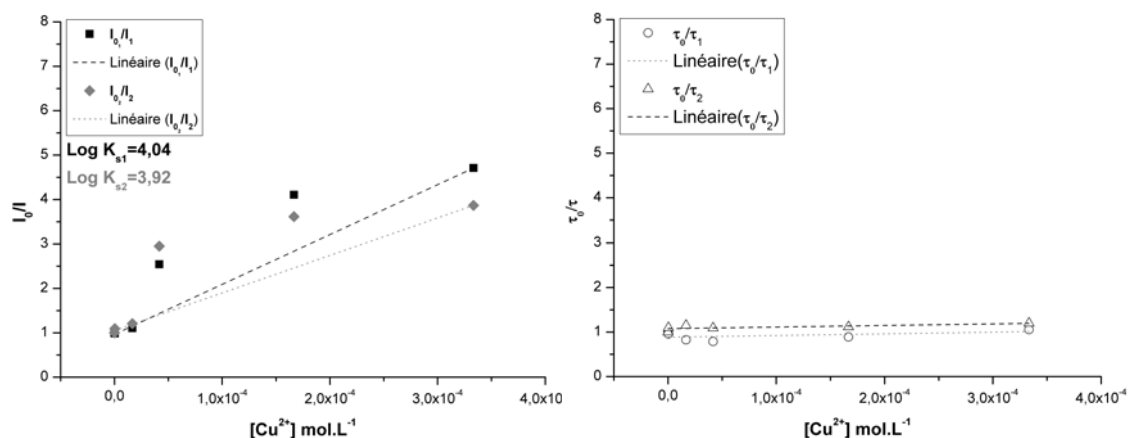


Figure 4.41 – Graphique de Stern–Volmer de l'AF–Cu(II)

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AF–Cu(II)	Cette étude	HITACHI F4500	2	75,52	4,62/5,89	0,75±0,07	14,15±6,56
		TECAN M1000	1	100	4,09		
		Quanta-Ray		Bi-exp	4,06/3,92		
	Ventry et al. (1991)	Voltammétrie			4,75		
	Ryan and Weber (1982)				5,03		
	Lombardi and Jardim (1997)				4,70/5,49		
	Smith and Kramer (2000)	Spectrofluorimétrie			4,95/4,98		
	Yan et al. (2013)				5,02		
	Chen et al. (2013)				4,25		

Tableau 4.22 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AF–Cu(II)

Le tableau 4.22 regroupe nos résultats et ceux de la littérature sur l'interaction AF–Cu(II). Toutes les études mentionnées ci-dessus ont révélé des constantes de complexation autour de 5 et proche de celle calculée dans notre étude quelque soit la technique, les sites ou les AF. Les différences qu'il peut y avoir dans les valeurs des constantes peuvent être liées à la gamme de concentration utilisée (Cu et AF) ou à l'utilisation du tampon. Notons une fois de plus le décalage en longueur d'onde d'excitation et d'émission en terme de pic fourni par l'HITACHI et le TECAN.

4.3.2.2 Aluminium

La question sur l'interaction AF–Al(III) a été bien référencée également. Un grand nombre de chercheurs se sont intéressés à cette interaction et différentes techniques ont été utilisées pour rapporter les constantes de stabilité.

L'étude de da Silva and Machado (1996) a porté sur l'interaction d'AF d'origine marine avec l'Al à pH=4. Par fluorescence synchrone et modélisation 1 : 1, ils ont rapporté une constante de stabilité Log K=5,1. La même technique a été réutilisée par la même équipe da Silva et al. (1997) pour déterminer à différents pH (2,5–5,0), la constante d'AF provenant du sol. Ils ont rapporté des constantes de stabilité entre 4,5 (pour un pH=2,5) et 6,2 (pour un pH=5).

Elkins and Nelson (2001) ont utilisé la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie

infrarouge pour déterminer l'interaction entre des AF standards de Suwannee River et l' Al^{3+} . Dans leurs conditions, c'est-à-dire à $\text{pH}=4$ et $0,1 \text{ M}$ en force ionique, ils ont trouvé une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'acide fulvique après ajouts en volume d' Al^{3+} et un décalage en longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Cette augmentation serait due à la liaison des petits ions très chargés Al^{3+} à l'AF ce qui rend la structure moléculaire plus rigide, augmentant ainsi le rendement quantique de fluorescence en réduisant la probabilité de dissipation d'énergie par d'autres processus non-radiatifs. La constante de stabilité Log K rapportée par modélisation 1 : 1 est égale à 4,67.

La plupart des études rapportées par [Elkins and Nelson \(2002\)](#) dans son étude analytique, montre des constantes de complexation entre 4,67 et 5,79 qui varient en fonction du pH et de la nature des AF. L'étude de [Zhao and Nelson \(2005\)](#) par fluorescence synchrone également a permis de trouver une constante de stabilité égale à $\text{Log K}=5,11$ pour l'interaction AF- Al(III) .

Dans nos conditions expérimentales en tout cas, nous n'avons pas observé d'augmentation en intensité de fluorescence. Les contributions ont révélé qu'un quenching de fluorescence se produisait suite à l'interaction de l'AF avec l'aluminium.

HITACHI F4500 Le CORCONDIA de CP/PARAFAC suggère la présence d'un seul composant (cf. figure 4.42). Ce spectre 3D est constitué par un double pic centré à 440 nm en émission. Le pic principal se situe autour de 265 nm en excitation et le pic secondaire se situe aux alentours de 310 nm. Le pic (265/440 nm) est généralement décrit comme pic A représentant les substances humiques marine dans la gamme UV. Le pic secondaire est caractéristique des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'AF de cette étude. La présence d'un double pic, comme mentionné précédemment, est toujours douteuse. En effet, il est difficile de savoir s'il s'agit du pic réel d'un fluorophore ou du mélange de deux groupements fluorescents distincts qui sont mal séparés par CP/PARAFAC. Cependant, CP/PARAFAC n'indique la présence que d'un seul composant et sa contribution spectrale en fluorescence est représentée à gauche de la même figure que ce soit un double pic ou un groupement, leur variation synchrone ne permet pas à CP/PARAFAC de les séparer. Celle-ci indique un quenching de fluorescence aux alentours de 70% et donc un résidu de fluorescence de 30%. La constante de stabilité calculée après modélisation est égale à $\text{Log K}=3,29$.

TECAN M1000 Les données mesurées par le TECAN indique après décomposition CP/PARAFAC la présence de deux composants mais le deuxième est négligé à cause sa très faible contribution et invariabilité en intensité de fluorescence. Par conséquent, il est systématiquement attribué à un bruit. Seul le premier composant est représenté (cf. figure 4.43). Le spectre 3D de ce composant est similaire à celui identifié par l'HITACHI. Il est constitué également d'un double pic en excitation (260/310 nm) et centré sur le point 440 nm en émission. Ce composant est référencé comme type A par Coble. Une décroissance de 70% est relevée. Sa contribution spectrale relative est représentée sur le même graphique à gauche et le modèle 1 : 1 a fourni une constante $\text{Log K}=3,20$. Cette valeur est similaire à celle retrouvée par l'HITACHI mais les deux sont inférieures à celles rapportées dans la littérature. Par ailleurs, il convient de remarquer que l'HITACHI et le TECAN fournissent en l'occurrence des résultats similaires pour cette interaction.

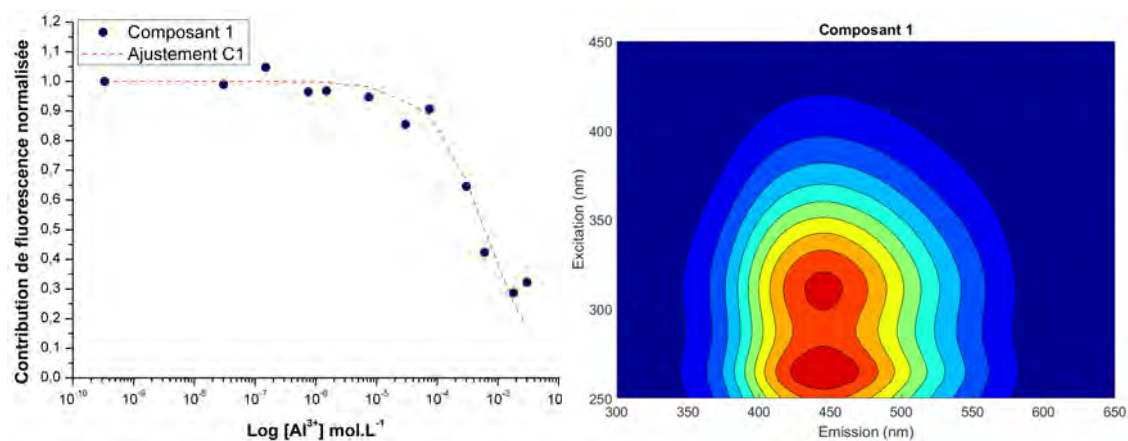


Figure 4.42 – **HITACHI**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–Al(III)

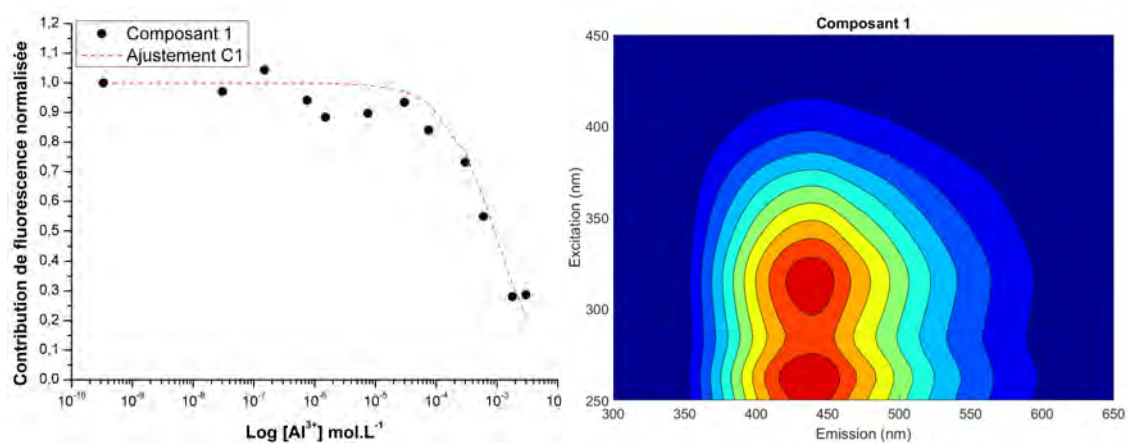


Figure 4.43 – **TECAN**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–Al(III)

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	265/310	445	260/310	440

Tableau 4.23 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AF-Al(III)

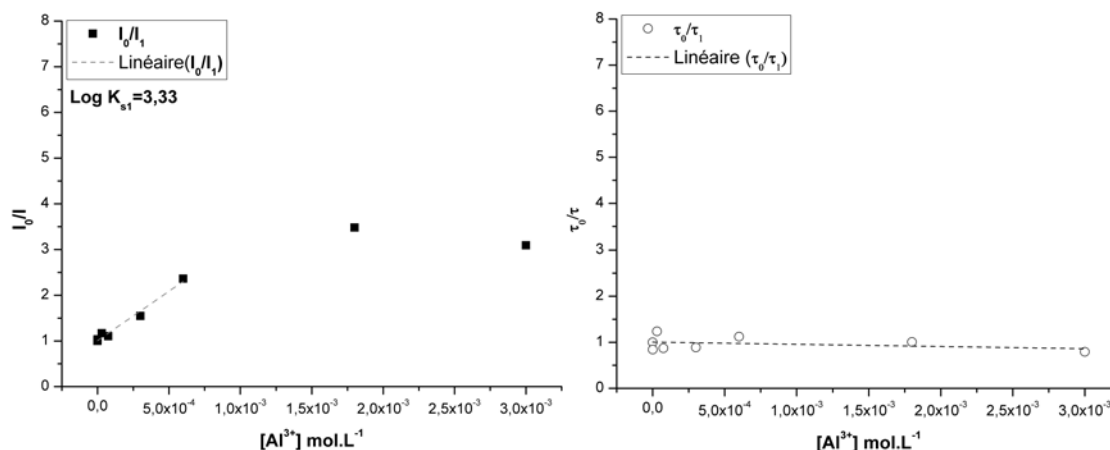


Figure 4.44 – Graphique de Stern-Volmer de l'AF-Al(III)

Le tableau 4.23 montre les différents pics identifiés par CP/PARAFAC.

Quanta-Ray Une décroissance mono-exponentielle a été observée pour cette interaction. Le temps de vie moyen est égal à $\tau_{\text{moy}}=4,03\pm0,40$ ns. La constante de formation a été déterminée à partir de la pente et est égale à $\text{Log } K_S=3,33$. Le ratio de temps de vie présente une linéarité aux alentours de 1 révélant distinctement l'apparition d'un quenching statique.

Le tableau 4.24 récapitule les principaux résultats de l'interaction AF-Al(III). Nous remarquerons que les constantes de la littérature sont plus grandes que nos constantes. Toutefois, les constantes que nous avons calculées par différentes techniques sont similaires.

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AF–Al(III)	Cette étude	HITACHI F4500	1	100	3,29	4,03±0,40	–
		TECAN M1000	1	100	3,20		
		Quanta-Ray	Mono-exp		3,33		
	da Silva and Machado (1996)				5,1	Q. statique	
	da Silva et al. (1997)				4,6–6,2		
	Elkins and Nelson (2002)	Spectrofluorimétrie			4,67–5,79		
	Zhao and Nelson (2005)				5,11		

Tableau 4.24 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-Al(III)

4.3.2.3 Arsenic

L'interaction de l'arsenic avec la MO est assez peu documentée à ce jour. Parmi les rares études effectuées à ce sujet, **Fakour and Lin (2014)** ont montré qu'à pH=7,5 une quantité significative d'arsenic peut se complexer avec les AF d'origine marine. Dans leurs conditions expérimentales ([AF]=30 mg/L, [As]=0,2–5 mg/L) ils ont observé une complexation de l'arsenic par les AF par spectroscopie IR. Ils ont également observé qu'en présence d'un adsorbant à base de fer, le complexe AF-arsenic a été réduit de 2–12% dans l'eau probablement par forte adsorption de l'arsenic à la surface. Ils ont également montré que deux sites de complexation (un site fort et un site faible) ont été responsables de la complexation de l'As. Pour l'espèce As(III), la constante de stabilité du site considéré fort est égale à $\text{Log } K=1,53\pm0,20$ et celle du site considéré faible, $\text{Log } K=0,012\pm0,002$. Pour l'espèce As(V), les constantes de stabilité du fort et faible de site de complexation sont respectivement égales à $\text{Log } K=2,54\pm0,09$ et $\text{Log } K=0,020\pm0,003$. Ils ont conclu que la constante de stabilité est indépendante de la concentration de la MO mais que le nombre de sites de complexation est proportionnelle à celle-ci.

HITACHI F4500 La MEEF issue de la décomposition CP/PARAFAC décrit un seul composant centré sur le point (315/445 nm) représentant les longueurs d'excitation et d'émission de l'AF étudié. Ce composant s'apparente au pic M des substances humiques marines selon **Coble (1996)**. Sa contribution spectrale relative montre un quenching de fluorescence supérieur aux décroissances observées pour l'AS et l'AH vis-à-vis de l'arsenic (cf. figure 4.45). La décroissance en intensité de fluorescence est de 69% et la modélisation 1 : 1 fournit une constante de stabilité $\text{Log } K=3,30$.

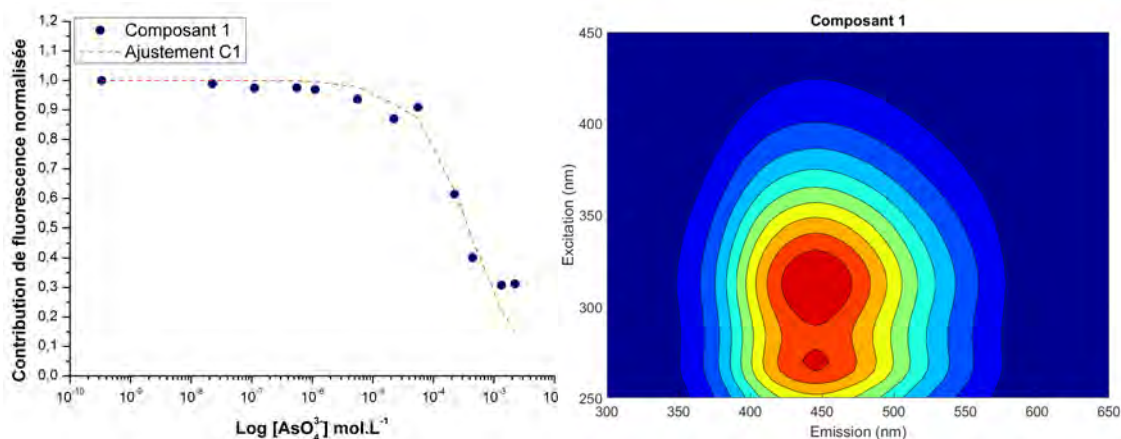


Figure 4.45 – **HITACHI**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF-As(V)

TECAN M1000 Le TECAN montre la présence d'un composant avec un CORCONDIA de 72%. Son spectre 3D représenté sur la figure 4.46 indique un pic centré en 305/415 nm. Il montre un décalage de 10 et 30 nm en longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement par rapport au pic identifié par l'HITACHI. En revanche, son pourcentage

de quenching est inférieur à celui de l'HITACHI montrant une décroissance en intensité très faible (cf. figure 4.46 de gauche).

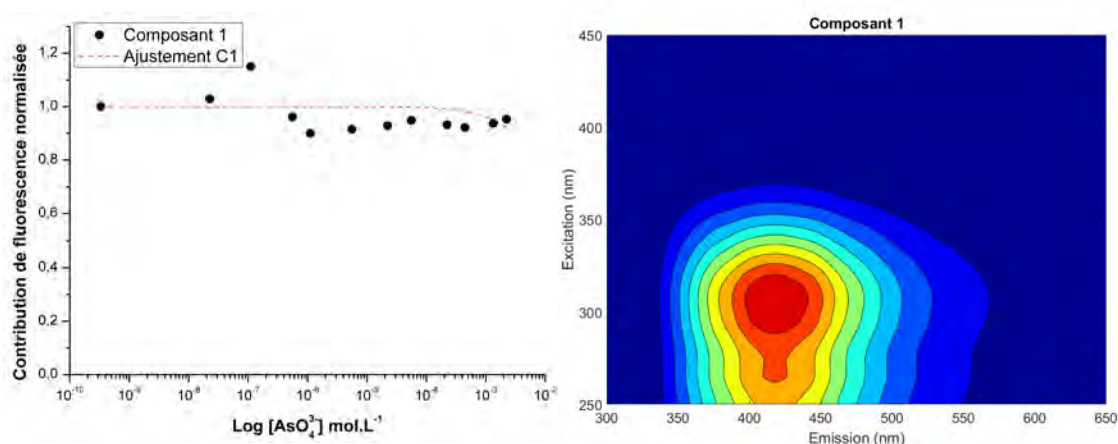


Figure 4.46 – **TECAN**–Contribution spectrale normalisée et matrice d'excitation et d'émission de fluorescence du composant identifié après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–As(V)

Le tableau des longueurs d'onde d'excitation et d'émission identifiés par CP/PARAFAC par les deux spectrofluorimètres est représenté ci-dessous :

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	315	445	305	415

Tableau 4.25 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AF–As(V)

Quanta-Ray Les temps de vie de fluorescence n'ont pas pu être mesurés à cause d'un problème technique avec la source laser. Par conséquent, déduire le type de quenching responsable dans l'interaction AF–As(V) n'a pas été possible. Cependant, la droite linéaire du ratio d'intensité représenté sur la figure 4.47 a permis de calculer la constante de stabilité Log K_S qui est égale à 3,51.

Interaction	Biblio	Spectro	N° Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$
AF–As(V)	Cette étude	HITACHI F4500	1	100	3,30	–
		TECAN M1000	1	100	1,22	
	Fakour and Lin (2014)	Spectroscopie IRTF			2,54/0,0020	

Tableau 4.26 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AF–As(V)

Le tableau 4.26 montre les principaux résultats de l'interaction AF–As(V). Les valeurs des constantes rapportées sont par le TECAN et par Fakour and Lin (2014) sont inférieures à la constante de stabilité optimisée dans notre étude avec l'HITACHI. La différence est probablement liée à la technique utilisée.

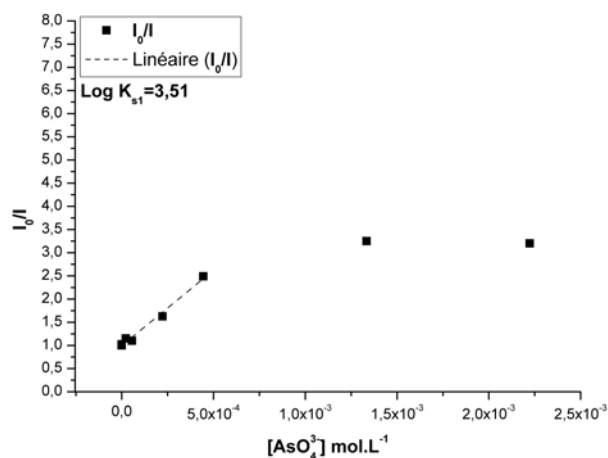


Figure 4.47 – Graphique de Stern-Volmer de l'AF-As(V)

4.3.2.4 Europium

De nombreuses études sur l'interaction AF-Eu(III) ont été réalisées et souvent, l'étude est faite en observant la fluorescence de l'euporium à fortes concentrations. Ainsi, Ephraïm et al. (1989) ont procédé par échange d'ions et ont rapporté une constante $\text{Log } K=3,5 \pm 0,7$ pour un pH entre 3,9 et 5. Bidoglio et al. (1991) dans leur étude par SLRT de l'Eu, ont trouvé une constante de stabilité 1 : 1 $\text{Log } K=6,00 \pm 0,1$ à $\text{pH}=6,51$. Ils ont également conclu que la dépendance de K du pH pour les AF est plus petite que pour les AH. Tiseanu et al. (1998) dans leur étude de caractérisation d'AF par SLRT a révélé que l'interaction avec l' Eu^{3+} engendrait un quenching statique. Lead et al. (1998) ont fourni une constante $\text{Log } K=2,36 \pm 0,13$ à $\text{pH}=2,5-3,5$. Chung et al. (2005) a mis en évidence deux constantes de stabilité 1 : 1 par quenching de fluorescence et en utilisant deux techniques différentes à $\text{pH}=5$. La concentration en AF a été maintenue constante à 10 mg.L^{-1} alors que la concentration d'Eu(III) a varié de $1,0 \cdot 10^{-6}$ à $2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$. En utilisant la fluorescence synchrone, ils ont trouvé une constante $\text{Log } K=6,4 \pm 0,2$ du composant qui a manifesté le maximum de quenching. En effet, ils ont trouvé par fluorescence synchrone trois pics d'émission caractéristiques de leur AF à : 392 nm, 420 nm et 498 nm. Du fait que le dernier pic (498 nm) montrait la plus haute décroissance en fluorescence, ils ont appliqué le modèle 1 : 1 sur cet unique pic pour déterminer la constante de stabilité. L'autre technique est la spectroscopie laser résolue en temps. Ils ont trouvé une constante $\text{Log } K=6,7 \pm 0,1$ en mesurant la fluorescence de l'euporium à différentes concentrations. Une étude de Wei et al. (2015) sur la matière organique dissoute en interaction avec l'Eu(III) par fluorescence 3D et CP/PARAFAC a révélé une constante de stabilité $\text{Log } K=5,84$ via le modèle 1 : 1.

HITACHI F4500 L'analyse CP/PARAFAC des données obtenues pour l'interaction AF-Eu(III) montre la présence de 2 composants avec un CORCONDIA de 88% (cf. figure 4.48) dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives sont : $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=310/415 \text{ nm}$ et $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=(270-340)/475 \text{ nm}$. Le premier composant fait référence au pic M et correspond aux substances humiques. Le deuxième composant présente un double pic en excitation. Le pic principal à 270 nm en excitation fait référence au pic A de la gamme UV

des substances humiques marines et le pic secondaire s'apparente au pic C des substances humiques terrestres. Les contributions en fluorescence normalisées de ces deux composants sont montrées sur la même figure. Ces courbes présentent des quenching de fluorescence particulièrement marqués avec des décroissances respectives de 94% et 95%. La modélisation 1:1 fournit des constantes de stabilité quasi similaires $\text{Log } K_1=4,42$ et $\text{Log } K_2=4,43$. À noter que le composant qui montre la plus haute contribution spectrale en intensité de fluorescence est le premier.

