



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie
et des Industries Alimentaires

CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Centre de Pédologie Biologique

THÈSE

présentée à
l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'INPL

en Biotechnologies et Industries Alimentaires

par

Moulay Abdeslam SAMRAKANDI



**ROLE DES NITRITES DANS L'OXYDATION DES POLYPHENOLS
ET LA FORMATION DE POLYCONDENSATS DE TYPE HUMIQUE**

Soutenue publiquement le 1er décembre 1992
devant la Commission d'Examen :

MM. A. HERBILLON, Professeur à l'Université de Nancy I
F. ANDREUX, Directeur de Recherche au C.N.R.S.
J.M. BOLLAG, Professeur à l'Université de Pennsylvanie (USA)
J.P. BOUDOT, Chargé de Recherche au C.N.R.S.

Président
Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Examineur
Examineur



D 136 008291 4

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

I.- L'ION NITRITE DANS LE SOL	3
II.- RÉACTIVITÉ DE L'ION NITRITE DANS LE SOL	4
III.- PRODUITS AZOTÉS ISSUS DES RÉACTIONS DE L'ION NITRE DANS LE SOL	5
IV.- L'INTERACTION DE L'ION NITRITE AVEC LA MATIÈRE ORGANIQUE DU SOL	6
V.- BUT DE L'ÉTUDE	8

PREMIÈRE PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.- MATERIEL ET METHODES	11
I.1.- Etude de la réaction entre polyphénols et nitrites	11
I.1.1- Réactifs	11
I.1.2.- Développement du processus réactionnel	11
1.1.3.- Obtention des polycondensats	12
I.2.- Auto-oxydation du pyrogallol	12
I.3.- Etude de la réaction d'oxydation du pyrogallol par la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène	12
1.3.1.- Développement du processus réactionnel	12
1.3.2.- Obtention des polycondensats	
1.4.- Etude de la réaction entre catéchol (O-diphénol), glycine et nitrites	13
1.5.- Analyse des gaz produits au cours de la réaction	13
1.5.1.- Détermination de l'azote moléculaire (N ₂) et des oxydes d'azote (NO, N ₂ O)	14
1.5.2.- Cinétique de la formation de CO ₂ suivie par chromatographie en phase gazeuse	14

1.5.3.- Etude de la cinétique de dégagement de CO ₂ par titration en retour par HCl	15
I.6.- Détermination de NO ₂ ⁻ par distillation suivant la méthode de Bremner et Keeney (1966)	15
I.7.- Chromatographie ionique (Dionex)	16
I.8.- Mise en évidence des produits issus de la transformation des substrats polyphénoliques : spectrophotométrie dans l'ultraviolet et le visible du milieu réactionnel	17
I.9.- Purification des polymères	18
I.9.1.- Dialyse du milieu réactionnel	18
I.9.2.- Décationisation des polymères	18
I.9.3.- Lyophilisation	19
I..10.- Détermination des caractéristiques analytiques des polycondensats purifiés	19
I.10.1.- analyse élémentaire	19
I.10.2.- Spectroscopie d'absorption dans l'infra-rouge	20
I.10.3.- Dosage des acidités	23
I.10.4.- Chromatographie par perméation sur gel de Dextrane "Sephadex G50" des solutions de polycondensats	25
I.10.5.- Dégradation acide des polycondensats purifiés	26
I.10.6.- Réduction au boryhydrure de sodium (BH ₄ Na) des polycondensats purifiés	29
I.10.7.- Microdétermination des groupements -NO ₂ et -N=O par la méthode de Kjeldahl	29
I.11.- Dosage colorimétrique des aminoacides (Moore et Stein, 1954)	30
I.12.- Dosage de ¹⁴ C. Scintillation liquide	31
I.13.- Détermination de ¹⁵ N par spectrophotométrie d'émission optique	32

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE DE LA RÉACTION ENTRE LE PYROGALLOL ET NO_2^-

INTRODUCTION	37
CHAPITRE I : OXYDATION DU PYROGALLOL	41
I.- OXYDATION DU PYROGALLOL : RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS	41
I.1.- Auto-oxydation du pyrogallol	41
I.2.- Oxydation du pyrogallol par la peroxydase de raifort en présence de peroxyde d'hydrogène	45
I.3.- Discussion	46
I.4.- Oxydation du pyrogallol par NO_2^- : Résultats et discussion	47
I.4.1.- Formation de produits quinoniques	47
I.4.2.- Relation entre la formation de CO_2^- et la formation de purpurogalline	49
I.4.3.- Oxydation de la purpurogalline par l'ion nitrite	51
CHAPITRE II : DÉCOMPOSITION DE NO_2^-	55
II.- DÉCOMPOSITION DE L'ION NITRITE	55
II.1.- Rappel	55
II.2.- Résultats et discussion	56
II.2.1.- Cinétique de décomposition de l'ion nitrite	56
II.2.2.- Formation des oxydes d'azote	57
CHAPITRE III : CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE DES POLYCONDENSATS ISSUS DE L'OXYDATION DU PYROGALLOL	65
III.1.- RENDEMENT DE LA RÉACTION	65
III.2.- ANALYSE ÉLÉMENTAIRE DES POLYCONDENSATS PURIFIÉS	66
III.3.- ANALYSE FONCTIONNELLE DES POLYCONDENSATS PURIFIÉS	67
III.3.1.- Fonctions acides	67
III.3.2.- Spectrophotométrie d'absorption Infra-rouge	68

III.4.- COMPORTEMENT DES POLYCONDENSATS AZOTÉS PURIFIÉS VIS-A-VIS DE L'HYDROLYSE ACIDE	72
III.5.- IDENTIFICATION DE L'AZOTE INCORPORÉ DANS LES POLYCONDENSATS PURIFIÉS	80
CHAPITRE IV : CARACTÉRISATION CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT ISSU DE L'OXYDATION DE LA PURPUROGALLINE PAR NO₂⁻	85
IV.- POLYCONDENSAT AZOTÉ PROVENANT DE L'OXYDATION DE LA PURPUROGALLINE : RÉSULTATS ET DISCUSSION	85
IV.1.- Analyse élémentaire	85
IV.2.- Analyse fonctionnelle du polycondensat azoté PurN5	86
IV.2.1.- Titration des fonctions acides	86
IV.2.2.- Spectrophotométrie d'absorption dans l'Infra-rouge	86
IV.2.3.- Comportement du polycondensat azoté (PurN5) soumis à hydrolyse acide	89
CHAPITRE V : CARACTÉRISATION CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT ISSU DE L'OXYDATION PÉROXYDASIQUE DU PYROGALLOL	93
V.- POLYCONDENSAT ISSU DE L'OXYDATION DU PYROGALLOL PAR LA PÉROXYDASE EN PRÉSENCE DE PÉROXYDE D'HYDROGÈNE (P(H ₂ O ₂)). RÉSULTATS ET DISCUSSION	93
DISCUSSION ET CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE	97

TROISIÈME PARTIE : ÉTUDE DE LA RÉACTION DE NO₂⁻ AVEC LE MÉLANGE STœCHIOMÉTRIQUE CATÉCHOL-GLYCINE
--

INTRODUCTION	107
CHAPITRE I : OXYDATION DU CATÉCHOL	111
I.1.- PRODUITS D'OXYDATION DU CATÉCHOL : SPECTROPHOTOMÉTRIE DANS L'UV-Vis DU MÉLANGE RÉACTIONNEL	111
I.2.- OXYDATION DU 4-NITROCATÉCHOL	116
I.3.- FORMATION DE GAZ CARBONIQUE DANS LE MILIEU RÉACTIONNEL	119

CHAPITRE II : DÉGRADATION DE LA GLYCINE ET DÉCOMPOSITION DE NO₂⁻	125
II.1.- CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DE LA GLYCINE	125
II.2.- CINÉTIQUE DE LA DÉCOMPOSITION DE NO ₂ ⁻	126
II.3.- POLYCONDENSATION DE LA GLYCINE AVEC LE CATÉCHOL EN PRÉSENCE DE NO ₂ ⁻	127
CHAPITRE III : CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT ISSU DE LA RÉACTION DE NO₂⁻ AVEC LE MÉLANGE STÉCHIOMÉTRIQUE CATÉCHOL-GLYCINE	133
III.- ÉTUDE DU POLYCONDENSAT ISSU DE LA RÉACTION DE NO ₂ ⁻ AVEC LE MÉLANGE CATÉCHOL-GLYCINE	133
III.1.- Composition élémentaire	133
III.2.- Chromatographie sur gel de dextrane "Séphadex G 50"	134
III.3.- Spectre UV-vis du polycondensat synthétique	135
III.4.- Analyse fonctionnelle du polycondensat synthétique	136
III.4.1.- Titration des acidités	136
III.4.2.- Spectroscopie dans l'Infra-rouge	136
III.5.- Dégradation acide du polycondensat synthétique	137
DISCUSSION ET CONCLUSIONS DE LA TROISIÈME PARTIE	141

QUATRIÈME PARTIE : ACTION DE NO₂⁻ SUR LE POLYCONDENSAT CATECHOL-GLYCINE
--

INTRODUCTION	147
I.- CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU POLYCONDENSAT PCG	147
II.- OXYDATION DU POLYCONDENSAT PCG	148

III.- CARACTÉRISTIQUES DU POLYCONDENSAT ISSU DE LA RÉACTION ENTRE NO_2^- ET PCG	148
III.1.- Composition élémentaire	148
III.2.- Spectrophotométrie infra-rouge du polycondensat PCG- NO_2^-	149
III.3.- Dégradation acide du polycondensat PCG- NO_2^-	151
 CONCLUSIONS GÉNÉRALES	 155
 I.- OXYDATION DU PYROGALLOL	 156
II.- FORMATION DE POLYCONDENSATS SYNTHÉTIQUES	
III.- INCORPORATION DE L'AZOTE D'ORIGINE NITREUSE DANS LES POLYCONDENSATS	157
IV.- ACTION DE NO_2^- SUR LE CATÉCHOL EN PRÉSENCE D'ACIDE AMINÉ	157
V.- ACTION DE NO_2^- SUR LE POLYCONDENSAT MODÈLE, CATÉCHOL-GLYCINE (PCG)	158
 BIBLIOGRAPHIE	 161

INTRODUCTION

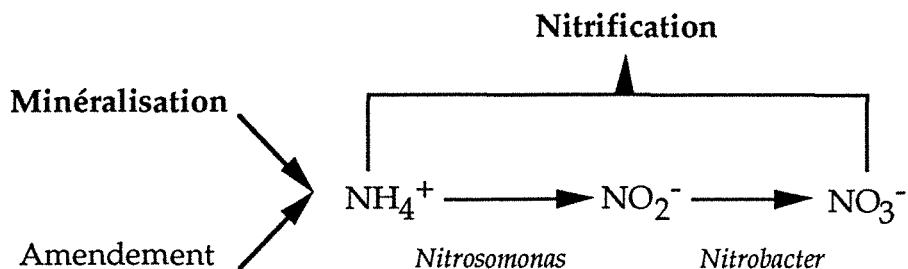
INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à l'état des connaissances sur la réactivité de l'ion nitrite avec les différents composés organiques du sol. Il s'agit en effet de préciser :

- le comportement de l'ion nitrite dans le sol,
- la nature des produits organiques qui réagissent avec l'ion nitrite,
- les critères d'environnement qui favorisent cette interaction,
- les produits issus de cette interaction,
- les conséquences de cette interaction sur le cycle de l'azote.

I- L'ION NITRITE DANS LE SOL

L'ion nitrite peut être considéré comme le produit intermédiaire de la transformation en nitrate de l'ion ammonium (NH_4^+) par des microorganismes autotrophes. Les *Nitrosomonas* sont responsables de l'étape d'oxydation de l'ion ammonium en nitrite (NO_2^-). L'étape suivante est sous la dépendance des *Nitrobacter* qui assurent l'oxydation de l'ion nitrite en nitrate (NO_3^-). Le processus biologique de la nitrification peut être dès lors schématisé :



Ce processus biologique, qui prolonge la minéralisation de l'azote, met à la disposition des végétaux une réserve permanente d'azote sous forme d'ions nitrates, qui est en même temps la forme directement utilisable par la plupart des espèces végétales.

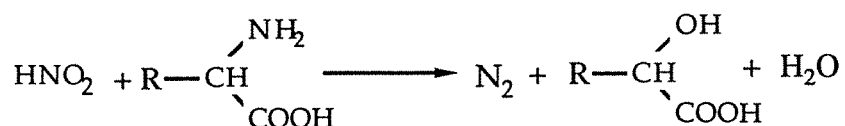
Dans la plupart des sols, la vitesse d'oxydation de l'ion nitrite en nitrate par *Nitrobacter* est plus élevée que celle de la conversion de l'ion ammonium en ion nitrite par *Nitrosomonas* (CHALK et SMITH, 1983). L'ion nitrite peut être aussi converti spontanément en nitrate en présence d'oxyde de Mn (BARTELETT, 1981), ce qui explique de l'ion nitrite s'accumule rarement dans les sols (ALEXANDER, 1977).

Cependant, cette accumulation peut être observée dans certaines conditions d'environnement, en particulier dans les sols qui reçoivent une fertilisation excessive en azote sous forme de sels d'ammonium ou d'urée (CHAPMAN et LIEBIG, 1952 ; BEZDICEK *et al.*, 1971). Cette accumulation est par exemple rendue possible par la toxicité que développe l'ammoniac à l'égard de *Nitrobacter* (ALEEM *et al.*, 1957 ; BROADBENT *et al.*, 1957 ; TYLER et BROADBENT, 1960).

II.- RÉACTIVITÉ DE L'ION NITRITE DANS LE SOL

Les pertes en azote dans le sol ont été expliquées longtemps par la volatilisation de l'ammoniac ou la dénitrification bactérienne. L'ion nitrite peut participer à ce déficit d'une façon significative. Il a la particularité de se décomposer spontanément en milieu acide (ALLISON et DOETSCH, 1951), mais ce processus ne permet pas d'expliquer à lui seul les pertes importantes d'azote sous forme gazeuse quand le sol est amendé en azote.

ALLISON et DOETSCH (1951) ont observé que l'ion nitrite peut réagir avec les acides aminés en produisant de l'azote moléculaire suivant le modèle réactionnel de Van Slyke. CLARK (1962) a proposé le terme de "dénitrification chimique" pour désigner le processus chimique par lequel l'azote gazeux est formé à partir de l'ion nitrite dans le sol.



Réaction de Van Slyke

Par ailleurs BREMNER (1957) a noté que la fraction organique du sol est particulièrement responsable de la décomposition de l'ion nitrite dans le sol. L'azote nitreux est transformé en azote gazeux et en partie fixé sur la matière organique du sol (BREMNER et FÜHR, 1966).

Deux facteurs sont principalement responsables de la décomposition de l'ion nitrite dans le sol : un pH bas et une teneur élevée en matière organique (EDWARDS et BREMNER, 1966 ; BREMNER et NELSON, 1968 ; NELSON et BREMNER, 1969). CLARK *et al.* (1960), REUSS et

SMITH (1965), BREMNER et NELSON (1968), JONES et HEDLIN (1970) et BOLLAG *et al.* (1973) ont montré que la vitesse de décomposition propre de l'ion nitrite est inversement proportionnelle au pH du sol, tandis que REUSS et SMITH (1965) ont observé que la décomposition chimique de l'ion nitrite augmente avec la teneur en matière organique du sol.

Les constituants organiques du sol sont particulièrement responsables de l'instabilité de l'ion nitrite. STEVENSON et SWABY (1964), puis BREMNER et NELSON (1968) ont apporté la preuve que les composés organiques de nature polyphénolique, tant simples (phénols, diphénols, triphénols) que complexes (lignines, tanins, acides humiques), participent activement à la décomposition de l'ion nitrite avec formation d'oxydes d'azote (NO, NO₂, N₂O), de N₂ et de nitrite de méthyle (CH₃ONO), en même temps que de gaz carbonique (STEVENSON *et al.*, 1970).

Rappelons aussi que l'ion nitrite réagit avec l'ion ammonium (ALLISON, 1963), cette réaction se déroulant plus facilement à pH alcalin. Il réagit aussi avec l'hydroxylamine (HONH₂) et les amines libres (R-NH₂) (REUSS et SMITH, 1965 ; SMITH et CHALK, 1980b). L'azote nitreux est ainsi transformé en azote moléculaire suivant le modèle de Van Slyke. Toutefois, NELSON (1982) a signalé que ces composés (acides aminés, urée, osamines, hydroxylamine) ne participent que très peu à la décomposition de l'ion nitrite car, les concentrations de chacune d'eux à l'état libre dans le sol apparaissent négligeables.

III.- PRODUITS AZOTÉS ISSUS DES RÉACTIONS DE L'ION NITRITE DANS LE SOL

Si la décomposition propre de l'ion nitrite en milieu acide a été démontrée au cours de nombreuses investigations, l'interaction de l'ion nitrite avec différents composés du sol (minéraux ou organiques) suscite encore beaucoup d'intérêt en vue de l'approfondissement des mécanismes et de la nature chimique des produits qui en résultent.

Selon SUZAWA *et al.* (1955) et NELSON et BREMNER (1970), les produits de la décomposition propre, à pH < 5, de l'ion nitrite sont formés essentiellement de NO et de NO₂. En présence d'air le NO se transforme entièrement en NO₂. Le NO₂ peut réagir avec l'eau pour former NO₂⁻ et NO₃⁻ (NELSON et BREMNER, 1970).

Les produits issus de la décomposition propre de l'ion nitrite représentent une perte d'azote pour le sol car ils peuvent être entraînés dans l'atmosphère. Cependant, les conditions acides de cette décomposition favorisent d'autres réactions chimiques qui font intervenir la matière organique du sol.

Les amines primaires aliphatiques réagissent avec l'ion nitrite en formant des sels de diazonium instables qui se décomposent avec formation de N_2 et d'un alcool. Les amines primaires aromatiques sont transformés en sels de diazonium plus au moins stables à température ambiante. Par contre les amines secondaires aliphatiques ou aromatiques conduisent à la formation de dérivés N nitroso ($-N-N=O$) (NORMAN *et al.*, 1987). Ces composés appelés nitrosamines sont connus pour leurs effets cancérigènes, mutagènes et toxiques à faibles concentrations (STEVENSON, 1982). Cependant tandis que des composés aminés sont présents dans les résidus végétaux dans le sol (FUJII *et al.*, 1974) et aussi dans les produits de dégradation des pesticides (TATE et ALEXANDER, 1974), les produits des réactions avec l'ion nitrite ne sont repérables qu'à l'état de traces.

Dans ce contexte, les substances polyphénoliques sont souvent mis en cause dans les processus de dénitrification chimique. L'interaction de l'ion nitrite avec les polyphénols (simples ou complexes) dans le sol revêt une importance considérable dont les conséquences sont multiples :

- Les polyphénols induisent activement en milieu acide la décomposition de l'ion nitrite, d'où la perte d'azote sous forme gazeuse. Selon REUSS et SMITH (1965), 40% des nitrites sont décomposés en présence de matière organique contre seulement 9 à 12 % en leur absence.
- l'interaction de l'ion nitrite avec les polyphénols entraîne probablement la formation de composés nitroso-aromatiques (BREMNER et FÜHR, 1966). Ces composés sont connus pour développer des effets cancérigènes, mutagènes et toxiques à très faible concentration.
- d'après BREMNER et SHAW (1957), l'azote d'origine nitriceuse lié à la matière organique de nature polyphénolique serait résistant à la minéralisation, ce qui signifie que cet azote n'est utilisable ni par les micro-organismes du sol ni par les plantes. Ce constat permet d'expliquer la décroissance du rapport C/N en même temps que l'accroissement de la teneur en azote ne participant plus au cycle normal de l'azote et formant ainsi un pool particulier.

