Fluorescence et propriétés photochimiques des matières organiques naturelles

Christian Coelho

▶ **To cite this version:**

Christian Coelho. Fluorescence et propriétés photochimiques des matières organiques naturelles. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF21986 . tel-00724606

HAL Id: tel-00724606

https://theses.hal.science/tel-00724606

Submitted on 21 Aug 2012

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.

N° d'Ordre : D.U.1986

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

U.F.R. Sciences et Technologies

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES N°624

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Chimie-Physique

par **Christian COELHO**

FLUORESCENCE ET PROPRIETES PHOTOCHIMIQUES DES MATIERES ORGANIQUES NATURELLES

A soutenir publiquement devant la commission d'examen :

Rapporteurs :	E. OLIVEROS	Directrice de recherche CNRS - Toulouse
	E. PARLANTI	Chargée de recherche CNRS - Bordeaux
Examinateurs :	M. BENEDETTI	Professeur des universités – Paris
	C. RICHARD	Directrice de recherche CNRS – Clermont-Ferrand
	A. ter HALLE	Chargée de recherche CNRS – Clermont-Ferrand
	G. GUYOT	Maître de conférences – Clermont-Ferrand

Sommaire

Abréviations **1**

Chapitre I. Introduction **3**

Chapitre II. Partie bibliographique **7**

II.1. Généralités sur la photochimie **8**
II.1.1. La lumière 8
II.1.2. Interactions lumière / molécule organique : le diagramme d'énergie de Perrin-Jablonski 10
II.1.3. Réactions photochimiques 12
II.2. Propriétés des Matières Organiques Naturelles (MON) **14**
II.2.1. Concepts sur les substances humiques 14
II.2.2. Propriétés optiques des MON 19
II.3.Réactivités photochimiques des Matières Organiques Naturelles (MON) **23**
II.3.1. Généralités 23
II.3.2. Les états excités triplets : ^{3}cDOM* 24
II.3.3. L'oxygène singulet : $^{1}O_2$ 24
II.3.4. D'autres espèces réactives 26

Chapitre III. Techniques expérimentales **27**
III.1. Réactifs utilisés **28**
III.1.1. Substrats 28
III.1.2. Solutions tampons 28
III.1.3. Actinométrie 28
III.1.4. Substances humiques et matières organiques 28
III.2. Préparation des solutions **31**
III.2.1. Généralités 31
III.2.2. Conditions expérimentales 31
III.3. Dispositifs d'irradiation **32**
III.3.1. Irradiation en lumière polychromatique artificielle (300-450 nm) 32
III.3.2. Irradiation en lumière solaire 33
III.4. Techniques d'analyses **33**
III.4.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible 33
III.4.2. Spectroscopie d'émission moléculaire 34
III.4.3. Carbone organique total (TOC) 36
III.4.4. Techniques chromatographiques 38
III.5. Actinométrie **39**

Chapitre IV. Fractionnement et étude des propriétés spectroscopiques et photochimiques des acides humiques de sols **40**
IV.1. Introduction **41**
IV.2. Etude sur des fractions de l'acide humique HAK **48**
IV.2.1. Détails du fractionnement 48
IV.2.2. Analyses des fractions 49
IV.2.3. Propriétés spectrales 50
IV.2.4. Propriétés photosensibilisatrices 62

IV.2.5. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices 67
IV.3. Etude sur les extraits hydrosolubles des sols Chernozem Kursk et Elliott 69
IV.3.1.Détails de l'extraction 69
IV.3.2. Analyses 69
IV.3.3. Propriétés spectrales 70
IV.3.4. Propriétés photosensibilisatrices 74
IV.3.5. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices 75
IV.4. Discussion générale 76
IV.5. Conclusions 79

Chapitre V. Etude des propriétés spectroscopiques et photochimiques de matières organiques extraites de composts 80
V.1. Introduction 81
V.2. Etude comparative de matières organiques extraites de compost 85
V.2.1. Origine des composts 85
V.2.2. Extraction des HLA et des fractions aqueuses de compost 87
V.2.3. Analyses des extraits de composts 89
V.2.4. Analyses spectrales 92
V.2.5. Propriétés photosensibilisatrices **102**
V.2.6. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices **106**
V.2.7. Bilan sur les analyses des extraits de compost **108**
V.3. Photosensibilisation de polluants réfractaires 110
V.4. Conclusions 115

Chapitre VI Corrélations entre l'émission moléculaire et la production de l'oxygène singulet des substances humiques : vers une identification moléculaire ? 116
VI.1. Introduction 117
VI.2. Corrélations entre I_F* et k^*_{FFA} 120
VI.2.1. Extension des propriétés photosensibilisatrices et émissives de MON à des HA, FA et MON supplémentaires 120
VI.2.2. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices 121
VI.3. Déconvolution des spectres d'émission moléculaire 124
VI.3.1 Description de la méthode de déconvolution 124
VI.3.2. Validation de la méthode de déconvolution 126
VI.3.3. Corrélation entre la production d'oxygène singulet et les composantes émissives de type gaussienne localisées au-delà de 500 nm 131
VI.4. Conclusions 133

Conclusions et perspectives 134

Références bibliographiques 138

ANNEXES 145

Remerciements

Je remercie, tout d’abord, Claire Richard, directrice du laboratoire, de m’avoir accueilli au sein du laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire et de m’avoir encadré et consacré du temps à m’apprendre la photochimie et sa vision futuriste des MON. Ses remarques et corrections avisées ont également grandement contribué à la rédaction de ce mémoire.

Un grand merci à Ghislain Guyot qui m’a appris les techniques spectroscopiques et avec qui j’ai toujours aimé avoir des discussions scientifiques, à la limite de la philosophie.

Je remercie aussi Alexandra ter Halle qui m’a encadré tout au long de ma thèse.

Tout au long de ces trois années de thèse, j’ai eu la chance de rencontrer des étudiants stagiaires et doctorants, des post-doctorants et des ATER, avec qui j’ai aimé partager ma vision optimiste de la recherche et des conseils que nous avons pu nous échanger. Je remercie ainsi mes collègues de bureau : Matthieu, Sabrina, Boris et Marie et Lei. Merci aussi à Delphine, Marius, Marcello, Michal, Harout, Tiffany, Natacha, Sébastien, Lubomir, Denis, Solène, Julien, Jean-François, Matthieu et Sylvain.

Je tiens à remercier le personnel technique du laboratoire : Guillaume, Bernadette, Sébastien, Claire, Haussmann et Jean Philippe, qui se sont toujours montrés disponibles et serviables.

Enfin, je me dois de remercier mes amis le plus proches, mes parents et mon frère qui ne sauront toujours pas ce que j’ai fait pendant ces trois années de travail mais qui m’ont toujours encouragé et donné la bonne humeur. Merci à mon oncle René et à Emilie.

Abréviations

Techniques expérimentales

A_{254}/A_{365}	Absorbance à 254 nm divisée par l'absorbance à 365 nm
A_λ	Absorbance à la longueur d'onde λ
DOC	Carbone organique dissous
EEM	Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence
ε^*_λ	Absorbance normalisée, à une mole de carbone organique par litre, à la longueur d'onde λ ($(mol\ C_{org})^{-1}.L.cm^{-1}$)
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HIX	Indice d'humification (Zsolnay et al., 1999)
I_F	Intensité de fluorescence
I_F^*	Intensité de fluorescence normalisée à une mole de carbone organique par litre
k_{FFA}	Constante de vitesse de disparition de l'alcool furfurylique (s^{-1})
k^*_{FFA}	Constante de vitesse de disparition de l'alcool furfurylique (s^{-1}), normalisée à une mole de carbone organique par litre
k_{TMP}	Constante de vitesse de disparition du 2,4,6-triméthylphénol (s^{-1})
k^*_{TMP}	Constante de vitesse de disparition du 2,4,6-triméthylphénol (s^{-1}), normalisée à une mole de carbone organique par litre
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolet

Matières organiques de sols et de composts

cDOM	Matière organique dissoute colorée
DOM	Matière organique dissoute
Ell	Sol Elliott (Etats-Unis)
FA	Acide fulvique
FLA	Acide de type fulvique
GM	Compost Green Manure (Italie)
HA	Acide humique
HLA	Acide de type humique
HLS	Substances de type humique
HS	Substances humiques de sol
K	Sol chernozem, provenant de la région Kursk (Russie)
MON	Matière organique naturelle
NR	Réservoir Nordique
SR	Rivière Suwannee
UB	Compost Urban Biowaste (Italie)
WEOM	Extrait aqueux de matière organique de sol ou de compost

WEOM $_{1:200}$	Extrait aqueux de matière organique de compost à l'eau ultrapure avec un ratio d'extraction 1:200
WEOM $_{Volvic,\ 1:200}$	Extrait aqueux de matière organique de compost à l'eau minérale Volvic® avec un ratio d'extraction 1:200
WEOM $_{CaCl2\ 0,01\ M,\ 1:200}$	Extrait aqueux de matière organique de compost par une solution de $CaCl_2$ (10^{-2} M) avec un ratio d'extraction 1:200

Produits chimiques

AMBA	Acide 2-amino-4-méthylsulfonyl-benzoïque
FFA	Alcool furfurylique
PNA	para nitroanisole
pyr	pyridine
TMP	2,4,6-triméthylphénol

Autres

Da	Dalton ($g.mol^{-1}$)
IHSS	International Humic Substance Society
MW	Masse moléculaire

Chapitre I

Introduction

Les substances humiques sont abondamment présentes dans les compartiments sol et eau de l'environnement. Ces composés sont formés au cours d'un processus naturel, de nature essentiellement microbiologique, qui transforme une partie du carbone végétal ou animal en composés plus stables que les formes initiales. L'humification est donc une forme de "stockage" du carbone organique dans les sols. Les acides humiques et fulviques constituent une grande partie du carbone organique dissous dans les eaux de surface (30 à 50 %) ou présent dans les sols (60 à 90 %). Ces composés ont la propriété d'absorber fortement la lumière solaire. Cela leur confère des propriétés photodégradantes à l'égard des composés organiques. Les substances humiques (SH) et les matières organiques dissoutes colorées (cDOM) influencent donc le devenir des micropolluants organiques rejetés dans l'environnement.

Les études sur la photochimie des substances humiques ont débuté au Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire (LPMM) en 1993. Les premiers travaux ont consisté à caractériser les espèces réactives générées par irradiation de ces composés (radicaux hydroxyle, oxygène singulet, électrons solvatés). Des substances humiques de différentes origines et de différentes natures (acides humiques, acides fulviques) ont été étudiées. Il est apparu que toutes possédaient des propriétés sensibilisatrices/photoinductrices. Par la suite, les recherches se sont concentrées sur les états excités triplets des substances humiques. Il a été démontré que les états excités triplets qui produisent de l'oxygène singulet sont également des oxydants capables de réagir directement avec les composés organiques. Si les propriétés photodégradantes des substances humiques sont maintenant bien reconnues, en revanche, la nature des chromophores humiques impliqués dans ces réactions reste mystérieuse.

Les substances humiques étant des molécules très complexes, nous avons cherché à simplifier le problème en les fractionnant sur la base de leur taille moléculaire. Sur les trois fractions obtenues par couplage chromatographie d'exclusion stérique/électrophorèse, une seule, la fraction 5-30 kDa, s'est avérée contenir la grande majorité des chromophores sensibilisateurs. De plus, par spectroscopie de fluorescence nous avons montré que cette même fraction contenait la majorité des fluorophores.

Mon travail de thèse a eu pour objectif d'identifier les chromophores sensibilisateurs et fluorescents. Cette identification a reposé sur la caractérisation spectrale d'échantillons variés, sur une étude de photoréactivité et sur une tentative de localisation des chromophores recherchés en utilisant le fractionnement.

J'ai mis en place une méthode de comparaison des échantillons fiable et j'ai élargi les études à une grande variété de substances humiques, issues de sols et du milieu aquatique.

Ce manuscrit de thèse est divisé en 5 chapitres. Je décrirai les résultats obtenus sur un acide humique de sol et ses fractions. Le chapitre suivant est dédié aux études sur les composts. Enfin, le dernier chapitre concerne l'identification des chromophores sensibilisateurs et fluorescents. L'annexe rassemble l'ensemble des données en spectroscopies d'absorption et de fluorescence.

Outre le présent chapitre d'introduction, le chapitre **II** est une synthèse bibliographique qui présente des données de base sur la photochimie et l'état actuel des connaissances sur les substances humiques et leur réactivité.

Le chapitre **III** décrit les techniques analytiques mises en œuvre pour réaliser ce travail.

Dans le chapitre **IV**, je présente les résultats obtenus sur l'acide humique de sol chernozem Kursk et ses fractions. Deux types de fractions ont été testés. D'une part les trois fractions de masse 100-300 kDa, 30-100 kDa et 5-30 kDa obtenues précédemment par couplage chromatographie d'exclusion stérique/électrophorèse en présence d'urée et d'autre part celles de masse inférieure à 5 kDa obtenues par ultrafiltration en présence d'urée. L'objectif était de localiser les chromophores sensibilisateurs et fluorescents. Un protocole expérimental commun a été utilisé pour tester toutes les substances humiques. J'ai comparé leurs propriétés spectrales (absorption et émission) et l'aptitude à produire de l'oxygène singulet sous irradiation.

Le chapitre **V** est consacré aux matières organiques extraites de compost. Les composts renferment un pool de matière organique important, et il nous a semblé utile de comparer leurs propriétés à celles de sols. Plusieurs paramètres ont été étudiés : l'origine du

compost, le temps de compostage et l'extractant. Les matières organiques extraites de compost ont été testées selon le même protocole que celui utilisé pour les substances humiques. De plus, nous avons examiné leur capacité à photodégrader trois produits phytosanitaires biorécalcitrants.

Le chapitre **VI** regroupe l'ensemble des données sous formes de corrélations entre le caractère émissif des matières organiques et leur aptitude à produire de l'oxygène singulet. Un nombre important de substances humiques a été étudié, ce qui donne de l'intérêt aux corrélations obtenues. Les spectres d'émission ont été déconvolués afin de rechercher des composantes fluorescentes de type gaussien communes aux différents échantillons.

Les annexes rassemblent l'ensemble des spectres UV-visible des substances humiques et les données de fluorescence sous forme de matrices d'excitation et d'émission que j'ai mesurés.

Chapitre II

Partie bibliographique

II.1. Généralités sur la photochimie

II.1.1. La lumière (Biémont, 1996)

Selon J-C. Maxwell, la lumière peut être identifiée à un phénomène électromagnétique périodique se propageant à une vitesse v, une période T, une amplitude A et une fréquence ν.

Selon M. Planck, on peut également définir la lumière comme un flux de particules hypothétiques, appelées photons, ayant une masse nulle et une énergie E qui dépend de ν selon l'équation :

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

où E est l'énergie du photon (J), h est la constante de Planck (6,63 10^{-34} J.s), ν est la fréquence (s^{-1}). La longueur d'onde λ et la fréquence ν sont définies par les relations :

$$\lambda = vT \quad \text{et} \quad \nu = \frac{1}{T} = \frac{v}{\lambda}$$

Dans le vide, la vitesse de la lumière v, encore appelée célérité de la lumière, est notée c : elle est égale à environ 3.10^8 $m.s^{-1}$. Dans le domaine des spectroscopies, il est usuel d'exprimer une longueur d'onde en nm (1 nm = 10^{-9} m), et d'introduire le nombre d'onde $\overline{\nu}$ (unité habituelle : cm^{-1}) calculé comme l'inverse de la longueur d'onde λ (Braslavsky et al., 1996).

Un rayonnement lumineux peut être constitué d'une seule longueur d'onde (rayonnement monochromatique) ou de plusieurs (rayonnement polychromatique). La lumière peut être blanche (rayonnement polychromatique dans la région du spectre visible, par exemple la lumière solaire) ou noire (rayonnement de Wood formé de radiations ultraviolette auxquelles l'œil humain est insensible).

L'œil humain n'est capable de distinguer qu'une partie de la lumière que l'on appelle en conséquence lumière visible qui s'étend dans le domaine des radiations électromagnétiques de 390 nm (violet) à 750 nm (rouge) (Figure II. 1).

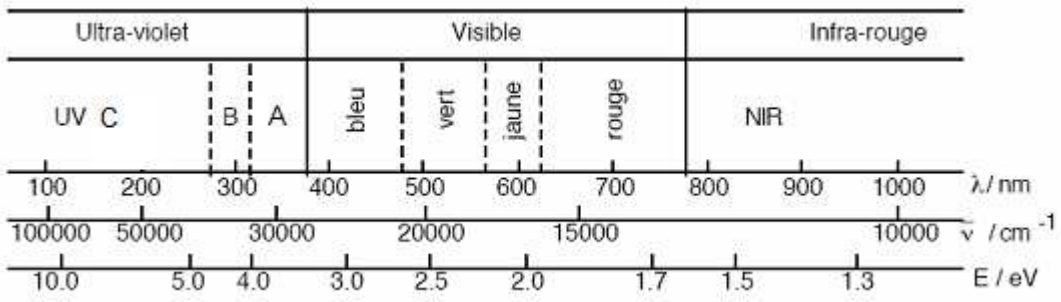


Figure II. 1 : Gamme de longueurs d'onde de l'ultraviolet au proche infrarouge.

Sur la Terre, les sources naturelles observées par l'œil humain sont les étoiles, en particulier le Soleil, dont l'irradiance spectrale est donnée Figure II. 2.

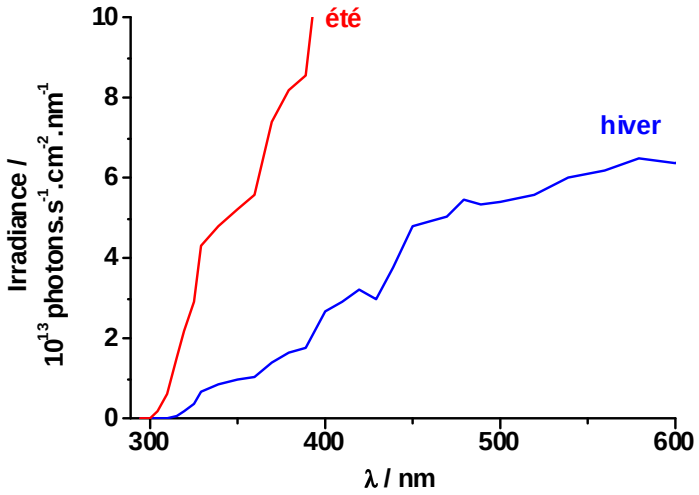


Figure II. 2 : Distribution spectrale des radiations solaires atteignant la surface de la Terre en été et en hiver, autour de 40° de latitude.

Outre les radiations visibles, la lumière solaire qui atteint la surface terrestre est composée de radiations de longueurs d'onde inférieures à 380 nm, les radiations ultra-violettes des domaines UV A et UV B, et de radiations de longueurs d'onde comprises entre 780 nm et 2500 nm (4000 cm^{-1}) appartenant au domaine du proche infrarouge. L'émission du rayonnement solaire reçu sur la Terre ne commence que dans le domaine des UV B, par suite de l'absorption des radiations du domaine UV C (15 à 280 nm) par l'atmosphère terrestre. Ce rayonnement solaire est néanmoins responsable de nombreuses réactions photochimiques, subies par les molécules inorganiques ou organiques. Le rayonnement visible est quant à lui indispensable à la photosynthèse, mais conduit au blanchiment de nombreux colorants.

Nous focaliserons notre attention sur les photoréactions subies par les molécules organiques soumises aux radiations UV-visible.

II.1.2. Interactions lumière / molécule organique : le diagramme d'énergie de Perrin-Jablonski

A l'obscurité et à température constante, une molécule organique est caractérisée par un état énergétique d'équilibre stable, appelé aussi état fondamental, et généralement de multiplicité de spin unitaire (2S+1 = 1, état électronique singulet). Cet état électronique fondamental est noté S_0 et il est décrit par différentes orbitales moléculaires dont l'occupation par des électrons est régie par plusieurs règles issues de la mécanique quantique (Hollas, 1998; Mc Quarrie D.A., 2000). Dans cet état électronique S_0, la dernière orbitale moléculaire remplie de plus haute énergie est appelée HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital). L'orbitale inoccupée de plus basse énergie est appelée LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Ces deux orbitales HOMO et LUMO sont respectivement à caractère n, σ ou π, d'une part, et σ* ou π* d'autre part.

L'apport d'énergie par absorption moléculaire d'un photon de fréquence ν conduit à une nouvelle répartition énergétique des électrons. La molécule est alors dans un nouvel état électronique plus énergétique, et donc instable, noté S_1 ou S_2 … La production de l'état électronique excité par l'absorption d'un photon et le devenir de cet état s'effectuent par différents processus indiqués dans le diagramme énergétique de Perrin-Jablonski (Figure II. 3) :

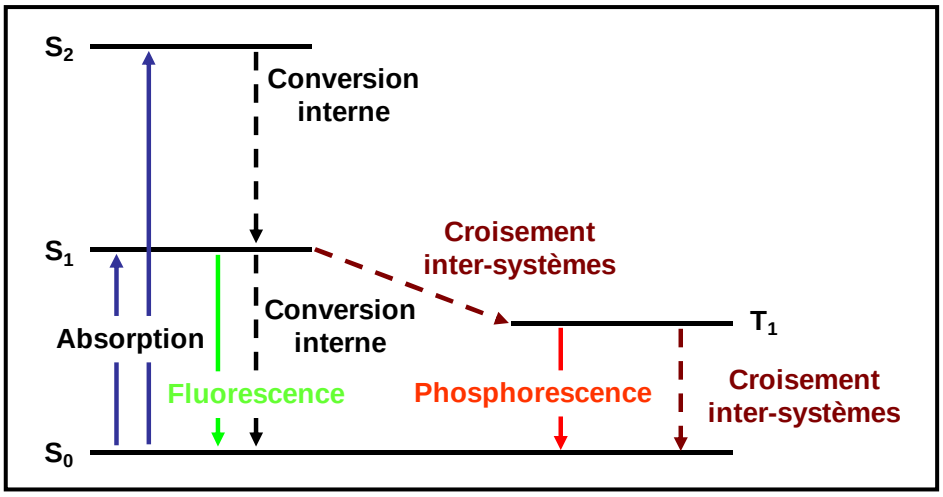


Figure II. 3 : Diagramme de Perrin-Jablonski.

♦ **l'absorption électronique** est un phénomène photophysique de très courte durée (10^{-15} s) et elle a lieu dans un domaine de longueur d'onde lié à la présence de certains motifs moléculaires absorbants, appelés chromophores (Rouessac, 1997). L'absorbance, également appelée densité optique (DO, ou OD, optical density), est définie à une longueur d'onde donnée et elle vérifie dans une gamme de concentration en chromophores, la loi de Beer-Lambert :

$$A_\lambda^i = \varepsilon_\lambda^i c^i l = \ln_{10} \frac{I_\lambda^0}{I_\lambda^t}$$

où A_λ^i est l'absorbance à longueur d'onde λ du composé i, ε_λ^i ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$) est le coefficient d'absorption molaire à longueur d'onde λ, c^i ($mol.L^{-1}$) est la concentration, l (cm) est le trajet optique, I_λ^0 est le flux lumineux incident et I_λ^t est le flux lumineux transmis.

♦ **la relaxation vibrationnelle et la conversion inter-systèmes**: après une excitation lumineuse, l'état électronique excité singulet produit peut donner lieu à une transformation chimique, se relaxer vibrationnellement par transition non radiative (conversion interne et/ou relaxation vibrationnelle) et produire l'état singulet S_1 ou se transformer par conversion inter-systèmes et relaxation vibrationnelle dans un état excité triplet T_1 (multiciplité de spin 2S+1 = 3). Ces processus ont des durées de vie de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-12} s.

♦ **la conversion interne** est une transition non radiative entre deux états électroniques de même multiplicité de spin (transition $S_2 \rightarrow S_1$ ou $S_1 \rightarrow S_0$, par exemple) qui s'effectue en solution par une relaxation vibrationnelle qui permet à la molécule d'atteindre le plus bas niveau vibrationnel de l'état électronique final en cédant de l'énergie aux molécules de solvant. Ces processus ont des durées de vie de l'ordre de 10^{-14} à 10^{-11} s.

♦ **la fluorescence** ($S_1 \rightarrow S_0$) et **la phosphorescence** ($T_1 \rightarrow S_0$) sont des processus radiatifs issus respectivement des états S_1 et T_1 qui permettent le retour à l'état électronique fondamental S_0, la molécule cédant son énergie sous forme d'un photon émis. Expérimentalement, ces deux types d'émission se différencient par :

- des longueurs d'onde d'émission plus courtes pour la fluorescence par rapport à celles observées pour la phosphorescence de la même molécule ;

- des durées de vie différentes des deux phénomènes, les états singulet (S_1) et triplet (T_1) de plus basse énergie ayant respectivement des durées de vie 10^{-10} à 10^{-8} s et de 10^{-7} à plusieurs secondes (Valeur, 2004).

II.1.3. Réactions photochimiques

J. Faure donne pour objet à la photochimie moléculaire de "décrire les processus physiques et chimiques engendrés par l'absorption de photons, sur la base d'un mécanisme qui prend en compte les changements d'états successifs de la molécule jusqu'au premier intermédiaire réactionnel, par exemple un état excité triplet (processus photophysique), ainsi que les réactions chimiques générées par cet intermédiaire" (Faure, 1994). Cette conception de la photochimie moléculaire a le mérite d'éviter une frontière entre photophysique décrivant uniquement les processus physiques issus des états excités primairement obtenus par l'absorption d'un photon, et photochimie définie comme ne décrivant que les processus conduisant à la formation de nouveaux produits chimiques.

T.-H. Tran-Thi et E. Amouyal remarquent que "les états excités, bien que fugaces, sont vraiment de nouvelles espèces chimiques qui, selon leur durée de vie, peuvent (photo)induire ou non des réactions chimiques : il n'est donc pas étonnant que la photochimie moderne se soit développée dès que les techniques d'impulsion de lumière aient été accomplies, de la microseconde à la femtoseconde (10^{-15} s), ce qui a valu le prix Nobel à R G. W Norrish et G Porter en 1967, et plus récemment à A. Zewail en 1999" (Tran-Thi T.H., 2007).

La description des états excités de molécules inorganiques ou organiques, et leur comportement, sont fornis dans plusieurs ouvrages de référence (Birks, 1973; Turro, 1978). Je me limiterai à indiquer quelques processus qui peuvent être engendrés par un rayonnement lumineux interagissant sur une molécule en solution aqueuse. Parmi ces processus, certains sont analogues à ceux pouvant se produire à l'état électronique fondamental (et donc non spécifiques à la photochimie) : isomérisation, cyclisation, addition, production de radicaux, réactions d'oxydoréduction et réactions acido-basiques. D'autres sont spécifiques aux états électroniques excités : par exemple les phénomènes d'émission de fluorescence ou de phosphorescence, la photoéjection d'électron, et les réactions de transfert d'énergie au cours desquelles un état excité peut transférer son énergie à une autre molécule présente dans la solution.

Enfin, il faut noter que l'étude des réactions chimiques a conduit au domaine de la photochimie préparative à l'échelle industrielle. E. Oliveros et M.L. Viriot (1994) distinguent les réactions photochimiques radicalaires en chaîne (photohalogénations, sulfochlorations,

sulfoxydations, photosulfhydrations, photooxydations du type I), les réactions photochimiques par étape(s) (photonitrosylations, photoisomérisations, photooxydations du type II, et diverses autres réactions photochimiques (photoadditions, photoannélations, photoréactions des dérivés carbonylés subdivisées en réactions de Norrish de type I ou II, photoénolisation). Tout l'art du photochimiste est donc de bien appréhender les propriétés d'absorption des composés éclairés, de connaître leurs états excités, d'analyser finement les différentes voies de désactivation des espèces excitées et enfin de tout mettre en œuvre pour privilégier le processus désiré.

Dans la chimie de l'environnement, ces différents types de réactions photochimiques doivent être étudiés pour une meilleure analyse des problèmes de contamination et de devenir de polluants organiques dans les différents compartiments aquatiques, terrestres et aériens. Dans son article sur le rôle de la lumière pour la protection de l'environnement, M-T. Maurette signale que pendant des siècles, "l'Homme a négligé son environnement car la nature semblait éliminer efficacement toutes les pollutions engendrées par ses activités" (Maurette, 2007). Aujourd'hui, la pollution de l'air, de l'eau ou des sols est due à un large éventail de composés plus ou moins toxiques.

Dans l'air, on retrouve majoritairement des aérosols, les oxydes de carbone ou d'azote, ainsi que les composés organiques volatiles, rejets des usines ou des voitures et du chauffage des habitations à l'heure où le bois redevient un combustible de choix.

L'eau, véhicule de pollution dans l'environnement, contient de nombreuses molécules minérales ou organiques et des biocontaminants. Il est donc primordial de pouvoir déceler ces polluants, de les discriminer et de les quantifier avant de les traiter ou de les éliminer. Ces objectifs ont conduit à un développement exponentiel de méthodes de détection et d'abattement des polluants. Parmi celles-ci, les méthodes non invasives utilisant la lumière sous différents aspects : détection par fluorescence, devenir de certains polluants, dont les pesticides, dans les milieux naturels sous rayonnement solaire.

"L'étude des sols et de leurs pollutions s'avère très délicate, le sol étant un milieu complexe et multifonctionnel : il est constitué d'une partie minérale (argiles, limons, sables, oxydes de métaux de transitions …) et d'une partie organique (acides humiques, fulviques …) qui lient les particules minérales" (Richard C., 2007). La suite de cette partie bibliographique se limitera aux propriétés optiques, structurales et photochimiques des matières organiques naturelles (MON) de sols.

II.2. Propriétés des Matières Organiques Naturelles (MON)

II.2.1. Concepts sur les substances humiques

Selon Stevenson (1982), les substances humiques (HS) sont des composés ubiquistes dans la nature. Elles constituent une part importante (jusqu'à 80 % en masse) de la matière organique naturelle (MON) des sols, des systèmes aquatiques et des sédiments.

La MON est constituée de différentes classes de biopolymères (protéines, lignine, carbohydrates, lipides) provenant de la dégradation de tissus d'espèces végétales et animales. Deux théories ont été essentiellement avancées pour expliquer la genèse des substances humiques (Tan, 2003) :

- la première proposée par Fuchs (1930) postule que c'est par condensation de la lignine sur les protéines qu'est formée la partie centrale des substances humiques sur laquelle viennent se greffer les constituants phénoliques et carboxyliques (Figure II.4.a).

- la seconde (Flaig, 1960) propose une étape préliminaire de dégradation de la lignine en éléments simples suivie d'une condensation des composés phénoliques sur les molécules azotées (Figure II.4.b).

Différents modèles de molécules humiques ont été proposés dans la littérature, notamment par Maillard (1916), Chesire et al. (1968) et Leenheer (1995). Ce dernier propose un modèle contenant des fonctions carboxyliques associées à des liaisons aliphatiques C-O contenant des esters et des éthers (Figure II.4.c). Ces diverses théories et modèles s'accordent sur le fait que les biopolymères se lient chimiquement les uns aux autres.

Les HS ont été classés sur un critère de masse et de solubilité en trois catégories :

- les acides humiques (HA) qui sont solubles en milieu basique mais insolubles en milieu acide de pH inférieur à 2;
- les acides fulviques (FA) qui sont solubles quelque soit le pH;
- l'humine qui est insoluble quelque soit le pH.

Les masses moléculaires des HS, obtenues par diffusion de rayons X, sont comprises entre 500 et 2000 Da pour des acides fulviques et sont supérieures à 10000 Da pour des acides humiques (Thurmann et al., 1982).

Leenheer (2007) montre l'évolution des différents modèles de substances humiques, qui s'est affinée avec l'évolution des techniques analytiques. Harvey et al. (1983) proposent un modèle de substances humiques marines contenant beaucoup plus de structures aliphatiques, en accord avec les données de résonance nucléaire magnétique (RMN) (Figure II.4.d). L'essor de l'ionisation par électrospray (ESI) sur des spectromètres de masse (MS), couplés à des techniques de séparation comme la chromatographie liquide haute performance (HPLC) (McIntyre et al., 1997) a permis de conforter l'idée que les HS étaient beaucoup moins aromatiques que ce que l'on pensait auparavant : des masses moléculaires de FAs sont données entre 200 et 700 Da avec un maximum à 350 Da.

Reemtsma et These (2005) couplent l'ESI à la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et s'intéressent aux distributions massiques des composés de bas poids moléculaire de plusieurs FAs d'origines différentes. Ils notent que des composés de formule chimique $C_{10}H_{12}O_5$ et de masse exacte 212,068 Da (Figure II.4.e) sont communs et pourraient jouer le rôle de précurseurs dans la formation de FA.

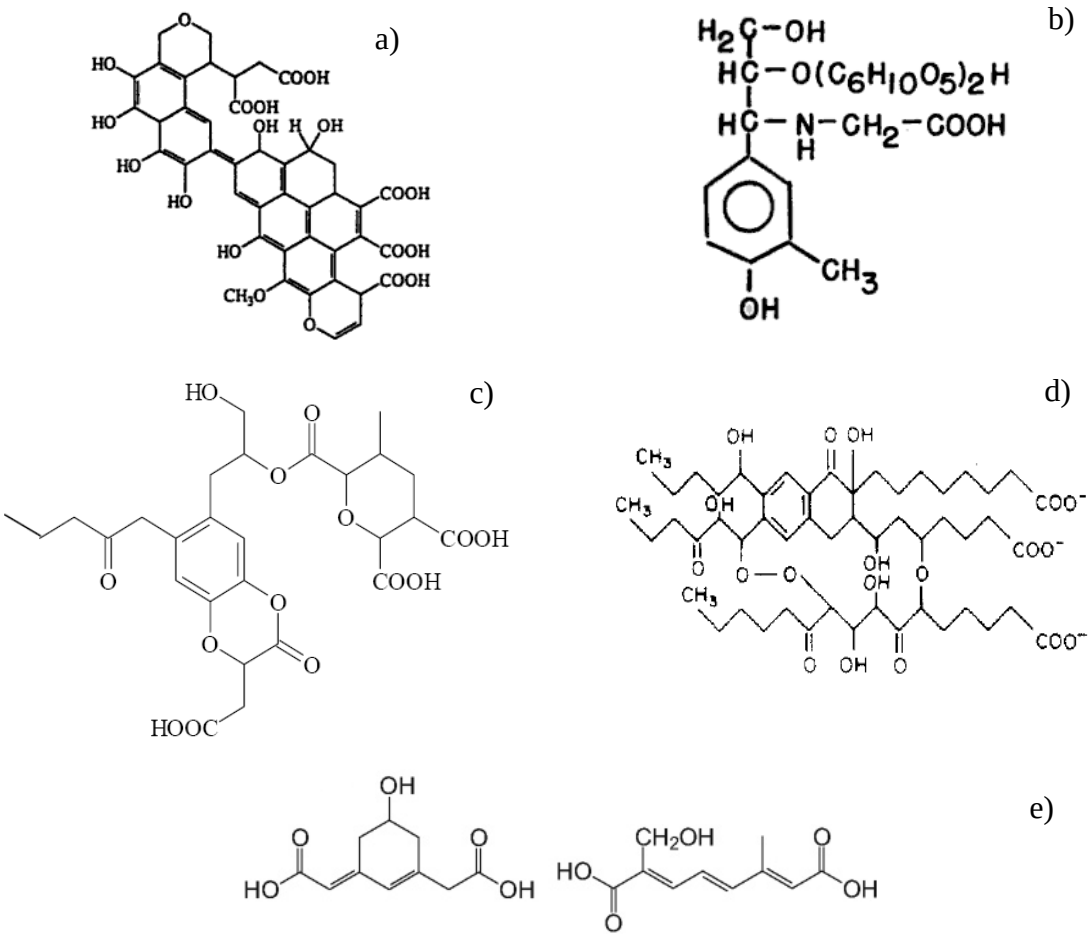


Figure II. 4 : Modèles macromoléculaires de substances humiques (a, b, c et d) et précurseurs d'acides fulviques de bas poids moléculaire de masse égale à 212,068 Da.

Structure macromoléculaire

Les données récentes obtenues par des méthodes faisant appel aux spectroscopies, à la microscopie, à la pyrolyse et à la technique d'ionisation douce se sont révélées être en contradiction avec la structure en macromolécules traditionnellement acceptée pour les substances humiques.

Un nouveau concept est alors apparu selon lequel les macromolécules humiques seraient en fait des ensembles de type supramoléculaire, composés de molécules relativement petites et chimiquement différentes retenues les unes aux autres par des liaisons hydrogène ou hydrophobes (Piccolo, 2001; Simpson et al., 2002).

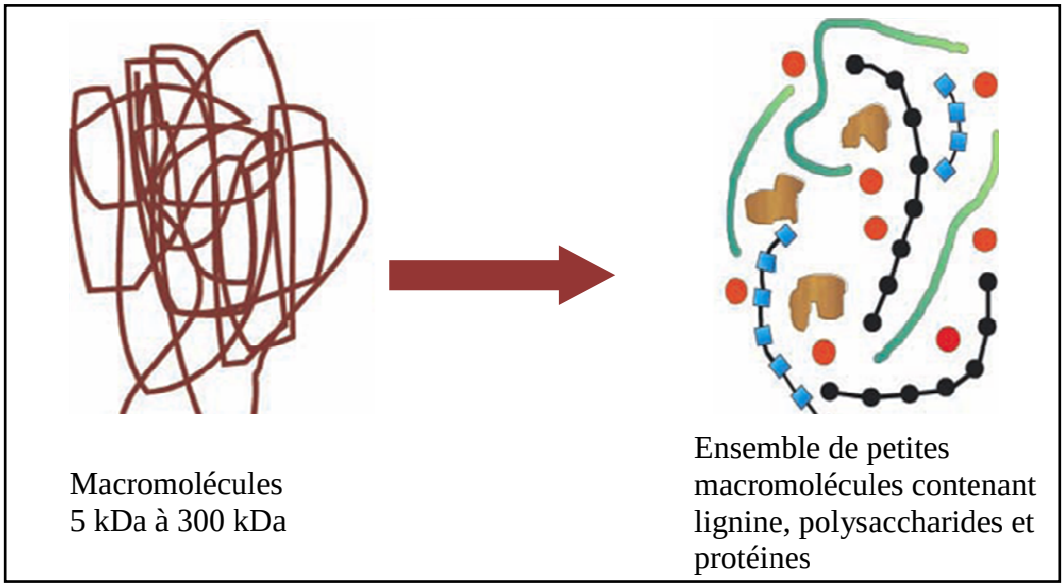


Figure II. 5 : Evolution de la théorie des substances humiques : du macromoléculaire au supramoléculaire, selon (Piccolo, 2001).

Le groupe d'A. Piccolo a été le premier montré en utilisant la chromatographie par perméation de gel et la SEC haute performance (HPSEC) que la taille apparente des fragments humiques changeait de façon plus importante par addition d'acide organique que d'acide chlorhydrique. L'absorbance UV-visible des échantillons traités baisserait suite à une augmentation de la distance entre les chromophores. Ainsi, la réduction de la taille des macromolécules ne serait pas due à une contraction des molécules sous l'effet de la baisse de pH mais à la perte d'éléments constitutifs suite à une certaine désagrégation. L'effet de désagrégation maximal est observé dans le cas de fractions humiques très hydrophobes combinées à des molécules organiques contenant à la fois une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Ce résultat montre l'importance des liaisons hydrophobes dans la structuration des macromolécules.

La technique de DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY) deux dimensions a été utilisée pour la détermination des tailles des molécules ou agrégats présents dans les substances humiques. Cette technique utilise un gradient de champ pulsé qui modifie les signaux RMN de sorte que l'intensité de la résonance peut être connectée au coefficient de diffusion dans la solution. Simpson a montré qu'un acide humique (HA) de tourbe à 100 $mg.ml^{-1}$ contient des agrégats dont la diffusivité correspond à une masse moléculaire moyenne de 66 kDa et plus. A 5 $mg.ml^{-1}$, la masse moyenne n'est plus que de 2,5 à 6,1 kDa. De plus, l'addition d'acide organique cause une désagrégation comme celle observée par Piccolo. Sur la base des diffusivités observées, les auteurs concluent que les fragments présentent des masses entre 200 Da et 2,5 kDa (Simpson et al., 2002).

Dans une autre série d'expériences, Simpson purifia un acide humique de sol à plusieurs reprises afin d'en extraire tous les cations métalliques. Il analysa les solutions de cet acide humique dans l'eau deutérée et le diméthylsulfoxyde et observa que les constituants de type aromatiques, aliphatiques et carbohydrates présentaient des coefficients de diffusion bien distincts prouvant ainsi que ces constituants n'étaient pas chimiquement liés. Cette jolie démonstration apporte la preuve que les éléments constitutifs de base des substances humiques ne sont liés que par agrégation mettant en jeu différents types d'associations non covalentes (hydrophobes, liaisons hydrogène, ponts métalliques, interactions ioniques, complexes par transfert de charge).

La spectrométrie de masse utilisant des techniques d'ionisation douce (électrospray ou ionisation par désorption laser) conduit à des masses relativement faibles (inférieures à 2500 Da). La méthylation d'un acide fulvique a permis de réduire la masse apparente ce qui suggère que la méthylation des acides carboxyliques réduit les phénomènes d'agrégation par suppression des liaisons hydrogène (Simpson et al., 2002).

Un autre travail intéressant mené par l'équipe de A. J. Simpson toujours par utilisation de la RMN 2D a permis de montrer qu'il n'existe pas en quantité significatives dans les substances humiques de nouvelles catégories de molécules ou de nouvelles structures en dehors des biopolymères naturels et de leurs produits d'oxydation. Cela confirmerait que ces biopolymères sont peu liés les uns aux autres car ces liaisons devraient donner des signaux distinctifs en RMN du proton (Kelleher and Simpson, 2006).

Structure micellaire

Une autre notion très importante est celle qui consiste à proposer que les substances humiques renferment des zones hydrophiles et hydrophobes à l'instar des micelles (Wershaw, 1999).

Alors que la fluorescence du pyrène est inhibée par les ions Br^-, Engebretson et von Wandruska (1994) observent une augmentation de l'intensité de fluorescence du pyrène en solution dans des acides humiques par ajout de Mg^{2+}. Cette augmentation de l'intensité est visible pendant quelques heures puis elle laisse la place à une franche diminution. Les auteurs concluent que Mg^{2+} favorise la formation de micelles permettant au pyrène d'être confiné dans un environnement hydrophobe auquel les ions Br^- n'ont pas accès. Au bout de quelques heures, il y a désagrégation progressive des micelles par migration des ions Mg^{2+} et finalement accessibilité du pyrène aux ions Br^-.

Une autre façon de prouver l'existence de zones hydrophobes est d'utiliser des sondes fluorescentes sensibles à la polarité du milieu. Ainsi le Prodan (6-propionyl-2-(N,N-diméthylamino)naphtalène) a un maximum d'émission qui varie en fonction du milieu (Weber G., 1979). En présence d'acides humiques, le Prodan donne un spectre d'émission caractéristique d'un milieu de polarité comprise entre celle de l'éthanol et du cyclohexane. Il est donc clair qu'il se retrouve dans un environnement dont les molécules d'eau sont exclues.

La formation potentielle de pseudo-micelles est un élément important en matière de réactivité car les contaminants qui pourront être alors localisés, selon leur polarité, dans les zones plutôt hydrophiles ou plutôt hydrophobes et seront donc soumis à un environnement différent..

Le monuron est un composé de la famille des phénylurées. Par excitation autour de 300 nm, il conduit à divers photoproduits qui résultent du réarrangement d'un intermédiaire de type iminocarbène. Cet intermédiaire extrêmement réactif peut additionner de l'oxygène ou arracher un atome d'hydrogène. Une de ses caractéristiques est de conduire à un dérivé bromé lorsque la réaction est conduite en présence d'ions Br^-. Or, la photolyse du monuron en présence de fortes concentrations de Br^- et d'acides humiques ne donne pas le dérivé bromé. Une explication tout à fait plausible est que le monuron est suffisamment hydrophobe pour migrer dans la zone intra-humique de sorte que l'iminocarbène est préservé d'une réaction avec les ions Br^- qui reste lui en solution aqueuse (Richard et al., 1997).

II.2.2. Propriétés optiques des MON

Spectroscopie UV-visible

Selon sa concentration, la Matière organique dissoute (MOD) va impartir une coloration jaunâtre à brunâtre aux eaux de surface (cf. Figure II. 6). Le terme de Matière Organique Dissoute Chromophorique (ou Colorée) (cDOM) a été introduit dans la littérature de la photochimie environnementale pour souligner l'importance des constituants absorbants dans la coloration brunâtre des eaux de surfaces et dans la réactivité photochimique de la matière organique dissoute (Green and Blough, 1994; Richard and Canonica, 2005).

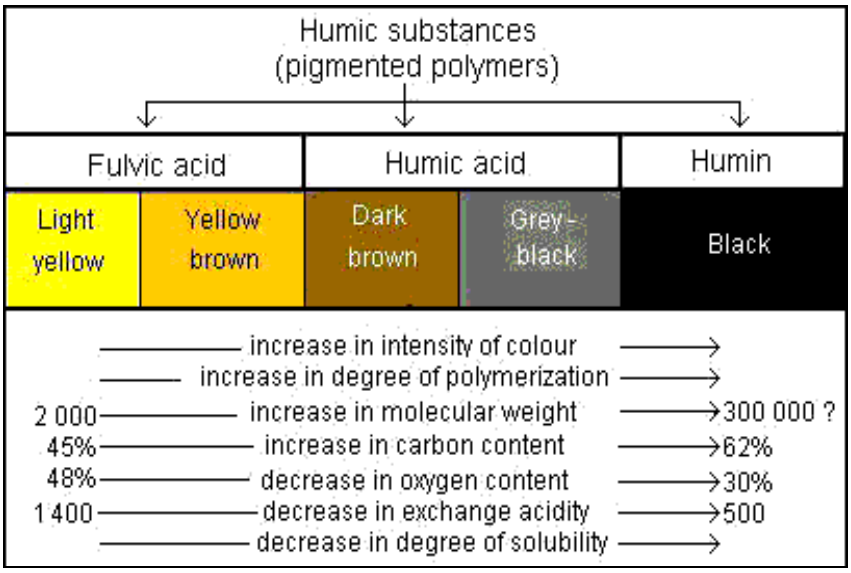


Figure II. 6 : Propriétés chimiques des différentes substances humiques colorées.

Les spectres d'absorption UV-visible de la cDOM permettent de déterminer l'atténuation de la lumière dans le compartiment aquatique (Zepp et al., 2002). Ils présentent une forme presque exponentielle et un épaulement dans la région (250-300) nm. Au-dessus d'approximativement 290 nm, les spectres peuvent être raisonnablement décrits par une fonction exponentielle de la forme :

$$A_\lambda = A_{\lambda_0} . e^{-S(\lambda - \lambda_0)}$$

où A_λ est le coefficient d'absorption (coefficient népérien d'absorption molaire utilisé par les limnologistes et les physiciens, à différencier du coefficient décimal d'absorption molaire encore appelé coefficient d'extinction molaire utilisé par les chimistes), λ est la longueur d'onde considérée, λ_0 est la longueur d'onde de référence, et (S) est appelée la pente spectrale. Il a été observé que la cDOM d'origine terrestre, plus riche en composés aromatiques que celle des océans présente une pente spectrale plus faible (Green et Blough, 1994).

La présence dans les substances humiques de fragments de biopolymères a été démontrée par différentes techniques analytiques. Il s'agit le plus souvent de fragments de lipides ou de lignines. De tailles très variables, ils sont souvent porteurs de fonctions oxygénées (alcool, éther, cétone ou aldéhyde). Ces fragments pourraient jouer un rôle dans les propriétés spectrales notamment en contribuant à la formation de complexes par transfert de charge auxquels on attribue l'absorption à grande longueur d'onde (Del Vecchio and Blough, 2004).

Spectroscopie de fluorescence

Les substances humiques, quelque soit leur origine, sont émissives et leur fluorescence est mesurée depuis les années 1970 (Levesque, 1972). Comme l'émission varie fortement avec la longueur d'onde d'excitation, trois types de données ont été enregistrées: les spectres d'émission (longueur d'excitation fixée), les spectres d'excitation (longueur d'émission fixée) et l'enregistrement synchrone (écart entre longueur d'émission et longueur d'onde d'excitation fixe) (Miano et al., 1990 ; Senesi, 1990, senesi et al., 1991). Le développement de la fluorescence 3D, qui regroupe l'ensemble de ces données, a permis de réels progrès (Coble et al., 1990). A partir des empreintes enregistrées, il est possible de déterminer l'origine terrestre, aqueuse ou marine et le caractère humique ou fulvique. Lorsque de bonnes conditions opératoires sont employées, des données quantitatives peuvent également être obtenues (Alberts et Takács, 2004; Coble, 1996; Huguet et al., 2009; Mobed et al., 1996; Parlanti et al., 2000; Senesi, 1990; Zsolnay et al., 1999).

Les spectres d'émission des substances humiques sont constitués d'une bande très large entre 300 et 700 nm. Une classification assez subjective a conduit à une localisation des pics principaux, des pics secondaires et des épaulements (Senesi et al., 1991). Les acides humiques de sol présentent un pic principal situé autour de 500-550 nm et les acides fulviques

un pic principal vers 450 nm. Le résultat étonnant est que l'on retrouve généralement les mêmes caractéristiques d'émission quelque soit l'origine de la substance humique. Ceci suggère fortement que l'émission est due aux mêmes types de constituants.

Une autre classification a été proposée pour les matières organiques du milieu aquatique par Coble (1996) et Parlanti et al. (2000) La nomenclature des fluorophores présents dans l'eau de mer est indiquée dans le Tableau II.1.

Tableau II. 1 : Principaux fluorophores contenus dans les matières organiques naturelles de l'eau de mer.

Pic (Coble, 1996)	Bande (Parlanti et al., 2000)	λ_{ex} / nm	$\lambda_{ém}$ / nm	Nature des fluorophores
B	γ	275	310	Tyrosine-like
T		275	340	Tryptophane-like
A	α'	260	380-460	Humique et Fulvique (terrestre)
M	β	310	380-420	Humique (marin ou autochtone)
C	α	350	420-480	Humique et Fulvique (terrestre)

Jusqu'à présent, la nature des constituants émissifs reste inconnue. Quelques structures chimiques ont été proposées sur la base d'analogie entre la fluorescence de composés modèles et celle des humiques : la 3 et la 4-hydroxycoumarine, le tryptophane et l'uracile, pour le pic A, l'adénine, l'acide 2-aminobenzoïque, la 7-hydroxycoumarine, le 5-phosphate pyridoxal et l'acide salicylique pour le pic C (Alberts et Takács, 2004).

Une étude de fluorescence par la technique d'imagerie d'EEM combinée au modèle PARAFAC a été menée sur 379 matières organiques provenant de différents systèmes aquatiques (Cory et Mc Knight, 2005). Il a été dénombré treize entités fluorescentes responsables de l'émission totale dans l'EEM :

- trois quinones oxydées : Q1, Q2 et Q3 caractérisées par des longueurs d'onde d'excitation de 250-260 nm et des émissions variant de 380 à 460 nm.
- trois semi-quinones : SQ1, SQ2 et SQ3 qui ont des émissions entre 350 et 520 nm pour deux longueurs d'onde d'excitation 250 nm et 350 nm
- une quinone réduite : HQ caractérisée par une excitation à 250 nm et une émission à 400 nm.
- deux composés de type tryptophane et tyrosine déjà décrits Tableau II.1.
- quatre autres fluorophores ayant des larges bandes d'émission entre 350 et 550 nm pour des excitations allant de 300 à 350 nm sont de nature inconnue.

Les sept fluorophores dont la structure de base est la quinone compteraient entre 50 et 60 % de l'intensité totale de fluorescence mesurée sur les EEM.

II.3. Réactivités photochimiques des Matières Organiques Naturelles (MON)

II.3.1. Généralités

Les principaux processus photochimiques qui suivent l'absorption de la lumière par la cDOM et aboutissent à la photodégradation d'un polluant P sont résumés dans la Figure II. 7.

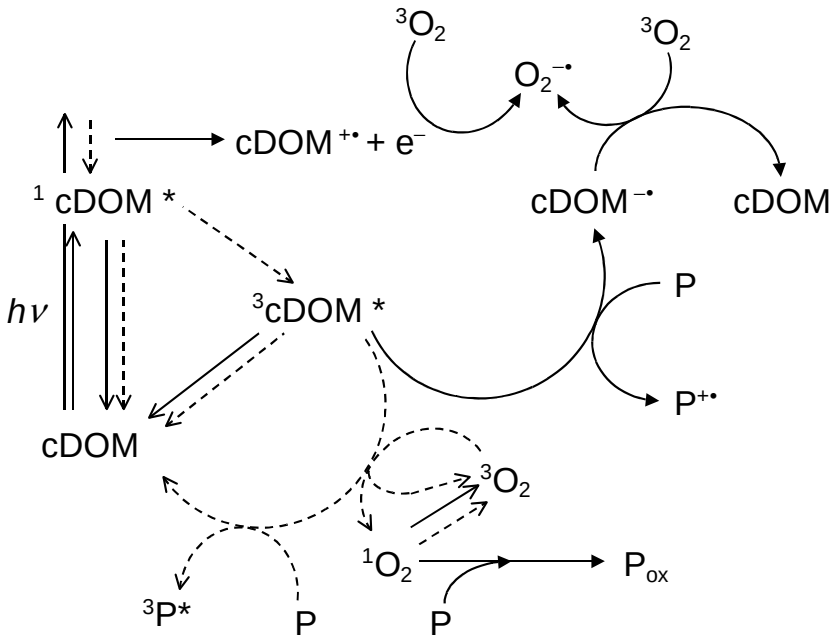


Figure II. 7 : Processus photochimiques majeurs de la cDOM, selon (Richard et Canonica, 2005).

Par absorption d'un photon, un chromophore de la cDOM est promu dans l'un des nombreux états excités singulets. Il s'en suit, soit une séparation de charge avec formation d'un électron hydraté et du radical-cation cDOM$^{\bullet+}$, soit une relaxation vibrationnelle à l'état excité singulet de plus basse énergie. L'oxygène moléculaire, qui est généralement présent à des concentrations importantes dans les zones photiques des eaux de surface, capte la majorité des électrons hydratés pour former le radical-anion superoxyde.