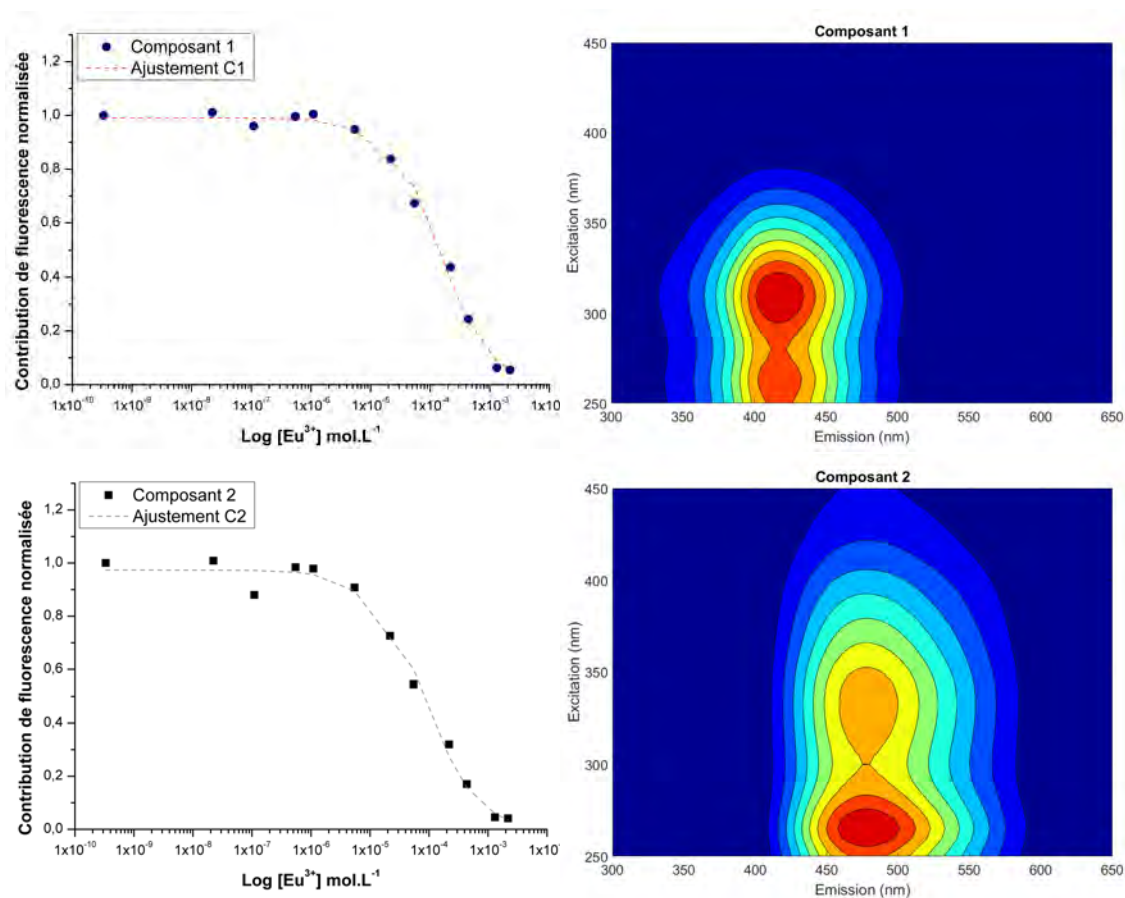


Figure 4.48 – **HITACHI**—Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF-Eu(III)

TECAN M1000 Nous retrouvons avec le TECAN également 2 composants après application de l'algorithme CP/PARAFAC (cf. figure 4.49). La décomposition présente un CORCONDIA de 87% et les MEEFs possèdent des pics de fluorescence dont les longueurs d'onde du premier et deuxième composant sont respectivement $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=310/410 \text{ nm}$ et $(260-350)/475 \text{ nm}$. On retrouve les mêmes pics identifiés par les données de l'HITACHI avec un décalage de 10 nm en excitation du deuxième composant. Les contributions en fluorescence des spectres 3D montrent que le premier et deuxième composant présentent

un quenching de fluorescence de 91% et 83% respectivement. Identiquement à l'HITACHI, le premier composant montre une plus haute contribution en fluorescence et sa constante de stabilité optimisée via le modèle 1 : 1 est égale à $\text{Log } K_1=4,11$. La constante du deuxième composant est égale à $\text{Log } K_2=3,56$.

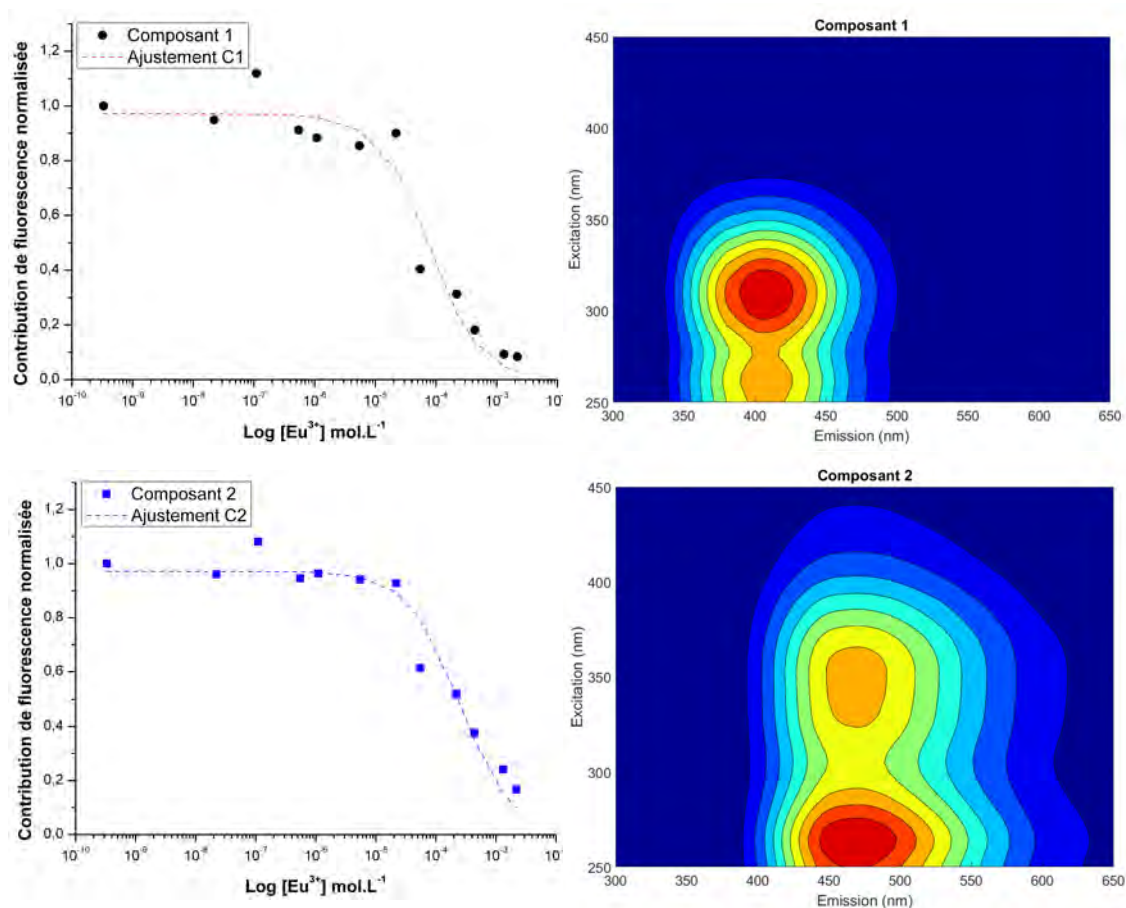


Figure 4.49 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–Eu(III)

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission identifiés par CP/PARAFAC sont rappelées dans le tableau ci-dessous, avec les plus hautes contributions représentées en gras :

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	310	415	310	415
Pic 2	270–340	475	260–350	475

Tableau 4.27 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AF–Eu(III)

Quanta-Ray Une décroissance bi-exponentielle est observée dans l'interaction de l'AF-Eu(III). Ces décroissances fournissent deux temps de vie moyens. Le premier est très court et est égal à $\tau_1 = 0,73 \pm 0,08$ ns et le deuxième, est égal à $\tau_2 = 12,48 \pm 9,96$ ns. Les graphiques de Stern-Volmer sont représentés sur la figure 4.50. Celui de gauche montre les ratios d'intensité de fluorescence. Nous pouvons constater une linéarité dans la courbe mise à part l'avant-dernier point qui montre une irrégularité probablement liée à une erreur expérimentale. Les ratios de temps de vie sur le graphique de droite sont relativement stables aux alentours de 1. Le caractère invariable des ratios de temps de vie révèle un quenching statique. Les constantes de formation ont été déterminées à partir des pentes des ratios d'intensité et sont égales pour le premier et le second composant respectivement à $\text{Log } K_{s,1} = 3,83$ et $\text{Log } K_{s,2} = 4,02$.

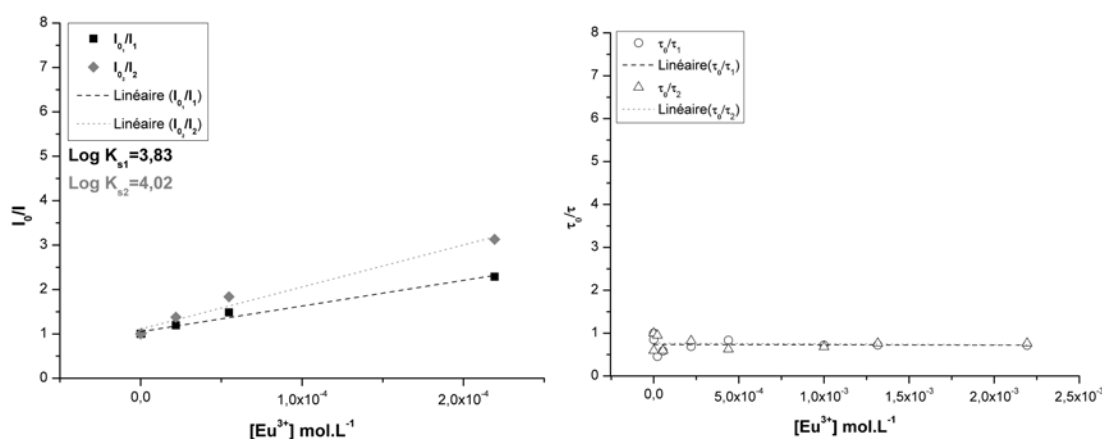


Figure 4.50 – Graphique de Stern-Volmer de l'interaction entre l'AF et l'Eu(III)

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}$ (ns)	$\tau_{\text{moy},2}$ (ns)
AF-Eu(III)	Cette étude	HITACHI F4500	2	88	4,42/4,43	$0,73 \pm 0,08$	$12,48 \pm 9,96$
		TECAN M1000	2	87	4,11/3,56		
		Quanta-Ray		Bi-exp	3,83/4,02		
	Bidoglio et al. (1991)	SLRT			$6,0 \pm 0,1$	Q. statique	
	Lead et al. (1998)	Spectrofluorimétrie			$2,36 \pm 0,13$		
	Tiseanu et al. (1998)	SLRT			—		
	Chung et al. (2005)	Fluorescence synchrone/SLRT			$6,4 \pm 0,2 / 6,7 \pm 0,1$		
	Wei et al. (2015)	Spectrofluorimétrie			5,84		

Tableau 4.28 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AF-Eu(III)

Le tableau 4.28 reprend les résultats essentiels de l'interaction AF-Eu(III). Les valeurs des constantes de stabilité citées dans la littérature sont supérieures à celles trouvées dans notre étude ce qui est étonnant car nous sommes à pH plus élevé. Ces valeurs peuvent s'expliquer par l'origine et la nature des AF. En effet, les AF extraits du sol peuvent avoir des capacités de complexation plus importantes que les AF d'origine marines. Seuls Lead et al. (1998) ont rapporté une constante plus faible car l'expérience a été effectuée à pH=2.

4.3.2.5 Uranium

Les études sur l'interaction AF- $\text{UO}_2(\text{II})$ sont suffisamment bien documentées et les chercheurs ont rapporté les paramètres d'équilibre issus de cette interaction. [da Silva et al. \(1996\)](#) ont également étudié à $\text{pH}=3,5$ et à $\text{pH}=7$, un AF d'origine terrestre en interaction avec l'uranium. Les deux constantes retrouvées sont égales à $\text{Log } K_1=3,93$ et $\text{Log } K_2=4,06$. Ils ont également rapporté d'après l'analyse des ratios d'intensité via le graphique de Stern-Volmer qu'un quenching statique et dynamique s'opérait pour le premier composant à $\text{pH}=3,5$ en observant une courbure croissante du ratio avec l'augmentation de la concentration en uranium. Pour le deuxième composant dont le $\text{pH}=7$, ils ont constaté une linéarité dans le ratio d'intensité et ont donc déduit qu'un quenching statique uniquement était responsable de l'interaction du deuxième composant avec l'uranium. L'étude de [Shin et al. \(2001\)](#) à $\text{pH}=3,5$ par fluorescence synchrone a permis d'établir également deux sites associés à deux constantes de stabilité : $\text{Log } K_1=4,34\pm 0,11$ et $\text{Log } K_2=4,67\pm 0,12$. [Zhu et al. \(2014\)](#) ont étudié par quenching de fluorescence et décomposition CP/PARAFAC cette interaction à $\text{pH}=3,5$. Ils ont trouvé deux composants et ont rapporté les constantes de stabilité de chacun de manière indépendante comme dans notre étude. Le premier a une constante de stabilité égale à $\text{Log } K_1=4,49\pm 0,02$ et le deuxième a une constante de stabilité $\text{Log } K=4,56\pm 0,07$. Ils ont également décrit l'importance que joue le pH dans cette interaction en soulignant le fait qu'il puisse induire un changement dans la fluorescence des SH. L'ion hydrogène entre en compétition avec les groupes carboxyliques et hydroxyles des SH. Ils ont noté qu'à $\text{pH}>3,5$, le système est dominé par la présence de l'hydroxyde qui entre également en compétition avec l'AF pour complexer l'uranyl libre UO_2^{2+} . [Zhu and Ryan \(2016\)](#) ont également rapporté deux constantes de stabilité par modélisation de 1 : 1 et quenching de fluorescence. Ils ont utilisé CP/PARAFAC et RIA (Regional Integration Analysis) qui consiste à séparer la MEEF en cinq régions distinctes pour l'identification des pics. Les deux constantes de stabilité conditionnelles retrouvées pour des AF de Suwannee River sont égales à $\text{Log } K_1=4,36\pm 0,07$ et $\text{Log } K_2=4,09\pm 0,08$.

HITACHI F4500 La décomposition CP/PARAFAC révèle, avec un CORCONDIA de 61%, la présence de deux composants représentés sur la figure 4.51. Le premier fluorophore montre une excitation à 300 nm et une émission à 425 nm et correspond au pic M des substances humiques marines. Le deuxième fluorophore montre une double excitation pour une longueur d'onde d'émission $(\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}})=260\text{--}350/475$ nm. Le pic principal à 350 nm en excitation correspond au pic C relatif aux substances humiques d'origine terrestres et le pic secondaire correspond aux substances humiques de la gamme UV. Cependant, nous observons également une augmentation du signal à fortes concentrations. Il est possible que cette augmentation qu'on observe également dans le cas des AH, soit liée à la fluorescence de l' UO_2^{2+} ou à des colloïdes. Les contributions respectives en fluorescence indiquent des décroissances en intensité de fluorescence de 73% et 28% pour le premier et deuxième composant. La modélisation 1 : 1 fournit des constantes de stabilité égales à $\text{Log } K_1=3,12$ et $\text{Log } K_2=5,08$.

De façon similaire, nous avons procédé à une modélisation plus adéquate pour l'ajustement des points mesurés en tenant en compte l'effet d'écran interne de la fluorescence de l'uranium (cf. figure 4.52)

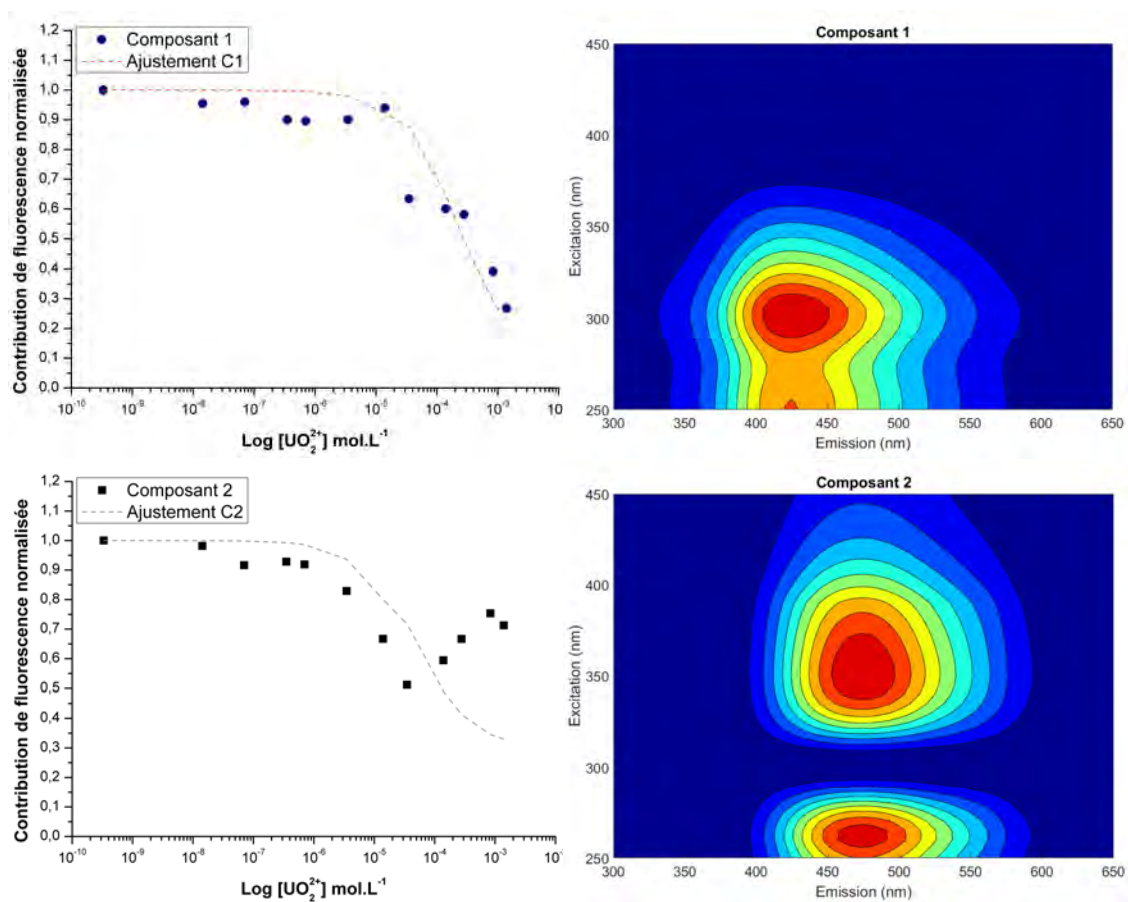


Figure 4.51 – **HITACHI**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–UO₂(II)

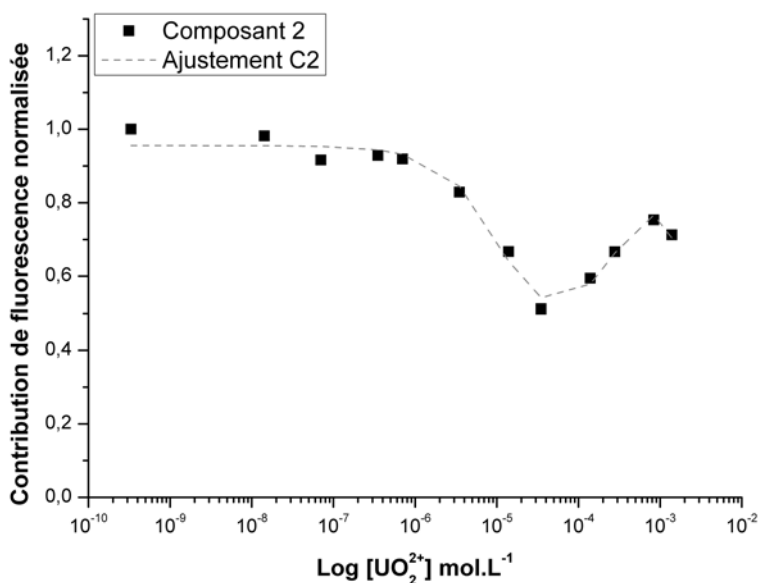


Figure 4.52 – Forme modifiée du modèle 1 : 1 tenant compte de la fluorescence de l'uranium

Composants	HITACHI F4500		TECAN M1000	
	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{ex}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$
Pic 1	300	425	310	410
Pic 2	260–350	475	260–350	475

Tableau 4.29 – Tableau récapitulatif des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'AF-U

TECAN M1000 Le traitement CP/PARAFAC par le TECAN montre également la présence de 2 composants (cf. figure 4.53). Le composant 1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=310/410 nm de la ligne M est relatif aux substances humiques marines. Le composant 2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)=260–350/475 nm montre un pic dans la gamme UV des substances humiques dans la ligne A en tant que pic principal et un pic relatif aux substances humiques d'origine terrestres en tant que pic secondaire. Les contributions spectrales des MEEFs sont représentées sur la même figure à gauche ainsi que leurs modélisations 1 : 1. Les 2 fluorophores indiquent des décroissances en intensité de fluorescence expérimentales importantes de l'ordre de 91 %, 89% pour le 1^{er} et 2^{ème} composant respectivement. La constante de stabilité du premier composant est égale à $\text{Log } K_1=4,09$ et celle du deuxième composant est supérieure et indique une constante de stabilité $\text{Log } K_2=4,29$. En revanche, le premier composant montre les contributions en fluorescence les plus hautes avec les deux spectrofluorimètres. Bien qu'il y ait un léger décalage en excitation et émission du premier composant, nous obtenons pratiquement le même résultat avec les deux spectrofluorimètres en terme de décomposition CP/PARAFAC et les pics identifiés sont rappelés ci-dessous :

Quanta-Ray Le comportement des ratios d'intensité de fluorescence ainsi que celui de l'intensité de fluorescence est manifestement semblable à celui de l'interaction des acides