IV.- L'INTERACTION DE L'ION NITRITE AVEC LA MATIÈRE ORGANIQUE DU SOL

L'interaction de l'ion nitrite avec la matière organique des sols, en particulier avec les constituants de nature polyphénolique, peut alors accroître la fraction de l'azote immobile, ce qui permet d'expliquer un rapport C/N paradoxalement bas. Ce comportement peut être accentué dans certaines conditions, en particulier dans le cas des sols qui favorisent l'accumulation de la matière organique. Dans ces conditions on assiste à l'interaction privilégiée de l'ion nitrite avec les composés organiques accumulés (BOUDOT, 1982). Les produits issus de cette réaction qui s'apparentent souvent

aux nitrosophénols (BREMNER, 1957), sont peu biodégradables (BREMNER et SHAW, 1957) et peuvent s'accumuler dans le sol (BOUDOT, 1982).

La formation d'une réserve organique importante est due à la faible minéralisation de la matière organique issue des retombés végétales. Ceci est dû à la réduction de l'activité biologique causée par le raccourcissement des périodes printanières et estivales et à la faiblesse des températures moyennes annuelles. Toutefois ces facteurs climatiques peuvent s'ajouter à d'autres liés à la nature de la roche-mère pour imprimer aux sols un caractère humifère plus ou moins prononcé (BEL HADJ, 1987).

Les composés organiques acides jouent un rôle significatif dans l'altération des minéraux et des roches dans le sol ; aujourd'hui, on admet que l'acidité et l'effet chélatant des composés organiques sont largement responsables de l'altération de nombreux minéraux et roches (TAN, 1986). Dans le cas, par exemple, des sols d'altitude observés dans les étages montagnards et subalpins des massifs montagneux, la teneur en matière organique atteint parfois plus de 20 %. Du fait du raccourcissement des périodes favorables à la minéralisation, les composés organiques acides accumulés libèrent des quantités d'hydroxydes ferriques ou alumineux variables suivant la nature de la roche-mère (BOUDOT, 1982). Le complexe d'altération minérale exerce en retour une influence décisive sur les cycles biologiques et en particulier sur les cycles du carbone et de l'azote. La plupart des sols humifères acides sont riches en hydroxydes ferriques ou alumineux, ou encore en allophanes. On attribue à ceux-ci un rôle important dans l'accumulation de la matière organique dans les sols (BOUDOT *et al.*, 1986 et 1988).

Le rôle catalytique des ions métalliques ou des minéraux argileux dans le processus de formation des substances humiques a été démontré par plusieurs recherches (WANG *et al.*, 1978 ; SHINDO et HUANG, 1984 ; WANG *et al.*, 1986 ; KUMADA et KATO, 1970 ; KYUMA et KAWAGUCHI, 1964 ; ADRIAN, 1985 ; MORTLAND et HALLORAN, 1976). Ces travaux ont montré, dans la plupart des cas, la stimulation de la formation de composés humiques modèles à partir des composés polyphénoliques simples en présence d'oxydes ou oxyhydroxydes de Fe, Al, Si ou Mn, de minéraux argileux (Kaolinite, Chlorites, smectites,...) ou de minéraux primaires (olivines, pyroxènes, feldspaths,...).

L'interaction de la matière organique avec les composés inorganiques dans le sol aboutit à la formation de complexes organo-minéraux stables (MARTIN et HAIDER, 1986). Ces derniers sont résistants à la biodégradation. On attribue ce comportement souvent à un effet protecteur dû aux composés inorganiques (MARTIN et HAIDER, 1976 et 1986 ; MARTIN *et al.*, 1982 ; ANDREUX, 1978 ; ANDREUX *et al.*, 1983).

V.- BUT DE L'ÉTUDE

On a vu dans quelles conditions du milieu environnement l'interaction nitrite-polyphénols peut avoir lieu et quel peut être son impact sur le cycle de l'azote (BOUDOT, 1982). L'existence de réactions entre l'ion nitrite et les composés polyphénoliques est à l'heure actuelle bien établie ; les mécanismes intervenant dans la transformation de l'azote d'origine nitreuse en azote organique ainsi que la nature des produits de cette interaction sont très mal connus.

Ce travail a pour but la mise en évidence de certains aspects de la réactivité entre ion nitrite, di- et triphénols, les caractéristiques chimiques et structurales des produits issus des réactions, ainsi que la réduction de l'azote d'origine nitreuse en azote organique.

Pour cela, des composés polyphénoliques modèles ont été utilisés, tels que pyrogallol et catéchol en présence de nitrite dans des conditions contrôlées (pH acide, anoxie, température 18-20°C).

Il nous est apparu intéressant ensuite de mettre en évidence et d'étudier la compétition entre polyphénols et acides aminés afin de comparer l'action spécifique de l'ion nitrite sur ce système avec la polycondensation oxydative en présence d'oxygène moléculaire. Pour l'étude de cette dernière réaction nous avons retenu le système catéchol (o.diphénol)-glycine (acide aminé).

Cette démarche nous a conduit à approfondir dans une deuxième étape l'étude de l'action spécifique de l'ion nitrite sur les produits issus de la polycondensation oxydative du système catéchol-glycine, afin de mieux comprendre la nature des transformations entre substances humiques et azote nitreux.

De l'ensemble de ces résultats nous dégagerons les conclusions pour expliquer la contribution respective des processus de nitrosation et d'oxydation à l'élaboration des polycondensats azotés à caractères humiques.

PREMIÈRE PARTIE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.- MATÉRIEL ET MÉTHODES

I-1.- ETUDE DE LA REACTION ENTRE POLYPHENOLS ET NITRITES

I-1-1.- Réactifs

Les composés polyphénoliques utilisés sont :

- Pyrogallol ($C_6H_6O_3$) : 1,2,3-trihydroxybenzène à la concentration 0,032 M.
- Purpurogalline ($C_{11}H_8O_5$) : 2,3,4,6-tétrahydroxy-5H-benzocyclohéptène-5-one à la concentration 0,018 M.

Les nitrites sont introduits sous forme de nitrite de sodium à une concentration de 0,15 M. La solution tampon à pH 5 est composée de :

- Phosphate monopotassique dihydrogéné : KH_2PO_4 M/15 = 992 ml
- Phosphate disodique dihydrogéné : $Na_2HPO_4, 2H_2O$ M/15 = 8 ml

I-1-2.- Développement du processus réactionnel

La réaction se déroule dans un flacon sérum d'un volume de 150 ml. Le tampon phosphate (pH 5) d'un volume de 50 ml est introduit dans le flacon et désoxygéné par un courant d'hélium pendant 10 min. Après désoxygénation du tampon on rajoute les réactifs, puis l'atmosphère du flacon est à nouveau balayée par un courant d'hélium pendant 2 min. Le temps zéro est compté à partir de cette deuxième désaération. On laisse la réaction se dérouler à la température du laboratoire (18-20°C) sous agitation continue. Le milieu de référence est préparé dans les mêmes conditions en omettant l'apport de nitrites.

I-1-3.- Obtention des polycondensats

La durée de réaction est de 5 jours : cette durée correspond à l'obtention d'une quantité suffisante de produits présentant une analogie avec les substances humiques. Après 5 jours de réaction, le mélange réactionnel est dégazé par un courant d'azote pour en éliminer par entraînement les oxydes d'azote NO et N₂O, et surtout NO₂ qui se forme par contact de NO avec l'oxygène (vapeurs nitreuses). La réaction du pyrogallol avec NO₂⁻ donne lieu à la formation d'un précipité qu'on observe au bout de 30 min et qui se maintient jusqu'à la fin de la durée de la réaction. Ce précipité est recueilli par filtration sur filtre "Millipore 0,45 µm" puis séché sous vide phosphorique. La solution filtrée est dialysée contre de l'eau distillée pendant une semaine au travers d'une membrane de point de coupure 2000 dal. A la fin de la dialyse, l'adialysat (polycondensats de PM > 2000 dal.) et le dialysat (PM < 2000 dal.) sont récupérés et conservés au froid pour les analyses ultérieures. Les polymères sont protonés par passage sur résine cationique (polystyrène sulfoné H⁺). La purification des polymères est contrôlée d'après leur teneur résiduelle en Na⁺ et K⁺ par absorption atomique. Les polycondensats ainsi purifiés sont lyophilisés puis séchés sous vide phosphorique (P₂O₅) pendant une semaine.

On procède à l'analyse du carbone et de l'azote contenus dans le dialysat pour déterminer le rendement de la réaction

I-2.- AUTO-OXYDATION DU PYROGALLOL

L'oxydation du pyrogallol par l'oxygène se déroule dans un flacon sérum d'une capacité de 150 ml en conditions contrôlées : pH 8 et température du laboratoire (18-20°C). La concentration en pyrogallol est de 0,018 M. La réaction se déroule pendant 5 jours sous agitation continue. A la fin de cette période, le mélange réactionnel est filtré sur filtre Millipore de porosité 0,45 µM, pour récupérer le précipité formé au cours de la réaction. La solution filtrée est dialysée ensuite contre de l'eau distillée au travers d'une membrane de point de coupure 2000 dal. L'adialysat (polycondensats de PM > 2000 dal.) est ensuite protoné par passage sur résine échangeuse de cations (H⁺) et lyophilisé puis séché sous vide phosphorique pendant une semaine.

I-3.-ETUDE DE LA REACTION D'OXYDATION DU PYROGALLOL PAR LA PEROXYDASE EN PRESENCE DE PEROXYDE D'HYDROGENE

I-3-1.- Développement du processus réactionnel

La réaction se déroule dans un flacon sérum d'une capacité de 150 ml en conditions contrôlées : pH 7, température du laboratoire (18-20°C) et en l'absence de l'oxygène de l'air. Le pyrogallol est introduit dans le flacon, contenant 50 ml de tampon phosphate (pH 7), à une concentration de 0,005 M (concentration maximale pour ne pas inhiber l'enzyme), sous un courant

d'hélium, avec 4,4U (20 μ g) de peroxydase. Le flacon étant étanche, 0,004 M de H_2O_2 sont ajoutés goutte à goutte avec une seringue (0,1 ml/min). On laisse ensuite la réaction se dérouler pendant 5 jours sous agitation continue.

I-3-2.- Obtention des polycondensats

Après 5 jours de réaction, le mélange réactionnel est filtré sur filtre "Millipore 0,45 μM " pour récupérer le précipité formé au cours de la réaction. Ce dernier est séché ensuite sous vide phosphorique et pesé avant l'analyse.

La solution filtrée est dialysée contre de l'eau distillée pendant une semaine au travers d'une membrane de point de coupure 2000 dal. A la fin de la dialyse l'adialysat (polycondensats de $\text{PM} > 2000$ dal.) est protoné par passage sur résine échangeuse de cations (H^+) et lyophilisé. Le lyophilisat est ensuite séché sous vide phosphorique pendant une semaine.

I-4.- ETUDE DE LA REACTION ENTRE CATECHOL (O-DIPHENOL), GLYCINE ET NITRITES

Les réactifs sont utilisés à une concentration équimolaire 0,03 M :

- Catéchol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) : 1,2-dihydroxybenzène
- Acide α -aminé : glycine ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$) marqué ^{14}C sur le carbone 1 ou 2
- Nitrite de sodium enrichi à 5,9% en NaNO_2 marqué (^{15}N)

Le processus réactionnel et le protocole d'obtention des polycondensats sont identiques à ceux appliqués dans le cas de la réaction du pyrogallol avec NO_2^- (cf. I-1-2 et I-1-3)

I-5.- ANALYSE DES GAZ PRODUITS AU COURS DE LA REACTION

Les produits gazeux formés au cours de la réaction sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le prélèvement des échantillons gazeux a lieu tout au long de la réaction à partir de la 2ème minute suivant les intervalles de temps : 2, 15, 30, 45min, 1, 2,3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120 H.

La chromatographie en phase gazeuse(CPG) ne nous a pas permis de quantifier les différents constituants gazeux formés au cours de la réaction à cause d'une surpression dans le flacon qui se développe au cours du temps. Il nous a paru plus simple de procéder à l'analyse quantitative par titration en retour à l'aide d' HCl pour le CO_2 et, par I.R. pour les constituants azotés.

a) Appareillage

- Chromatographe GIRDEL 3000
- Colonne : Porapak Q80-100 mesh.
- Détecteur : Catharomètre

b) Critères opérationnels :

- Température du four : 90°C
- Température du détecteur : 110°C
- Catharomètre : 120 mA
- Gaz vecteur : Hélium à la pression de 0,5 bar

I-5-1.- Détermination de l'azote moléculaire (N_2) et des oxydes d'azote (NO, N_2O)

a) Etalonnage

Les gaz témoins (N_2 , NO et N_2O , commercialisés par "Air liquide" sont injectés à l'aide d'une seringue (1 ml) pour repérer les pics correspondants. Ces derniers sont déterminés par le temps de rétention de chaque gaz.

b) Mesure

Pour l'analyse des mélanges gazeux provenant du milieu réactionnel, on prélève à la seringue des échantillons de 1 ml que l'on injecte ensuite dans le chromatographe. Le catharomètre est solidaire d'un intégrateur. Dans ces conditions on observe une bonne linéarité entre la surface des pics et les volumes gazeux correspondants. Pour chaque mesure on opère trois répétitions.

I-5-2.- Cinétique de la formation de CO_2 suivie par chromatographie en phase gazeuse

a) Courbe de référence

Des flacons serum vides d'un volume de 250 ml sont désaérés par passage d'un courant d'hélium pour en éliminer par entraînement l'air contenu dans l'atmosphère des flacons ; on injecte ensuite des volumes connus de CO_2 pur en quantité croissante. La courbe des concentrations correspondantes en CO_2 est établie en rapportant les surfaces des pics en fonction des quantités de CO_2 (μg de C- CO_2) introduits dans le système.

b) Cinétique du dégagement de CO_2

On prélève à la seringue 1 ml de mélange gazeux formé au cours de la réaction suivant I-5. Chaque prélèvement de 1 ml est remplacé par 1 ml d'hélium pour maintenir le volume de l'atmosphère gazeuse constant. La quantité de CO_2 dégagé est déterminée d'après la courbe étalon.

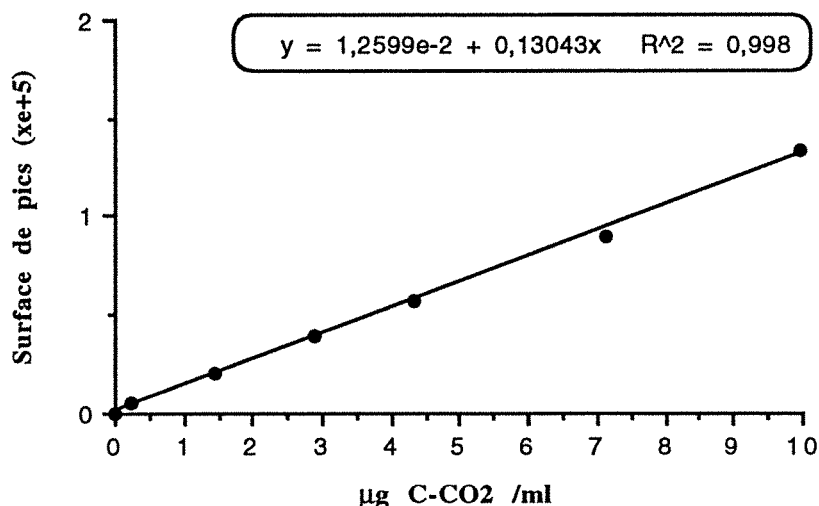


Figure 1.-Courbe étalon de CO_2 établie à partir du CO_2 pur et dosé par chromatographie en phase gazeuse

I-5-3.- Etude de la cinétique de dégagement de CO_2 par titration en retour par HCl

Le CO_2 total dégagé est entraîné par un courant d'hélium suivant I-5, et fixé dans NaOH 0,45N ; on procède ensuite à sa détermination par dosage volumétrique en retour par HCl 0,1N en présence de BaCl_2 et de thymol-phtaléine.

I-6.- DETERMINATION DE NO_2^- PAR DISTILLATION SUIVANT LA METHODE DE BREMNER et KEENEY (1966)

Cette méthode est basée sur la réduction de NO_2^- et NO_3^- en NH_4^+ en présence d'alliage de DEVARDA suivie d'un entraînement à la vapeur de NH_3 en milieu alcalin selon la méthode Kjeldhal.

Le dosage de NO_2^- du milieu réactionnel en fonction du temps est effectué sur une partie aliquote (1 ml) prélevée à la seringue suivant les intervalles de temps : 2, 15, 30, 45min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120 h. Pour chaque point, on effectue 3 mesures :

① Dosage de $\text{N}(\text{NH}_4^+)$:

0,5 ml de mélange réactionnel, amené à pH 6,6 avec une solution de NaOH 0,01N, puis soumis à distillation en présence du tampon borate (pH 8,8) pour entraîner NH_4OH formé par la vapeur d'eau.

② Dosage de $\text{N}-(\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-)$:

à la fin de la distillation de NH_4OH (①), on ajoute l'alliage de DEVARDA (0,3g) et on procède à un nouvel entraînement par la vapeur.

③ Dosage de $\text{N}-(\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-)$:

un échantillon de mélange réactionnel (0,5ml) est traité par de l'acide sulfamique (1ml d'une solution à 2%), pour détruire NO_2^- , ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}$) puis distillé en présence d'alliage de DEVARDA (0,5g) et du tampon borate (pH 8,8) (mêmes conditions que pour ①)

Les solutions standards sont un mélange de :

- NH_4^+ : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$; KNO_3 , 10^{-3} M ; NaNO_2 , 10^{-3} M

L'échantillon de référence est composé de NaNO_2 (0,15 M) ou de NaNO_2 (0,03 M) et glycine en tampon phosphate de pH 5 et en absence d'oxygène.

I-7.- CHROMATOGRAPHIE IONIQUE (DIONEX)

La chromatographie ionique permet d'analyser de nombreuses substances organiques et minérales. Pour ce qui nous concerne, cette technique a été appliquée au dosage des ions NO_3^- en fonction du temps dans le mélange réactionnel, polyphénol, NaNO_2 , en milieu tampon de pH 5. Ce type de séparation chromatographique est très performant, puisqu'il permet d'identifier rapidement (± 10 minutes) et simultanément plusieurs ions : F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , et SO_4^{2-} , avec une limite de détection de l'ordre de 1 mg/l.

a) Appareillage

- Chromatographe ionique Série 2000i.
- Pompe isochratique APM.
- Colonne analytique Polystyrène-Divynyl-Benzène (PS/DVB ; AS4A ; 250 mm x 4 ; porosité : 15 μ).
- Boucle d'injection : 50 μ l.
- Détecteur conductimétrique.
- Colonne de garde NG1 (macroporeuse).
- Intégrateur : Spectra-physics 4290.

b) Conditions analytiques

- Eluant : mélange de Na_2CO_3 1,8 M et NaHCO_3 1,7 M
- Débit de l'éluant : 2ml/min à une pression de 15 bar.
- Standard : solution formée de : 2mg/l F^- , 3mg/l Cl^- , 5mg/l NO_2^- , 10mg/l NO_3^- , 5mg/l PO_4^{3-} et de 15mg/l SO_4^{2-} .
- Filtration sur filtre Millipore (0,45 μ m).

c) Protocole analytique

La teneur en NO_3^- est déterminée à partir de 2mn jusqu'à 5 jours de réaction suivant les intervalles de temps : 2, 15, 30, 45min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120H. Pour chaque injection dans l'appareil, une partie aliquote du mélange réactionnel (0,5 ml) est prélevée à la seringue, diluée 400 fois (cas où $\text{NaNO}_2 = 0,15$ M) ou 200 fois (cas où $\text{NaNO}_2 = 0,03$ M) et traitée ensuite par une cartouche ON-GUARD P (Polyvinylpyrrolidone) pour la rétention des composés phénoliques. L'échantillon de référence comportant l'ion nitrite (0,15 M ou 0,03 M) dans le tampon phosphate de pH 5 et en absence d'oxygène est traité dans les mêmes conditions.