Avec un temps de vie de l'ordre de la nanoseconde, le premier état excité singulet ne dure généralement pas suffisamment longtemps pour enclencher une réaction photochimique avec les substances dissoutes. Deux processus de désactivation, la fluorescence et la conversion interne, ramène le chromophore de son état excité singulet à son état fondamental

singulet, alors que la transition intersystèmes génère le premier état excité triplet du chromophore. Grâce à un temps de vie plus long (de l'ordre de la microseconde), ce dernier peut initier une réaction avec une espèce dissoute. De nouveau, deux processus intramoléculaires, la phosphorescence et la transition intersystèmes contribuent à la désactivation de l'état excité triplet à l'état fondamental singulet du chromophore.

II.3.2. Les états excités triplets : ^{3}cDOM*

Il existe deux modes d'interaction de l'état excité triplet de la cDOM avec les polluants organiques : le premier est un transfert d'énergie triplet-triplet, un processus non-radiatif qui conduit à la désactivation du triplet de la cDOM et à la formation simultanée de l'état excité triplet du polluant organique. Peu d'exemples de ce type de réaction sont rapportés dans la littérature, a priori, mise à part l'isomérisation cis-trans du 1,3-cyclopentadiène (Zepp et al., 2002). Le second est une réaction photochimique d'oxydoréduction. Dans la suite, nous nous intéresserons surtout au cas de figure où ^{3}cDOM* est réduit avec formation de cDOM$^{\bullet-}$et polluant organique oxydé (perte d'un électron, P$^{\bullet+}$). Les réactions photochimiques les plus rapides se font avec des composés riches en électrons comme les phénols et le 2,4,6-triméthylphénol (Canonica et al., 2002). D'autres composés peuvent semble-t-il être oxydés par ^{3}cDOM* comme les herbicides de la famille des phényl-urées, (Aguer et Richard, 1996; Gerecke et al., 2001), l'herbicide mécoprop (Cavani et al., 2009), le bisphénol A (Zhan et al., 2007), des acides aminés libres (Boreen et al, 2008), certaines amines (Chen et al., 2009) et des β-bloquants (Liu et al., 2009).

Prouver la réaction directe d'un polluants avec ^{3}cDOM* n'est pas aisée. Généralement, le mécanisme réactionnel est établi en étudiant l'influence de l'oxygène sur la réaction (Halladja et al., 2007).

II.3.3. L'oxygène singulet : $^1O_2$

Dans les eaux de surface oxygénées, la présence de cDOM induit la photoproduction d'oxygène singulet. La réaction de ^{3}cDOM* avec l'oxygène moléculaire permet la formation d'oxygène singulet ($^1O_2$). Cette réaction entre en compétition avec la désactivation de ^{3}cDOM* et sa réaction avec les composés organiques présents en solution (cDOM elle-même, substrats organiques) (Halladja et al., 2007).

En absence de réactions bimoléculaires, la durée de vie de l'oxygène singulet dans l'eau est de 4,2 µs (k_d = 2,4x10^5 s^{-1}) (Rodgers, 1983).

L'oxygène singulet est alors temporellement capable d'oxyder toute une gamme de composés organiques. La concentration de $^1O_2$ dans les eaux photoirradiées peut être le plus facilement déterminée par le suivi de la cinétique de consommation de molécules-sondes sélectives, les dérivés du furanne, comme le 2,5 diméthylfuranne, et l'alcool furfurylique (FFA) étant le plus couramment utilisés (Haag et Hoigné, 1986).

Haag et Hoigné (1986) ont montré qu'à la surface de différentes eaux naturelles, la concentration quasi stationnaire en oxygène singulet est d'autant plus grande que le compartiment aquatiqe est riche en carbone organique dissous. Ces concentrations diminuent quand la profondeur augmente du fait de l'atténuation du flux lumineux par les composés chromophores ou les espèces diffusantes. Le Tableau II. 2 donne des valeurs de concentration en oxygène singulet à la surface et à 1 m de profondeur.

Tableau II. 2 : Demi-vies et concentrations quasi-stationnaires en oxygène singulet dans différents compartiments aquatiques, selon Haag et Hoigné (1986).

	DOC (mg.L^{-1})	$t_{1/2}$ FFA (h) à la surface	[$^1O_2$] (10^{-14} mol.L^{-1}) à la surface	[$^1O_2$] (10^{-14} mol.L^{-1}) à 1 m de profondeur
Lac Greifensee	3,5	20	8	4,6
Etang de la Gruyère	13	6	28	1,5
Fleuve Rhin	3,2	27	6	3,6
Eaux de rejet	15	14	11	2,2

Une étude récente (Latch et McNeill, 2006) a montré que les concentrations apparentes en oxygène singulet [$^1O_2$]$_{app}$, mesurées en utilisant des molécules-sondes hydrophobes chimiluminescences, augmentaient avec l'hydrophobicité de la sonde et atteignaient des valeurs jusqu'à 100 fois supérieures à celles qui étaient mesurées par une sonde hydrophile conventionnelle comme l'alcool furfurylique (FFA). Les auteurs concluent que $^1O_2$ se forme principalement au centre de la microzone hydrophobe où il se retrouve alors en concentration plus élevée que dans la zone hydrophile. Sa diffusion vers l'extérieur de la sphère s'accompagne d'une désactivation physique et d'une baisse progressive de sa concentration tout le long du trajet.

II.3.4. D'autres espèces réactives

D'autres espèces réactives, telles que l'électron solvaté, le radical hydroxyle, les radicaux carbonate et tous les radicaux dérivés de la DOM (radicaux centrés sur le carbone, oxyle ou peroxyle), peuvent se former par irradiation de la cDOM, mais leurs vitesses de production sont beaucoup plus faibles que celles des états triplets de cDOM et de l'oxygène singulet.

Dans le milieu aquatique, les radicaux hydroxyles sont également formés par irradiation des ions nitrate ou nitrite ou par irradiation des complexes de fer par la réaction de Fenton. Il faut souligner que la MON capte une grande partie de ces radicaux.

Ces espèces réactives peuvent réagir sur certains substrats avec des constantes de vitesses très élevées et être les principales espèces responsables de la transformation de polluants organiques. Les concentrations quasi-stationnaires de ces espèces réactives sont mentionnées sur le Tableau II. 3. Les concentrations quasi-stationnaires des radicaux carbonate peuvent être jusqu'à 1000 fois plus grandes que celles des radicaux hydroxyles (Sulzberger et al., 1997).

Le peroxyde d'hydrogène, bien qu'il soit considéré comme une espèce réactive oxygénée et un acteur important en photochimie aquatique, est volontairement omis parce qu'aucune preuve de son action directe sur les polluants organiques en milieu aquatique n'existe.

Tableau II. 3 : Ordre de grandeur des concentrations quasi –stationnaires d'espèces réactives dans des compartiments aquatiques exposés à la lumière solaire, selon [(1)](Frimmel, 1994) et [(2)](Lam et al., 2003).

Espèces réactives	Concentration quasi stationnaire ($mol.L^{-1}$)
e^-_{aq}	2.10^{-17} (1)
$O_2^{-\cdot}$	$(0,2\text{-}50).10^{-17}$ (1)
H_2O_2	$10^{-5} – 10^{-7}$ (1)
$CO3^{-\cdot}$	$10^{-13}\text{-}10^{-15}$ (2)
$OH^{\bullet}$	10^{-8} (1)

Chapitre III

Techniques expérimentales

III.1. Réactifs utilisés

III.1.1. Substrats

● Alcool furfurylique, Aldrich (99 %)
● 2,4,6-Triméthylphénol, Aldrich (99 %)
● Acide Téréphtalique, Aldrich (98%)
● Acide hydroxytéréphtalique synthétisé au laboratoire selon le protocole décrit par (Mason et al., 1994). La pureté du produit obtenu a été vérifiée par RMN du proton.
● Mésotrione, Pestanal Riedel de Haën (99,90%)
● Ethofumésate, Pestanal Riedel de Haën (99,50%)
● Epoxiconazole, Pestanal Riedel de Haën (99,20%)

III.1.2. Solutions tampons

● Hydrogénophosphate de sodium contenant 12 molécules d'eau Prolabo (99%)
● Dihydrogénophosphate de potassium Prolabo (99,5%)

III.1.3. Actinométrie

● *p*-nitroanisole, Aldrich (97%)
● Pyridine, Aldrich (99,90%)

III.1.4. Substances humiques et matières organiques

Différentes substances humiques et matières ont été utilisées dans cette étude (voir Tableau III. 1). Elles proviennent de sols, de tourbes, de composts et de rivières. Certaines ont été achetées auprès de l'IHSS (International Humic Substances Society), d'autres nous ont été données par plusieurs collègues, enfin, plusieurs ont été extraites par nos soins.

Nos collègues, et naturellement l'IHSS ont utilisé le protocole préconisé par l'IHSS (http://ihss.gatech.edu/ihss2/soilhafa/.html). Je décris ci-après les protocoles, voisin de celui de l'IHSS, que nous avons utilisé pour extraire les acides humiques ou de type humique et les extraits aqueux.

• Acides humiques (HA), substances de type humique (HLA, humic like acid) et acides fulviques (FA)

Les échantillons ont été collectés, séchés, pulvérisés et passés au travers d'un tamis de taille 0,5µm. 10,0 g d'échantillons secs ont été placés dans un tube à centrifugation de 250 mL dans lequel a été ajouté 100 mL d'une solution mixte de soude 0,10 M et de pyrophosphate de sodium 0,10 M. L'ensemble a été agité pendant 24 heures à température ambiante (25 °C) sous atmosphère inerte de diazote, puis centrifugé à 5000 g pendant 30 minutes. La solution a été acidifiée par une solution d'acide chlorhydrique 6 M jusqu'à obtenir un pH inférieur à 2, laissée pendant 24 heures à +4 °C de façon à précipiter les HA/HLA, puis centrifugée à 5000 g pendant 30 minutes. Le surnageant, contenant les FA, a été éliminé et les précipités de HA/HLA ont été purifiés en répétant trois fois les étapes suivantes :

(i) dissolution dans un volume minimal de soude 0,5 M

(ii) centrifugation à 5000 g pendant 30 minutes

(iii) acidification de la solution surnageante alcaline avec une solution d'acide chlorhydrique 6 M jusqu'à obtenir un pH inférieur à 2

(iv) précipitation des HA/HLA pendant une heure à température ambiante

(v) centrifugation finale, comme indiqué plus haut.

Les précipités de HA/HLA ont été dissous dans une solution de soude 0,5 M et neutralisés avec une solution d'acide chlorhydrique 1,0 M (pH 7,0) et ont ensuite été dialysés à 4 °C avec de l'eau distillée et une membrane de dialyse ayant un seuil de coupure de 6000-8000 Da, jusqu'à ce que l'eau dialysée ait donné un test négatif aux ions chlorures avec du nitrate d'argent. Enfin, les HA/HLA dialysés ont été lyophilisés et stockés à température ambiante dans des récipients ambrés, à l'abri de la lumière.

• Extraits aqueux de matière organique (WEOM)

Les échantillons ont été collectés, séchés, pulvérisés et passés à travers un tamis de 2 mm (sol) et de 0,5 mm (pour le compost). 20,0 g d'échantillons secs ont été ensuite placés dans un tube à centrifugation de 250 mL dans lequel a été ajouté 100 mL d'eau doublement distillée (ratio d'extraction matière : extractant de 1:5). L'ensemble a été agité pendant 30 minutes à température ambiante (25 °C) sous atmosphère inerte de diazote, puis centrifugé à 5000 g pendant 30 minutes à 20 °C. La solution surnageante a été récupérée et filtrée (à environ 0,1 bar) à travers un filtre de 0,4 µm en polycarbonate. Finalement le filtrat a été lyophilisé et stocké dans un récipient ambré, à l'abri de la lumière.

Tableau III. 1 : Substances humiques et matières organiques utilisées dans cette étude

	HA/HLA	FA	WEOM	MON
Extraites de sols	Chernozem[3]	Chernozem[3]	Chernozem	
	Elliott [1]	Elliott[1]	Elliott	
	Ranker[2]	Ranker[2]		
	Aldrich[5]			
	Léonardite[1]			
	Andosol[3]			
	Rendzine[4]			
	Kaldenkirchen[4]			
		Laurentian[5]		
Extraites de Tourbes	Pahokee[1]	Pahokee[1]		
	Waskish[1]			
Extraites de Composts	GM060		GM060	
	GM120		GM120	
	GM180		GM180	
	UB030		UB030	
	UB075		UB075	
	UB120		UB120	
Extraites de Rivières				Suwannee River (SR)[1]
				Nordic Reservoir (NR)[1]

1/ Acheté auprès de l'IHSS

2/ Donné par le Pr Francis Andreux, Université de Bourgogne

3/ Donné par les Drs Olga et Oleg Trubetskoj, centre de recherche de Pushchino, Académie des Sciences Russe

4/ Donné par Dr Philippe Schmitt-Kopplin, GSF, Munich

5/ Commercial

Remarque : pour les six échantillons de composts, j'ai également étudié pour un même ratio d'extraction matière : extractant de 1:200, l'effet de trois extractants : eau ultrapure, eau minérale Volvic et une solution de chlorure de calcium 0,01 M. Les différents extraits aqueux de compost seront respectivement notés $WEOM_{1:200}$ (par opposition à WEOM décrit plus haut), $WEOM_{Volvic,1:200}$ et $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$.

III.2. Préparation des solutions

III.2.1. Généralités

Les solutions ont été préparées dans de l'eau ultra-pure obtenue grâce à un appareil Milli-Q et contrôlées par leur résistivité qui était supérieure ou égale à 18 MΩ.cm.

Le pH des solutions a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre JENWAY équipé d'une électrode combinée Ag/AgCl (ORION). La précision des mesures est de 0,1 unité pH. Les valeurs de pH des solutions de substances humiques ont été ajustées par l'ajout de tampons phosphates (10^{-3} M).

Les solutions de substrats ou de substances humiques étaient préparées à l'avance et stockées jusqu'à deux semaines dans le réfrigérateur à +4 °C, à l'abri de la lumière. Les solutions de substances humiques et de matières organiques étaient passées sur des filtres en acétate de cellulose de diamètre de pore égal à 0,45 µm. Tous les mélanges substrats-substances humiques ont été réalisés juste avant les irradiations ou les analyses.

III.2.2. Conditions expérimentales

Les solutions initiales de substances humiques ont été préparées en dissolvant entre 1,0 et 2,0 mg de substances humiques dans 20 ml d'eau Milli-Q tamponnée à pH 6,5 avec des tampons phosphatés (10^{-3} M), et agitées magnétiquement jusqu'à dissolution complète de la substance humique. Leurs concentrations étaient comprises entre 50 et 100 $mg.L^{-1}$ en substances humiques. Pour certaines substances humiques, la séparation sur filtre de 0,45 µm a conduit à une perte de matière qui peut être évaluée à 10 % au maximum, par comparaison entre un spectre d'absorption d'une solution filtrée et non filtrée.

Pour la préparation des mélanges substances humiques / sonde ou polluant, j'ai précédé de façon à obtenir les concentrations finales suivantes :

- solutions de substances humiques ayant une absorbance de 0,100 ± 0,005 à 300 nm, pour un trajet optique de 1 cm ;
- les sondes à espèces réactives : alcool furfurylique, 2,4,6-triméthylphénol et acide téréphtalique dans une gamme de concentration de 10^{-4} à 5.10^{-4} M ;
- les polluants organiques : mésotrione, éthofumésate et époxiconazole aux concentrations micromolaires (entre 10^{-6} et 10^{-5} M).

III.3. Dispositifs d'irradiation

III.3.1. Irradiation en lumière polychromatique artificielle (300-450 nm)

Les irradiations polychromatiques ont été réalisées dans des enceintes équipées de six tubes fluorescents de type TLAD 15W05 Philips (Eindhoven, The Netherland), présentant une large bande d'émission lumineuse (300 - 450 nm) dont le maximum se situe à 365 nm (voir Figure III.1).

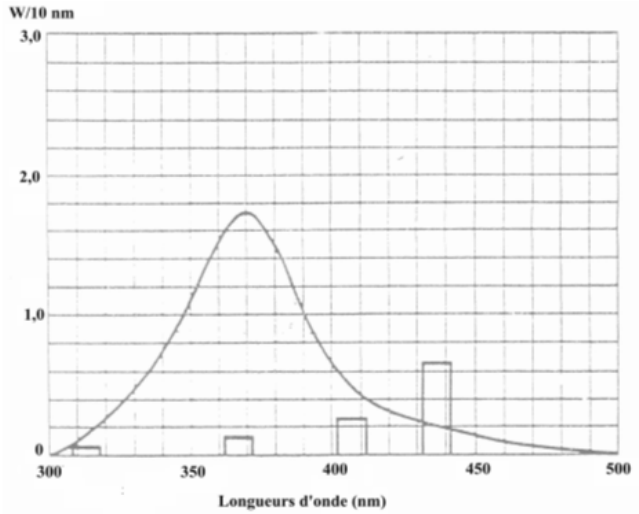


Figure III. 1 : Spectre d'émission d'un tube fluorescent de type TLAD 15W05 Philips.

Afin de limiter le rayonnement reçu par les solutions au domaine de longueur d'onde (295 - 450 nm), les irradiations ont été réalisées dans un réacteur en pyrex, dont le seuil de

coupure est de 300 nm, de forme cylindrique ayant un diamètre interne de 14 mm et une hauteur égale à 15 cm. Le dispositif est équipé d'un ventilateur afin d'éviter l'échauffement des solutions pendant les irradiations. La Figure III.2 est une photo du réacteur photochimique polychromatique utilisé.

Figure III. 2 : Réacteur photochimique polychromatique utilisé.

III.3.2. Irradiation en lumière solaire

Des solutions ont été exposées à la lumière solaire durant les mois de mars à avril 2007 à *Clermont-Ferrand* (46° N, 3° E). Les irradiations ont été effectuées dans des réacteurs en quartz remplis à plus de la moitié de leurs capacités de façon à laisser une surface libre suffisante. Les réacteurs ont été fermés par un septum et maintenus inclinés de 30° par rapport à l'horizontal. Le renouvellement de l'oxygène s'effectuait par bullage d'air lors de l'enlèvement du septum au moment des prélèvements. Les solutions recevaient 5 heures d'irradiation solaire par jour entre 11h et 16h.

III.4. Techniques d'analyses

III.4.1. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible des solutions de substances humiques ont été enregistrés sur un spectrophotomètre *Varian Cary 3*, en utilisant une bande passante de 1 nm. Tout d'abord, l'enregistrement de la ligne de base a été effectué en utilisant deux cellules en

quartz, de trajet optique égal à 1 cm, remplies d'eau ultrapure utilisée comme solvant de référence.

Par la suite, les mesures des absorbances des différentes solutions de substances humiques ont été effectuées dans une cuve en quartz de trajet optique égal à 1 cm, en ajustant systématiquement le zéro d'absorbance à 800 nm, hors cuves de mesure et de référence. Le spectre d'absorption de la cellule de mesure remplie d'eau ultrapure obtenu pour le blanc a ensuite été soustrait des spectres d'absorbance de chacune des solutions de substances humiques afin d'obtenir l'absorbance réelle de chacune des solutions.

III.4.2. Spectroscopie d'émission moléculaire

Les spectres d'émission moléculaire 3D, également appelés matrices d'excitation et d'émission (EEM) ont été enregistrés sur un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS-55 dont le schéma de principe est présenté sur la Figure III.3.

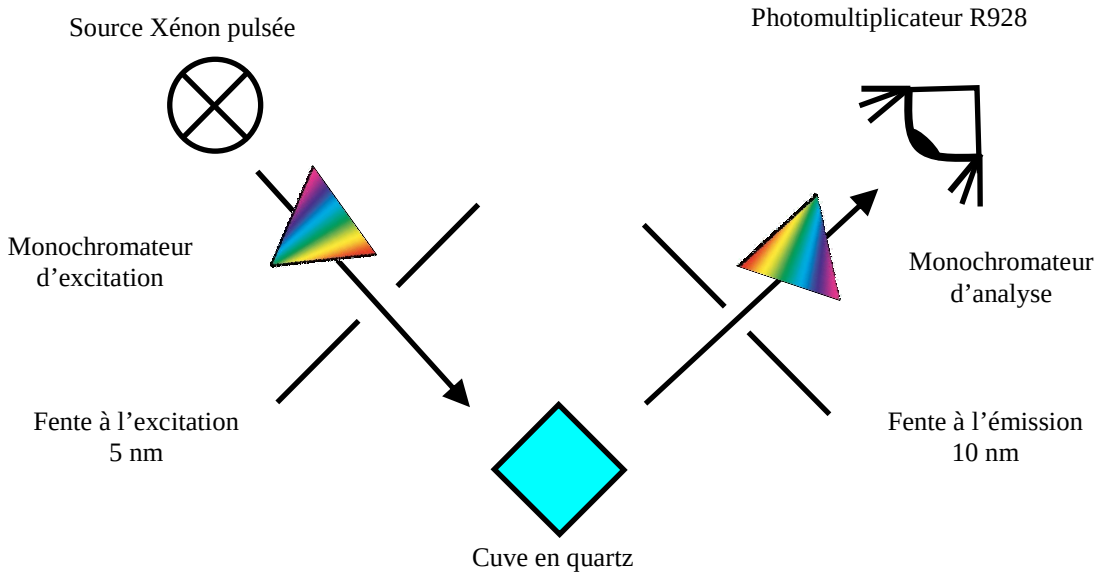


Figure III. 3 : Principe de fonctionnement du spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS-55.

Les différents composants optiques qui constituaient le spectrofluorimètre étaient :

● la source était une lampe à Xénon pulsée émettant un rayonnement dans l'UV et dans le visible, entre 200 et 800 nm ;

● le monochromateur à l'excitation était composé d'un jeu de miroirs, de fentes d'entrée et de sortie réglées à 5 nm de bande passante et d'un réseau. Il permettait d'obtenir

une lumière excitatrice à la longueur d'onde voulue. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées allaient de 200 nm à 500 nm par pas de 10 nm, soient 31 spectres d'émission obtenues pour une analyse qui durait environ 1 h 45 ;

● Les solutions humiques ont été placées dans une cuve en quartz de 1cm de trajet optique. L'émission moléculaire était observée à 90° par rapport à la lumière incidente afin de minimiser la mesure de la lumière excitatrice incidente par rapport à celles émises par la solution étudiée ;

● Le monochromateur d'analyse était composé d'un jeu de miroirs, de fentes d'entrée et de sortie réglées à 10 nm de bande passante et d'un réseau. Il permettait l'étude de l'émission moléculaire des solutions humiques. L'utilisation d'un filtre passe-haut fourni avec le spectrofluorimètre coupant les longueurs d'onde inférieures à 290 nm devait être utilisé pour observer correctement l'émission sans être gêner par les premiers et seconds ordres des raies Rayleigh et Raman compris entre 290 et 580 nm. Les émissions observées allaient de 300 à 700 nm avec une vitesse de balayage de 120 $nm.min^{-1}$;

● Le photomultiplicateur R928 permettait de convertir l'énergie lumineuse captée en signal électrique amplifié pour une meilleure détection. Les signaux produits étaient enregistrés par ordinateur à l'aide du logiciel FL Winlab® fourni avec le spectrofluorimètre ;

Lorsque les solutions humiques présentaient une émission moléculaire trop importante, l'utilisation d'un filtre neutre MTO 7080 à l'excitation était nécessaire. Comme indiqué sur la Figure III.4, le filtre ne laissait passer que 46 % de la lumière incidente entre 250 nm et 700 nm soit une diminution de l'intensité incidente d'un facteur 2,18.

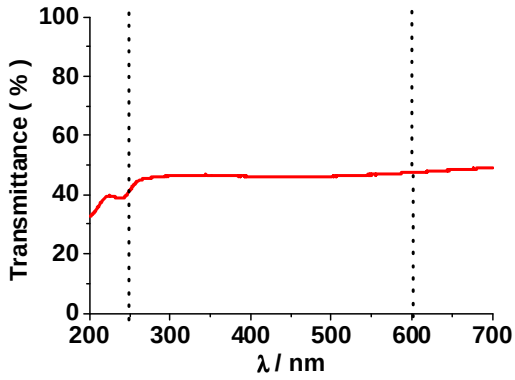


Figure III. 4 : Spectre de transmission du filtre MTO 7080.

L'ensemble des spectres d'émission et d'excitation étaient corrigés des réponses instrumentales en utilisant les fichiers fournis par le constructeur. Les solutions de substances humiques analysées avaient toutes une absorbance égale à 0,100 ± 0,005 à 300 nm. Cette valeur de 0,100 était choisie car elle limitait l'effet de filtre interne à l'excitation (Ohno, 2002) et constituait une limite supérieure de validité de la relation raisonnablement linéaire entre intensité de fluorescence et concentration des composés fluorescents.

Les matrices tridimensionnelles étaient construites à partir des 31 spectres d'émission qui étaient traités avec le logiciel Origin®, de 250 nm à 500 nm pour les longueurs d'onde d'excitation et de 300 à 600 nm pour les longueurs d'onde d'émission. Je donnerai l'EEM de chacun des échantillons, avec une comparaison faite à même absorbance totale à 300 nm. Cependant, comme nous pouvons le voir en annexes, les concentrations en carbone organique dissous des différentes solutions humiques varient alors dans une gamme de 1 à 20 10^{-4} mol $C_{org}.L^{-1}$, soit de 1 à 25 mg $C_{org}.L^{-1}$. Afin d'avoir une vision globale des fluorophores présents dans chaque échantillon contenant une même concentration de carbone organique dissous, une normalisation à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ des intensités d'émission a été effectuée.

L'échelle commune des intensités normalisées, pour tous les EEM, a été choisie comme allant de 0 à 20 car elle représente l'intensité normalisée de référence de l'acide humique Kursk (voir annexes 1 à 17). Dans certains cas, pour garder le même code de couleurs, il a été nécessaire de multiplier ou de diviser les intensités réelles normalisées par une valeur, indiquée systématiquement sur l'EEM.

III.4.3. Carbone organique total (TOC)

Les teneurs en carbone organique dissous ont été mesurées à l'aide d'un appareil Shimadzu TOC-5050A. Le principe de mesure consiste en une oxydation catalytique à haute température (680 °C) du carbone total contenu dans les échantillons filtrés sur 0,45 µm (acétate de cellulose). Le catalyseur utilisé est à base de platine. Le carbone total (TC) est alors transformé en CO_2 par l'oxydation et sa teneur est ensuite déterminée par un détecteur infrarouge. La mesure du carbone inorganique (IC), sous forme de carbonates et d'hydrogénocarbonates, se fait de la même manière avec une acidification préalable dans une solution d'acide orthophosphorique (H_3PO_4) à 25%. La mesure de TOC se fait alors par la soustraction de IC à TC.

Pour tous nos échantillons analysés, le carbone organique total (TOC) et le carbone organique dissous (DOC) sont équivalents du fait des filtrations sur 0,45 µm avant analyse.

Pour chaque échantillon le résultat donné est la moyenne d'au moins trois mesures satisfaisantes différant au plus de 10 %.

L'appareil est étalonné à l'aide :

- d'une solution standard de phtalate acide de potassium $C_6H_4(COOK)(COOH)$ diluée à différentes concentrations comprises généralement entre 0 et 50 mg $C.L^{-1}$, pour l'analyse de TC ;
- et d'une solution standard de carbonate de sodium Na_2CO_3 diluée à différentes concentrations comprises entre 0 et 5 mg $C.L^{-1}$ pour l'analyse de IC.

Différentes gammes d'étalonnage en TC et IC ont été utilisées en fonction de la teneur en DOC des échantillons afin d'optimiser la précision des mesures. La précision de la méthode est de l'ordre de 0,5 mg $C_{org}.L^{-1}$.

Dans la suite, nous utiliserons deux types de données normalisées à 1,00 $mol.L^{-1}$ de carbone organique dissous :

- l'absorbance normalisée à une concentration de DOC égale à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$, nommée ε^*_λ est définie par :

$$\varepsilon^*_\lambda = \frac{A_\lambda}{m \times \%DOC} \times 12000$$

où A_λ est l'absorbance de la solution de substance humique à une concentration massique exprimée en $mg.L^{-1}$, λ la longueur d'onde de la mesure, % DOC le pourcentage de carbone organique dissous (cf. annexes 18 et 19) ;

- l'intensité de fluorescence normalisée, notée $I_F{}^*_\lambda$, définie par :

$$I_F{}^*_\lambda = \frac{I_{F\lambda}}{[C_{org}]}$$

où $I_{F\lambda}$ est l'intensité de fluorescence mesurée en unités arbitraires a.u. à la longueur d'onde λ pour une absorbance de 0,100 ± 0,005 à 300 nm et $[C_{org}]$ est la concentration de DOC $mol.L^{-1}$ dans cette même solution (cf. annexes 18 et 19).

III.4.4. Techniques chromatographiques

Les analyses au cours du temps d'irradiation sont faites par chromatographie liquide haute performance (HPLC) Waters® Empower avec la colonne Nucleodur® 100-5 C18 ec 5µm (4.6 mm x 250 mm). Les volumes d'injection sont de 20 µL. Les détecteurs utilisés sont le détecteur UV à barrette de diode Waters® 996, le détecteur UV Waters® 2487 et le détecteur de fluorescence Waters®. Le débit de la phase mobile est de 1 $mL.min^{-1}$.

Les phases mobiles utilisées sont des mélanges d'acétonitrile et d'eau ultrapure, avec acidification de la phase aqueuse à 4‰ en acide formique lorsque le symbole * est présent, dont les rapports de volumes (volume d'acétonitrile %v / volume d'eau ù v) sont donnés dans le Tableau III.2 ci dessous.

Tableau III. 2 : Conditions d'analyse chromatographique.

Substrat	Phase mobile	UV $\lambda_{détection}$ / nm	fluorescence $\lambda_{exc}/\lambda_{ém}$
Alcool furfurylique	(10/90)	215	-
2,4,6 triméthylphénol	(60/40)	280	-
Acide Téréphtalique	(20/80*)	240	(330/430) : TAOH
p-nitroanisole	(50/50)	320	-
Mésotrione	(45/55*)	255	(340/420) : AMBA
Ethofumésate	(60/40)	280	(270/315)
Epoxiconazole	(60/40)	220	(230/340)

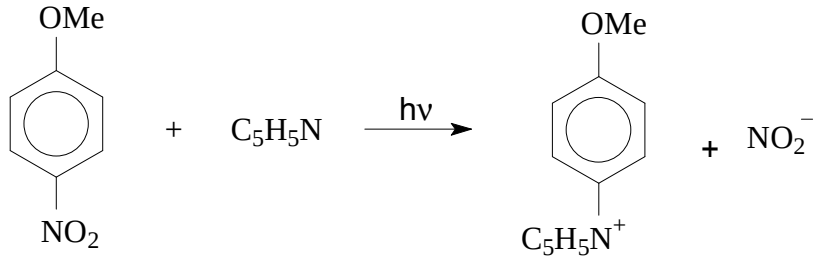
Avant chaque analyse chromatographique, des solutions étalons de chacun des substrats sont préparées dans une gamme de concentrations pour laquelle ils sont présents lors des diverses irradiations. Elles sont alors analysées quotidiennement pour calibrer le détecteur utilisé (UV et/ou fluorescence).

III.5. Actinométrie

Pour mesurer les flux de la lumière reçus par les réacteurs photochimiques nous avons utilisé un actinomètre chimique : le mélange *p*-nitroanisole (PNA)/pyridine (pyr).

Le mélange *p*-nitroanisole/pyridine a été choisi comme actinomètre pour mesurer les flux de photons incidents lors des irradiations en lumière solaire ou en lumière polychromatique. Le *p*-nitroanisole présente un maximum d'absorption à 314 nm (log ε_{314} = 4,04, ε_{314} étant le coefficient d'extinction molaire à 314 nm) alors que la pyridine n'absorbe pas à cette longueur d'onde (Dulin et Mill, 1982)

Sous irradiation lumineuse, une solution aqueuse contenant du *p*-nitroanisole (PNA) et de la pyridine (pyr) conduit à la formation d'un photoproduit stable le *p*-pyridinium anisole. Sa formation est décrite par la réaction suivante :



La réaction est réalisée dans un grand excès de pyridine, les rapports de concentrations PNA : pyr dans le mélange devant être compris entre 1:10 et 1:1000.

Dans nos expériences, nous avons opéré avec des proportions PNA:pyr de 1:10. C'est ainsi qu'une solution de PNA (10^{-5} M) et de pyridine (10^{-4} M) a été irradiée dans les mêmes conditions que les échantillons étudiés en lumière solaire et en lumière polychromatique (300-450 nm). Le taux de conversion de PNA a été déterminé par HPLC. En lumière polychromatique artificielle (300-450 nm), entre 12 % et 18 % de PNA avait disparu après 1 heure d'irradiation, alors qu'entre 16 % et 17 % de PNA étaient transformés après une heure d'exposition à la lumière solaire, entre 11 h, le matin et 16 h, l'après-midi, en mars et avril 2007. Cela signifie que les flux de photons sont équivalents dans les deux cas. Des données sur l'ensoleillement journalier selon les heures de la journée sont disponibles sur le site http://www.obs.univ-bpclermont.fr/opgc/index.php où des rayonnements de puissance maximale au milieu de la journée de 750 $W.m^{-2}$ sont indiqués en mars et avril 2007, deux mois qui sont remarqués sur le site comme étant dignes de ceux d'été.

Chapitre IV

Fractionnement et étude des propriétés spectroscopiques et photochimiques des acides humiques de sols

Horizons 0 et A d'un sol chernozem de la région de Kursk (Russie)

IV.1. Introduction

Les substances humiques étant des mélanges très complexes de macromolécules (cf. chapitre III), il s'avère difficile de comprendre leurs propriétés spectroscopiques et photochimiques, tant les protocoles expérimentaux, les techniques d'analyse et les possibilités d'interprétation sont nombreux. Une simplification du système étudié s'impose donc et le fractionnement devient alors une technique de choix dans la mesure où il permet de séparer les macromolécules sur des critères de taille, de masse moléculaire et/ou de polarité. Les données expérimentales obtenues sur ces mélanges de macromolécules plus homogènes, peuvent permettre de tirer des conclusions plus sûres.

Dans le cadre des collaborations du laboratoire, deux techniques de fractionnement ont été mises en oeuvre :

- la chromatographie d'exclusion stérique (size exclusion chromatography, SEC), couplée à une analyse des fractions par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) en présence d'urée.
- l'ultrafiltration (UF).

Dans les deux cas, les fractions obtenues ont été caractérisées par analyse élémentaire, par leurs propriétés spectroscopiques d'absorption UV-visible et d'émission moléculaire, et par leurs aptitudes à produire de l'oxygène singulet. Je rappellerai les principaux résultats de ces deux études, avant de présenter l'objectif de mon travail.

Fractionnement par SEC-PAGE et propriétés photochimiques d'un acide humique de sol chernozem (Trubetskoj et al., 1997)

Le fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique est appliqué par de nombreux auteurs (De Nobili et Chen, 1999; Perminova, 1999; Trubetskoj et al., 1997) et a été particulièrement développée par Trubetskoj et al., qui l'ont amélioré par l'ajout d'agents dénaturants et notamment l'urée. Leur effet est de rompre les liaisons hydrogène inter et intramoléculaires ainsi que de limiter les phénomènes d'adsorption des macromolécules sur le gel. L'utilisation en tandem de la chromatographie d'exclusion stérique et de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SEC-PAGE en présence d'urée à 7 M a été appliquée sur plusieurs

acides humiques dont l'acide humique extrait d'un sol chernozem (région Kursk, Russie). Cet acide humique, nommé HAK, a été étudié dans le détail. La séparation permet d'aboutir à trois fractions notées A, B et C+D (Figure IV.1).

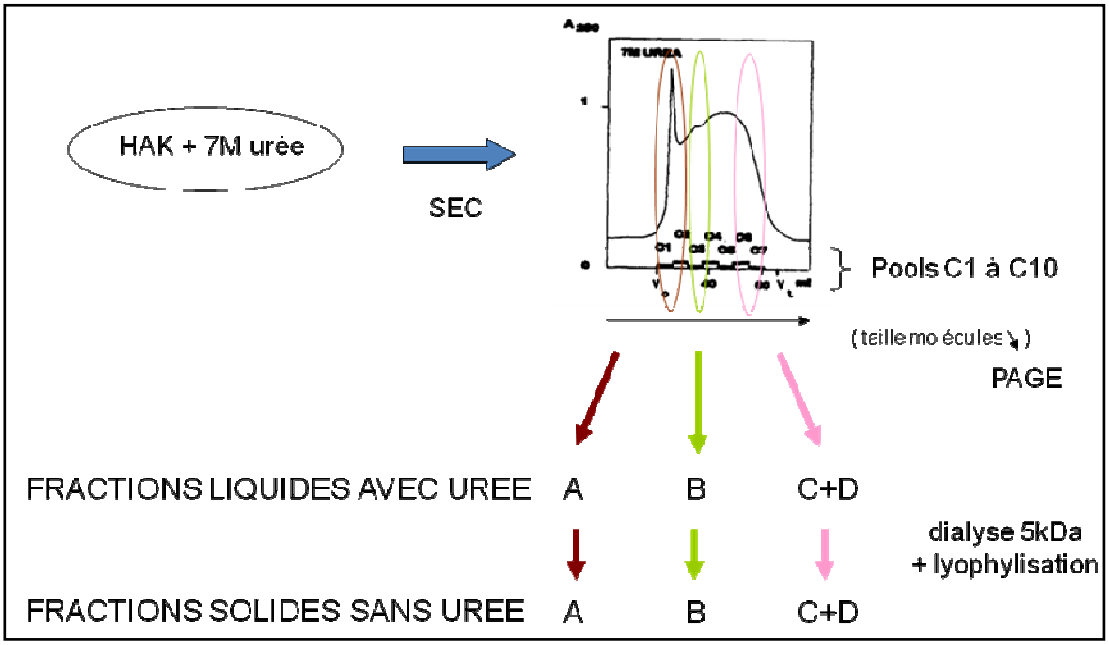


Figure IV. 1 : Etapes successives du fractionnement par SEC-PAGE de HAK, aboutissant aux fractions A, B et C+D.

L'étape de SEC permet de séparer les macromolécules sur un critère de taille. Sont d'abord éluées les macromolécules ne pouvant pas pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les macromolécules de plus petites tailles sont quant à elles éluées les dernières. Sur la Figure IV. 2, on observe que tous les HA présentent des chromatogrammes assez similaires, constitués d'un premier pic regroupant les composés non ou peu retenus sur la colonne et d'une longue traînée regroupant les composés les plus retenus. L'étalonnage a été réalisé en utilisant des composés standards de masse moléculaire connue. C'est l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) qui a mis en évidence que les fractions A, B et C+D contiennent des macromolécules présentant des mobilités électrophorétiques très différentes. Cependant quelque soit le HA utilisé, on retrouve de façon systématique les mêmes zones A, B et C+D sur les électrophérogrammes. La fraction C+D a été appelée ainsi car l'électrophorégramme fait apparaître deux bandes de mobilités très proches, l'une C et l'autre D, (cf. figure IV.3) mais elles ne sont pas séparables.

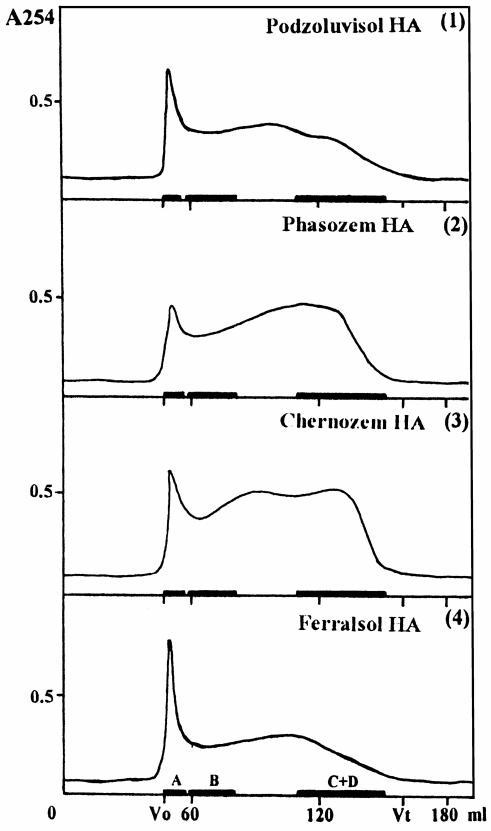


Figure IV. 2 : Séparation par chromatographie d'exclusion stérique d'acides humiques extraits de différents sols, détection à 254 nm, (Trubetskoj et al., 1997).

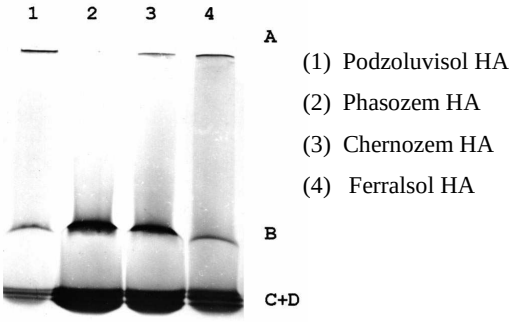


Figure IV. 3 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de ces mêmes acides humiques, (Trubetskoj et al., 1997).

Trubetskoj et al. ont montré que chacune des fractions est constituée d'un ensemble de macromolécules présentant des tailles moléculaires et des mobilités électrophorétiques voisines :

- la fraction A a une masse MW (Molecular Weight) comprise entre 300 et 100 kDa et une très faible mobilité électrophorétique,
- la fraction B a une masse MW comprise entre 100 et 30 kDa et une mobilité électrophorétique intermédiaire,
- enfin, la fraction C+D a une masse MW comprise entre 30 et 5 kDa et la plus grande mobilité électrophorétique.

Les mobilités électrophorétiques sont différentes pour les fractions A, B et C+D d'un acide humique donné, mais identiques pour la même fraction A ou B ou C+D quelque soit l'acide humique. Ces fractions ont été récupérées de façon préparative et en quantités suffisantes pour permettre des analyses ultérieures. Les aliquots de 2 mL prélevés en sortie de colonne après la SEC ont été analysés séparément par PAGE et réunis en fonction de la mobilité électrophorétique obtenue. Les fractions A, B et C+D sont alors purifiées par dialyse sur membrane de 5kDa, puis lyophilisées. Les molécules de taille inférieure à 5 kDa ont donc été éliminées. Le pourcentage de récupération en masse des différentes fractions est donné dans le Tableau IV.1.

Tableau IV. 1 : Récupération en masse (%) des différentes fractions de HAK par SEC-PAGE, selon (Trubetskoj et al., 1997).

A 100-300 kDa	B 30-100 kDa	Mélange B et C+D	C+D 5-30 kDa
24,0 ± 2,7	19,3 ± 2,0	21,0 ± 2,2	35,7 ± 3,7

Sur la base des caractéristiques spectroscopiques de ces fractions, on peut tirer les conclusions suivantes :

- les analyses par FTIR (Richard et al., 2007) montrent que les fonctions acides carboxyliques sont présentes en beaucoup plus grande quantité dans la fraction C+D que dans A et B. Ces dernières sont enrichies en carbones aliphatiques et en fonctions amides ;
- à concentrations massiques égales, l'absorbance mesurée en spectroscopie d'absorption UV-visible diminue dans l'ordre C+D > B >A ;

- les fractions A et B sont faiblement luminescentes au-delà de 450 nm, et elles présentent une bande d'émission avec un maximum localisé vers 350 nm. Généralement cette zone d'émission est attribuée aux constituants protéiniques de type tryptophane (Coble, 1996; Coble et al., 1990). Ceci est donc en lien direct avec la forte présence des fonctions amides. La fluorescence de la fraction C+D donne lieu à un maximum localisé vers 540 nm.

Dans le cadre d'une collaboration avec Oleg et Olga Trubetskoj (Institut des Problèmes Biologiques Basiques et l'Institut de Chimie Bioorganique, Pushchino, Russie), les fractions A, B et C+D ont été comparées pour leur aptitude à sensibiliser la phototransformation de sondes moléculaires (2,4,6-triméthylphénol, fénuron). Le rôle clé de la fraction C+D dans les propriétés photoinductrices des acides humiques a pu être démontré (Richard et al., 2004). Les ordres de réactivité ont été établis sur la base de solutions comparées à même concentration (25 $mg.L^{-1}$). Même si ces résultats donnent certainement un ordre de réactivité convenable, la méthode de comparaison avait besoin d'être améliorée afin d'éliminer l'impact de certains paramètres dont notamment celui connu sous les appellations « d'effet de peau » ou « de filtre interne à l'excitation ». Un autre inconvénient de la méthode utilisée jusqu'alors est la différence d'absorption des solutions étudiées, les coefficients d'extinction molaires à une longueur d'onde donnée étant différents d'une fraction à une autre. Or, pour un même trajet optique, plus l'absorbance d'une solution est élevée, plus l'absorption s'effectue dans les premières couches traversées par le faisceau de la lumière excitatrice. Il s'en suit une plus forte concentration stationnaire d'espèces réactives intermédiaires dans ces premières couches, et donc des réactions bimoléculaires mettant en jeu ces espèces favorisées au détriment des réactions de premier ordre ou de premier ordre apparent. Cet effet de « filtre interne à l'excitation », intervenant aussi lors de l'excitation de la solution pour en déterminer les propriétés d'émission, a été présenté dans le chapitre III. Il convenait donc d'effectuer de nouvelles mesures de la photoréactivité des échantillons déjà étudiés, mais cette fois-ci à absorbance constante à la longueur d'onde d'excitation : c'est l'une des tâches qui m'a été confiée dans le cadre de ma thèse.

Fractionnement par ultrafiltration et propriétés photochimiques d'un acide humique de tourbe (Cavani et al., 2009)

Un acide humique extrait d'une tourbe irlandaise d'espèce Sphagnum, selon le protocole IHSS (http://ihss.gatech.edu/ihss2/soilhafa.html), a été fractionné par ultrafiltration tangentielle en six fractions de masses moléculaires (MW) > 300 kDa, 300-100 kDa, 100-50 kDa, 50-20 kDa, 20-10 kDa et 10-5 kDa. Chacune des fractions a été purifiée par dialyse sur des membranes de taille de pores 0,5 kDa.

Il a été montré que ces fractions présentent des coefficients d'extinction molaires très différents. Les fractions > 300 kDa et 300-100 kDa ont un coefficient d'extinction molaire à 280 nm (ε^*_{280}) voisin de 800 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} et le proche de celui de l'acide humique entier. Les fractions de plus faible masse moléculaire, 10-5 kDa et 20-10 kDa, ont des coefficients d'extinction molaires ε^*_{280} voisins de 200 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} et sont donc visuellement plus claires.

La tendance générale des spectres d'émission de fluorescence consiste en une vaste zone d'émissions situées entre 300 et 600 nm pour des longueurs d'onde d'excitation variant de 250 à 450 nm. La longueur d'onde du maximum de l'émission principale se situe vers 430 nm et plusieurs épaulements sont plus ou moins visibles autour de 360, 380, 400, 500 et 550 nm. Toutes les fractions sont émissives, mais l'intensité d'émission est globalement plus importante pour les fractions 300-100 kDa et 100-50 kDa.

Enfin, toutes les fractions produisant de l'oxygène singulet sous irradiation, Cavani et al. ont recherché s'il existait une corrélation entre propriétés émissives et capacité à générer de l'oxygène singulet. Les meilleurs résultats ont été obtenus en portant la vitesse de disparition de l'alcool furfurylique, capteur d'oxygène singulet, avec l'intensité de fluorescence à 500 nm mesurée pour une excitation à 300 nm : le coefficient de corrélation de la régression linéaire R^2 étant autour de 0,8.

Objet de mon travail

J'ai repris et complété les études de Trubetskoj et al. sur l'acide humique HAK.

- J'ai d'abord repris l'étude sur les fractions A, B et C+D, issues de HAK, dont l'aptitude à générer de l'oxygène singulet n'avait pas été mesurée. J'ai complété ce travail en m'intéressant aux molécules de taille inférieure à 5 kDa dont l'obtention a été mise en œuvre par Oleg et Olga Trubetskoj.

- Parallèlement et pour faire suite aux premières études photochimiques réalisées sur les fractions de HAK, j'ai mis en place un protocole de mesure permettant une comparaison des propriétés émissives et photosensibilisatrices des différents échantillons humiques en éliminant tout effet de filtre interne à la longueur d'excitation de la solution étudiée (cf. chapitre III). Le principe est de faire les mesures à faible absorbance, la même pour tous les échantillons (absorbance à 300 nm, A_{300} = 0,100), puis de ramener les résultats à même concentration de carbone organique (1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$). Il peut néanmoins parfois être judicieux de comparer les résultats à même absorbance afin d'évaluer la proportion des centres absorbants présentant une photoréactivité.

- Enfin, je me suis également intéressé aux extraits aqueux du sol chernozem Kursk et du sol Elliott, dont une partie des macromolécules humiques peuvent être extraites à l'eau. Ce protocole est souvent utilisé car il permet d'isoler la part des molécules potentiellement lixiviables sur un sol (water extractable organic matter, WEOM). Cependant, il faut garder à l'esprit que, dans ce cas, d'une part seuls les composés hydrosolubles sont extraits et, que d'autre part, le taux d'extraction de matière humique est 100 à 200 fois moins important que lors d'une extraction classique à la soude (Tableau IV. 2).

Tableau IV. 2 : Taux de récupération de la matière organique en fonction du mode d'extraction.

HA (extraction avec NaOH 0,1 M)	FA (extraction avec NaOH 0,1 M)	WEOM (extraction avec de l'eau ultrapure)
Sol Chernozem région Kursk (Russie)		
10 %	10 %	0.09 %
Sol Elliott état Illinois (USA)		
17 %	-	0.14 %

IV.2. Etude sur des fractions de l'acide humique HAK

IV.2.1. Détails du fractionnement

Nous avons récupéré les macromolécules de taille inférieure à 5 kDa par ultrafiltration : en présence d'urée.

- Deux solutions de 50 mL ont été utilisées pour dissoudre 50 mg de HAK : soit l'urée 7 M, soit un tampon phosphates 10^{-2} M de pH égal à 6,5. Par une membrane de taille de pores de 5 kDa, on sépare le rétentat (R, 20 mL) d'une part et la solution ultrafiltrée (UF, 30 mL) d'autre part, sous atmosphère de N_2, à une pression de 0,35 bar.

- Le rétentat est dissous de nouveau dans le solvant approprié (eau + urée ou eau + phosphate) et l'opération d'ultrafiltration est renouvelée. Ce procédé est répété vingt et une fois. Les solutions ultrafiltrées sont purifiées par dialyse sur une membrane de 0,5 kDa puis lyophilisées.

- Nous appellerons $UF_{1,u}$, $UF_{2\text{-}22,\,u}$ et $R_{22,\,u}$ respectivement les fractions ultrafiltrées provenant de la première ultrafiltration, la somme de celles récupérées de la deuxième à la vingt-deuxième ultrafiltration et le rétentat obtenu au bout de la vingt-deuxième ultrafiltration, en présence d'urée. Pour les ultrafiltrations avec le tampon phosphate, les échantillons sont notés $UF_{1,p}$ (pour la première), $UF_{2,p}$ (pour la seconde), $UF_{3,p}$ (pour la troisième) et $UF_{7,p}$ (pour la septième).

L'ensemble du protocole est résumé sur la Figure IV. 4.

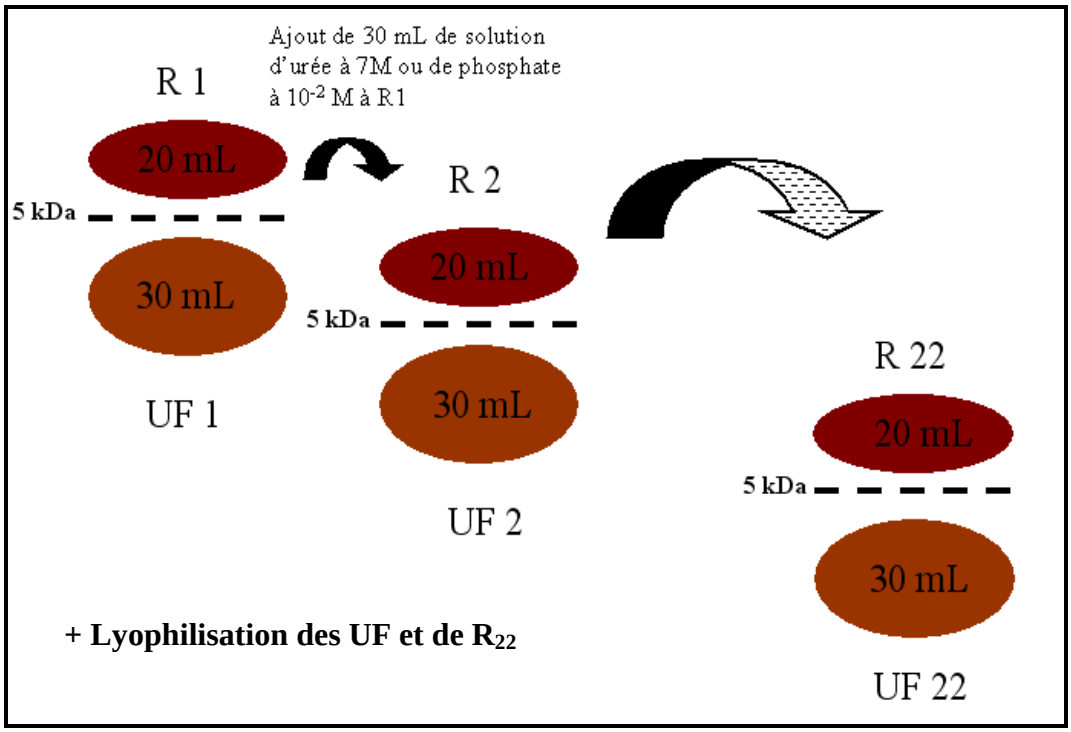


Figure IV. 4 : Etapes successives du fractionnement par ultrafiltration de HAK, aboutissant aux fractions UF_1 à UF_{22}.