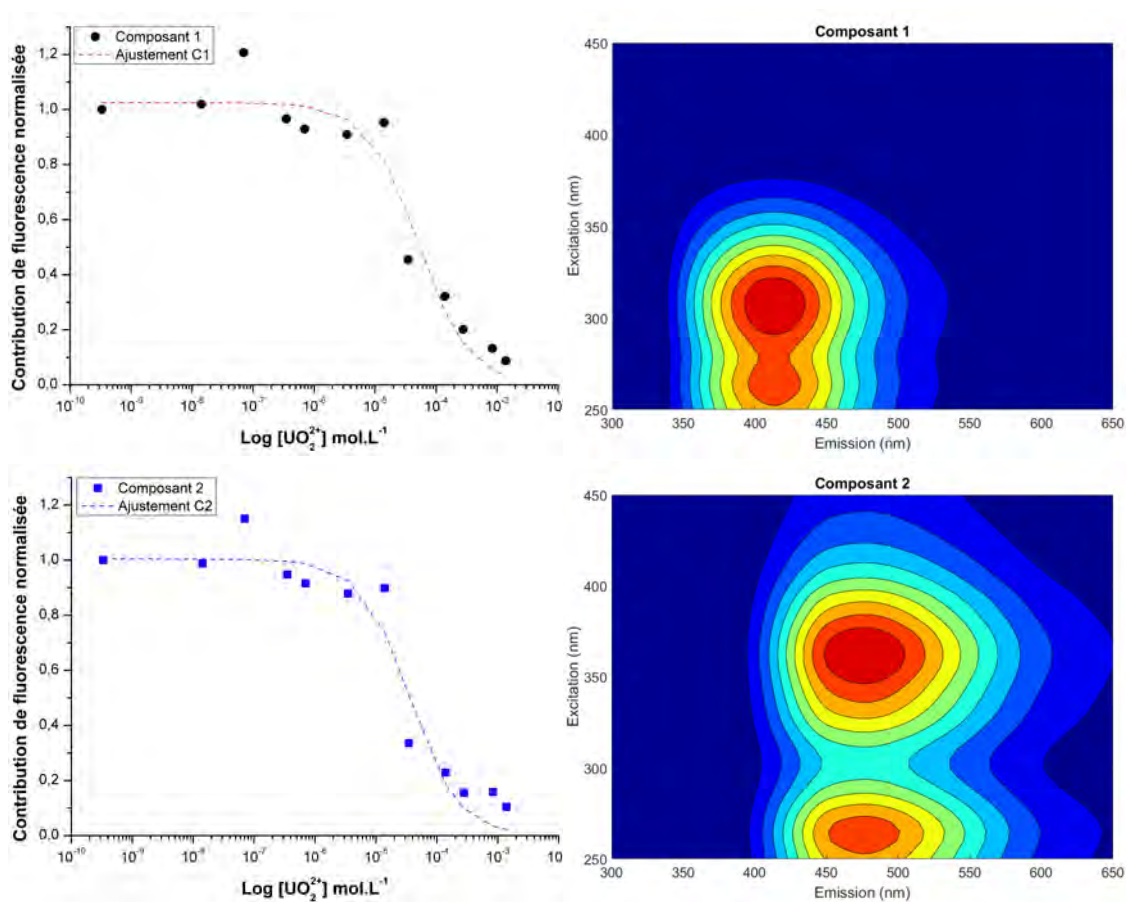
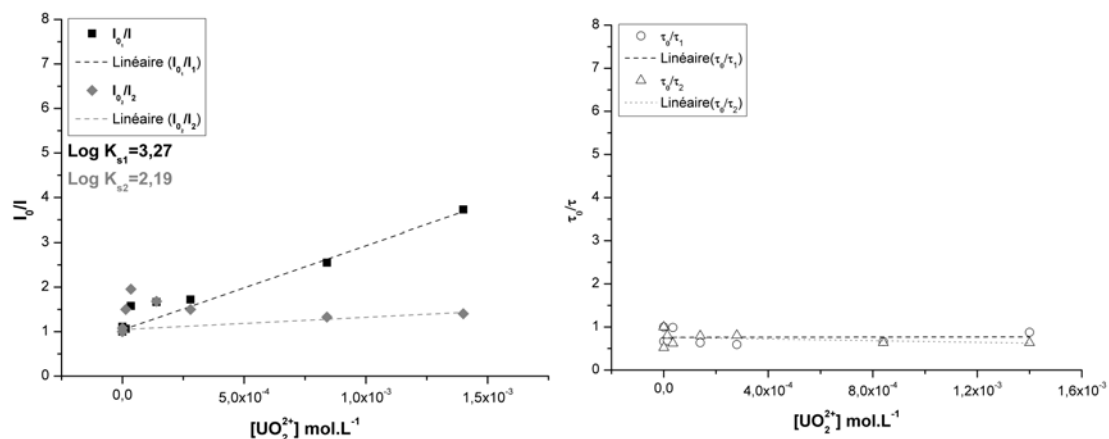


Figure 4.53 – **TECAN**–Contributions spectrales normalisées et matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des composants identifiés après décomposition CP/PARAFAC de l'interaction AF–UO₂(II)

Figure 4.54 – Graphique de Stern–Volmer de l'interaction entre l'AF et l' $\text{UO}_2(\text{II})$

Interaction	Biblio	Spectro	N°Comp.	%Corcondia	Log K	$\tau_{\text{moy},1}(\text{ns})$	$\tau_{\text{moy},2}(\text{ns})$
AF–UO ₂ (II)	Cette étude	HITACHI F4500	2	61,46	3,12/5,08	0,66±0,07	12,28±6,78
		TECAN M1000	2	71,58	4,09/4,29		
		Quanta–Ray		Bi-exp	3,27/2,19		
	da Silva et al. (1996)	Spectrofluorimétrie			3,93/4,06	Q. statique et dynamique	
	Shin et al. (2001)				4,34±0,11/4,67±0,12		
	Zhu et al. (2014)				4,49±0,02/4,56±0,07		
	Zhu and Ryan (2016)				4,36±0,07/4,09±0,08		

Tableau 4.30 – Tableau récapitulatif des résultats de l'AF- $\text{UO}_2(\text{II})$

humiques avec l'uranium. En effet, la déconvolution temporelle nous informe sur une décroissance bi-exponentielle également dans le cas de l'interaction AF- $\text{UO}_2(\text{II})$. Les temps de vie moyen sont égaux à $\tau_1 = 0,66 \pm 0,07$ ns et $\tau_2 = 12,28 \pm 6,78$ ns. La non variabilité des ratios de temps de vie indiquent de façon notable qu'un quenching statique se produit pour les deux composants. La constante de formation du premier temps de vie est déduite directement de la pente du ratio d'intensité de fluorescence et est égale à $\text{Log } K_{s,1} = 3,27$. La seconde constante est calculée à partir de l'équation de Stern–Volmer puisque le ratio d'intensité de fluorescence présente une non-linéarité et est égale à $\text{Log } K_{s,2} = 2,19$. Les deux constantes sont pratiquement similaires à celles retrouvées avec l'HITACHI par modélisation 1 : 1.

Le tableau 4.30 remontre les résultats importants de l'interaction AF- $\text{UO}_2(\text{II})$. Ces constantes de stabilité semblent toutes être supérieures à celles rapportées dans notre étude probablement à cause du pH utilisé. En effet à pH=7 (dans notre expérience), la spéciation de l'uranium est dominée par la présence de l'espèce $\text{UO}_2(\text{OH})^+$ et l'hydroxyle entre en compétition avec les sites de complexation de l'AF.

La figure 4.55 regroupe tous les pics identifiés avec les deux spectrofluorimètres par CP/PARAFAC issus des interactions AF-métaux. Ces pics sont caractérisés par Peak-Picking grâce à l'identification rapportée par Coble (1996). La nature des pics identifiés dépend du métal ajouté. Une fois de plus, les mesures effectuées avec l'HITACHI et le TECAN ne permettent pas de retrouver les mêmes pics après décomposition. Un décalage en longueur d'onde d'émission de 5 nm à 15 nm environ est observé pour l'Al et l'U et un faible

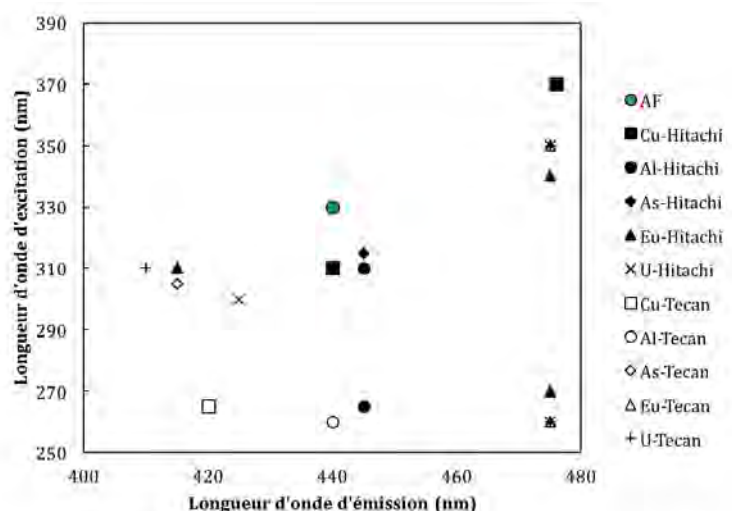


Figure 4.55 – Positions des maxima des spectres issus de CP/PARAFAC à partir des données 3D de l'HITACHI et du TECAN obtenues avec les interactions AF-(Cu/Al/As/Eu et U)

décalage en longueur d'onde d'excitation est observé pour l'Eu. Le Cu et l'As présentent des pics très différents entre les deux appareils.

4.4 Conclusion

Les méthodes d'analyse appliquées ont permis de déduire le type de quenching qui se produit entre les interactions ligands fluorescents et métaux. Les contributions relatives en intensité de fluorescence, les constantes de stabilité ainsi que les temps de vie de fluorescence ont été déterminés et varient selon la MO et le métal étudié.

Les différentes valeurs des constantes de stabilité sont représentées sur les figures ci-dessous. Ces graphiques radar permettent de réaliser une carte d'affinité de l'acide salicylique, l'acide humique et l'acide fulvique avec les différents métaux en terme de constante de stabilité. Une représentation des données du TECAN en graphique radar a également été réalisée et a permis une comparaison plus générale entre les deux appareils. Les données de l'arsenic et de l'uranium pour l'acide salicylique en l'occurrence n'ont pas été calculées à cause des résultats aberrants attribués à de la diffusion (cf. figure 4.56)

Dans le cas de l'AH (cf. figure 4.57), la forme du graphique est pratiquement la même pour les deux appareils malgré la différence dans les identifications des pics. Nous pouvons voir que l'euprécium présente les plus fortes constantes de stabilité avec l'AH et l'arsenic les plus faibles.

Dans le cas de l'AF (cf. figure 4.58), le TECAN reproduit à peu près le même schéma mis à part pour l'arsenic qui, avec l'HITACHI, a montré un quenching de fluorescence en interaction avec l'AF contrairement au TECAN dont la constante de formation est faible à cause de la faible variation d'intensité de fluorescence modélisée.

L'acide salicylique qui a été choisi comme modèle dans notre étude, nous a permis de

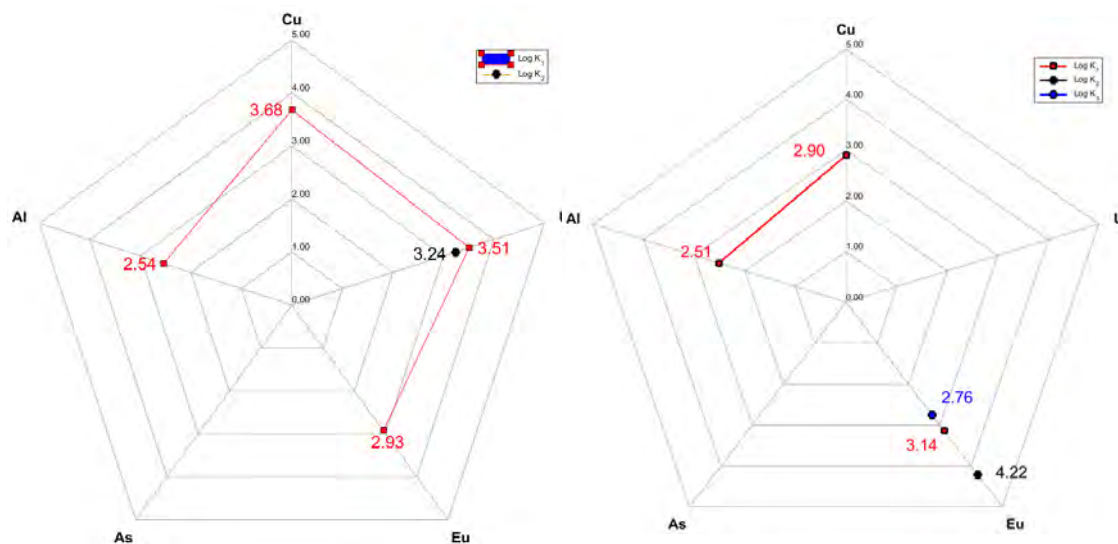


Figure 4.56 – Graphique radar des interactions AS-Métaux

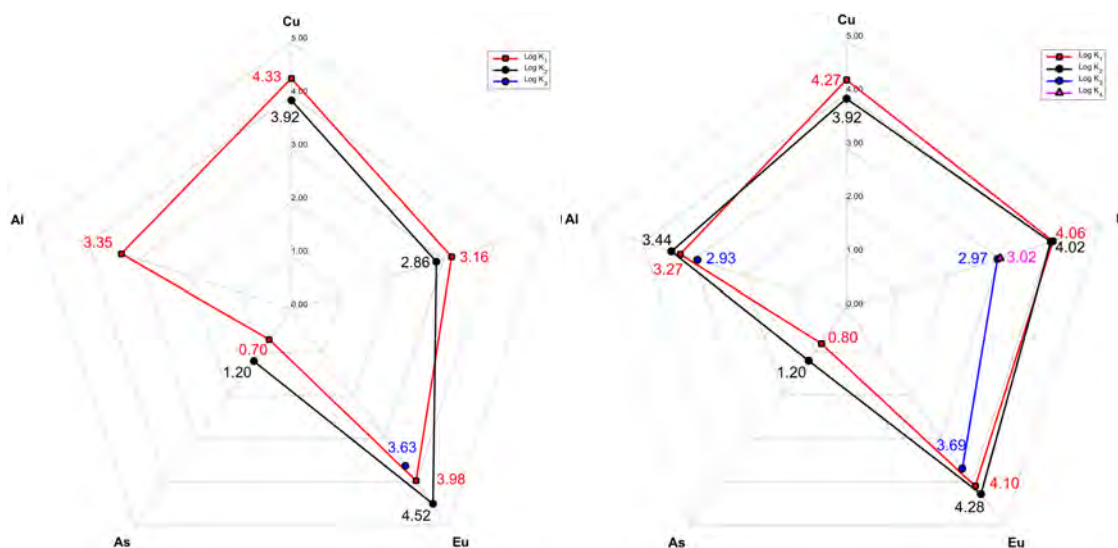


Figure 4.57 – Graphique radar des interactions AH-Métaux

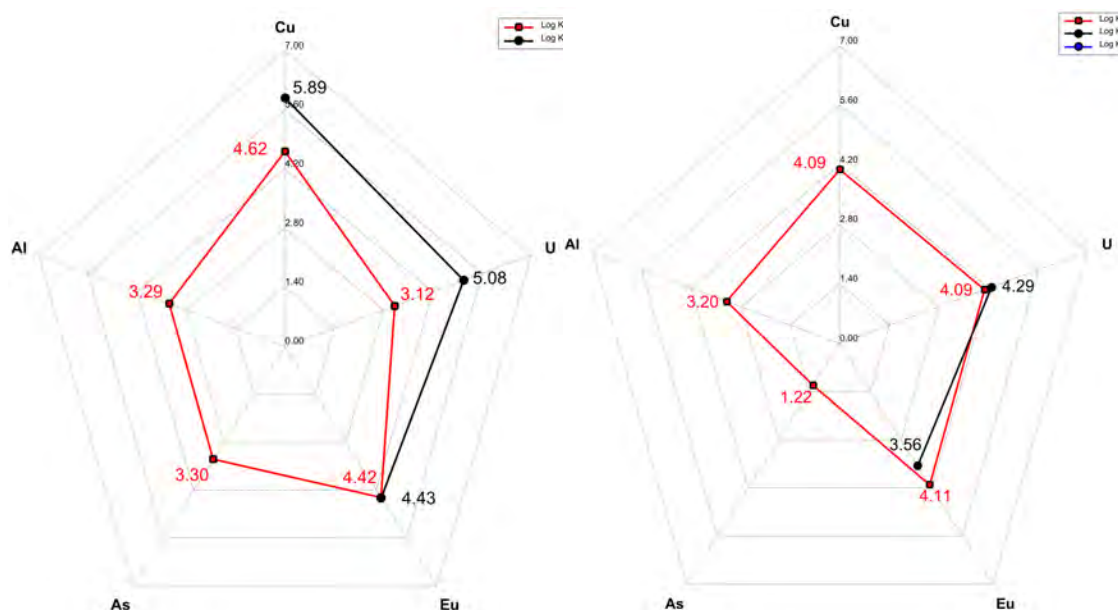


Figure 4.58 – Graphique radar des interactions AF-Métaux

valider nos expériences et les valeurs rapportées sont en bonne corrélation avec la littérature. Nous avons ainsi remarqué que l'AF formait des complexes plus stables que l'AH. En effet, les AF comportent plus d'atomes d'oxygène par unité de masse que les AH, ce qui leur procure un plus grand nombre de groupements carboxyles COOH, hydroxyles OH, aldéhydes et cétones [Schnitzer \(1978\)](#). Ces groupements fonctionnels et notamment les acides carboxyliques sont connus pour leurs propriétés de complexation [Stevenson and Fitch \(1986\)](#). Nous avons également remarqué quelques problèmes liés aux différentes mesures entre l'HITACHI et le TECAN en terme d'identification de pics. Ces différences peuvent être liées à la sensibilité des appareils ou à la différence dans le protocole expérimental et le matériel. Une autre hypothèse serait la présence d'une contamination malgré le nettoyage entre chaque mesure. Les expériences de temps de vie calculés par déconvolution temporelle ont souvent révélé une décroissance bi-exponentielle et les temps de vie de fluorescence rapportés se situent entre 0,60 ns et 14,15 ns et sont comparables aux temps de vie d'AH et d'AF de la littérature qui varient entre 0,42 ns et 10 ns [Lochmuller and Saavedra \(1986\)](#); [Clark et al. \(2002\)](#). Le tableau ci-dessous résume tous les résultats des interactions SH-métaux ainsi que les valeurs minimales et maximales des constantes de stabilité et du pourcentage de quenching. Le nombre de site et le type de quenching qui se produit sont également rapportés.

Acide salicylique								Acide humique								Acide fulvique							
	N° de sites	Log K		% Quenching		Type de Quenching	C _L		N° de sites	Log K		% Quenching		Type de Quenching	C _L		N° de sites	Log K		% Quenching		Type de Quenching	C _L
		min	max	min	max					min	max	min	max					min	max	min	max		
Cuivre	1	2,90	3,68	70%	75%	statique	6,30.10 ⁻⁷	2	3,92	4,43	80%	97%	statique	5,83.10 ⁻⁶ 5,74.10 ⁻⁶	2	3,92	4,16	66%	94%	statique		6,34.10 ⁻⁵	
Aluminium	1	2,04	2,54	15%	45%	statique	3,37.10 ⁻⁶	3	2,93	3,44	69%	88%	statique	4,83.10 ⁻⁶	1	3,29	3,33	70%	70%	statique		4,79.10 ⁻⁵	
Arsenic	1	–	–	–	–	statique	–	2	0,70	1,44	6%	15%	statique	5,83.10 ⁻⁶ 4,74.10 ⁻⁶	1	1,22	3,30	4%	69%	–		5,25.10 ⁻⁵	
Europium	3	2,66	4,22	45%	82%	statique & dynamique	9,83.10 ⁻⁷	3	3,63	4,52	50%	94%	statique	4,65.10 ⁻⁶ 5,22.10 ⁻⁶ 5,99.10 ⁻⁶	2	3,56	4,43	83%	94%	statique		1,49.10 ⁻⁵ 3,78.10 ⁻⁵	
Uranium	4	3,24	3,61	77%	80%	statique	1,15.10 ⁻⁶	4	2,81	4,06	50%	75%	statique	1,32.10 ⁻⁵ 3,12.10 ⁻⁵	2	2,19	4,29	28%	91%	statique		1,14.10 ⁻⁵ 1,02.10 ⁻⁵	

Première partie

Article

Article publié dans Spectrochimica Acta part A : Molecular and Bimolecular Spectroscopy

*"La persévérance est la compagne du
vrai courage ; l'obstination est le
partage de l'ignorance."*

Isocrate



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Time-resolved laser fluorescence spectroscopy of organic ligands by europium: Fluorescence quenching and lifetime properties

A. Nouhi^{a,*}, H. Hajjoul^a, R. Redon^a, J.P. Gagné^b, S. Mounier^a^a Laboratoire PROTEE, Université de Toulon, Toulon Cedex 9 CS 60584-83041, France^b Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2017

Received in revised form 13 November 2017

Accepted 4 December 2017

Available online 8 December 2017

Keywords:

Fluorescence quenching

Europium (III)

Natural organic matter

Complexation

Time-resolved laser-induced fluorescence

spectroscopy

Parallel factor analysis

Lifetime analysis

ABSTRACT

Time-resolved Laser Fluorescence Spectroscopy (TRLFS) has proved its usefulness in the fields of biophysics, life science and geochemistry to characterize the fluorescence probe molecule with its chemical environment. The purpose of this study is to demonstrate the applicability of this powerful technique combined with Steady-State (S-S) measurements. A multi-mode factor analysis, in particular CP/PARAFAC, was used to analyze the interaction between Europium (Eu) and Humic substances (HSs) extracted from Saint Lawrence Estuary in Canada. The Saint Lawrence system is a semi-enclosed water stream with connections to the Atlantic Ocean and is an excellent natural laboratory. CP/PARAFAC applied to fluorescence S-S data allows introspecting ligands–metal interactions and the one-site 1:1 modeling gives information about the stability constants. From the spectral signatures and decay lifetimes data given by TRLFS, one can deduce the fluorescence quenching which modifies the fluorescence and discuss its mechanisms. Results indicated a relatively strong binding ability between europium and humic substances samples (Log K value varies from 3.38 to 5.08 at pH 7.00). Using the Stern-Volmer plot, it has been concluded that static and dynamic quenching takes places in the case of salicylic acid and europium interaction while for HSs interaction only a static quenching is observed.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Improved insight on the interactions between natural dissolved organic matter with lanthanides and actinides has been widely studied [1–13]. Indeed, it is of paramount importance to better understand transport and toxicity pathways of metal ions as well as creating efficient remediation techniques for contaminated environments [14–18]. Various spectroscopic techniques are used for these purposes. Fluorescence spectroscopy in S-S measurements provides quantitative and qualitative information. However, more data such as fluorescence lifetime measurements could be gathered using TRLFS. In fact, TRLFS is a convenient technique when dealing with different elements in the same sample because it can offer the spectral and temporal resolution together with its high sensitivity. The discriminating capability of TRLFS relies on the fact that the different chemical species between organic matter and a fluorescent metal ion can have different decay lifetimes and spectral shapes which is adequate for the study of such a complex system [19]. The

greatest advantages of TRLFS are its relatively low detection limit and good discriminating capability for different chemical species.

An assessment of the influence of HSs on the mobility of Eu in the environment is necessary and has to include knowledge of stability constants for the formation of Ln(III)–HSs complexes. In this work, complexation of Eu^{3+} by Humic Acids (HA) and Fulvic Acids (FA) from St. Lawrence Estuary (Canada) was first studied by fluorescence quenching using Excitation Emission Matrices of fluorescence (EEMs) with a large range of europium concentration. Metal additions were performed using logarithmic increments to cover a wide range of concentration from 2.2×10^{-7} to 1.5×10^{-3} M. The obtained data was treated by CP/PARAFAC to extract the different fluorescent components using a MATLAB® home-made program [20,21]. Then a fitting based on the one-site model (1:1) [22] was done on the CP/PARAFAC components to determine their stability constants. TRLFS is a complementary technique to determine the composition of the mixtures by measuring the fluorescence lifetimes and see its variation with the metal addition. Fluorescence properties of Eu(III) with Salicylic Acid (SA) and HSs complexes were studied from Eu(III) site [6,10–12,23–28] and also from the ligand site, but only for SA [29]. Analysis of the literature has shown that data of humic substances complexes with Eu(III) from the ligand site is still lacking. As a matter

* Corresponding author.

E-mail address: nouhi@univ-tln.fr (A. Nouhi).

of fact, it raises some interesting questions that have not been discussed before. Therefore, with this study, we wanted to investigate how these interactions occur focusing on the HSs fluorescence emission. Analysis of fluorescence lifetimes and Stern-Volmer plots [30] will give reliable information on the quenching process that takes place. This line of study is important to settle a general relationship between organic matter properties from St. Lawrence Estuary and static/dynamic quenching contributions.

2. Experimental Setup

2.1. Sample Preparation

The complexation of Eu(III) by SA was first studied in order to calibrate our assays and compare our results with literature [29]. Indeed, the compositions of HSs are complex and partly unknown. The HSs are composed of a complex mixture of organic and organomineral compounds and can differ depending on its type. Therefore, SA provides a carboxyl and hydroxyl group that mimic the important functionalities of HSs [31] and form strong complexes with Eu(III) [27].

Salicylic acid (NormaPur®, Prolabo) was used as received. Its aqueous solution was prepared at a concentration of 5×10^{-4} M with UHQ water. HA and FA were obtained from the St. Lawrence Estuary [32] following the IHSS protocol [33].

Europium standard ($1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in 2% HNO_3 , SPEX CertiPrep) was used as a quencher without further purification.

Twelve solutions with different concentrations of Eu(III) were prepared by mixing the stock solutions in a 1 cm quartz cell. The final concentrations of SA, HA and FA were kept constant at respectively 5×10^{-5} M, 11 and 16 mg of matter per liter. Eu(III) was added using logarithmic increments of concentrations from 2.2×10^{-7} M to 1.5×10^{-3} M. Every sample was allowed to equilibrate for at least 15 min and no precipitation was observed at higher europium concentration. The pH of the samples was adjusted to 7.00 ± 0.09 using 1 mL of HEPES buffer (0.1 M). HEPES was used to maintain the pH constant and avoid pH adjustment for each sample. Preliminary measurements without metal additions were done to verify that there is no interaction between the fluorescent ligands and the HEPES buffer. The results did not show any variation of the fluorescence intensity. Thus, no interaction between the HEPES buffer and ligands was observed. Moreover, the HEPES is known to not interact with metals [34]. A total volume of 3 mL was achieved by adding UHQ water. Necessary pH adjustments of metal solutions were done with NaOH (1 M) and HCl (1 M) and the changes in the volume were taken into account.