I-8.-MISE EN EVIDENCE DES PRODUITS ISSUS DE LA TRANSFORMATION DES SUBSTRATS POLYPHENOLIQUES : SPECTROPHOTOMETRIE DANS L'ULTRAVIOLET ET LE VISIBLE DU MILIEU REACTIONNEL

Les spectres d'absorption dans l'UV-Vis sont couramment utilisés pour la caractérisation des substances humiques ; ils donnent de précieuses indications concernant le degré de condensation de ces produits. On utilise en particulier le rapport entre l'absorbance à 465nm et l'absorbance à 665nm (E4/E6 ou Q4/6). Ce rapport est d'autant plus faible que les composés ont des poids moléculaires élevés (KONONOVA, 1966 ; FLAIG *et al.*, 1975 ; CHEN *et al.*, 1977 ; STEVENSON, 1982).

a) Appareillage

- Spectrophotomètre "BECKMAN 25"
- Cuves Beckman en quartz (1 cm d'épaisseur)

b) Protocole

Pour suivre la formation des produits de la réaction, le spectre UV-Vis (200-800nm) est enregistré à partir d'une solution diluée du mélange réactionnel. Pour cela, on prélève 0,5ml de ce dernier que l'on dilue cinquante fois avec de l'eau distillée ou une solution de NaOH N/100. Les spectres UV-Vis enregistrés correspondent aux temps de réaction suivants : 2, 15, 30, 45min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120H.

La détermination du rapport Q4/6 est effectuée après dissolution de 0,5mg de polycondensat purifié dans 10ml de tampon Tris (pH 7,5).

I-9.- PURIFICATION DES POLYMERES

La purification a pour but d'isoler des polycondensats de taille moléculaire supérieure à 2000dal. Pour cela, nous avons retenu la technique de dialyse. Après obtention des polycondensats, ces derniers sont protonés par passage sur résine H⁺ et lyophilisés.

I-9-1.- Dialyse du milieu réactionnel

La dialyse est effectuée à l'aide d'une membrane "Spectrapor 6" PM 2000 (diamètre poral 10Å).

Le mélange réactionnel est dialysé contre de l'eau distillée que l'on renouvelle fréquemment. La fin de la dialyse est contrôlée par analyse de Na⁺ et K⁺ dans le dialysat par absorption atomique et suivi du pH.

I-9-2.- Décationisation des polymères

a) Matériel : Colonnes en verre (diamètre : 4,5cm ; H : 45 cm) fermées à leur base par un robinet en verre ou un étranglement en caoutchouc pourvu d'une pince de Mohr.

b) Réactifs

- Résine polystyrène-sulfoné (H^+) "DOWEX 50W X8" (50/100 mesh, capacité d'échange : 4,9 à 5,2 méq./g de résine sèche)
- Acide chlorhydrique (HCl) 2N
- Solution de soude (NaOH) 2N

c) Protocole

Les résines, préalablement gonflées dans l'eau, décantées et éluées successivement, en leur faisant subir plusieurs cycles, dans NaOH 2N, H_2O , HCl 2N et H_2O , sont introduites dans les colonnes en verre. Les solutions de polymères dialysés sont lentement percolées au travers de ces échangeurs d'ions pour en éliminer les cations. La pureté est ensuite contrôlée par l'analyse de Na^+ et K^+ par absorption atomique.

I-9-3.- Lyophilisation

Les solutions de polymères dialysés et décationisés sont congelées rapidement à l'aide d'un congélateur rotatif équipé d'un bain de méthanol refroidi à $-50^\circ C$. La sublimation de l'eau se produit à $-40^\circ C$ et à une pression inférieure à 0,1 mm de Hg. Les produits lyophilisés sont rassemblés dans des piluliers en verre maintenus sous vide phosphorique (P_2O_5). Les produits ainsi séchés peuvent être conservés sans transformation apparente.

I-10.- DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES DES POLYCONDENSATS PURIFIES**I-10-1.- Analyse élémentaire**

La composition élémentaire est un critère important qui peut être utilisé pour déterminer la nature et l'origine des substances humiques (STEVENSON, 1982). Plusieurs indices peuvent être établis, notamment à partir des rapports C/N (ou N/C), H/C et O/C.

Les analyses de C, H et N sont effectuées dans un appareil "CARLO ERBA 1106 CHN + O". 1 à 2 mg d'échantillon sont pesés (au 1/1000 de mg) dans une nacelle en argent. L'échantillon est brûlé dans un four à $1055^\circ C$ en présence de catalyseur Cr_2O_2 et d'oxygène, avec formation de CO_2 , H_2O et d'oxydes d'azote, postérieurement réduits en N_2 par passage sur Cu. Les différents constituants gazeux sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (gaz vecteur : Hélium ; détecteur : catharomètre). L'oxygène est déterminé par réduction à $1200^\circ C$ sur charbon actif nickelé ;

le CO résultant est déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Chaque résultat est la moyenne de trois répétitions.

I-10-2.- Spectroscopie d'absorption dans l'infrarouge

Pour avoir des informations structurales sur les molécules chimiques, la spectroscopie infrarouge offre la possibilité d'assigner les bandes d'absorption de radiations infrarouges à des groupements spécifiques à l'intérieur d'une molécule (BELLAMY, 1975). La spectroscopie infrarouge n'offre qu'un intérêt limité pour la détermination de la structure chimique des molécules complexes telles que les substances humiques. Toutefois, cette technique a été largement utilisée par plusieurs auteurs pour l'étude des substances humiques (STEVENSON, 1982), et il en ressort que malgré la nature complexe de ces substances, elle fournit des informations intéressantes sur les groupements fonctionnels oxygénés.

a) Matériel

- Mortier en agate
- Moule "BECKMAN K-13" (Diamètre 13 mm) en acier
- Presse "RIIC" 10 T/cm²
- Pompe à vide à palettes (1 à 2 mm Hg)
- Spectrophotomètre "BECKMAN IR 4250"

b) Agent de dispersion des échantillons : Bromure de potassium anhydre (KBr stocké à 120°C)

c) Protocole

Un poids correspondant à 0,5 mg de carbone est homogénéisé par broyage au mortier d'agate avec 200 mg de KBr. Le mélange introduit dans le moule est vitrifié sous une pression de 10 T/cm² et sous vide. Les spectres sont enregistrés en absorbance à une vitesse de 300cm⁻¹/min, le temps de réponse étant de 2 secondes, l'atmosphère des compartiments d'analyse est balayée en permanence par un courant d'air sec.

Toutefois nous avons utilisé cette technique essentiellement à des fins qualitatives. Les tableaux I et II donnent les attributions des principales bandes d'absorption des composés nitrosés et des substances humiques respectivement.

Tableau I.- Caractéristiques des spectres IR des groupement nitro et nitroso appartenant à des dérivés nitrés et nitrosés simples (d'après EL SAYED AZHAR *et al.*, 1986).

Fréquence (cm ⁻¹)	-NO ₂ ou -N=O
1055-950	vibration d'élongation de -N-O de l'oxime
1110	N=O en position parahydroxy
1250	groupe amine situé en position ortho par rapport à -NO ₂
1265	N=O dimère sous forme trans
1315	groupe amine situé en para par rapport à -NO ₂
1335	-N=O en position parahydroxy
1350	élongation symétrique de -NO ₂ aromatique
1370	absorption du groupe N ₃ (azide)
1410	-N=O dimère sous forme cis
1515	-N=O aromatique d'un composé monomérique
1540	élongation asymétrique du groupe -NO ₂
1615	-C=N d'un groupe azo
2050-2160	N ₃ (groupe azide)

Tableau II.- Attribution des bandes d'absorption propres aux composés humiques (d'après Barriuso, 1985)

Description	Localisation	Vibration	Attribution et commentaires
Large bande à 3400 cm^{-1}	$3700\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ $3090\text{-}3070\text{ cm}^{-1}$	Valence Valence Valence Valence	O-H libres O-H liés N-H Amides-peptides, encombrée par la précédente C-H aromatiques et oléfines à peine visibles
Double pic centré à 2920 cm^{-1}	$2962\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$	Valence	C-H aliphatiques 2962 cm^{-1} asymétrique -CH_3 2926 cm^{-1} asymétriques $\text{-CH}_2\text{-}$ 2890 cm^{-1} -C-H 2872 cm^{-1} symétriques -CH_3 2853 cm^{-1} symétriques $\text{-CH}_2\text{-}$
Epaulements à 2500 cm^{-1}	$2700\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$	Valence	O-H liés, chélatés ou pontés (H) dans des acides carboxyliques
(F) 1700 cm^{-1}	$1730\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$	Valence	O-C carboxyliques, cétoniques ou esters
Large bande à 1630 cm^{-1}	$1690\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$	Déformation Valence Valence Valence Déformation	H-O-H C=C aromatiques et oléfiniques O=C quinoniques pontés (H) à OH acides O=C associés à des amides N-H amides-amines primaires
Pics (f) sur la bande précédente	$1570\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$	Déformation Vibrations	N-H amides-amines secondaires Squelette aromatique
Large bande à 1400 cm^{-1}	1460 cm^{-1} $1420\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ $1395\text{-}1365\text{ cm}^{-1}$	Déformation Vibration Déformation	Asymétriques C-H de -CH_2 et C- H_3 Symétriques, structure résonnante carboxylates -CO_2 Symétriques C-H du $\text{-(CH}_2\text{)}_n$ ($1,2,3 \approx n$)
Large bande à 1230 cm^{-1}	$1320\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ 1200 cm^{-1} $1160\text{-}1130\text{ cm}^{-1}$	Valence Déformation Déformation Vibrations du squelette aliphatique	C-O O-H O-H phénoliques (probablement)
Pic (F) à 1030 cm^{-1}	$100\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$	Valence Valence	CO-alcooliques (polysaccharides) Si-O
$1800\text{-}930\text{ cm}^{-1}$	Grand massif dû à plusieurs vibrations, principalement du squelette carboné (C...C) et groupements C-OR (éther, hydroxyl, ...)		
$930\text{-}660\text{ cm}^{-1}$	Bandes d'intensité variables, pas toujours visibles, dues à des vibrations symétriques et hors du plan de C-H aromatiques		

I-10-3.- Dosage des acidités

Il s'agit des groupes acides dissociables ($-\text{COOH}$ et $-\text{OH}$) des polycondensats purifiés. La méthode appliquée est celle développée par BRUNELLOT *et al.*, (1990) qui consiste à effectuer la neutralisation en milieu de force ionique élevée ($0,1 \text{ M NaClO}_4$), à température constante (25°C), d'un acide minéral fort en excès (HClO_4) puis de ce même acide fort en présence de la solution organique à titrer. A partir des courbes de titrage normalisées et des fonctions de GRAN (1952) (équation I et II), on détermine le début et la fin du titrage.

Equation I : début de titrage

$$F(V) = (V_0 + V) \cdot [\text{H}^+]$$

Equation II : fin de titrage

$$F(V) = (V_0 + V) \cdot [\text{OH}^-]$$

V_0 = Volume initial de l'échantillon à titrer

V = Volume de soude ajouté pour le titrage de l'échantillon.

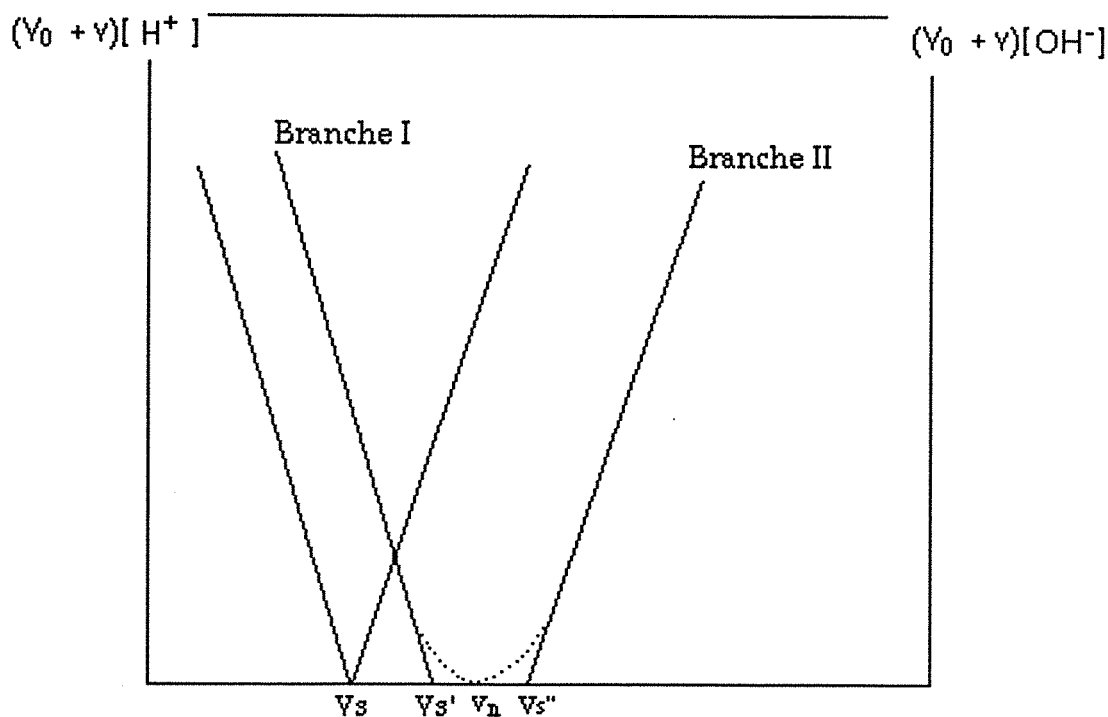


Figure 2.-Courbes de fonctions de GRAN déduites des courbes de titrage d'un polyacide, en présence d'acide fort, par la soude.

Pour $F(V) = 0$ on détermine 2 volumes V_s' et V_s'' représentant respectivement les volumes de début et de fin de titrage.

Le point de neutralisation apparent est obtenu au maximum de la dérivée :

$$\frac{d\phi G}{dV} = V_N$$

On définit ainsi 3 types d'acidité :

① Acidité Forte : $AF = (V_s' - V_s) \times N$. Cette acidité est attribuée aux combinaisons minérales acides et/ou aux fonctions carboxyliques en position ortho par rapport à une fonction phénolique selon GAMBLE (1970).

② Acidité faible : $Af = (V_n - V_s') \times N$ correspondant principalement aux fonctions carboxyliques.

③ Acidité très faible : $Atf = (V_s'' - V_n) \times N$ correspondant aux fonctions phénoliques.

V_s = Volume équivalent de $HClO_4$ seul évalué en milieu acide.

V_s' = Volume équivalent de $HClO_4$ titré en présence de l'échantillon.

V_n = Volume de soude versé pour atteindre le point d'équivalence ; il correspond à une valeur calculée à partir de la courbe dérivée (dV/dpH).

V_s'' = Volume de soude nécessaire pour titrer toutes les acidités présentes dans la solution de titrage, c'est le volume de fin de titrage.

$V_s' - V_s$ = Volume de soude employé pour titrer les acides forts.

$V_n - V_s'$ = Volume de soude employé pour titrer les acides faibles.

$V_s'' - V_n$ = Volume de soude nécessaire pour titrer les acides très faibles

N : normalité de la soude.

L'ensemble de la chaîne automatisée de mesure comprend :

- un ionomètre ORION 901
- une burette à piston Metrohm (Multidosimat 655)
- une électrode combinée de type ROSS (Orion 8101)
- un réacteur étanche comportant une jaquette thermostatique et permettant de réaliser le titrage sous atmosphère de gaz inerte (N_2)
- un micro-ordinateur Apple II, couplé à l'ionomètre et à la burette.

Les calculs sont effectués sur un ordinateur Apple IIe selon un programme élaboré par ADRIAN (1985).

I-10-4.- Chromatographie par perméation sur gel de Dextrane "Sephadex G50" des solutions de polycondensats

L'une des propriétés physiques fondamentales des composés chimiques est leur poids moléculaire. La chromatographie sur gel de Sephadex est une technique de séparation dont les molécules sont séparées suivant leur dimension (DETERMANN, 1969). C'est la technique la plus utilisée pour la détermination du poids moléculaire des substances humiques (DE NOBILI *et al.*, 1989). La séparation s'effectue sur colonne garnie d'un gel formé de particules poreuses. Cette technique est utilisée aussi pour la purification et le fractionnement des molécules.

a) Matériel

- Colonne en verre (diamètre 1,7 cm, hauteur : 34 cm)
- Appareillage "GILSON", avec microcellule de détection par absorption UV à 280 nm, enregistreur et collecteur de fractions.

b) Réactifs

- Gel de dextrane "Sephadex G50" (Pharmacia Fine Chemicals)
- Bleu Dextrane 2000 (Pharmacia Fine Chemicals), Poids moléculaire 2×10^6 à 2 ‰ dans une solution aqueuse ramenée à pH 7 avec une solution de NaOH N/100.

c) Protocole

Le gel, préalablement gonflé dans l'eau et sous vide, est introduit dans la colonne de verre ; la hauteur du gel est de 24 cm. On utilise comme éluant une solution aqueuse de pH 7, dont le débit est régulé par gravité à pression constante.

On dépose 0,5 ml d'une solution de polycondensat (1 mg dissous dans l'eau distillée, le tout est ramené à pH 7 à l'aide d'une solution de NaOH N/100) au sommet de la colonne de gel ; l'élution est poursuivie à température ambiante avec de l'eau distillée ramenée à pH 7. On enregistre ensuite la variation de la densité optique en fonction des volumes d'élution recueillis à l'aide d'un collecteur de fractions. Sur l'enregistrement, on distingue deux types de pics correspondant respectivement à une fraction exclue, dont l'encombrement moléculaire est plus grand que la taille des pores du gel, et à une fraction retenue.

La relation entre le coefficient de partage (K_{av}) et le poids moléculaire est :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} = -\log PM + B$$

où V_t = volume total du gel gonflé

V_o = volume du vide du gel gonflé (phase circulante) correspondant au volume d'élution d'une molécule totalement exclue (Bleu Dextrane 2000)

V_e = volume d'élution de chaque pic ou fraction retenue.