Les taux de récupération en masse de l'ensemble des fractions ($UF_{1,u}$ + $UF_{2\text{-}22\ u}$) est de 20 %. Le rétentat, quant à lui, a été pesé à 25 mg soit 50 % de la masse initiale de HAK. Il manque donc 30 % de matière. Il est sûr qu'une partie a été perdue au cours des différentes manipulations. Dans le cas de l'ultrafiltration avec le tampon phosphate, la masse d'ultrafiltré était deux fois plus faible (Oleg Trubetskoj, communication personnelle). Ce résultat est important, car il montre que l'urée permet une meilleure extraction des « petites molécules » (molécules de masses inférieures à 5kDa) par rapport au phosphate. Sa capacité à rompre les liaisons hydrogènes est vraisemblablement impliquée dans ce phénomène (Trubetskoj et al., 1991).

IV.2.2. Analyses des fractions

La mesure du carbone a été réalisée sur chacun des échantillons : le pourcentage massique de carbone (%m C) est donné dans le Tableau IV. 3 pour les fractions A, B et C+D et les fractions ultrafiltrées UF et R_{22}. Pour les fractions A, B et C+D nous avons mesuré le carbone par analyse élémentaire. Pour HAK, nous avons mesuré le carbone organique dissous

par TOC et le carbone par analyse élémentaire, les valeurs étaient très voisines. Pour les fractions nous avons mesuré le carbone organique dissous par TOC.

Tableau IV. 3 : Pourcentage massique de carbone dans les fractions de HAK obtenues par SEC-PAGE ou par ultrafiltration sur 5 kDa.

HAK entier	A	B	C+D	$UF_{1,u}$	$UF_{2a22,u}$	$R_{22,u}$
56,3	38,6	43,6	44,1	31,5	27,5	53,9

Il est intéressant de noter qu'au terme des 22 ultrafiltrations, le rétentat $R_{22,u}$ contient un pourcentage massique de carbone voisin de celui de HAK entier. En supposant qu'elles ne contiennent pas plus de cendres ou d'eau que le rétentat et HAK, les fractions UF sont comparativement "appauvries en carbone" ou sont "enrichis en hétéroatomes".

Pour les fractions ultrafiltrées en présence de tampon phosphates (UF_p), les mesures de carbone par analyse élémentaire n'ont pas pu être réalisées du fait du manque de matière. A partir des mesures de carbone organique dissous, nous avons pu déterminer la concentration massique de carbone (%m DOC) dans les solutions d'absorbance A_{300} = 0,100 (cf. Annexe 18). Ces valeurs nous serviront par la suite pour les normalisations à même concentration de carbone organique dissous (DOC).

IV.2.3. Propriétés spectrales

Spectres d'absorption moléculaire UV-visible

Les spectres d'absorption moléculaire UV-visible des différentes fractions, normalisés à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ de DOC et pour trajet optique de 1 cm, sont donnés sur la Figure IV. 5.

a)

b)

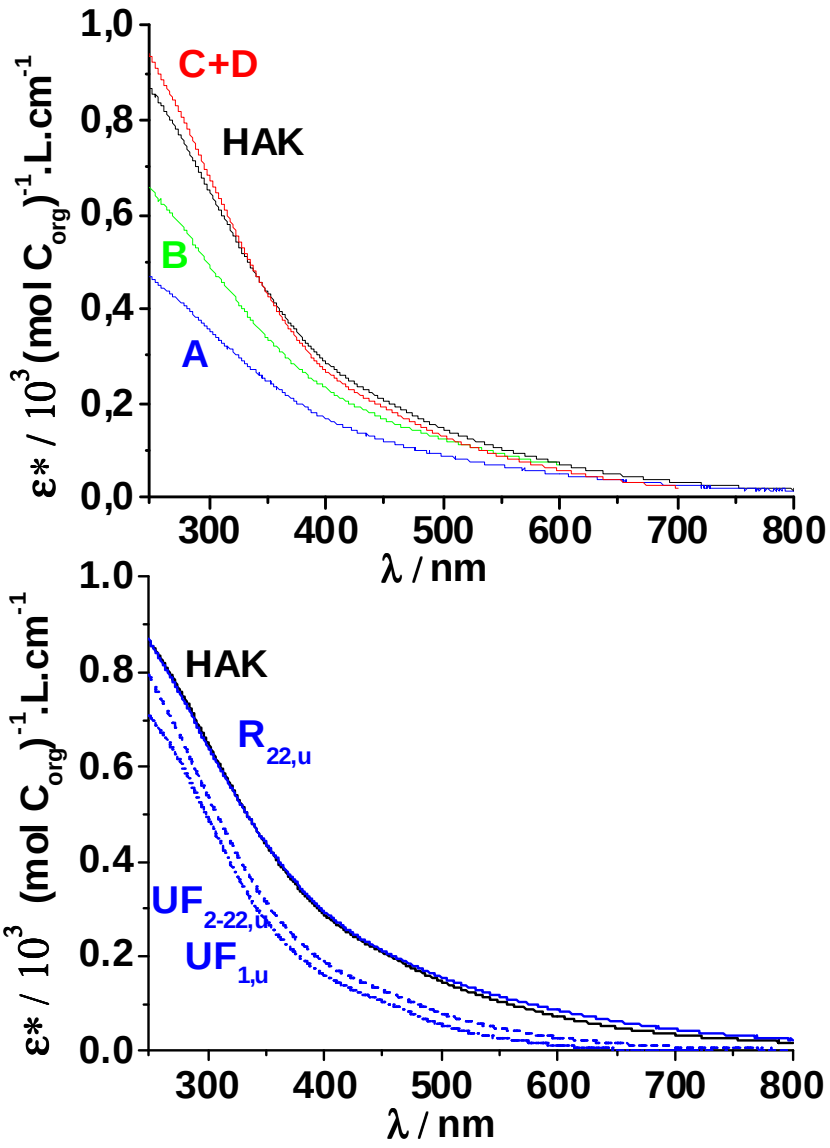


Figure IV. 5 : Spectres d'absorption UV-visible normalisés à 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique dissous des fractions de HAK obtenues (a) par SEC-PAGE et (b) par ultrafiltration à l'urée.

Quelque soient les fractions considérées, les spectres UV-visible présentent une allure exponentiellement décroissante de 250 à 600 nm. Dans la partie UV (250-380 nm), l'absorbance varie dans l'ordre :

$$HAK \approx C+D > B > A \quad \text{et} \quad UF_{1,p} \approx UF_{2,p} >> HAK \approx R_{22,u} > UF_{1,u} \approx UF_{1\text{-}22,u}$$

L'examen détaillé des spectres d'absorption UV-visible révèle que le rétentat présente une absorbance régulièrement descendante lorsque la longueur d'onde augmente alors que HAK et surtout les UF ont eux un épaulement bien visible autour de 450 nm et sans doute aussi 250 nm. Dans le cas du rétentat, on peut déterminer une pente spectrale S de -0,00618 entre 400 et 800 nm (R^2 = 0,99984). Si l'on prend cette même valeur de S, on peut bien modéliser l'absorbance de HAK dans la zone 630-800 nm. En dessous de 630 nm, la courbe expérimentale est nettement au dessus de la courbe calculée. Par différence on obtient un spectre d'absorption voisin de celui mesuré pour les UF (Figure IV.6).

On peut donc conclure que l'absorption de HAK est la superposition de différentes bandes. L'une, de type exponentielle décroissante, est attribuable à des structures conjuguées avec des électrons délocalisés. L'autre est due à des chromophores individuels. Ces derniers ont pu être séparés par l'ultrafiltration en présence d'urée.

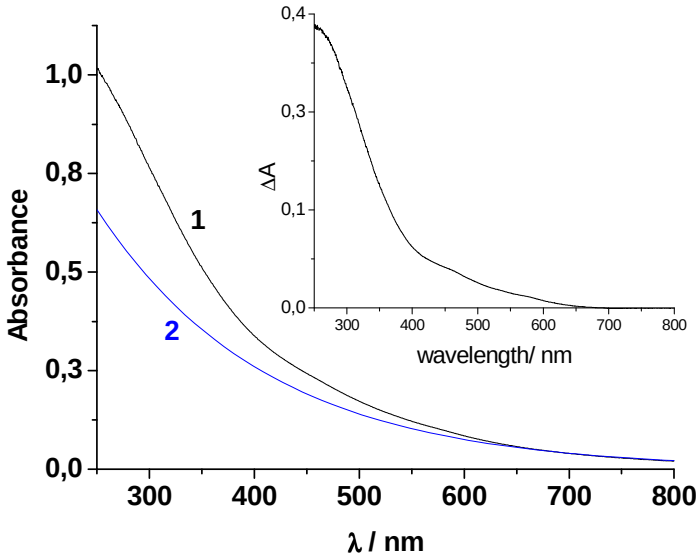


Figure IV. 6 : Spectres d'absorption UV-visible de HAK (courbe 1) ; tracé exponentiel avec S= -0,00618 (courbe 2). En insert : différence entre les deux courbes.

L'absorbance à 280 nm normalisée à une concentration de 1,00 mol C_{org} $.L^{-1}$ et pour trajet optique de 1 cm, comme définie dans le chapitre III, est notée ε^*_{280}. Les valeurs sont données Tableau IV. 4.

Tableau IV. 4 : Propriétés d'absorption électronique des différentes fractions étudiées.

	ε^*_{280} (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1}	A_{254}/A_{365}
HAK	746 ± 75	2,22 ± 0,12
A	405 ± 41	2,08 ± 0,11
B	568 ± 57	2,13 ± 0,11
C+D	790 ± 65	2,37 ± 0,12
$UF_{1,u}$	595 ± 69	3,02 ± 0,15
$UF_{2\text{-}22,u}$	645 ± 66	2,91 ± 0,15
$R_{22,u}$	737 ± 74	2,19 ± 0,11
$UF_{1,p}$	1480 ± 148	2,87 ± 0,15
$UF_{2,p}$	1735 ± 174	2,72 ± 0,14
$UF_{3,p}$	1635 ± 164	2,74 ± 0,14
$UF_{7,p}$	1329 ± 133	2,73 ± 0,14

Les résultats de la Figure IV. 5 et du Tableau IV. 4 montrent que les centres absorbants sont plus concentrés dans les fractions de bas poids moléculaire et particulièrement dans les fractions UF_p. Nous avons vu précédemment que le tampon phosphate extrayait moins de matière que l'urée. Les résultats suggèrent donc que le tampon phosphate et l'urée extraient les composés très absorbants de HAK. Mais l'urée extrait en plus des composés non ou peu absorbants de sorte que l'absorbance moyenne des fractions s'en trouve affaiblie.

Il est très vraisemblable que le phénomène de diffusion de la lumière par la solution impacte les spectres d'absorption UV-visible, comme semble le renseigner l'absorbance à grande longueur d'onde. Généralement, pour les fractions de plus petite taille moléculaire : C+D, UF_u et UF_p, les valeurs d'absorbance à 800 nm sont plus faibles que pour les fractions A, B, $R_{22,u}$ et pour HAK. Ceci traduit une diffusion de la lumière par la solution plus importante pour les fractions de plus haut poids moléculaire. Lorsqu'un échantillon humique se retrouve en solution, ce paramètre diffusionnel est très difficile à contrôler.

Nous avons également considéré le rapport A_{254}/A_{365}, correspondant au rapport de l'absorbance à 254 nm sur l'absorbance à 365 nm. Il varie entre 2,08 à 3,02 dans l'ordre :

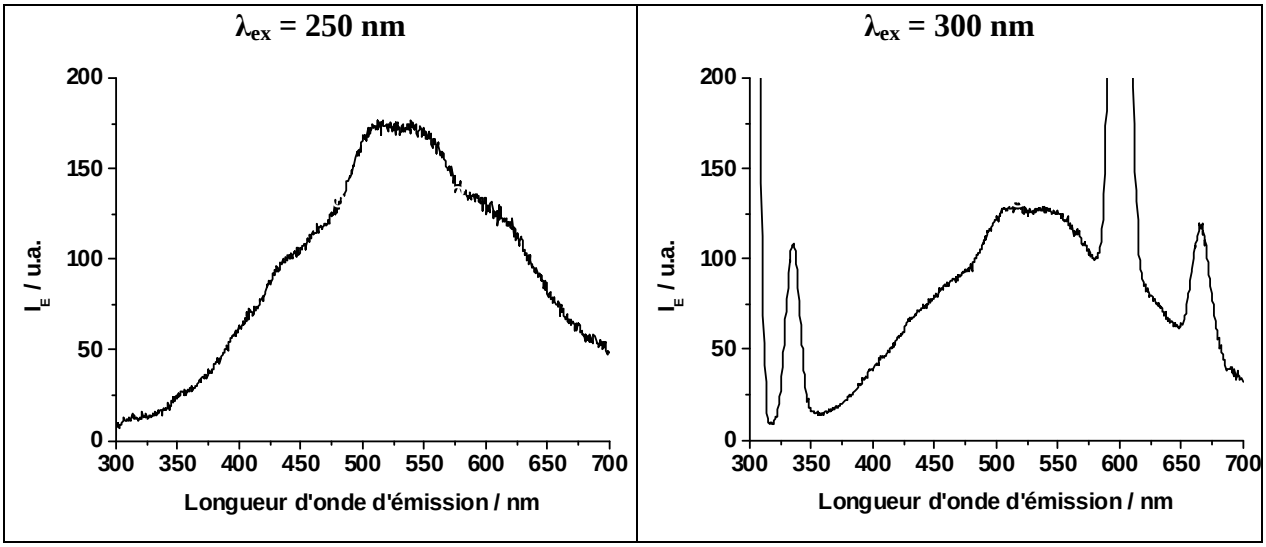
$$A < B < HA \approx R_{22,u} < C+D < \text{UF phosphate} < \text{UF urée}.$$

Il apparaît que la valeur du rapport A_{254}/A_{365} diminue lorsque la masse moléculaire augmente. Ceci a déjà été constaté dans différentes fractions d'acides humiques aquatiques, séparées par SEC (Peuravuori et Pihlaja, 1997). Les échantillons de grande masse moléculaire contiennent une proportion plus importante de centres absorbants à grande longueur d'onde que les échantillons de faible masse moléculaire. L'absorption à grande longueur d'onde est attribuable à des complexes par transfert de charge et à des structures dans lesquelles il y a une importante délocalisation des électrons. Il est donc tout à fait logique que ces structures soient plus présentes dans les macromolécules de plus grandes masses.

Spectres d'émission moléculaire

✓ Construction de la matrice d'excitation et d'émission (EEM)

Comme indiqué dans le chapitre III, les matrices d'excitation et d'émission ont été enregistrées en diluant les différents échantillons de façon à obtenir une absorbance faible et constante de 0,100 ± 0,005 à 300 nm. La Figure IV.7 présente six spectres d'émissions enregistrés pour six longueurs d'onde d'excitation variant de 250 nm à 500 nm par pas de 50 nm.



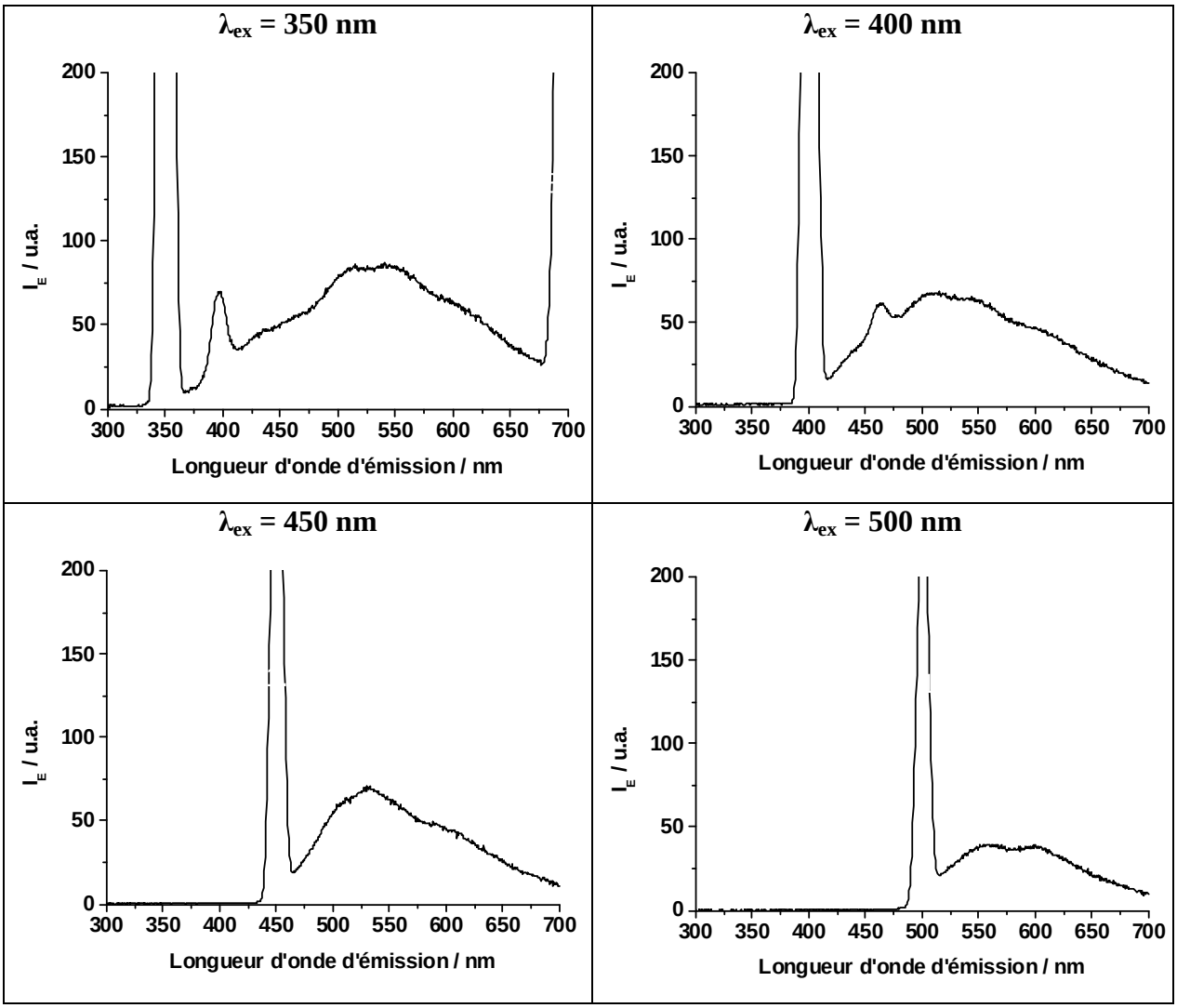


Figure IV. 7 : Spectres d'émissions de HAK pour six longueurs d'onde d'excitation différentes : 250, 300, 350, 400, 450 et 500 nm, à A_{300} = 0,100.

Il apparaît que la superposition de ces six spectres conduit à l'EEM. L'EEM est obtenue en regroupant l'ensemble des spectres d'émissions. Pour chacune des fractions, les EEM sont normalisées à la concentration de carbone organique dissous 1,00 mol.L^{-1}. Les EEM de HAK et des différentes fractions sont données en annexes 1, 2 et 3. L'échelle commune à tous les EEM présentées est celle de HAK (cf. Figure IV. 8). En haut à gauche du spectre, le nom de l'échantillon est noté, suivi de la mention *I_f divisée par* ou *I_f multipliée par* signifiant respectivement que l'intensité d'émission de fluorescence réelle est à diviser ou à multiplier par le coefficient mentionné pour retrouver l'EEM mesuré expérimentalement.

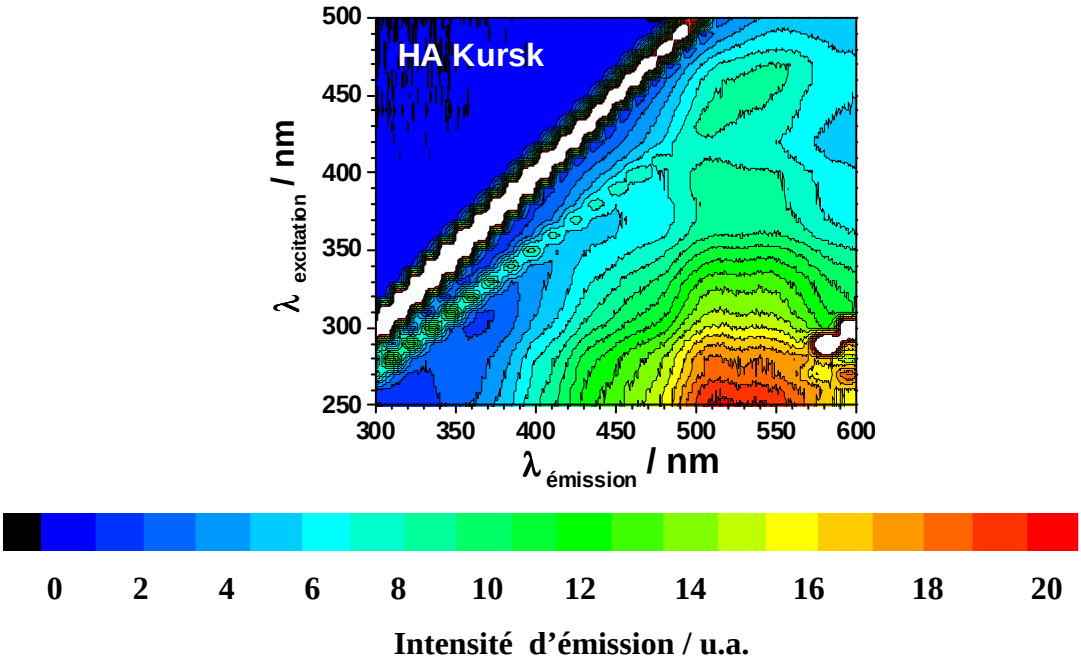


Figure IV. 8 : EEM de HAK pour une teneur en carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.

✓ **HAK** (cf. Figure IV. 7 et Figure IV. 8)

La lecture des spectres est rendue difficile par la présence des raies Rayleigh et Raman du premier et second ordre. Un bon compromis consiste à considérer le spectre d'émission à la longueur d'onde d'excitation à 300 nm. Il est également intéressant de donner la vision globale de l'EEM.

HAK présente un double maximum d'émission vers 510 nm et 550 nm. En plus, les spectres contiennent plusieurs épaulements d'émission à 350, 400, 430 et 600 nm. Dans la littérature, les composés émettant aux grandes longueurs d'onde sont décrits comme des structures hautement conjuguées et aromatiques portant des substituants électro-accepteurs tels que les groupements carbonyles et carboxylates ou à des systèmes de liaisons insaturées très fortement conjugués (Senesi et al., 1991). L'intervention de complexes par transfert de charge a également été proposée (Boyle et al., 2009; Del Vecchio et Blough, 2004).

✓ **Fractions** (cf. Figure IV. 9, Figure IV. 10 et annexes 1, 2 et 3)

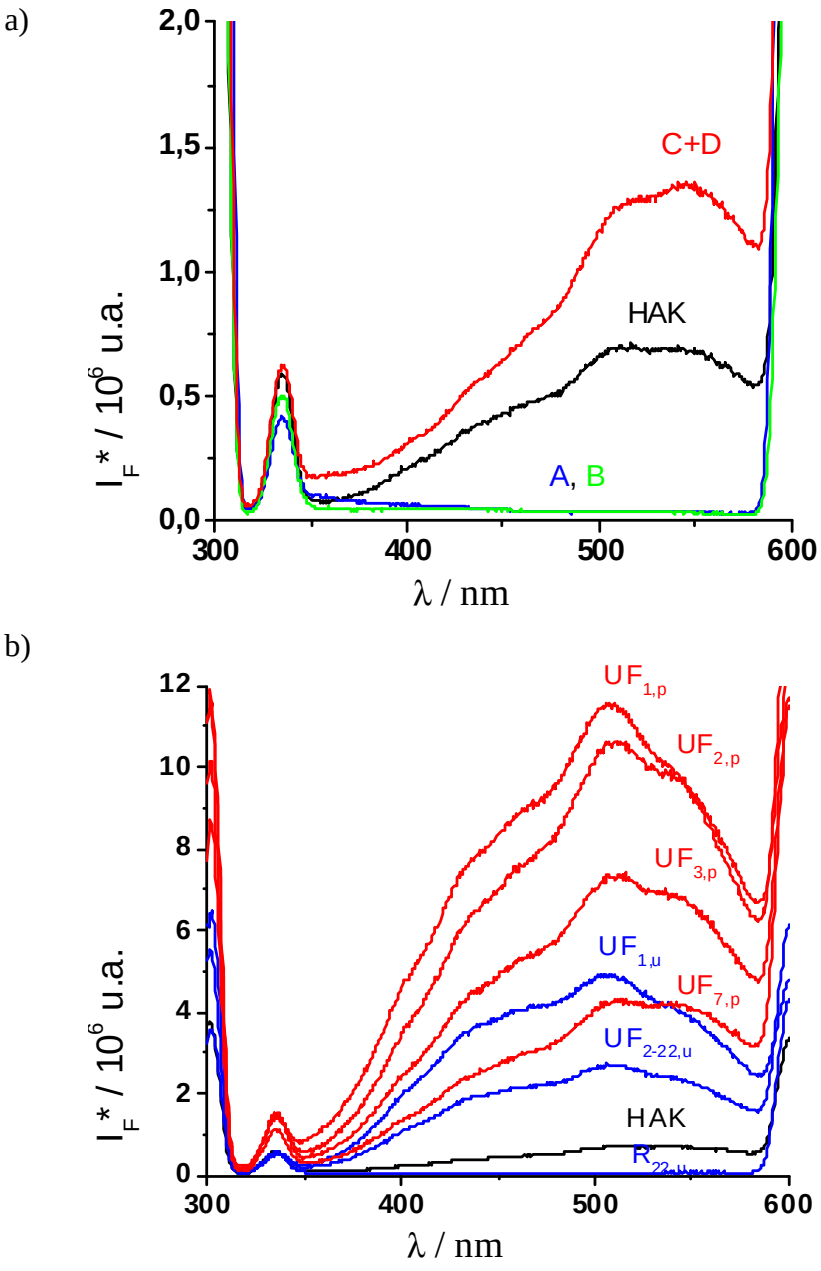


Figure IV. 9 : Spectres d'émissions des fractions de HAK obtenues (a) par SEC-PAGE et (b) par ultrafiltration à l'urée et au phosphate pour une longueur d'onde d'excitation à 300 nm, normalisés à une teneur de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.

(a) SEC-PAGE à l'urée

(b) ultrafiltration à l'urée

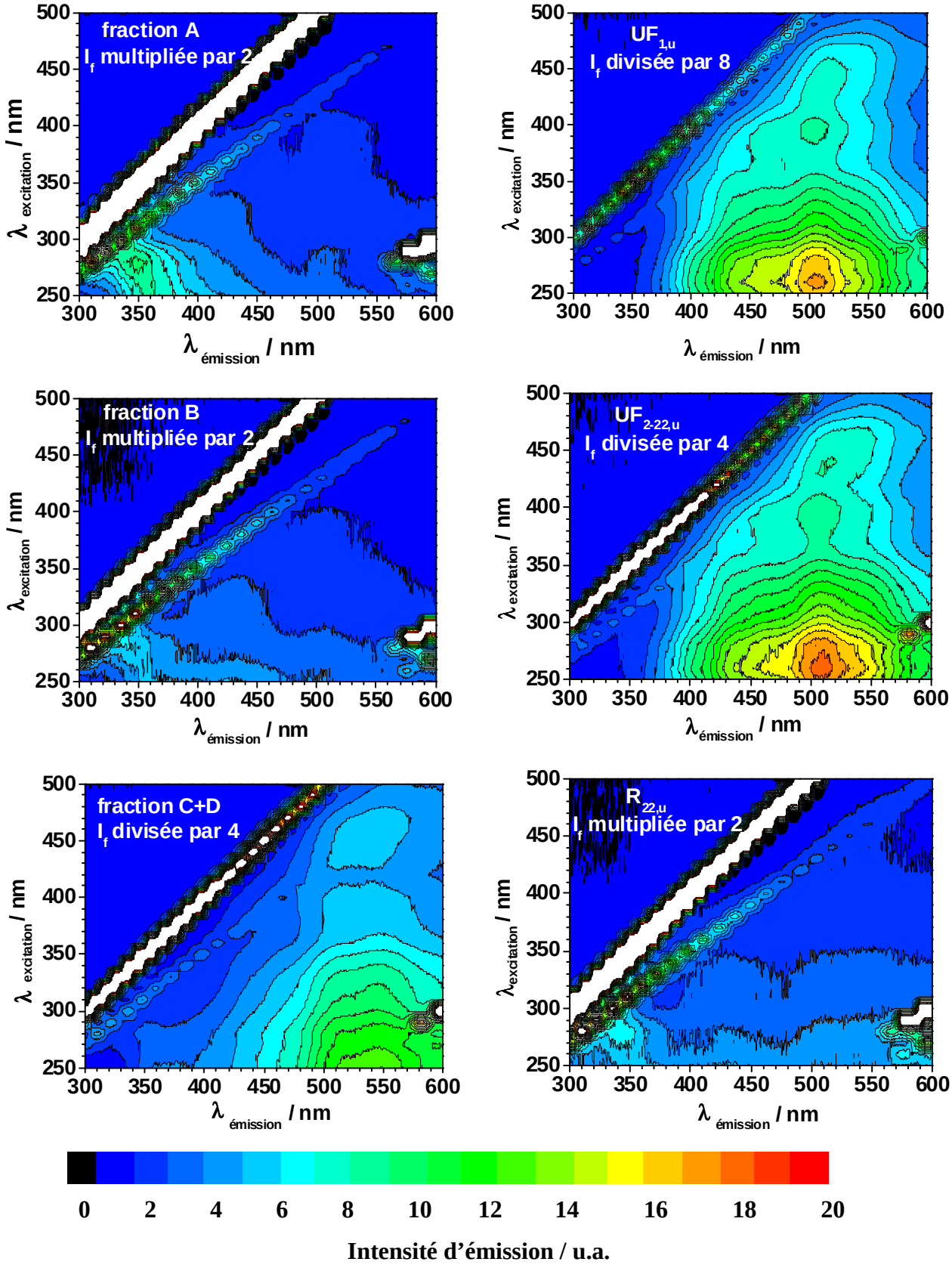


Figure IV. 10 : EEM des fractions de HAK obtenues par SEC-PAGE à l'urée (a) et par ultrafiltration à l'urée (b). EEM normalisées à une teneur en carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.

Comme déjà rapporté dans la littérature, les fractions A et B sont peu émissives comparées à HAK et à la fraction C+D (Richard et al., 2004; Trubetskaya et al., 2002). Les principales émissions des fractions A et B sont observées vers 350 nm, elles sont caractéristiques des fluorophores de type tryptophane. La fraction C+D, quant à elle, présente une dominante entre 500 et 570 nm avec 2 maxima vers 510 et 540 nm. Les intensités ont dû être divisées par 4 pour être comparables à celles de HAK. Cela signifie que l'émission de la fraction C+D est 4 fois plus intense vers 550 nm que de HAK. Dans cette fraction C+D on ne distingue pas l'émission de type tryptophane, la raison pourrait en être la division par 4 de l'intensité.

Un des résultats qui a attiré notre attention est le fait que l'émission vers 510 nm bien qu'importante dans HAK est peu visible dans la fraction C+D et non détectée dans les autres fractions. Cela signifie que les fluorophores à 510 nm ont été « perdus » au cours du fractionnement par SEC-PAGE.

Sachant que la méthode de fractionnement utilisée jusqu'alors mettait en jeu une purification des fractions par dialyse sur une membrane de taille de pores égale à 5 kDa, nous avons pensé que les fluorophores manquant se trouvaient dans le pool de molécules de bas poids moléculaire (inférieures à 5 kDa) éliminées dans cette étape de purification. C'est la raison pour laquelle nous avons mis en place les ultrafiltrations déjà décrites. Il apparaît effectivement que $UF_{1,u}$ et $UF_{2\text{-}22,u}$ émettent avec une dominante à 510 nm.

Le rétentat $R_{22,u}$ a une empreinte assez similaire à celle des fractions A et B, avec l'émission de type tryptophane vers 350 nm et aucune émission à grande longueur d'onde. L'émission de $UF_{1,u}$ à 510 nm est plus de 2 fois plus intense que celle de la fraction C+D à 550 nm. L'émission à 550 nm existe aussi dans $UF_{1,u}$ mais elle est faible. L'intensité de l'émission à 510 nm diminue au fil des ultrafiltrations successives.

Les échantillons UF au phosphate ressemblent beaucoup aux échantillons UF à l'urée. Ils émettent deux fois plus intensément.

On peut essayer d'évaluer quantitativement la part de fluorescence dans HAK provenant de la fraction < 5 kDa. Pour faire ce calcul, nous nous sommes basés sur la quantité de carbone organique contenue dans les fractions. $UF_{1,u}$ et $UF_{2\text{-}22,u}$ contiennent respectivement 2 et 10 % du CO de HAK (données personnelles d'Olga Trubetskaya). On peut alors recalculer l'émission correspondant aux UF. Par différence, on a la part de

fluorescence « perdue » au cours de l'ultrafiltration. Le spectre d'émission différence a un maximum vers 550 nm à l'instar de la fraction C+D (Figure IV.11). Deux possibilités sont envisageables. Les fluorophores émettant à 550 nm sont restés dans le rétentat mais ont été éliminés au cours du lavage à l'eau de cette fraction. Les fluorophores émettant à 550 nm ont été extraits mais ont perdu leurs propriétés émissives dans le changement d'environnement et/ou de conformation.

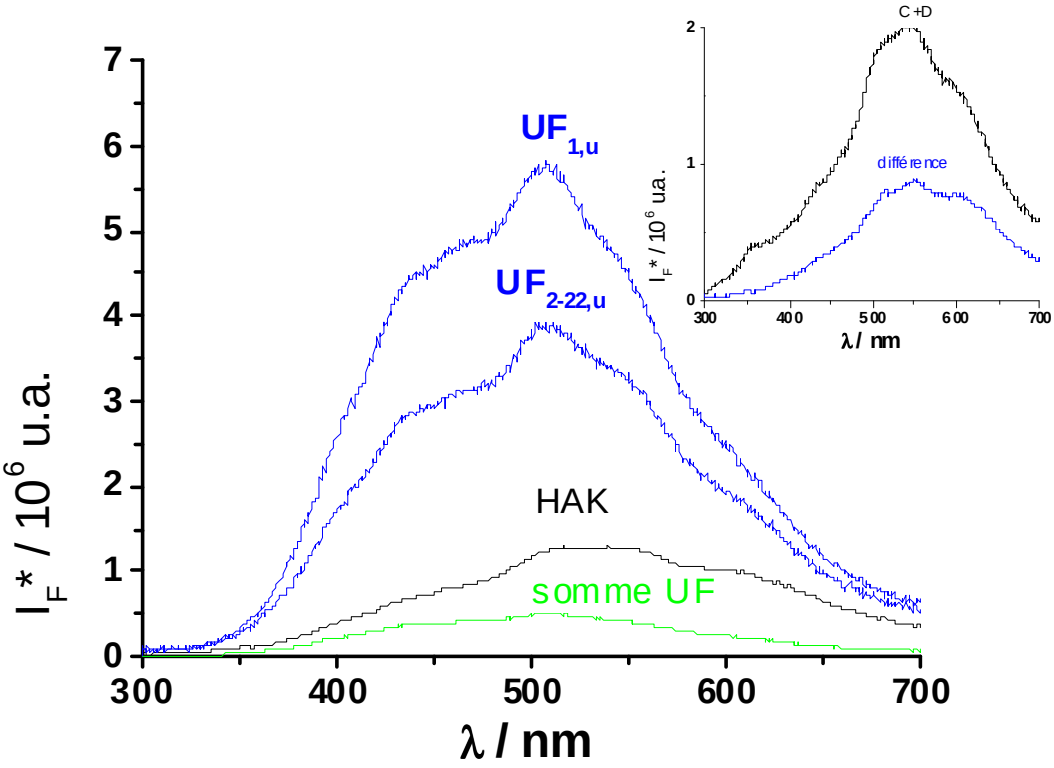


Figure IV. 11 : Spectres d'émission pour une excitation à 250 nm de $UF_{1,u}$, $UF_{2\text{-}22,u}$, HAK et de la somme pondérée de l'émission sur la base du carbone organique des fractions $UF_{1,u}$ et $UF_{2\text{-}22,u}$. En insert : différence entre l'émission de HAK et cette somme.

En résumé

Les études complémentaires sur les fractions SEC-PAGE ont permis de confirmer que les fractions A et B contiennent l'essentiel du pool des acides aminés et qu'à même carbone organique, la fraction C+D, dont l'émission dominante est à 540 nm, est plus émissive que HAK.

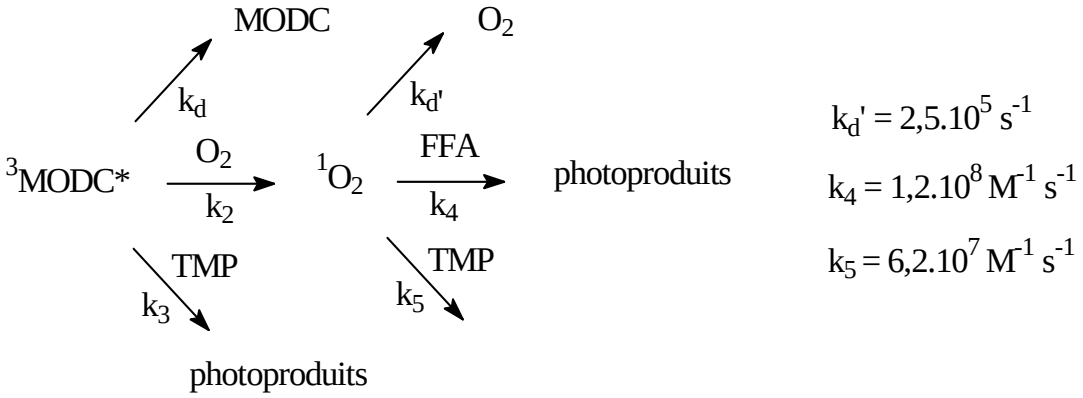
Le fractionnement par ultrafiltration en présence d'urée a plusieurs avantages.

- Il permet une certaine séparation des chromophores individuels du pool de structures conjuguées donnant une absorbance décroissante exponentiellement.
- Les ultrafiltrés sont entre 4 et 8 fois plus émissifs que HAK. Leur composante d'émission majoritaire se situe à 510 nm. On a ainsi récupéré les fluorophores 510 nm qui étaient visibles dans HAK mais non récupérés au cours du fractionnement SEC-PAGE.
- Les fractions UF au phosphate donnent les mêmes empreintes que les échantillons UF à l'urée, avec des intensités deux fois plus importantes.

La séparation des fluorophores 510 et 550 nm n'avait encore jamais été rapportée dans la littérature.

IV.2.4. Propriétés photosensibilisatrices

Nous avons également comparé l'aptitude des différents échantillons à photosensibiliser la transformation des composés organiques. Rappelons que les substances humiques produisent sous excitation des états excités triplets qui conduit à l'oxygène singulet par transfert d'énergie sur l'oxygène moléculaire. Deux types de molécules sondes ont été choisies : le 2,4,6-triméthylphénol (TMP) et l'alcool furfurylique (FFA). Le premier piège essentiellement les états excités triplets et le second l'oxygène singulet.

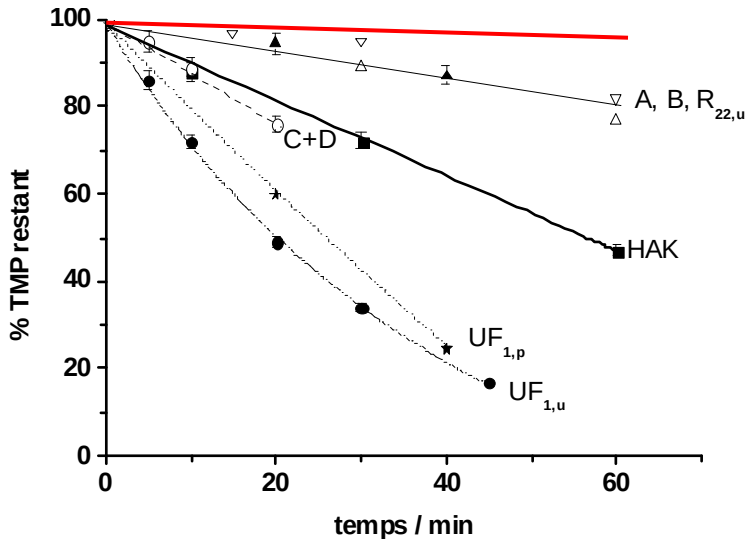


Dans une étude précédente (Halladja et al., 2007), il a été montré que les états triplets d'un acide humique et d'un acide fulvique de sol Elliott photosensibilisaient l'oxydation du TMP par réaction directe avec lui. TMP réagit de façon négligeable avec l'oxygène singulet dans les conditions expérimentales choisies. Le rapport k_2/k_3 a été trouvé égal à 1,09 pour HA et 1,16 pour FA. Ainsi, à 10^{-4} M, TMP capte entre 40 à 80% des triplets, respectivement pour HA et FA. FFA est essentiellement oxydé par l'oxygène singulet. Pour preuve, le 2-propanol, capteur de radicaux hydroxyle, n'a pas d'effet sur la réaction et l'azoture de sodium, capteur de radicaux hydroxyles et d'oxygène singulet, inhibe la réaction dans un rapport correspondant parfaitement à celui calculé sur la base d'une constante de vitesse de réaction de $7{,}8.10^8\ M^{-1}.s^{-1}$ avec $^1O_2$. A 10^{-4} M, FFA capte 4,8 % de l'oxygène singulet.

Comme pour l'étude des propriétés émissives, les comparaisons entre substances humiques ont été établies à partir de mesures cinétiques (i) réalisées sur des solutions présentant une faible absorbance pour éliminer l'effet d'écran et (ii) normalisées à même carbone organique. Les solutions ont été irradiées en lumière polychromatique. Le détail de la procédure expérimentale est décrit au chapitre III.

La Figure IV. 12 donne les cinétiques de phototransformation de TMP (10^{-4} M) et FFA (10^{-4} M) exposés chacun à la lumière en présence des différents échantillons humiques. Nous avons vérifié que dans chacun des cas le 2-propanol n'exerçait aucun effet inhibiteur sur les réactions de phototransformation. Ceci montre que les radicaux hydroxyle n'interviennent pas de façon significative sur les réactions. En outre, il a été vérifié que l'azoture exerçait un effet inhibiteur sur la photooxygénation de FFA mais pas sur celle de TMP. Donc il ne capte que l'oxygène singulet. Cette vérification a été faite sur les fractions A, B et C+D.

a)



b)

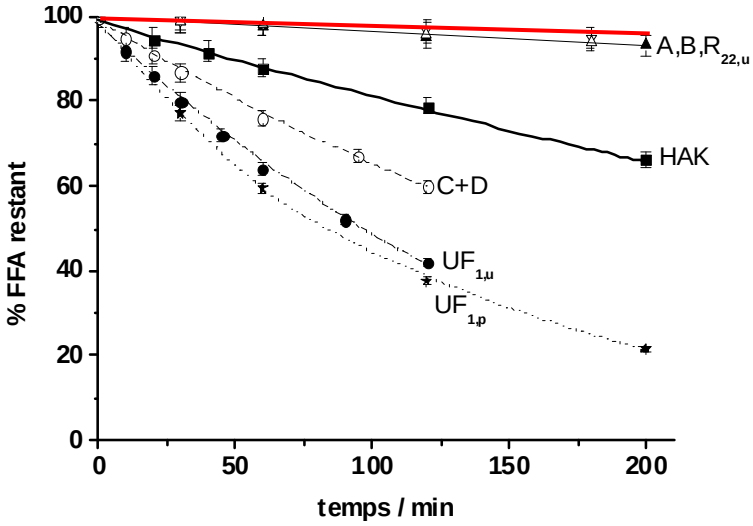


Figure IV. 12 : Cinétiques de disparition du TMP 10^{-4} M (a) et FFA 10^{-4} M (b) en présence des différentes fractions d'acide humique de sol chernozem sous irradiation. Comparaison pour une même absorbance A_{300} = 0,100.

Irradiés seuls, les deux substrats disparaissent à une vitesse négligeable.

TMP disparaît nettement plus vite quelque soit l'échantillon humique en présence duquel il est irradié. Sa vitesse de disparition augmente dans l'ordre :

$$A \approx B \approx R_{22,u} < HAK < C+D < UF_{1,p} < UF_{1,u}$$

FFA disparaît très lentement en présence de A, B et $R_{22,u}$ mais beaucoup plus vite en présence de HAK, C+D, $UF_{1,u}$ et $UF_{1,p}$. Sa vitesse de disparition augmente dans l'ordre :

$$A \approx B \approx R_{22} << HAK < C+D < UF_{1,u} \approx UF_{1,p}$$

Les ordres de réactivité sont donc voisins. Les cinétiques de disparition sont du pseudo premier ordre en substrat comme on peut le voir par le tracé de $\ln[FFA]/[FFA]_0$ en fonction du temps représenté sur la Figure IV.13.

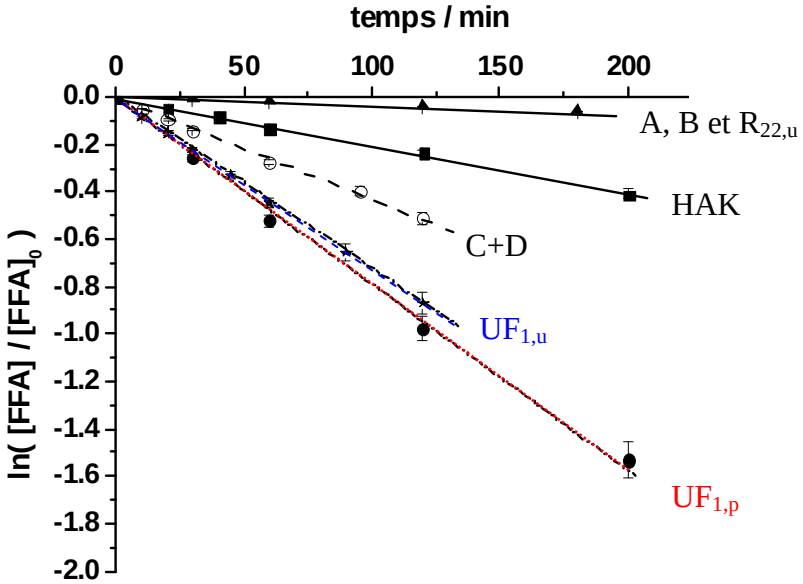


Figure IV. 13 : Cinétiques de disparition de FFA de pseudo premier ordre pour les différentes fractions de HAK, sous irradiation.

Nous avons procédé de la même façon pour TMP. Les valeurs des pentes des régressions linéaires, k_{FFA} et k_{TMP}, sont portées dans le Tableau IV.5. Toutes les valeurs ont été normalisées à 1,00 mol L^{-1} de carbone organique pour obtenir k^*_{FFA} et k^*_{TMP}.

Tableau IV. 5 : Constantes de vitesse de disparition de TMP (10^{-4} M) et de FFA (10^{-4} M) k_{TMP} et k_{FFA} avant et après normalisation à 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique dissous en présence des différentes fractions de HAK. Rapport r = k_{TMP}/k_{FFA}.

Technique de fractionnement	Fraction	TMP		FFA		
		k_{TMP} / 10^{-4} s^{-1}	**k^*_{TMP} / s^{-1}**	k_{FFA} / 10^{-4} s^{-1}	**k^*_{FFA} / s^{-1}**	r
	HAK	2,15	**1,39 ± 7 %**	0,26	**0,17 ± 9 %**	8,2
SEC-PAGE à l'urée	A	0,77	**0,35 ± 5 %**	0,057	**0,03 ± 5 %**	13,5
	B	0,66	**0,51 ± 23 %**	0,047	**0,03 ± 11 %**	14,0
	C+D	2,32	**1,58 ± 9 %**	0,77	**0,52 ± 5 %**	3,0
Ultrafiltration à l'urée	$UF_{1,u}$	5,93	**2,69 ± 5 %**	1,23	**0,55 ± 5 %**	4,8
	$UF_{2\text{-}22,u}$	4,58	**2,52 ± 9 %**	0,82	**0,45 ± 4 %**	5,6
	$R_{22,u}$	0,65	**0,42 ± 9 %**	0,061	**0,04 ± 12 %**	10,6
Ultrafiltration au tampon phosphate	$UF_{1,p}$	3,84	**4,73 ± 5 %**	1,31	**1,61 ± 6 %**	2,9
	$UF_{2,p}$	4,26	**6,25 ± 5 %**	1,39	**2,04 ± 9 %**	3,1
	$UF_{3,p}$	1,96	**2,72 ± 5 %**	0,99	**1,38 ± 9 %**	2,0
	$UF_{7,p}$	1,96	**2,21 ± 5 %**	0,92	**1,04 ± 5 %**	2,1

L'examen détaillé de ces résultats laisse apparaître les faits suivants :

● les valeurs de k_{TMP} sont plus grandes que celles de k_{FFA}. Ceci est dû à la différence de réactivité des deux molécules à l'égard de chacune des espèces réactives impliquées.

● les variations de k^*_{TMP} et k^*_{FFA} sont assez similaires. L'ordre est le suivant :

$$A \approx R_{22,u} \approx B < HAK < C+D < UF_{1,u} < UF_{1,p} < UF_{2,p}$$

● FFA est une sonde plus sélective que TMP car en effet k_{FFA} varie dans une échelle de 1 à 30 alors que k_{TMP} varie dans une échelle de 1 à 9. Nous avons porté dans la dernière colonne, r, le rapport k_{TMP}/k_{FFA}. Il varie entre 2 et 14 dans l'ordre :

$$\text{UF phosphate} < C+D < \text{UF urée} < HAK < A = B = R_{22,u}$$

Cette variation du rapport r est vraisemblablement la preuve qu'une partie des réactions a lieu en solution et une autre dans la zone intra-humique. Si les réactions avaient lieu uniquement en solution, le rapport r serait toujours le même car il serait uniquement fonction de la proportion d'espèces réactives captées par TMP d'une part et FFA d'autre part. Cette proportion ne dépendrait alors que de la concentration des sondes utilisées. Le fait que r varie avec la fraction montre que le nombre d'états excités triplets accessibles aux sondes varient. Cette variation peut être rapportée à l'hydrophobicité de la sonde. Le coefficient de partage octanol/eau renseigne sur la polarité de nos deux sondes : il est de 0,28 pour FFA contre 2,73 pour le TMP, ce qui montre que TMP est beaucoup plus hydrophobe que FFA. On peut alors présumer que TMP peut se glisser dans les zones intra-humiques hydrophobes alors que FFA reste dans la phase aqueuse. Ainsi, dans certains cas, TMP peut avoir accès à un plus grand nombre d'espèces réactives (triplets ou oxygène singulet) que FFA. D'où l'augmentation du rapport r. D'ailleurs, le fait que TMP soit moins sélectif que FFA est en bon accord. Sur cette base, on peut conclure que les fractions A, B et $R_{22,u}$ sont capables de produire des triplets qui réagissent avec TMP, en revanche, l'oxygène singulet formé à partir de ceux-ci accède très difficilement à FFA. Ces triplets produisent très vraisemblablement de l'oxygène singulet (Latch et McNeill, 2006), mais ce dernier se désactive avant de rencontrer FFA confiné dans la phase aqueuse. Les fractions UF n'ont, quant à elles, pas ou peu de zones hydrophobes, tous les triplets seraient accessibles aussi bien à TMP qu'à FFA.

On peut alors répartir les chromophores en deux catégories : les hydrophobes et les hydrophiles. Les fractions A, B et $R_{22,u}$ ne contiendraient que des hydrophobes et les UF phosphate que des hydrophiles. Toutes les autres fractions contiennent des deux. L'impact des sensibilisateurs hydrophobes reste toutefois limité : soit ils sont présents en faible quantité, soit leurs états excités sont efficacement désactivés.

IV.2.5. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices

La dernière étape de cette étude sur les fractions a été de déterminer dans quelle mesure les propriétés de fluorescence et de photosensibilisation pouvaient se corréler. Il apparaît en effet clairement que les fractions de haut poids moléculaires A et B et le rétentat ne sont que faiblement émissifs et ne photosensibilisent que très peu la photooxygénation de FFA ou la photooxydation de TMP. Par opposition, les fractions C+D et les UF urée ou phosphate présentent des émissions au-delà de 500 nm et photoinduisent mieux que l'acide humique entier la phototransformation des deux sondes moléculaires. Nous avons porté k^*_{FFA} et k^*_{TMP} en fonction de I_F^*, en choisissant l'émission à 550 nm (cf. Figure IV.14).