2.2. Fluorescence and Lifetime Measurements

Two series of experiments were done on the prepared samples. In order to perform S-S measurements, a spectrophotometer (HITACHI F4500) equipped with a Xenon lamp (450 W) and connected to a computer was used. Twelve individual EEMs gathered from S-S measurements of SA, HA, and FA were collected in fluorescence quenching experiments. The excitation wavelength range was from 250 nm to 450 nm with a 10 nm slit and 5 nm excitation step. The corresponding emission wavelengths were collected at 5 nm step between 300 nm and 700 nm and 10 nm slit. The scan speed was set at $2400 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ and the photomultiplier tension was at 700 V.

TRLFS data was carried out using a pulsed Nd:YAG laser (Quanta-Ray INDI, Spectra Physics) and performed at room temperature (294 K). The Nd:YAG source provides an excitation with a pulse width of 5 ns and a repetition rate of 20 Hz. The excitation source for TRLFS was the third harmonic generation (355 nm) and the fluorescence emission was collected at 90° through a bundle made of 16 optical

fibers of 200 μm into the entrance slit of a Czerny-Turner spectrograph (TRIAX 180, Horiba Jobin-Yvon). The latter has three UV-VIS gratings (300 g/mm, 900 g/mm and 2400 g/mm). The spectral resolutions were respectively 0.27 nm, 0.09 nm and 0.034 nm. The second grating was used for these experiments.

The fluorescence signal was detected by an intensified couple charged device camera (ICCD 300V, Horiba Jobin-Yvon). For the time-resolved measurements, the initial timing of the fluorescence signal was varied by changing the delay of the trigger through a pulse generator (DG535, Stanford Research System). In order to increase the accuracy of the measurements, each laser pulse was corrected in energy fluctuation by splitting the laser beam through a pyroelectric sensor (PE10, Ophir Electronics). The power of pulse was constant within around 3–5 μJ pulse during the acquisition. Seven hundred spectra were accumulated at each time step of 0.2 ns and a time delay of 200 ns with a 35 ns gate width. These parameters were set to measure the fluorescence focusing on the ligand fluorescence emission.

Every mixture was allowed to equilibrate for at least 10 min and bubbled by a nitrogen flux to avoid photobleaching.

2.3. Data Treatment

For S-S data treatment, CP/PARAFAC algorithm was used to determine the contribution of components to the EEMs by separating independent sources after elimination of scattering phenomena [20]. The first step of decomposition consists of cleaning all EEMs from the diffusion signals (Rayleigh and Raman) by cutting the Rayleigh diffusion bands (20 nm) and applying the Zepp procedure [35]. No inner effect was encountered because chosen concentrations were in the linear zone of fluorescence. Dilution curves were done to determine these value (data not shown). Thus, no numerical correction was applied to the EEMs. The estimation of the number of components is particularly critical because users have to test a range of model to evaluate the best number of components. In this study, it was defined by evaluating the CORCONDIA score. Decomposition investigation was done from 1 to 4 components and the number of component giving a CORCONDIA score higher than 60% was selected as optimal model. Iterations and number of runs were implemented until the algorithm converged.

The optimization between experimental and calculated fluorescence using one-site model with one ligand [22] was executed by evaluating the bias errors. The bias is equal to the sum of the square of the subtraction between the experimental fluorescence intensity and the calculated fluorescence intensity.

Data obtained with TRLFS were analyzed using a home-made MATLAB® program. The evaluation of the best fitting of the integrated fluorescence intensity was done by time deconvolution to determine fluorescence amplitudes and fluorescence lifetimes. Supposing a system excited by an infinitely sharp pulse of light (δ -function) and assuming the response to be linear, the measured fluorescence decay is given by the convolution integral:

$$y(n) = h(n) \otimes \text{IRF} \quad (1)$$

where $h(n)$ is the intrinsic fluorescence decay and IRF is the Instrument Response Function. Experimentally, the IRF is gathered by measuring only the solvent diffusion.

The estimation of $h(n)$ was achieved by time deconvolution in order to obtain the amplitudes of each fluorophore and lifetimes. Assuming a multi-exponential decay as follow:

$$h(n) = \sum_i \alpha_i \exp^{-t/\tau_i} \quad (2)$$

The amplitudes α_i and the lifetimes τ_i can be considered to be adjustable parameters. They are calculated employing Simplex algorithm minimizing the error of the equation:

$$[y(n) - y'(n)] = \varepsilon(n). \quad (3)$$

It is known that quenching can occur by different mechanisms. Dynamic quenching occurs when the excited-state fluorophore is deactivated upon contact with other molecules in solutions due to physical collision [30]. In this case, the fluorophore returned to the ground-state during a diffusive encounter with the quencher. The molecules are not chemically modified in the process and can be shown by the Stern-Volmer Eq. (4).

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_Q[Q] \quad (4)$$

where I_0 and I_Q are the fluorescence intensities in the absence and presence of quencher respectively, τ_Q is the fluorescence lifetime in the presence of metal, K_{SV} is the Stern-Volmer quenching constant and k_q is the bimolecular quenching constant.

If dynamic quenching takes place, the intensity of fluorescence and lifetime follows the relationship:

$$\frac{I_0}{I_Q} = \frac{\tau_0}{\tau_Q}. \quad (5)$$

In this expression, τ_0 is the fluorescence lifetime in the absence of quencher. It is noteworthy that dynamic quenching is a time-dependent process.

Aside from collisional quenching, fluorescence quenching can occur due to a complex formation. Fluorophores can form non-fluorescent complexes with quenchers [30]. This process is referred to as static quenching since it occurs at ground-state and does not rely on diffusion or molecular collisions. The dependence of the fluorescence intensity upon quencher concentration is given by the following expression

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + K_S[Q] \quad (6)$$

where K_S is the association constant of the complex.

Note that the I_0/I_Q on $[Q]$ is linear, which is identical to dynamic quenching. Hence, the measurement of fluorescence lifetimes is the most ultimate method to distinguish static and dynamic quenching.

3. Results & Discussions

3.1. Steady-state and Fluorescence Quenching Results

The CP/PARAFAC decomposition of SA-Eu³⁺ quenching experiment shows that two components are obtained in this interaction (Fig. 1). The first component ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) = 295/410 nm shows a fluorescence intensity and is obviously the excitation/emission wavelength of SA [36] whereas, the second component does not show any fluorescence intensity variation (Fig. 2 A) nor fluorescence peak. Thus, the peak could be a noise factor and was not considered in the following discussion.

The relative contributions of each components of SA-Eu³⁺ interaction are shown in Fig. 2A, indicating the quenching of SA depending on the Eu³⁺ concentration. The corresponding conditional stability constant (K value) for the first component is reported in Table 1 and was estimated as $\text{Log } K_{SA} = 3.38$ based on the 1:1 complexation assumption between metal and ligand. This value is higher than $\text{Log } K = 2.08 \pm 0.02$ obtained by Aoyagi et al. [29] at pH

4 from the slope of the intensity Stern-Volmer plot and higher than $\text{Log } K = 2.02 \pm 0.05$ obtained by Hasegawa et al. [24] at pH 6 from the glass electrode method. The stability constant of SA-Eu³⁺ found in this study is consistent considering that the stability constant should increase when pH increases.

As for the extracted humic substances, the presence of abundant aromatic structures in organic matter provides reasonably good fluorescence characteristics. CP/PARAFAC decomposition of the EEMs obtained in the case of HA interaction with Eu³⁺ suggests the presence of three components (Fig. 1B). The first component in the UV range is located at ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) = 270/445 nm, and has been designated as peak A. It was attributed to humic substances [37]. The relative contribution of this component to the EEMs during the quenching experiment is shown in Fig. 2B and the corresponding stability constant is $\text{Log } K_{HA,C_1} = 4.43$ (Table 1). The second component ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) = 270/505 nm shows a longer emission wavelength characteristic of a higher conjugated structure usually found in soils. This component behaves similarly to component 1 (Fig. 2B) and has the higher stability constant ($\text{Log } K_{HA,C_2} = 5.08$). The third component ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) = 250/395 nm is more relative to the protein-like structures and presents a weaker quenching effect. This means that the related fluorescent chemical functions are less affected by europium or less complexing. This is demonstrated by the lowest stability constant value $\text{Log } K_{HA,C_3} = 3.63$. In comparison, Wei et al. [38] reported two stability constants using synchronous fluorescence spectroscopy. Their constants at pH 6 are higher than found in our study: $\text{Log } K_1 = 5.51$ and $\text{Log } K_2 = 5.60$. However, the value reported by Hahn et al. [39] using ultrafiltration and CE-ICP-MS at pH = 5.00 ± 0.05 seems to be also higher than ours: $\text{Log } K = 6.36 \pm 0.02$ and $\text{Log } K = 6.1 \pm 0.1$. This work clearly shows that several fluorescent sites complex the europium in this particular HA from St. Lawrence estuary. More investigation should be done to compare the data, in particular for the pH conditions.

For the FA, two components were found by CP/PARAFAC showing an interesting fluorescence quenching (Fig. 2 C) The first component (Fig. 1 C) located at ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) = 310/415 nm is generally another marine humic-like component and is designated as peak M [37]. The second component ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) = 265/475 nm is larger and is designated as peak A [37] with a slight red shift in emission. The corresponding fluorescence intensities are given in Fig. 2 C showing a homogeneous and similar behavior of both components. This is demonstrated by the values of the stability constants respectively $\text{Log } K_{FA,C_1} = 4.42$ and $\text{Log } K_{FA,C_2} = 4.43$ of the first and second component. The study of Chung et al. [40] reported a stability constant at pH 5 equal to 6.4 ± 0.2 for FA-Eu(III) interaction using synchronous fluorescence spectroscopy. This value is higher than our stability constant. This data is in good agreement with an other published work: $\text{Log } K = 6.00 \pm 0.10$ [41]. Furthermore, Lead et al. [42] reported only one stability constant at a pH between 2.5 and 3.5: $\text{Log } K = 2.36 \pm 0.13$ much like Wei et al. [38]: $\text{Log } K = 5.84$. The values of the stability constants found in the literature are higher due to the fact that the fulvic acids studied are mainly derived from soils or rivers and may have greater complexing capacities than the fulvic acids used in this study.

3.2. TRLFS Results

As mentioned above in Section 2.3, the quenching process cannot be assessed using steady-state measurements. Therefore, fluorescence lifetime measurements using TRLFS are the most ultimate method to distinguish whether static, dynamic or both quenching processes occur based on Stern-Volmer plots [30].

After S-S quenching experiments, eight samples out of twelve from the quenching curves were selected for lifetime measurement, because of the time required for each measure. The first sample does

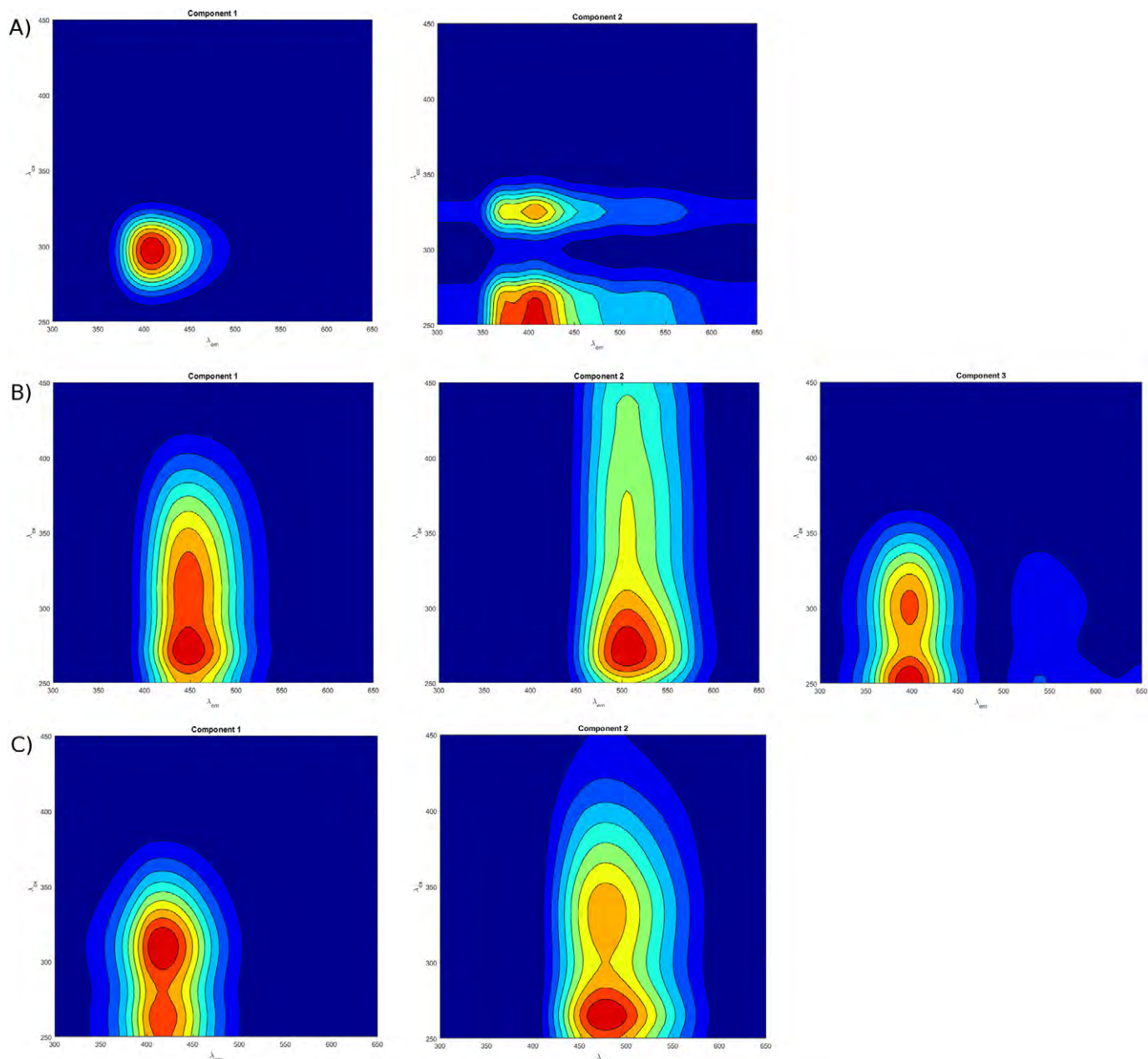


Fig. 1. Components obtained for A) Salicylic acid–Eu³⁺ B) Humic acid–Eu³⁺ and C) Fulvic acid–Eu³⁺ interaction after CP/PARAFAC decomposition.

not contain any concentration of Eu³⁺ while the seven other samples contain an increasing volume of it at a concentration varying from 2.2×10^{-5} M to 2.2×10^{-3} M.

For the interaction between SA and Eu³⁺, the decay was found to be mono-exponential. The average lifetime τ_a recorded was 2.97 ± 0.2 ns. In Fig. 3 A, I_0/I_Q and τ_0/τ_Q are shown as a function of the concentration of Eu³⁺. The solid red line shows the linear regression of the Stern-Volmer plot intensity for I_0/I_Q and τ_0/τ_Q . The value of the lifetime ratio seems to be dependent on metal addition. This indicates that the observed quenching involves a dynamic quenching process or a mix of static and dynamic quenching, as the I_0/I_Q and τ_0/τ_Q should have the same slope in case of pure dynamic process [30]. On the other hand, Aoyagi et al. [29] found a fluorescence lifetime equal to 2.02 ± 0.01 ns and a static quenching occurring for SA–Eu³⁺ interaction. This discrepancy could be due to the pH value as they worked at pH 4.

For HA–Eu³⁺ interaction, CP/PARAFAC decomposition gives three components while the time deconvolution suggests a bi-exponential decay and two lifetimes denoted by exponent indexes τ^A and τ^B . One very short, indicated by τ_0^A/τ_Q^A in Fig. 3 B and the second one, specified by τ_0^B/τ_Q^B , longer than the first one (11.33 ns). The two fluorescence lifetimes turned out to be independent on total concentration of Eu³⁺. This suggests a static quenching. The dependence of I_0/I_Q of component 1 and component 2 on [Eu³⁺] is therefore non-linear. In the case of static and dynamic quenching, the characteristic feature of the Stern-Volmer plot is an upward curvature, concave towards the y-axis. The concave pattern of the Stern-Volmer plot is interpreted as the manifestation of fluorophores that are not accessible for quenching [30]. Thus, the data cannot be accurately fitted using the linear Stern-Volmer Eq. (4) in this situation. However, Reiller and Brevet [43] observed a bi-exponential decay for the luminescence of Eu(III)–HSs complexes and reported a deactivation of at

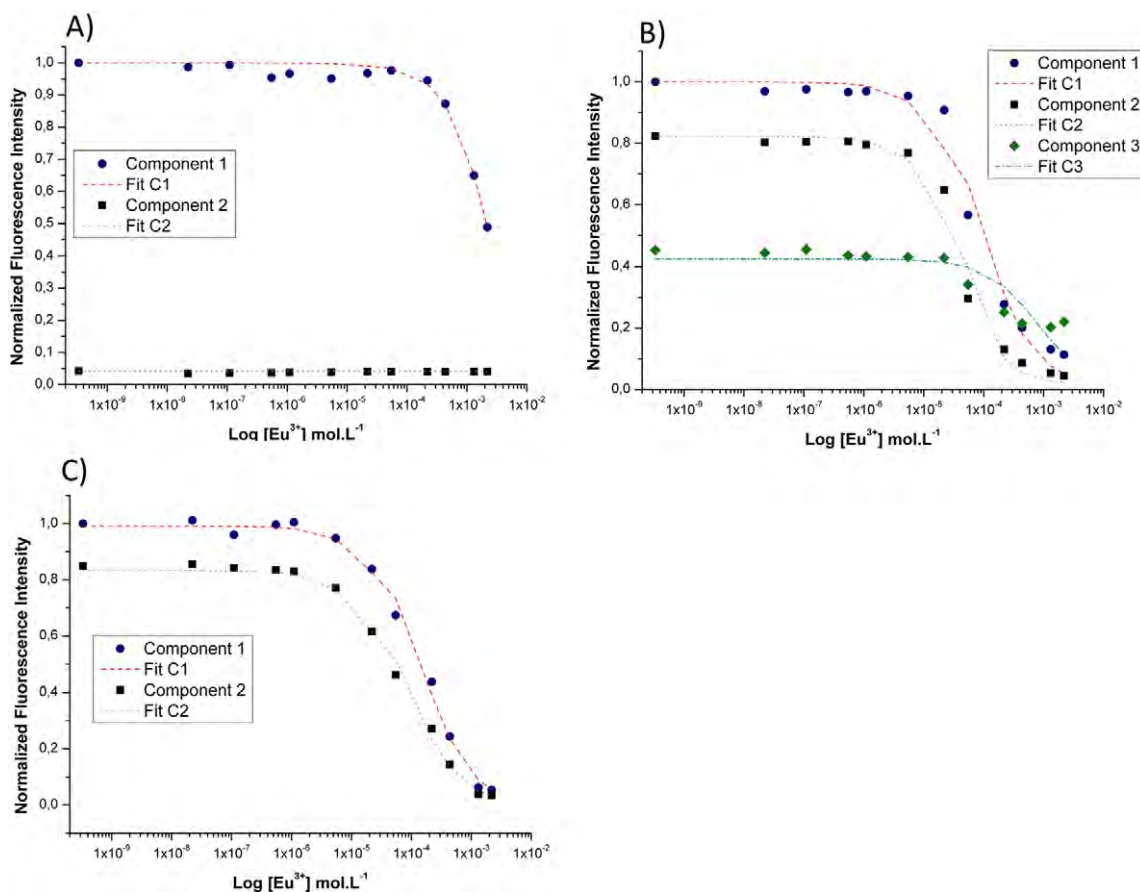


Fig. 2. Variation of the CP/PARAFAC components contributions to the EEMs of A) Salicylic acid B) Humic acid and C) Fulvic acid as a function of Eu^{3+} concentration. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

least two different excited-states from Eu(III) site. The reported values of fluorescence lifetime cannot be compared to our study since they measured the fluorescence lifetime values from Eu(III) site.

The intensity ratios of the fulvic acid with Eu^{3+} in Fig. 3C seem to be linear except the penultimate point which could be attributed to an error in the measurement. According to Tiseanu et al. [6], the existence of a tri-modal decay time distribution with time values centered around 0.7, 3 and 11 ns were reported. In this study, we found abi-exponential time decay. The first average decay time component (0.7ns) referred to as τ_0^A/τ_Q^A may be assumed as typical for FA of different origins [44] and similar to Tiseanu et al. [6]. The second lifetime indicated by τ_0^B/τ_Q^B in Fig. 3C is around 12 ns and is similar too to the literature. In the presence of Eu^{3+} , the dependency of the relative amplitudes of the fluorescence decay of FA was almost unchanged showing a longer decrease for the shorter lifetime and a great increase for the longer lifetime. The resulting plot is linear and can be fitted using the linear Stern-Volmer equation. The invariance of the decay time values of the FA upon metal addition was not

related to energy transfer between FA singlet states and the Eu^{3+} . Quenching of FA fluorescence induced by Eu^{3+} thus indicates a static quenching. The previous study [6] also reported a static quenching in the case of FA– Eu(III) interaction.

4. Conclusion

In this work, the interactions of salicylic acid, humic acid and fulvic acid with Eu^{3+} were studied by steady-state and time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy focusing on the ligand fluorescence emission using a nanosecond pulsed laser. Lifetime analysis using Stern-Volmer plot showed that part of dynamic quenching process or both static and dynamic quenching contributed to the global quenching of fluorescence in the case of salicylic acid– Eu^{3+} interaction. Data obtained is not exactly in agreement with literature [29] since they found a static quenching in the case of SA– Eu(III) interaction. This discrepancy with SA should be investigated at different pH to define precisely the quenching process dependence on pH. Static quenching process took place for humic acid and fulvic acid extracted from St. Lawrence Estuary. Tiseanu et al. [6] also found a static quenching in the case of FA– Eu(III) interaction, which is in a good agreement with our study. The stability constants of all the interactions studied were calculated using the one-site 1:1 model and are in concordance with literature for SA and HA. For FA, we found constants slightly lower than those in the literature which may be due to the origin of FA. It is noteworthy that TRLFS successfully discriminates the fluorescence quenching process that takes place and gives original lifetimes of HSs and constant of complexation with

Table 1
Stability constants and average fluorescence lifetimes of SA and HSs complexed with Eu^{3+}

	$\text{Log } K_{SA}$	$\text{Log } K_{C1}$	$\text{Log } K_{C2}$	$\text{Log } K_{C3}$	τ_a^A ns	τ_a^B ns
SA	3.38	–	–	–	2.97	–
HA	–	4.43	5.08	3.63	0.61	11.33
FA	–	4.42	4.43	–	0.73	12.54

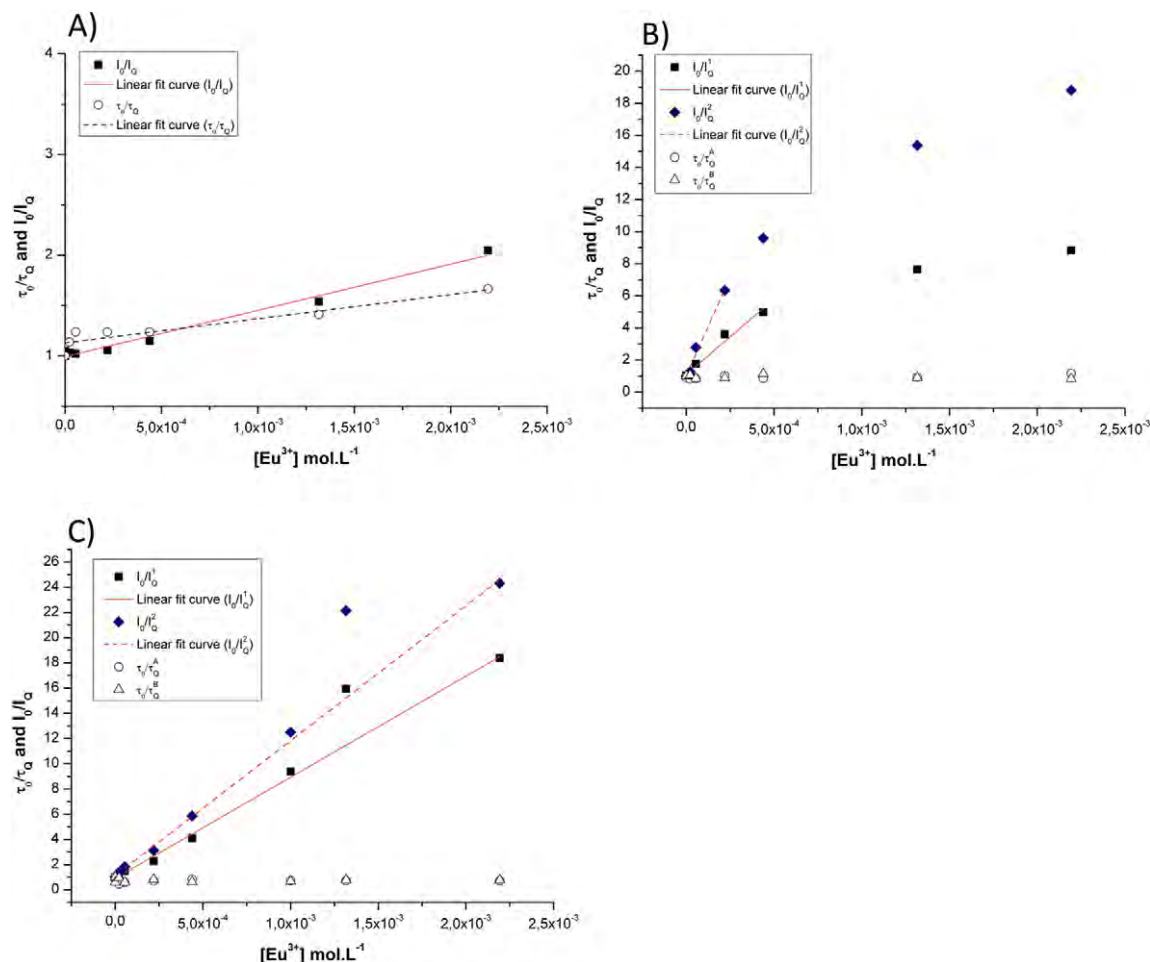


Fig. 3. Stern-Volmer plot showing the intensities ratio and the fluorescence lifetimes ratio of A) Salicylic acid–Eu³⁺, B) Humic acid–Eu³⁺ and C) Fulvic acid–Eu³⁺ interactions. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

Eu(III). Further application can be extended to quantitatively analyze other lanthanides and actinides.