On estime le poids moléculaire en fonction du K_{av} avec l'abaque de la figure 3 :

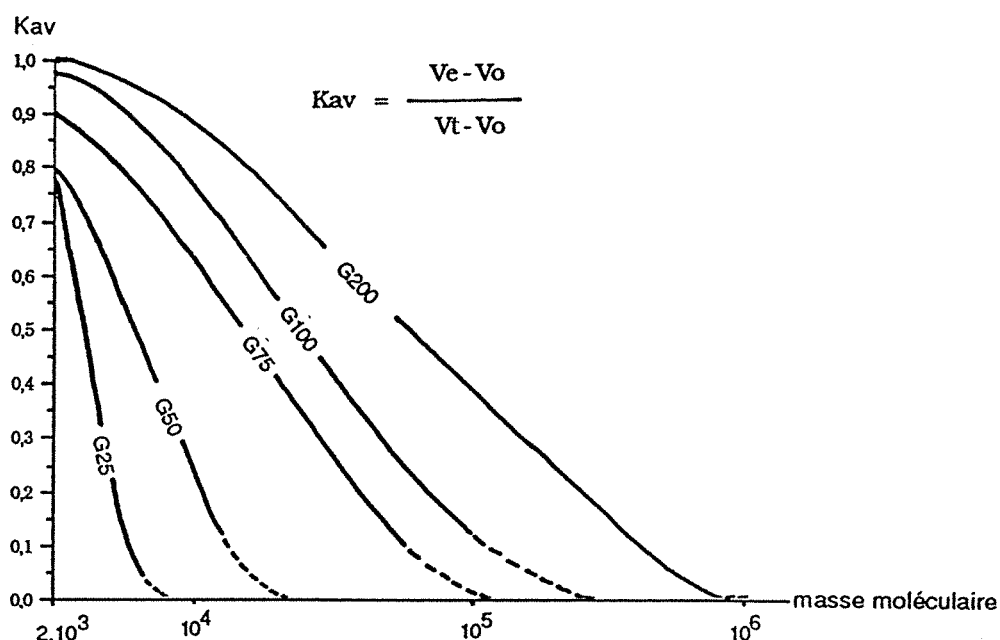


Figure 3.- Evolution des K_{av} en fonction de la masse moléculaire (échelle logarithmique) pour des protéines globulaires (ANDREWS, 1964)

I-10-5.- Dégradation acide des polycondensats purifiés

L'acide chlorhydrique est un réactif classique utilisé pour l'hydrolyse des protéines. Il est utilisé depuis plusieurs années pour l'étude des substances humiques. Cette technique dégradative est utilisée souvent pour l'analyse des composés entrant dans la constitution des macromolécules humiques. Ainsi, le traitement chlorhydrique à reflux des molécules humiques provoque la libération de molécules simples par rupture des liaisons esters, éthers ou amides

(PARSONS, 1989). Mais cette technique est utilisée aussi pour tester la stabilité chimique et pour avoir des indications sur le degré de condensation et d'humification (HAIDER *et al.*, 1965 ; METCHE *et al.*, 1970 ; ANDREUX *et al.*, 1971 ; SCHNITZER *et KHAN*, 1972 ; ANDREUX, 1978 ; JOCTEUR-MONROZIER *et ANDREUX*, 1981 ; JOCTEUR-MONROZIER *et DUCHAUFOR*, 1986 ; BARRIUSO *et al.*, 1990).

a) Matériel

- Ballons à fond rond et col rodé de 250 ml
- Rampe à hydrolyse : bain de sable à température stabilisée (130°C) et réfrigérants à boules sous courant d'eau
- Système d'ultrafiltration "Millipore" équipé d'un filtre en polyvinyle (nitrate de cellulose) "BDWP" de 0,45 µm. Les filtres "Millipore" sont séchés sous vide phosphorique (P₂O₅) pendant une nuit avant pesée.
- Evaporateur rotatif "BUCHI-ROTAVAPOR R"
- pH-mètre "Tacussel Minisis 5000"

b) Réactifs : Acide chlorhydrique (HCl) 3N

c) Protocole :

Un poids équivalent à 25 mg de carbone est dissout dans 100 ml d'acide chlorhydrique 3N avant hydrolyse sous reflux pendant 16 heures. A la fin de l'hydrolyse, le ballon est refroidi et l'hydrolysate est récupéré par ultrafiltration. Le résidu insoluble d'hydrolyse est séché sous vide phosphorique et pesé après dessiccation pour établir le rendement de l'hydrolyse avant de poursuivre l'analyse. Le contenu en carbone et en azote du résidu séché est déterminé par combustion à sec (cf. 1-10-1).

L'hydrolysate chlorhydrique est évaporé sous pression réduite à 40°C, pour éliminer HCl, en évitant la dessiccation. Le concentré dépourvu d'HCl est repris au moins avec 4 à 5 volumes d'eau distillée.

Détermination du contenu en carbone et en azote de l'hydrolysate

Carbone

Le dosage est effectué sur une partie aliquote de l'hydrolysate dans un appareil "T.C.M. CARLO ERBA 400". Il s'agit d'une combustion en four fermé à 880°C, méthanisation du CO₂ formé et dosage par détecteur d'ionisation de flamme. Le seuil de détection est de 5 mg/l.

Azote

Sur l'hydrolysate chlorhydrique, on détermine l'azote total et l'azote ammoniacal libéré par hydrolyse;

Azote total : Méthode Kjeldahl

Minéralisation : A 25 ml d'hydrolysate chlorhydrique introduits dans un matras d'une capacité de 250ml, on rajoute 2g de catalyseur (63g de H_2SO_4 + 24 g de CuSO_4 + 3g de Se homogénéisés au broyeur à bille) et 2ml de H_2SO_4 36N. Le matras est ensuite chauffé sur une plaque chauffante à 130°C pendant une nuit. La minéralisation est considérée comme terminée lorsque la solution devient claire et prend une couleur verdâtre.

Distillation :

* Matériel

- Distillateur semi-micro type Kjeldahl
- pH-mètre "Tacussel Minisis 5000"

* Réactifs

- Hydroxyde de sodium Titrisol (NaOH) 0,01 N
- Acide sulfurique Titrisol (H_2SO_4) 0,01 N
- Indicateur de pH, Bleu de Tashiro : Solution de Rouge de méthyle à 0,15% dans l'alcool et solution de Bleu de méthylène à 0,2% (5 : 1(v/v))
- Lessive de soude (NaOH 13N)
- Tampon borate pH 8,8 (8 g d'acide borique (H_3BO_3) + 40 g de tétraborate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$))

Dosage : L'ammoniac formé par minéralisation de l'hydrolysate est déplacé par de la lessive de soude (NaOH 13N) et distillé par entraînement à la vapeur dans une quantité connue de H_2SO_4 0,01N. On titre ensuite en retour par NaOH 0,01 N en présence de Bleu de Tashiro sous contrôle pH-métrique (pH = 5,3).

Azote ammoniacal libéré par hydrolyse acide

25 ml d'hydrolysate amenés à pH 6,6 avec NaOH 1N sont distillés par entraînement à la vapeur en présence de tampon borate pH 8,8. L'ammoniac entraîné est dosé comme dans le cas de l'azote total (cf.b-1-2.).

I-10-6.- Réduction au borohydrure de sodium (BH_4Na) des polycondensats purifiés

Cette méthode est utilisée, dans ce travail, principalement pour compléter les résultats des spectres UV-Vis et IR pour confirmer la présence des groupements carbonyles, quinones ou cétones. En effet, le BH_4Na réduit les fonctions cétones ou quinones en groupements hydroxyles correspondants, et respecte les autres fonctions insaturées telles que $-\text{C}=\text{O}$ carboxyliques, amides ou esters.

a) Réactifs

- Borohydrure de sodium : BH_4Na
- Méthanol

b) Protocole

50 mg de polycondensat purifié sont mis en solution aqueuse avec 1 g de BH_4Na . La réduction se déroule, dans un flacon sous courant d'azote, à la température du laboratoire (18-20°C). Après 24 h de réduction, l'excès de BH_4Na est détruit par le méthanol, et la solution est dialysée contre de l'eau distillée. Le polymère réduit est décationisé sur résine échangeuse de cations (H^+), puis lyophilisé et séché sous vide phosphorique.

I-10-7.- Microdétermination des groupements $-\text{NO}_2$ et $-\text{N}=\text{O}$ par la méthode de Kjeldahl

Cette méthode peut être utilisée pour la détermination des groupements nitro ($-\text{NO}_2$) et nitroso ($-\text{N}=\text{O}$). Elle consiste à réduire ces groupements en fonctions aminées pour les transformer finalement en ammoniac. Ce dernier est dosé par titration en retour après distillation suivant la méthode de Kjeldahl. Toutefois, cette méthode a l'inconvénient de ne pas être sélective car l'ensemble des groupements azotés tels que amines, azo et oximes peuvent être déterminés simultanément (KRUSE, 1970). Son application aux polycondensats synthétiques a l'avantage de nous renseigner sur la présence d'azote sous toutes ces formes.

a) Matériel

- Matras de 50 ml
- Distillateur type Kjeldahl
- pH-mètre

b) Réactifs

- Poudre de zinc
- Acide acétique
- HCl concentré
- Ethanol

c) Protocole

Un poids de polycondensat purifié correspondant au moins à 0,7 mg d'azote est introduit dans un matras de 50 ml avec 1 ml d'acide acétique pour dissoudre l'échantillon. Le milieu réactionnel est chauffé légèrement pour faciliter la solubilisation du polycondensat ; après refroidissement on lui rajoute 100 mg de poudre de zinc et 1,5 ml d'éthanol. On ajoute ensuite 2 gouttes (0,1 ml) d' HCl concentré pour démarrer la réduction. Quand le dégagement gazeux tend à diminuer on rajoute 0,1 ml d' HCl concentré (au total 0,6 ml d'HCl sont rajoutés). On chauffe avec précaution le milieu réactionnel pour faciliter le dégagement de H_2 . L'azote ainsi réduit en NH_4OH est dosé après distillation par titrage en retour (cf. b-1-2, p. 26).

I-11.- DOSAGE COLORIMETRIQUE DES AMINOACIDES (MOORE and STEIN, 1954)

L'une des réactions les plus utilisées pour caractériser la fonction azote α -aminé est la réaction à la ninhydrine. Elle est appliquée à la détermination quantitative des aminoacides α -aminés.

La ninhydrine entraîne la décarboxylation des aminoacides. L'ammoniac et l'hydrindantine ainsi formés réagissent avec une seconde molécule de ninhydrine pour former un composé pourpre auquel l'acide ne fournit qu'un atome d'azote.

L'azote libre sous forme ammoniacale contenu dans la solution de départ est dosé par la méthode de Kjeldahl (cf. b-1-2, p. 25).

a) Matériel

- Tubes à essais (diamètre : 1,5cm ; H : 18cm)
- Bain marie à ébullition
- Spectrophotomètre (570 nm)

b) Réactifs

- Ninhydrine
- Hydrindantine
- Tampon acétate pH 5,5 : 544 g d'acétate de sodium ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) + 100 ml d'acide acétique (CH_3COOH) complété à 1 litre avec H_2O distillée.
- Méthylcellosolve ($\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)
- Ethanol 50%
- Solution de Leucine ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$), 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (327,5 mg/250 ml dans l'eau)
- Réactif à la ninhydrine (préparation extemporanée) : dans un récipient opaque à la lumière, 400 mg de ninhydrine + 60 mg d'hydrindantine + 15 ml de méthylcellosolve + 5 ml de tampon acétate pH 5,5.

c) Protocole

1 ml de milieu réactionnel dilué 2 fois (0,5 ml du milieu réactionnel + 0,5 ml H_2O distillée) est mélangé à 1 ml de réactif à la ninhydrine. Les tubes sont agités, bouchés et portés au bain marie pendant 15 min. Après chauffage, on dilue le milieu réactionnel avec de l'éthanol, jusqu'à un volume de 15 ml. Les tubes sont refroidis sous courant d'eau froide, puis agités pour oxyder l'excès d'hydrindantine.

On établit selon le même protocole une courbe étalon à partir de solutions témoins de leucine de concentrations connues après dilution 1 à 10 fois de la solution mère dans l'eau.

Les concentrations en N α -aminé des milieux réactionnels sont calculées par rapport à cette courbe. Les valeurs obtenues correspondent à la somme (N α -aminé + N- NH_4^+), la teneur en N α -aminé est calculée d'après la différence entre la teneur en (N α -aminé + N- NH_4^+) et la teneur en N- NH_4^+ déterminée par distillation.

I-12.- DOSAGE DE ^{14}C . SCINTILLATION LIQUIDE

L'utilisation des traceurs radioactifs permet de suivre la dégradation et/ou l'incorporation d'un composé organique donné dans les produits de la réaction (GUCKERT *et al.*, 1968). Cette technique permet de suivre, dans notre cas, la réactivité de la glycine dans le système catéchol-glycine-nitrite. La technique de scintillation liquide est parfaitement adaptée au dosage du ^{14}C dans la phase gazeuse ($^{14}\text{CO}_2$) et dans le milieu réactionnel.

a) Matériel : Spectromètre à scintillation liquide "Packard 4430" équipé d'un dispositif de standardisation externe.

b) Réactifs : Liquide scintillant "Lumagel" de KONTRON

c) Protocole

Le $^{14}\text{CO}_2$ formé, déplacé par un courant d'hélium est recueilli dans une solution de NaOH 0,45N. Un ml de cette solution est ensuite introduit dans 9 ml de liquide scintillant. Le comptage des désintégrations est exprimé en désintégrations par minute (DPM).

Pour les autres extraits (dialysat et adialysat), 0,1 ml de chaque solution est amené à 1 ml avec de l'eau distillée avant transfert dans 9 ml de liquide scintillant.

I-13.-DETERMINATION DE ^{15}N PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'EMISSION OPTIQUE

L'utilisation du nitrite de sodium enrichi à raison de 5,9 % en ^{15}N dans la réaction avec le mélange stœchiométrique catéchol-glycine, permet d'estimer les proportions d'azote incorporé dans les polycondensats finaux (PM > 2000 dal), respectivement à partir de NO_2^- et de glycine.

a) Matériel

- Distillateur semi-micro Kjeldhal
- pH-mètre "METROHM"
- Pompe à vide "EDWARDS" à diffusion d'huile
- Spectromètre d'émission optique "SOPRA"

b) Réactifs

- Acide sulfurique 36 N
- Hydroxyde de sodium Titrisol (NaOH) 0,01 N
- Acide sulfurique Titrisol (H_2SO_4) 0,01 N
- Indicateur de pH Bleu de Tashiro
- Lessive de soude (NaOH 13N)
- Catalyseur (63 g K_2SO_4 + 24 g CuSO_4 + 3 g Se)
- Oxyde de cuivre(CuO)

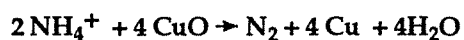
c) Protocole

Dosage de l' azote total

L'azote de l'échantillon (hydrolysate ou polymère) est préalablement transformé en ammoniac et déterminé par la méthode Kjeldahl. L'azote ammoniacal recueilli dans H_2SO_4 N/100 est titré en retour par NaOH N/100. Le résultat exprimé en azote ammoniacal permet de connaître la teneur en azote total.

Conversion des ions NH_4^+ en N_2 gazeux : Méthode de GUIRAUD et BUSCARLET (1975) modifiée par MARTIN *et al.*, (1981).

La solution de sulfate d'ammonium provenant de l'entraînement à la vapeur de l'ammoniac est concentrée à 2 ml par évaporation ménagée à 80°C. Le sulfate d'ammonium est transformé en N_2 par oxydation en présence d'oxyde cuivrique dans une ampoule sous vide à 600°C :



La teneur en azote isotopique est calculée par rapport à une courbe étalon établie dans les mêmes conditions à partir de l'étalon standard ($^{15}\text{NH}_4$) $_2\text{SO}_4$ (ONIA).

DEUXIÈME PARTIE

*ETUDE DE LA RÉACTION ENTRE
LE PYROGALLOL ET NO₂⁻*

ETUDE DE LA RÉACTION ENTRE LE PYROGALLOL ET NO_2^-

INTRODUCTION

Les premières étapes de l'oxydation du pyrogallol et de ses dérivés sont amplement commentées (CRITCHLOW *et al.*, 1967). Toutefois dans ce contexte il existe peu d'information sur le devenir des produits d'oxydation et sur la formation des produits de polycondensation.

Les composés polyphénoliques, essentiellement les o. ou p. diphénols, peuvent donner lieu à polycondensation oxydative spontanément à la température ambiante et au pH des sols (FLAIG, 1964, 1970 ; ANDREUX *et al.*, 1971 ; ANDREUX et METCHE, 1974 ; SCHVARTZ, 1975). L'oxydation et la polymérisation peuvent être catalysées par les polyphénols oxydases (KUPREVICH et SHCHERBAKOVA, 1971 ; FLAIG *et al.*, 1975 ; SJOBLAD et BOLLAG, 1981), et par certains cations de métaux lourds incorporés aux argiles (KUMADA et KATO, 1970 ; WANG *et al.*, 1976 ; MORTLAND et HALLORAN, 1976)

L'ion nitrite peut jouer le rôle d'oxydant à l'égard des o. et p. diphénols dans certaines conditions du sol, et entraîner la formation de polycondensats dont la nature humique ou la proximité avec les polycondensats humiques naturels mérite d'être examinée.

CHAPITRE I

OXYDATION DU PYROGALLOL

OXYDATION DU PYROGALLOL

I.- OXYDATION DU PYROGALLOL : RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

I-1.- AUTO-OXYDATION DU PYROGALLOL

Le pyrogallol à la concentration de 0,032 M est oxydé en présence d'oxygène dans un tampon phosphate de pH 8. La réaction se déroule pendant 5 jours sous agitation continue. L'observation du mélange réactionnel permet de constater le développement d'une coloration jaune qui vire au brun-noir en fonction du temps. L'évolution, en fonction du temps, du spectre UV-Vis (Figure 4) du mélange réactionnel permet d'observer une augmentation de l'intensité d'absorption du Visible vers l'UV. Ainsi le spectre UV-Vis du mélange réactionnel après 30 secondes, comparé à celui du pyrogallol qui absorbe à 268 nm, permet de noter l'apparition d'une nouvelle bande située à 335 nm. Une deuxième bande d'absorption, située vers 400 nm, apparaît après 2 minutes de réaction. L'intensité d'absorption de ces deux nouvelles bandes s'accroît avec l'avancement de la réaction ; elle est accompagnée de la disparition de la bande spécifique du pyrogallol (Figure 4). Un épaulement est observé aussi vers 430 nm. Ces bandes d'absorption sont attribuées communément à des groupements chromophores de type quinonique. Ce résultat témoigne de l'oxydation du pyrogallol avec formation de produits comportant des groupements carbonyles.

L'observation du mélange réactionnel permet de noter, au bout de 30 minutes, la formation d'un produit insolubilisé que l'on a isolé (porosité : 0,45 μm). Les spectres dans l'UV-Vis (Figure 5) et dans l'infra-rouge (Figure 6) du produit isolé ont permis de l'identifier à la purpurogalline, produit en C_{13} et à noyau tropolone (Equation I, page 46).

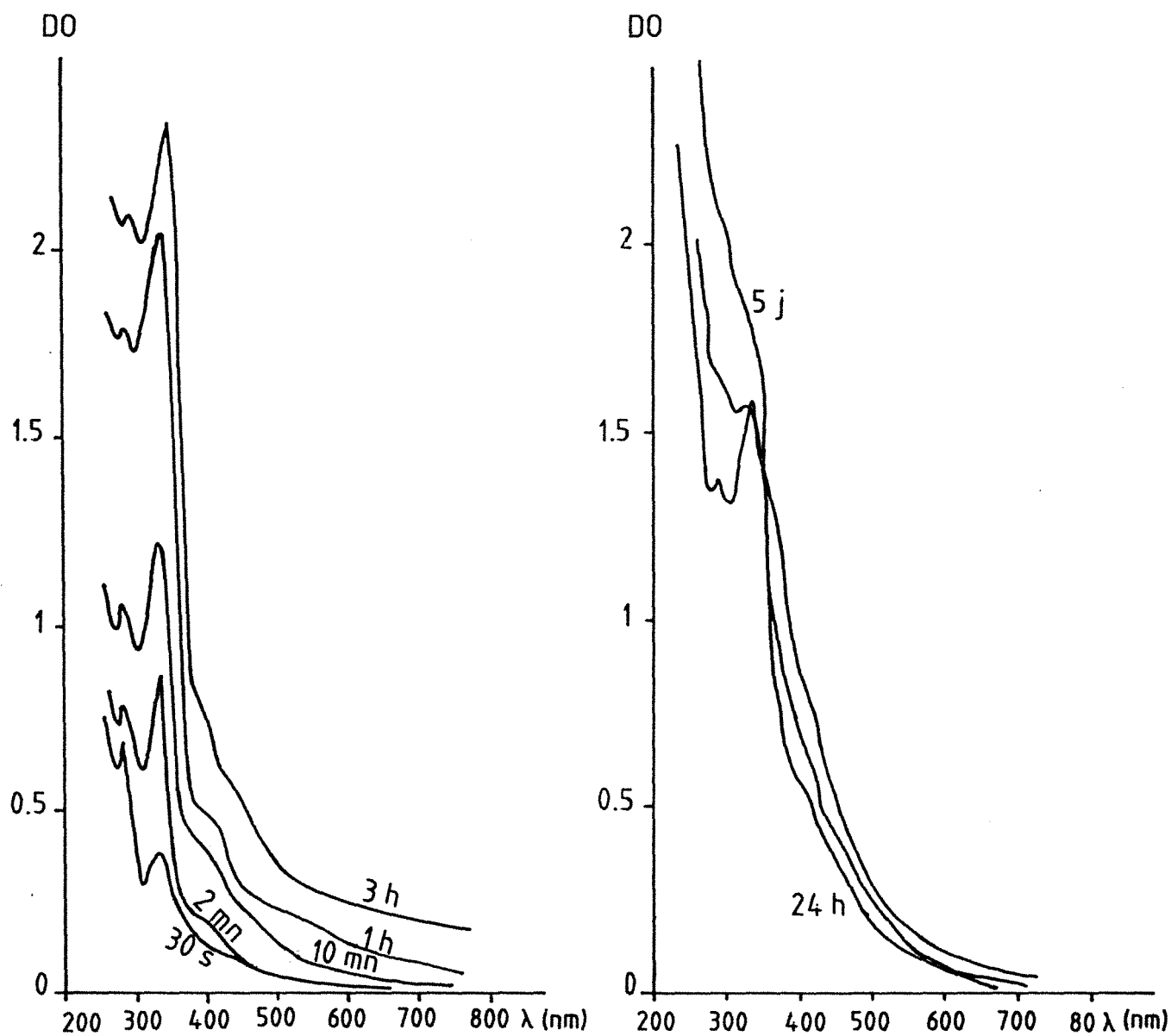


Figure 4 : Spectres d'absorption dans l'UV-Vis (200-800 nm).
 Evolution en fonction du temps de l'absorption dans l'UV-Vis du mélange réactionnel, formé de pyrogallol (0,032 M) et d'oxygène en milieu tamponné de pH 8.
 1 ml du mélange réactionnel est dilué 50 fois avec H₂O distillée.