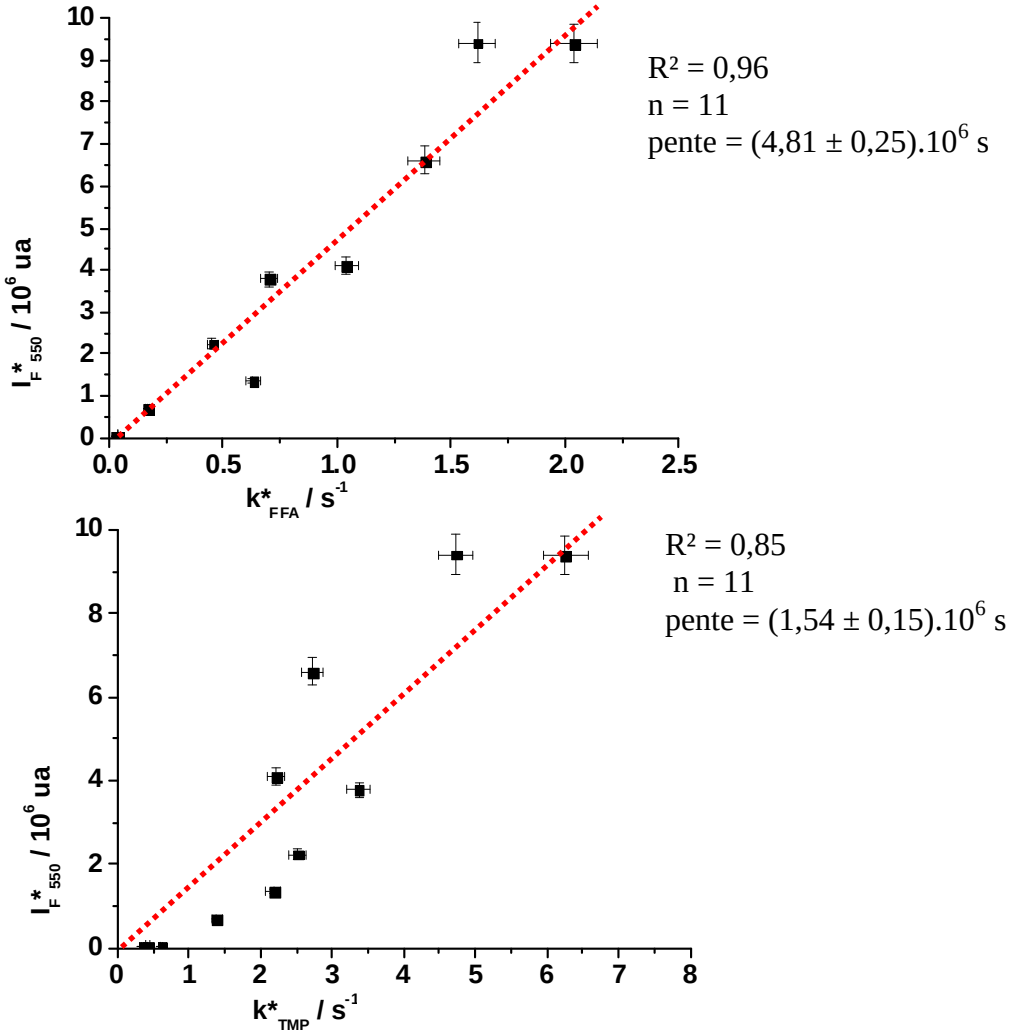


Figure IV. 14 : Tracé de l'intensité de fluorescence d'émission à 550 nm normalisée à 1,00 mol de C_{org} .L^{-1} pour une excitation à 300 nm en fonction de (a) k^*_{FFA} et (b) k^*_{TMP}.

Comme on peut aussi le voir dans le Tableau IV.6, les meilleures corrélations sont obtenues avec FFA et pour une émission à 510 ou 550 nm.

Tableau IV. 6 : Valeurs des pentes et des coefficients de corrélation R^2 des droites I_F^* pour les trois longueurs d'onde d'émission 430 nm, 510 nm et 550 nm, pour une excitation de 300 nm en fonction des k*, n=11.

	FFA	TMP
$I_F^*{}_{430}$	$(3,28 \pm 0,30).10^6$ s, R^2=0,85	$(1,07 \pm 0,12).10^6$ s, R^2=0,83
$I_F^*{}_{510}$	$(5,54 \pm 0,38).10^6$ s, R^2=0,92	$(1,79 \pm 0,18).10^6$ s, R^2=0,85
$I_F^*{}_{550}$	$(4,81 \pm 0,25).10^6$ s, R^2=0,96	$(1,54 \pm 0,15).10^6$ s, R^2=0,85

Ces résultats incitent à conclure que les constituants émissifs à 510 et 550 nm produisent de l'oxygène singulet capable d'oxyder FFA. Ils sont donc situés dans la zone hydrophile et polaire.

En ce qui concerne TMP, la corrélation entre k^*_{TMP} et I_F^* est moins bonne, quelque soit la longueur d'onde d'émission choisie. Ceci peut s'expliquer par le fait que TMP est oxydé à la fois par les chromophores photoactifs hydrophiles et par les chromophores photoactifs hydrophobes et que seuls les chromophores hydrophiles sont fluorescents.

Une analyse fine du comportement des différentes fractions suggère que l'urée et le phosphate ont extrait des pools de molécules un peut différentes. Les fractions phosphate ne contiendraient que des chromophores actifs hydrophiles alors que les fractions urée contiendraient des deux. Curieusement, la fraction C+D ne semble pas contenir de chromophores actifs hydrophobes. Aurait-elle été « vidée » au cours du fractionnement SEC-PAGE ou de l'étape de purification qui a suivi ?

IV.3. Etude sur des extraits hydrosolubles des sols Chernozem Kursk et Elliott

IV.3.1. Détails de l'extraction

Les extraits hydrosolubles (WEOM) ont été extraits de deux sols : Chernozem et Elliott. Chacun des sols a été extrait avec de l'eau ultrapure en choisissant un ratio matière : extractant de 1 : 5. Les solutions ont été agitées pendant 30 minutes, à température ambiante, sous atmosphère de N_2. La séparation entre la suspension et le surnageant a été réalisée par centrifugation. Le surnageant a été filtré sur des filtres en polycarbonate de seuil de coupure 0.45 µm. Le filtrat a été ensuite lyophilisé et stocké dans des flacons ambrés.

IV.3.2. Analyses

Chacun des échantillons a été analysé par analyse élémentaire et par analyse TOC. Les résultats sont donnés Tableau IV. 7.

Tableau IV. 7 : Pourcentages de carbone (% C) dans les échantillons humiques de sol et pourcentages de carbone organique dissous (% DOC) en solution.

	Sol Chernozem		Sol Elliott	
	% C	% DOC	% C	% DOC
HA	56.3	51.8	51.7	-
FA	-	41.3	44.1	-
WEOM	20.9	12.0	31.6	27.0

D'après (Tan, 2003), les % C, communément trouvées dans les HA et FA de sols sont respectivement compris entre 50 et 55 % et entre 40 et 45 %. Les valeurs reportées sur le Tableau IV. 7 sont en accord avec celles données par l'IHSS. Il apparaît que les WEOM ont des valeurs beaucoup plus faibles en % C que les HA et FA. Ceci s'explique par le fait qu'ils n'ont pas subi de purification et contiennent donc une quantité importante de substances minérales venant des sols.

Dans la suite, les calculs de normalisation seront faits à partir des valeurs de % DOC si elles sont disponibles, ou à défaut à partir des valeurs de % C (données reportées en annexe 18 et 19.

IV.3.3. Propriétés spectrales

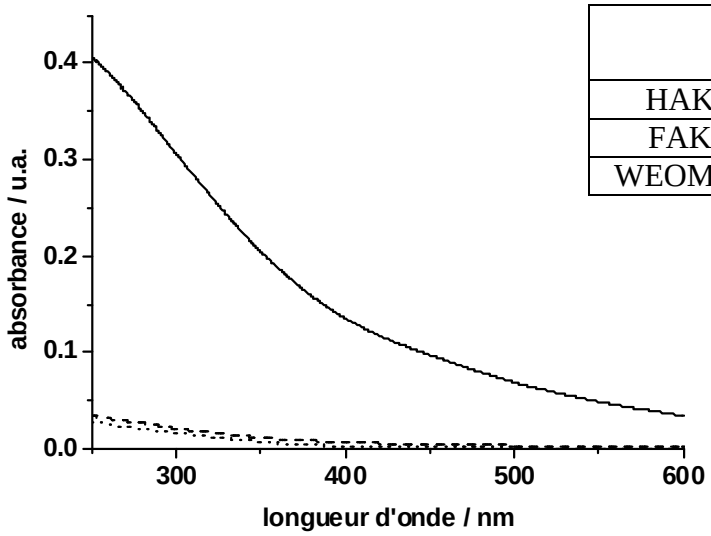
Spectres d'absorption moléculaire UV-visible

Les FAs et WEOMs ont été dissous à une concentration environ exactement à 100 $mg.L^{-1}$ dans un tampon phosphate à pH = 6.5. Les spectres UV-visible présentés par la suite seront présentés à 10 $mg.L^{-1}$ ou normalisés à 1 $mol.L^{-1}$ de carbone organique.

Comme le montre la Figure IV. 15, les deux HAs ont des spectres UV-visible extrêmement voisins avec des ε^*_{280} de l'ordre de 750 $(mol\ C_{org})^{-1}.L.cm^{-1}$. Le FA Chernozem est particulièrement peu coloré comparé au FA Elliott. Il n'y a pas d'explication à cela. Les valeurs de ε^*_{280} rencontrées dans la littérature, pour des HA de sols sont compris entre 600 et 800 $(mol\ C_{org})^{-1}.L.cm^{-1}$ (Cavani et al., 2009; Richard et al., 2007). Les deux WEOMs ont des spectres d'absorption assez ressemblants : ils sont moins absorbants que les HAs avec des ε^*_{280} de l'ordre de 120 $(mol\ C_{org})^{-1}.L.cm^{-1}$.

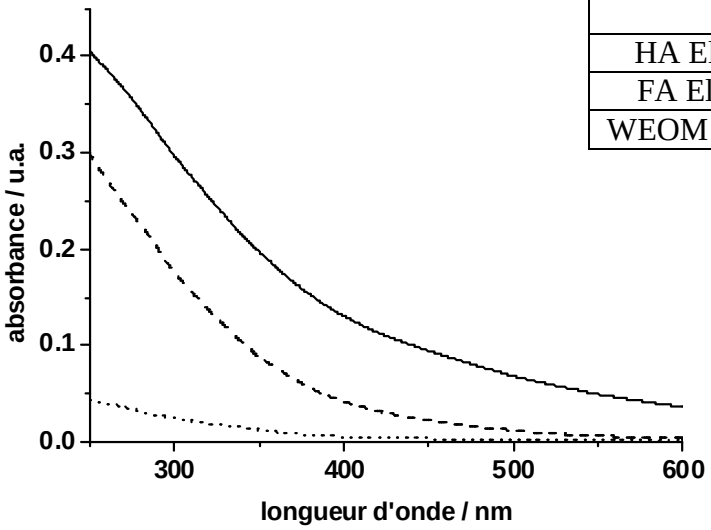
D'une façon générale, le rapport A_{254}/A_{365} augmente dans l'ordre HA < FA < WEOM. Cette évolution va dans le sens d'une augmentation de la pente avec la diminution de la masse moléculaire comme c'est généralement observé.

(a) Sol Chernozem



	A_{254}/A_{365}	ε^*_{280} $(mol\ C_{org})^{-1}.L.cm^{-1}$
HAK	2,22	746
FAK	3,34	77
WEOM K	5,35	116

b) Sol Elliott



	A_{254}/A_{365}	ε^*_{280} $(mol\ C_{org})^{-1}.L.cm^{-1}$
HA Ell	2,30	798
FA Ell	4,06	612
WEOM Ell	4,54	121

Figure IV. 15 : Spectres d'absorption UV-visible de HA (___), FA (- - -) et WEOM (. . .) à 10 $mg.L^{-1}$ provenant des sol Chernozem (a) et Elliott (b).

Spectres d'émission moléculaire

Les spectres d'émission moléculaire à 300 nm et les EEM normalisés à 1 $mol.L^{-1}$ de carbone organique dissous sont donnés respectivement Figure IV. 16 et la Figure IV. 17. Comme précédemment, les intensités ont été multipliées ou divisées par un certain facteur, noté dans le cadre de l'EEM, de façon à retrouver l'EEM mesuré expérimentalement.

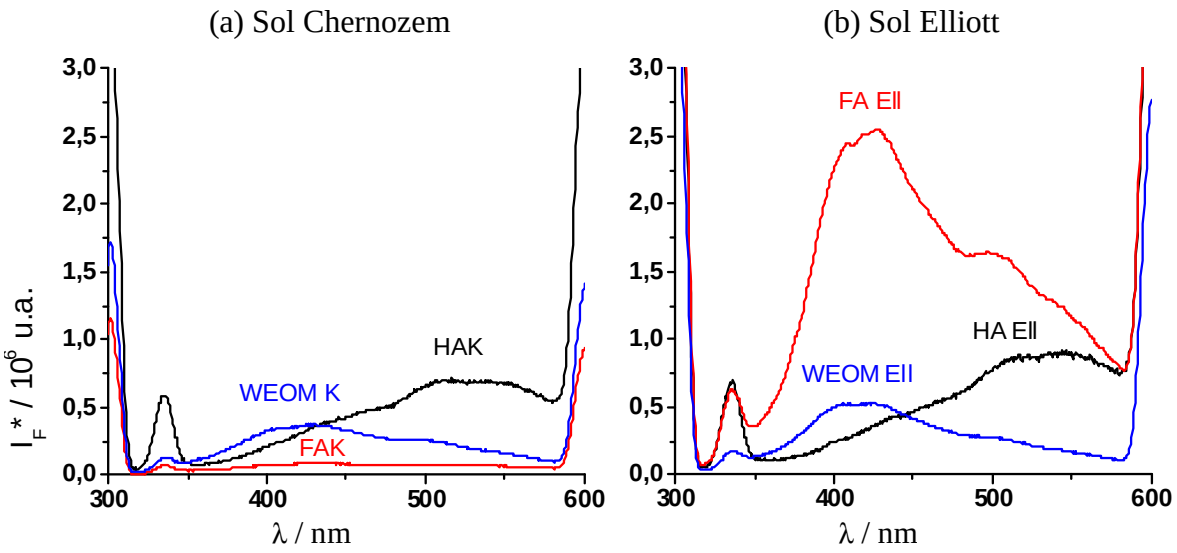


Figure IV. 16 : Spectres d'émission de HA, FA et WEOM des sols (a) Chernozem et (b) Elliott pour une longueur d'onde d'excitation à 300 nm. Normalisation à une teneur de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.

Les émissions de WEOM et de FA présentent de nombreuses similitudes :

- émissions larges entre 300 et 600 nm avec maximum vers 430 nm;
- couples $\lambda_{exc}/\lambda_{ém}$ voisins : 250/430 et 320/430 pour la série Chernozem et 250/430 300/430 pour la série Elliott ;
- mêmes épaulements vers 500 et 550 nm.

En revanche, on observe des différences en ce qui concerne les intensités d'émission. Pour la série Chernozem, WEOM est deux fois plus intense que FA à 430 nm et pour la série Elliott WEOM est six fois moins intense que FA.

Les EEMs de WEOM et de HA présentent des maxima différents, vers 430 nm pour WEOM et 550 nm pour HA, mais les épaulements observés à 430 nm pour HA et 510 et 550 nm pour WEOM indiquent que les mêmes fluorophores sont présents dans les échantillons, seules leurs quantités varient.

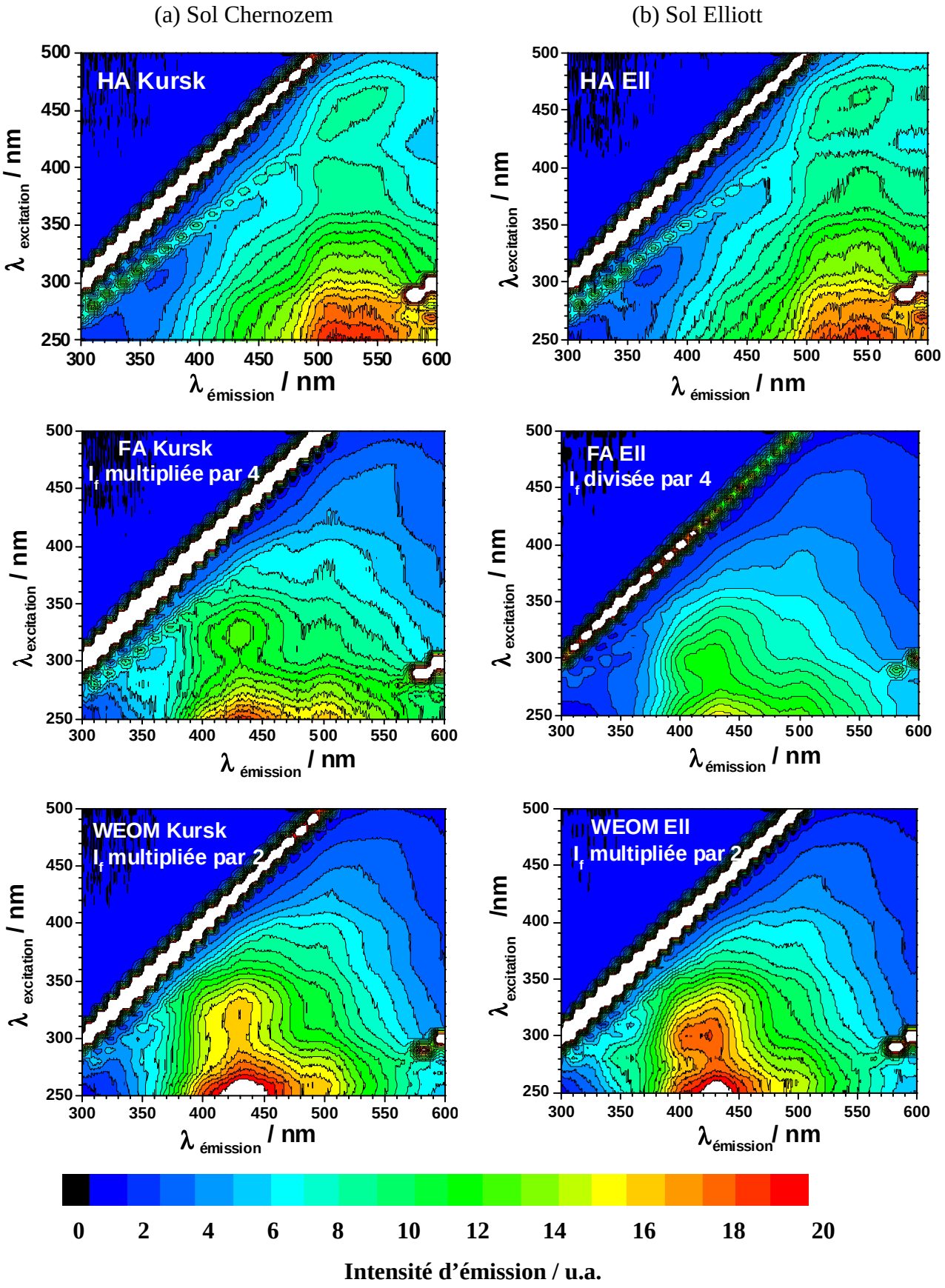


Figure IV. 17 : EEM des échantillons humiques de sol Chernozem (a) et Elliott (b). Normalisation à 1 mol.L¯1 de carbone organique dissous.

IV.3.4. Propriétés photosensibilisatrices

Les propriétés photosensibilisatrices des WEOMs ont été comparées à celles des HAs et FA, en utilisant l'alcool furfurylique (10^{-4} M) comme sonde. Comme précédemment, les solutions ont été irradiées en enceinte polychromatique (300 - 450 nm) à une absorbance constante de 0,100 ± 0,005 à 300 nm.

Les résultats de la Figure IV. 18 sont donnés pour ces conditions. FFA disparaît plus vite en présence de WEOM que de FA et HA. Dans le cas du sol chernozem, HA et FA ont un comportement identique, alors qu'avec le sol Elliott, FA est plus efficace que HA.

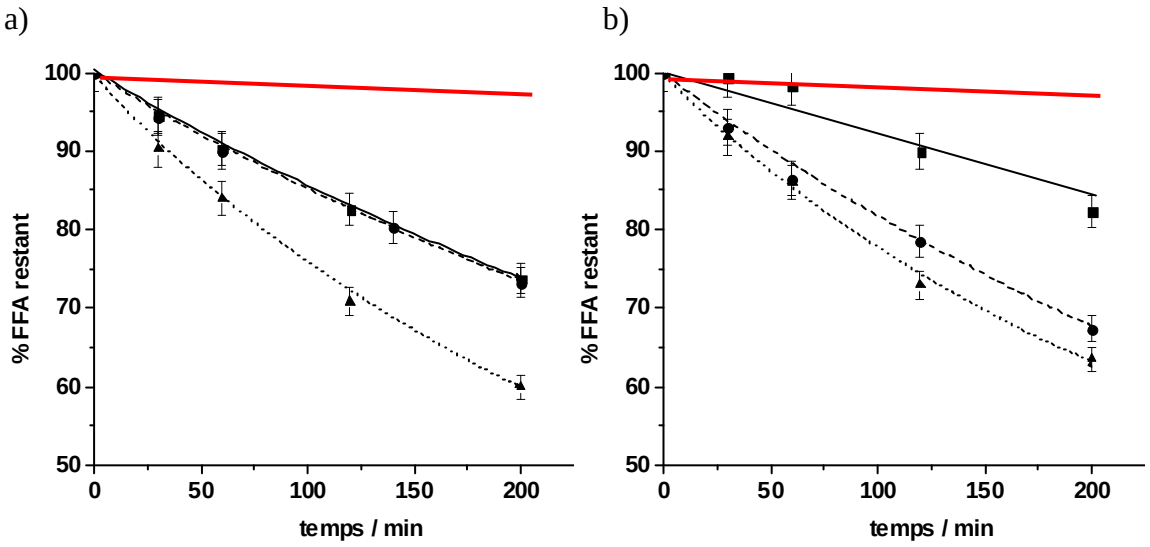


Figure IV. 18 : Cinétiques de phototransformation de FFA (10^{-4} M) en présence de HA (—■—), FA (- -●- -) et WEOM (. .▲. .) à A_{300} = 0,100, (a) sol Chernozem et (b) sol Elliott.

Les cinétiques sont du pseudo premier ordre. Les constantes de pseudo-premier ordre ont été calculées puis normalisées pour une concentration de 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique dissous.

Lorsque les substances humiques sont comparées à même absorbance à 300 nm, WEOM produit plus d'oxygène singulet que HA. En revanche, lorsque la comparaison est établie sur une même concentration de carbone organique, HA produit plus d'oxygène singulet que WEOM (voir Tableau IV.8).

Cela signifie que WEOM contient une proportion plus petite que HA de composés organiques participant à la photosensibilisation. En revanche, sur l'ensemble des composés

absorbants, une plus grande proportion que dans HA participe à la photosensibilisation. Dans les deux cas, on cible des aspects totalement différents mais qui peuvent avoir chacun leur intérêt.

IV.3.5. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices

Comme dans le § précédent, nous avons cherché à établir s'il existait une corrélation entre les intensités de fluorescence et k^*_{FFA}. Le Tableau IV.8 résume certaines des données.

Tableau IV. 8 : Valeurs des intensités de fluorescence à 430 nm, 510 nm et 550 nm normalisées et k^*_{FFA}.

	HA K	**FA K**	**WEOM K**	**HA Ell**	**FA Ell**	**WEOM Ell**
$I_F^*{}_{430}$ / 10^6 u.a.	0,36	0,16	0,37	0,38	2,53	0,53
$I_F^*{}_{510}$ / 10^6 u.a.	0,69	0,14	0,24	0,85	1,59	0,26
$I_F^*{}_{550}$ / 10^6 u.a.	0,68	0,12	0,16	0,88	1,16	0,17
k^*_{FFA} / s^{-1}	0,168 ± 9 %	0,023 ± 11 %	0,041 ± 14 %	0,103 ± 15 %	0,161 ± 13 %	0,037 ± 9 %

Il n'existe apparemment pas de lien entre l'émission à 430 nm et k^*_{FFA} : ces deux paramètres évoluent différemment d'une substance humique à l'autre. En revanche, $I_F^*{}_{550}$et k^*_{FFA} semblent connectés. La Figure IV. 19 confirme que k^*_{FFA} augmente avec $I_F^*{}_{550}$. Le coefficient R^2 n'est cependant que 0,77 lorsque l'on regroupe les données des deux sols. Si l'on considère les deux séries séparément, les résultats sont bien meilleurs. La pente de la droite $I_F^*{}_{550}$ en fonction de k_{FFA}^* est de $7{,}51.10^6$ s pour le sol Elliott contre $4{,}10.10^6$ s pour le sol chernozem. Cela signifie que les chromophores photoinducteurs hydrophiles sont présents en plus grande quantité dans les extraits humiques du sol Elliot que dans les extraits du sol Chernozem.

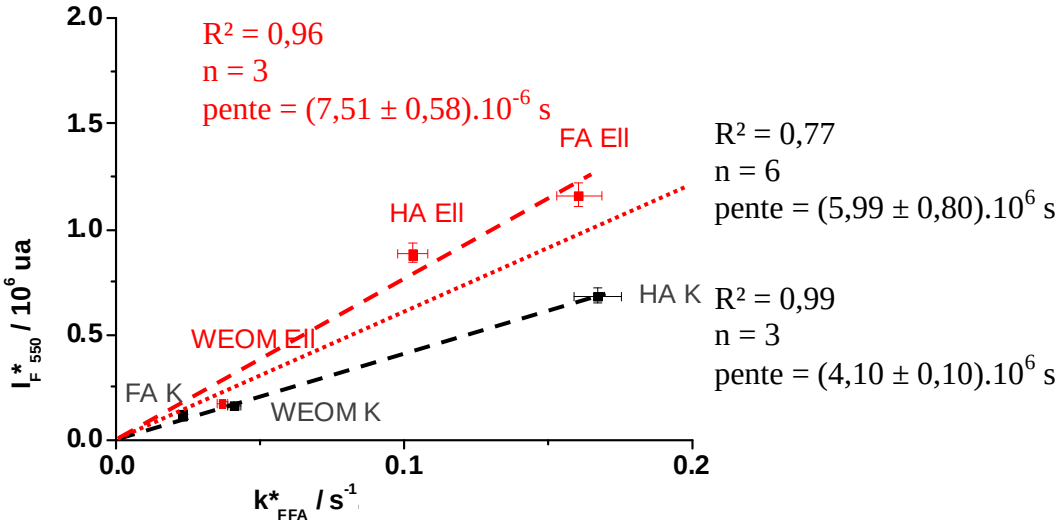


Figure IV. 19 : Corrélation entre l'intensité d'émission à 550 nm pour une excitation à 300 nm et k^*_{FFA}. Données normalisées à 1,00 mol de $C_{org}.L^{-1}$.

Il est intéressant de remarquer que le FAK, qui se démarquait par son absorbance très faible, est bien en ligne avec les autres échantillons.

IV.4. Discussion générale

En résumé, nous avons comparé les propriétés spectrales et les propriétés photosensibilisatrices d'échantillons humiques obtenus de différentes façons:

- par chromatographie d'exclusion stérique en présence d'urée d'un HA
- par ultrafiltration en présence d'urée ou de phosphate du même HA
- par extraction à l'eau de deux sols.

L'objectif était de localiser au sein des différents groupes de macromolécules les chromophores responsables de l'absorption, de la fluorescence et des propriétés photosensibilisatrices, et de déterminer comment il était possible de les extraire.

Absorption

Toutes les fractions sont absorbantes et plus ou moins diffusantes. La part relative de l'absorption et de la diffusion de la lumière est une des inconnues.
Les centres absorbants sont portés par toutes les molécules quelque soit leur taille et leur solubilité dans l'eau. L'analyse des spectres permet de voir deux contributions :

- une contribution de type exponentielle, sans maximum localisé. Celle-ci peut être due à une somme de systèmes d'électrons délocalisés (systèmes de conjugaison différente en mélange à différents pourcentages), à un système d'électron délocalisé (comme dans la mélanine) ou à une somme de complexes par transfert de charge (Del Vecchio et Blough, 2004).
- une contribution avec maxima localisés correspondant à des composés organiques simples.

Fluorescence

Les résultats sont très contrastés. Plusieurs types de fluorophores sont observés dans HA; ils se répartissent très différemment dans les différentes fractions.

- Les fluorophores 350 nm de type tryptophane sont essentiellement dans les fractions A, B et le rétentat. Ils sont portés par les macromolécules de haut poids moléculaire.
- Les fluorophores 430 nm sont essentiellement présents dans les FA et les WEOM. Ils sont donc portés par des macromolécules très solubles dans l'eau peu présentes dans HA.
- Les fluorophores 510 nm sont essentiellement présents dans les UF urée ou phosphate. Ils proviennent de petites molécules solubles dans l'eau mais insérées dans HA.
- Les fluorophores 550 nm sont essentiellement présents dans la fraction C+D. Ces fluorophores seraient portés par les macromolécules de taille moyenne à petite.

Propriétés photosensibilisatrices

Les capacités à générer de l'oxygène singulet sous irradiation sont elles aussi très contrastées. Les UF extraits au phosphate sont les meilleurs photosensibilisateurs. A même carbone organique, ils produisent 10 fois plus d'oxygène singulet que HA. A contrario, les

fractions A et B et le rétentat sont 4 fois moins efficaces que HA. Il y a donc un facteur 40 entre UF phosphate et les fractions A, B et le rétentat. Il est la preuve qu'une grande partie des centres photosensibilisateurs sont extractibles des macromolécules et portés par les petites molécules. Les résultats obtenus avec TMP sont eux aussi très informatifs. TMP est directement oxydé par les états excités triplets et cette réaction est compétitive avec la production de l'oxygène singulet. Compte tenu de ceci, on pourrait s'attendre à ce que les fractions photosensibilisant la photooxygénation de FFA, photosensibilisent la phototransformation de TMP (voir schéma p. 62). Ceci est généralement observé, mais il y a une certaine déviation dans les résultats cinétiques suggérant que certains états excités oxydent TMP sans photosensibiliser la photooxygénation de FFA. Soit ces triplets ne produisent pas d'oxygène singulet, ce qui serait surprenant, soit l'oxygène singulet produit n'est pas accessible à FFA. Dans la mesure où FFA est très hydrophile, on privilégie cette deuxième hypothèse avec une production partielle d'oxygène singulet dans les zones hydrophobes. Dès lors, on a vraisemblablement affaire à deux types d'états excités triplets oxydants : certains sont hydrophiles et portés par les petites molécules et d'autres sont hydrophobes portés par les macromolécules de grande taille.

Les WEOM sont peu photosensibilisateurs comparés aux fractions UF.

Corrélations

Compte tenu des similitudes obtenues entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices, nous avons recherché à établir une corrélation sur l'ensemble des échantillons. Le résultat est extrêmement satisfaisant lorsque l'on porte l'intensité d'émission à 510 ou 550 nm en fonction de k^*_{FFA}, avec un R^2=0,96 (cf. Figure IV. 20).

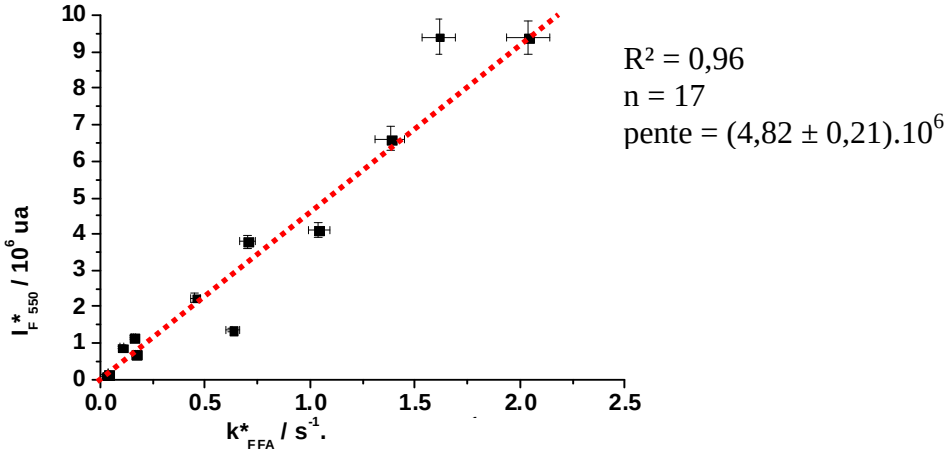


Figure IV. 20 : Corrélation entre $I_F{}^*_{550}$ pour une excitation à 300 nm et k^*_{FFA}. Données normalisées à 1,00 mol de C_{org} . L^{-1}.

IV.5. Conclusions

Cette étude couplant fractionnement des substances humiques et mesure de leurs propriétés spectrales et photosensibilisatrices permet de proposer le schéma bilan de la Figure IV. 21 et de tirer les conclusions suivantes :

● L'émission de fluorescence dans HAK est due à l'émission de différents types de fluorophores que nous avons réussi à séparer ;

● les différents types de fluorophores sont localisés sur des molécules de tailles différentes, intimement imbriquées les unes dans les autres ;

● les fluorophores 510 nm et 550 nm sont également des constituants photosensibilisateurs (états excités triplets oxydants et producteurs d'oxygène singulet) ;

● les fluorophores 510 nm et 550 nm sont portés par des petites molécules ;

● on les retrouve dans HA, FA et WEOM, à des abondances relatives différentes.

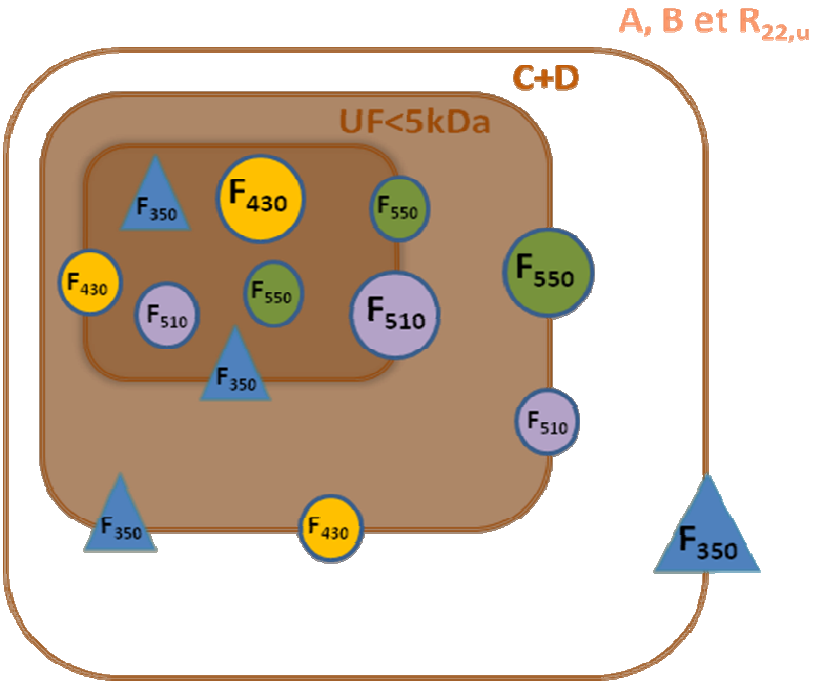


Figure IV. 21 : Schéma bilan présentant la localisation des différents fluorophores de HAK.

Chapitre V

Etude des propriétés spectroscopiques et photochimiques de matières organiques extraites de composts

V.1. Introduction

Le compostage est une technique relativement moderne qui est apparue dans les années 1990 dans le but de recycler les déchets organiques fermentescibles. Selon un rapport de l'ADEME (2006) « Gestion des déchets organiques en France – Le point sur les filières de gestion biologique avec retour au sol », la production française de compost atteignait 4 millions de tonnes en 2003. L'origine des composts est bien évidemment variée. La moitié de la production est constituée de composts issus de déchets urbains (déchets verts + boues d'épuration ou déchets verts + biodéchets ménagers). Les composts agricoles sont produits à hauteur de 700 milliers de tonnes. 600 milliers de tonnes sont des composts de fumiers. Entre 200 et 400 milliers de tonnes de composts proviennent des déchets des industries agroalimentaires (distilleries, brasseries). Il faut savoir qu'en 2006, l'écoulement dans le marché des composts dépassait les 4 millions de tonnes. Les plus gros consommateurs de compost sont les secteurs des grandes cultures, suivis par la viticulture, la revégétalisation de sites et enfin l'agriculture biologique.

Le procédé de compostage se fait en deux grandes étapes :

- une biodégradation en aérobie des déchets fermentescibles les plus dégradables (comme l'amidon et les sucres) par des bactéries mésophiles, puis par des bactéries thermophiles. Ces bactéries sont naturellement présentes dans les déchets et se multiplient, sous certaines conditions lors du processus de compostage. Pendant cette première phase qui peut durer jusqu'à un mois, la température s'élève de 40 à 70 °C. La respiration de ces bactéries provoque une libération de dioxyde de carbone CO_2 et de composés volatils comme le méthane CH_4 ou l'ammoniaque NH_3. Le milieu est ainsi appauvri en dioxygène O_2 et nécessite une aération fréquente pour que l'activité bactérienne soit maintenue.

- une humification de la matière organique jusqu'à obtention d'un compost mature, qui peut durer de 2 à 6 mois. Pendant cette deuxième phase, les micro-organismes n'ont quasiment plus de matériaux à biodégrader et synthétiseraient des substances de type humiques HLS pour se nourrir (Grigatti et al., 2004). Dans un sol, lors de l'humification qui dure des milliers d'années, ces bactéries produisent également des substances humiques (HS) (Stevenson, 1994).

En général, les études portent sur les matières organiques extraites en milieu basique, les acides humiques like (HLA) (Quagliotto et al., 2006; Senesi et al., 2007) et sur les différentes caractérisations physico-chimiques pouvant indiquer la maturité d'un compost. On parle d'acides humiques like car le protocole d'extraction est le même que celui utilisé pour les acides humiques de sol. Mais, contrairement aux HA qui ont été produits sur des temps très longs, les HLA sont eux formés sur des temps très courts (Senesi et al., 2007).

Une technique empirique et originale pour évaluer la maturité d'un compost a été proposée par Pfeiffer et al. (Pfeiffer, 1984). Il s'agit d'un test simple basé sur la chromatographie circulaire sur papier. Au centre d'une feuille de papier filtre imbibée de nitrate d'argent, on dépose un extrait basique de compost qui va migrer naturellement. Un compost peu mature sera caractérisé par une tache centrale claire et des bords de cercles sombres, alors qu'un compost mature aura une tache centrale sombre et des traînées claires vers la périphérie (voir Figure V. 1). Cette technique est basée sur la différence d'affinité des molécules de types humiques avec le support. Elle a largement inspiré, depuis les années 2000, les techniques basées sur les différences de mobilités des composés humiques sous l'effet d'un champ électrique, comme l'électrophorèse (Cavani et al., 2003 et 2008).

Figure V. 1 : Chromatogramme d'un compost mature par la méthode de Pfeiffer.

Une autre technique, à la fois très simple et très fiable, pour voir si un compost est mature est de faire des semis de graines de laitues dans des bocaux contenant du compost, hermétiquement fermés, et d'évaluer le taux de germination des graines (Zucconi, 1981).

L'analyse chimique permet bien évidemment aussi d'apporter des réponses. Au cours du compostage, on observe généralement un enrichissement de la matière organique en HLA, en fraction hydrophobe mais une diminution du carbone organique extractible à l'eau. Ainsi, suivre la proportion humique-fulvique, fractions hydrophobes-fractions hydrophiles et mesurer le carbone organique extractible donne l'état d'avancement de l'humification

(Ciavatta et al., 1990; Ciavatta et al., 1993; Gigliotti et al., 2002; Iglesias Jimenez et Perez Garcia, 1992; Said-Pullicino et al., 2007a; Said-Pullicino et al., 2007b).

● Dès que le ratio HLA sur FLA (acide fulvique like) dépasse 1,6 le compost a atteint un stade suffisant pour être considéré comme mature.

● L'indice d'humification (HI) défini par : $HI = \frac{TEC - C_{HLA+FLA}}{C_{HLA+FLA}}$

où TEC est la concentration totale de carbone (humifié ou non) extractible par une extraction à la soude du compost et $C_{HLA+FLA}$ est la concentration totale de carbone humifié contenue dans la fraction humique et fulvique. Un compost a une composition stable si HI est inférieur à 0,5 (voir Figure V. 2). Ce seuil de 0,5 pour l'indice d'humification signifie qu'au moins 70 % du carbone organique total extractible et humifié. Pour comparaison les valeurs de HI d'un HA de sol sont comprises entre 0 pour une léonardite (où le carbone extractible est totalement humifié) et 0,47 pour un sol en passant par des valeurs de 0,3 pour des tourbes.

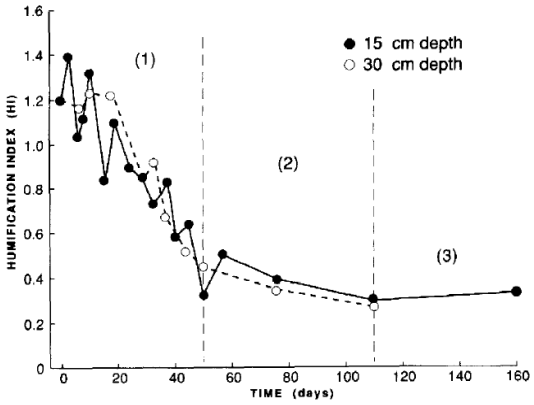


Figure V. 2 : Evolution de l'indice d'humification au cours des différentes étapes de stabilisation de la matière d'un compost issu de déchets urbains,(Ciavatta et al., 1990).

D'autres études scientifiques ont été consacrées à la caractérisation d'un compost mature par les techniques de spectroscopie infrarouge (Provenzano et al., 2001; Senesi et al., 2007; Spaccini et Piccolo, 2007), spectroscopie d'absorption UV-visible et de spectroscopie d'émission moléculaire (Marhuenda-Egea et al., 2007; Morán Vieyra et al., ; Senesi et al., 2007). Parmi ces différentes techniques, les spectroscopies UV-visible et de fluorescence présentent de vraies potentialités (Senesi et al. 1991).

● En spectroscopie UV-visible, certains indices ont été introduits par Chin (1994) et Peuravuori et Pihlaja (1997) dont le rapport A_{254}/A_{365} défini comme le quotient entre

l'absorbance à 254 nm et 365 nm et le coefficient d'absorption molaire à 280 nm, normalisé pour une concentration de carbone organique de 1 mol.L^{-1}.

● En spectroscopie de fluorescence, selon la nature de l'analyse (émission, excitation ou synchrone) plusieurs indexes ont été introduits (Zsolnay et al., 1999, Milori et al., 2002, Kalbitz et al., 1999). Nous retiendrons pour la suite l'indice de Zsolnay, que l'on note HIX. Il est défini sur un spectre d'émission pour une excitation à 250 nm. Il est égal au rapport de l'aire sous la courbe comprise entre 435-480 nm sur l'aire sous la courbe comprise entre 300-345 nm.

Tous ces indices numériques se sont révélés utiles pour évaluer le degré d'humification des substances humiques extraites de compost. Ils augmentent avec le temps de compostage (Fuentes et al., 2006)

Les premières études photochimiques sur des composts en ont découlées. Une première étude concernant les propriétés spectroscopiques et photoinductrices de matière organique extraite de compost a été menée au laboratoire sur un compost composé à 70 % de boues de stations d'épuration et de 30 % de déchets verts (Amine-Khodja et al., 2006). Il a été montré pour la première fois (i) que les HLA et FLA extraites à différents temps de compostage pouvaient photodégrader la disparition de l'Irgarol 1051 sous irradiation solaire et (ii) que cette capacité photodégradante augmentait avec le temps de compostage tout comme l'absorbance et l'émission de fluorescence vers 450 nm. Ces comparaisons spectroscopiques ont été faites à même concentration massique. De plus, le cas des WEOM a également été examiné (Amine Amine-Khodja et al., 2006). Des tests de photoinduction ont été menés sur l'Irgarol 1051, le fénuron et le 2,4,6-triméthylphénol, dans les mêmes conditions opératoires que précédemment. Il a été montré que les fractions solubles photoinduisaient également la photodégradation de ces composés organiques.

Le but de ce chapitre est de compléter ces premières études photochimiques réalisées sur différentes matières organiques extraites de compost. J'ai en particulier cherché à caractériser les chromophores actifs photochimiquement par la comparaison de différents échantillons de compost. Nous avons utilisé le même protocole de mesure que celui décrit au chapitre IV, à savoir mesure des différentes propriétés sur de solutions de HLS d'absorbance faible et constante puis normalisation à même carbone organique.

V.2. Etude comparative de matières organiques extraites de compost

V.2.1. Origine des composts

Les échantillons de composts ont été obtenus à partir de deux sources décrites Tableau V. 1.

Tableau V. 1 : Caractéristiques des composts étudiés.

	Green Manure (GM)			**Urban Biowaste (UB)**		
Sources	Déchets verts			Déchets verts (55%), déchets urbains (40%), boues de station d'épuration (5%)		
Temps de compostage (jours)	60	120	180	30	75	120
Procédé de compostage	Aérobique en andains			Aérobique en bioréacteurs		
Période de collecte	Printemps 2007			Printemps, Eté 2007		
Nom de l'échantillon	GM060	GM120	GM180	UB030	UB075	UB120

● La série GM (produite à Ozzano Emilia, Italie) provenait de déchets verts. Ceux-ci ont été mis à composter en andains aérés, en extérieur. Les piles de composts étaient retournées une fois par mois. Les prélèvements ont été effectués au bout de 60, 120 et 180 jours de compostage. Les trois échantillons ont été nommés GM060, GM120 et GM180.

● La série UB (produite à Sant'Agata Bolognese, Italie) contenait un mélange de 55 % de déchets verts, 40 % de déchets urbains et 5 % de boues de station d'épuration. Le compostage a été fait en deux temps : d'abord une biooxydation dans un réacteur pendant 30 jours, puis, un compostage similaire à celui de la série GM. Trois prélèvements ont été réalisés au bout de 30, 75 et 120 jours. Les trois échantillons ont été nommés UB030, UB075 et UB120.

Après collecte, les composts ont été séchés, réduits en poudre puis tamisés sur 0,5 mm. Leurs analyses élémentaires sont archivées dans le Tableau V. 2.

Tableau V. 2 : Analyses élémentaires menées sur les composts bruts à différents temps de compostage.

		GREEN MANURE (GM)			URBAN BIOWASTE (UB)		
	Sample code	**GM060**	**GM120**	**GM180**	**UB030**	**UB075**	**UB120**
(1)	pH (eau)	7.35	7.78	7.89	8.05	7.95	8.1
(2)	Conductivité électrique (mS cm^{-1})	1.2	1.4	2.0	4.5	3.1	4.3
(3)	Humidité (%)	6.4	6.2	6.4	7.32	15.0	8.83
(4)	Cendres (%)	42.0	49.4	49.5	42.2	41.4	46.9
(5)	Matière organique (%)	51.6	44.4	44.1	50.5	43.6	44.3
(6)	Carbone Organique Total, TOC (%)	29.1	24.9	24.9	27.5	24.1	24.7
(7)	Carbone organique dissous, DOC (g C kg^{-1})	9.9	7.9	8.2	29.3	30.6	20.4
(8)	Azote total, TN (%)	1.23	1.21	1.62	1.89	2.03	2.50
	Azote total Kjeldahl, TKN (%)	1.23	1.21	1.62	1.89	2.03	2.33
	Ammonium, NH3-N (%)	0.02	0.02	0.03	0.36	0.57	0.03
(9)	Azote organique (N, %)	1.21	1.19	1.59	1.53	1.46	2.30
	Nitrate, NO3-N (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17
(10)	ratio C/N	23.7	20.6	15.4	14.6	11.9	9.9
(11)	Phosphore total (P, %)	0.188	0.204	0.310	0.393	0.434	0.408
(11)	Soufre total (S, %)	0.181	0.205	0.261	0.313	0.306	0.269
(11)	Sodium total (mg Na kg^{-1})	405	426	741	2670	2110	2960
(11)	Potassium total (mg K kg^{-1})	7270	8050	12800	10300	10100	14600
(11)	Magnesium total (mg Mg kg^{-1})	5140	7000	6670	7060	6350	6300
(11)	Calcium total (mg Ca kg^{-1})	52100	66800	57700	55800	51000	50900
(11)	Fer total (mg Fe kg^{-1})	8950	10000	11300	12800	13600	13100
(11)	Cuivre total (mg Cu kg^{-1})	45.6	69.7	67	88.7	131	140
(11)	Manganèse total (mg Mn kg^{-1})	391	424	454	536	399	398
(11)	Nickel total (mg Ni kg^{-1})	15.9	19.7	20.6	17.1	18.2	27.6
(11)	Zinc total (mg Zn kg^{-1})	117	150	165	265	336	148
(11)	Chrome total (mg Cr kg^{-1})	26.8	30.7	32.7	29.9	35.9	43.1
(11)	Plomb total (mg Pb kg^{-1})	94.7	66.9	52.7	64.8	103	95.4
(11)	Cadmium total (mg Cd kg^{-1})	1.67	1.11	1.24	1	1.24	1.24

(1) eau 1:10 (w/w) 2 h à Température ambiante

(2) eau 1:10 (w/w) 2 h à Température ambiante

(3) perte de masse à 105°C

(4) masse constante à 550 °C

(5) Matière organique = 100 - humidité – cendres

(6) oxydation par le dichromate

(7) eau 1:10 (w/w) 2 h à Température ambiante

(8) TN = (TKN) + (NO3-N)

(9) Azote organique = (TKN) - (NH4-N)

(10) C/N ratio = TOC/TN

(11) soluble dans l'acide

V.2.2. Extraction des HLAs et des fractions aqueuses de compost

Nous avons extrait quatre extraits aqueux :

- $WEOM_{1:200}$, avec de l'eau ultrapure (UP) et un ratio d'extraction matière:extractant de 1:200,
- $WEOM_{Volvic,1:200}$, avec de l'eau minérale Volvic (MW) et un ratio d'extraction matière:extractant de 1:200,
- $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ avec une solution de $CaCl_2$ 10^{-2} M (CC) et un ratio d'extraction matière:extractant de 1:200,
- WEOM avec de l'eau ultrapure (UP) et un ratio d'extraction matière:extractant de 1:5.

Ces quatre extraits aqueux ont été lyophilisés et n'ont pas subi de purification.

Nous avons extrait des HLAs avec une solution de soude 0,1 M avec du pyrophosphate $Na_4P_2O_7$ 0,1 M. Ces extraits humiques ont été purifiés par dialyse sur membrane de seuil de coupure de 6-8 kDa. Pour plus de détails, nous pourrons nous rapporter au chapitre III. Cette extraction a conduit à la récupération de six acides de type humiques (HLA).

L'ensemble des données quantitatives est consigné Tableau V. 3.

Tableau V. 3 : Récupération de matière totale (organique + minérale) en mg pour 1 g de compost brut.

échantillon	% C_{org}	**$WEOM_{1:200}$**	**$WEOM_{Volvic,\ 1:200}$**	**$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$**	**WEOM**	**HLA**
extractant		Eau ultrapure (UP)	Eau de Volvic (MW)	Eau+$CaCl_2$ 10^{-2} M (CC)	Eau ultrapure (UP)	Soude 0,1 M
Ratio d'extraction		1:200			1:5	1:10
compost		mg / 1 g				
GM060	29,1	34	65	201	8	38
GM120	24,9	34	60	201	9	65
GM180	24,9	47	64	197	10	95
UB030	27,5	106	123	281	27	61
UB075	24,1	54	72	211	12	95
UB120	24,7	46	80	230	14	165

Il apparaît que la récupération de matière est la plus grande lorsque le volume d'extractant est le plus grand. De plus, CC conduit à l'extraction la plus importante de matière, mais cet échantillon n'ayant pas été purifié, il contient vraisemblablement beaucoup d'ions. En effet, un rapide calcul indique que les 200 ml d'extractant contiennent 220 mg de $CaCl_2$. Ceci correspond presque à la quantité récupérée et suggère une faible récupération de matière organique. D'une manière générale, la récupération en matière diminue au cours du compostage pour les extraits aqueux alors qu'elle augmente pour les extraits humiques. Ceci est conforme aux résultats de la littérature (Iglesias Jimenez et Perez Garcia, 1992; Said-Pullicino et al., 2007a; Said-Pullicino et al., 2007b) où le pourcentage de composés organiques extractibles à l'eau diminue de 18,9 % à 5,6 % alors que les composés de type humiques extractible augmente de 5,1 à 7,4 % avec le temps de compostage pour un compost provenant de déchets municipaux.

V.2.3. Analyses des extraits de composts

Nous avons mesuré le carbone organique sur les échantillons dissous dans un tampon phosphate (10^{-3} M, pH=6,5). Les résultats sont donnés sur la Figure V. 3. Parallèlement, les analyses élémentaires en carbone et en azote ont été menées sur WEOM et HLA (cf. Annexes 19 et Tableau V. 4). Les pourcentages de carbone % C et % N sont donnés sans correction d'eau et de cendres. Les valeurs de % DOC et % C sont très voisines (cf. Annexes 19).

Pour un même échantillon, le pourcentage de carbone organique varie grandement selon l'extractant. Les valeurs les plus importantes sont obtenues pour les HLA (entre 45 et 50 %) et les plus faibles pour CC (entre 3 et 10 %), confirmant la forte présence de $CaCl_2$ dans l'échantillon. UP, quelque soit le ratio d'extraction, donne une valeur intermédiaire, de même que l'eau de Volvic. On peut relier ces variations du % DOC avec l'ajout ou non d'une étape de purification. En effet, sans purification, les échantillons contiennent des substances minérales qui réduisent d'autant la concentration de carbone organique. Ce phénomène est le plus marqué avec CC, extractant riche en ions Ca^{2+} et Cl^-.

Le pourcentage de carbone organique est stable autour de 50 % dans le cas des HLA, alors qu'il diminue lorsque le temps de compostage augmente dans le cas des extractants aqueux. La baisse à fort temps de compostage est plus importante avec UB qu'avec GM.

Plusieurs études (Gabriele, 2000; T. Reemtsma, 1999; Thilo Rennert, 2007) menées sur différents sols avec différents extractants montrent que $CaCl_2$ est l'extractant qui est le moins capable d'extraire le carbone organique.