References

- [1] J. Kim, G. Buckau, E. Bryant, R. Klenze, Complexation of americium (III) with humic acid, *Radiochimica Acta* 48 (3–4) (1989) 135–144.
- [2] C. Moulin, P. Decambox, P. Mauchien, V. Moulin, M. Theyssier, On the use of laser-induced time-resolved spectrofluorometry for interaction studies between organic matter and actinides: application to curium, *Radiochim. Acta* 52 (1) (1991) 119–126.
- [3] J. Kim, D. Rhee, H. Wimmer, G. Buckau, R. Klenze, Complexation of trivalent actinide ions (Am³⁺, Cm³⁺) with humic acid: a comparison of different experimental methods, *Radiochim. Acta* 62 (1–2) (1993) 35–44.
- [4] P. Panak, R. Klenze, J. Kim, A study of ternary complexes of Cm (III) with humic acid and hydroxide or carbonate in neutral pH range by time-resolved laser fluorescence spectroscopy, *Radiochim. Acta* 74 (s1) (1996) 141–146.
- [5] K. Czerwinski, J. Kim, D. Rhee, G. Buckau, Complexation of trivalent actinide ions (Am³⁺, Cm³⁺) with humic acid: the effect of ionic strength, *Radiochim. Acta* 72 (4) (1996) 179–188.
- [6] C.-D. Tiseanu, M. Kumke, F. Frimmel, R. Klenze, J. Kim, Time-resolved fluorescence spectroscopy of fulvic acid and fulvic acid complexed with Eu³⁺: a comparative study, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 117 (3) (1998) 175–184.
- [7] M. Morgenstern, R. Klenze, J. Kim, The formation of mixed-hydroxo complexes of Cm (III) and Am (III) with humic acid in the neutral pH range, *Radiochim. Acta* 88 (1) (2000) 7–17.
- [8] J.-M. Monsallier, R. Artinger, M.A. Denecke, F.J. Scherbaum, G. Buckau, J.-I. Kim, Spectroscopic study (TRLFS and EXAFS) of the kinetics of An (III)/Ln (III) humate interaction, *Radiochim. Acta* 91 (10) (2003) 567–574.
- [9] K. Schmeide, T. Reich, S. Sachs, G. Bernhard, Plutonium (III) complexation by humic substances studied by X-ray absorption fine structure spectroscopy, *Inorg. Chim. Acta* 359 (1) (2006) 237–242.
- [10] J. Brevet, F. Claret, P.E. Reiller, Spectral and temporal luminescent properties of Eu (III) in humic substance solutions from different origins, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 74 (2) (2009) 446–453.
- [11] A. Jain, K. Yadav, M. Mohapatra, S. Godbole, B. Tomar, Spectroscopic investigation on europium complexation with humic acid and its model compounds, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 72 (5) (2009) 1122–1126.
- [12] S. Lukman, T. Saito, N. Aoyagi, T. Kimura, S. Nagasaki, Speciation of Eu³⁺ bound to humic substances by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) and parallel factor analysis (PARAFAC), *Geochim. Cosmochim. Acta* 88 (2012) 199–215.
- [13] J.L. Pacold, D.S. Tatum, G.T. Seidler, K.N. Raymond, X. Zhang, A.B. Stickrath, D.R. Mortensen, Direct observation of 4f intrashell excitation in luminescent Eu complexes by time-resolved X-ray absorption near edge spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (11) (2014) 4186–4191.
- [14] M. Hiraide, Heavy metals complexed with humic substances in fresh water, *Anal. Sci.* 8 (4) (1992) 453–459.
- [15] A. Dube, R. Zbytniewski, T. Kowalkowski, E. Cukrowska, B. Buszewski, Adsorption and migration of heavy metals in soil, *Pol. J. Environ. Stud.* 10 (1) (2001) 1–10.
- [16] G. Choppin, Actinide speciation in the environment, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 273 (3) (2007) 695–703.
- [17] S. Sachs, G. Bernhard, Influence of humic acids on the actinide migration in the environment: suitable humic acid model substances and their application in studies with uranium – a review, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 290 (1) (2011) 17–29.
- [18] A. Cobelo-García, M. Filella, P. Croot, C. Frazzoli, G.D.u. Laing, N. Ospina-Alvarez, S. Rauch, P. Salaun, J. Schäfer, S. Zimmermann, COST action TD1407: network on technology-critical elements (NOTICE) from environmental processes to human health threats, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (19) (2015) 15188–15194.
- [19] R.N. Collins, T. Saito, N. Aoyagi, T.E. Payne, T. Kimura, T.D. Waite, Applications of time-resolved laser fluorescence spectroscopy to the environmental biogeochemistry of actinides, *J. Environ. Qual.* 40 (3) (2011) 731–741.
- [20] R. Bro, PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (2) (1997) 149–171.

- [21] X. Luciani, S. Mounier, R. Redon, A. Bois, A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96 (2) (2009) 227–238.
- [22] D.K. Ryan, J.H. Weber, Copper (II) complexing capacities of natural waters by fluorescence quenching, *Environ. Sci. Technol.* 16 (12) (1982) 866–872.
- [23] H. Irving, S. Sinha, The formation constants of europium (III)-salicylate complexes and their extraction into isoamyl alcohol, *Anal. Chim. Acta* 49 (3) (1970) 449–454.
- [24] Y. Hasegawa, Y. Morita, M. Hase, M. Nagata, Complexation of lanthanoid (III) with substituted benzoic or phenylacetic acids and extraction of these acids, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 62 (5) (1989) 1486–1491.
- [25] Y. Hasegawa, N. Yamazaki, S. Usui, G.R. Choppin, Effects of phenyl groups on thermodynamic parameters of lanthanoid (III) complexation with aromatic carboxylic acids, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63 (8) (1990) 2169–2172.
- [26] T. Toraishi, S. Nagasaki, S. Tanaka, A theoretical study on molecular structure of Eu (III)-salicylate complexes in aqueous system, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 757 (1) (2005) 87–97.
- [27] S. Kuke, B. Marmodee, S. Eidner, U. Schilde, M.U. Kumke, Intramolecular deactivation processes in complexes of salicylic acid or glycolic acid with Eu (III), *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 75 (4) (2010) 1333–1340.
- [28] T. Saito, N. Aoyagi, M. Terashima, Europium binding to humic substances extracted from deep underground sedimentary groundwater studied by time-resolved laser fluorescence spectroscopy, *J. Nucl. Sci. Technol.* 54 (4) (2017) 444–451.
- [29] N. Aoyagi, T. Toraishi, G. Geipel, H. Hotokezaka, S. Nagasaki, S. Tanaka, Fluorescence characteristics of complex formation of Europium (III)-Salicylate, *Radiochim. Acta* 92 (9–11) (2004) 589–593.
- [30] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science and Business Media, 2006.
- [31] F.J. Stevenson, *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, John Wiley and Sons, 1994.
- [32] L. Tremblay, J.-P. Gagné, Organic matter distribution and reactivity in the waters of a large estuarine system, *Mar. Chem.* 116 (1) (2009) 1–12.
- [33] R. Swift, Method for extraction of IHSS soil fulvic and humic acids, *Soil Sci. Soc. Am. Am. Soc. Agronomy* (1996) 1011–1069.
- [34] A. Witter, S. Mabury, A. Jones, Copper (II) complexation in northern California rice field waters: an investigation using differential pulse anodic and cathodic stripping voltammetry, *Sci. Total Environ.* 212 (1) (1998) 21–37.
- [35] R.G. Zepp, W.M. Sheldon, M.A. Moran, Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices, *Mar. Chem.* 89 (1) (2004) 15–36.
- [36] R. Tauler, I. Marqués, E. Casassas, Multivariate curve resolution applied to three-way trilinear data: study of a spectrofluorimetric acid-base titration of salicylic acid at three excitation wavelengths, *J. Chemom.* 12 (1) (1998) 55–75.
- [37] P.G. Coble, Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy, *Mar. Chem.* 51 (4) (1996) 325–346.
- [38] J. Wei, L. Han, J. Song, M. Chen, Evaluation of the interactions between water extractable soil organic matter and metal cations (Cu (II), Eu (III)) using Excitation-Emission Matrix combined with Parallel Factor Analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (7) (2015) 14464–14476.
- [39] R. Hahn, C. Hein, J.M. Sander, R. Kautenburger, Complexation of europium and uranium with natural organic matter (NOM) in highly saline water matrices analysed by ultrafiltration and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Appl. Geochem.* 78 (2017) 241–249.
- [40] K. Chung, W. Lee, Y. Cho, G. Choi, C. Lee, Comparison of synchronous and laser-induced fluorescence spectroscopy applied to the Eu (III)-fulvate complexation, *Talanta* 65 (2) (2005) 389–395.
- [41] G. Bidoglio, I. Grenthe, P. Qi, P. Robouch, N. Omentto, Complexation of Eu and Tb with fulvic acids as studied by time-resolved laser-induced fluorescence, *Talanta* 38 (9) (1991) 999–1008.
- [42] J. Lead, J. Hamilton-Taylor, A. Peters, S. Reiner, E. Tipping, Europium binding by fulvic acids, *Anal. Chim. Acta* 369 (1) (1998) 171–180.
- [43] P.E. Reiller, J. Brevet, Bi-exponential decay of Eu (III) complexed by Suwannee River humic substances: spectroscopic evidence of two different excited species, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 75 (2) (2010) 629–636.
- [44] M. Kumke, C. Tiseanu, G. Abbt-Braun, F. Frimmel, Fluorescence decay of natural organic matter (NOM) influence of fractionation, oxidation, and metal ion complexation, *J. Fluoresc.* 8 (4) (1998) 309–318.

Deuxième partie

Conclusion & Perspectives

Les différentes recherches menées au cours de cette thèse ont été faites sur la complexation de la matière organique avec ces métaux : Cu, Al, Eu, U et le métalloïde As et plus précisément sur la caractérisation de leurs interactions par spectroscopie de fluorescence.

L'objectif de cette étude était d'utiliser la spectroscopie de fluorescence en mode stationnaire et résolue en temps pour caractériser le type d'interaction MO-métaux : statique ou dynamique. La matière organique a été prélevée de l'estuaire Saint Laurent du Canada. L'extraction a été effectuée en utilisant le protocole IHSS pour séparer les AH et les AF. Le cuivre, l'aluminium, l'arsenic, l'euporium et l'uranium ont été choisis comme modèle d'étude. En effet, le cuivre est un modèle couramment utilisé, l'Al est un élément toxique tout comme l'As et l'U, et l'Eu est un bon analogue des actinides trivalents.

Afin de mieux connaître les interactions de ces métaux avec la matière organique, l'acide salicylique a été choisi comme modèle pour son pouvoir complexant et sa capacité à imiter des propriétés proches de celles des substances humiques, aussi car on connaît sa formule et donc le nombre de sites. L'évaluation des propriétés de complexation a été basée sur le quenching de fluorescence.

Deux spectrofluorimètres ont été utilisés : l'HITACHI F4500 en utilisant des cuves et le TECAN M1000 en utilisant une microplaque. Le protocole expérimental d'ajouts logarithmiques pour la fluorescence en continu a été utilisé pour couvrir une large gamme de concentrations en métal. Il a également été adapté pour les petits volumes de la microplaque du TECAN. Les mesures de fluorescence ont été traitées par décomposition multilinéaire CP/PARAFAC. Les contributions spectrales de chaque fluorophore d'un échantillon ont été normalisées et présentées avec la MEEF correspondante. L'analyse des décompositions CP/PARAFAC a été faite en caractérisant chaque composant à partir de son spectre 3D. Le principal critère de comparaison entre les différents fluorophores a été effectué en se basant sur la position du maximum de fluorescence localisée par rapport aux zones décrites par Coble (1996).

L'utilisation du quenching de fluorescence a permis de déterminer les paramètres d'équilibre de chaque interaction via les variations des contributions spectrales en fonction des ajouts. La modélisation 1:1 par régression non-linéaire et optimisation de ces paramètres a permis d'établir les constantes conditionnelles de stabilité notées K qui correspondent à la formation du complexe MO-métaux. Les valeurs retrouvées ont été comparées à la littérature et sont du même ordre de grandeur. Les écarts observés sont liés aux différentes conditions expérimentales. Effectivement, un changement dans le pH, la force ionique, la nature de la MO ou l'utilisation de tampon induisent un changement dans les paramètres d'équilibre calculés. C'est pourquoi il est important de systématiquement décrire les conditions expérimentales.

L'un des autres points cruciaux de cette étude a été de déterminer par les lois de décroissances de fluorescence induites par impulsion laser et un algorithme de déconvolution temporelle, le type de quenching qui s'opère. En utilisant la spectroscopie laser résolue en temps et en mesurant les temps de vie de fluorescence, il a été possible de déterminer si un quenching statique ou dynamique s'opérait pour chaque interaction, ceci en analysant les graphiques de Stern-Volmer. Ces graphiques représentent I_0/I et τ_0/τ en fonction de

la concentration du quencheur. Cette méthode a été utilisée pour déterminer le processus de quenching qui se produit dans l'hypothèse d'une stœchiométrie de liaison 1 : 1 et a permis également de déterminer par une autre approche, les constantes de formation de complexes K_S . Le résultat des interactions du cuivre, de l'euprium et de l'uranium avec l'acide salicylique et les substances humiques montrent des décroissances de fluorescence importantes. L'aluminium et l'arsenic quant à eux dépendent du ligand fluorescent. En effet, l'aluminium par exemple, forme un complexe plus stable avec l'acide humique et inversement pour l'arsenic, qui forme un complexe plus stable avec l'acide fulvique. Le cuivre a confirmé être un bon modèle d'étude à travers son interaction avec l'AH et l'AF. Les métaux fluorescents euprium et uranium ont révélé également de bons résultats avec les substances humiques étudiées. Notre étude a aussi confirmé que l'acide salicylique est un bon modèle en tant que ligand fluorescent en fournissant des résultats en bonne corrélation avec la littérature. En ce qui concerne les différences entre les deux substances humiques étudiées, l'AH a généralement révélé un plus grand nombre de sites que l'AF. Il montre également une plus forte complexation avec le cuivre, l'aluminium et l'euprium tandis que l'AF montre une plus forte complexation avec l'arsenic et l'uranium. L'interaction de l'AH avec l'arsenic n'a pas montré une forte décroissance de fluorescence et les constantes calculées sont faibles alors que l'AF a montré une forte complexation avec celui-ci et un quenching de fluorescence notable. Les données de site de complexation C_L sont systématiquement calculées lors de l'optimisation du modèle 1 : 1 et permettraient d'obtenir plus d'informations sur la capacité de complexation. Ces données n'ont pas fait l'objet de ce travail et les valeurs obtenues n'ont pas été comparées avec celles de la littérature. Par conséquent, l'exploitation de ces données serait une perspective pour la comparaison de nos données. Déterminer également l'erreur sur l'optimisation serait un point important pour vérifier l'exactitude sur nos résultats.

Les résultats de ce travail montrent que les interactions étudiées engendrent principalement un quenching statique et donc la formation de complexe moléculaire à l'état fondamental. Seule l'interaction AS-Eu(III) a révélé un quenching dynamique également. À noter une fois de plus les différences dans les résultats rapportés avec l'HITACHI et le TECAN en terme d'identification de pics. Ces différences pourraient être exploitées pour effectuer une intercalibration entre les deux appareils et vérifier nos résultats.

La déconvolution temporelle a permis de calculer les temps de vie de fluorescence et les amplitudes relatives. Cependant, les spectres d'émission correspondant aux temps de vie calculés n'ont pas pu être extraits. Une première perspective serait donc d'adapter notre algorithme pour soustraire les spectres d'émission relatifs à chaque décroissance temporelle par reconstruction des spectres à partir des données de temps de vie de fluorescence et d'amplitude calculés. Cela permettrait une comparaison avec les différentes contributions de fluorophores mesurées et identifiées par CP/PARAFAC en mode stationnaire. Un autre moyen d'identifier les différents composants à partir des mesures par SLRT serait de coupler cette technique avec CP/PARAFAC. En effet, à partir des spectres d'émission mesurés par SLRT, il serait possible d'effectuer une décomposition CP/PARAFAC sur ces spectres pour déterminer les différentes contributions en intensité de fluorescence. Le couplage SLRT-CP/PARAFAC serait donc un atout pour déterminer les différents fluorophores d'un échantillon.

Nous avons utilisé dans notre étude une large gamme de concentrations de métaux pour se rapprocher le plus possible des conditions environnementales. La plupart des études sur la fluorescence du métal tels que l'euporium et l'uranium, ont utilisé des concentrations fortes de métal. En effet, l'utilisation d'un domaine de concentrations fortes pour les métaux fluorescents permettrait d'observer leur fluorescence par SLRT en utilisant les longueurs d'onde d'excitation adaptées pour comparer les données avec celles obtenues dans cette étude. Elles permettraient également de vérifier l'existence d'un transfert de charges entre les substances humiques et les métaux fluorescents. Nous avons tenté d'effectuer ces mesures mais par manque de temps et de sensibilité dans la mesure au niveau des métaux fluorescents, nous n'avons pas pu obtenir des résultats pertinents. Par conséquent, trouver les concentrations optimales pour effectuer ces mesures serait un atout pour bien comprendre les résultats qui montrent une augmentation de fluorescence à fortes concentrations notamment pour l'uranium.

Les résultats obtenus dans ce travail ont permis de valider nos différentes techniques d'analyses sur des échantillons naturels de matière organique en modélisant le quenching de fluorescence en présence de quenchneur. Une autre technique complémentaire pour distinguer le quenching statique et le quenching dynamique serait l'observation des différents fluorophores par absorption UV-Visible. En effet, le quenching dynamique affecte les fluorophores à l'état excité uniquement. Par conséquent, aucun changement en absorption ne devrait être visible. En revanche, la formation d'un complexe à l'état fondamental entraînerait des perturbations fréquentes des spectres d'absorption des fluorophores. Nous avons tenté d'effectuer ces mesures avec notre protocole expérimentale mais le problème rencontré était lié à la sensibilité de l'appareil. Une adaptation du protocole est nécessaire pour accomplir ces mesures.

Une autre perspective est bien sûr l'application des techniques utilisées dans cette thèse à d'autres métaux notamment les TCE (Technology-Critical Elements) qui sont d'une préoccupation majeure également du fait de la toxicité qu'ils représentent pour l'environnement et de leur dissémination de plus en plus grande.

Enfin, un travail plus complet d'un point de vue modélisation pourrait être fait en utilisant le logiciel PROSECE pour modéliser les fluorophores complexants. Ce logiciel permet une meilleure modélisation en optimisant plus rigoureusement les concentrations, les constantes de complexation ainsi que leurs rendements quantiques en prenant en compte les compétitions 1 : 1 et 1 : 2 entre les différents sites des ligands fluorescents.