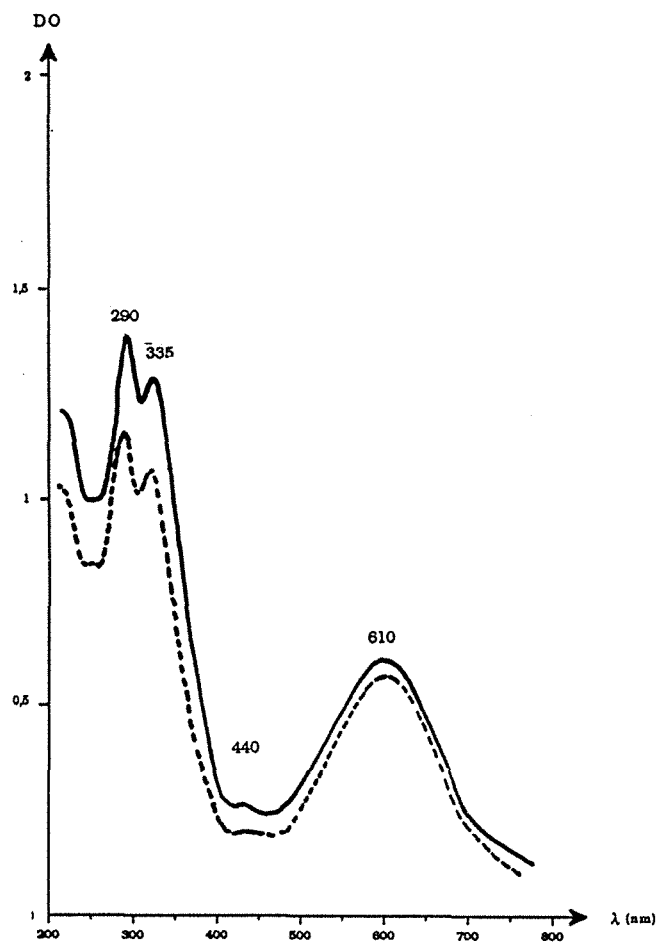


Figure 5.- Spectre d'absorption dans l'UV-Vis (200-800 nm) du produit insoluble isolé par filtration sur filtre Millipore (0,45 μ m) formé par auto-oxydation du pyrogallol en milieu tamponné de pH 8 à la température ambiante (18-20°C). Concentration 50 mg/l NaOH 0,01 M.
(—) Produit isolé - (---) Purpurogalline pure commerciale.

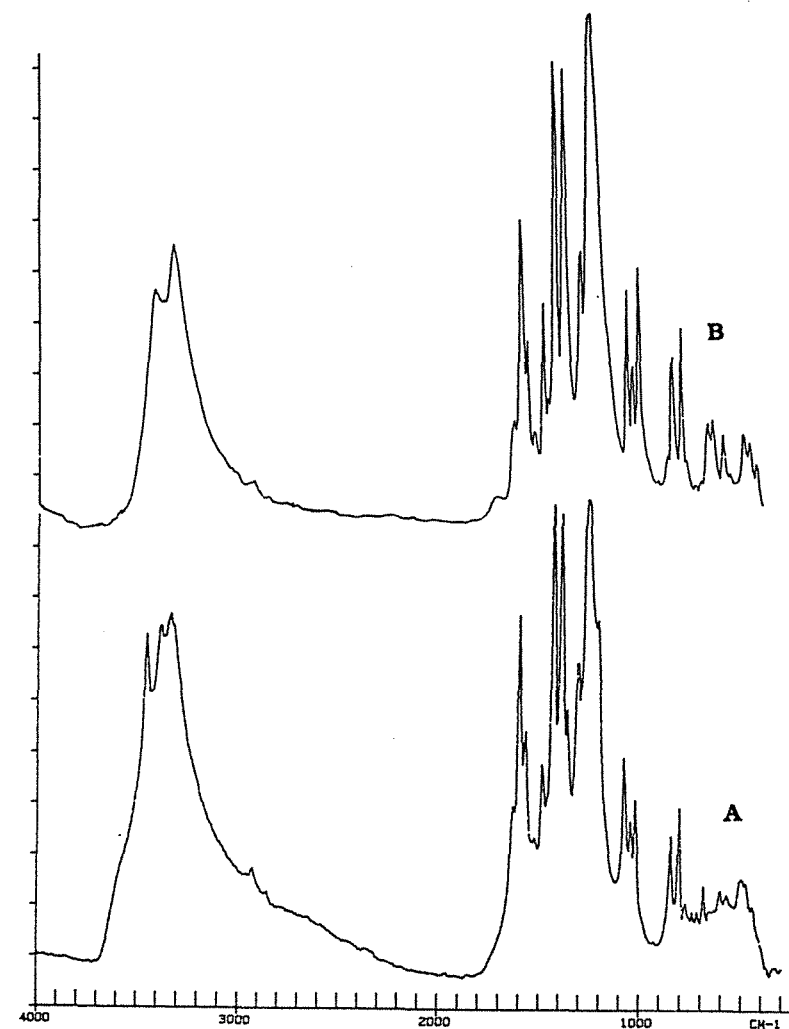


Figure 6.- Spectres IR du produit isolé par filtration sur filtre Millipore (0,45 μ m) formé par auto-oxydation du pyrogallol en milieu tamponné de pH 8 à la température ambiante (18-20°C). Concentration 1 mg/200 mg KBr
A : Produit isolé - B : Purpurogalline pure commerciale.

La purpurogalline pure dissoute dans le tampon phosphate de pH 8 absorbe fortement dans l'UV à 335 nm et à une intensité moindre à 290 et 240 nm (figure 7). Ceci nous permet de corréler la bande située à 335 nm avec la formation très rapide de la purpurogalline au cours de l'auto-oxydation du pyrogallol. Le spectre UV-Vis du mélange réactionnel au bout de 24 h de réaction (Figure 4) fait apparaître une décroissance de l'intensité d'absorption de la bande 335 nm au profit soit de l'oxydation de la purpurogalline soit de son insolubilisation. Au terme de 5 jours de réaction, la quantité de purpurogalline résiduelle est équivalente à 2,3 % du poids total de carbone imputable au pyrogallol mis en œuvre.

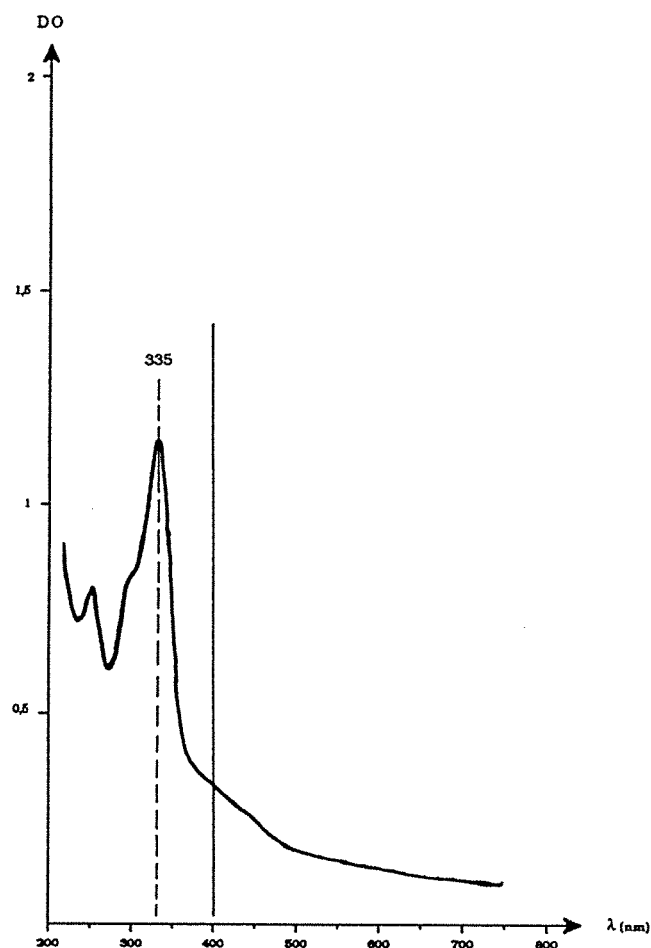


Figure 7.- Spectre d'absorption UV-Vis (200-800 nm) d'une solution de purpurogalline pure dans le tampon phosphate de pH 8. Concentration : $1,36 \times 10^{-7}$ M.

I-2.- OXYDATION DU PYROGALLOL PAR LA PEROXYDASE DE RAIFORT EN PRESENCE DE PEROXYDE D'HYDROGENE

Le mélange réactionnel formé de pyrogallol (0,005 M), de peroxydase (4,4U) et de H_2O_2 (0,01 M) dans un tampon phosphate de pH 7 et en l'absence d'oxygène gazeux, développe une couleur jaune. Cette coloration est accentuée avec l'addition de quantités supplémentaires de H_2O_2 .

L'établissement du spectre UV-Vis du mélange réactionnel en fonction du temps (1 ml de milieu réactionnel dilué 50 fois dans l'eau distillée) fait apparaître des bandes nouvelles par rapport au spectre UV-Vis du milieu de référence (milieu réactionnel formé de pyrogallol dans le tampon phosphate de pH 7 en l'absence d' O_2) avec accroissement de l'intensité d'absorption du Visible vers l'UV (Figure. 8). On distingue une bande bien définie située à 335 nm, en même temps qu'un épaulement situé à 440-450 nm. Des groupements chromophores de nature quinonique peuvent être responsables de l'absorption dans ces deux régions.

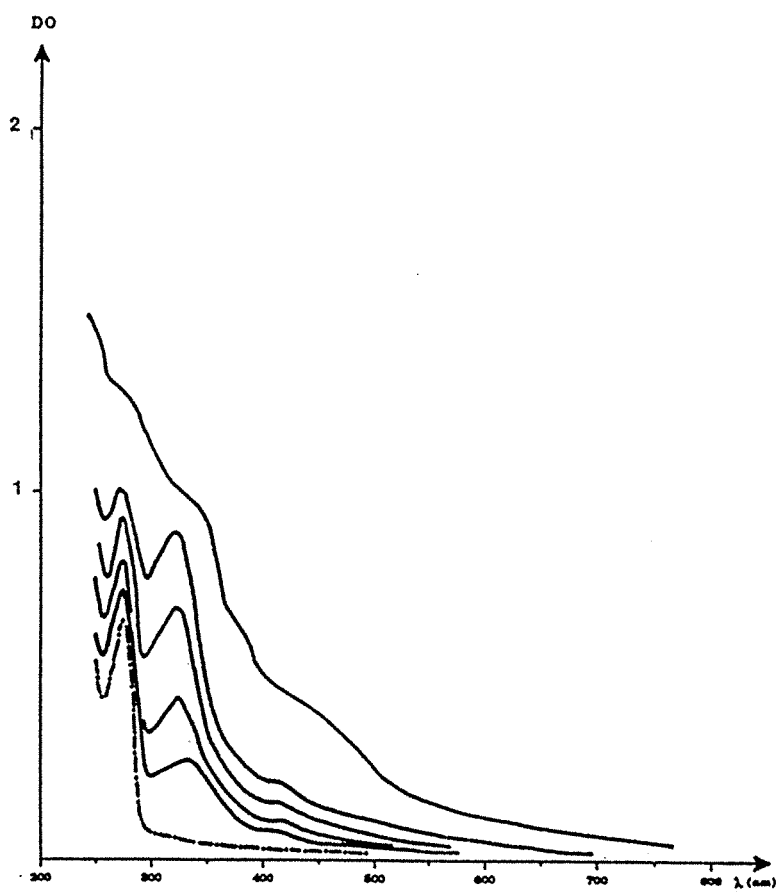
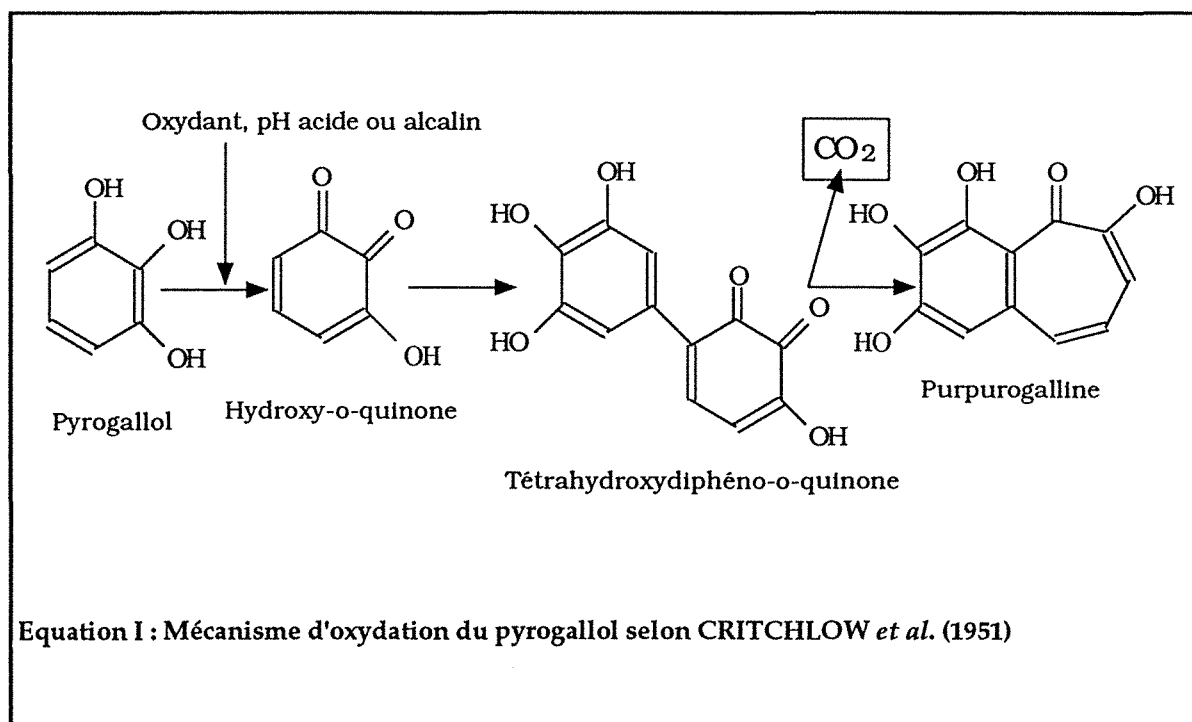


Figure 8.- Spectres d'absorption dans l'UV-Vis (200-800 nm). Evolution de l'absorption en fonction du temps du mélange réactionnel, formé de pyrogallol (0,005M), de peroxydase de Raifort (4,4U) en présence de H_2O_2 (0,01M) en milieu tamponné de pH 7 (—) 1 ml du mélange réactionnel est dilué 50 fois avec H_2O distillée. (---) : Spectre UV-Vis du milieu de référence formé de pyrogallol dans le tampon phosphate de pH 7.

Comme dans le cas de l'auto-oxydation du pyrogallol à pH 8, on a pu isoler un précipité à la fin de la réaction (5 jours) qui par ailleurs pourrait être responsable de l'absorption dans l'UV à 335 nm. Ce précipité est identifié à la purpurogalline par comparaison des spectres d'absorption dans l'UV-Vis et dans l'infra-rouge avec ceux de la purpurogalline pure.

I-3.- DISCUSSION

L'oxydation du pyrogallol par l'oxygène à pH 8 ou par la peroxydase de Raifort en présence de H_2O_2 à pH 7 aboutit à des résultats semblables, au moins en ce qui concerne les étapes intermédiaires de la réaction. Dans les deux cas, on observe la formation de produits intermédiaires assimilés à des produits quinoniques. La nature de ces produits est comparable à celle définie par CRITCHLOW *et al.* (1951) dans des conditions différentes de celles retenues dans ce travail. Ils ont noté que "le pyrogallol se convertit en purpurogalline avec une facilité remarquable par une variété d'agents oxydants dans des conditions de pH neutre ou faiblement acide". Ces auteurs ont obtenu la formation de purpurogalline en faisant réagir du pyrogallol à pH très alcalin en présence d'iodate de potassium. Ils ont conclu que la formation de la purpurogalline fait intervenir la formation d'intermédiaires quinoniques tels que la 3-hydroxy-o-diquinone qui se condense ensuite avec le pyrogallol pour donner la tétrahydroxydiphéno-o-quinone. C'est ce dernier produit qui se transforme en purpurogalline après avoir perdu une molécule de CO_2 .



L'obtention de la purpurogalline au cours de l'oxydation du pyrogallol par voies chimique et enzymatique suggère la formation de produits de nature quinonique, certainement par un mécanisme voisin de celui décrit par CRITCHLOW *et al.* (1951). Ainsi le CO_2 dégagé est issu de l'ouverture des cycles aromatiques.

Le spectre UV-Vis du mélange réactionnel (Figures 4 et 8) fait apparaître un accroissement de l'absorption du Visible vers l'UV avec un effacement des maxima, 268 et 335 nm, et subsistance de l'épaulement situé à 430-440 nm. Ce comportement du mélange réactionnel dans l'UV-Vis est corrélé avec l'apparition progressive de molécules de taille importante résultant de la polycondensation oxydative du pyrogallol.