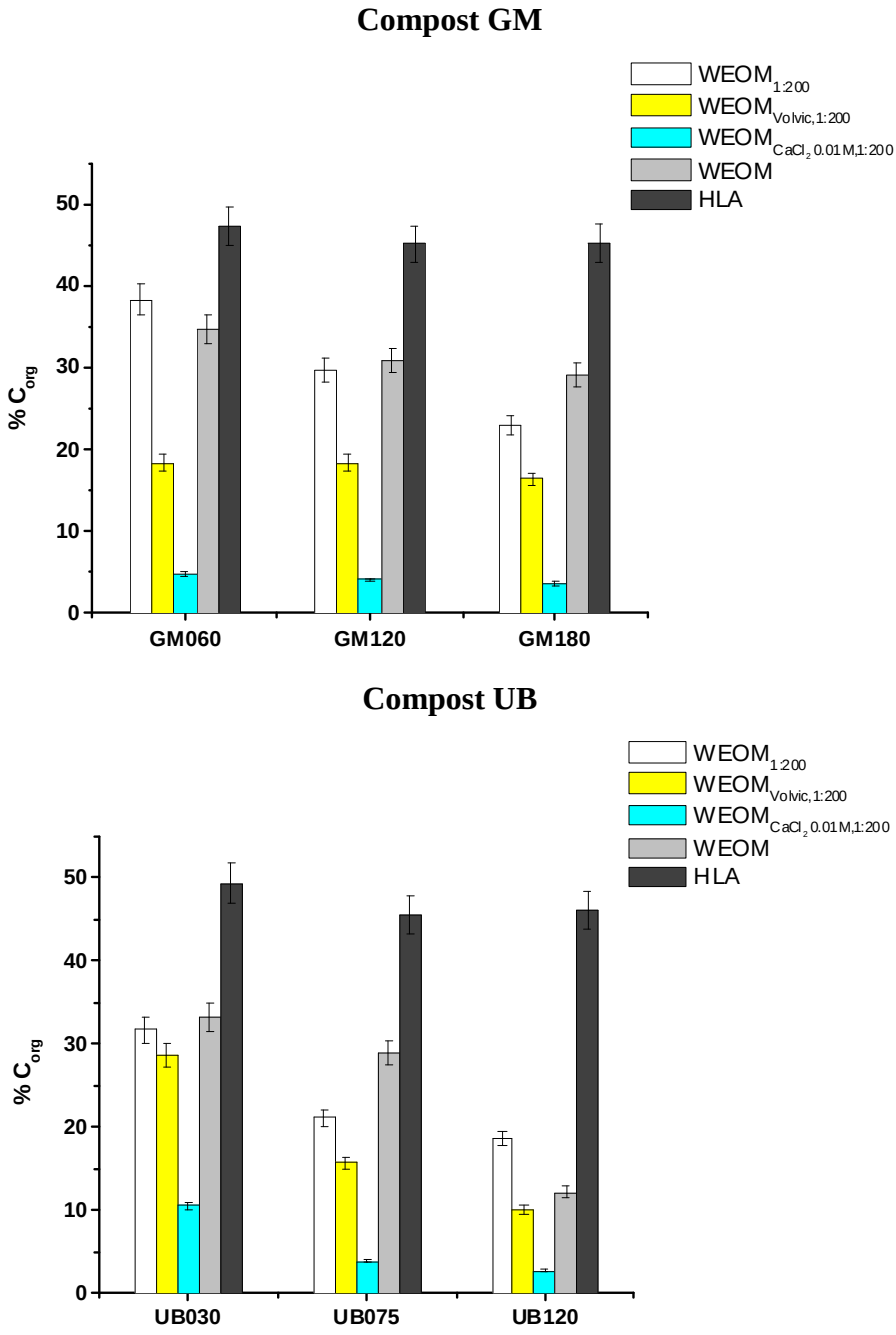


Figure V. 3 : Pourcentage du carbone organique présent dans les extraits aqueux et humiques des composts GM et UB.

L'analyse du bilan de matière sur le carbone organique fait apparaître que le pourcentage de carbone potentiellement extractible par la soude augmente nettement avec le temps de compostage. Ceci s'explique par l'humification de la matière organique de compost. En début de compostage le pourcentage de carbone extractible est proche de celui que l'on peut obtenir avec une extraction aqueuse, ce qui signifie que les composés organiques

carbonés présents sont quasiment tous hydrosolubles et n'ont pas encore eu le temps de s'associer en molécules de type humique. En fin de compostage, le pourcentage de carbone organique extractible par la soude est entre 4 à 7 fois plus élevé que le pourcentage de carbone extractible par l'eau, ce qui signifie bien que les composés organiques se sont humifiés et sont devenus beaucoup plus difficiles à extraire avec un simple extractant comme l'eau.

Le Tableau V. 4 donne également des informations sur le devenir de l'azote au cours du compostage.

Tableau V. 4 : Pourcentages de carbone et d'azote présents dans les extraits WEOM et HLA des composts GM et UB, sans correction d'eau et de cendres.

	WEOM			**HLA**		
	% C	**% N**	**% C/N**	**% C**	**% N**	**% C/N**
GM060	**34,7**	**2,27**	**15,3**	**47,2**	**3,69**	**12,8**
GM120	**30,9**	**2,19**	**14,1**	**45,2**	**3,51**	**12,9**
GM180	**29,2**	**2,85**	**10,2**	**45,3**	**5,12**	**8,8**
UB030	**33,2**	**3,03**	**10,9**	**49,3**	**4,68**	**10,5**
UB075	**28,9**	**4,45**	**6,5**	**45,4**	**5,95**	**7,6**
UB120	**12,2**	**7,14**	**1,7**	**46,1**	**6,22**	**7,4**

Les WEOM et les HLA ont une teneur en azote qui augmente avec le temps de compostage. Généralement les HLA contiennent des pourcentages d'azote plus élevé que les WEOM. Said-Pullicino et al. (Said-Pullicino et al., 2007a) trouvent des pourcentages d'azote dans les WEOM qui augmentent de 1,5 à 2,5 % au cours du compostage et expliquent que cette augmentation du pourcentage d'azote est due à la dégradation des composés organiques au cours du compostage, qui réduit la masse sèche du compost. WEOM GM180 contient un pourcentage d'azote de 7,14 % qui est anormalement élevé du fait vraisemblablement de la forte teneur en nitrates de cet échantillon.

En conclusion, nous pouvons dire qu'au fur et à mesure que le temps de compostage augmente :

- le pourcentage de récupération de matière totale diminue dans le cas des WEOMs mais augmente dans celui des HLAs;

● le pourcentage du carbone organique extractible à l'eau diminue alors que le pourcentage d'azote organique extractible à l'eau augmente.

Ces deux tendances indiquent que les composés organiques s'humifient, en formant des molécules de taille de plus en plus grande et qui sont de plus en plus difficile à extraire à l'eau.

V.2.4. Analyses spectrales

Spectres d'absorption moléculaire UV-visible

Les WEOM et les HLA ont été dissous à une concentration environ exactement à 100 $mg.L^{-1}$ dans un tampon phosphate à pH = 6,5. Les spectres UV-visible ont ensuite été normalisés à 1,00 $mol.L^{-1}$ de carbone organique. Tous les spectres UV-visible sont donnés de l'annexe 4 à l'annexe 13.

L'allure des spectres d'absorption est régulièrement décroissante de 250 nm à 600 nm, sans maximum localisé (cf. Figure V. 4).

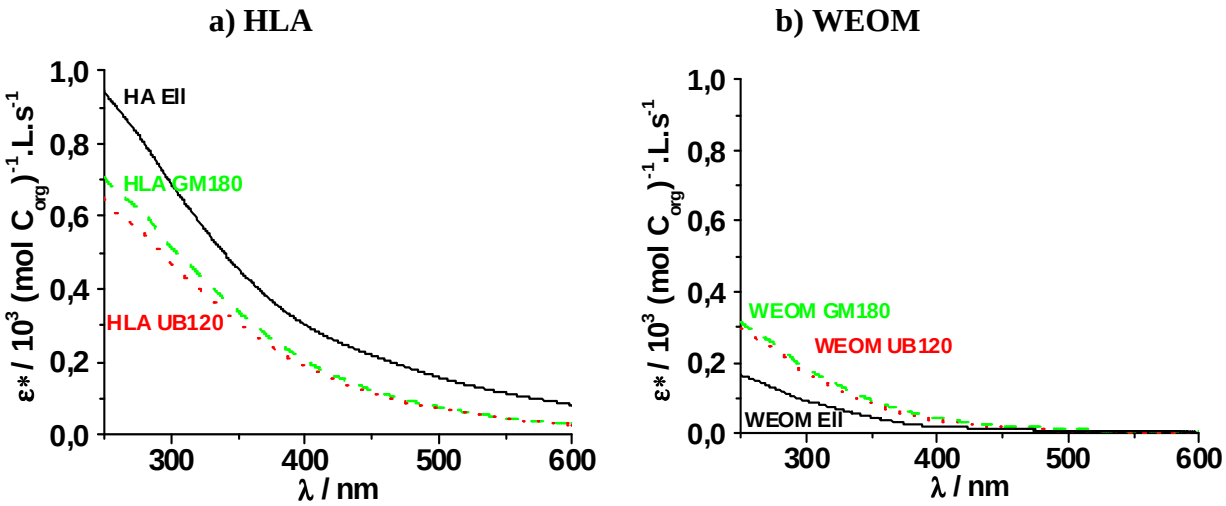


Figure V. 4 : Spectres d'absorption UV-visible des extraits humiques (a) et aqueux (b) provenant du sol Elliott et des composts GM180 et UB120.

Les WEOM sont nettement moins absorbants que les HLA (voir annexes 6 à 13). L'absorbance des WEOM et des HLA de la série UB a tendance à augmenter au cours du

compostage, surtout entre le 30^{e} jour et le 75^{e} jour. L'augmentation est moins importante pour la série GM. Cela montre que la phase de biooxydation est une phase critique pour le compost UB.

D'autre part, j'ai été surpris par la similitude des résultats entre le compost GM et le compost UB, alors que ce sont deux composts de sources différentes obtenues par des procédés de compostage différents.

Le Tableau V. 5 montre que les valeurs de ε^*_{280} varie de 65 a 316 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour les WEOM et de 292 à 604 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour les HLAs. Comme attendu, on extrait plus de composés absorbants par la soude. L'examen de ces données indique aussi que ε^* augmente avec le temps de compostage, même pour les extraits aqueux. Cela signifie donc que l'on produit des composés absorbants au cours du compostage et/ou qu'une partie de ces composés absorbants devient soluble. De façon étonnante, les valeurs pour GM et UB sont proches.

Tableau V. 5 : Valeurs des ε^*_{280} pour les différents extraits de composts.

ε^*_{280} (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1}	**$WEOM_{1:200}$**	**$WEOM_{Volvic,1:200}$**	**$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$**	**WEOM**	**HLA**
GM060	141 ± 14	135 ± 14	131 ± 13	114 ± 11	443 ± 44
GM120	194 ± 19	171 ± 17	158 ± 16	114 ± 11	541 ± 54
GM180	275 ± 28	247 ± 25	213 ± 21	242 ± 24	604 ± 60
UB030	102 ± 10	98 ± 10	98 ± 10	65 ± 7	292 ± 29
UB075	213 ± 21	194 ± 19	193 ± 19	143 ± 14	555 ± 56
UB120	316 ± 32	305 ± 31	247 ± 25	227 ± 23	552 ± 55

Le Tableau V. 6 donne les valeurs du rapport A_{254}/A_{365}. D'une façon générale les valeurs de A_{254}/A_{365} varient de 3,32 à 5,82 pour les WEOM et de 2,33 à 2,59 pour les HLA. Le compost UB075 présente la plus grande variabilité, ce coefficient allant de 2,33 pour HLA à 5,82 pour $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$.

Le rapport A_{254}/A_{365} des WEOM diminue généralement lorsque le temps de compostage augmente. Cela signifie que la nature des composés extraits à l'eau se modifie au cours du compostage. Plus le rapport diminue, plus le taux de composés extractibles à l'eau et absorbants à grande longueur d'onde augmente. Cela est en ligne avec la maturation du

compost qui produit des composés organiques humifiés dont une partie est tout de même soluble dans l'eau.

Tableau V. 6 : Valeurs de A_{254}/A_{365} pour les différents extraits de composts.

A_{254}/A_{365}	**$WEOM_{1:200}$**	**$WEOM_{Volvic,1:200}$**	**$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$**	**WEOM**	**HLA**
GM060	4,12 ± 0,21	4,33 ± 0,22	5,04 ± 0,25	4,89 ± 0,24	2,51 ± 0,13
GM120	3,82 ± 0,19	3,96 ± 0,20	4,73 ± 0,24	4,98 ± 0,25	2,45 ± 0,12
GM180	3,59 ± 0,18	3,87 ± 0,19	4,96 ± 0,25	4,01 ± 0,20	2,34 ± 0,12
UB030	4,45 ± 0,22	4,46 ± 0,22	4,89 ± 0,25	5,18 ± 0,26	2,59 ± 0,13
UB075	4,47 ± 0,22	4,62 ± 0,23	5,82 ± 0,29	4,76 ± 0,24	2,33 ± 0,12
UB120	3,32 ± 0,17	3,47 ± 0,18	4,00 ± 0,20	4,35 ± 0,22	2,35 ± 0,12

Les WEOM provenant des deux composts GM et UB présentent la particularité d'avoir une absorbance spécifique à 280 nm qui diminue avec la force ionique de l'extractant. Le rapport A_{254}/A_{365} augmente quant à lui. Ceci traduit donc le fait que la solution $CaCl_2$ à 0,01 M extrait le moins de composés absorbants et le moins de composés humifiés.

Si l'on compare ces résultats avec ceux des résultats des WEOM et HA obtenues à partir des sols chernozem et Elliott, on peut dire que :

- les HLA de composts présentent moins de composés absorbants que les HA de sols. En effet ε^*_{280} n'est que de 600 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} en fin de compostage pour les composts, contre des valeurs comprises entre 750 et 800 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour les HA de sol. De plus, le rapport A_{254}/A_{365} est légèrement plus élevé pour un compost (autour de 2,35) comparé à celui d'un sol (autour de 2,2) indiquant que les composés absorbants sont légèrement moins humifiés pour un compost que pour un sol.

- les WEOM de composts matures présentent plus de composés absorbants que les WEOM de sols. Les valeurs de ε^*_{280} sont comprises entre 250 et 300 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour un compost mature contre 120 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour les sols. Le rapport A_{254}/A_{365} est légèrement plus faible pour les composts (de 3,3 à 4,3) en fin de compostage que pour les sols (4,5 à 5,3) traduisant que les composés absorbants extractibles à l'eau sont plus humifiés pour les composts matures que ceux des sols, ou que les composés humifiés sont plus hydrosolubles dans le cas des composts que dans celui des sols.

Spectres d'émission moléculaire

Les mêmes conditions que celles décrites dans le chapitre IV ont été utilisées pour obtenir les matrices d'excitation et d'émission. Trente et un spectres d'émission ont été obtenus en faisant varier l'excitation de 250 nm à 500 nm par pas de 10 nm. Six de ces spectres d'émission sont donnés Figure V. 5 pour l'échantillon HLA GM180. Les intensités d'émission sont très faibles comparées à celles observées dans le cas de HAK. Les mêmes maxima d'émission localisée sont obtenus à 510 et 550 nm. On retrouve également les mêmes épaulements à 350, 400, 430 et 600 nm.

Il y a donc de fortes analogies entre les espèces émissives contenues dans le compost et celles contenues dans les acides humiques de sol.

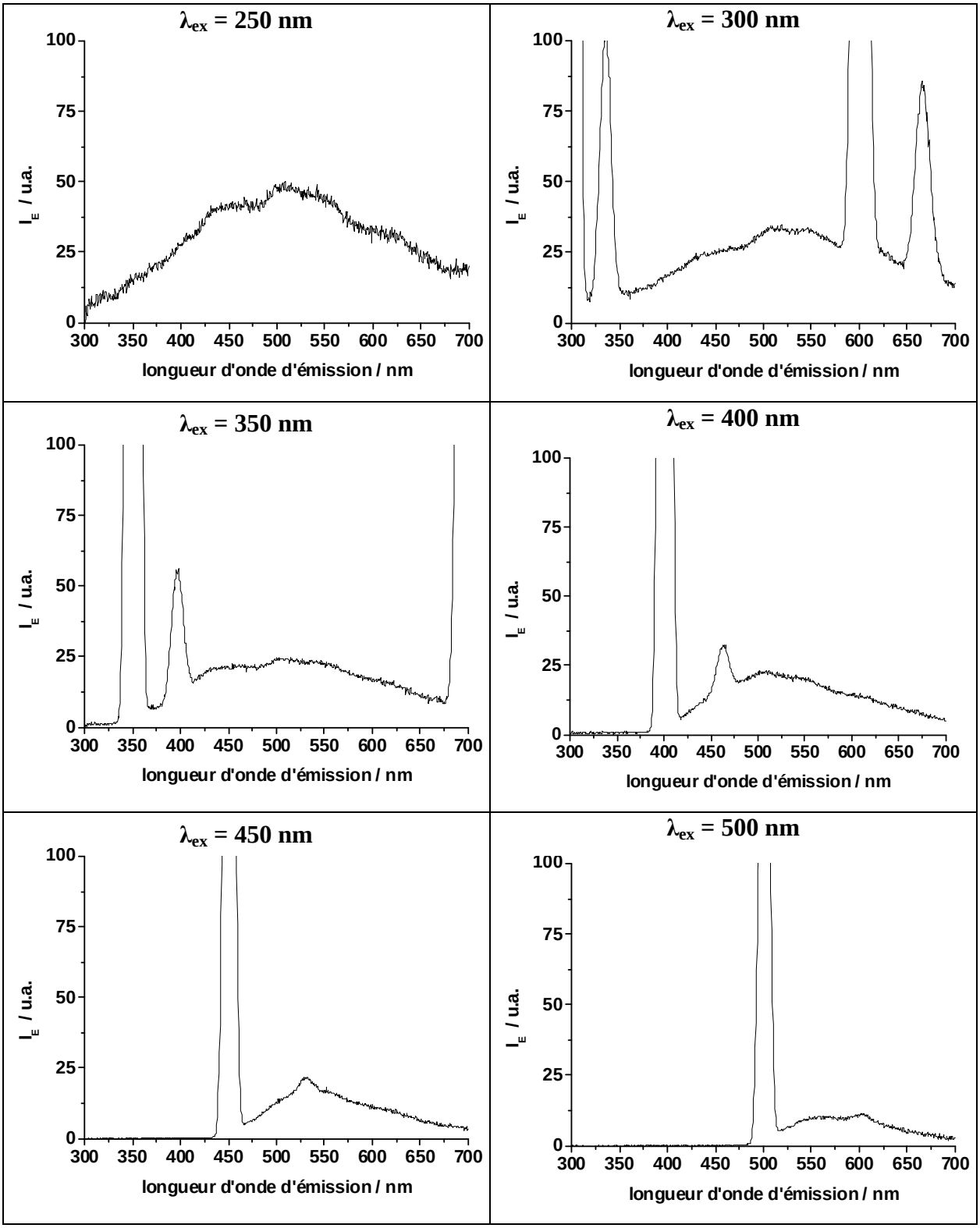


Figure V. 5 : Spectres d'émission de HLA GM180 aux longueurs d'onde d'excitation : 250, 300, 350, 400, 450 et 500 nm, pour une A_{300} = 0,100.

L'EEM de HLA GM180 est donnée Figure V. 6 pour une normalisation à 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique dissous. En haut à gauche du spectre, j'ai noté le nom de l'échantillon, suivi de la mention *I_f multipliée par 2* signifiant que l'intensité d'émission de HLA GM180 a été multipliée par 2 pour retrouver des intensités du même ordre de grandeur que pour HAK.

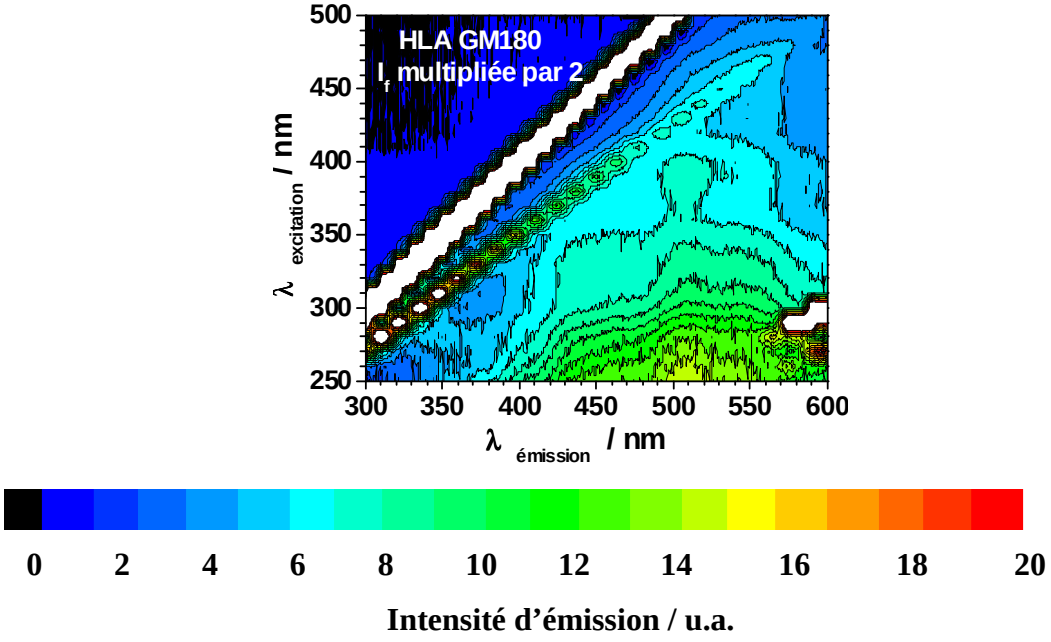


Figure V. 6 : EEM de HLA GM180, normalisée à une concentration de 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique.

✓ **HLA :**

Tous les HLAs ont une matrice d'excitation et d'émission ressemblant à celle de la Figure V. 6. Les émissions dominantes se situent vers 510 nm et vers 550 nm pour une excitation allant de 250 nm à 450 nm, comme dans le cas de HAK. Un épaulement à 430 est également visible. L'excitation à 250 nm permet de visualiser l'émission à 350 nm attribuable aux noyaux de type tryptophanes. L'intensité d'émission de HLA GM180 a dû être multipliée par 2 pour retrouver des intensités d'émission de l'ordre de celles de HAK.

D'une façon globale, les intensités d'émission des HLA sont de 2 à 4 fois plus faibles que celles de HAK ou de HA Ell (cf. annexes 4 et 5). D'après la Figure V. 7, les intensités d'émission à 510 nm, pour une excitation à 300 nm, sont quatre fois plus faibles pour les HLA de composts matures que pour HAK.

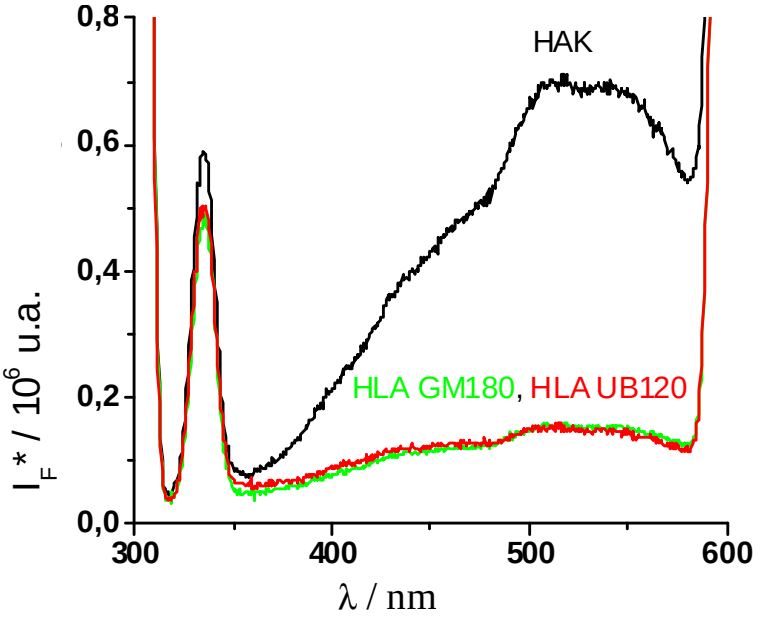


Figure V. 7 : Spectres d'émission de HLA GM180 et HLA UB120, en comparaison avec HAK, pour une excitation à 300 nm, normalisation à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$.

Les spectres d'émission varient peu au cours du compostage. Seules les intensités normalisées à 1,00 mol$C_{org}.L^{-1}$ augmentent légèrement : un facteur 2 est à noter entre 60 et 180 jours pour GM et 45 et 120 jours pour UB.

Pour s'affranchir des variations de concentration, nous avons utilisé l'indice d'humification HIX introduit par Zsolnay (1999). On admet que les valeurs de HIX augmentent avec le taux d'humification, cependant, ces données sont à utiliser avec précaution et valent surtout pour comparer une série d'échantillons. Les valeurs de HIX des extraits de compost sont rassemblées dans le Tableau V.7.

Tableau V. 7 : Valeurs des HIX pour les différents extraits de composts, à A_{300} = 0,100.

HIX	$WEOM_{1:200}$	$WEOM_{Volvic,1:200}$	$WEOM_{CaCl2}$ 0,01M, 1:200	WEOM	HLA
GM060	4,0	2,9	3,5	5,6	3,3
GM120	6,7	5,1	5,7	3,6	4,2
GM180	11,4	8,7	8,8	10,0	4,6
UB030	3,8	3,3	3,4	3,2	3,2
UB075	7,6	5,9	6,8	5,6	4,6
UB120	11,6	11,7	8,5	9,2	3,9

Pour les HLAs, HIX varie entre 3,2 et 4,6. Là encore, nous sommes surpris de la similitude de comportement des deux composts GM et UB. Il y a une légère tendance à l'augmentation de HIX au cours du compostage, ce qui signifie que l'émission dans la zone 435-480 nm augmente plus vite ou diminue moins vite que l'émission dans la zone de 300-345 nm. Cependant les valeurs de HIX pour les HLAs sont faibles comparées à celles mesurées pour les HAs de sols. Nous trouvons un HIX moyen de 12,0 ± 4,5 pour les HAs des sols chernozem et Elliott. Les faibles valeurs de HIX des HLA pourraient s'expliquer par le fait que les HLAs contiennent des composés organiques absorbants moins émissifs et moins humifiés que les HAs de sol. Ceci va dans le sens des résultats obtenus en absorption UV-visible.

✓ **$WEOM_{1:200}$, $WEOM_{Volvic,1:200}$, $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ et WEOM**

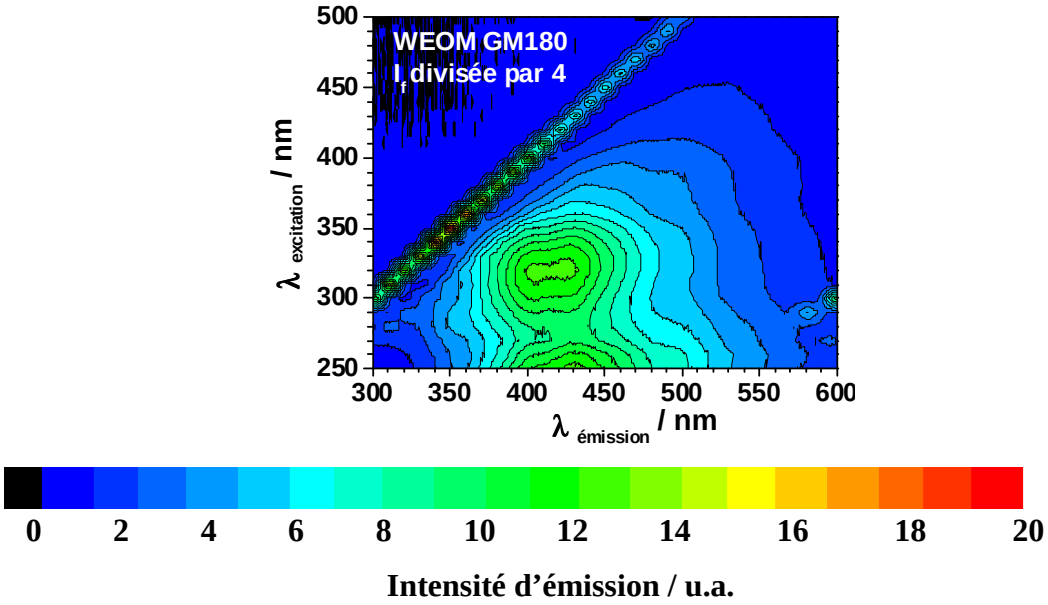


Figure V. 8 : EEM de WEOM GM180, normalisée à une concentration de 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique.

Les WEOMs présentent généralement une matrice d'excitation et d'émission ressemblant à celle représentée sur la Figure V. 8 pour le compost GM180. Les WEOMs comportent deux grandes familles de fluorophores : les composés émettant à 400 nm et 430 nm, pour des longueurs d'onde d'excitation allant de 250 nm à 400 nm. Des épaulements sont également notés aux longueurs d'onde d'émission 350, 510 et 550nm. Sur la Figure V. 8, l'intensité d'émission normalisée à 1,00 molC_{org}.L^{-1} a été divisée par 4, ce qui signifie que l'émission de WEOM GM180 est quatre fois plus grande que celle de HAK (voir chapitre IV), soit une intensité d'émission huit fois plus grande que celle de HLA de compost. Nous arrivons à un facteur 4 de différence entre un WEOM de compost qui semble mature et un WEOM de sol, comme le chernozem (voir Figure V. 9).

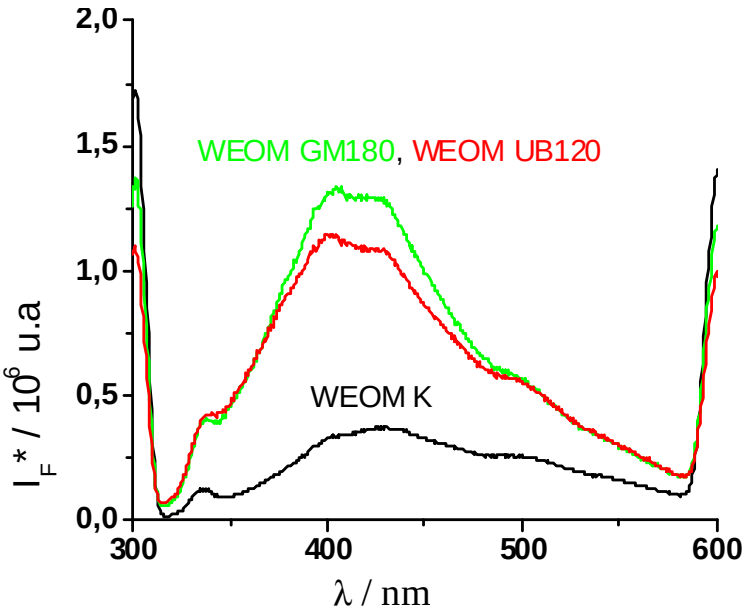


Figure V. 9 : Spectres d'émission des WEOM des composts GM180 et UB120 et du sol chernozem pour une excitation à 300 nm. Normalisation à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$.

Il est important d'insister sur le fait que l'on retrouve les mêmes maxima localisés ou épaulements à 350, 400, 430, 510 et 550 nm pour les WEOMs de sol et de compost, les HAs et les HLAs (Figure V. 7 et Figure V. 9). Ceci signifie que les mêmes types de fluorophores sont présents quelque soient les matières organiques considérées et quelque soit le mode d'extraction. L'émission à 330 nm correspond à l'émission Raman. On s'aperçoit qu'elle est du même ordre de grandeur pour les HLAs et les WEOMs de composts matures. Cependant, celle-ci est nettement plus faible pour WEOM K, sûrement du fait de phénomènes de diffusion de la lumière en solution moins importants pour cet échantillon que pour les autres.
D'après le Tableau V. 7, les valeurs de HIX des WEOMs varient de 2,9 à 11,7. Il y a une tendance prononcée à l'augmentation de HIX avec le temps de compostage, ce qui signifie là encore que les composés organiques constituant les WEOMs sont de plus en plus humifiés. Il est intéressant de noter que les valeurs de HIX sont plus élevées pour les WEOM de composts matures que pour les HLA. Ceci traduit le fait que les composés extraits à l'eau des composts matures sont plus humifiés que les composés extraits à l'eau de nos sols.

On peut remarquer que l'extraction des composés hydrosolubles par une solution de $CaCl_2$ à 0,01 M est le mode opératoire qui conduit aux valeurs de HIX les plus basses, ce qui signifie que ces $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,\ 1:200}$ sont ceux qui contiennent les composés organiques les moins humifiés de tous les extraits aqueux.

D'une façon générale, les émissions augmentent au cours du compostage pour les différents WEOMs, d'un facteur 2 pour le compost GM et d'un facteur 4 pour le compost UB (voir des annexes 6 à 13). Ainsi, les WEOMs sont plus sensibles à l'évolution de la matière organique du compost que les HLA. Une explication pourrait être que les composés humifiés, dont on note une émission dominante à 400 et 430 nm, d'un compost mature sont plus facilement extractibles à l'eau. Ainsi les fluorophores à 400 et 430 nm semblent être de plus en plus concentrés dans les WEOMs au cours du compostage.

Les émissions à 310 nm et à 340 nm sont attribuables respectivement aux fluorophores protéiniques de type tyrosine et tryptophane (Coble, 1996). Les émissions à 430 nm, pour une excitation à 250 nm, quant à elles coïncident aux émissions de type fulviques (Chen et al., 2003). Différentes molécules dérivées des lignines et/ou des débris végétaux peuvent contribuer à l'émission à 430 nm. Ces émissions à 430 nm pourraient être de nature humique, c'est-à-dire des composés de plus haut degré de maturation (Senesi et al., 2007).

Les émissions à 450 nm pour une excitation à 370 nm proviendraient de matière organique issue de molécules biologiques (Diane M. McKnight, 2001).

V.2.5. Propriétés photosensibilisatrices

Nous avons comparé l'aptitude des différents extraits à photosensibiliser la transformation des composés organiques. Le FFA a été choisi pour tester la photoproduction de l'oxygène singulet.

Comme dans l'étude des propriétés émissives, les comparaisons ont été établies à partir de mesures cinétiques (i) réalisées sur des solutions présentant une faible absorbance pour éliminer l'effet d'écran et (ii) normalisées à une même concentration de carbone organique dissous. Les solutions ont été irradiées en lumière polychromatique 300-450 nm. Le détail de la procédure expérimentale est décrit chapitre III.

La Figure V. 10 présente les cinétiques de phototransformation du FFA (10^{-4} M) exposé à la lumière en présence des WEOMs et HLAs des composts GM et UB.

Tableau V. 8 : Constantes de premier ordre apparent de disparition k_{FFA} et k^*_{FFA} de FFA (10^{-4} M), irradié en présence de $WEOM_{1:200}$, $WEOM_{Volvic,1:200}$, $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$, WEOMs et des HLAs.

	$WEOM_{1:200}$		**$WEOM_{Volvic,\ 1:200}$**		**$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$**		**WEOM**		**HLA**	
	k_{FFA} / $10^{-4}s^{-1}$	**k^*_{FFA} / s^{-1}**	k_{FFA} / $10^{-4}s^{-1}$	**k^*_{FFA} / s^{-1}**	k_{FFA} / $10^{-4}s^{-1}$	**k^*_{FFA} / s^{-1}**	k_{FFA} / $10^{-4}s^{-1}$	**k^*_{FFA} / s^{-1}**	k_{FFA} / $10^{-4}s^{-1}$	**k^*_{FFA} / s^{-1}**
GM060	0,34	**0,034 ± 7%**	0,28	**0,027 ± 10%**	0,38	**0,034 ± 9 %**	0,26	**0,021 ± 10%**	0,05	**0,018 ± 15%**
GM120	0,24	**0,034 ± 9%**	0,20	**0,026 ± 11%**	0,26	**0,029 ± 12%**	0,35	**0,029 ± 7%**	0,03	**0,013 ± 15%**
GM180	0,35	**0,075 ± 10%**	0,26	**0,049 ± 9%**	0,38	**0,059 ± 7%**	0,28	**0,051 ± 9%**	0,07	**0,032 ± 9%**
UB030	0,22	**0,016 ± 9%**	0,21	**0,015 ± 8%**	0,25	**0,016 ± 12%**	0,20	**0,009 ± 9%**	0,03	**0,009 ± 18%**
UB075	0,23	**0,034 ± 12%**	0,21	**0,027 ± 13%**	0,24	**0,030 ± 15%**	0,18	**0,017 ± 7%**	0,05	**0,023 ± 15%**
UB120	0,32	**0,079 ± 8%**	0,26	**0,062 ± 9%**	0,34	**0,063 ± 8%**	0,26	**0,044 ± 9%**	0,07	**0,035 ± 16%**

Les cinétiques de disparition de FFA sont du pseudo premier ordre (voir figure IV. 11). Les valeurs des pentes des régressions linéaires, k_{FFA}, sont portées dans le Tableau V.8.

Tous les WEOMs et HLAs photosensibilisent la transformation de FFA.

- les HLAs sont très peu photosensibilisateurs, présentant des k_{FFA} qui varient de 0,03 à 0,07 10^{-4} s^{-1};
- pour $WEOM_{1:200}$, $WEOM_{Volvic,1:200}$, $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ et WEOM, les k_{FFA} sont plus grands, ils varient entre 0,18 et 0,38.10^{-4} s^{-1}.

Toutes les valeurs de k_{FFA} ont été normalisées à 1,00 $mol.L^{-1}$ de carbone organique dissous pour obtenir k^*_{FFA}. L'examen détaillé des résultats fait apparaître les faits suivants :

- les valeurs de k^*_{FFA} varient de 0,009 s^{-1} à 0,079 s^{-1};
- les valeurs de k^*_{FFA} les plus basses sont obtenues pour le compost le plus jeune UB030 et pour les HLAs et les WEOMs ;
- les valeurs de k^*_{FFA} les plus élevées 0,075 s^{-1} et 0,079 s^{-1} sont relevées pour $WEOM_{1:200}$ des composts GM180 et UB120.
- les valeurs de k^*_{FFA} augmentent généralement avec le temps de compostage.

Lorsque l'on considère les HLAs de composts matures (GM180 et UB120), les valeurs de k^*_{FFA} sont de l'ordre de grandeur des valeurs obtenues pour les fractions les moins photosensibilisatrices de HAK: A, B et $R_{22,u}$ (entre 0,03 et 0,04 s^{-1}, cf. chapitre IV). Pour comparaison, les HA de sol (Chernozem et Elliott) produisent entre 3 et 4 fois plus d'oxygène singulet.

Les k^*_{FFA} des WEOMs de composts matures sont compris entre 0,044 et 0,079 s^{-1}, valeurs qui sont légèrement supérieures aux valeurs de k^*_{FFA} trouvées pour les WEOMs de sols (0,037 à 0,041 s^{-1}).

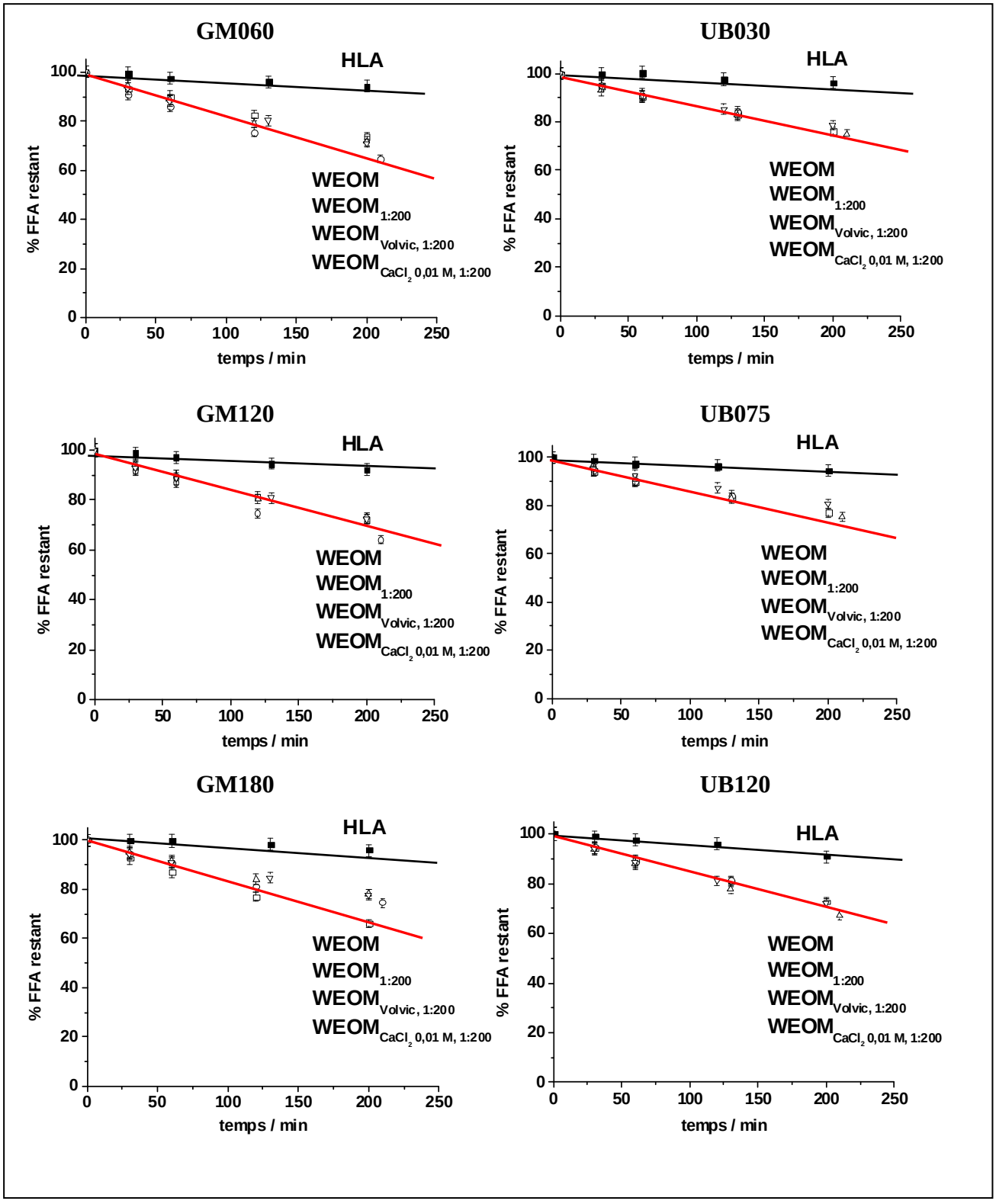


Figure V. 10 : Cinétiques de disparition de FFA (10^{-4} M) irradié en présence des différents extraits de composts : HLA (—■—), $WEOM_{1:200}$ (—□—), $WEOM_{Volvic,1:200}$ (—○—), $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ (—Δ—) et WEOM (—∇—). Comparaison pour une même absorbance A_{300} = 0,100.

La Figure V. 11 ci-dessous montre le lien fort entre l'indice d'humification HIX et k^*_{FFA}.

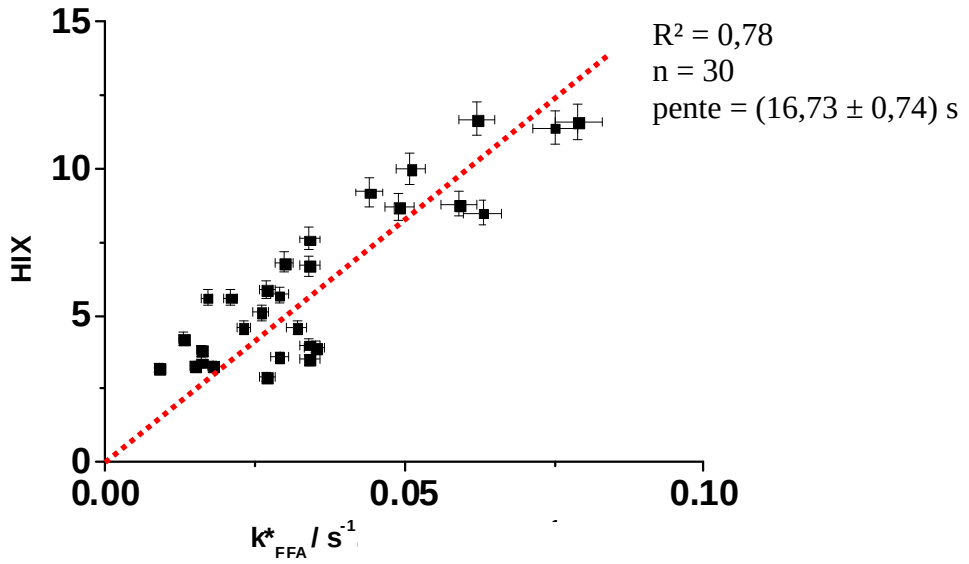


Figure V. 11 : Corrélations entre les valeurs d'indice d'humification HIX et les constantes normalisées de pseudo premier ordre de disparition de FFA.

Cette droite signifie que plus les valeurs de HIX sont élevées, plus les k^*_{FFA} sont grands. Des valeurs de HIX plus élevées signifient que les fluorophores émettant aux grandes longueurs d'onde prédominent devant ceux émettant aux plus courtes longueurs d'onde. Ceci caractérise un état d'humification plus avancé de la matière organique. Nous nous sommes donc intéressés dans la suite aux émissions aux grandes longueurs d'onde pour les comparer.

V.2.6. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices

Dans cette partie, nous avons essayé de corréler les propriétés émissives et photosensibilisatrices, comme dans le chapitre IV. Le Tableau V.9 résume ces données. Comme dans le chapitre IV, les intensités d'émission à 430, 510 et 550 nm (pour une excitation de 300 nm) ont été comparées aux constantes de vitesse de disparition de l'alcool furfurylique. Toutes les données ont été normalisées à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$.

Tableau V. 9: Valeurs de I_F* à 430 nm, 510 nm et 550 nm et de k^*_{FFA} de $WEOM_{1:200}$, $WEOM_{Volvic,1:200}$, $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$, WEOM et HLA des composts GM et UB.

	GM060	**GM120**	**GM180**	**UB030**	**UB075**	**UB120**
	$WEOM_{1:200}$			$WEOM_{1:200}$		
$\mathbf{I_F^*_{430}}$	801970	1181819	1924769	545864	1195682	1648781
$\mathbf{I_F^*_{510}}$	290898	419144	839032	189937	424061	868227
$\mathbf{I_F^*_{550}}$	158942	237483	500720	104340	240269	513640
$\mathbf{k^*_{FFA}}$ / $\mathbf{s^{-1}}$	0,034 ± 7%	0,034 ± 9%	0,075 ± 10%	0,016 ± 9%	0,034 ± 12%	0,079 ± 8%
	$WEOM_{Volvic,1:200}$			$WEOM_{Volvic,1:200}$		
$\mathbf{I_F^*_{430}}$	778239	1063358	1572979	490941	1340133	1596941
$\mathbf{I_F^*_{510}}$	271033	367858	647485	170330	489838	809025
$\mathbf{I_F^*_{550}}$	143288	205863	381178	93707	279328	505319
$\mathbf{k^*_{FFA}}$ / $\mathbf{s^{-1}}$	0,027 ± 10%	0,26 ± 11%	0,049 ± 9%	0,015 ± 8%	0,027 ± 13%	0,062 ± 9%
	$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$			$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$		
$\mathbf{I_F^*_{430}}$	980411	1216240	1942952	540516	1581358	2172158
$\mathbf{I_F^*_{510}}$	304237	371410	670293	174225	529415	773239
$\mathbf{I_F^*_{550}}$	156471	205673	372068	97141	292730	408383
$\mathbf{k^*_{FFA}}$ / $\mathbf{s^{-1}}$	0,034 ± 9 %	0,029 ± 12%	0,059 ± 7%	0,016 ± 12%	0,030 ± 15%	0,063 ± 8%
	WEOM			WEOM		
$\mathbf{I_F^*_{430}}$	668694	609848	1273634	316921	823952	1067578
$\mathbf{I_F^*_{510}}$	211256	189113	504644	101366	286226	502939
$\mathbf{I_F^*_{550}}$	111819	103639	285510	55929	165457	300209
$\mathbf{k^*_{FFA}}$ / $\mathbf{s^{-1}}$	0,021 ± 10%	0,029 ± 7%	0,051 ± 9%	0,009 ± 9%	0,017 ± 7%	0,044 ± 9%
	HLA			HLA		
$\mathbf{I_F^*_{430}}$	91207	92362	114737	84332	134555	115915
$\mathbf{I_F^*_{510}}$	106993	112573	156826	99702	181083	152908
$\mathbf{I_F^*_{550}}$	95671	117185	156115	92160	175740	153113
$\mathbf{k^*_{FFA}}$ / $\mathbf{s^{-1}}$	0,018 ± 15%	0,013 ± 15%	0,032 ± 9%	0,009 ± 18%	0,023 ± 15%	0,035 ± 16%

Quand on trace les intensités d'émission normalisées en fonction de k^*_{FFA}, on obtient des coefficients de régression linéaire respectivement de 0,64, 0,84 et 0,86 pour les intensités d'émission à 430, 510 et 550 nm (Figure V. 12). Les meilleurs résultats sont donc obtenus pour les émissions aux grandes longueurs d'onde : 510 et 550 nm.

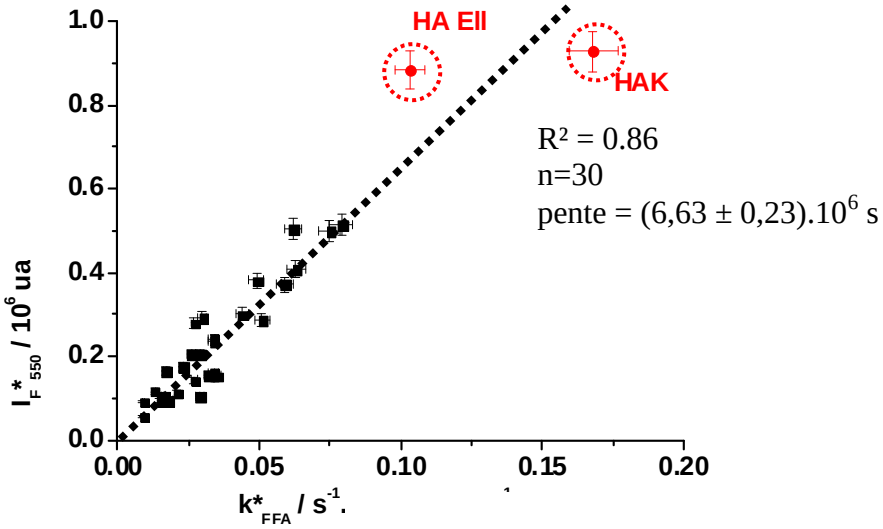


Figure V. 12 : Corrélation entre l'intensité d'émission à 550 nm pour une excitation à 300 nm et k^*_{FFA}. Données normalisées à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$.

En pointillé, j'ai placé les points correspondant aux deux HA de sols : HA Ell et HAK. Ils se situent sur la droite $I_F{}^*_{550} = f(k^*_{FFA})$ de pente $(6,63 \pm 0,23).10^{-6}$ s. Il semble donc que la corrélation entre $I_F{}^*_{550}$ et k^*_{FFA} fonctionne pour toutes les matières organiques testées.

V.2.7. Bilan sur les analyses des extraits de compost :

L'étude des différents extraits de compost amène aux conclusions suivantes :

- la quantité de matière extraite à l'eau diminue avec le temps de compostage ;

- le pourcentage de carbone organique diminue au cours du compostage dans $WEOM_{1:200}$, $WEOM_{Volvic,1:200}$, $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ et WEOM, alors qu'il est quasiment

stable et proche de 50 % pour les HLAs. Les valeurs les plus basses de carbone organique sont obtenues dans les WEOM extraits avec $CaCl_2$ 10^{-2} M ;

- le pourcentage d'azote organique augmente au cours du compostage dans les différents extraits ;

- les chromophores sont d'autant plus extraits que le temps de compostage augmente. Le coefficient ε^*_{280} en (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} permet d'évaluer la concentration en chromophores dans les échantillons. Il augmente au cours du compostage. Le rapport A_{254}/A_{365} renseigne sur l'état d'humification. Ce rapport diminue au cours du compostage.

Les composts matures sont caractérisés par des valeurs de ε^*_{280} de 250 à 300 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour WEOM et 550 à 600 (mol C_{org})$^{-1}$.L.cm^{-1} pour HLA et des valeurs de A_{254}/A_{365} de 3,5 à 4,3 pour WEOM et 2,3 pour HLA ;

- les fluorophores des WEOM donnent des émissions à 400 et 430 nm alors que ceux des HLAs ont une émission dominante à 510 nm et 550 nm. Les fluorophores des WEOMs sont jusqu'à huit fois plus concentrés que des HLAs. L'indice d'humification HIX augmente au cours du compostage ;

- la photoproduction d'oxygène singulet augmente avec le temps de compostage.

Dans l'étude qui va suivre, sur la phototransformation de polluants biorécalcitrants photosensibilisée par la matière organique extraite de compost, je vais considérer les WEOMs et les HLAs des composts matures : GM180 et UB120.

V.3. Photosensibilisation de polluants réfractaires

Les pesticides choisis ont été sélectionnés selon un rapport d'activité final, datant de 2006, provenant de Phyt'Eauvergne (groupe régional d'action contre les polluants des eaux par les produits phytosanitaires) : et FREDON Auvergne (fédération régionale de défense contre les organismes nuisibles en Auvergne). Ce rapport portait sur une expérimentation de traitement d'effluents phytosanitaires par dégradation en biobac®. Nous en avons ressorti deux pesticides biorécalcitrants : l'éthofumésate et l'époxiconazole, auxquels nous avons ajouté la mésotrione, dont la photodégradation a été largement étudiée au laboratoire (ter Halle et Richard, 2006).

Le Tableau V.10 résume les caractéristiques physico-chimiques des trois pesticides étudiés. Deux sont des herbicides : la mésotrione et l'éthofumésate et un est un fongicide : l'époxiconazole.

Ces trois molécules absorbent très faiblement au dessus de la longueur d'onde de 300 nm, ce qui explique les constantes de vitesse de photolyse directe très faibles, comprises entre 3,97 et 5,01 10^{-7} s^{-1}, dans les conditions expérimentales suivantes : concentrations initiales de 5.10^{-6} $mol.L^{-1}$, solutions sont tamponnées à pH 6,5, et irradiation en enceinte polychromatique 300-450 nm, simulant la lumière naturelle.

Tableau V. 10 : Caractéristiques physico-chimiques des trois pesticides étudiés.