Bibliographie

- Achard, R., Benard, A., Merdy, P., Durrieu, G., Le Poupon, C., Campredon, B., and Lucas, Y. (2013). Environmental quality assessment for valorization of raw and desalinated dredged marine sediment contaminated by potentially toxic elements. *Waste and Biomass Valorization*, 4(4) :781–795. [40](#)
- Aitkenhead-Peterson, J. A., McDowell, W. H., Neff, J. C., Stuart, E., and Robert, L. (2003). Sources, production, and regulation of allochthonous dissolved organic matter inputs to surface waters. *Aquatic Ecosystems : Interactivity of Dissolved Organic Matter*, pages 25–70. [33](#)
- Aoyagi, N., Toraishi, T., Geipel, G., Hotokezaka, H., Nagasaki, S., and Tanaka, S. (2004). Fluorescence characteristics of complex formation of Europium (III)-salicylate. *Radiochimica Acta*, 92(9-11) :589–593. [81](#), [85](#)
- Babko, A. (1947). Copper salicylate complexes. *Zhurnal Obshchei Khimii*, 17(3) :443–449. [72](#)
- Banks, C. and Singh, R. (1960). Composition and stability of some metal-5-sulphosalicylate complexes. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 15(1-2) :125–132. [85](#)
- Barkleit, A., Acker, M., and Bernhard, G. (2013). Europium (III) complexation with salicylic acid at elevated temperatures. *Inorganica Chimica Acta*, 394 :535–541. [81](#), [85](#)
- Bayen, S. (2012). Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems : a review. *Environment International*, 48 :84–101. [37](#)
- Beer, A. (1852). Bestimmung der absorption des rothen lichts in farbigen flüssigkeiten. *Annual Review of Physical Chemistry*, 86(2) :78–90. [6](#)
- Beltrami, D., Mercier-Bion, F., Cote, G., Mokhtari, H., Courtaud, B., Simoni, E., and Chagnes, A. (2014). Investigation of the speciation of uranium (VI) in concentrated phosphoric acid and in synergistic extraction systems by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy (TRLFS). *Journal of Molecular Liquids*, 190 :42–49. [43](#)
- Berger, P., Ewald, M., Liu, D., and Weber, J. H. (1984). Application of the fluorescence quenching titration method to the complexation of copper (II) in the gironde estuary (France). *Marine Chemistry*, 14(3) :289–295. [93](#), [97](#)

- Bertha, E. L. and Choppin, G. R. (1978). Interaction of humic and fulvic acids with Eu (III) and am (III). *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 40(4) :655–658. [104](#)
- Bidoglio, G., Grenthe, I., Qi, P., Robouch, P., and Omentto, N. (1991). Complexation of eu and tb with fulvic acids as studied by time-resolved laser-induced fluorescence. *Talanta*, 38(9) :999–1008. [42](#), [126](#), [129](#)
- Binnemans, K. (2015). Interpretation of europium (III) spectra. *Coordination Chemistry Reviews*, 295 :1–45. [42](#)
- Bonin, B. and Blanc, P. (2001). L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. *L'Uranium : de l'environnement à l'homme*, pages 7–33. [42](#)
- Bowen, H. (1985). The cycles of copper, silver and gold. In *The Natural Environment and the Biogeochemical Cycles*, pages 1–27. Springer. [38](#)
- Boyer, J. (1976). L'aluminium échangeable : incidence agronomique. évaluation et correction de sa toxicité dans les sols tropicaux. *Cah. ORSTOM, Sér. Pédol*, 14(4) :259–269. [39](#)
- Brevet, J., Claret, F., and Reiller, P. E. (2009). Spectral and temporal luminescent properties of eu (III) in humic substance solutions from different origins. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(2) :446–453. [42](#)
- Bro, R. (1997). Parafac. tutorial and applications. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 38(2) :149–171. [65](#)
- Bro, R. and Kiers, H. A. (2003). A new efficient method for determining the number of components in parafac models. *Journal of chemometrics*, 17(5) :274–286. [66](#)
- Bruland, K., Lohan, M., and Elderfield, H. (2003). The oceans and marine geochemistry. *Treatise on Geochemistry*, 6 :23–47. [43](#)
- Buenzli, J. C. G. and Yersin, J. R. (1979). Fluorescence spectra and lifetime measurements of aqueous solutions of europium nitrate and perchlorate. *Inorganic Chemistry*, 18(3) :605–607. [40](#)
- Buffle, J. (1988). Complexation reactions in aquatic systems. an analytical approach. [33](#), [37](#), [39](#)
- Bünzli, J.-C. and Choppin, G. R. (1989). Lanthanide probes in life. *Chemical and Earth Sciences*. [42](#)
- Buschmann, J., Kappeler, A., Lindauer, U., Kistler, D., Berg, M., and Sigg, L. (2006). Arsenite and arsenate binding to dissolved humic acids : Influence of ph, type of humic acid, and aluminum. *Environmental Science and Technology*, 40(19) :6015–6020. [101](#)
- Cabaniss, S. E. (1992). Synchronous fluorescence spectra of metal-fulvic acid complexes. *Environmental Science and technology*, 26(6) :1133–1139. [93](#)

- Cabaniss, S. E. and Shuman, M. S. (1986). Combined ion selective electrode and fluorescence quenching detection for copper-dissolved organic matter titrations. *Analytical Chemistry*, 58(2) :398–401. [30](#), [39](#)
- Caceci, M. S. (1985). The interaction of humic acid with europium (III). complexation strength as a function of load and pH. *Radiochimica Acta*, 39(1) :51–56. [104](#), [109](#)
- Campredon, B. (2013). *Mécanismes et transferts de l'arsenic dans une confluence du Var et étude d'une méthode de remédiation dans les eaux potables*. PhD thesis, Université Nice Sophia Antipolis. [40](#)
- Carlsen, L., BO, P., and LARSEN, G. (1984). Radionuclide-humic acid interactions studied by dialysis. ACS Publications. [104](#)
- Carnall, W., Fields, P., and Rajnak, K. (1968). Electronic energy levels of the trivalent lanthanide aquo ions. IV. Eu^{3+} . *The Journal of Chemical Physics*, 49(10) :4450–4455. [42](#)
- Cathalifaud, G., Ayele, J., and Mazet, M. (1997). Etude de la complexation des ions aluminium par des molécules organiques : Constantes et stoechiométrie des complexes. application au traitement de potabilisation des eaux. *Water Research*, 31(4) :689–698. [v](#), [40](#), [75](#), [76](#), [78](#)
- Cha, W., Cho, H.-R., Jung, E., Park, K., Kim, W., and Song, K. (2012). Spectroscopic studies on U(VI)-salicylate complex formation with multiple equilibria. *Radiochimica Acta International journal for chemical aspects of nuclear science and technology*, 100(6) :371–379. [86](#), [89](#)
- Cha, W.-S., Cho, H.-R., and Jung, E.-C. (2011). Spectroscopic studies on U(VI) complex with 2, 6-dihydroxybenzoic acid as a model ligand of humic acid. *Journal of Nuclear Fuel Cycle and Waste Technology*, 9(4) :207–217. [109](#), [114](#)
- Chan, S., Gerson, B., and Subramaniam, S. (1998). The role of copper, molybdenum, selenium, and zinc in nutrition and health. *Clinics in Laboratory Medicine*, 18(4) :673–685. [39](#)
- Chen, J., LeBoeuf, E. J., Dai, S., and Gu, B. (2003a). Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 50(5) :639–647. [35](#)
- Chen, W., Smith, D., and Guéguen, C. (2013). Influence of water chemistry and dissolved organic matter (dom) molecular size on copper and mercury binding determined by multiresponse fluorescence quenching. *Chemosphere*, 92(4) :351–359. [38](#), [117](#), [120](#)
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., and Booksh, K. (2003b). Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, 37(24) :5701–5710. [35](#)
- Chung, K., Lee, W., Cho, Y., Choi, G., and Lee, C. (2005). Comparison of synchronous and laser-induced fluorescence spectroscopy applied to the Eu(III) -fulvate complexation. *Talanta*, 65(2) :389–395. [42](#), [126](#), [129](#)

- Clark, C. D., Jimenez-Morais, J., Jones, G., Zanardi-Lamardo, E., Moore, C. A., and Zika, R. G. (2002). A time-resolved fluorescence study of dissolved organic matter in a riverine to marine transition zone. *Marine Chemistry*, 78(2) :121–135. [44](#), [137](#)
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial dom in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51(4) :325–346. [viii](#), [35](#), [36](#), [71](#), [93](#), [95](#), [114](#), [117](#), [124](#), [134](#), [149](#)
- Coble, P. G., Lead, J., Baker, A., Reynolds, D. M., and Spencer, R. G. (2014). *Aquatic organic matter fluorescence*. Cambridge University Press. [34](#), [35](#)
- Colette, S., Amekraz, B., Madic, C., Berthon, L., Cote, G., and Moulin, C. (2004). Europium (III) interaction with a polyaza-aromatic extractant studied by time-resolved laser-induced luminescence : a thermodynamical approach. *Inorganic Chemistry*, 43(21) :6745–6751. [42](#)
- Crou  , J.-P., Benedetti, M., Violleau, D., and Leenheer, J. (2003). Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the south platte river : evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environmental Science & Technology*, 37(2) :328–336. [92](#)
- da Silva, J. C. E. and Machado, A. A. (1995). Evolving factor analysis of synchronous fluorescence spectra of humic substances in the presence of Cu(II). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 27(1) :115–128. [117](#)
- da Silva, J. C. E. and Machado, A. A. (1996). Characterization of the binding sites for Al (III) and Be (II) in a sample of marine fulvic acids. *Marine Chemistry*, 54(3-4) :293–302. [93](#), [120](#), [123](#)
- da Silva, J. C. E., Machado, A. A., and Oliveira, C. J. (1996). Study of the interaction of a soil fulvic acid with UO_2^{2+} by self-modelling mixture analysis of synchronous molecular fluorescence spectra. *Analyst*, 121(10) :1373–1379. [85](#), [86](#), [89](#), [130](#), [134](#)
- da Silva, J. C. E., Machado, A. A., and Oliveira, C. J. (1997). Study of the interaction of Al(III) with a soil fulvic acid in the acid ph range by self-modeling mixture analysis of synchronous fluorescence spectral data. *Analytica Chimica Acta*, 349(1-3) :23–31. [120](#), [123](#)
- Da Silva, J. C. E., Machado, A. A., Oliveira, C. J., and Pinto, M. S. (1998). Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu (II), Fe (III) and UO_2^{2+} . *Talanta*, 45(6) :1155–1165. [39](#)
- Dang, D. H., Tessier, E., Lenoble, V., Durrieu, G., Omanovi  , D., Mullot, J.-U., Pfeifer, H.-R., Mounier, S., and Garnier, C. (2014). Key parameters controlling arsenic dynamics in coastal sediments : an analytical and modeling approach. *Marine Chemistry*, 161 :34–46. [40](#)
- de Souza Sierra, M. M. (1992). *Caractérisation et r  activit   de la matière organique fluorescente dissoute dans les milieus c  tiers et marins*. PhD thesis. [33](#)

- Driscoll, C. T., Lehtinen, M. D., and Sullivan, T. J. (1994). Modeling the acid-base chemistry of organic solutes in adirondack, new york, lakes. *Water Resources Research*, 30(2) :297–306. [40](#)
- Drobot, B., Steudtner, R., Raff, J., Geipel, G., Brendler, V., and Tsushima, S. (2015). Combining luminescence spectroscopy, parallel factor analysis and quantum chemistry to reveal metal speciation—a case study of uranyl (VI) hydrolysis. *Chemical Science*, 6(2) :964–972. [42](#), [44](#)
- Elkins, K. M. and Nelson, D. J. (2001). Fluorescence and FT–IR spectroscopic studies of suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 87(1) :81–96. [39](#), [75](#), [97](#), [120](#)
- Elkins, K. M. and Nelson, D. J. (2002). Spectroscopic approaches to the study of the interaction of aluminum with humic substances. *Coordination Chemistry Reviews*, 228(2) :205–225. [40](#), [75](#), [97](#), [121](#), [123](#)
- Elumalai, M., Antunes, C., and Guilhermino, L. (2007). Enzymatic biomarkers in the crab *Carcinus maenas* from the minho river estuary (nw portugal) exposed to zinc and mercury. *Chemosphere*, 66(7) :1249–1255. [31](#)
- Ephraim, J. H., Marinsky, J. A., and Cramer, S. J. (1989). Complex-forming properties of natural organic acids : fulvic acid complexes with cobalt, zinc and europium. *Talanta*, 36(4) :437–443. [126](#)
- Fakour, H. and Lin, T.-F. (2014). Experimental determination and modeling of arsenic complexation with humic and fulvic acids. *Journal of Hazardous Materials*, 279 :569–578. [124](#), [125](#)
- Fellows, R. J., Wang, Z., and Ainsworth, C. C. (2003). Europium uptake and partitioning in oat (*avena sativa*) roots as studied by laser-induced fluorescence spectroscopy and confocal microscopy profiling technique. *Environmental Science and Technology*, 37(22) :5247–5253. [42](#)
- Ferraro, J. R. (2003). *Introductory raman spectroscopy*. Academic press. [24](#)
- Foley, R. T. and Anderson, R. C. (1949). Spectrophotometric studies of complex formation with sulfosalicylic acid. II. with uranyl ion. *Journal of the American Chemical Society*, 71(3) :909–912. [86](#)
- Gauthier, C. E. (2002). *Contribution à l'étude du fractionnement de l'aluminium libéré dans des solutions de sols forestiers : Influence de la quantité et de la nature de la matière organique*. PhD thesis, Limoges. [40](#)
- Guggenberger, G., Zech, W., and Schulten, H.-R. (1994). Formation and mobilization pathways of dissolved organic matter : evidence from chemical structural studies of organic matter fractions in acid forest floor solutions. *Organic Geochemistry*, 21(1) :51–66. [37](#)

- Habashy, G. (1969). Polarographic and potentiometric studies of cu (II)-salicylate complexes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 21(2) :357–363. [72](#)
- Hahn, R., Hein, C., Sander, J. M., and Kautenburger, R. (2017). Complexation of europium and uranium with natural organic matter (NOM) in highly saline water matrices analysed by ultrafiltration and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Applied Geochemistry*, 78 :241–249. [104](#), [109](#), [110](#)
- Harshman, R. A. and Lundy, M. E. (1984). The PARAFAC model for three-way factor analysis and multidimensional scaling. *Research Methods for Multimode Data Analysis*, 46 :122–215. [66](#)
- Harshman, R. A. and Lundy, M. E. (1994). PARAFAC : Parallel factor analysis. *Computational Statistics and Data Analysis*, 18(1) :39–72. [66](#)
- Hasegawa, Y., Morita, Y., Hase, M., and Nagata, M. (1989). Complexation of lanthanoid (III) with substituted benzoic or phenylacetic acids and extraction of these acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 62(5) :1486–1491. [81](#), [85](#)
- Hasegawa, Y., Yamazaki, N., Usui, S., and Choppin, G. R. (1990). Effects of phenyl groups on thermodynamic parameters of lanthanoid (III) complexation with aromatic carboxylic acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 63(8) :2169–2172. [81](#)
- Hatcher, P. and Spiker, E. (1988). Selective degradation of plant biomolecules. *Humic substances and Their Role in the Environment*, pages 59–74. [35](#)
- Hays, M. D., Ryan, D. K., and Pennell, S. (2004). A modified multisite stern–volmer equation for the determination of conditional stability constants and ligand concentrations of soil fulvic acid with metal ions. *Analytical Chemistry*, 76(3) :848–854. [117](#)
- Hedges, J. I., Clark, W. A., and Come, G. L. (1988). Organic matter sources to the water column and surficial sediments of a marine bay. *Limnology and Oceanography*, 33(5) :1116–1136. [33](#)
- Heller, A., Barkleit, A., Foerstendorf, H., Tsushima, S., Heim, K., and Bernhard, G. (2012). Curium (III) citrate speciation in biological systems : a Europium (III) assisted spectroscopic and quantum chemical study. *Dalton Transactions*, 41(45) :13969–13983. [42](#)
- Hemmingsen, S. L. and McGown, L. B. (1997). Phase-resolved fluorescence spectral and lifetime characterization of commercial humic substances. *Applied Spectroscopy*, 51(7) :921–929. [35](#)
- Herschel, J. F. W. (1845). On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, pages 143–145. [4](#)
- Horrocks Jr, W. D. and Sudnick, D. R. (1979). Lanthanide ion probes of structure in biology. laser-induced luminescence decay constants provide a direct measure of the number of metal-coordinated water molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 101(2) :334–340. [42](#)

- Hsiu-Chin, Y. (1966). Studies on the composition and stability of complexes of copper (II) with salicylic acid in aqueous solution. *Acta Chimica Sinica* 32, pages 94–96. [72](#)
- Hue, N., Craddock, G., and Adams, F. (1986). Effect of organic acids on aluminum toxicity in subsoils. *Soil Science Society of America Journal*, 50(1) :28–34. [75](#), [78](#)
- Hur, J. and Lee, B.-M. (2011). Characterization of binding site heterogeneity for copper within dissolved organic matter fractions using two-dimensional correlation fluorescence spectroscopy. *Chemosphere*, 83(11) :1603–1611. [93](#), [97](#)
- Idiz, E. F., Carlisle, D., and Kaplan, I. (1986). Interaction between organic matter and trace metals in a uranium rich bog, kern county, california, USA. *Applied Geochemistry*, 1(5) :573–590. [43](#)
- Irving, H. and Sinha, S. (1970). The formation constants of europium (III)-salicylate complexes and their extraction into isoamyl alcohol. *Analytica Chimica Acta*, 49(3) :449–454. [81](#)
- Jahagirdar, D. and Khanolkar, D. (1973). Studies of $UO_2(II)$ complexes of substituted salicylic acids. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 35(3) :921–930. [86](#)
- Janoš, P. (2003). Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A*, 983(1) :1–18. [47](#)
- Jørgensen, C. K. and Judd, B. (1964). Hypersensitive pseudoquadrupole transitions in lanthanides. *Molecular Physics*, 8(3) :281–290. [42](#)
- Joshi, H., Mishra, H., and Tripathi, H. (1997). Photophysics and photochemistry of salicylic acid revisited. *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 105(1) :15–20. [46](#)
- Juste, C. (1964). Influence du chaulage sur la phytotoxicité de l'aluminium mobile d'un sol de défriche riche en colloïdes minéraux. *Annales Agronomiques*, 15 :5–22. [39](#)
- Kalbitz, K. and Wennrich, R. (1998). Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland soils and its dependence on dissolved organic matter. *Science of the Total Environment*, 209(1) :27–39. [37](#)
- Karim, M. M., Lee, H. S., Kim, Y. S., Bae, H. S., and Lee, S. H. (2006). Analysis of salicylic acid based on the fluorescence enhancement of the As(III)–salicylic acid system. *Analytica Chimica Acta*, 576(1) :136–139. [78](#)
- Kim, B.-I., Miyake, C., and Imoto, S. (1974). Spectroscopic studies on the uranyl complexes with 1, 2-disubstituted benzenes. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 36(9) :2015–2021. [46](#), [85](#)
- Kochian, L. V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 46(1) :237–260. [39](#)

- Kouhail, Y. (2016). *Influence de la compétition des anions (hydroxydes, carbonates) sur la complexation des lanthanides trivalents par la matière organique naturelle : cas des substances humiques*. PhD thesis, Institut de physique du globe de paris-IPGP. [42](#)
- Kraus, T. E., Anderson, C. A., Morgenstern, K., Downing, B. D., Pellerin, B. A., and Bergamaschi, B. A. (2010). Determining sources of dissolved organic carbon and disinfection byproduct precursors to the mckenzie river, oregon. *Journal of environmental quality*, 39(6) :2100–2112. [36](#)
- Kuke, S., Marmodee, B., Eidner, S., Schilde, U., and Kumke, M. U. (2010). Intramolecular deactivation processes in complexes of salicylic acid or glycolic acid with Eu (III). *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(4) :1333–1340. [81](#)
- Kumke, M., Tiseanu, C., Abbt-Braun, G., and Frimmel, F. (1998). Fluorescence decay of natural organic matter (NOM)—influence of fractionation, oxidation, and metal ion complexation. *Journal of Fluorescence*, 8(4) :309–318. [35](#)
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science and Business Media. [8](#), [9](#), [14](#), [17](#), [18](#), [21](#)
- Lambert, J., Buddrus, J., and Burba, P. (1995). Evaluation of conditional stability constants of dissolved aluminum/humic substance complexes by means of ^{27}Al nuclear magnetic resonance. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351(1) :83–87. [39](#), [97](#), [98](#)
- Landa, E. R. and Councell, T. B. (1992). Leaching of uranium from glass and ceramic foodware and decorative items. *Health Physics*, 63(3) :343–348. [42](#)
- Lavrik, N. and Mulloev, N. (2010). A fluorescence quenching study of the complexation of salicylic acid mono-and dianions with the copper (II) ion in aqueous solutions. *High Energy Chemistry*, 44(2) :139–142. [38](#), [46](#), [72](#), [75](#)
- Lead, J., Hamilton-Taylor, J., Peters, A., Reiner, S., and Tipping, E. (1998). Europium binding by fulvic acids. *Analytica Chimica Acta*, 369(1) :171–180. [126](#), [129](#)
- Leenheer, J. A. and Croué, J.-P. (2003). Peer reviewed : characterizing aquatic dissolved organic matter. [35](#)
- Lehmann, S., Geipel, G., Grambole, G., and Bernhard, G. (2009). A novel time-resolved laser fluorescence spectroscopy system for research on complexation of uranium (IV). *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(5) :902–908. [43](#)
- Lenoir, T. (2011). *Mécanismes de rétention du cuivre dans les sols : Évaluation statistique des approches macroscopiques et spectroscopiques*. PhD thesis, Université de Grenoble. [39](#)
- Ley, H. and Englehardt, K. (1910). Ultraviolet fluorescence and chemical constitution of cyclic compounds. *Journal of Physical Chemistry*, 74(1) :1–64. [46](#)

- Li, W., Victor, D., and Chakrabarti, C. (1980). Effect of pH and uranium concentration on interaction of uranium (VI) and uranium (IV) with organic ligands in aqueous solutions. *Analytical Chemistry*, 52(3) :520–523. [109](#), [114](#)
- Lifset, R., Gordon, R., Graedel, T., Spataro, S., and Bertram, M. (2002). Where has all the copper gone : The stocks and flows project, part 1. *Journal of the Minerals, Metals and Materials Society*, 54(10) :21–26. [39](#)
- Lin, T., Hou, B., Wang, J., Xu, Y., and Chen, W. (2017). Characterization of interaction between amino acids and fulvic-like organic matter by fluorescence spectroscopy combining thermodynamic calculation. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(8) :7226–7235. [35](#)
- Lochmuller, C. H. and Saavedra, S. S. (1986). Conformational changes in a soil fulvic acid measured by time-dependent fluorescence depolarization. *Analytical Chemistry*, 58(9) :1978–1981. [137](#)
- Lombardi, A. T. and Jardim, W. F. (1997). The complexation of marine and terrestrial organic materials with copper (II) ions as determined by fluorescence quenching. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 9(1) :27–34. [117](#), [120](#)
- Lu, X. and Jaffe, R. (2001). Interaction between Hg (II) and natural dissolved organic matter : a fluorescence spectroscopy based study. *Water Research*, 35(7) :1793–1803. [31](#)
- Luciani, X. (2007). *Analyse numérique des spectres de fluorescence 3D issus de mélanges non linéaires*. PhD thesis, Université du Sud Toulon Var. [7](#), [100](#), [110](#)
- Lukman, S., Saito, T., Aoyagi, N., Kimura, T., and Nagasaki, S. (2012). Speciation of Eu^{3+} bound to humic substances by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) and parallel factor analysis (PARAFAC). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 88 :199–215. [42](#)
- Luster, J., Lloyd, T., Sposito, G., and Fry, I. V. (1996). Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper (II) and aluminum (III) complexation by dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, 30(5) :1565–1574. [40](#), [75](#)
- Ma, J. F., Ryan, P. R., and Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6) :273–278. [39](#)
- Madic, C. and Genet, M. (2001). Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. *L'Uranium : de l'environnement à l'homme*, pages 43–78. [42](#)
- Mandal, B. K. and Suzuki, K. T. (2002). Arsenic around the world : a review. *Talanta*, 58(1) :201–235. [40](#)
- Mantoura, R., Dickson, A., and Riley, J. (1978). The complexation of metals with humic materials in natural waters. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 6(4) :387–408. [30](#)

- Martell, A. E., Motekaitis, R. J., and Smith, R. M. (1990). Aluminium complexes of hydroxyaliphatic and hydroxyaromatic ligands in aqueous systems—some problems and solutions. *Polyhedron*, 9(2-3) :171–187. [40](#)
- Martell, A. E. and Smith, R. M. (1974). *Critical stability constants*, volume 1. Springer. [73](#), [75](#)
- McCarthy, J. F., Czerwinski, K. R., Sanford, W. E., Jardine, P. M., and Marsh, J. D. (1998). Mobilization of transuranic radionuclides from disposal trenches by natural organic matter. *Journal of Contaminant Hydrology*, 30(1) :49–77. [37](#)
- McIntyre, A. and Guéguen, C. (2013). Binding interactions of algal-derived dissolved organic matter with metal ions. *Chemosphere*, 90(2) :620–626. [93](#)
- McKnight, D. M., Feder, G. L., Thurman, E. M., Wershaw, R. L., and Westall, J. C. (1983). Complexation of copper by aquatic humic substances from different environments. *Science of the Total Environment*, 28(1-3) :65–76. [117](#)
- Meinrath, G., Lis, S., Stryla, Z., and Noubactep, C. (2000). Lifetime and fluorescence quantum yield of uranium (VI) species in hydrolyzed solutions. *Journal of Alloys and Compounds*, 300 :107–112. [42](#)
- Midorikawa, T. (1998). Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water. *Marine Chemistry*, 62(3) :219–239. [39](#)
- Midorikawa, T. and Tanoue, E. (1998). Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water. *Marine Chemistry*, 62(3) :219–239. [16](#), [30](#)
- Monsallier, J.-M., Scherbaum, F. J., Buckau, G., Kim, J.-I., Kumke, M. U., Specht, C. H., and Frimmel, F. H. (2001). Influence of photochemical reactions on the complexation of humic acid with Europium (III). *Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 138(1) :55–63. [104](#), [109](#)
- Morel, F. and Price, N. (2003). The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science*, 300(5621) :944–947. [37](#)
- Moulin, C., Decambox, P., Moulin, V., and Decaillon, J. G. (1995). Uranium speciation in solution by time-resolved laser-induced fluorescence. *Analytical Chemistry*, 67(2) :348–353. [42](#)
- Moulin, C., Wei, J., Van Iseghem, P., Laszak, I., Plancque, G., and Moulin, V. (1999). Europium complexes investigations in natural waters by time-resolved laser-induced fluorescence. *Analytica Chimica Acta*, 396(2) :253–261. [42](#), [104](#)
- Moulin, V., Tits, J., and Ouzounian, G. (1992). Actinide speciation in the presence of humic substances in natural water conditions. *Radiochimica Acta*, 58(1) :179–190. [iv](#), [37](#)