I-4.- OXYDATION DU PYROGALLOL PAR NO_2^- : RESULTATS ET DISCUSSION

I-4-1.- Formation de produits quinoniques

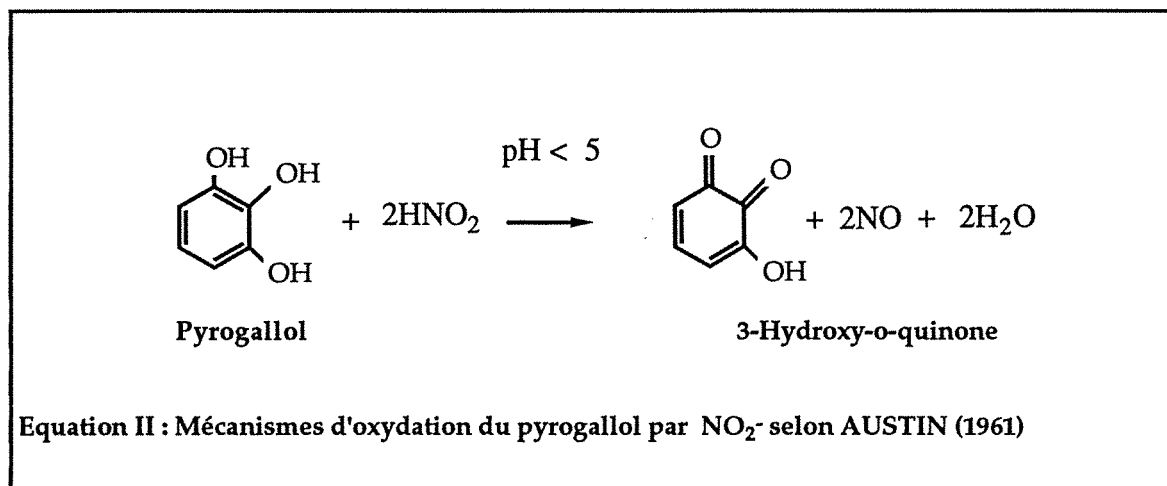
La réactivité du mélange réactionnel, formé de pyrogallol (0,032 M) et de NaNO_2 (0,15 M) dans le tampon phosphate de pH 5 et en absence d'oxygène, a été suivie par spectrophotométrie UV-Vis en fonction du temps. Le mélange réactionnel développe dès les premières minutes une teinte jaune qui vire au brun noir au cours du temps.

Le milieu réactionnel de référence, formé de pyrogallol dans le tampon phosphate de pH 5 et en absence d'oxygène, absorbe dans l'UV-Vis à $\lambda_{\text{max}} = 268 \text{ nm}$, tandis que l'absorption du mélange réactionnel formé de pyrogallol et NO_2^- se traduit par un accroissement très significatif de l'absorbance dans la région 440-300 nm (Figure 8) (SAMRAKANDI, 1987).

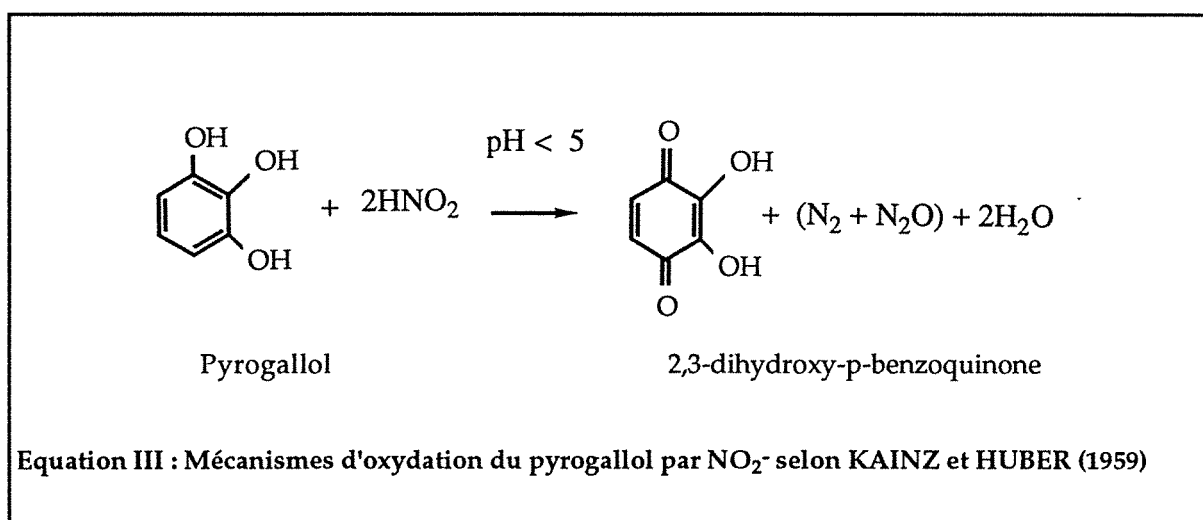
La manifestation de bandes nouvelles (440, 370 et 290 nm) est imputée à des formes quinoniques provenant de l'oxydation du pyrogallol. D'autre part nous avons pu isoler en cours de réaction un intermédiaire que nous avons identifié à la purpurogalline. Le spectre UV-Vis de la purpurogalline pure en solution aqueuse montre trois bandes ; une bande située à 295 nm avec une intensité élevée et deux épaulements situés à 370 et 450 nm. Ceci tend à montrer que dans nos conditions opératoires, l'ion nitrite, au même titre que l'oxygène en milieu alcalin ou la peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène en milieu neutre, se comporte en oxydant à l'égard du pyrogallol.

Le mécanisme débouchant sur la formation de la purpurogalline fait état de la formation d'un intermédiaire quinonique, hydroxy-o-quinone, qui se condense avec le pyrogallol pour former la purpurogalline avec perte de CO_2 . Il s'agit donc d'une polycondensation oxydative faisant intervenir vraisemblablement le même mécanisme réactionnel décrit par CRITCHLOW *et al.* (1951).

La formation par ailleurs de l'hydroxy-o-quinone peut être interprétée par le mécanisme décrit par AUSTIN (1961) (Equation II) qui stipule que l'oxydation d'un groupement α -diénol, de type réductone, en groupement α -dicarbonylé correspondant entraîne la réduction de NO_2^- en oxyde nitrique (NO).



Toutefois, il y a lieu de penser que la réaction de NO_2^- avec le pyrogallol peut conduire en même temps à d'autres composés quinoniques tels que la 2,3-dihydroxy-p-benzoquinone suivant le mécanisme décrit par KAINZ et HUBER (1959) (Equation III), bien que cette réaction soit privilégiée par un pH plus faible du milieu réactionnel (pH = 4).



L'oxydation du pyrogallol est accompagnée par ailleurs de la formation de différents produits azotés gazeux : NO, N₂ et N₂O, ce qui confirme bien le caractère réducteur du pyrogallol à l'égard de l'ion nitrite.

I-4-2.- Relation entre la formation de CO_2 et la formation de la purpurogalline

L'oxydation du pyrogallol par NO_2^- à pH 5 et en l'absence d'oxygène a été suivie dès la deuxième minute en mesurant le CO_2 dégagé par le milieu réactionnel au cours du temps. Le CO_2 dégagé est titré en retour par HCl (0,1 N) après entraînement à l'hélium et fixation sur NaOH (0,45 N).

Le dégagement du CO_2 par le milieu réactionnel est d'abord élevé, $V_0 = 13 \text{ mM/l/h}$. Ce dégagement décroît progressivement ensuite sans pour autant s'annuler. A la fin de la réaction (5 jours), la quantité de CO_2 produit par mole de pyrogallol est voisine de 0,7 M.

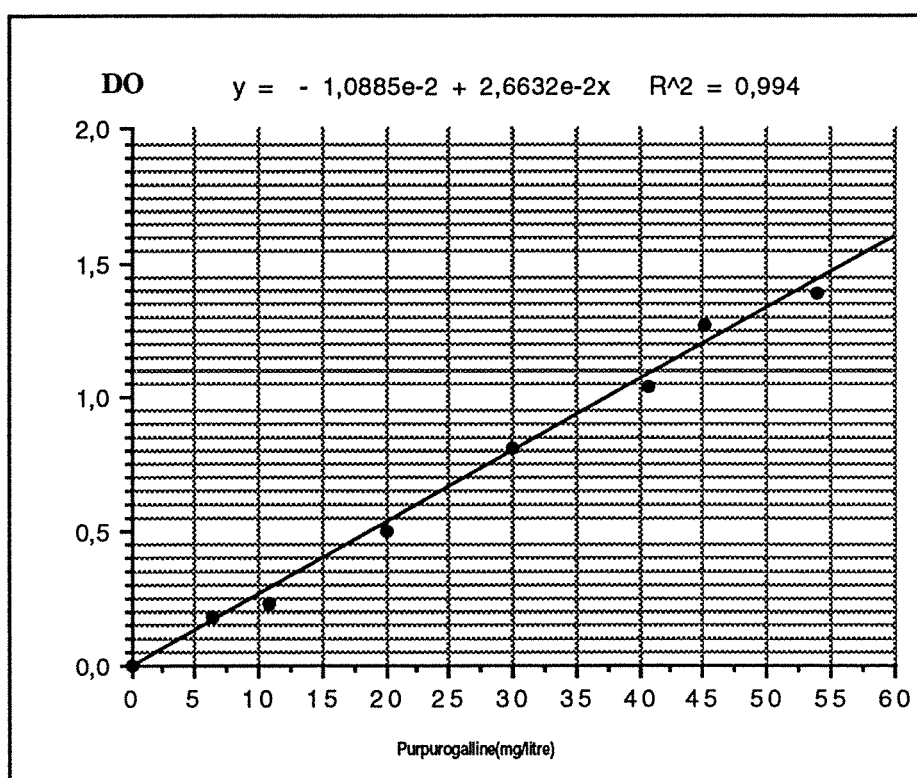


Figure 9.- Courbe étalon pour le dosage de la purpurogalline par spectrophotométrie dans le Visible (610 nm). Solutions de purpurogalline (mg/l) dans NaOH 0,01 N

Pour suivre la formation de la purpurogalline en fonction du temps dans le mélange réactionnel, on a procédé de la façon suivante :

- la purpurogalline précipitée au cours de la réaction est récupérée par filtration du mélange réactionnel sur filtre Millipore ($0,45\ \mu\text{m}$) et pesée après séchage sous vide phosphorique pendant 48 h.

- sur le mélange réactionnel filtré (filtrat), la purpurogalline soluble peut être, en principe, déterminée par spectrophotométrie dans le Visible à 610 nm après dilution d'une partie aliquote (0,5 ml) du filtrat en milieu alcalin (NaOH 0,01N) et la quantité de purpurogalline est calculée par rapport à une courbe étalon établie à partir de la densité optique (DO) à 610 nm des solutions de purpurogalline pure en concentration croissante (Figure 9). Cependant, cette détermination n'est pas adaptée à ce type de milieu réactionnel car son alcalinisation ne développe qu'une très faible coloration bleue, qui vire très vite (moins de 5 secondes) en brun foncé et absorbe alors fortement dans le visible sans bande spécifique à 610 nm. On pense que la présence du pyrogallol, qui s'oxyde rapidement en milieu alcalin en produit brun, et la faible quantité de purpurogalline soluble sont facteurs négatifs pour la détermination de la purpurogalline soluble dans le milieu réactionnel. Dans ces conditions la purpurogalline soluble n'est pas prise en compte.

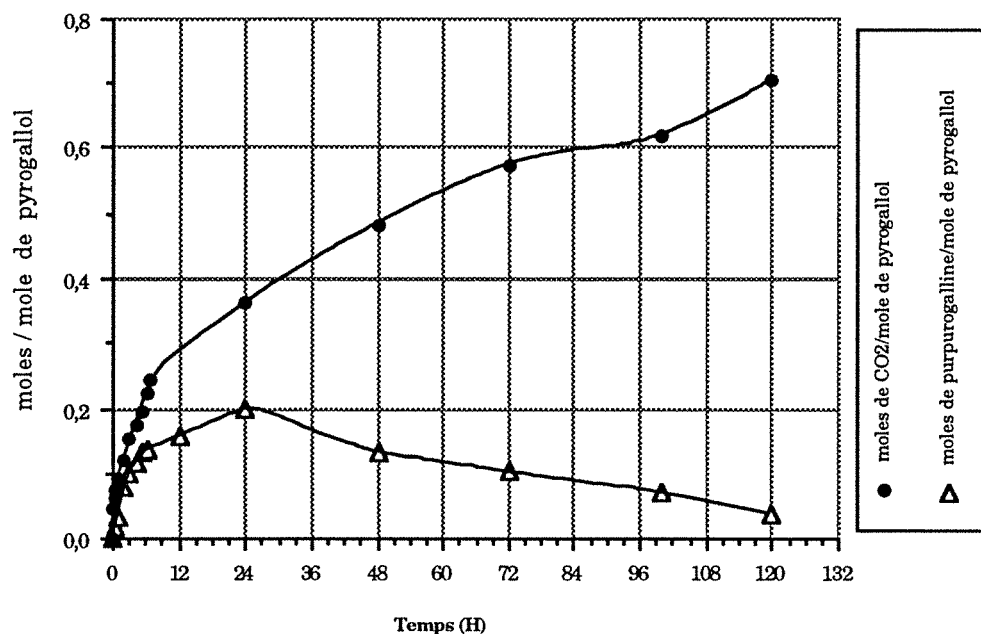


Figure 10.- Courbes de formation en fonction du temps de CO₂ et de la purpurogalline à partir du mélange réactionnel formé de pyrogallol (0,032 M), NaNO₂ (0,15 M) en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire.

Cependant, le dosage de la purpurogalline insoluble, formée dans le milieu réactionnel au cours du temps, permet d'établir une relation étroite entre le dégagement de CO_2 et la formation de la purpurogalline au cours des 24 h de réaction (Figure 10). A partir de ce temps là, on note une diminution progressive de la purpurogalline jusqu'à la fin de la réaction (5 jours) tandis que le CO_2 continue d'être dégagé. Ce résultat est en faveur d'un processus d'oxydation qui porte aussi sur les produits intermédiaires dont la purpurogalline. Ajoutons que cette dernière peut donner lieu à l'élaboration de polycondensats de taille moléculaire élevée et de structure complexe.

I-4-3.- Oxydation de la purpurogalline par l'ion nitrite

L'étude cinétique de la formation de la purpurogalline dans le milieu réactionnel, formé de pyrogallol et de NO_2^- à pH 5, permet de considérer son oxydation et sa polycondensation. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi son oxydation par NO_2^- dans les mêmes conditions que celles de son précurseur, le pyrogallol.

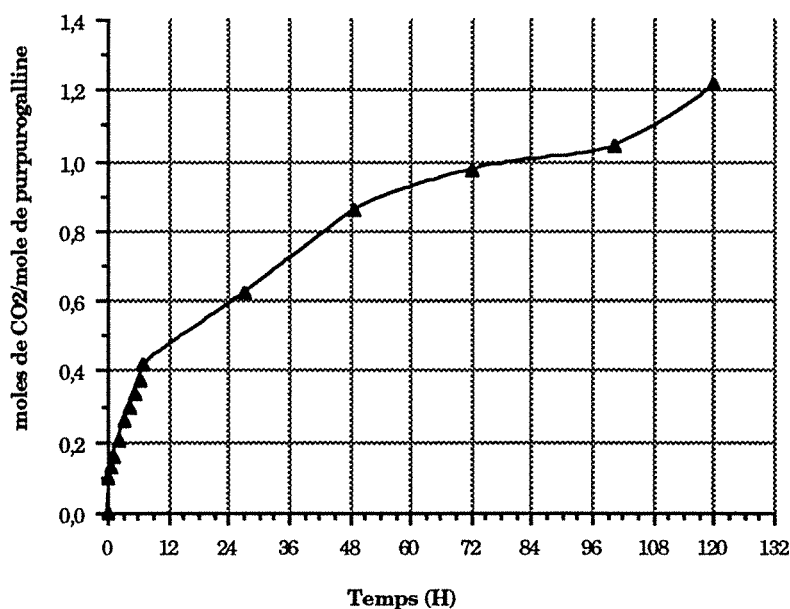
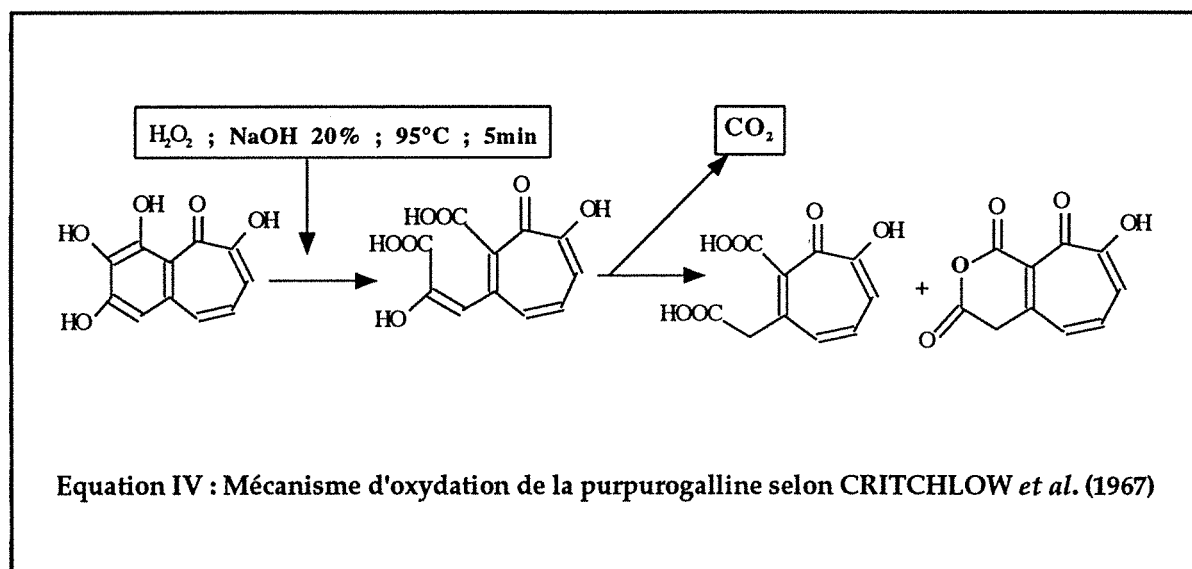


Figure 11.- Courbe de dégagement de CO_2 à partir du mélange réactionnel formé de purpurogalline (0,018M) et de NaNO_2 (0,15 M) en l'absence d'oxygène en milieu tamponné de pH 5. Température : 18-20°C

Le milieu réactionnel est formé de purpurogalline (0,018M) et de NaNO_2 (0,15M), en l'absence d'oxygène moléculaire, en milieu tamponné de pH 5. La réactivité de la purpurogalline avec NO_2^- se traduit par le dégagement de CO_2 et de produits gazeux : NO , N_2 et N_2O , ce qui confirme à la fois le rôle oxydant de NO_2^- et le caractère réducteur de la purpurogalline pour ce dernier.

Le dégagement de CO_2 d'abord élevé, $V_0 = 4 \text{ mM/l/h}$, diminue progressivement sans pour autant complètement annuler au bout 5 jours de réaction (Figure 11). Au bout de 5 jours, le bilan est de 1,2 M de CO_2 dégagé par mole de purpurogalline.

Le dégagement de CO_2 à partir de la purpurogalline est la preuve de l'ouverture des cycles aromatiques. CRITCHLOW *et al.* (1967) ont montré que l'oxydation de la purpurogalline en milieu alcalin et en présence de H_2O_2 conduit à la formation de dérivés oxydés par ouverture du cycle en C_6 accompagnée de décarboxylation avec formation de dérivés dicarboxyliques et d'anhydride (Equation IV).