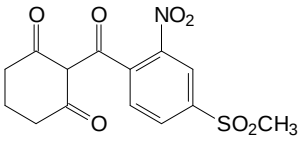
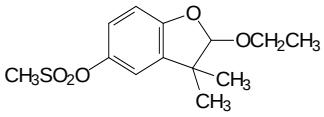
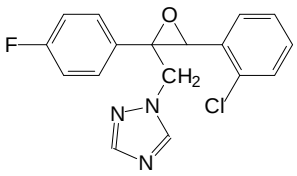
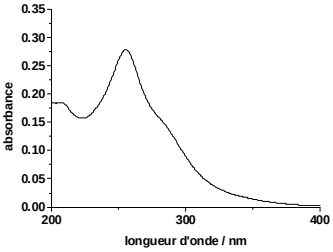
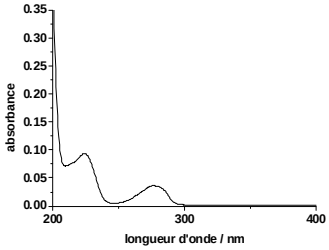
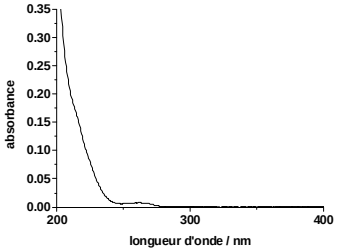
	mésotrione	éthofumésate	époxiconazole
molécule			
Spectre UV 10^{-5} M			
formulation	CALLISTO®	TRAMAT®	DIAMANT®
Usage	Herbicide sélectif utilisé dans les cultures de **maïs** inhibant l'activité de la HPPD	Herbicide sélectif utilisé dans les cultures de **betteraves** inhibant l'activité des élongases	Fongicide utilisée dans les **cultures céréalières** inhibant la déméthylation des stérols
pKa	3,12	-	-
M_w ($g.mol^{-1}$)	339,32	286,3	329,78
Coefficient octanol eau K_{ow}	1,99	2,7	3,44
Constante Henry K_H à 25°C ($Pa.m^3.mol^{-1}$)	$1,27.10^{-12}$	$6,5.10^{-4}$	$4,7.10^{-4}$

Tableau V.10 (suite) : Caractéristiques physico-chimiques des trois pesticides étudiés.

	mésotrione	éthofumésate	époxiconazole
Solubilité eau à 20°C ($mg.L^{-1}$)	160	50	7
Photolyse directe k_{disp} / 10^{-7} s^{-1}	4,0 ± 1,2	5,0 ± 0,1	4,9 ± 2,9

Les cinétiques de disparition des trois pesticides sont données dans la Figure V. 13. Elles sont du pseudo premier ordre et elles présentent les caractéristiques suivantes :

- tous les extraits photoinduisent ou photosensibilisent la disparition des pesticides ;
- les temps de réaction sont assez longs puisqu'ils se comptent en jours et sont du même ordre de grandeur quelque soit le pesticide et quelque soit l'extrait ;
- la photodégradation la plus rapide est observée pour WEOM du compost UB120. Au bout de 76 heures d'irradiation, il ne reste qu'entre 50 et 60 % de la concentration initiale de leur concentration initiale.

Après normalisation à même carbone organique, on obtient les constantes cinétiques données Figure V.14. Les conclusions sont assez similaires. Les constantes de vitesse normalisées sont comprises dans une fourchette de valeurs très étroite, entre 2 et 4.10^{-3} s^{-1} pour WEOM et entre 5 et 9.10^{-3} s^{-1} pour HLA.

Nous avons été surpris par la relative homogénéité des valeurs des constantes de vitesse normalisées compte tenu des différences physico-chimiques marquées pour les pesticides choisis. Une étude plus approfondie des espèces réactives impliquées serait maintenant nécessaire pour comprendre les résultats observés.

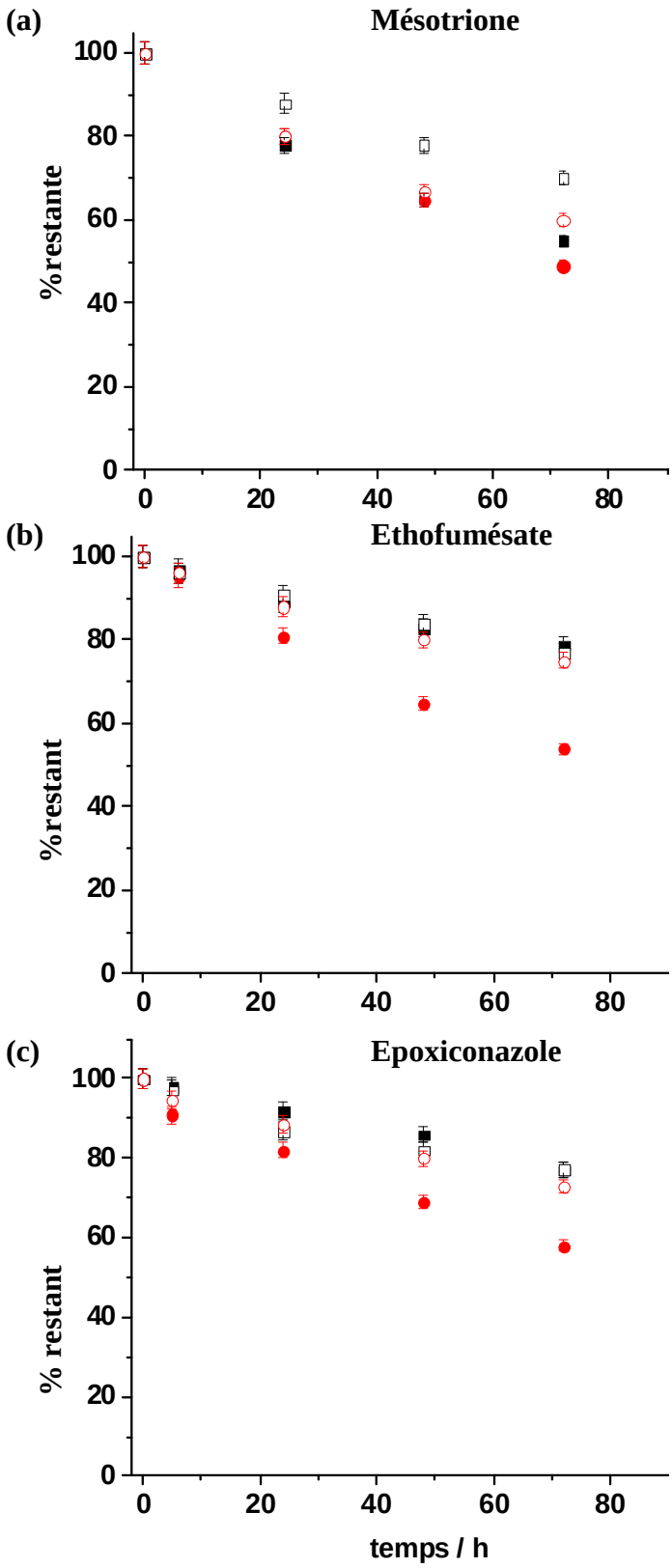


Figure V. 13 : Cinétiques de disparition de la mésotrione (a), de l'éthofumésate (b) et de l'époxiconazole (c) pour des concentrations intiales de 5.10^{-6} M. Irradiation en présence de WEOM (■,●) et de HLA (□,○) extraits des composts GM180 (carrés) et UB120 (ronds). Comparaison pour une même absorbance A_{300} = 0,100.

Les constantes de disparition de chacun des polluants sont calculées et normalisées à une teneur de 1,00 molC_{org}.L^{-1} et elles sont présentées sur la Figure V. 14.

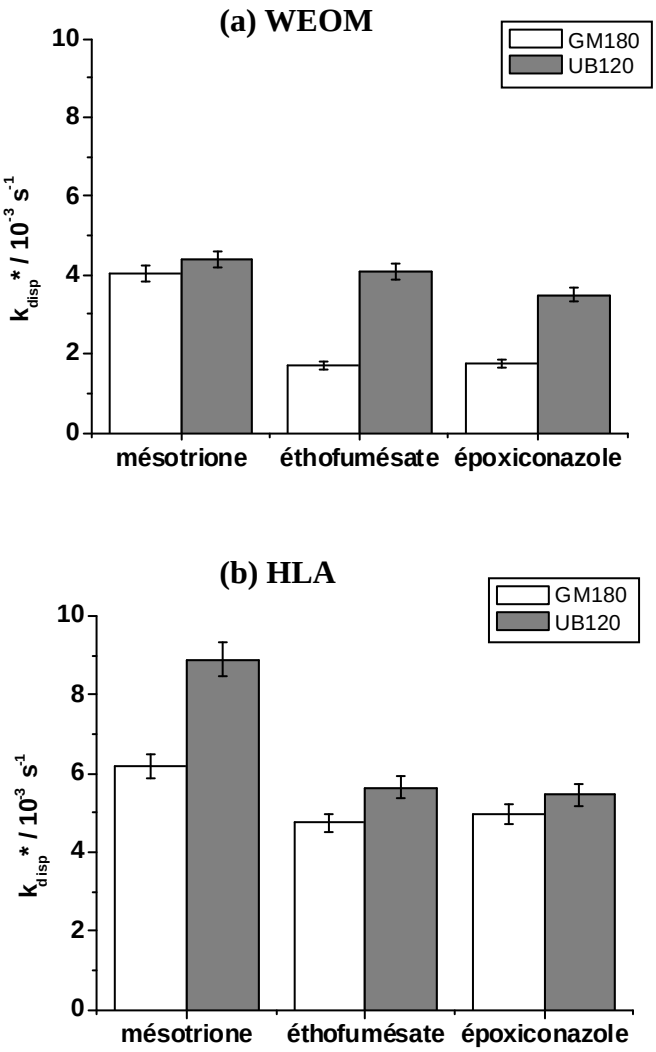


Figure V. 14 : Constantes de vitesse de disparition des trois pesticides étudiés : mésotrione, éthofumésate et époxiconazole, normalisées à 1,00 mol.L^{-1} de carbone organique dissous des WEOMs (a) et HLAs (b) pour les composts GM180 et UB120.

V.4. Conclusions

Cette étude a porté sur deux composts prélevés à différents temps de compostage pour lesquels nous avons extraits les matières organiques à l'eau ou par un procédé classiquement utilisé pour extraire les acides humiques de sols.

Les propriétés émissives et la capacité à produire de l'oxygène singulet varient en fonction de tous ces paramètres. Il ressort de l'étude les principaux résultats suivants :

● Quelque soit l'extractant utilisé, la quantité de chromophores extraits augmente avec le temps de compostage tout comme les intensités d'émission de fluorescence et la capacité à produire de l'oxygène singulet. Ces phénomènes sont un peu plus marqués avec le compost UB qui a subi une phase initiale de bio-oxydation qu'avec le compost GM. Ces évolutions peuvent s'expliquer par une désagrégation des macromolécules permettant la libération lors de l'extraction à l'eau pure des chromophores impliqués dans ces propriétés.

● Les spectres d'émission de fluorescence des HLAs et WEOMs de compost présentent les mêmes maxima ou épaulements que les HAs et WEOMs extraits de sols, notamment 430, 510 et 550 nm. Ils contiennent donc les mêmes espèces fluorophores ou mêmes types d'espèces fluorophores. Les intensités d'émission sont plus faibles et les abondances relatives des fluorophores différentes.

● La capacité à produire de l'oxygène singulet est plus faible pour les HLAs que pour les HAs, mais plus importante pour les WEOMs de composts que pour les WEOMs de sols. L'eau extrait donc mieux les chromophores d'un compost que d'un sol.

● Nous avons de nouveau trouvé une bonne corrélation entre les propriétés émissives vers 500 nm et la capacité à produire de l'oxygène singulet.

Chapitre VI

Corrélations entre l'émission moléculaire et la production de l'oxygène singulet des substances humiques : vers une identification moléculaire ?

VI.1. Introduction

Les propriétés émissives des substances humiques sont bien établies. Afin d'identifier les constituants à l'origine des émissions observées, plusieurs auteurs ont tenté de trouver des corrélations entre la fluorescence et certaines caractérisations structurales des échantillons.

● Mc Knight et al. introduisent un index de fluorescence I_{450}/I_{500} défini comme le rapport de l'intensité d'émission à 450 nm sur l'intensité d'émission à 500 nm pour une excitation à 370 nm (Diane M. McKnight, 2001). Cet index de fluorescence se corrèle au taux d'aromaticité de différents acides fulviques (cf. Figure VI.1)

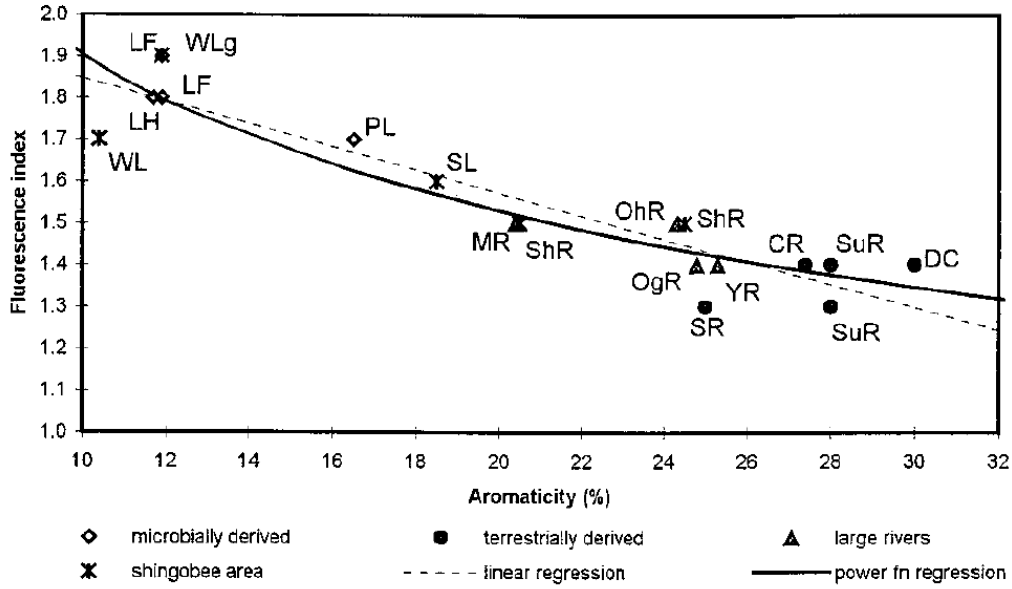


Figure VI. 1 : Index de fluorescence I_{450}/I_{500} en fonction de l'aromaticité de différents acides fulviques (l'aromaticité a été calculée par RMN ^{13}C dans la zone des carbones aromatiques) selon (Diane M. McKnight, 2001).

● Les émissions des pics attribuables à la tyrosine et au tryptophane (émissions vers 350 nm) ont été corrélées aux concentrations en acides aminés totalement hydrolysables sur 109 matières organiques provenant d'eaux marines (Yamashita et Tanoue, 2003). Il est mentionné une présence quatre fois plus importante de tyrosine que de tryptophane.

● Plus récemment, Huguet et al. obtiennent de très bonnes corrélations entre l'intensité de fluorescence rapporté aux pics γ, α', β, et α (définis au chapitre II) et la teneur de

carbone organique dissous de matières organiques extraites d'eaux de l'estuaire de la Gironde (cf. Figure VI.2), même si cette corrélation est variable selon la saison de l'année à laquelle les prélèvements ont été effectués (Huguet et al., 2009).

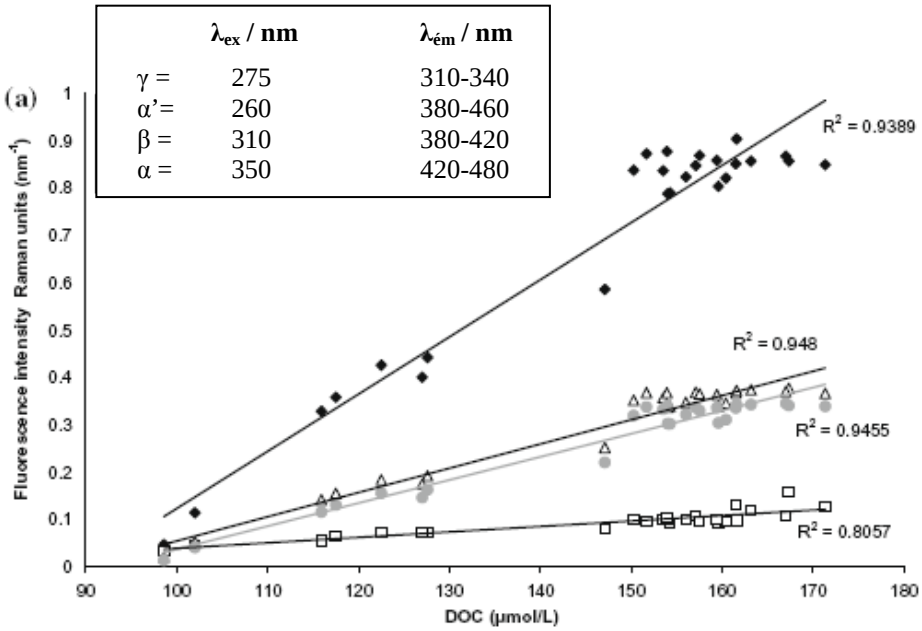


Figure VI. 2 : Intensité d'émission des fluorophores majeurs en fonction de la concentration en carbone organique dissous, pour des eaux de l'estuaire de Gironde collectées en septembre 2006.

- Les émissions des pics α' (380 – 460 nm pour une excitation à 260 nm) d'acides fulviques ont été corrélées positivement avec la teneur en fonctions carboxyliques et négativement avec les fonctions phénoliques (cf. Figure VI.3).

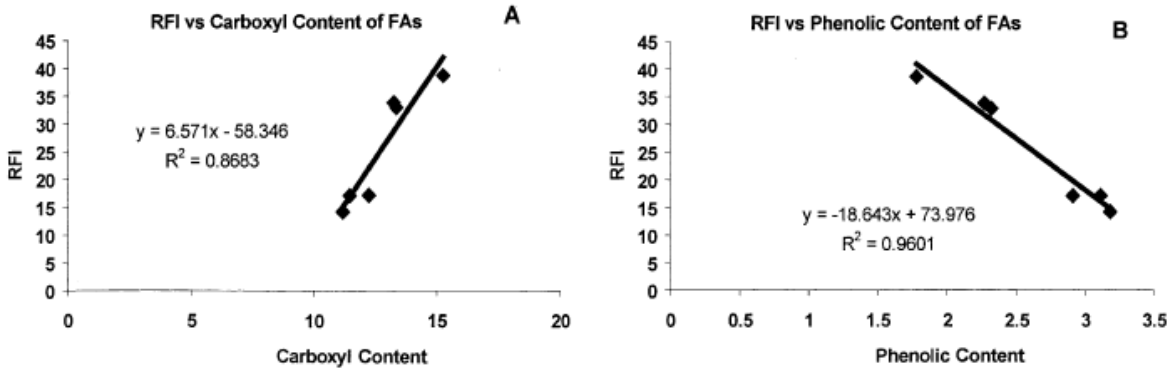


Figure VI. 3 : Indice de fluorescence du pic C en fonction des teneurs en groupements carboxyliques (A) et phénoliques (B) pour des acides fulviques (Alberts et Takács, 2004).

- Une autre étude sur 25 matières organiques naturelles de rivières et de lacs, montrent des corrélations plus ou moins bonnes entre leurs propriétés d'émission, notamment le rapport d'intensité du pic γ (310 – 340 nm pour une excitation à 275 nm) sur le pic α (420 – 480 nm pour une excitation à 350 nm), et leurs propriétés fonctionnelles comme le photoblanchissement, le pouvoir tampon l'hydrophilie, la capacité à complexer le benzo[a]pyrène et l'adsorption de l'aluminium (Baker et al., 2008).

- Concernant les études photochimiques de la matière organique, une étude récente émanant du laboratoire (Cavani et al., 2009), a montré pour la première fois que l'intensité de fluorescence à 500 nm pour une excitation à 300 nm se corrélait relativement bien avec la vitesse de photooxygénation de l'alcool furfurylique pour une série de six fractions d'un acide humique de tourbe obtenues par ultrafiltration, pour l'acide fulvique de cette même tourbe et pour l'acide humique Elliott. Ces premiers résultats laissent entrevoir une possibilité d'extension à d'autres types de matières organiques.

Dans le chapitre IV, nous avons montré qu'il existait une corrélation entre la constante de vitesse de photooxygénation de l'alcool furfurylique par les différentes fractions de l'acide humique HAK et l'intensité de fluorescence à 550 nm. Dans le chapitre V, nous avons étendu cette corrélation à des WEOMs et des HLAs provenant de composts.

Dans ce chapitre, nous avons donc voulu élargir l'étude à d'autres acides humiques de sols (Andosol, Léonardite, Kaldenkirchen, Aldrich, Ranker et Rendzine) et de tourbes (Waskish et Pahokee), à des acides fulviques de sols (Laurentian, Ranker) et de tourbes (Pahokee) et à deux matières organiques naturelles (rivière Suwannee et réservoir nordique).

Enfin, nous avons déconvolué les spectres d'émission afin de rechercher de données communes à tous.

VI.2. Corrélations entre I_F^* et k^*_{FFA}

VI.2.1. Extension des propriétés photosensiblisatrices et émissives de MON à des HA, FA et MON supplémentaires

Ces substances humiques ont été étudiées comme expliqué précédemment. Les valeurs de k_{FFA} et k^*_{FFA} sont rapportées dans le Tableau VI.1. La variabilité entre les résultats est d'un facteur 10 pour k_{FFA} et d'un facteur 4 pour k^*_{FFA}. Les valeurs de $I_F^*{}_{500}$ sont également portées dans le Tableau VI.1.

Tableau VI. 1 : Constantes de vitesse de premier ordre apparent k_{FFA} et k^*_{FFA} et intensités d'émission moléculaire à 550 nm $I_F^*{}_{550}$ normalisées à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ pour les HA, FA et MON.

	k_{FFA} / 10^{-4} s^{-1}	k^*_{FFA} / s^{-1}	$I_F^*{}_{550}$ / 10^6 ua
HA Léonardite	0,12	0,08	0,69
HA Pahokee	0,15	0,09	0,64
HA Aldrich	0,17	0,10	1,06
HA Ranker	0,32	0,16	1,24
HA Waskish	0,05	0,02	0,20
HA Andosol	0,16	0,06	0,47
HA Kaldenkirchen	0,22	0,08	0,44
HA Rendzine	0,10	0,02	0,16
FA Pahokee	0,36	0,16	1,02
FA Laurentian	0,14	0,05	0,34
FA Ranker	0,44	0,05	0,22
MON NR	0,19	0,06	0,26
MON SR	0,14	0,04	0,21

VI.2.2. Liens entre propriétés émissives et capacités photosensibilisatrices

Les tracés $I_F^*{}_{550} = f(k^*_{FFA})$ sont donnés Figure VI.4 pour la totalité des échantillons HA / HLA, FA, WEOM et MON.

Les corrélations entre les intensités d'émission moléculaire à 550 nm à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ avec leurs constantes de disparition de l'alcool furfurylique, normalisée à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ pour la totalité des échantillons HA / HLA, FA, WEOM et MON sont données sur la Figure VI. 4.

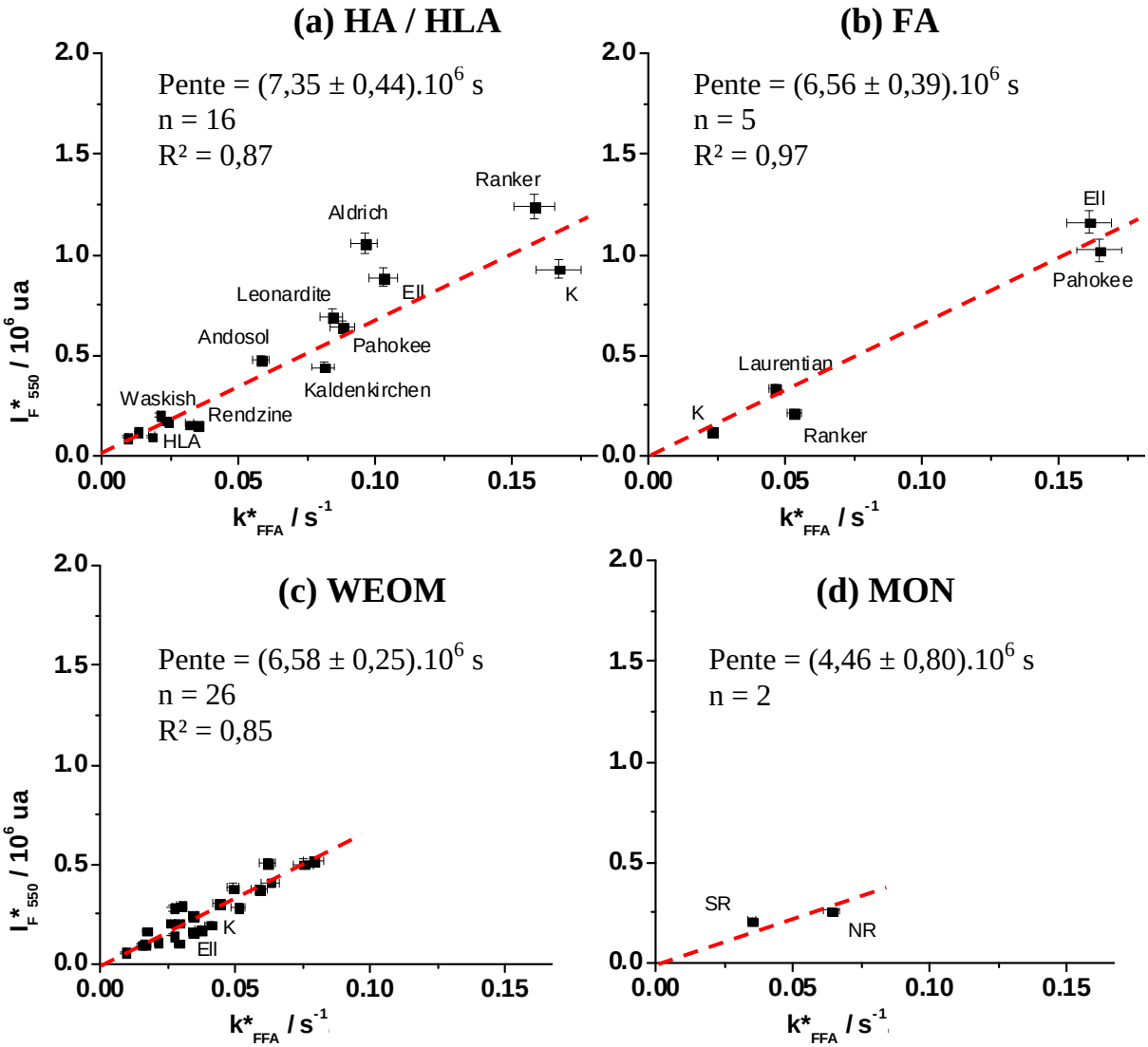


Figure VI. 4 : Corrélation entre les intensités de fluorescence à 550 nm pour une excitation à 300 nm et les constantes de premier ordre apparent de disparition de FFA. Données normalisées à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ pour (a) HA et HLA, (b) FA, (c) WEOM et (d) MON.

Il apparaît que pour ces quatre types de matières organiques, les coefficients de corrélations sont assez proches. Les pentes des droites des tracés $I_F^*_{550} = f(k^*_{FFA})$ sont les plus élevées pour les HA ($7{,}4.10^6$ s). Celles de FA et WEOM sont légèrement plus faibles mais restent du même ordre de grandeur ($6{,}6.10^6$ s). Concernant les MON, je n'en ai testé que deux, mais la pente est la plus basse de toutes ($4{,}5.10^6$ s). Les pentes restent cependant du même ordre de grandeur.

Il semble donc que nous ayons trouvé des conditions d'analyse où l'émission moléculaire à 550 nm et la production de l'oxygène singulet sous irradiation soient extrêmement liées. Ceci est valable pour toutes les matières organiques testées photochimiquement, auxquelles nous avons ajouté les fractions de l'acide humique HAK (voir Figure VI. 5 ci-dessous).

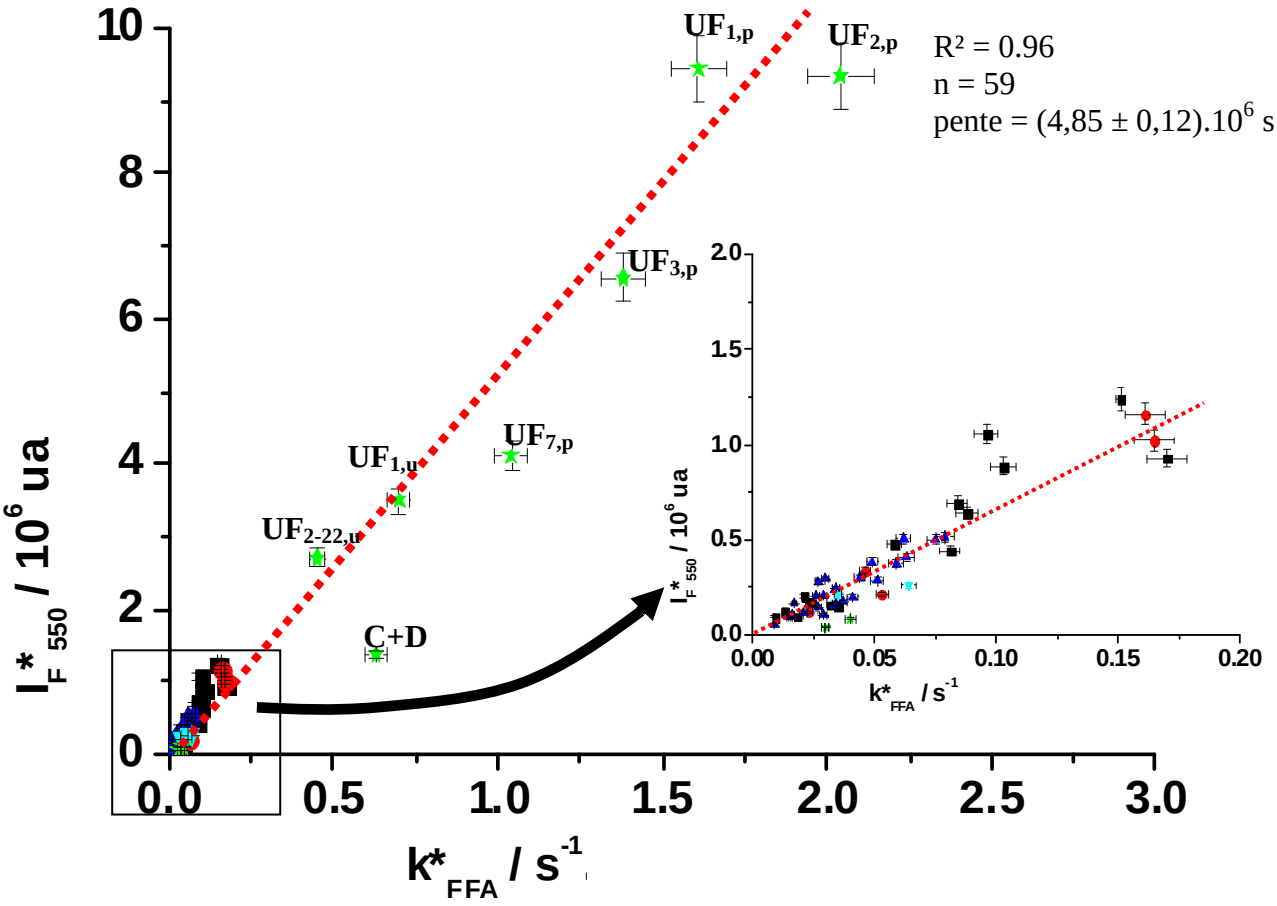


Figure VI. 5 : Tracé de l'intensité de fluorescence à 550 nm, normalisée à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$ en fonction de la constante de disparition de l'alcool furfurylique, normalisée à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$, pour HA et HLA (■), FA (●), WEOM (▲), MON (▼) et fractions de HAK (★).

Le coefficient de corrélation de régression linéaire R^2 vaut 0.96 lorsque l'on trace $I_F{}^*_{550}$ en fonction de k^*_{FFA}. En prenant les valeurs brutes de I_{F550} et de k_{FFA}, le coefficient de corrélation R^2 n'est plus que de 0,74. La valeur de la pente reste inchangée. En normalisant les valeurs d'intensité et de constantes de disparition du FFA, il se trouve que les points se déplacent le long de cette droite et que cinquante deux points sur cinquante neuf se retrouvent dans la zone des k^*_{FFA} compris entre 0 et 0,2 alors que seulement sept points sont situés entre 0,2 et 3,0 s^{-1}. Le R^2 n'est donc pas amélioré, en normalisant, que par le fait que les points ne sont plus répartis de façon homogène le long de cette droite.

Néanmoins, la corrélation positive entre $I_F{}^*_{550}$ et k^*_{FFA} semble mettre en évidence que plus l'intensité d'émission d'une solution de substances humiques est grande, plus elle est capable de photogénérer de l'oxygène singulet. Les mêmes constituants semblent donc être à l'origine de ces deux propriétés et ces constituants seraient présents dans toutes les matières organiques.

Dans une dernière étape, nous avons procédé à une déconvolution des spectres d'émission afin de les étudier plus finement en caractérisant leurs différentes contributions

VI.3. Déconvolution des spectres d'émission moléculaire

VI.3.1. Description de la méthode de déconvolution

Chacun des trente et un spectres d'émission de l'EEM aurait pu être déconvolué. Cependant, nous avons limité l'étude à 3 longueurs d'onde d'excitation différentes : 250, 300 et 360 nm. Les trois spectres d'émission de HAK et HA Ell ont été déconvolués avec le logiciel Peak Fit, jusqu'à avoir un bon ajustement avec le spectre obtenu expérimentalement. (cf. Figure VI. 6). Le choix de ces trois longueurs d'onde d'étude se justifie pour :

- 250 nm car toutes émissions de type Rayleigh et Raman du premier et du second ordre sont exclues du spectre d'émission ;
- 300 nm car à cette longueur d'onde des absorbances constantes et égales à 0,100 ont été choisies pour les réactions photochimiques avec le FFA et la lecture des spectres d'émission moléculaire ;
- 360 nm car c'est la longueur maximale d'émission de la lumière polychromatique émise par les lampes du dispositif d'irradiation.

Il nous a tout d'abord fallu transformer les longueurs d'onde (nm) en nombre d'onde (cm^{-1}). Ensuite les spectres sont retravaillés, avant déconvolution, par un lissage selon l'algorithme de Savitzky-Golay et un filtre digital répartissant chacun des points du spectre de façon homogène. La déconvolution des spectres d'émission a été faite avec un certain nombre de gaussiennes. L'équation mathématique de la gaussienne est la suivante :

$$y = a_0.\exp[-0{,}5.(\frac{x-a_1}{a_2})^2]$$

où a_0 est l'amplitude du pic, a_1 est le centre du pic et a_2 est la largeur du pic.

Pour l'ensemble des déconvolutions, a_0 et a_2 pouvait varier de 100 % et a_1 pouvait varier de 50 %. Généralement les meilleurs ajustements se faisaient lorsque nous utilisions une largeur de bande à mi-hauteur comprise entre 500 et 700 cm^{-1}. Ils étaient considérés comme bons lorsque le coefficient de corrélation R^2 était supérieur à 0,9990.

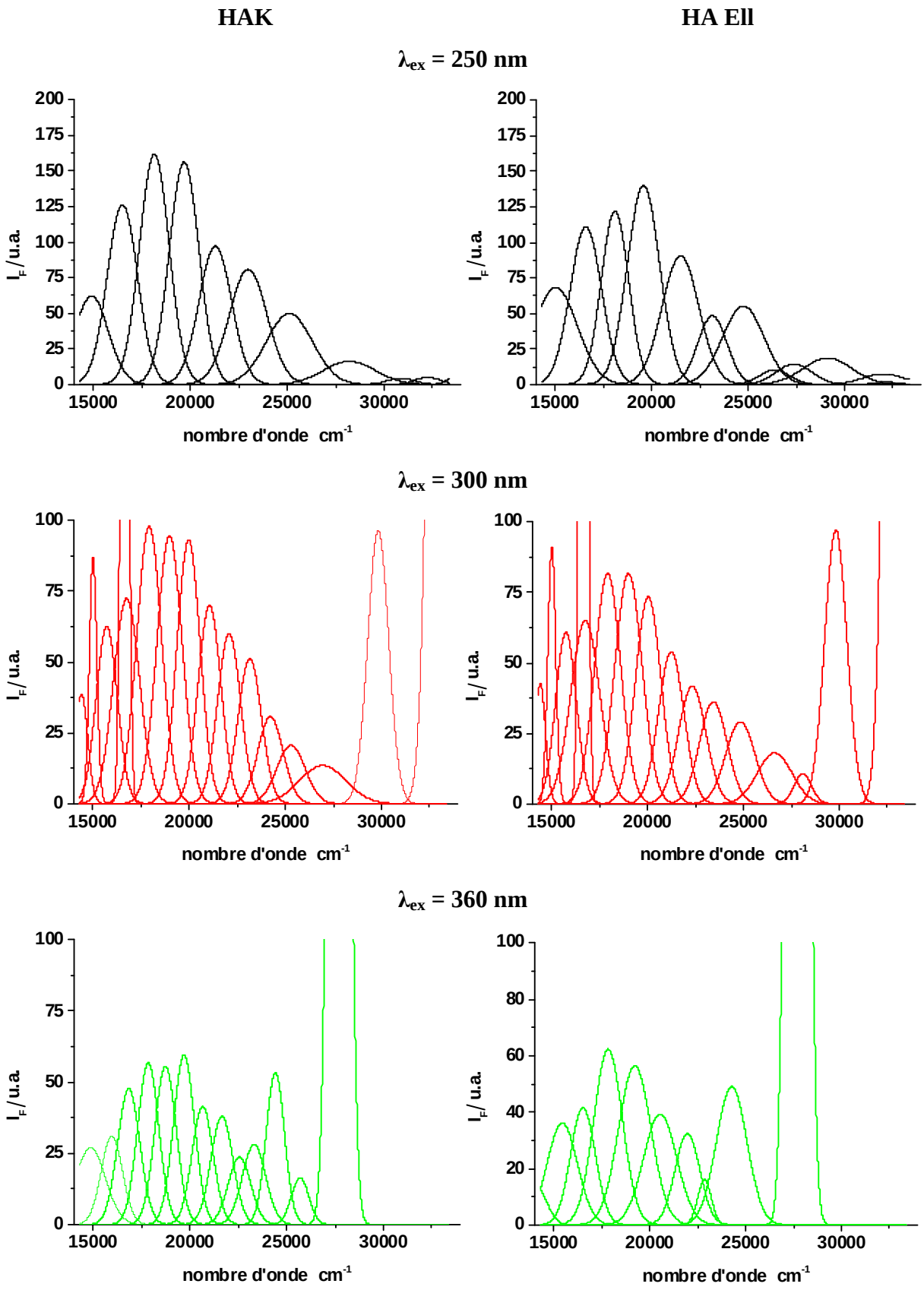


Figure VI. 6 : Déconvolution des spectres d'émission à 250, 300 et 360 nm de HAK et HA Ell.

VI.3.2. Validation de la méthode de déconvolution

Il apparaît que selon la longueur d'onde d'excitation : 250 nm, 300 nm ou 360 nm, le spectre d'émission de HAK se déconvolue respectivement en 10 gaussiennes, 16 gaussiennes (dont quatre pour les raie Rayleigh et Raman du premier et second ordre situées à 300, 335, 600 et 667 nm) et 13 gaussiennes (dont les raies Rayleigh et Raman du premier ordre situées à 360 et 410 nm). Pour HA Ell, la déconvolution se fait respectivement en 11 gaussiennes, 16 gaussiennes (dont quatre pour les raie Rayleigh et Raman du premier et second ordre) et 10 gaussiennes (dont les raies Rayleigh et Raman du premier ordre).

La Figure VI.7 indique la distribution en pourcentages des aires des gaussiennes localisées en des centres a_1 (nm) repérés tous les 25 nm, après déconvolution des spectres d'émission aux trois longueurs d'onde d'excitation choisies. Dans cette configuration d'analyse, l'émission totale mesurée pour une excitation à 250 nm correspond à 100 % du total des aires des gaussiennes obtenues par déconvolution. Elle ne représente plus que 50 % et 40 % de l'émission totale, pour les longueurs d'onde d'excitation respectives de 300 et 360 nm, du fait des émissions correspondant aux raies Rayleigh et Raman du premier ordre et second ordre. J'ai donc volontairement retiré le poids des émissions de type Rayleigh et Raman dans la représentation graphique Figure VI.7.

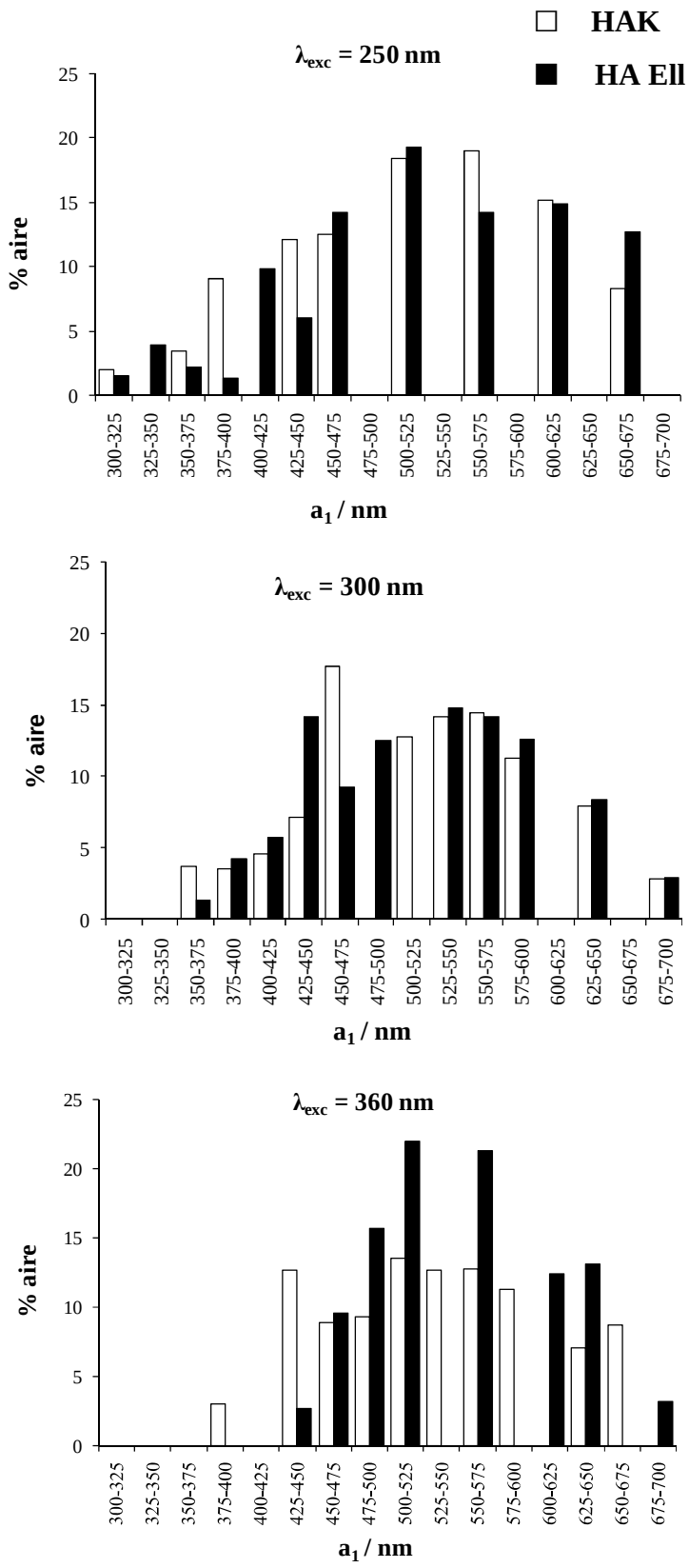


Figure VI. 7 : Distribution des % d'aires des gaussiennes localisées des centres a_1 (en nm), à trois longueurs d'onde d'excitation à 250, 300 et 360 nm, pour les acides humiques HAK et HA Ell.

Une des premières difficultés qui est apparue est la déconvolution en un certain nombre de pics qui peut être variable selon la longueur d'onde d'excitation à laquelle est lu le spectre d'émission et selon l'origine de l'acide humique.

Au premier abord, les spectres d'émission à 300 nm semblent complexes à analyser du fait de la présence de quatre raies diffusionnelles. Ces dernières peuvent cependant être fixées manuellement avec le logiciel Peak Fit et ainsi rendre la déconvolution plus simple et plus stable selon l'origine de l'acide humique. En effet pour HAK et HA Ell, la déconvolution se fait avec un même nombre de gaussiennes.

Nous pouvons décrire la Figure VI.7 de la façon suivante :

- de 300 à 400 nm, l'analyse des gaussiennes est difficile du fait de la présence des raies Rayleigh et Raman du premier ordre pour une excitation à 300 nm et du manque d'information concernant les émissions pour une excitation à 360 nm. On peut ajouter que le poids des gaussiennes dans cette gamme de longueur d'ondes est très faible : de l'ordre de 10 % de l'émission totale ;
- entre 400 et 500 nm, la déconvolution amène des gaussiennes localisées dont deux sont communes quelque soit l'acide humique considéré : celles à 400 et celles à 430 nm. Le poids de ces deux gaussiennes varie entre 15 à 20 % de l'émission totale. La gaussienne centrée sur 400 nm n'est plus visible pour une excitation à 360 nm.
- de 500 à 600 nm, on retrouve les gaussiennes centrées à 500, 560 et 600 nm. Quand la longueur d'onde d'excitation augmente (à 300 et 360 nm), il semble qu'une autre gaussienne centrée sur 525 nm apparaisse. Le poids de ces gaussiennes à l'émission totale est compris entre 40 et 50 % ;
- au-delà de 600 nm, l'analyse des gaussiennes est de nouveau difficile du fait de la présence des raies Rayleigh et Raman du second ordre pour une excitation à 300 nm. Le poids des gaussiennes y est compris entre 15 et 25 %.

Les expériences de photosensibilisation étant menées à absorbance constante de 0,100 à 300 nm, dans des enceintes où les lampes émettent une lumière polychromatique de 300 à 450 nm, j'ai choisi de travailler la déconvolution sur des spectres d'émission, pour une excitation à 300 nm.

La Figure VI. 8 présente la déconvolution des spectres d'émission à 300 nm de HA, FA et WEOM provenant du sol Elliott. La déconvolution se fait respectivement en 16, 19 et 18 gaussiennes dont les centres sont reportés sur le Tableau VI.2. Nous avons là encore retiré volontairement les gaussiennes attribuées aux raies Rayleigh et Raman du premier et second ordre.

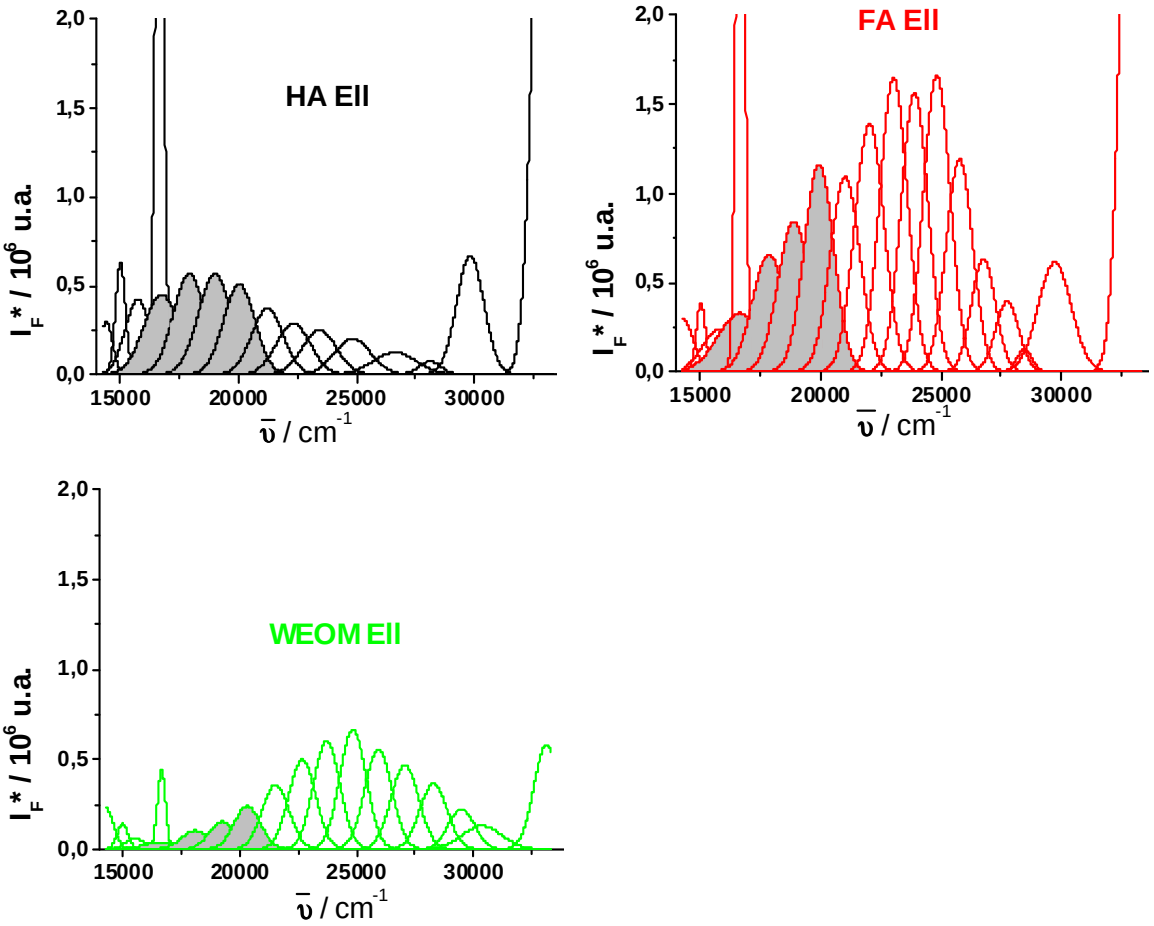


Figure VI. 8 : Déconvolution en gaussiennes des spectres d'émission de HA Ell, FA Ell et WEOM Ell. Excitation à 300 nm.

Tableau VI. 2 : Centres a_1 (en nm) des gaussiennes obtenues par déconvolution des spectres d'émission de HA Ell, FA Ell et WEOM Ell. Excitation à 300 nm.

HA Ell	FA Ell	WEOM Ell
		329
356	351	353
	360	
376	374	369
	388	386
403	403	403
427	418	422
	434	
448	454	441
471	476	464
499	502	492
526	530	519
558	560	553
597	601	601
635	635	644
694	700	700

Nous retrouvons les gaussiennes centrées sur 400, 430, 500, 525, 560 et 600 nm à 3–8 nm près. Il apparaît en plus des gaussiennes communes centrées sur 350, 370, 450 et 470 et 640 et 700 nm à 4-9 nm près. Au total, douze gaussiennes sont communes sur ces trois échantillons HA, FA et WEOM qui n'avait a priori aucun point commun, comme nous pouvons le voir sur leurs spectres d'émission pour une excitation à 300 nm (cf. Figure VI. 9).

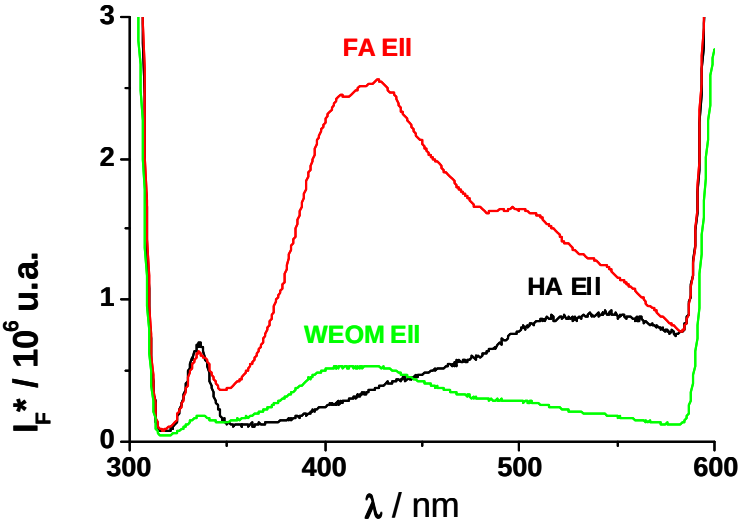


Figure VI. 9 : Spectres d'émission de HA Ell, FA Ell et WEOM Ell pour une excitation à 300 nm, recalculés à partir de la déconvolution en gaussiennes donnée sur la Figure VI. 8, avec R^2 > 0,9990.

Les corrélations $I_F^* = f(k^*_{FFA})$ sont les meilleures lorsque l'on choisit des longueurs d'émission supérieures à 500 nm. J'ai volontairement focalisé mon attention pour la suite sur les gaussiennes centrées au delà de 500 nm, notamment sur les gaussiennes centrées sur 500, 525, 560 et 600 nm à 3–7 nm près qui sont grisés sur la Figure VI. 8.

VI.3.3. Corrélation entre la production d'oxygène singulet et les composantes émissives de type gaussienne localisées au-delà de 500 nm

J'ai déconvolué les spectres d'émission à 300 nm des 10 HA de sols, 2 HLA de composts, 5 FA de sols et 2 WEOM de sols, soit dix neuf matières organiques différentes. Il a été vérifié que la méthode conduisait systématiquement aux quatre gaussiennes centrées sur 500, 525, 560 et 600 nm à 3-7 nm près.

J'ai ensuite tracé les courbes représentant les aires de chacune des quatre gaussiennes normalisées à 1,00 mol$C_{org}.L^{-1}$ en fonction de k^*_{FFA}. Il apparaît que la rel ation est linéaire (cf. Figure VI. 10).