- Mounier, S., Zhao, H., Garnier, C., and Redon, R. (2011). Copper complexing properties of dissolved organic matter : Parafac treatment of fluorescence quenching. *Biogeochemistry*, 106(1) :107–116. [35](#), [38](#), [39](#), [93](#), [95](#), [97](#)
- Murphy, K. R., Stedmon, C. A., Waite, T. D., and Ruiz, G. M. (2008). Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 108(1) :40–58. [35](#)
- Nieke, B., Reuter, R., Heuermann, R., Wang, H., Babin, M., and Therriault, J. (1997). Light absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter (CDOM), in the St. Lawrence Estuary (case 2 waters). *Continental Shelf Research*, 17(3) :235–252. [47](#)
- Nouhi, A., Hajjoul, H., Redon, R., Gagné, J., and Mounier, S. (2017). Time-resolved laser fluorescence spectroscopy of organic ligands by europium : Fluorescence quenching and lifetime properties. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. [44](#)
- Nriagu, J. O. (1989). A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338(6210) :47–49. [39](#)
- O'Connor, D., Ware, W., and Andre, J. (1979). Deconvolution of fluorescence decay curves. a critical comparison of techniques. *Journal of Physical Chemistry*, 83(10) :1333–1343. [29](#)
- Pacyna, J. M. and Pacyna, E. G. (2001). An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews*, 9(4) :269–298. [39](#)
- Parker, C. and Barnes, W. (1957). Some experiments with spectrofluorimeters and filter fluorimeters. *Analyst*, 82(978) :606–618. [110](#)
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., and Lamotte, M. (2000). Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*, 31(12) :1765–1781. [35](#)
- Perrin, D. (1958). Stability of metal complexes with salicylic acid and related substances. *Nature*, 182(4637) :741–742. [72](#)
- Perrin, F. (1924). Quantitative description of static quenching (active sphere model). [20](#)
- Peuravuori, J. and Pihlaja, K. (1997). Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 337(2) :133–149. [48](#)
- Philpot, W., Bisogni, J., and Vodacek, A. (1984). *U.S. Geological Survey*, (05). [97](#)
- Plancque, G., Moulin, V., Toulhoat, P., and Moulin, C. (2003). Europium speciation by time-resolved laser-induced fluorescence. *Analytica Chimica Acta*, 478(1) :11–22. [42](#), [104](#)

- Plaza, C., Senesi, N., Garcia-Gil, J., and Polo, A. (2005). Copper (II) complexation by humic and fulvic acids from pig slurry and amended and non-amended soils. *Chemosphere*, 61(5) :711–716. [39](#), [93](#)
- Prasad, M. N. V. (2013). *Heavy metal stress in plants : from biomolecules to ecosystems*. Springer Science & Business Media. [37](#)
- Rajan, K. and Martell, A. (1964). Equilibrium studies of uranyl complexes—i : Interaction of uranyl ion with some hydroxy-carboxylic and aminocarboxylic acids. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 26(5) :789–798. [86](#)
- Raman, C. V. and Krishnan, K. S. (1928). A new type of secondary radiation. *Nature*, 121 :501–502. [24](#)
- Rao, J. M. and Sessaiah, U. (1966). Stability constants of uranyl chelates with nuclear-substituted salicylic acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 39(12) :2668–2671. [86](#)
- Rayleigh, J. W. S. B. (1871). *On the scattering of light by small particles*. [24](#)
- Reid, K. R., Meyerhoff, M. E., and Mitchell-Koch, J. T. (2008). Salicylate detection by complexation with iron (III) and optical absorbance spectroscopy. an undergraduate quantitative analysis experiment. *Journal of Chemical Education*, 85(12) :1658. [85](#)
- Reiller, P. E. and Brevet, J. (2010). Bi-exponential decay of eu(III) complexed by suwannee river humic substances : spectroscopic evidence of two different excited species. *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(2) :629–636. [104](#)
- Ryan, D. K. and Weber, J. H. (1982). Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*, 54(6) :986–990. [30](#), [35](#), [39](#), [63](#), [65](#), [93](#), [97](#), [117](#), [120](#)
- Saar, R. A. and Weber, J. H. (1980). Lead (II) complexation by fulvic acid : how it differs from fulvic acid complexation of copper (II) and cadmium (II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44(9) :1381–1384. [30](#), [39](#), [63](#)
- Saito, T., Nagasaki, S., and Tanaka, S. (2002). Evaluation of the complexation behavior between humic acid and UO_2^{2+} with fluorescence spectroscopy and its mixture analysis. *Radiochimica Acta*, 90(1) :27–33. [86](#), [89](#), [109](#), [114](#)
- Saito, T., Sao, H., Ishida, K., Aoyagi, N., Kimura, T., Nagasaki, S., and Tanaka, S. (2010). Application of parallel factor analysis for time-resolved laser fluorescence spectroscopy : Implication for metal speciation study. *Environmental Science and Technology*, 44(13) :5055–5060. [42](#)
- Schmeide, K., Sachs, S., Bubner, M., Reich, T., Heise, K. H., and Bernhard, G. (2003). Interaction of uranium (VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*, 351 :133–140. [109](#), [114](#)

- Schnitzer, M. (1978). Humic substances : chemistry and reactions. *Developments in soil science*, 8 :1–64. [35](#), [137](#)
- Seitz, W. R. (1981). Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water : fluorescence quenching yields information on the binding of metal ions to humic substances. *Trends in Analytical Chemistry*, 1(4) :79–83. [63](#)
- Senesi, N. (1990). Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals : Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*, 232 :77–106. [30](#)
- Senesi, N. (1993). Nature of interactions between organic chemicals and dissolved humic substances and the influence of environmental factors. *Special Publication-Royal Society of Chemistry*, 135(1) :73–73. [30](#)
- Shin, H.-S. and Choppin, G. R. (1999). A study of Eu(III)-humate complexation using Eu(III) luminescence spectroscopy. *Radiochimica Acta*, 86(3-4) :167–174. [42](#)
- Shin, H.-S., Hong, K.-H., Lee, M.-H., Cho, Y.-H., and Lee, C.-W. (2001). Fluorescence quenching of three molecular weight fractions of a soil fulvic acid by $\text{UO}_2(\text{II})$. *Talanta*, 53(4) :791–799. [43](#), [130](#), [134](#)
- Shuman, M. S. and Cromer, J. L. (1979). Copper association with aquatic fulvic and humic acids. estimation of conditional formation constants with a titrimetric anodic stripping voltammetry procedure. *Environmental Science and Technology*, 13(5) :543–545. [116](#)
- Sigg, L. (1992). Les métaux lourds dans les cours d'eau. *Nouvelles de l'EAWAG*, 32 :32–35. [37](#)
- Sillen, L. G., Martell, A. E., and Bjerrum, J. (1964). Stability constants of metal-ion complexes. Technical report, Chemical Society,. [86](#)
- Smith, D. S. and Kramer, J. R. (1999). Fluorescence analysis for multi-site aluminum binding to natural organic matter. *Environment International*, 25(2-3) :295–306. [35](#)
- Smith, D. S. and Kramer, J. R. (2000). Multisite metal binding to fulvic acid determined using multiresponse fluorescence. *Analytica Chimica Acta*, 416(2) :211–220. [117](#), [120](#)
- Soini, E., Lövgren, T., and Reimer, C. B. (1987). Time-resolved fluorescence of lanthanide probes and applications in biotechnology. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 18(2) :105–154. [42](#)
- Stedmon, C. A., Markager, S., and Bro, R. (2003). Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 82(3) :239–254. [35](#)
- Stevenson, F. and Fitch, A. (1986). Chemistry of complexation of metal ions with soil solution organics. *Interactions of soil minerals with natural organics and microbes, (interactionsofs)* :29–58. [137](#)

- Stevenson, F. J. (1994). *Humus chemistry : genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons. [iv](#), [33](#), [34](#), [46](#)
- Stokes, G. G. (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142 :463–562. [4](#), [11](#)
- Sunda, W. G. and Hanson, A. K. (1987). Measurement of free cupric ion concentration in seawater by a ligand competition technique involving copper sorption onto C18 sep-pak cartridges. *Limnology and Oceanography*, 32(3) :537–551. [39](#)
- Tanaka, F. and Yamashita, S. (1984). Luminescence lifetimes of aqueous europium chloride, nitrate, sulfate, and perchlorate solutions. studies on the nature of the inner coordination sphere of europium(III) ion. *Inorganic Chemistry*, 23(14) :2044–2046. [42](#)
- Tauler, R., Marqués, I., and Casassas, E. (1998). Multivariate curve resolution applied to three-way trilinear data : Study of a spectrofluorimetric acid–base titration of salicylic acid at three excitation wavelengths. *Journal of Chemometrics*, 12(1) :55–75. [47](#)
- Thomas, J. (1997). The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 38(1) :1–36. [33](#)
- Tipping, E. (1993). Modelling the binding of europium and the actinides by humic substances. *Radiochimica Acta*, 62(3) :141–152. [104](#)
- Tipping, E. (2002). *Cation binding by humic substances*, volume 12. Cambridge University Press. [37](#)
- Tiseanu, C.-D., Kumke, M., Frimmel, F., Klenze, R., and Kim, J. (1998). Time-resolved fluorescence spectroscopy of fulvic acid and fulvic acid complexed with Eu^{3+} —a comparative study. *Journal Of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry*, 117(3) :175–184. [42](#), [126](#), [129](#)
- Toraishi, T., Aoyagi, N., Nagasaki, S., and Tanaka, S. (2004). Stoichiometry, stability constants and coordination geometry of Eu (III) 5-sulfosalicylate complex in aqueous system—a TRLIFS study. *Dalton Transactions*, (21) :3495–3502. [81](#)
- Toraishi, T. and Grenthe, I. (2003). Potentiometric and ^1H and ^{19}F NMR studies of the Th (IV)–5-sulfosalicylate–OH–F– system. *Dalton Transactions*, (8) :1634–1640. [81](#)
- Toraishi, T., Nagasaki, S., and Tanaka, S. (2005). A theoretical study on molecular structure of Eu (III)-salicylate complexes in aqueous system. *Journal of Molecular Structure*, 757(1) :87–97. [81](#)
- Torres, R. A. and Choppin, G. R. (1984). Europium (III) and americium (III) stability constants with humic acid. *Radiochimica Acta*, 35(3) :143–148. [104](#)
- Turro, N. J. (1991). *Modern molecular photochemistry*. University Science Books. [17](#)
- Valencia, S., Marín, J. M., Restrepo, G., and Frimmel, F. H. (2014). Evaluation of natural organic matter changes from lake hohloh by three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy during TiO_2/UV process. *Water research*, 51 :124–133. [35](#)

- Valeur, B. and Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular fluorescence : principles and applications*. John Wiley & Sons. [iv](#), [9](#), [16](#), [21](#), [22](#)
- Vartak, D. and Menon, K. (1971). Stability constants of some substituted salicylic acids and their complexes. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, 33(4) :1003–1011. [86](#)
- Ventry, L. S., Ryan, D. K., and Gilbert, T. R. (1991). A rapid fluorescence quenching method for the determination of equilibrium parameters for copper (II) complexation by humic materials. *Microchemical journal*, 44(2) :201–214. [72](#), [73](#), [75](#), [117](#), [120](#)
- Wang, S. and Mulligan, C. N. (2006a). Effect of natural organic matter on arsenic release from soils and sediments into groundwater. *Environmental Geochemistry and Health*, 28(3) :197–214. [40](#)
- Wang, S. and Mulligan, C. N. (2006b). Natural attenuation processes for remediation of arsenic contaminated soils and groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, 138(3) :459–470. [40](#)
- Wang, S. and Mulligan, C. N. (2009). Enhanced mobilization of arsenic and heavy metals from mine tailings by humic acid. *Chemosphere*, 74(2) :274–279. [100](#)
- Warwick, P., Inam, E., and Evans, N. (2005). Arsenic's interaction with humic acid. *Environmental Chemistry*, 2(2) :119–124. [100](#), [104](#)
- Webb, E. A., Schwarcz, H. P., and Healy, P. F. (2004). Detection of ancient maize in lowland maya soils using stable carbon isotopes : evidence from caracol, belize. *Journal of Archaeological Science*, 31(8) :1039–1052. [48](#)
- Wei, J., Han, L., Song, J., and Chen, M. (2015). Evaluation of the interactions between water extractable soil organic matter and metal cations (Cu(II), Eu(III)) using excitation-emission matrix combined with parallel factor analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7) :14464–14476. [93](#), [104](#), [109](#), [126](#), [129](#)
- Weller, A. (1955). Fluorescence of salicylic acid and related compounds. *Naturwissenschaften*, 42 :175–176. [46](#)
- Wiedemann, E. (1888). Ueber fluorescenz und phosphorescenz i. abhandlung. *Annalen der Physik*, 270(7) :446–463. [4](#)
- Witter, A., Mabury, S., and Jones, A. (1998). Copper (ii) complexation in northern california rice field waters : an investigation using differential pulse anodic and cathodic stripping voltammetry. *Science of the total environment*, 212(1) :21–37. [50](#)
- Yan, M., Ma, X., and Cheng, J. (2013). Characterizing interactions between suwannee river dissolved organic matter and cu (II) using fluorescence excitation- emission matrices and parallel factor analysis. *Journal of Water Sustainability*, 3 :165–177. [93](#), [117](#), [120](#)
- Yousif, Y. Z. and Faris, A.-I. J. (1989). Spectrophotometric study of the effect of substitution on the thermodynamic stability of the 1 :1 complexes of the dioxouranium(II) ion with mono-substituted salicylic acids in aqueous media. *Transition Metal Chemistry*, (14) :123–126. [85](#), [86](#)

- Zepp, R. G., Sheldon, W. M., and Moran, M. A. (2004). Dissolved organic fluorophores in southeastern us coastal waters : correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices. *Marine Chemistry*, 89(1) :15–36. [26](#), [68](#)
- Zhang, C., Howell, R. C., Scotland, K. B., Perez, F. G., Todaro, L., and Francesconi, L. C. (2004). Aqueous speciation studies of europium(III) phosphotungstate. *Inorganic Chemistry*, 43(24) :7691–7701. [42](#)
- Zhao, J. and Nelson, D. J. (2005). Fluorescence study of the interaction of suwannee river fulvic acid with metal ions and Al^{3+} –metal ion competition. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(2) :383–396. [121](#), [123](#)
- Zhu, B., Pennell, S. A., and Ryan, D. K. (2014). Characterizing the interaction between uranyl ion and soil fulvic acid using parallel factor analysis and a two-site fluorescence quenching model. *Microchemical Journal*, 115 :51–57. [43](#), [130](#), [134](#)
- Zhu, B. and Ryan, D. K. (2016). Characterizing the interaction between uranyl ion and fulvic acid using regional integration analysis (RIA) and fluorescence quenching. *Journal of Environmental Radioactivity*, 153 :97–103. [38](#), [43](#), [130](#), [134](#)

Troisième partie

Annexes

Annexe A

Poster EGU 2016

Interactions between natural organic ligands and Europium (III) studied by fluorescence lifetime and fluorescence quenching

A. Nouhi ^{a,*}; H. Hajjoul ^a; R. Redon ^a; J.P. Gagné ^b; S. Mounier ^a

^a Laboratoire PROTEE, Université de Toulon, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, FRANCE

^b Institut des sciences de la mer de Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Québec, CANADA

*Author for correspondence : nouhi@univ-tln.fr



Abstract

The aim of this study was to characterize interactions between natural organic ligands and trace metals using Time-Resolved Laser Spectroscopy (TRLFS) to evaluate the fluorescence lifetime of the fluorophore, the occurrence of quenching in presence of metal, discuss its mechanism and estimate conditional stability constants if a complex organic ligand-metal is formed.

Introduction

Improved insight on the interactions between natural organic ligands and trace metals is of paramount importance for better understanding transport and toxicity pathways of metal ions in the environment.

Fluorescence spectroscopy allows introspecting ligands-metals interactions. Time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) measures fluorophore lifetime probing the local molecular environment.

In TRLFS, the study of fluorescence decay's laws induced will allow to exactly qualify the type of interaction. The crucial point of the temporal deconvolution will be the evaluation of the best fitting between the different physical models and the decays measured.

Conclusion

□ The complexation of Europium and Salicylic acid/Humic acids was studied by fluorescence quenching and the application EEMF-PARAFAC decomposition and TRLFS using a nanosecond pulsed laser.

□ The main benefit of these techniques for this study was to obtain information about the fluorescence quenching that takes place, the fluorescence lifetime and the stability constant.

□ TRLFS employing the fluorescence of ligands can be used to evaluate Eu-salicylate and Eu-Humic acid complex formation and other Lanthanides/Actinides complex formation.

Experimental setup

- Natural organic matters from St. Laurent Estuary in Canada are obtained following the IHSS protocol.



- Humic acids (HA) and Fulvic acids (FA) are extracted and the respective used concentrations are 110,54 ppm and 168,93 ppm
- Logarithmic addition of metals

Sample s	Eu 2 6.5x10 ⁻⁵ M (μL)	Eu 1 6.5x10 ⁻⁵ M (μL)	Eu 0 6.5x10 ⁻⁵ M (μL)	Humic Acid/Salicylate (μL)	Buffer (pL) (HEPES 0.1M) pH7	Ultrapure Water (μL)
1	0			300/1000	1000	1700/1000
2	100			300/1000	1000	1600/900
3	500			300/1000	1000	1200/500
4		25		300/1000	1000	1675/975
5		50		300/1000	1000	1650/950
6		250		300/1000	1000	1450/750
7		1000		300/1000	1000	700/0
8			25	300/1000	1000	1675/975
9			100	300/1000	1000	1600/900
10			200	300/1000	1000	1500/800
11			600	300/1000	1000	1100/400
12			1000	300/1000	1000	700/0

Table 1: The experimental logarithmic additions of different metal concentrations

- Steady-state measurements are obtained using a spectrophotometer HITACHI F4500.



- TRLFS is a particular fluorescence technique for fluorescent ligands and metal ions. The main advantages over other techniques are its non-destructiveness, and high sensitivity and selectivity.



Fluorescence quenching – Steady-state results

- The steady-state measurements provides the Excitation-Emission Matrices of Fluorescence (EEMFs). This technique, while combined with a statistical method called Parallel Factor Analysis (PARAFAC) allows to extract the fluorescent components.

Salicylic Acid - Europium

- This study has been done in two steps :
 - First, we have examined the interactions between Salicylic acid (5.10⁻⁴ M) and Europium in order to calibrate our assays and compare our results with literature [1]. Two components were identified by PARAFAC analysis.

After processing the EEMFs, The fluorescence quenching curves of PARAFAC derived components with Eu³⁺ is shown in Figure 1, we found a fluorescence intensity decay by about 50%.

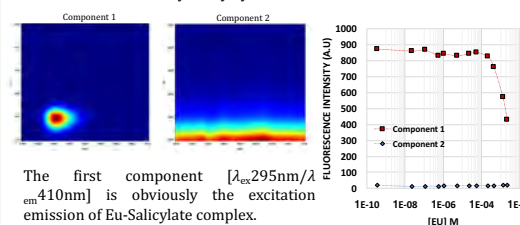


Figure 1 – Fluorescence quenching curve of salicylic acid and Europium after PARAFAC decomposition.

The first component [λ_{ex} 295nm/ λ_{em} 410nm] is obviously the excitation emission of Eu-Salicylate complex.

The second component doesn't show any variations, nor fluorescence pic. Thus, it appears to be a noise factor

Humic Acid - Europium

- In the second step, we have studied the interactions between Eu³⁺ and two types of natural organic matters but only the results obtained with humic acids are shown above.

The fluorescence quenching curve of the three components is shown in figure 2 :

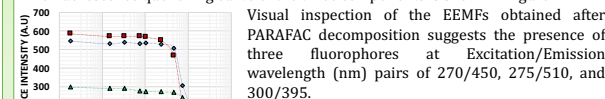


Figure 2 – Fluorescence quenching curve of Humic acid and Europium obtained after PARAFAC decomposition.

The first component which is visible in the ultraviolet range has been designated as pic A and attributed to humic substances in interaction with Eu³⁺. The fluorescence intensity decay appears to be 95,55%

The second one shows a longer emission wavelength characteristic of a high conjugated structure usually found in soils. This component behaves similarly to component 1 and shows an intensity decay by about 90,75%. And the third component is more relative to the protein-like structures and presents a weaker quenching effect meaning that the fluorescent chemical function is less affected by metal or less complexing.

Fluorescence lifetime measurements

- The selectivity of TRLFS is based on the differences in the spectral shapes and fluorescence decay lifetimes among different chemical species of a fluorescent ligand or metal ion.
- Lifetime analysis will allow us to identify which process (dynamic or static quenching) contribute to the quenching of fluorescence in the Eu-salicylate and Eu-Humic acid system.

- If dynamic quenching takes place, the lifetime and the intensity of the fluorescence follows the relationship [2] :
$$I_0/I = \tau_0/\tau$$

- As the decay was found to be mono-exponential, the lifetime τ was determined to be 4.28±0.3ns

- The value of τ_0/τ was found to be independent of total concentration of Eu³⁺ This indicates that the observed quenching is a static quenching process in agreement with the literature[1][3]

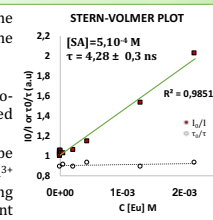


Figure 3 – Stern-Volmer plot of Eu-Salicylate complex

Ligand	Log $\beta_{1,1}$ *	Fluorescence lifetime (ns)	N° Factors	Core consistency (%)
Salicylic acid	3,01	4,28 ± 0,3 ns	2	99,67

Table 2: PARAFAC and fluorescence characteristics of Eu(III)-Salicylate complexation

* Condition stability binding determined by modified Ryan & Weber Model

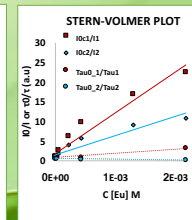


Figure 5 – Stern-Volmer plot of Eu-Humic acid complex

acid complex		that the first component has a stronger binding capability than the second one.				
Ligand	Log $\beta_{1,1}$ *	Log $\beta_{2,1}$ *	Fluorescence lifetime (ns)	N° Factors	Core consistency (%)	
Component 1		Component 2				

Table 3: PARAFAC and fluorescence characteristics of Eu(III)-humic acids complexation.

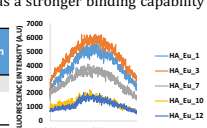


Figure 6 – Fluorescence quenching spectra of humic acids and Europium

References :

- Aoyagi, N., Toraishi, T., Geipel, G., Hotokezaka, H., Nagasaki, S., & Tanaka, S. (2004). Fluorescence characteristics of complex formation of europium (III)-salicylate. *Radiochimica Acta*, 92(9-11), 589-593.
- Lakowicz, J. R., & Masters, B. R. (2008). Principles of fluorescence spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(2), 029901.
- Barkleit, A., Acker, M., & Bernhard, G. (2013). Europium (III) complexation with salicylic acid at elevated temperatures. *Inorganica Chimica Acta*, 394, 535-541.
- Lukman, S., Saito, T., Aoyagi, N., Kimura, T., & Nagasaki, S. (2012). Speciation of Eu 3+ bound to humic substances by time-resolved laser fluorescence spectroscopy (TRLFS) and parallel factor analysis (PARAFAC). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 88, 199-215.