CHAPITRE II

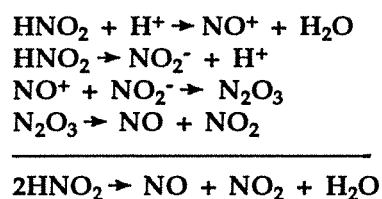
DÉCOMPOSITION DE NO₂⁻

DÉCOMPOSITION DE NO_2^-

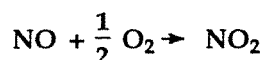
II.- DÉCOMPOSITION DE L'ION NITRITE

II-1.- RAPPEL

Selon SUZAWA *et al.*(1955), l'ion nitrite est décomposé en milieu acide ($\text{pH} < 5$) avec formation d'oxydes d'azote suivant le processus réactionnel :



La décomposition de HNO_2 conduit donc globalement à la formation d'oxydes d'azote : NO et NO_2 . Par ailleurs, NELSON et BREMNER (1970) ont montré que NO_2 peut se former en l'absence d'oxygène en remarquant toutefois que la principale source est la peroxydation de NO en NO_2 :



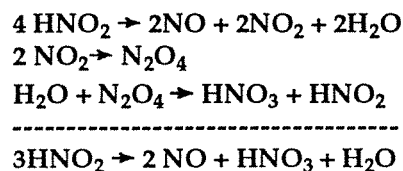
L'ion nitrosonium (NO^+) est formé par protonation de l'acide nitreux suivie de perte d'eau :



L'ion nitronium est formé dans les mêmes conditions à partir de l'acide nitrique suivant la réaction :



L'ion nitrite en milieu aqueux et en anaérobiose peut donner lieu au processus de dismutation proposé par SNEED et BRASTED (1956) :



II-2.- RESULTATS ET DISCUSSION

II-2-1.- Cinétique de décomposition de l'ion nitrite

L'étude de la décomposition de NO_2^- est poursuivie sur le mélange réactionnel formé de pyrogallol (0,032 M) et de nitrite (0,15 M) dans un tampon phosphate de pH 5 et en l'absence d'oxygène. Sur une partie aliquote de 1 ml de mélange réactionnel, prélevé à la seringue, on détermine la concentration résiduelle en NO_2^- en fonction du temps, par distillation suivant la méthode de BREMNER et KEENEY (1966).

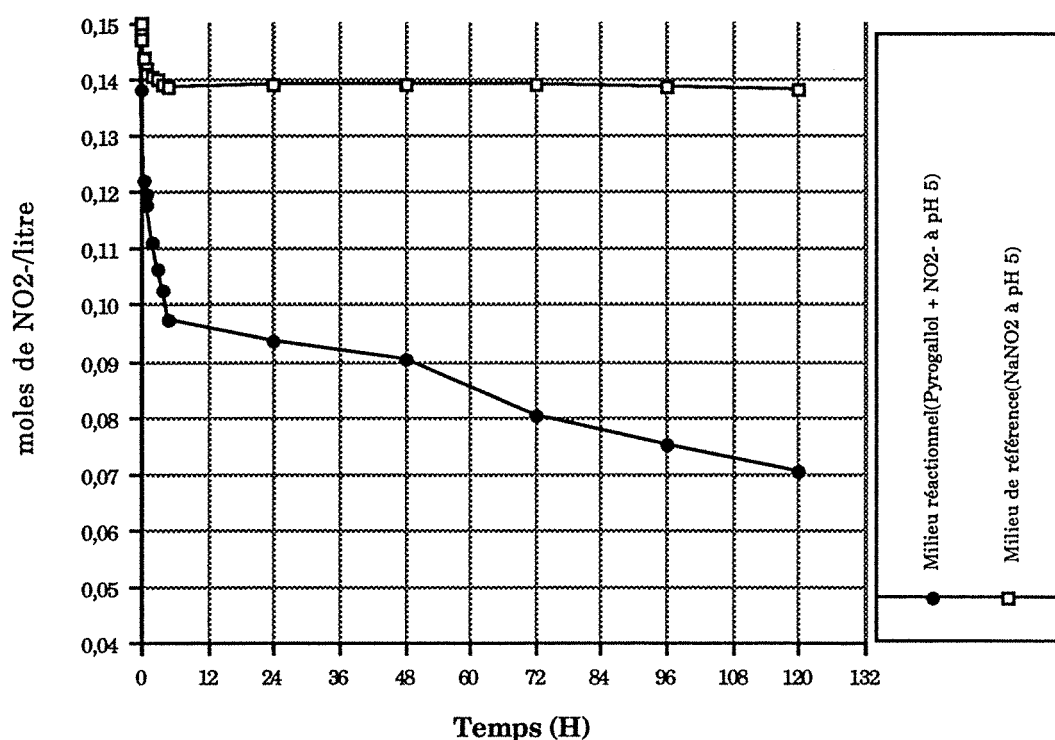


Figure 12.- Courbe de disparition de NO_2^- en fonction du temps dans le mélange réactionnel formé de pyrogallol (0,032 M) et de NaNO_2 (0,15 M) en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène.

L'évolution de la concentration en NO_2^- en fonction du temps est présentée sur la figure 12 . L'examen de cette courbe permet d'observer l'existence de deux étapes bien distinctes :

- 1^{ère} étape : la disparition de NO_2^- est très rapide, 38% de NO_2^- ont disparu en 5 h avec une $V_0 = 7,6 \text{ mM/l/h}$.
- 2^{ème} étape : la baisse de concentration de NO_2^- se poursuit à vitesse lente et pratiquement constante durant 5 jours, 17% de NO_2^- initial ont disparu pendant cette période.

La comparaison de ce résultat avec celui donné par l'échantillon de référence (NO_2^- en milieu tampon de pH 5) montre que la décomposition de NO_2^- , à ce pH, dépend essentiellement de la présence du pyrogallol. En effet, ce résultat montre bien le rôle du pyrogallol dans l'instabilité de NO_2^- . Le pyrogallol est le substrat donneur d'électrons nécessaires à la réduction de NO_2^- .

L'étude de la cinétique de formation des composés gazeux azotés au cours de la réaction de NO_2^- avec le pyrogallol devrait nous permettre de proposer un mécanisme réactionnel et de déterminer la nature des produits quinoniques formés. Selon KAINZ et HUBER (1959) les dérivés gazeux azotés formés pourraient être N_2 et N_2O avec formation de la dihydroxyhydroquinone (équation III) tandis que dans le processus réactionnel d'AUSTIN (1961) la formation d'oxyde nitrique (NO) pourrait accompagner la formation d'hydroxy-o-quinone (équation II, p. 48).

II-2-2.- Formation des oxydes d'azote

La réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu tamponné de pH 5 aboutit à la formation de produits quinoniques, mis en évidence par l'absorption dans l'UV dès la deuxième minute de la réaction et le dégagement de CO_2 . En même temps, la réduction de NO_2^- conduit à la formation de dérivés gazeux azotés (N_2 , NO et N_2O). Ces gaz sont repérés en chromatographie en phase gazeuse par leur temps de rétention. Les deux gaz (N_2 et NO), sont identifiés ensemble car ils ont le même temps de rétention. L'identification individuelle de ces gaz permet de trancher sur la nature des produits quinoniques formés.

Les mécanismes proposés par AUSTIN (1961) mettent en avant la formation de NO décrit par l'équation II ; tandis que KAINZ et HUBER (1959) proposent la formation de N_2 et N_2O en proportion équivalente suivant l'équation III. La spectroscopie Infra-rouge permet de suivre la formation de NO et N_2O en fonctions du temps.

Les constituants gazeux, NO et N_2O provenant de l'air liquide sont utilisés pour le repérage des bandes d'absorption des radiations IR ; le NO_2 est obtenu par mélange de NO et O_2 directement dans la cuve IR à pression atmosphérique et à température ambiante (18-20°C).

L'identification des différents constituants gazeux azotés dégagés par le milieu réactionnel est effectuée aux temps suivants : 15, 30, 60, 120 et 180 minutes. Les proportions relatives aux différents gaz sont représentées par leur pourcentage dans le mélange gazeux en fonction de la transmission.

La figure 13 représente les spectres d'absorption dans l'Infrarouge des mélanges gazeux témoins composés de NO et de N_2O et de NO, N_2O et CO_2 . Ces spectres montrent la présence des bandes d'absorption attribuées au peroxyde d'azote en plus de celles spécifiques aux gaz injectés dans la cuve IR. Le peroxyde d'azote est issu de l'oxydation de NO en présence des traces d'oxygène dans la cuve. Ceci permet par conséquent de considérer le NO_2 comme issu de NO.

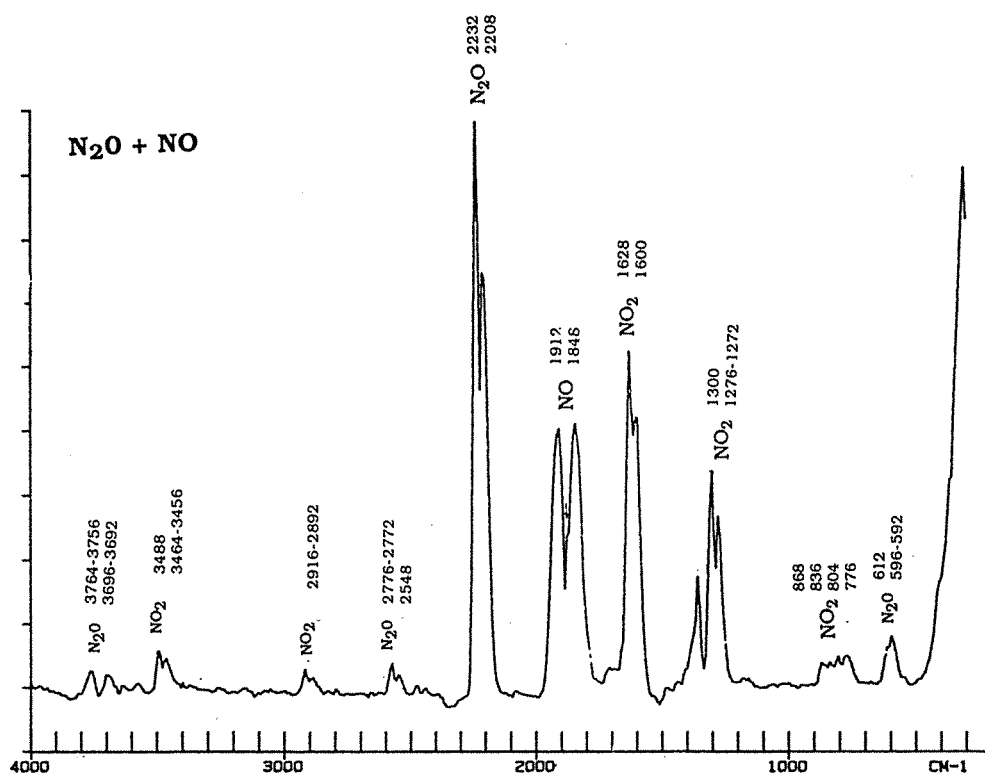
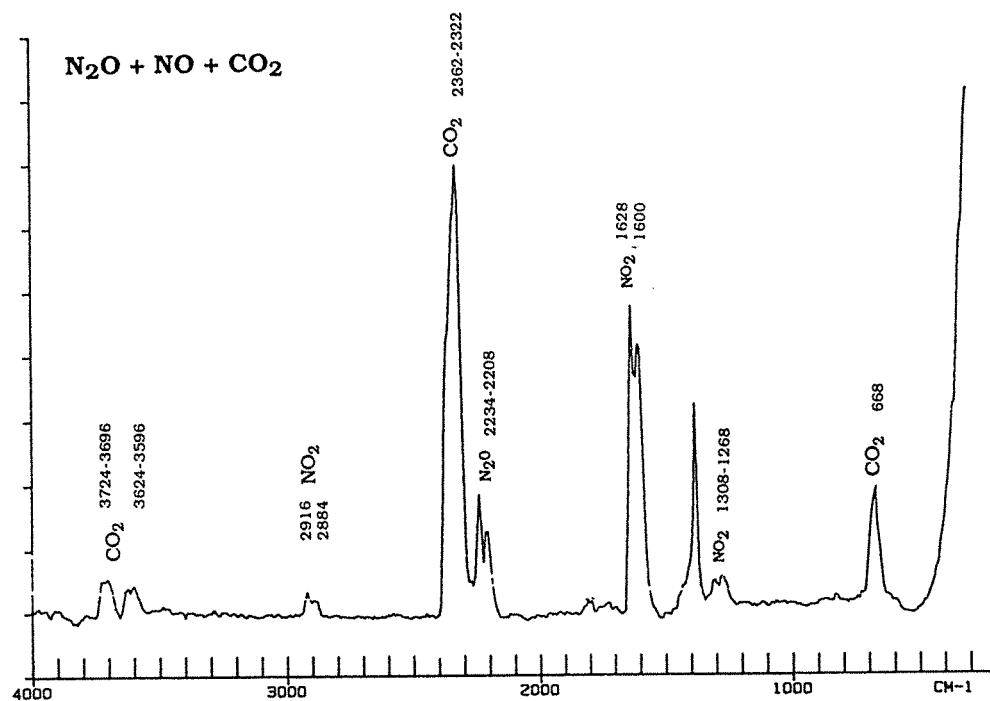


Figure 13.- Spectres d'absorption Infra-rouge d'un mélange de gaz témoins ($\text{NO} + \text{N}_2\text{O} + \text{CO}_2$) et ($\text{N}_2\text{O} + \text{NO}$).

L'établissement des courbes étalons présentées à la figure 14 montre que l'absorption des radiations IR est proportionnelle à la quantité des gaz présents dans le mélange gazeux.

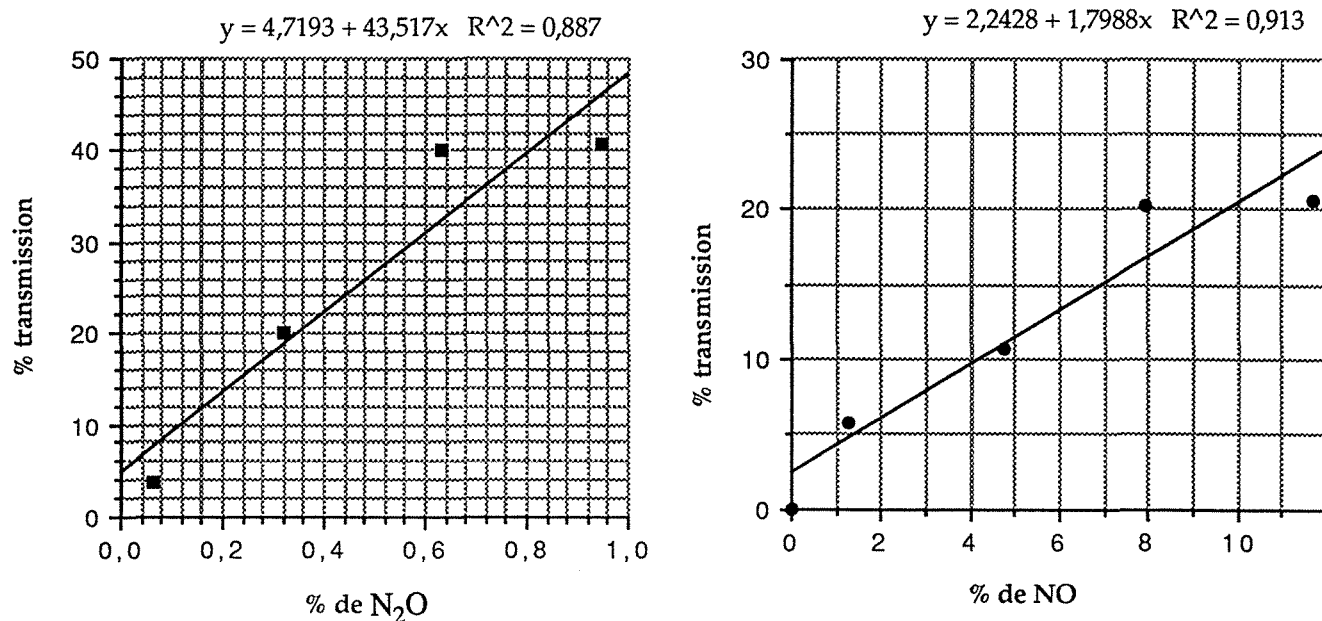


Figure 14.- Courbes étalons pour estimer l'évolution de la transmission IR des gaz NO et N_2O à des concentrations croissantes (% de gaz par rapport au volume total de la cuve IR contenant N_2)

Les résultats obtenus à partir de l'analyse dans l'Infrarouge de l'atmosphère gazeuse du mélange réactionnel montrent tout d'abord la prédominance de l'oxyde nitrique et de son produit d'oxydation, le peroxyde d'azote, à 15 minutes de la réaction. L'intensité des bandes spécifiques pour NO ($1909-1846\text{ cm}^{-1}$) et NO_2 ($1624-1600\text{ cm}^{-1}$) s'accroît au cours du temps de la réaction (figure 15 à 15 minutes et 45 minutes). Sur le spectre enregistré à 45 minutes de réaction, on peut noter la présence de N_2O ($2236-2204\text{ cm}^{-1}$) également, mais à des quantités très faibles. La présence de N_2O suppose indirectement la formation de N_2 si l'on se réfère au mécanisme de KAINZ et HUBER (1959).

Le dégagement de NO (ou NO_2) à des proportions élevées par rapport à N_2O permet de privilégier le mécanisme d'AUSTIN (1961). Ceci conduit donc à considérer la 3-hydroxy-o-quinone comme produit prédominant de l'oxydation du pyrogallol. Cette hypothèse pourrait être appuyée par les résultats de la cinétique de formation de la purpurogalline au cours de l'oxydation du pyrogallol par NO_2^- : le mécanisme de cette réaction nécessite en effet la formation d'intermédiaires tels que la 3-hydroxy-o-quinone, suivant l'équation II.