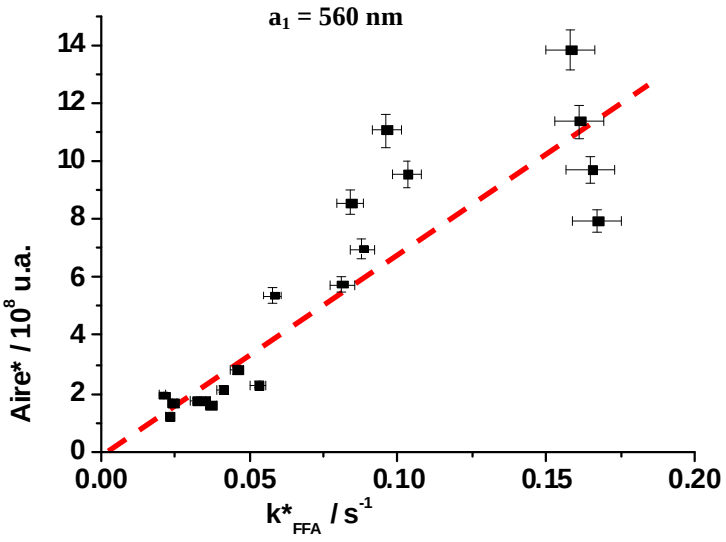


Figure VI. 10 : Tracé de l'aire de la gaussienne centrée sur 560 nm pour les 19 matières organiques testées en fonction de la constante de premier ordre apparent de disparition de FFA. Données normalisées à 1,00 mol $C_{org}.L^{-1}$.

Les pentes de ces droites sont indiquées sur le Tableau VI. 3 ci-dessous.

Tableau VI. 3 : Valeurs des pentes des droites représentant l'aire des gaussiennes centrées sur 500, 525, 560 et 600 nm en fonction de k^*_{FFA}. Normalisation à 1,00 $molC_{org}.L^{-1}$.

a_1	500 nm	525 nm	560 nm	600 nm
Pente ($/10^9$ s)	8,09 ± 0,61	7,97 ± 0,52	7,21 ± 0,46	4,63 ± 0,34
R^2	0,73	0,79	0,80	0,78

Les pentes sont comprises entre $8{,}09.10^9$ s et $4{,}63.\ 10^9$ s pour les quatre gaussiennes décrites précédemment avec des coefficients de régression linéaire R^2 voisin de 0,80 (cf. Tableau VI. 3). Les gaussiennes centrées sur 500, 525 et 560 nm ont curieusement une pente du même ordre de grandeur, avoisinant $7{,}5.10^9$ s. La pente semble légèrement décroître avec la localisation a_1 (nm) de la gaussienne.

L'aire de la gaussienne centrée sur 600 nm se corrèle bien linéairement avec k^*_{FFA} (pente de $4{,}6.10^9$ et $R^2 = 0{,}78$). Je peux signaler que cette gaussienne centrée sur 600 nm est difficile à manipuler du fait de la présence de la raie Rayleigh du second ordre, mais cette baisse brutale de la pente n'est pas anodine du fait de la décroissance de l'intensité d'émission sur les spectres bruts de tous les échantillons humiques.

Cette pente est proportionnelle à la contribution moyenne des gaussiennes obtenues aux quatre longueurs d'onde provenant .de 19 matières organiques différentes.

VI.4. Conclusions

Tous les échantillons humiques testés sont fluorescents et présentent des spectres d'émission similaires s'étendant sur une large gamme de longueurs d'onde allant de 300 nm à 700 nm et présentant des mêmes maxima localisés ou épaulements). Ceci suggère que les mêmes fluorophores sont impliqués dans ces émissions.

● Selon la nature (HA, FA ou WEOM) et l'origine (sols, tourbes, composts, eaux de rivière) des substances humiques, les contributions relatives des différents fluorophores varient (d'un HA à un autre et d'un FA ou WEOM à un autre).

● Afin d'affiner la corrélation, nous avons cherché à analyser plus finement les phénomènes en déconvoluant les spectres d'émission de fluorescence en une somme de composantes de forme gaussienne.

● Il est apparu que plusieurs composantes gaussiennes, centrées sur des longueurs d'onde variant de 300 à 700 nm (par exemple 350, 400, 450, 500, 520, 560, 600 nm) et de largeur à mi-hauteur égale à 600 cm^{-1}, étaient communes aux différents échantillons humiques. Ceci confirme la présence de constituants communs.

● Pour ces quatre dernières composantes (500, 520, 560 et 600 nm), nous avons pu établir une bonne corrélation avec les paramètres cinétiques. Ceci prouve qu'elles proviennent de fluorophores impliqués dans la photosensibilisation

Conclusions et perspectives

Cette étude avait pour objectif de caractériser les fluorophores et les constituants photosensibilisateurs des substances humiques. Le travail a porté sur plusieurs acides humiques extraits de sols ou de composts et a reposé sur des caractérisations spectrales (UV et fluorescence) et sur une étude de réactivité sous irradiation.

- Les spectres UV-visible et les spectres d'émission de fluorescence des différents échantillons ont été le plus souvent comparés à même concentration de carbone organique.

- Les mesures de fluorescence et de photoréactivité ont été réalisées sur des solutions présentant une absorbance faible et identique (0,100 à 300 nm) pour tous et les données ont été normalisées à même concentration de carbone organique.

- Pour l'étude des propriétés photosensibilisatrices, nous nous sommes surtout intéressés à la capacité des échantillons à produire de l'oxygène singulet et l'alcool furfurylique a été utilisé comme sonde moléculaire. Cette molécule a ses limites car elle ne piège que l'oxygène singulet présent dans les zones hydrophiles. Mais, elle présente aussi l'avantage de permettre la discrimination entre photosensibilisateurs hydrophiles et hydrophobes.

- Pour deux des acides humiques de sol, nous avons étudié en parallèle, l'acide humique lui-même et la fraction de sol soluble à l'eau. Pour un acide humique, nous avons examiné les fractions obtenues de deux façons différentes : SEC-PAGE en présence d'urée et ultrafiltration en présence d'urée. Dans le cas des composts, nous avons étudié les acides de type humiques et les fractions solubles à l'eau.

- Pour un grand nombre d'échantillons, nous avons procédé à la déconvolution des spectres d'émission de fluorescence afin de localiser les différentes composantes gaussiennes.

Localisation des fluorophores et les constituants photosensibilisateurs.

Il avait été montré au laboratoire que la fraction d'acide humique de masse moléculaire comprise entre 5 et 30 kDa obtenue par SEC-PAGE en présence d'urée contenait

beaucoup plus de constituants fluorophores et photosensibilisateurs que les fractions de haut poids moléculaires (30 à 100 kDa et 100 à 300 kDa). J'ai montré au cours de ce travail que la fraction < 5 kDa contient elle aussi une grande partie des fluorophores et des espèces photosensibilisatrices. Les mesures par fluorescence ont permis de mettre en évidence que les fractions 5 à 30 kDa et < 5 kDa sont assez complémentaires puisque la première présente un maximum d'émissions à 540 nm et des émissions au-delà de 600 nm alors que la deuxième un maximum d'émissions à 510 nm et des émissions en dessous de 450 nm. L'acide humique entier présente l'ensemble de ces émissions. La fraction < 5 kDa produit plus d'oxygène singulet que la fraction 5 à 30 kDa. En accord avec cela, les extraits aqueux WEOMs qui sont censés contenir des molécules d'assez faibles masses moléculaires sont à la fois fluorescents et photosensibilisateurs. Les HLA et les WEOMs de composts sont faiblement fluorescents et faiblement photosensibilisateurs. Ces propriétés augmentent avec les temps de compostage.

Caractéristiques communes à tous les échantillons.

Les spectres d'émission de fluorescence de tous les échantillons étudiés (HA, HLA, FA, WEOM, MON, fractions SEC-PAGE ou ultrafiltrés) ont en commun les mêmes maxima ou épaulements. Ceci traduit l'existence de fluorophores communs. Ces similitudes ont pu être confirmées dans la majorité des cas par la déconvolution des spectres en composantes de forme gaussienne. Plusieurs composantes apparaissent aux mêmes nombres d'onde. Les intensités de ces composantes varient d'un échantillon à l'autre traduisant des différences de concentrations des fluorophores impliqués.

Relations entre fluorophores et les constituants photosensibilisateurs.

Tous les échantillons humiques étudiés photosensibilisent la photooxygénation de l'alcool furfurylique. L'ordre de réactivité sur la base d'une comparaison à même carbone organique est la suivante :

$$A \approx R_{22,u} \approx B \approx \text{WEOMs sol} < \text{HLA composts matures} < \text{WEOM composts matures} < \text{HA sols} < C+D < \text{UF à l'urée}$$

Si l'on rapporte la capacité photosensibilisatrice des substances humiques exprimée par k^*_{FFA}, la constante de vitesse de premier ordre apparent de photooxygénation de l'alcool

furfurylique, aux intensités d'émission de fluorescence au-delà de 500 nm ou aux composantes de forme gaussiennes (500, 525, 560 et 600 nm) on obtient une bonne corrélation (R^2 =0,96, n=59). Cela n'est en revanche pas observé si l'on considère l'émission de fluorescence à plus courte longueur d'onde (en dessous de 450 nm).

L'existence de cette corrélation suggère fortement que les mêmes constituants sont responsables de ces deux propriétés. Il faut également noter que la corrélation est assez médiocre lorsque l'on utilise le 2,4,6-triméthylphénol comme capteur d'états excités triplets. Cette molécule est plus hydrophobe que l'alcool furfurylique. Les résultats semblent indiquer que les constituants fluorescents et photosensibilisateurs sont situés dans les zones hydrophiles.

Perspectives.

Si les constituants fluorescents et photosensibilisateurs ne sont pas encore identifiés, ils sont en revanche localisés et nous avons acquis sur eux des renseignements essentiels pour la suite. Afin de compléter ce travail, il serait intéressant de déterminer la nature des composés responsables des composantes gaussiennes communes aux différents échantillons. Il faut noter dès à présent que cette détermination peut être simplifiée car certaines de ces composantes peuvent correspondre à des structures vibrationnelles d'un même composé : le nombre de composés fluorescents rendant compte du spectre observé peut alors être plus restreint que celui attendu.

Références bibliographiques

Aguer, J.-P. et Richard, C., 1996. Transformation of fenuron induced by photochemical excitation of humic acids. Pesticide Science, 46(2): 151-155.

Aiken, G.R, McKnight, D.M., Wershaw, R.L, et MacCarthy, P., 1985. An introduction to humic substances in soil, sediment, and water. Wiley.

Alberts, J.J., et Takács, M., 2004. Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms. Organic Geochemistry, 35(3): 243-256.

Amine-Khodja, A., Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Cavani, L., Ciavatta, C., Guyot, G., et Richard C., 2006. Humic-like substances extracted from composts can promote the photodegradation of Irgarol 1051 in solar light. Chemosphere, 62(6): 1021-1027.

Amine-Khodja A., Richard C., Lavédrine B., Guyot G., Trubetskaya O. et Trubetskoj O., 2006. Water-soluble fractions of composts for the photodegradation of organic pollutants in solar light. Environmental Chemistry Letters, 3(4): 173-177.

Baker, A., Tipping, E., Thacker, S.A. et Gondar, D., 2008. Relating dissolved organic matter fluorescence and functional properties. Chemosphere, 73(11): 1765-1772.

Biémont, E., 1996. La lumière. "Que sais-je ?". Presses Universitaires de France.

Birks, J.B., 1973. Organic Molecular Photophysics. John Wiley & Sons.

Boreen, A.L., Edhlund, B.L., Cotner, J.B. et McNeill, K., 2008. Indirect Photodegradation of Dissolved Free Amino Acids: The Contribution of Singlet Oxygen and the Differential Reactivity of DOM from Various Sources. Environmental Science & Technology, 42(15): 5492-5498.

Boyle, E.S., Guerriero, N., Thiallet, A., Vecchio, R.D. et Blough, N.V., 2009. Optical Properties of Humic Substances and cDOM: Relation to Structure. Environmental Science & Technology, 43(7): 2262-2268.

Braslavski, S.E., Houk, K.N., Verhoeven, J.W., 1996. Glossary of terms used in photochemistry. IUPAC, 2nd edition. Handbook of Organic Photochemistry, Vol. II, J.C. Scaiano, CRC Press Inc.

Canonica, S., Jans, U., Stemmler, K. et Hoigné, J., 2002. Transformation Kinetics of Phenols in Water: Photosensitization by Dissolved Natural Organic Material and Aromatic Ketones. Environmental Science & Technology, 29(7): 1822-1831.

Cavani, L., Ciavatta, C. et Gessa, C., 2003. Identification of organic matter from peat, leonardite and lignite fertilisers using humification parameters and electrofocusing. Bioresource Technology, 86(1): 45-52.

Cavani, L., Halladja, S., ter Halle, A., Guyot, G., Corrado, G., Ciavatta, C., Boulkamh, A., et Richard, C., 2009. Relationship between photosensitizing and emission properties of peat humic acid fractions obtained by tangential ultrafiltration. Environmental Science & Technology, 43(12): 4348-4354.

Cavani, L., Trubetskaya, O., Grigatti, M., Trubetskoj, O. et Ciavatta, C., 2008. Electrofocusing the compost organic matter obtained by coupling SEC-PAGE. Bioresource Technology, 99(10): 4360-4367.

Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A. et Booksh, K., 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. Environ. Sci. Technol., 37: 5701.

Chen, Y., Hu, C., Hu, X., et Qu, J., 2009. Indirect photodegradation of amine drugs in aqueous solution under simulated sunlight. Environmental Science and Technology, 43(8): 2760-2765.

Cheshire, M.V., Cranwell, P.A., et Haworth, R.D., 1968. Humic acid III. Tetrahedron, 24: 5155-5167.

Chin, Y.-P., Aiken, G. et O'Loughlin, E., 1994. Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. Environmental Science & Technology, 28(11): 1853-1858.

Ciavatta, C., Govi, M., Antisari, L.V. et Sequi, P., 1990. Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. Journal of Chromatography A, 509(1): 141-146.

Ciavatta, C., Govi, M., Pasotti, L. et Sequi, P., 1993. Changes in organic matter during stabilization of compost from municipal solid wastes. Bioresource Technology, 43(2): 141-145.

Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. Mar. Chem., 51: 325.

Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V. et Gagosian, R.B., 1990. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. Nature, 348(6300): 432-435.

Cory, R.M. et McKnight, D.M., 2005. Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter. Environmental Science & Technology, 39(21): 8142-8149.

De Nobili, M. et Chen, Y., 1999. Size Exclusion Chromatography of Humic Substances: Limits, Perspectives and Prospectives Soil Science 164(11): 825-833.

Del Vecchio, R. et Blough, N.V., 2004. On the Origin of the Optical Properties of Humic Substances. Environmental Science & Technology, 38(14): 3885-3891.

Dulin, D. et Mill, T., 1982. Development and evaluation of sunlight actinometers. Environmental Science and Technology, 16 (11), 815–820.

Engebretson, R. et von Wandruszka, R., R., 1994. Micro-Organization in Dissolved HumicAcids. Environmental Science & Technology, 28(11): 1934-1941.

Faure, J., 1994. Les bases élémentaires de la photochimie, L'Actualité Chimique, "Photochimie 94", supplément au n°7, p7.

Flaig, W., 1960. Chemistry of humus materials. Suomen Kemistilehti B, 33A: 229-251.

Frimmel, F.H., 1994. Photochemical aspects related to humic substances. Environment International, 20(3): 373-385.

Fuchs, W., 1930. Humic acids. Kolloid-Zeitschrift, 52: 248-21 et 350-356 (in german).

Gerecke, A.C., Canonica, S., Muller, S.R., Scharer, M. et Schwarzenbach, R.P., 2001. Quantification of Dissolved Natural Organic Matter (DOM) Mediated Phototransformation of Phenylurea Herbicides in Lakes. Environmental Science & Technology, 35(19): 3915-3923.

Gigliotti, G., Kaiser, K., Guggenberger, G. et Haumaier, L., 2002. Differences in the chemical composition of dissolved organic matter from waste material of different sources. Biology and Fertility of Soils, 36(5): 321-329.

Green, S.A. et Blough, N.V., 1994. Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. Limnology and Oceanography, 39(8): 1903-1916.

Grigatti, M., Ciavatta, C. et Gessa, C., 2004. Evolution of organic matter from sewage sludge and garden trimming during composting. Bioresource Technology, 91(2): 163-169.

Haag, W.R. et Hoigne, J., 1986. Singlet oxygen in surface waters. 3. Photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters. Environ. Sci. Technol., 20(4): 341-348.

Halladja, S., ter Halle, A., Aguer, J.-P., Boulkamh, A. et Richard, C., 2007. Inhibition of Humic Substances Mediated Photooxygenation of Furfuryl Alcohol by 2,4,6-Trimethylphenol. Evidence for Reactivity of the Phenol with Humic Triplet Excited States. Environmental Science & Technology, 41(17): 6066-6073.

Harvey, G.R., Boran, D.A., Chesal, L.A. et Tokar, J.M., 1983. The structure of marine fulvic and humic acids. Marine Chemistry, 12(2-3): 119-132.

Hollas, J.M., 1998. Spectroscopie. Dunod.

http://ihss.gatech.edu/ihss2/soilhafa.html

http://www.obs.univ-bpclermont.fr

Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M., et Parlanti, E., 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. Organic Geochemistry, 40(6): 706-719.

Kalbitz, K., Geyer, W., et Geyer, S., 1999. Spectroscopic properties of dissolved humic substances - A reflection of land use history in a fen area. Biogeochemistry, 47: 219-238.

Iglesias Jimenez, E. et Perez Garcia, V., 1992. Determination of maturity indices for city refuse composts. Agriculture, Ecosystems & Environment, 38(4): 331-343.

Kelleher, B.P. et Simpson, A.J., 2006. Humic Substances in Soils: Are They Really Chemically Distinct? Environmental Science & Technology, 40(15): 4605-4611.

Lam, M.W., Tantuco, K. et Mabury, S.A., 2003. PhotoFate: A New Approach in Accounting for the Contribution of Indirect Photolysis of Pesticides and Pharmaceuticals in Surface Waters. Environmental Science & Technology, 37(5): 899-907.

Latch, D.E. et McNeill, K., 2006. Microheterogeneity of Singlet Oxygen Distributions in Irradiated Humic Acid Solutions. Science, 311(5768): 1743-1747.

Leenheer, J.A., Wershaw, R.L., et Reddy, M.M., 1995. Strong-Acid, Carboxyl-Group Structures in Fulvic Acid from the Suwannee River, Georgia. 2. Major Structures. Environmental Science & Technology, 29(2): 399-405.

Leenheer, J.A., 2007. Progression from model structures to molecular structures of natural organic matter components. Annals of Environmental Science, 1: 57-68.

Levesque, M., 1972. Fluorescence and gel filtration of humic compounds. Soil Science, 11: 346-353.

Liu, Q., Cumming, R. I., et Sharpe, A. D., 2009. Photo-induced environmental depletion processes of β-blockers in river waters. Photochemical and Photobiological Sciences, 8(6): 768-777.

Maillard, L.C., 1916. Synthèse de matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. Annales de chimie physique, 5(258-317).

Marhuenda-Egea, F.C., Martinez-Sabater, E., Jorda, J., Moral, R., Bustamente, M.A., Paredes, C., et Pérez-Murcia, M.D., 2007. Dissolved organic matter fractions formed during composting of winery and distillery residues: Evaluation of the process by fluorescence excitation-emission matrix. Chemosphere, 68(2): 301-309.

Mason, T.J., Lorimer, J.P., Bates, D.M. et Zhao, Y., 1994. Dosimetry in sonochemistry: the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. Ultrasonics Sonochemistry, 1(2): S91-S95.

Maurette, M.T., 2007. La lumière pour la protection de l'environnement. L'Actualité Chimique, "La photochimie pour mieux vivre", 2007, n°308-309, p61.

McIntyre, C., Barry D, B. et Daniel R, J., 1997. Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids. Journal of Mass Spectrometry, 32(3): 328-330.

Mc Quarrie D.A., Simon, J.D., 2000. Chimie physique - Approche moléculaire. Dunod.

McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., et Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity Limnol. Oceanogr., 46(1): 38-49.

Miano, T., Sposito, G., et Martin, J.P., 1990. Fluorescence spectroscopy of model humic acid-type polymers. Geoderma, 47: 349-359.

Milori, D., Martin-Neto, L., Bayer, C., Mielniczuk, J., et Vagnato, V., 2002. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. Soil Science, 167: 739-749.

Mobed, J.J., Hemmingsen, S.L., Autry, J.L. et McGown, L.B., 1996. Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total Luminescence Spectra with Absorbance Correction. Environmental Science & Technology, 30(10): 3061-3065.

Morán Vieyra, F.E., Palazzi, V.I., Sanchez de Pinto, M.I. et Borsarelli, C.D., Combined UV-Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes. Geoderma, In Press, Corrected Proof.

Ohno, T., 2002. Fluorescence Inner-Filtering Correction for Determining the Humification Index of Dissolved Organic Matter. Environmental Science & Technology, 36(4): 742-746.

Oliveros, E. et Viriot, M.L., 1994. Photochimie préparative industrielle. L'Actualité Chimique, "Photochimie 94", supplément au n°7, p34-42

Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L. et 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.

Perminova, I.V., 1999. Size Exclusion Chromatography of Humic Substances: Complexities of Data Interpretation Attributable To Non-Size Exclusion Effects Soil Science 164(11): 834-840.

Peuravuori, J. et Pihlaja, K., 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. Anal. Chim. Acta, 337: 133.

Pfeiffer, E.E., 1984. Chromatography Applied to Quality Testing.

Piccolo, A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. Soil science, 166(11): 810-832.

Provenzano, M.R., de Oliveira, S.C., Santiago Silva, M.R. et Senesi, N., 2001. Assessment of maturity degree of composts from domestic solid wastes by fluorescence and Fourier transform infrared spectroscopies. J. Agric. Food Chem., 49(12): 5874-5879.

Quagliotto, P., Montoneri, E., Tambone, F., Adani, F., Goberto, R. et Viscardi, G., 2006. Chemicals from Wastes: Compost-Derived Humic Acid-like Matter as Surfactant. Environ. Sci. Technol., 40(5): 1686-1692.

Reemtsma T., Bredow, A. et Gehrng, M., 1999. The nature and kinetics of organic matter release from soil by salt solutions. European Journal of Soil Science, 50(1): 53-64.

Reemtsma, T. et These, A., 2005. Comparative Investigation of Low-Molecular-Weight Fulvic Acids of Different Origin by SEC-Q-TOF-MS: New Insights into Structure and Formation. Environmental Science & Technology, 39(10): 3507-3512.

Rennert, T., Gockel, K.F., et Mansfeldt, T., 2007. Extraction of water-soluble organic matter from mineral horizons of forest soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 170(4): 514-521.

Richard, C., Vialaton, D., Aguer, J.-P. et Andreux, F., 1997. Transformation of monuron photosensitized by soil extracted humic substances: energy or hydrogen transfer mechanism? Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 111(1-3): 265-271.

Richard, C., Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Reznikova, O., Afanas'eva, G., Aguer, J.P. et Guyot, G., 2004. Key Role of the Low Molecular Size Fraction of Soil Humic Acids for Fluorescence and Photoinductive Activity. Environmental Science & Technology, 38(7): 2052-2057.

Richard, C. et Canonica, S., 2005. Aquatic Phototransformation of Organic Contaminants Induced by Coloured Dissolved Natural Organic Matter, Environmental Photochemistry Part II, pp. 299-323.

Richard, C., ter.Halle, A., Sarakha M., Mazelier P. et Chovelon J.M., 2007a. La lumière à l'assaut des polluants. L'Actualité Chimique, "La photochimie pour mieux vivre", 2007, n°308-309, p71-75.

Richard, C., Guyot, G., Rivaton, A., Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Cavani, L. et Ciavatta, C., 2007b. Spectroscopic approach for elucidation of structural peculiarities of Andisol soil humic acid fractionated by SEC-PAGE setup. Geoderma, 142(1-2): 210-216.

Rodgers, M.A.J., 1983. Solvent-induced deactivation of singlet oxygen: additivity relationships in nonaromatic solvents. Journal of the American Chemical Society, 105(20): 6201-6205.

Rouessac, F. et Rouessac, A., 1997. Analyse Chimique - Méthode et techniques instrumentales modernes. Masson.

Said-Pullicino, D., Erriquens, F.G. et Gigliotti, G., 2007a. Changes in the chemical characteristics of water-extractable organic matter during composting and their influence on compost stability and maturity. Bioresource Technology, 98(9): 1822-1831.

Said-Pullicino, D., Kaiser, K., Guggenberger, G. et Gigliotti, G., 2007b. Changes in the chemical composition of water-extractable organic matter during composting: Distribution between stable and labile organic matter pools. Chemosphere, 66(11): 2166-2176.

Schaumann, G.E., 2000. Effect of CaCl2 on the kinetics of dissolved organic matter release from a sandy soil. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 163(5): 523-529.

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.

Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R. et Brunetti, G., 1991. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. Soil Sci, 4: 259.

Senesi, N., Plaza, C., Brunetti, G. et Polo, A., 2007. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. Soil Biology and Biochemistry, 39(6): 1244-1262.

Simpson, A., Kingery, W., Hayes, M., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Goejohann, et M., Hofmann, M., 2002. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. Naturwissenschaften, 89(2): 84-88.

Simpson, A.J., 2002. Determining the molecular weight, aggragation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. Magnetic Resonace in Chemistry, 40(13): S72-S82.

Spaccini, R. et Piccolo, A., 2007. Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity. 1. Chemical fractionation and infrared spectroscopy. J. Agric. Food Chem., 55(6): 2293-2302.

Stevenson, F.J., 1994. Humus Chemistry : Genesis, Composition, Reactions, 2nd ed John Wiley &sons, Ltd.
Stumn, W., 1990. Aquatic Chemical Kinetics : Reactions Rates of Processes in Natural Waters.

Sulzberger, B., Canonica, S., Egli, T., Giger, W., Klausen, J., et Gunten, V.U., 1997. Oxidative Transformations of Contaminants in Natural and in Technical Systems. CHIMIA International Journal for Chemistry, 51: 900-907.

Tan, K.H., 2003. Humic Matter in Soil and the Environment. Principles and Controversies. Marcel Dekker. New York.

ter Halle, A. et Richard, C., 2006. Simulated Solar Light Irradiation of Mesotrione in Natural Waters. Environmental Science & Technology, 40(12): 3842-3847.

Thurman, E.M., Wershaw, R.L., Malcolm, R.L. et Pinckney, D.J., 1982. Molecular size of aquatic humic substances. Organic Geochemistry, 4(1): 27-35.

Tran-Thi T.H. et Amouyal, E., 2007. La photochimie face aux défis du XXIe siècle, L'Actualité Chimique, "La photochimie pour mieux vivre", 2007, n°308-309, p5

Trubetskaya, O., Trubetskoj, O., Guyot, G., Andreux, F. et Richard, C., 2002. Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis. Organic Geochemistry, 33(3): 213-220.

Trubetskoj, O.A., Kudryavceva, L.Y. et Shirshova, L.T., 1991. Characterization of soil humic matter by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of denaturating agents. Soil Biology and Biochemistry, 23(12): 1179-1181.

Trubetskoj, O.A., Trubetskaya, O.E., Afanas'eva, G.V., Reznikova, O.I. et Saiz-Jimenez, C., 1997. Polyacrylamide gel electrophoresis of soil humic acid fractionated by size-exclusion chromatography and ultrafiltration. Journal of Chromatography A, 767(1-2): 285-292.

Turro, N.J., 1978. Modern Molecular Photochemistry. Benjamin Cummings.

Valeur, B., 2004. Invitation à la fluorescence moléculaire. De Boeck.

Wandruszka, R.v., 1998. The micellar model of humic acid evidence from pyrene fluorescence measurement. Soil Science, 163(12): 921-930.

Weber, G., et Farris, F.J., 1979. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe : 6-propionyl-2(dimethylamino)naphtalene. Biochemistry, 18(14): 3075-3078.

Wershaw, R.L., 1999. Molecular aggregation of humic substances. Soil Science, 164(11): 803-813.

Yamashita, Y. et Tanoue, E., 2003. Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. Marine Chemistry, 82(3-4): 255-271.

Zepp, R.G., Schlotzhauer, P.F. et Sink, R.M., 2002. Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances. Environmental Science & Technology, 19(1): 74-81.

Zhan, M., Yang, X., Yang, H., Kong, L., 2007. Effect of natural aquatic humic substances on the photodegradation of bisphenol A. Frontiers of Environmental Science and Engineering in China, 1(3): 311-315.

Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B. et Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. Chemosphere, 38(1): 45-50.

Zucconi, F., Forte, M., Monac, A., et Beritodi, M., 1981. Biological evaluation of compost maturity. Biocycle, 22: 27-29.

ANNEXES

Les annexes 1 à 17 présentent les spectres UV-visible et les matrices d'excitation et d'émission des échantillons étudiés, normalisés à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.

Les annexes 18 et 19 présentent les concentrations en carbone organique dissous des échantillons étudiés à une A_{300} = 0,100.

Annexe 1 : Fractions par SEC-PAGE d'un acide humique provenant d'un sol chernozem. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **147**

Annexe 2 : Fractions par ultrafiltration à l'urée d'un acide humique provenant d'un sol chernozem. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **148**

Annexe 3 : Fractions par ultrafiltration au phosphate d'un acide humique provenant d'un sol chernozem. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **149**

Annexe 4 : HLA des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **150**

Annexe 5 : HLA des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **151**

Annexe 6 : WEOM des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **152**

Annexe 7 : WEOM des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **153**

Annexe 8 : $WEOM_{1:200}$ des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **154**

Annexe 9 : $WEOM_{1:200}$ des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **155**

Annexe 10 : $WEOM_{Volvic,\ 1:200}$ des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **156**

Annexe 11 : $WEOM_{Volvic,\ 1:200}$ des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. 153 **157**

Annexe 12 : $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,\ 1:200}$ des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **158**

Annexe 13 : $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **159**

Annexe 14 : HA de différents sols. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **160**

Annexe 15 : FA de différents sols. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **162**

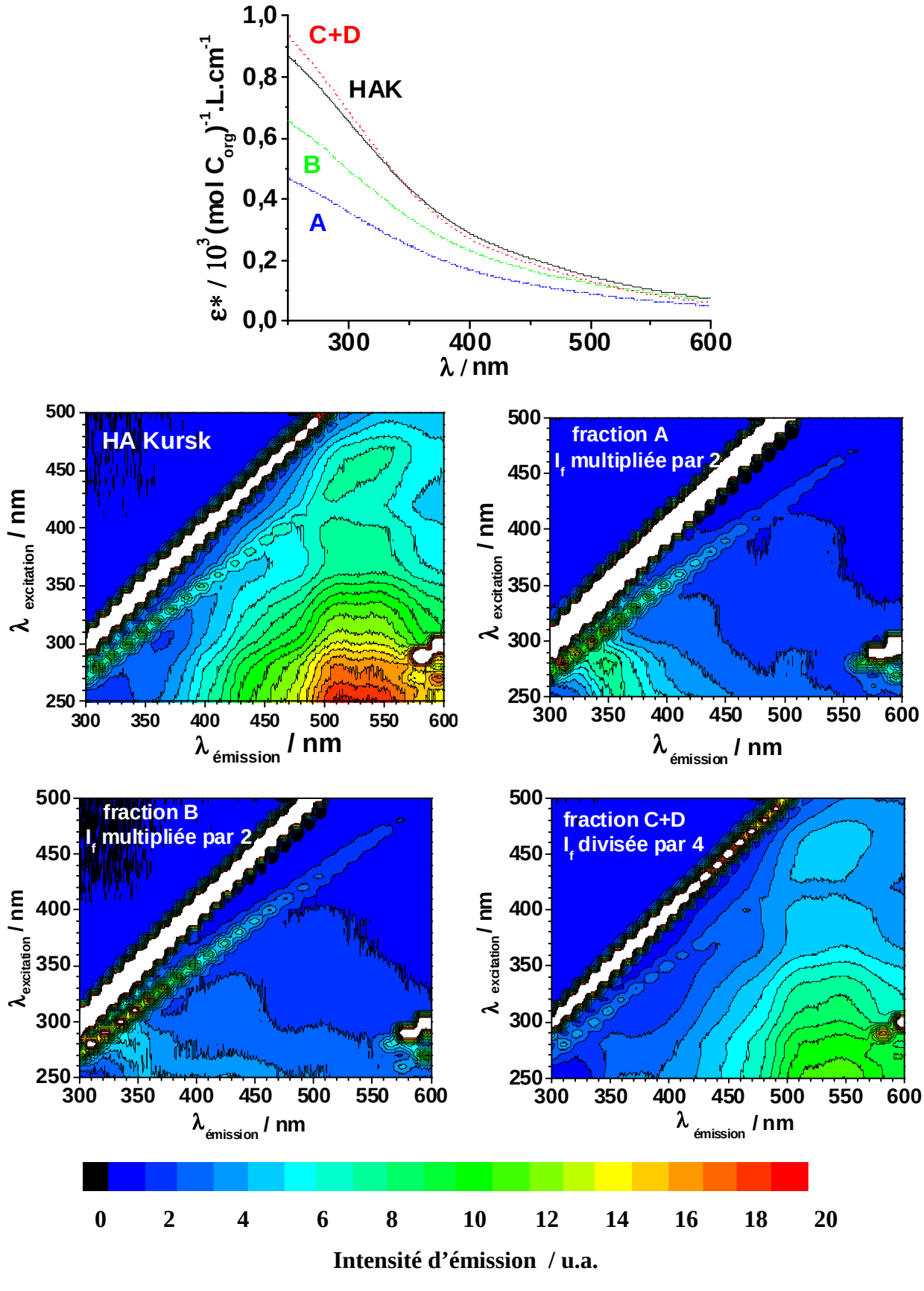
Annexe 16 : WEOM de deux sols différents. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **163**

Annexe 17 : MON de la rivière Suwannee (SR) et du réservoir nordique (NR). Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}. **164**

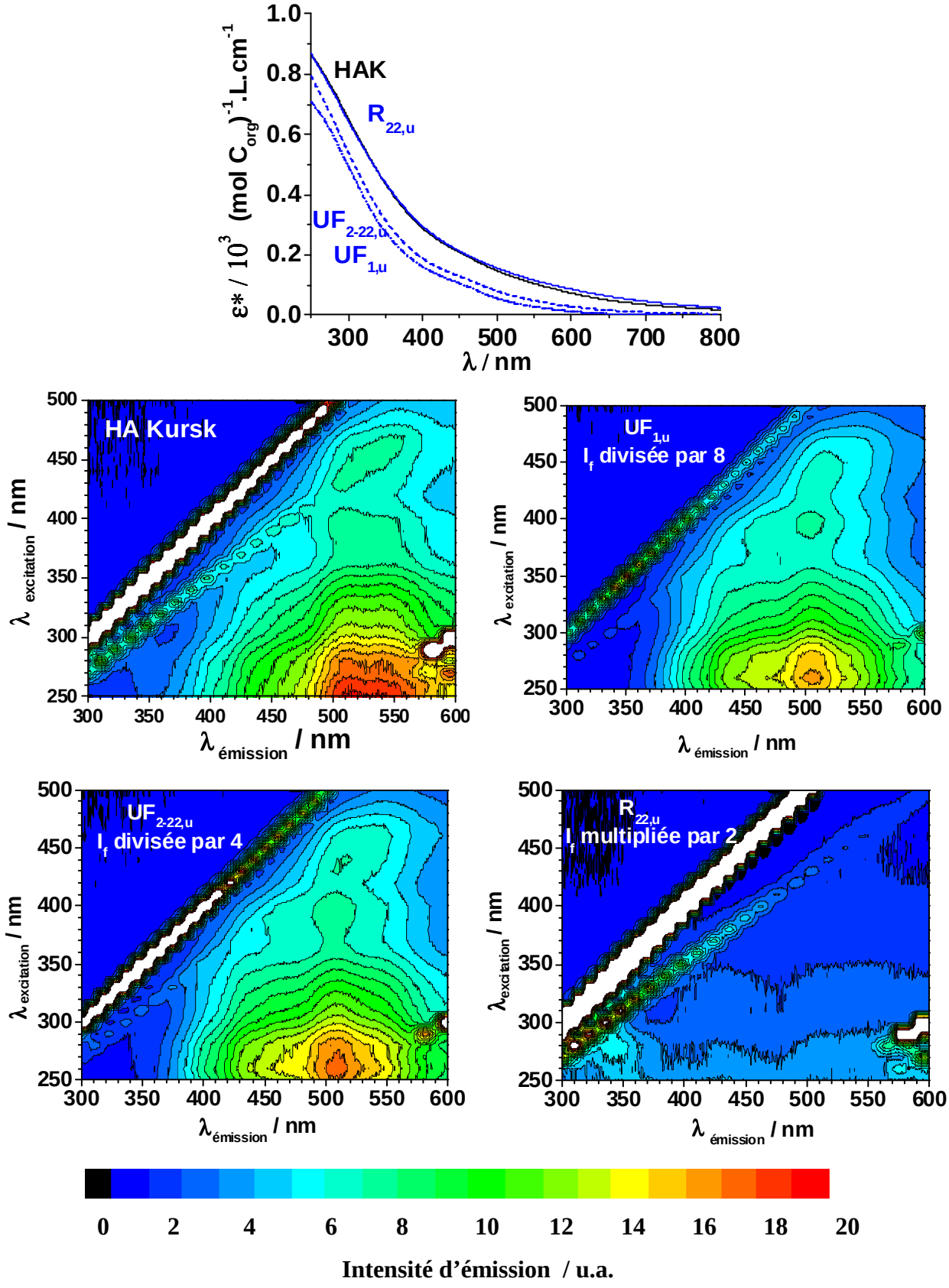
Annexe 18 : % de carbone total (avec eau et cendres), % de carbone organique dissous (% DOC) mesuré dans une solution de concentration variant de 50 à 100 mg.L^{-1}, et concentrations en carbone organique dissous [Corg] calculée dans une solution à A300 = 0,100. Ces dernières valeurs ont été utilisées pour effectuer les normalisations, de 29 matières organiques extraites de sols, de tourbes et de rivières. **165**

Annexe 19 : % de carbone total (ni eau, ni cendres), % de carbone organique dissous (% DOC) mesuré dans une solution de concentration variant de 50 à 100 mg.L^{-1} et concentrations en carbone organique dissous [Corg] mesuré dans une solution à A300 = 0,100. Ces dernières valeurs ont été utilisées pour effectuer les normalisations de 30 matières organiques extraites de compost testées. **166**

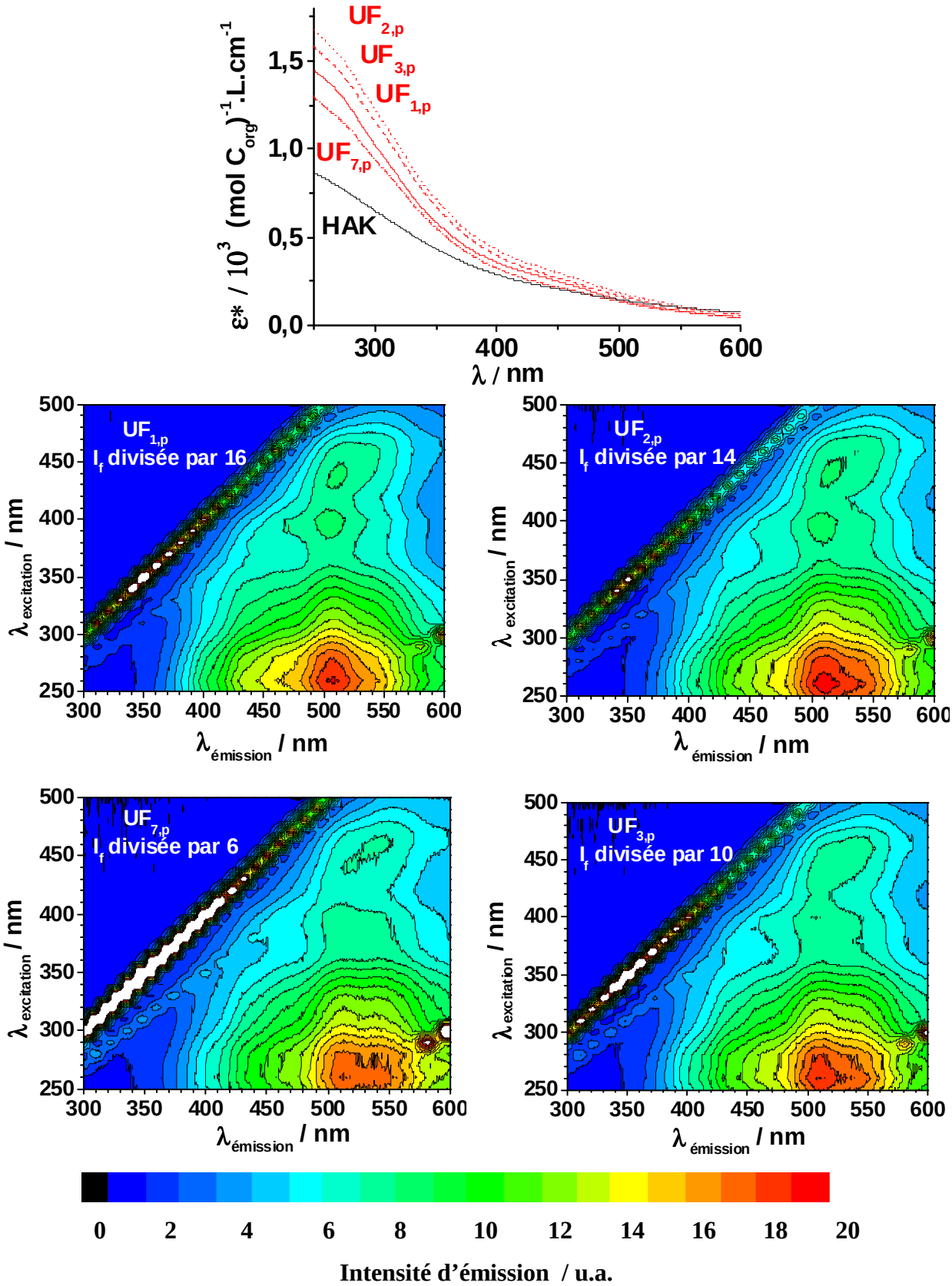
Annexe 1 : Fractions par SEC-PAGE d'un acide humique provenant d'un sol chernozem. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



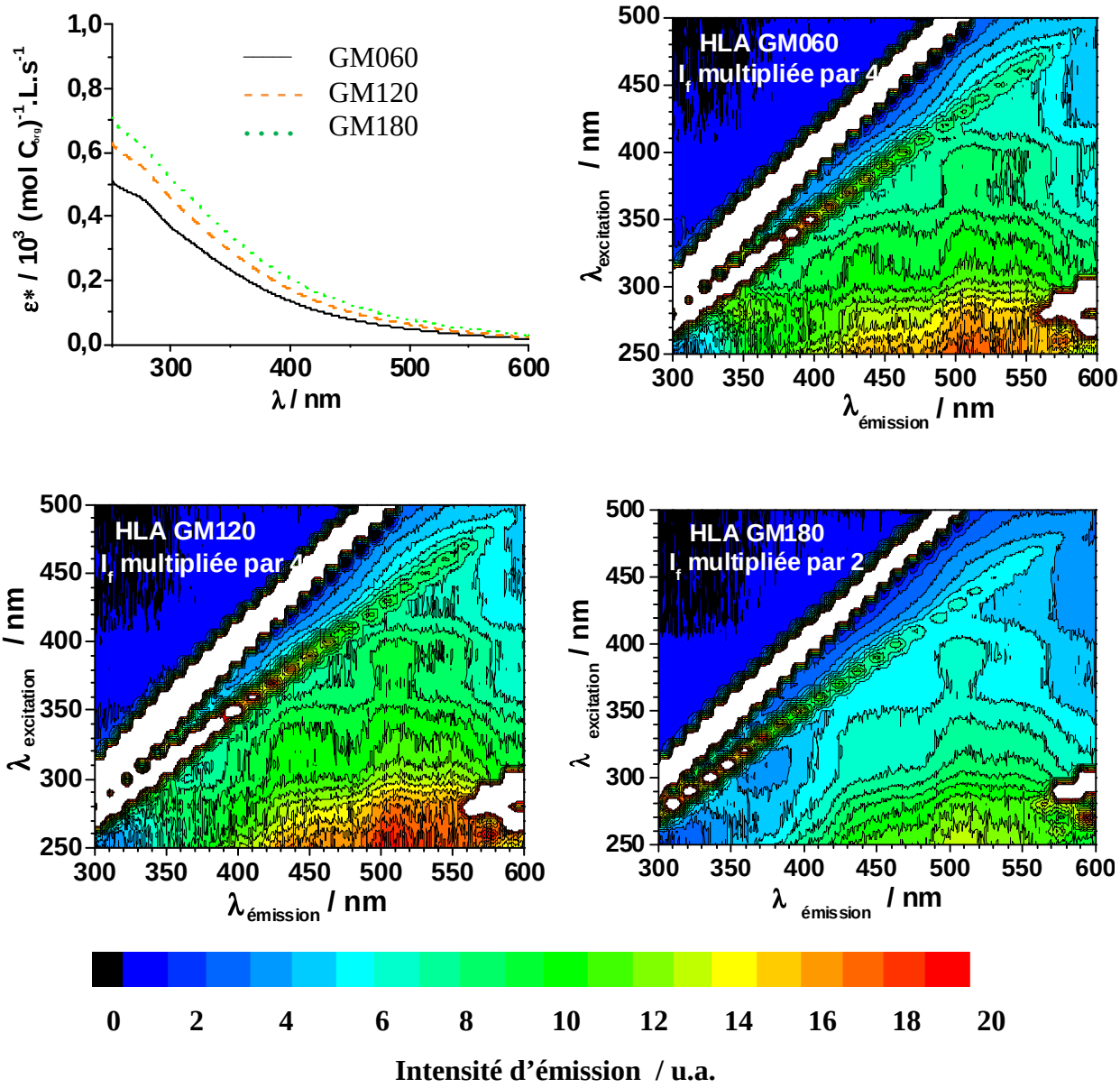
Annexe 2 : Fractions par ultrafiltration à l'urée d'un acide humique provenant d'un sol chernozem. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



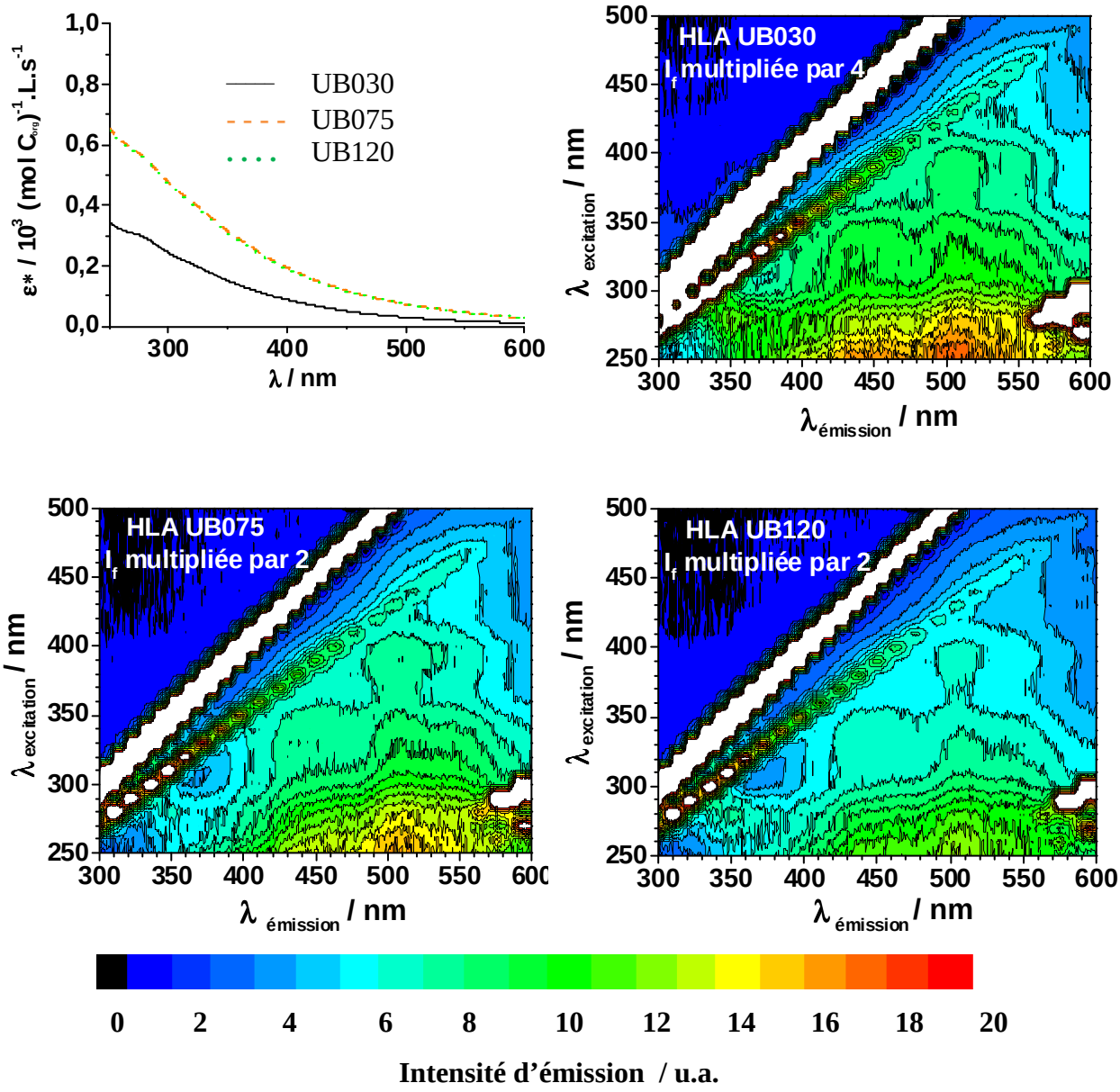
Annexe 3 : Fractions par ultrafiltration au phosphate d'un acide humique provenant d'un sol chernozem. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



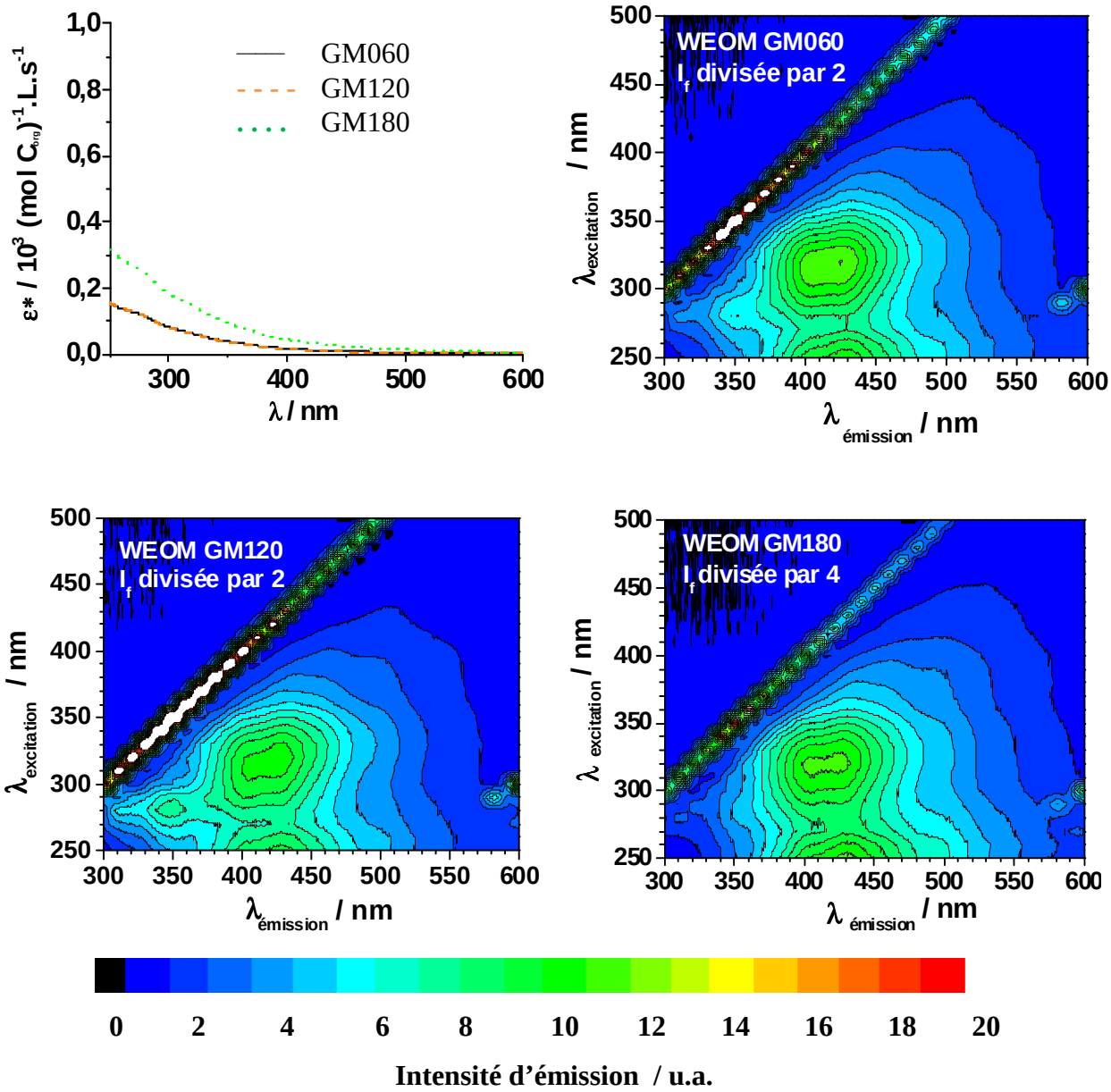
Annexe 4 : HLA des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