Annexe B

Données complémentaires sur l'AS, l'AH et l'AF sans métal

B.1 Acide salicylique

B.1.1 MEEFs Brutes

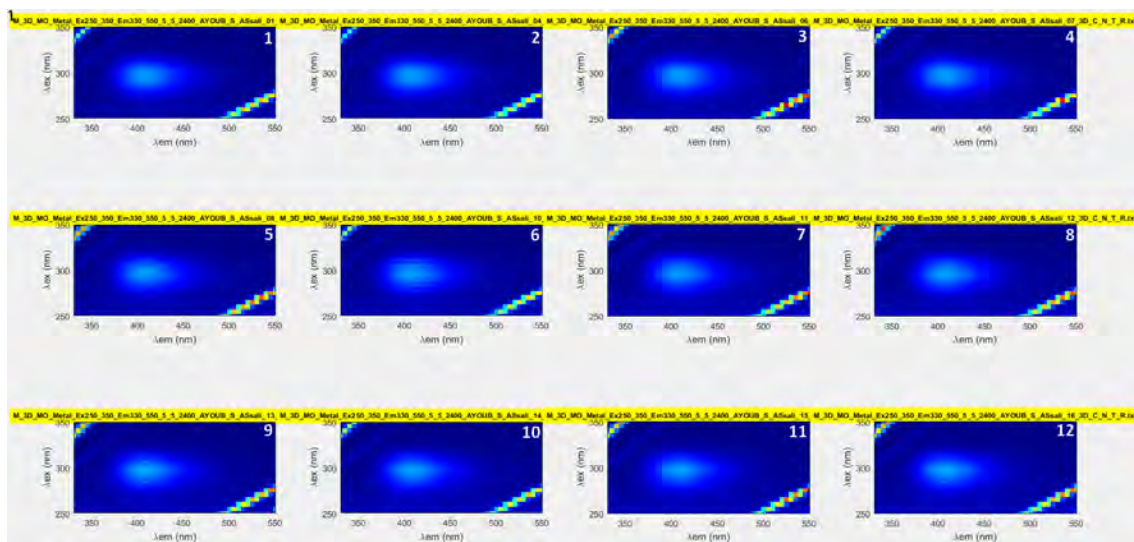


Figure B.1 – MEEFs brut (sans correction de la diffusion) de l'acide salicylique sans ajouts de métal

B.1.2 MEEFs corrigées

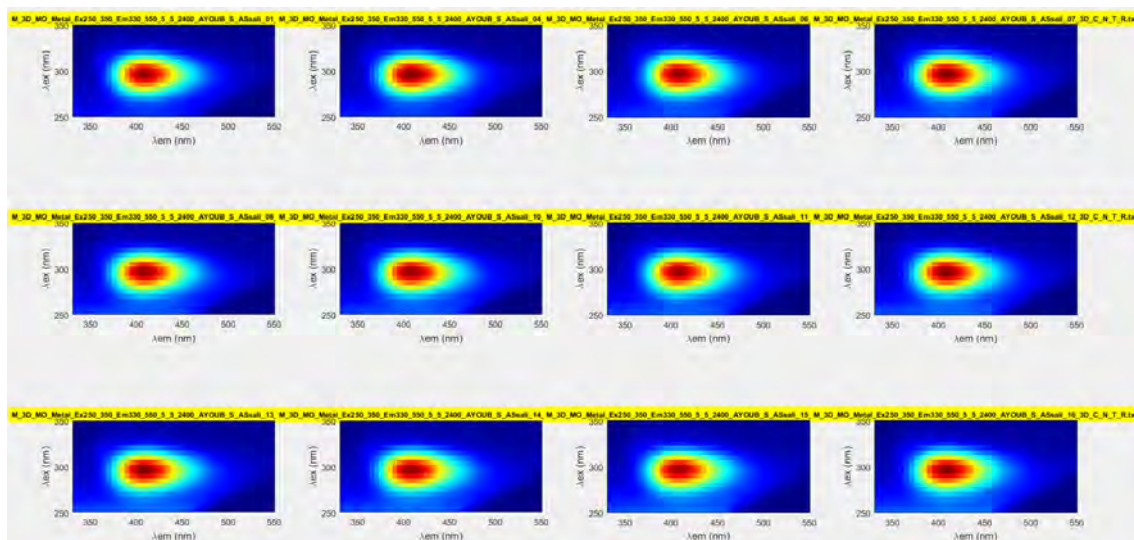


Figure B.2 – MEEFs corrigées de l'acide salicylique sans ajouts de métal (même ordre)

B.1.3 Décomposition CP/PARAFAC

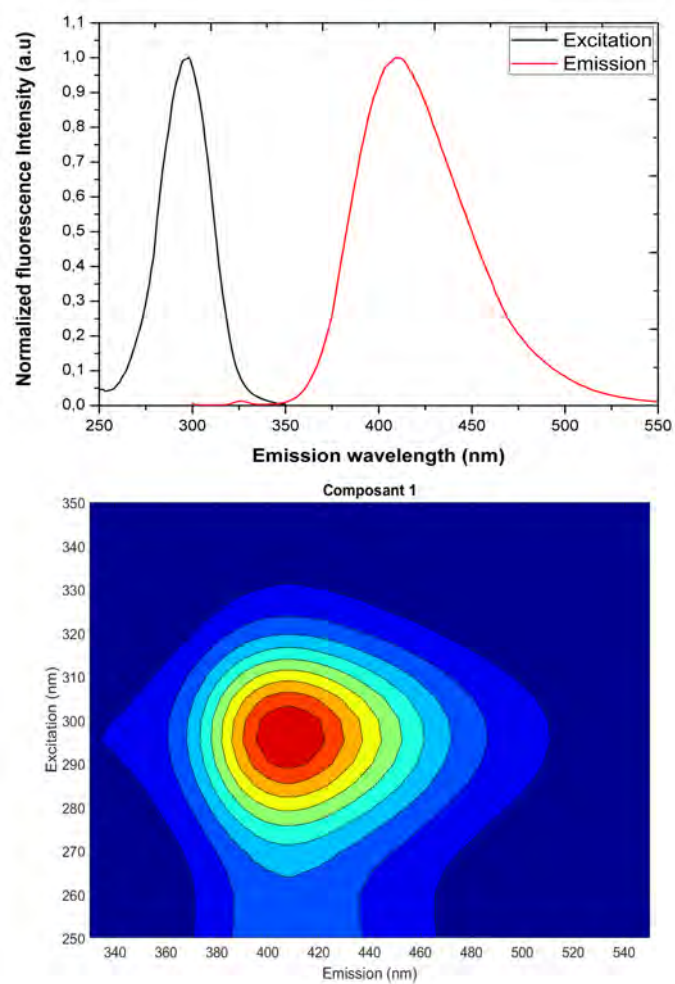


Figure B.3 – Décomposition CP/PARAFAC des 12 matrices de l'acide salicylique sans ajouts métal

B.2 Acide humique

B.2.1 MEEFs brutes

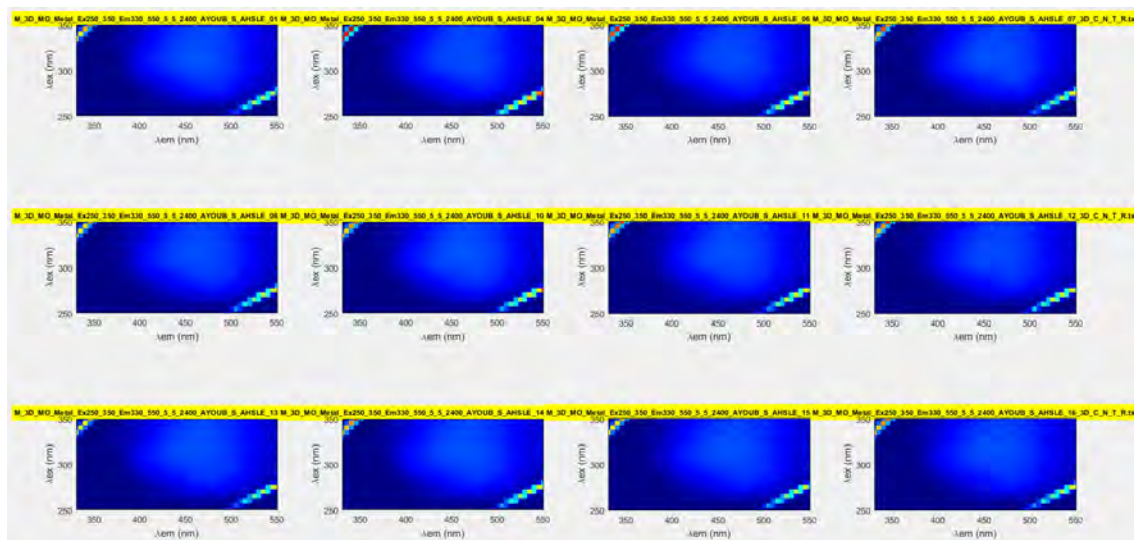


Figure B.4 – MEEFs brut (sans correction de la diffusion) de l'acide humique sans ajouts de métal

B.2.2 MEEFs corrigées

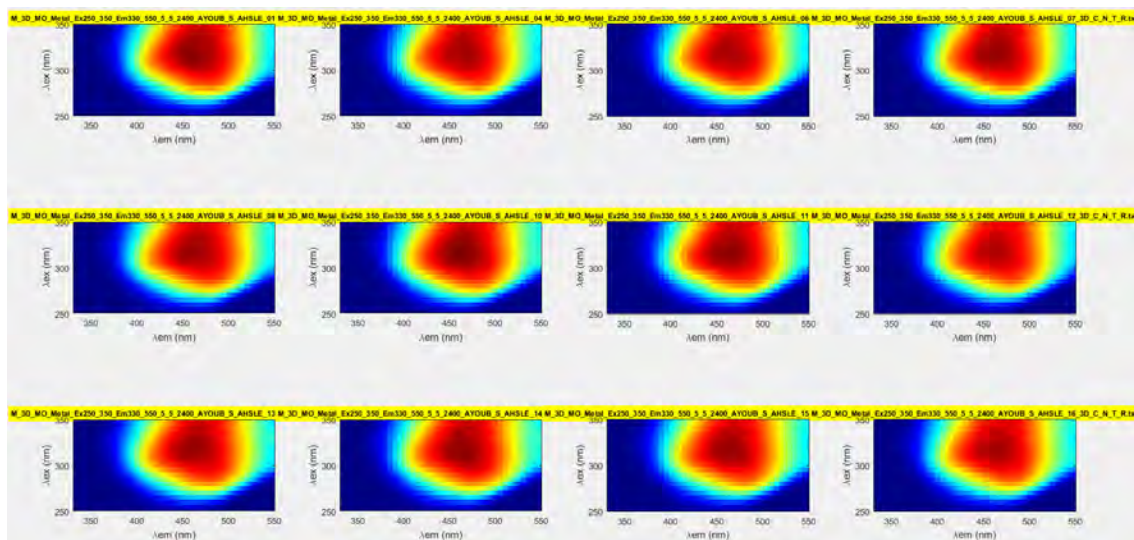


Figure B.5 – MEEFs corrigées de l'acide humique sans ajouts de métal

B.2.3 Décomposition CP/PARAFAC

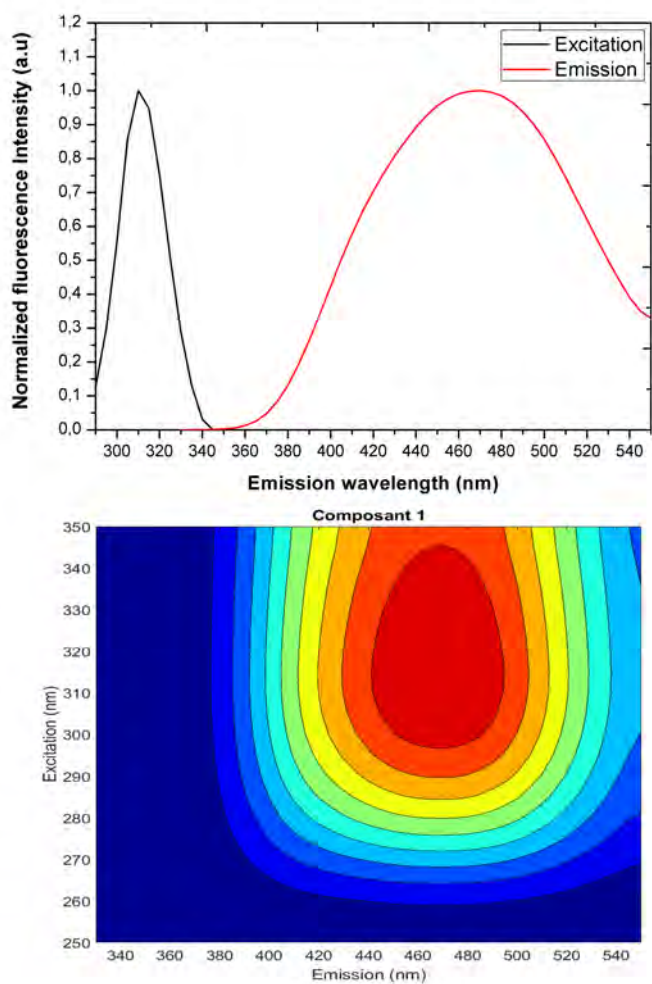


Figure B.6 – Décomposition CP/PARAFAC des 12 matrices de l'acide humique sans ajouts de métal

B.3 Acide fulvique

B.3.1 MEEFs brutes

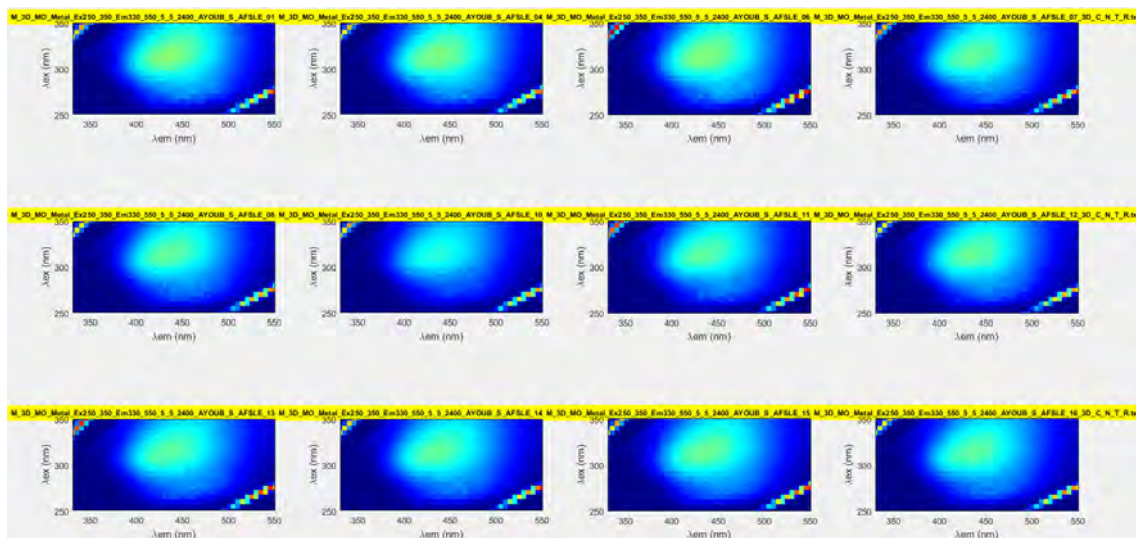


Figure B.7 – MEEFs brut (sans correction de la diffusion) de l'acide fulvique sans ajouts de métal

B.3.2 MEEFs corrigées

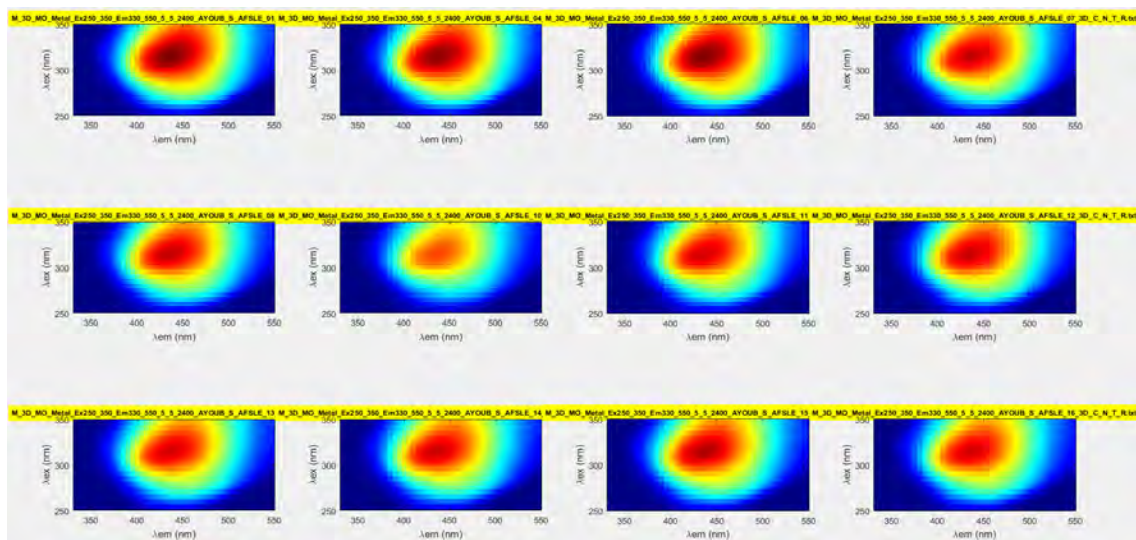


Figure B.8 – MEEFs corrigées de l'acide fulvique sans ajouts de métal

B.3.3 Décomposition CP/PARAFAC

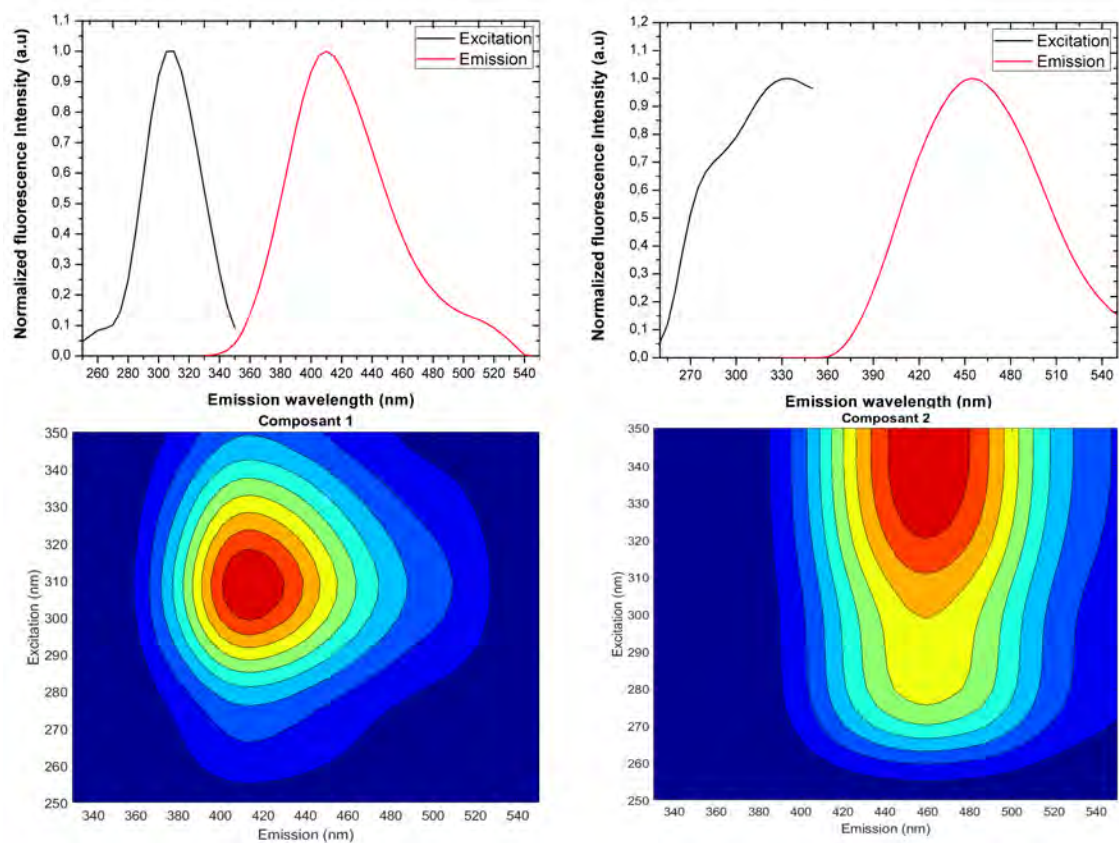


Figure B.9 – Décomposition CP/PARAFAC des 12 matrices de l'acide fulvique sans ajouts de métal

Annexe C

Protocole expérimental des solutions métalliques

ETM	[C _{initiale}] mol.L ⁻¹	[V _{initial}] mL	[V _{HEPES}] mL	[C]–2 mol.L ⁻¹	[C]–1 mol.L ⁻¹	[C]–0 mol.L ⁻¹	pH mesuré
CuSO₄	1,45.10 ⁻²	25	25	7,25.10 ⁻³	–	–	6,15
		0,5	49,5	–	7,25.10 ⁻⁵	–	6,20
		0,5	49,5	–	–	7,25.10 ⁻⁷	6,22
AlCl₃	1,8.10 ⁻²	25	25	9.10 ⁻³	–	–	5,89
		0,5	49,5	–	9.10 ⁻⁵	–	5,95
		0,5	49,5	–	–	9.10 ⁻⁷	5,99
As(V)	1.10 ⁻²	25	25	6,67.10 ⁻³	–	–	6,90
		0,5	49,5	–	6,67.10 ⁻⁵	–	7,05
		0,5	49,5	–	–	6,67.10 ⁻⁷	7,17
Europium 2% HNO₃	6,50.10 ⁻³	25	25	2,89.10 ⁻³	–	–	6,94
		0,5	49,5	–	2,89.10 ⁻⁵	–	7,02
		0,5	49,5	–	–	2,89.10 ⁻⁷	7,11
Uranium 2 à 5% HNO₃	4,20.10 ⁻³	25	25	1,46.10 ⁻³	–	–	6,85
		0,5	49,5	–	1,46.10 ⁻⁵	–	6,82
		0,5	49,5	–	–	1,46.10 ⁻⁷	6,86

Tableau C.1 – Procédure expérimentale de préparation des différentes solutions de métal

Résumé :**Caractérisation Spectrale et Temporelle par Quenching de Fluorescence des interactions Matière Organique–Éléments Métalliques**

L'étude du comportement des éléments métalliques est primordiale compte tenu leur effet souvent toxique dans de nombreux écosystèmes. Ces derniers lorsqu'ils interagissent avec la Matière Organique (MO), peuvent former des complexes plus ou moins stables. Ainsi, la MO joue un rôle important dans leur spéciation chimique et leur transport. Dans ce travail, l'analyse de cette complexation est réalisée par Quenching de Fluorescence (QF). Cette technique permet de modéliser la fixation des sites de complexation à l'aide d'une constante thermodynamique déterminée à partir d'un modèle 1 : 1. Le quenching de fluorescence a été mesuré par spectroscopie de fluorescence en mode stationnaire et en mode résolue en temps. Les mesures de fluorescence en mode stationnaire fournissent des Matrices d'Excitation et d'Émission de Fluorescence (MEEFs). L'extraction des différents composants de ces MEEFs est effectué par séparation de sources : la décomposition multilinéaire CP/PARAFAC, qui permet de caractériser spectralement les composants. Les mesures par Spectroscopie Laser Résolue en Temps (SLRT) permettent une caractérisation spectrale et temporelle des composants fluorescents. L'étude des lois de décroissance de la fluorescence induite par impulsion laser nanoseconde en l'occurrence a permis de déterminer le type d'interaction entre la MO et les quenchers. Pour se faire, un algorithme de déconvolution temporelle a été appliqué à chaque décroissance de fluorescence mesurée. L'interprétation des données temporelles a été accomplie en utilisant le graphique de Stern–Volmer. Les résultats des interactions du cuivre, de l'euporium et de l'uranium avec les Acides Humiques (AH) et les Acides Fulviques (AF) montrent des décroissances de fluorescences importantes et des constantes de stabilité entre 2,04 et 4,52. Le cuivre a permis de valider notre modèle d'étude et l'interaction de l'euporium et l'uranium avec les AH et AF étudiés a révélé des constantes de stabilité en général en bonne corrélation avec la littérature. Les résultats de la SLRT ont souvent révélé des décroissances bi-exponentielles et des temps de vie entre 0,40 et 14 ns et montrent que les interactions étudiées ont principalement engendrer un quenching statique et donc la formation d'un complexe moléculaire à l'état fondamental. Cette étude a donc permis par caractérisation spectrale et temporelle, de déterminer l'interaction de la matière organique avec les métaux plus ou moins toxiques.

Mots-clés : Spectroscopie laser résolue en temps – Quenching de fluorescence – MEEFs – CP/PARAFAC – Matière organique dissoute – Éléments métalliques – Complexation

Abstract :**Spectral and Temporal Characterization of Organic Matter–Metal Elements by Fluorescence Quenching**

The study of metal elements behavior, considering their impact in various ecosystems, is of paramount importance. The latter, upon contact with Organic Matter (OM) can form weak or strong stable complexes. Therefore, OM plays an important role in their chemical speciation and transport. The analysis of these properties is carried out by Fluorescence Quenching (QF). This technique allows introspecting ligands–metal interactions and the 1 : 1 modeling (one ligand site, one metal) gives information about the conditional thermodynamic constant. Fluorescence quenching was measured using steady–state and time–resolved fluorescence spectroscopy. The steady–state measurements provides Excitation and Emission Matrices of fluorescence (EEMs). The extraction of the different components from these matrices is carried out by a multi–mode factor analysis such as CP/PARAFAC, which allows a spectral composition of the samples. Time-Resolved Laser Spectroscopy (TRLS) measurements allow temporal and spectral characterization of the fluorescent components. Indeed, the study of the fluorescence decays induced by a nanosecond pulsed laser in this case allowed to measure the interaction between the OM and the quencher. For those purposes, a fluorescence lifetime deconvolution algorithm was applied to each fluorescence decay. Analysis of the fluorescence lifetime data was accomplished using the Stern–Volmer plot which gave reliable information on the quenching process that takes place. Copper, europium and uranium interactions with Humic Acids (HA) and Fulvic Acids (FA) shows significant fluorescence decays and stability constants between 2.04 and 4.52. Copper allowed to calibrate our model study and the interactions of europium and uranium with the HA and FA studied reported stability constants in agreement with the literature. TRLS results have often revealed a bi-exponential decays and fluorescence lifetimes between 0.40 and 14 ns and shows that the studied interactions mainly lead to static quenching and thus the formation of a molecular complex in the ground state. This study has allowed spectral and temporal characterization to determine organic matter interaction with toxic metals.

Keyword : Time-Resolved Laser induced fluorescence spectroscopy – Fluorescence quenching – EEMs – CP/PARAFAC – Dissolved organic matter – Metal elements – Complexation