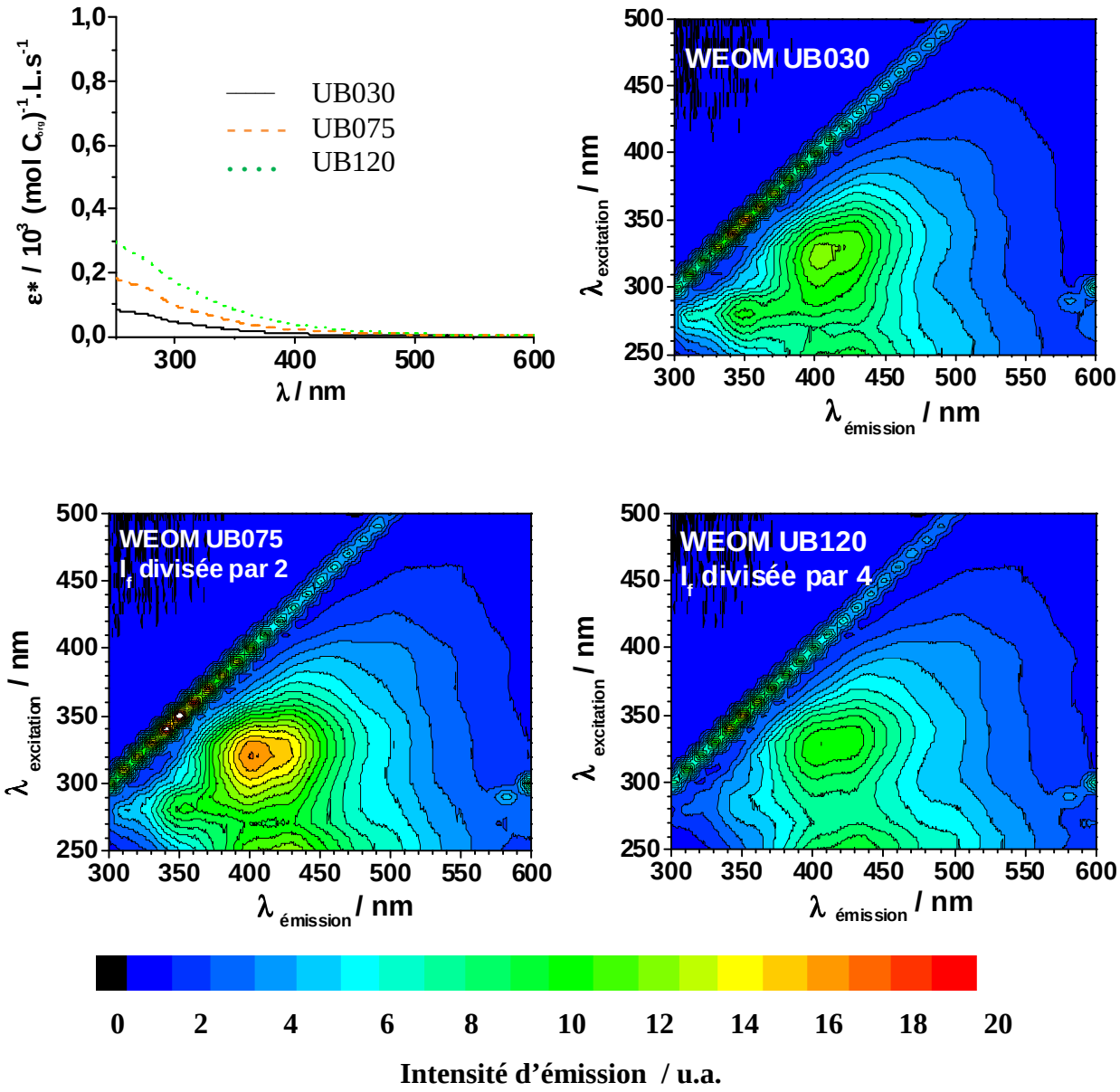
Annexe 5 : HLA des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



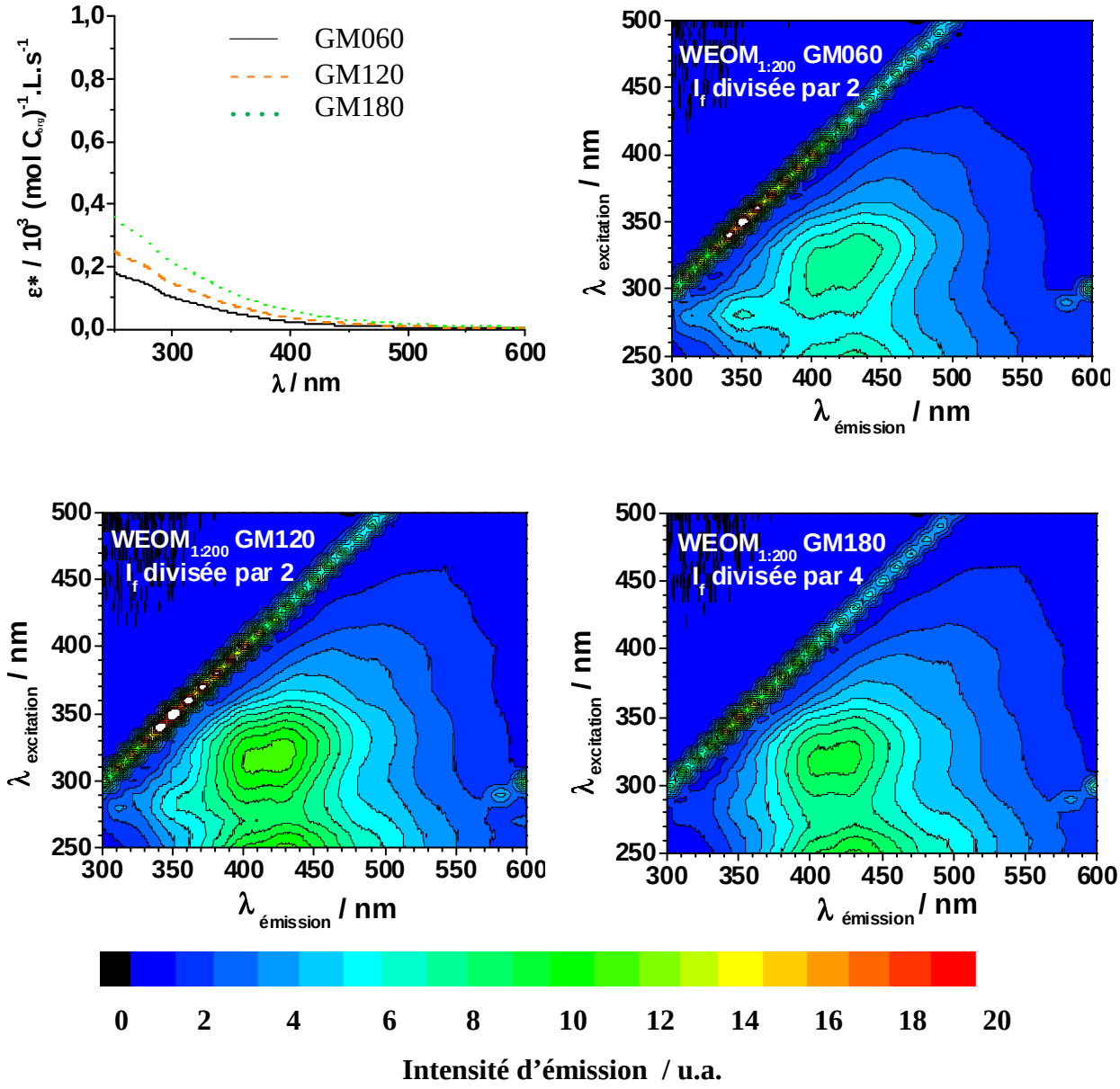
Annexe 6 : WEOM des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



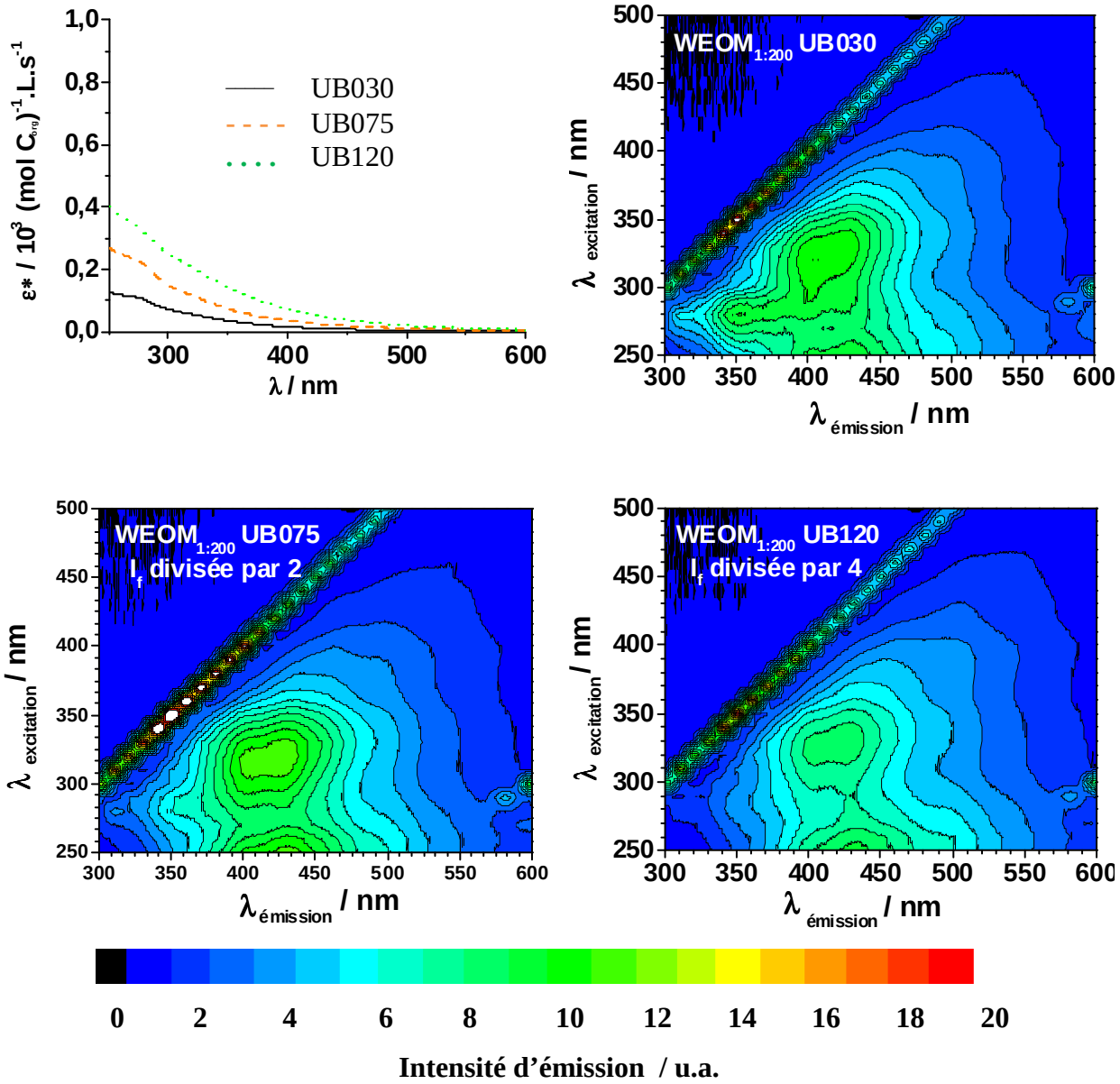
Annexe 7 : WEOM des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



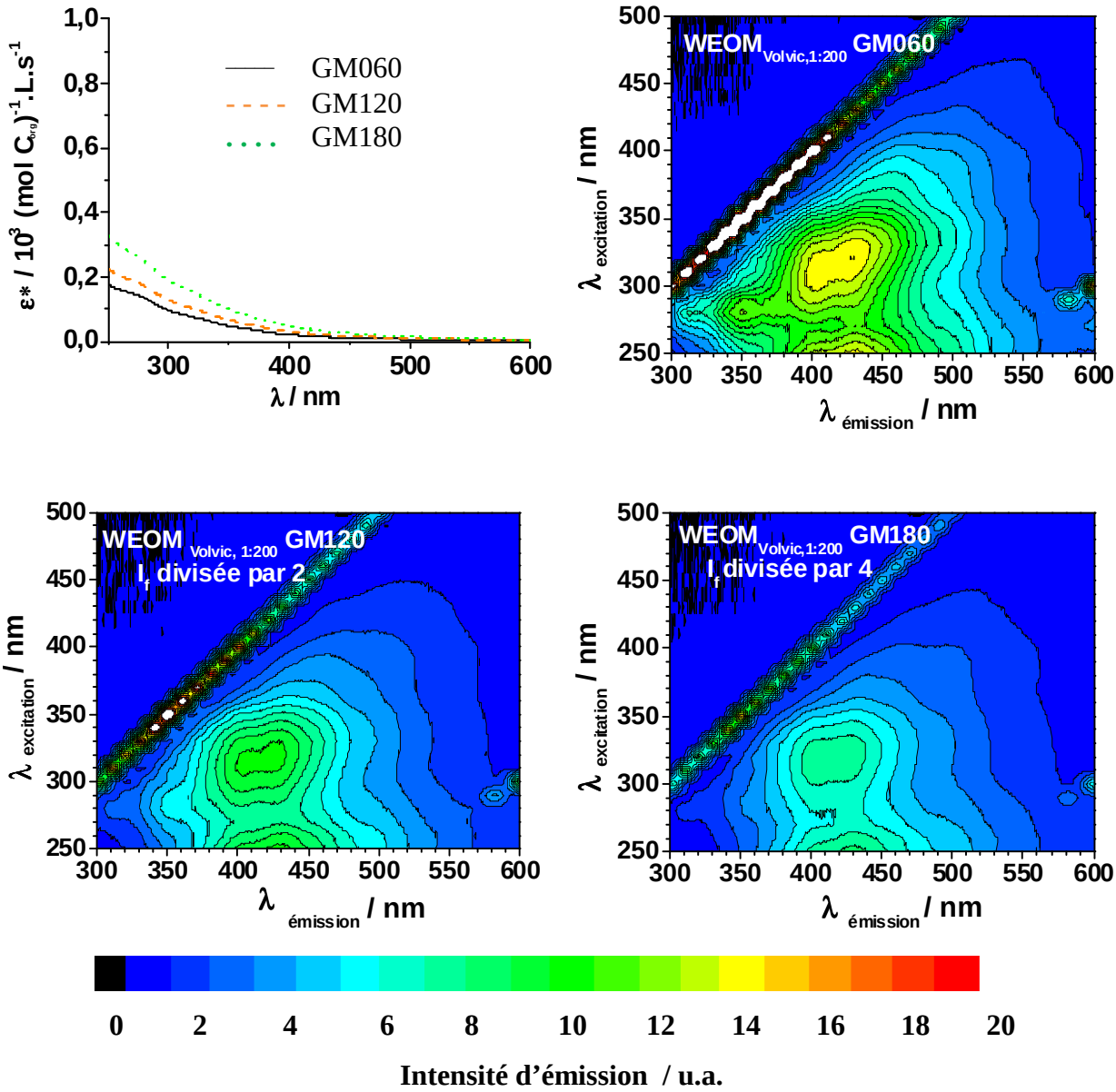
Annexe 8 : $WEOM_{1:200}$ des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 $mol.L^{-1}$.



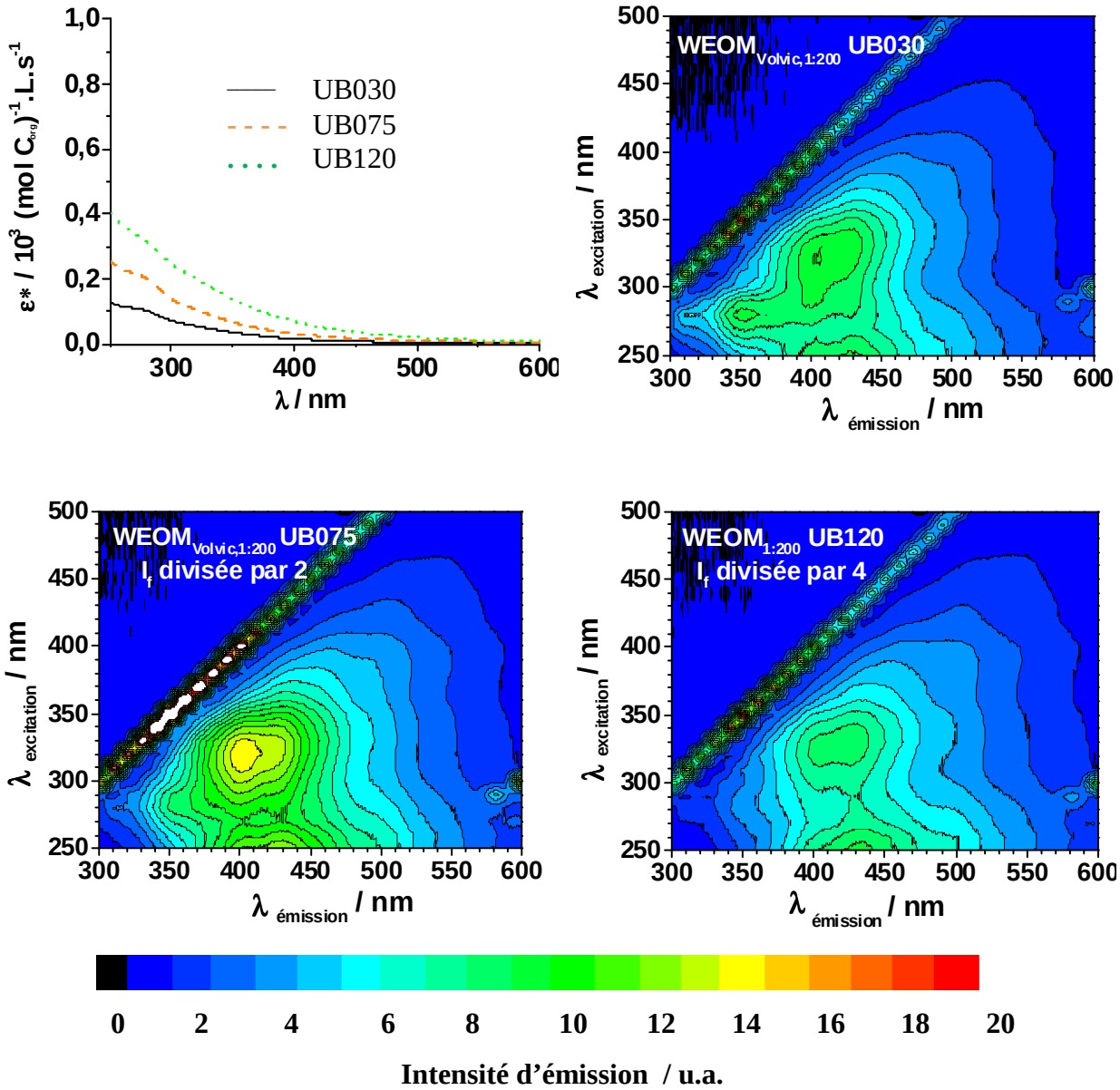
Annexe 9 : $WEOM_{1:200}$ des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 $mol.L^{-1}$.



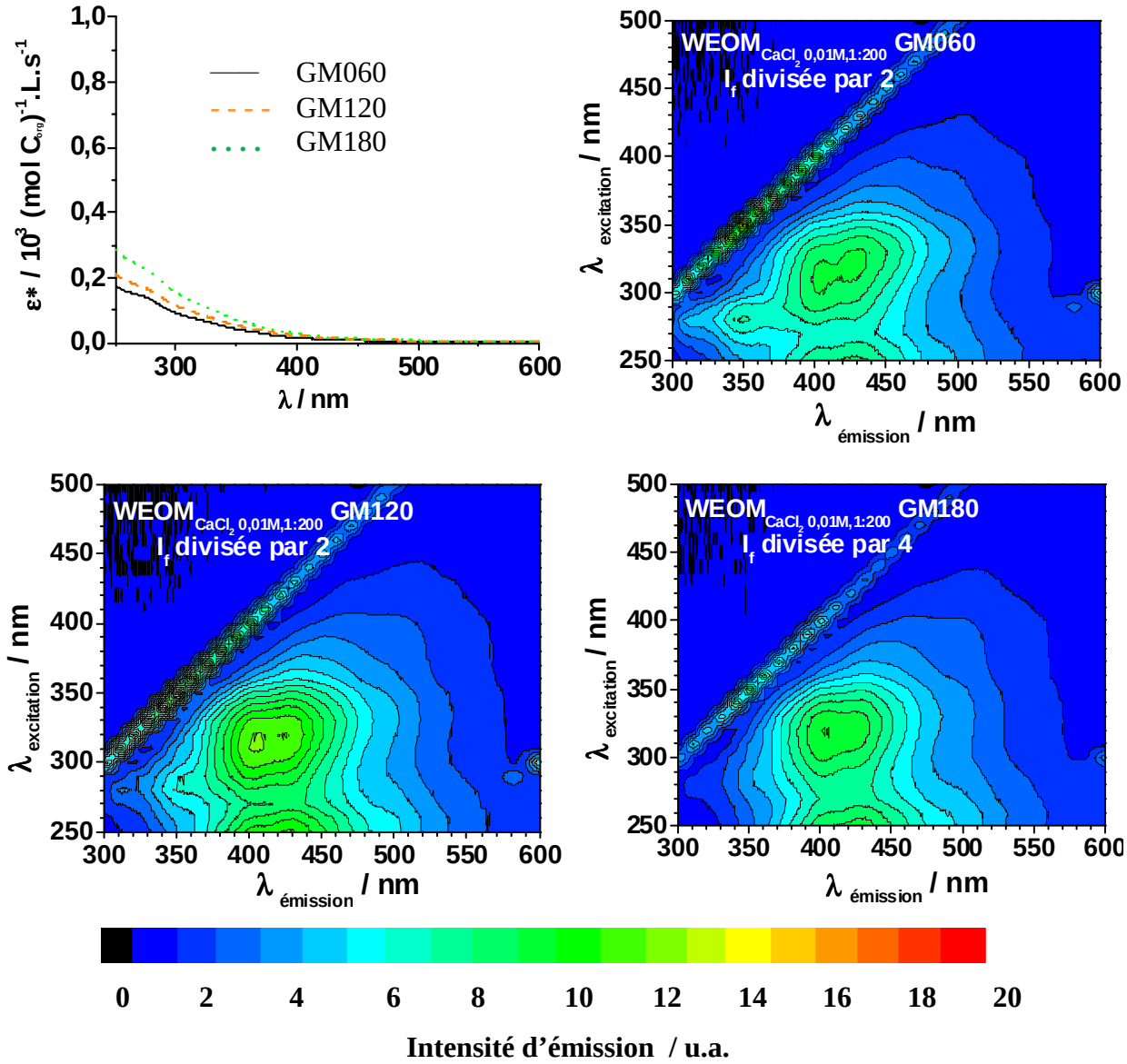
Annexe 10 : $WEOM_{Volvic,\ 1:200}$ des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 $mol.L^{-1}$.



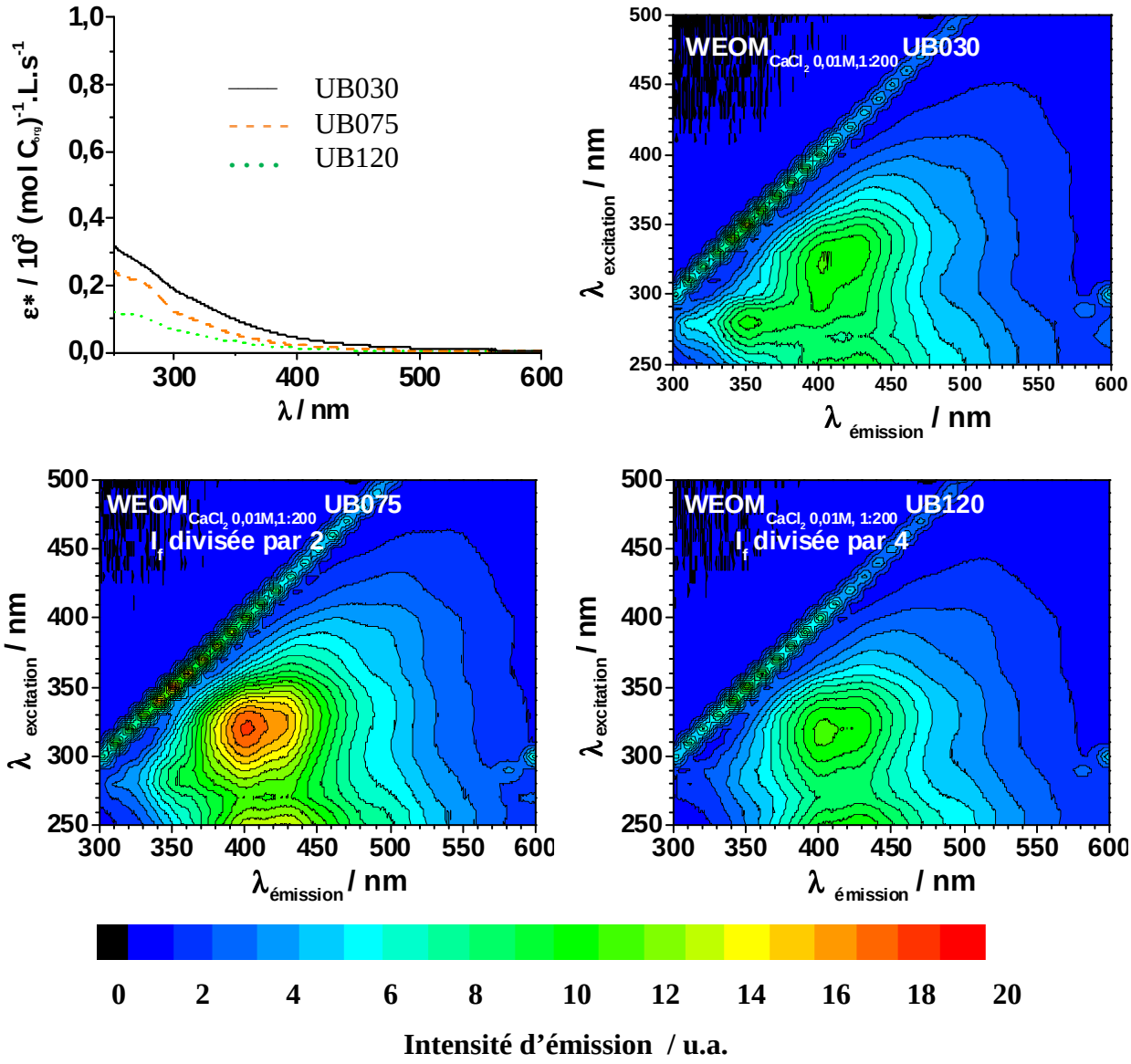
Annexe 11 : $WEOM_{Volvic,\ 1:200}$ des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 $mol.L^{-1}$.



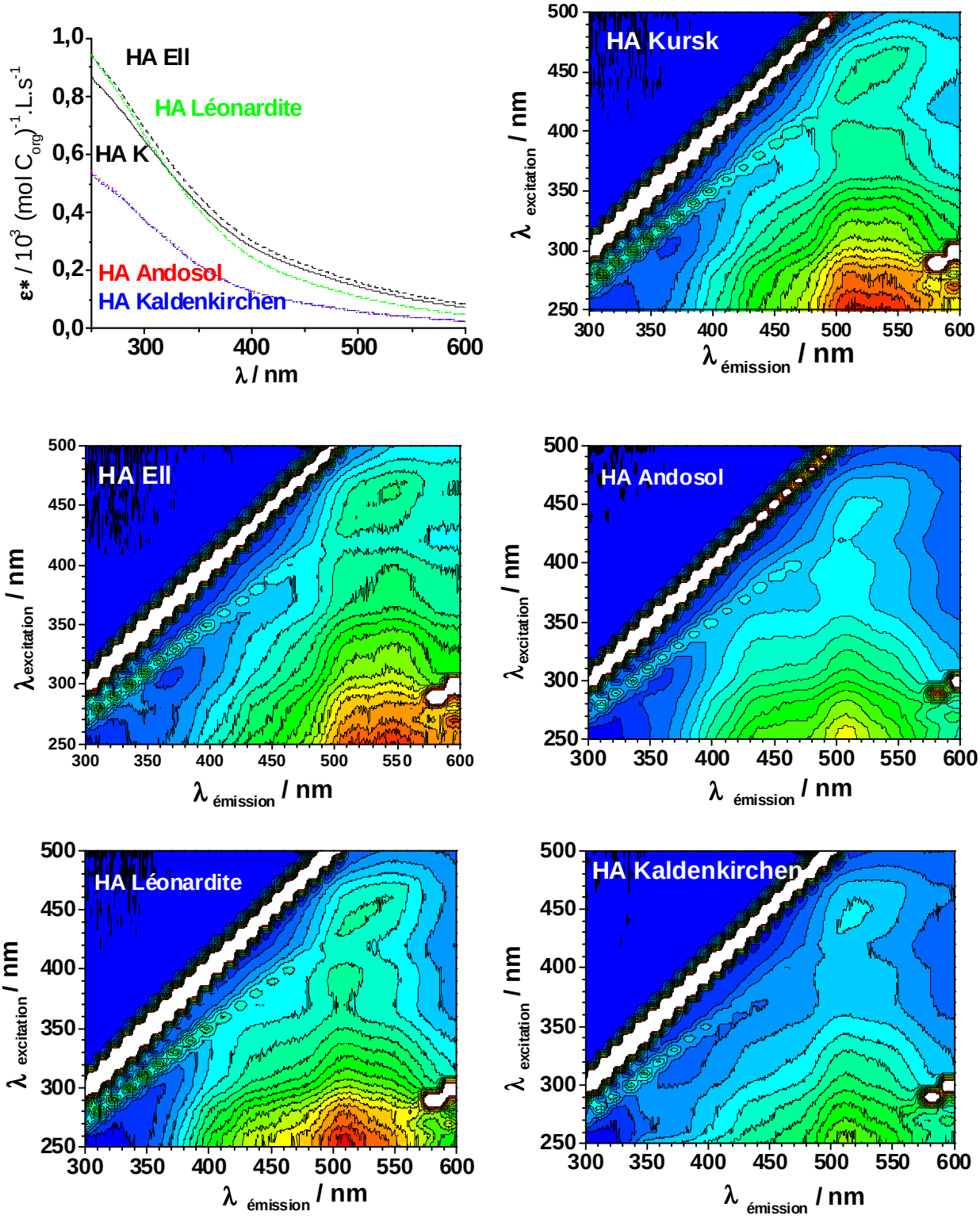
Annexe 12 : $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,\ 1:200}$ des composts GM060, GM120 et GM180. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 $mol.L^{-1}$.



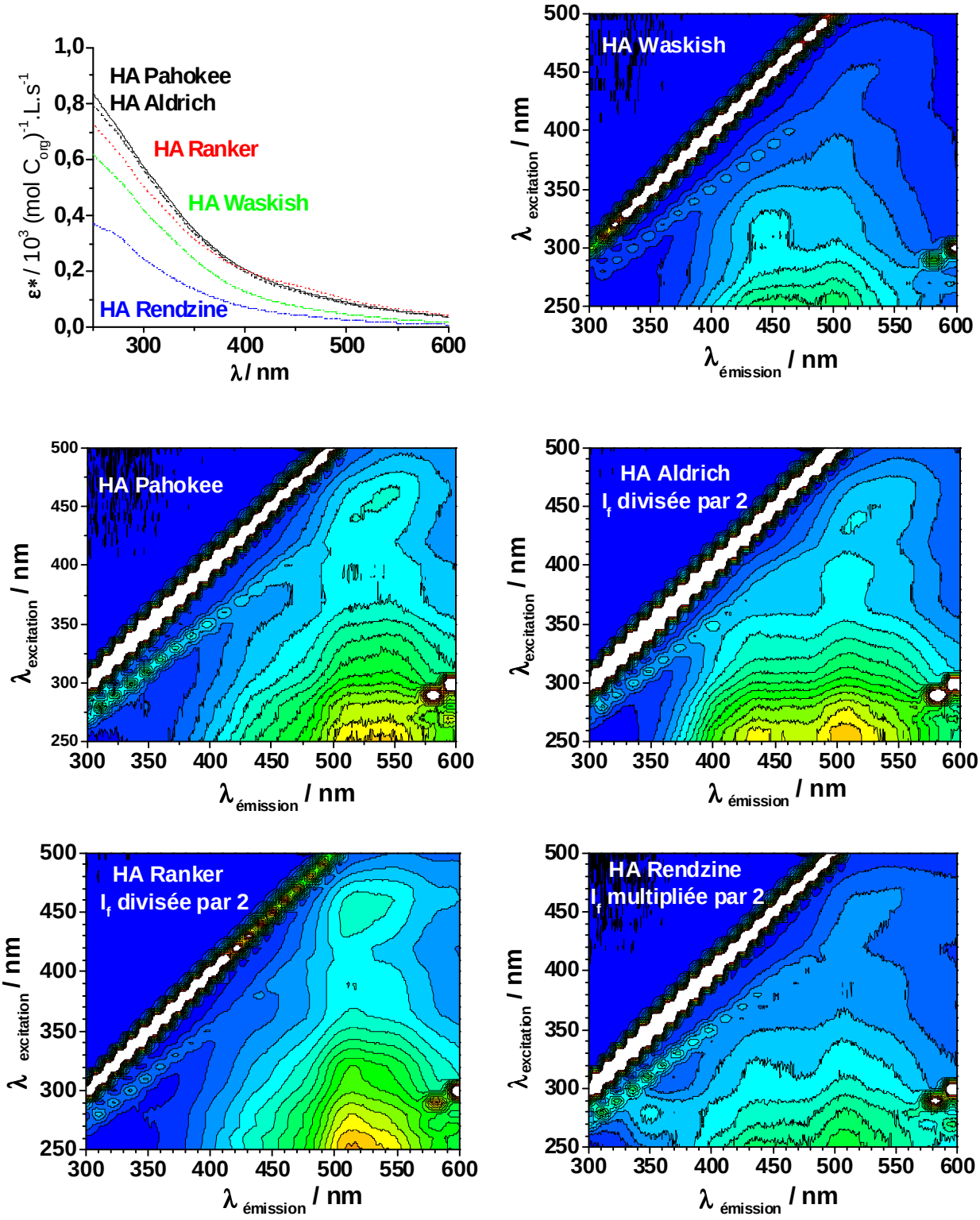
Annexe 13 : $WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ des composts UB030, UB075 et UB120. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 $mol.L^{-1}$.



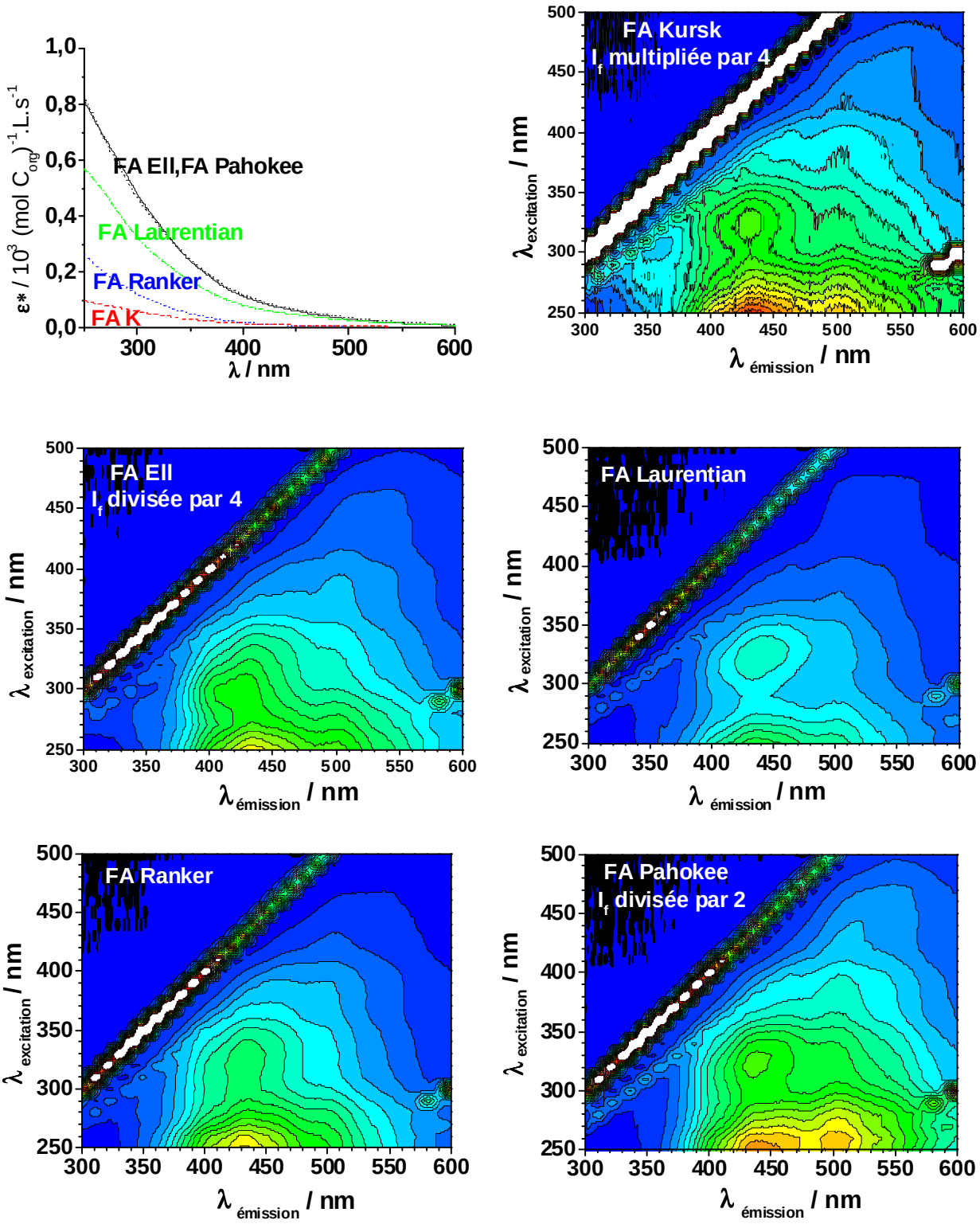
Annexe 14 : HA de différents sols. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



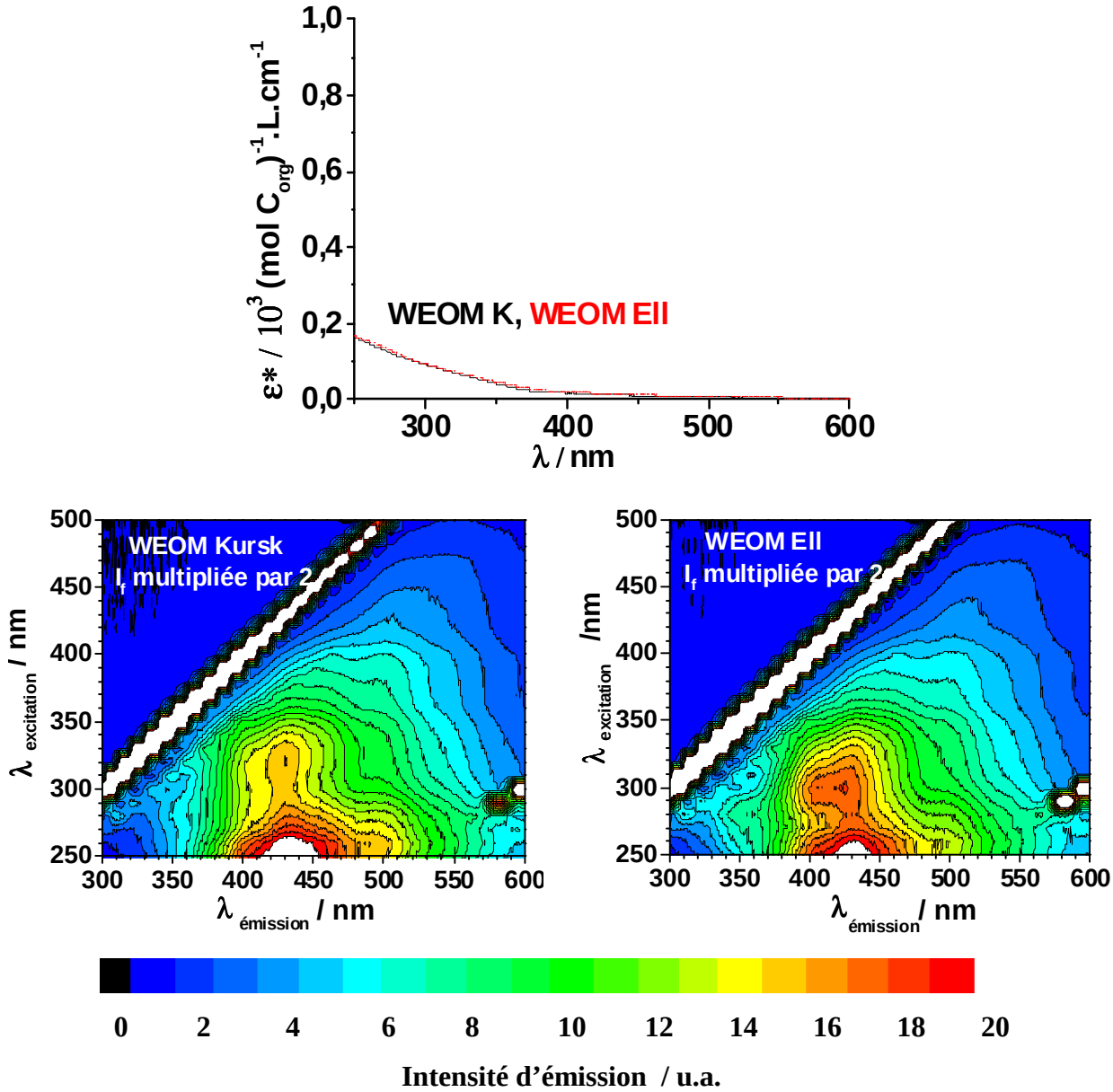
Annexe 14 (suite) : HA de différents sols. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



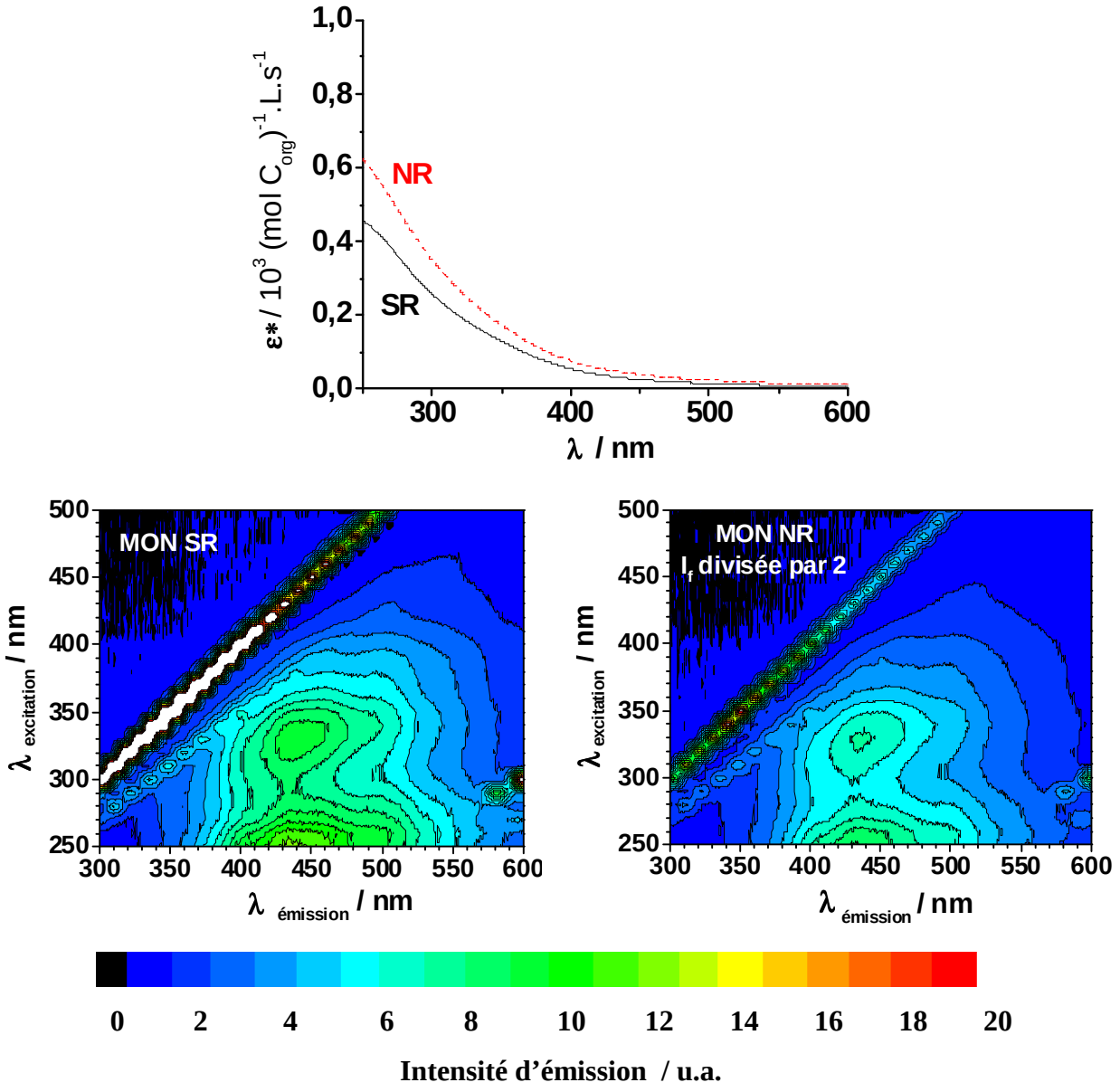
Annexe 15 : FA de différents sols. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



Annexe 16 : WEOM de deux sols différents. Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



Annexe 17 : MON de la rivière Suwannee (SR) et du réservoir nordique (NR). Normalisation à une concentration de carbone organique dissous de 1,00 mol.L^{-1}.



Annexe 18 : % de carbone total (avec eau et cendres), % de carbone organique dissous (% DOC) mesuré dans une solution de concentration variant de 50 à 100 mg.L^{-1}, et concentrations en carbone organique dissous [C_{org}] calculée dans une solution à A_{300} = 0,100. Ces dernières valeurs ont été utilisées pour effectuer les normalisations, de 29 matières organiques extraites de sols, de tourbes et de rivières.

	% C	% DOC	[C_{org}] / 10^{-4} mol.L^{-1}
$UF_{2,p}$	**-**	**-**	**0,82**
$UF_{3,p}$	**-**	**-**	**0,87**
$UF_{1,p}$	**-**	**-**	**0,97**
$UF_{7,p}$	**-**	**-**	**1,06**
HA Elliott	**49,0**	**51,7**	**1,45**
HA Léonardite	**57,4**	**40,4**	**1,48**
$R_{22,u}$	**-**	**53,9**	**1,55**
HA Kursk	**56,2**	**56,3**	**1,55**
HA Pahokee	**49,6**	**47,7**	**1,71**
HA Aldrich	**41,9**	**33,5**	**1,73**
Fraction C+D	**44,1**	**-**	**1,47**
$UF_{2\text{-}22,u}$	**-**	**27,5**	**1,82**
HA Ranker	**46,2**	**32,0**	**1,99**
Fraction B	**43,6**	**-**	**2,02**
FA Elliott	**37,9**	**44,1**	**2,09**
FA Pahokee	**41,1**	**46,2**	**2,15**
$UF_{1,u}$	**31,5**	**22,5**	**2,20**
HA Waskish	**49,8**	**38,7**	**2,33**
HA Andosol	**50,5**	**45,1**	**2,69**
HA Kaldenkirchen	**43,3**	**34,3**	**2,69**
Fraction A	**38,6**	**-**	**2,81**
MON NR	**26,0**	**31,7**	**2,88**
FA Laurentian	**45,1**	**46,5**	**3,11**
MON SR	**44,6**	**43,9**	**3,90**
HA Rendzine	**47,9**	**36,3**	**4,10**
FA Ranker	**40,2**	**45,9**	**8,31**
WEOM Elliott	**31,6**	**27,0**	**10,79**
WEOM Kursk	**20,9**	**11,9**	**10,82**
FA Kursk	**-**	**41,3**	**11,35**

Annexe 19 : % de carbone total (ni eau, ni cendres), % de carbone organique dissous (% DOC) mesuré dans une solution de concentration variant de 50 à 100 $mg.L^{-1}$ et concentrations en carbone organique dissous [C_{org}] mesuré dans une solution à A_{300} = 0,100. Ces dernières valeurs ont été utilisées pour effectuer les normalisations de 30 matières organiques extraites de compost testées.

	% C	% DOC	$[C_{org}] / 10^{-4}$ mol.L^{-1}
HLA GM060	**47,2**	**44,9**	**2,73**
HLA GM120	**45,2**	**48,1**	**2,20**
HLA GM180	**45,3**	**42,8**	**2,14**
WEOM GM060	**34,7**	**29,6**	**12,28**
WEOM GM120	**30,9**	**32,8**	**12,32**
WEOM GM180	**29,2**	**29,7**	**5,43**
$WEOM_{UP,1:200}$ GM060	**-**	**38,3**	**9,94**
$WEOM_{UP,1:200}$ GM120	**-**	**29,8**	**6,90**
$WEOM_{UP,1:200}$ GM180	**-**	**22,9**	**4,71**
$WEOM_{Volvic,1:200}$ GM060	**-**	**18,4**	**10,43**
$WEOM_{Volvic,1:200}$ GM120	**-**	**18,4**	**7,83**
$WEOM_{Volvic,1:200}$ GM180	**-**	**16,4**	**5,31**
$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ GM060	**-**	**4,7**	**11,00**
$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ GM120	**-**	**4,1**	**8,83**
$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ GM180	**-**	**3,6**	**6,52**
HLA UB030	**49,3**	**47,8**	**3,47**
HLA UB075	**45,4**	**43,1**	**2,11**
HLA UB120	**46,1**	**44,0**	**2,13**
WEOM UB030	**33,2**	**28,4**	**22,27**
WEOM UB075	**28,9**	**25,0**	**10,46**
WEOM UB120	**12,2**	**12,4**	**5,92**
$WEOM_{UP,1:200}$ UB030	**-**	**31,7**	**14,04**
$WEOM_{UP,1:200}$ UB075	**-**	**21,1**	**6,82**
$WEOM_{UP,1:200}$ UB120	**-**	**18,6**	**4,01**
$WEOM_{Volvic,1:200}$ UB030	**-**	**28,5**	**14,58**
$WEOM_{Volvic,1:200}$ UB075	**-**	**15,7**	**7,61**
$WEOM_{Volvic,1:200}$ UB120	**-**	**10,0**	**4,19**
$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ UB030	**-**	**10,5**	**15,16**
$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ UB075	**-**	**3,9**	**8,18**
$WEOM_{CaCl2\ 0,01M,1:200}$ UB120	**-**	**2,7**	**5,34**

La matière organique naturelle (MON) est un mélange complexe de molécules provenant de débris végétaux et animaux. Elle a la capacité d'absorber la lumière solaire par des entités chimiques, appelées chromophores, ouvrant ainsi la voie aux études de caractérisation et de photoréactivité basée sur la photochimie.

Nous avons étudié les propriétés spectroscopiques et photochimiques de la matière organique de sol obtenue par ultrafiltration. Cette étude a été étendue à la matière organique de compost, où les matières premières et le procédé sont contrôlés et connus de l'homme. Le but de ce travail a été d'établir une relation existant entre ces deux propriétés et de tenter d'identifier des structures chimiques responsables de la photoréactivité de la matière organique.

Une première étape a consisté à localiser les chromophores émissifs de la MON, également appelés fluorophores, et a conduit à classifier les fluorophores par leurs longueurs d'onde d'émission et en fonction de la taille des fractions impliquées.

Dans une deuxième étape, par des tests de réactivité photochimique entre des molécules sondes et la matière organique naturelle, il a été montré que les espèces réactives oxygénées (ROS) étaient produites sous irradiation et intervenaient dans la photodégradation de pesticides volontairement introduits en solution aqueuse.

Notre attention s'est orientée vers l'oxygène singulet très réactif vis-à-vis de l'alcool furfurylique, utilisé comme sonde. Il a été trouvé que, dans nos conditions d'irradiation, les émissions des fluorophores aux grandes longueurs d'onde se corrélaient positivement et linéairement aux constantes de disparition de l'alcool furfurylique ($R^2 = 0,96$, $n = 59$).

Pour la première fois, une tentative de corrélation entre réactivité et structure de la matière organique d'origine variée a été envisagée et a conduit à un caractère prédictif relativement fiable.

Pour tenter de préciser la nature exacte des fluorophores, le signal brut d'émission de fluorescence de la matière organique a été déconvolué en composantes gaussiennes afin d'en caractériser les structures vibrationnelles des différentes émissions observées. Les résultats obtenus ont été confrontés aux hypothèses proposées dans la littérature.

Mots clefs : Matières organiques naturelles - Pesticides – Photoréactivité – Fluorescence

Natural organic matter (NOM) is a complex mixture of molecules formed from decomposition of the dead organic matter of animals and plants. A fraction, refered to as humic substances, absorb solar light and exhibits photosensitizing properties. The objective of this thesis was to investigate the photodegrading properties of a variety of humic substances. In particular, we tried to find correlations between these properties and spectral characteristics (absorbance, fluorescence). The goal was to identify the absorbing entities responsible for the photosensitizing properties.

Many samples were studied: humic acids extracted from soils, fractions of these humic acids obtained by ultrafiltration, water extracts of soils, humic-like acids extracted from compost, water extracts of compost. For all, spectral and photosensitizing properties were investigated simultaneously. Two molecular probes, 2,4,6-trimethylphenol and furfuryl alcohol were used. The former is oxidized by humic triplet excited states through electron transfer and the latter is photooxygenated by singlet oxygen produced by electron transfer between humic triplet excited states and ground state oxygen. Active ingredients of phytosanitary formations were tested too.

The following important results were obtained. The components that are fluorescent above 500 nm are located in the macromolecules of molecular weight lower than 30 kDa. The emission band is large and can be splitted in two. The one, with an emission maximum at 515 nm, corresponds to the fraction of molecular weight less than 3 kDa; the other, with an emission maximum at 545 nm, corresponds to the fraction of molecular weight higher than 3 kDa. The production of singlet oxygen is positively correlated with the intensity of emission between 500 and 550 nm. This correlation was obtained for many samples and for very different samples. This means that photosensitizing components are fluorescents at long wavelength. This results is an important step in the understanding of the photochemical behaviour of humic substances and should be of help for the characterization of photosensitizing chromophores.

Key-words : Natural organic matter - Pesticides – Photosensitizing – Fluorescence