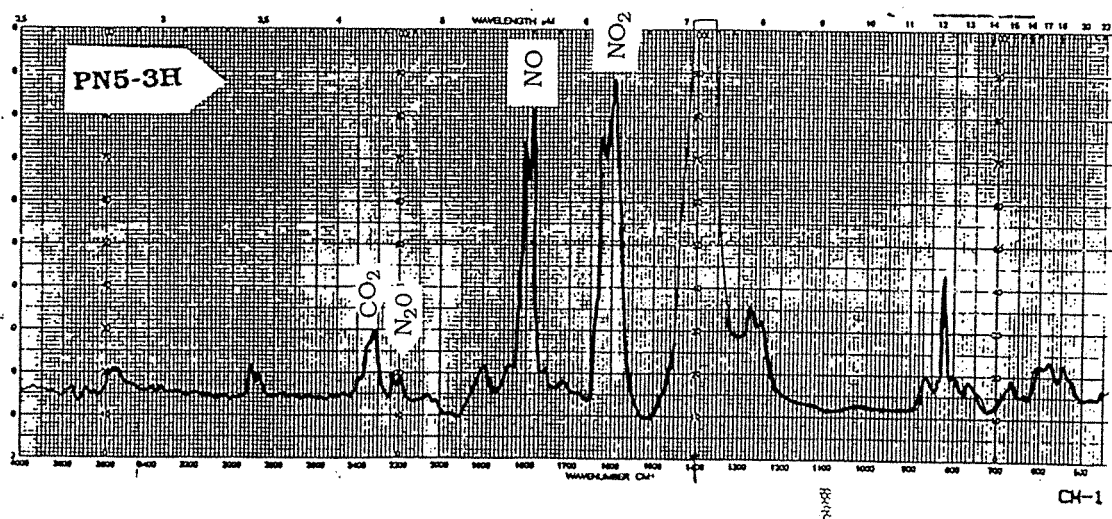
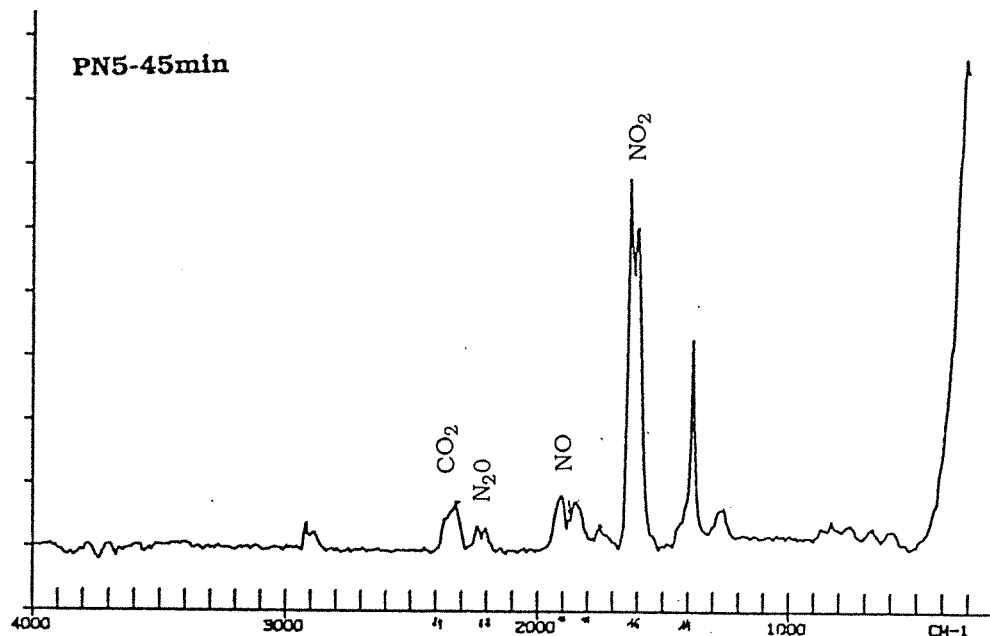
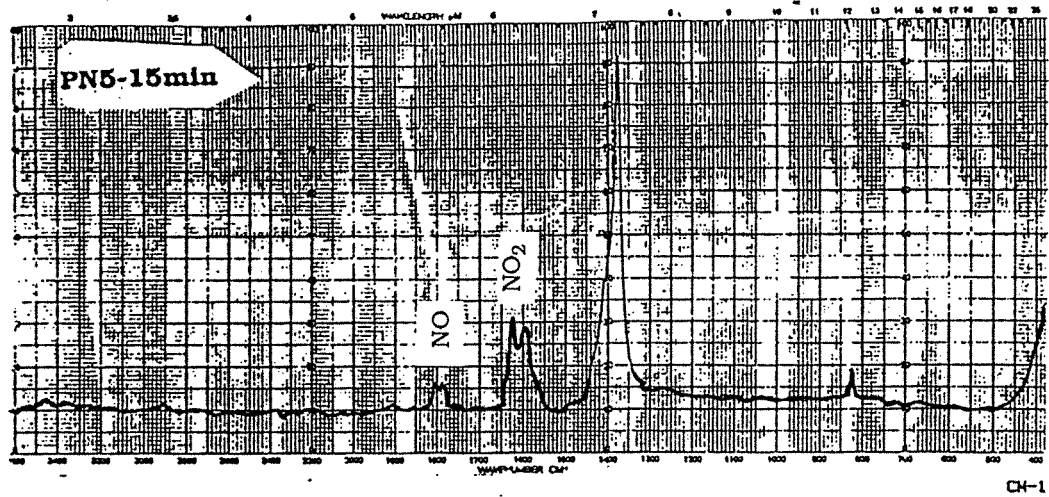


Figure 15.- Spectres d'absorption Infra-rouge des gaz issus de la réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire

La formation en revanche de N_2O dans le mélange réactionnel dès 45 minutes de réaction suggère l'existence d'intermédiaires C-nitrosés. Ces groupements sont en équilibre avec les oximes (isonitroso). Ces dérivés réagissent avec l'excès de nitrite avec formation de l'acide hyponitreux ($OH-N=N-OH$) qui se décompose en N_2O pendant que les groupements C-nitrosés réagissent avec formation d'un diazo ($=C-N=N^+$) instable qui libère de l'azote moléculaire (N_2) et du peroxyde d'azote (N_2O). Ces résultats témoignent de la complexité des mécanismes chimiques mis en jeu quand le nitrite et le pyrogallol sont présents en milieu acide (pH5).

CHAPITRE III

*CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE
DES POLYCONDENSATS ISSUS DE
L'OXYDATION DU PYROGALLOL*

**CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE DES POLYCONDENSATS
ISSUS DE L'OXYDATION DU PYROGALLOL**

On désigne par polycondensats, les produits issus d'une réaction de 5 jours du pyrogallol en présence d'un agent oxydant et en milieu tamponné. Ces produits sont isolés par dialyse au travers d'une membrane de point de coupure 2000 dal. Ils sont purifiés par passage sur résine échangeuse de cations (H^+), lyophilisés et séchés sous vide phosphorique à température ambiante pendant une semaine. Les analyses physico-chimiques sont effectuées sur ces polycondensats purifiés.

III.1.- RENDEMENT DE LA RÉACTION

La purpurogalline est isolée à la fin des 5 jours de réaction, et pesée après séchage sous vide phosphorique. Les polycondensats obtenus par dialyse sont pesés à l'état lyophilisé après décationisation et séchage sous vide phosphorique pendant une semaine. Le rendement en produits d'oxydation est exprimé en pourcentage pondéral par rapport au pyrogallol introduit dans le système au temps 0 (Tableau III).

Tableau III.- Rendements de la réaction (5 jours) calculés en poids-pourcentage par rapport à la quantité de pyrogallol introduit dans le système au temps 0.

Milieu réactionnel	% Purpurogalline	% Polycondensats (PM > 2 000 dal.)
PN5	6-7	8-10
PNO5	0,5	29,2
P(NO)O5	3,4	19,6
PO8	2,3	16,8

PN5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène

PNO5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en présence d'oxygène

P(NO)O5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec l'oxyde nitrique (NO) en milieu tamponné de pH 5 et en présence d'oxygène

PO8 : Polycondensat purifié obtenu par oxydation du pyrogallol par l'oxygène en milieu tamponné de pH 8

L'examen du tableau III représentant la quantité de produits recueillis à la fin de la réaction (5 jours) permet de noter certaines différences attribuées à l'action de l'agent oxydant. Pendant la même durée d'oxydation, la quantité de purpurogalline obtenue varie d'un système à l'autre, mais ce produit ne peut pas être utilisé comme indicateur de rendement car lui même participe, après sa formation, à l'élaboration de polycondensats ($PM > 2000$ dal.). Par contre, la formation de ces derniers est importante dans les systèmes contenant de l'oxygène. Ceci tend à montrer l'importance de O_2 dans le processus de polycondensation oxydative tant en milieu alcalin qu'en milieu acide (pH 5). Ainsi la quantité de polycondensats de masse moléculaire supérieure à 2000 dal est maximale dans le système renfermant NO_2^- et O_2 à pH 5. Elle est trois fois supérieure à celle obtenue en présence de NO_2^- seul. Cela peut s'expliquer, indépendamment de l'effet oxydant de l'oxygène sur le pyrogallol, par la formation d'un intermédiaire très oxydant, le dioxyde d'azote (NO_2). L'oxyde nitrique (NO) formé par interaction de l'ion nitrite avec le pyrogallol est oxydé par l'oxygène en formant NO_2 . C'est ce dernier qui peut être considéré comme le véritable oxydant en présence d'oxygène. Cette activité oxydante est mise en évidence par le système réactionnel renfermant NO et O_2 injectés simultanément dans les proportions respectives 2 : 1, V/V.

III.2.- ANALYSE ÉLÉMENTAIRE DES POLYCONDENSATS PURIFIÉS

La composition élémentaire des différents polycondensats purifiés fait apparaître une teneur en carbone supérieure à 50% pour les polycondensats obtenus par oxydation du pyrogallol en présence d'oxygène (PO8). Tandis que celle des polycondensats azotés est inférieure ou égale à 50 %. La teneur en oxygène est voisine de 42 % ($0,6 < O/C < 0,7$).

Tableau IV.- Analyse élémentaire des polycondensats purifiés issus de l'oxydation du pyrogallol.
La teneur en oxygène est déterminée par différence : % O = $(100 - (\% C + \% N + \% H))$

Polycondensats	C %	N %	H %	O %	C/N	H/C	O/C
PN5	49,4	3,1	2,7	44,4	16,1	0,63	0,67
PNO5	47,1	6,5	2,4	40,9	7,3	0,61	0,65
P(NO)O5	45,3	4,5	2,6	41,6	10,1	0,68	0,69
PO8	54,0	0	2,6	43,3	-	0,58	0,60

PN5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène

PNO5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en présence d'oxygène

P(NO)O5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec l'oxyde nitrique (NO) en milieu tamponné de pH 5 et en présence d'oxygène

PO8 : Polycondensat purifié obtenu par oxydation du pyrogallol par l'oxygène en milieu tamponné de pH 8

Les résultats de l'analyse élémentaire (Tableau IV) permettent de mettre en évidence l'existence d'une différence dans les teneurs en azote entre les polycondensats azotés obtenus en présence ou en absence d'oxygène. Le rapport C/N est compris entre 7 et 17. On constate qu'un rapport C/N bas (7,3 et 10) correspond aux polycondensats azotés préparés en présence d'oxygène soit avec NO_2^- ou NO, ce qui correspond à un degré d'incorporation d'azote plus important par rapport aux polycondensats issus du milieu réactionnel comportant uniquement le pyrogallol et nitrites.

La présence de l'oxygène dans le système permet non seulement d'accroître la quantité de produits polycondensés formés mais parallèlement facilite l'incorporation de l'azote d'origine nitreuse dans les produits de la réaction. Ce qui confirme l'hypothèse de la participation active de NO_2 formé par oxydation de NO en présence de O_2 . *Il y a tout lieu de penser que l'azote nitreux est incorporé plutôt à partir de NO_2 .*

Les résultats de l'analyse élémentaire (Tableau IV) donnent par ailleurs un rapport H/C considéré comme un indice d'aromaticité des polycondensats, inférieur à 1, ce qui permet de conclure à la nature très aromatique de tous les polycondensats issus de l'oxydation du pyrogallol.

III.3.- ANALYSE FONCTIONNELLE DES POLYCONDENSATS PURIFIÉS

III-3-1.- FONCTIONS ACIDES

La méthode de BRUNELLOT *et al.* (1989) permet de doser les groupements acides et de définir la nature des fonctions acides présentes dans les produits polycondensés. Les analyses d'acidités effectuées sur les polycondensats purifiés issus de l'oxydation du pyrogallol par les différents agents oxydants montrent une acidité comprise entre 5 et 8 me/g. Les polycondensats obtenus en présence d'oxygène présentent une prédominance de l'acidité carboxylique ($\geq 80\%$), alors que le polycondensat issu de l'oxydation du pyrogallol par NO_2^- à pH 5 présente une acidité carboxylique nettement plus faible (54 %) (Tableau V).

La polycondensation oxydative s'accompagne donc de la formation de produits à caractère acide. Cette acidité est représentée en majorité par des groupements de type carboxylique. Ces derniers résultent vraisemblablement de l'ouverture des cycles aromatiques au cours de la polycondensation oxydative tant en milieu alcalin (pH 8) qu'en milieu acide (pH 5 en l'absence ou en présence d'oxygène). D'autant plus, la présence simultanée de l'oxygène et des nitrites dans le système en milieu acide (pH 5) se traduit par l'accroissement de l'acidité des polycondensats en faveur des fonctions carboxyliques. L'acidité de type phénolique (hydroxyles titrables) ne peut être imputée qu'aux groupements phénols en provenance des substrats polyphénoliques de départ. La

teneur en -OH titrables du polycondensat azoté (PN5) obtenu en absence d'oxygène est nettement supérieure (46 %) à celle (< 20%) de ceux (PNO5 et PO8) obtenus en sa présence, tant en milieu alcalin, qu'acide rapportés à la totalité des fonctions acides titrables par la méthode de BRUNELOT *et al.*, (1989).

Tableau V.- Acidités (me/g) des polycondensats issus de l'oxydation du pyrogallol, déterminées par la méthode de BRUNELOT *et al.* (1989).

Polycondensats	A.T.	Af(-COOH)	Atf(-OH)	% (Af/AT)
PN5	6,2	3,4	2,9	54
PNO5	7,7	6,2	1,5	80
P(NO)O5	6,3	5,5	0,8	87,7
PO8	6,9	5,7	1,2	82,5

PN5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène

PNO5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en présence d'oxygène

P(NO)O5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec l'oxyde nitrique (NO) en milieu tamponné de pH 5 et en présence d'oxygène

PO8 : Polycondensat obtenu par oxydation du pyrogallol par l'oxygène en milieu tamponné de pH 8
AT = Acidité totale ; Af = Acidités faibles de type carboxylique ; Atf = Acidités très faibles de type phénolique

Nous avons montré dans un travail précédent (SAMRAKANDI, 1987) que lors de la polycondensation oxydative du pyrogallol en présence de nitrites en milieu acide (pH 5) l'acidité de type phénolique tend à augmenter en fonction du temps. Ainsi, nous avons montré que les polycondensats obtenus en 24 h de réaction ont une acidité carboxylique nettement supérieure (83 %) à celle (54 %) de ceux obtenus au bout de 5 jours de réaction. La concentration en groupements -OH titrables varie en sens inverse de la teneur en groupements -COOH dont la diminution tend à suivre le degré de polycondensation (ANDREUX, 1978). Dans ce contexte les polycondensats à forte acidité carboxylique (PNO5 et PO8) montreraient un faible degré de polycondensation.

III-3-2.- SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION INFRA-ROUGE

Si on compare les spectres des polycondensats azotés ou non, on note une grande ressemblance entre les uns et les autres. Ces spectres sont caractérisés par une nette prédominance des bandes imputables aux groupements oxygénés de types phénolique et carbonyle ($\text{R}=\text{C}=\text{O}$ et $\text{R}-\text{COOH}$) (Figure 16).

A 3400 cm^{-1} : Ensemble des bandes formant un massif élargi, correspondant aux groupements -OH associés par liaisons hydrogènes. Comparativement il faut noter l'absence d'-OH libres qui absorbent vers 3600 cm^{-1} ainsi que des -CH aliphatiques qui absorbent dans la région $2980\text{-}2860\text{ cm}^{-1}$. Bien que l'on ne puisse pas exclure totalement un recouvrement dû à l'absorption des -OH liés, il apparaît nettement que la contribution des -CH aliphatiques est faible.

On note aussi une absorption faible, mais étalée, entre 2700 et 2350 cm^{-1} que l'on peut attribuer aux hydroxyles fortement liés des acides carboxyliques (BELLAMY, 1975).

Selon DORMAAR (1967), la pente de la tangente à la ligne de base dans la région du spectre infra-rouge située entre 2100 et 1800 cm^{-1} est en relation avec le degré de polymérisation des substances humiques. La pente négative ou nulle traduit un degré de polymérisation élevé, ce qui est le cas ici pour tous les polycondensats. Au contraire, pour les composés faiblement polymérisés, la pente est positive.

La bande située vers 1720 cm^{-1} est attribuable aux groupements -C=O des groupements carboxyles, dont l'intensité varie d'un polycondensat à un autre en fonction de la teneur en groupements acide de type carboxylique. Ceci a été vérifié par salification des polycondensats, par passage sur résine échangeuse de cations (Na^+) ; dans ces conditions les spectres montrent une disparition de la bande 1720 cm^{-1} et l'apparition des bandes des carboxylates à 1575 et 1390 cm^{-1} .

A $1620\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$: Cette bande peut être attribuée aussi bien aux groupements carbonylés de type quinonique qu'aux liaisons C=C aromatiques. L'intensité de cette bande est beaucoup réduite après traitement des polycondensats au borohydrure de sodium avec apparition d'une nouvelle bande située vers 1100 cm^{-1} (-OH alcoolique) résultant de la réduction des groupements carbonylés. On note aussi après réduction au BH_4Na l'apparition d'une bande à 2928 cm^{-1} attribuables aux -CH aliphatiques (Figure 17).

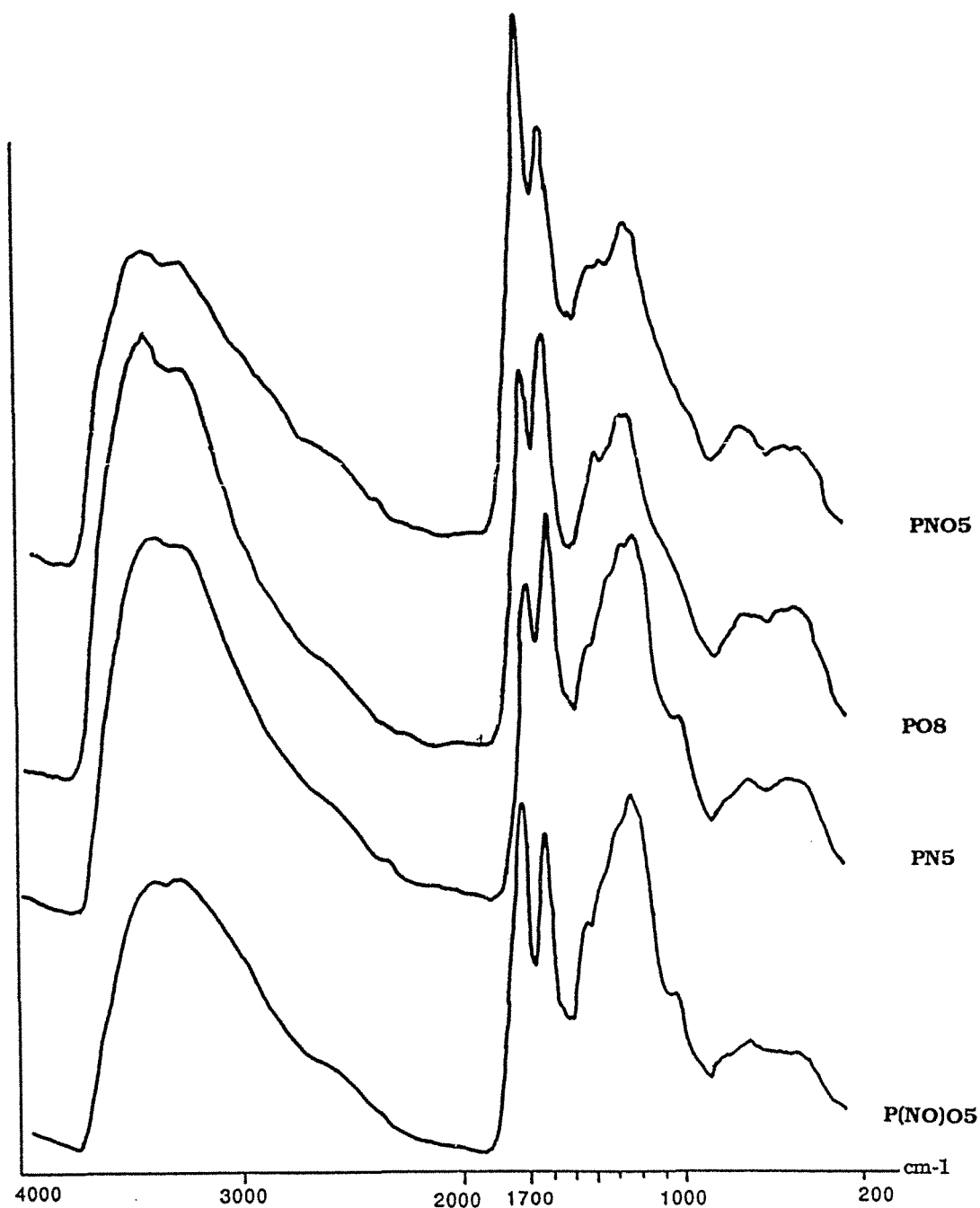


Figure 16.- Spectres d'absorption infra-rouge des polycondensats issus de l'oxydation du pyrogallol.

- PN5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène.
- PNO5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 en présence d'oxygène.
- P(NO)O5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec l'oxyde nitrique (NO) en milieu tamponné de pH 5 en présence d'oxygène.
- PO8 : Polycondensat obtenu par oxydation du pyrogallol par l'oxygène en milieu tamponné de pH 8.

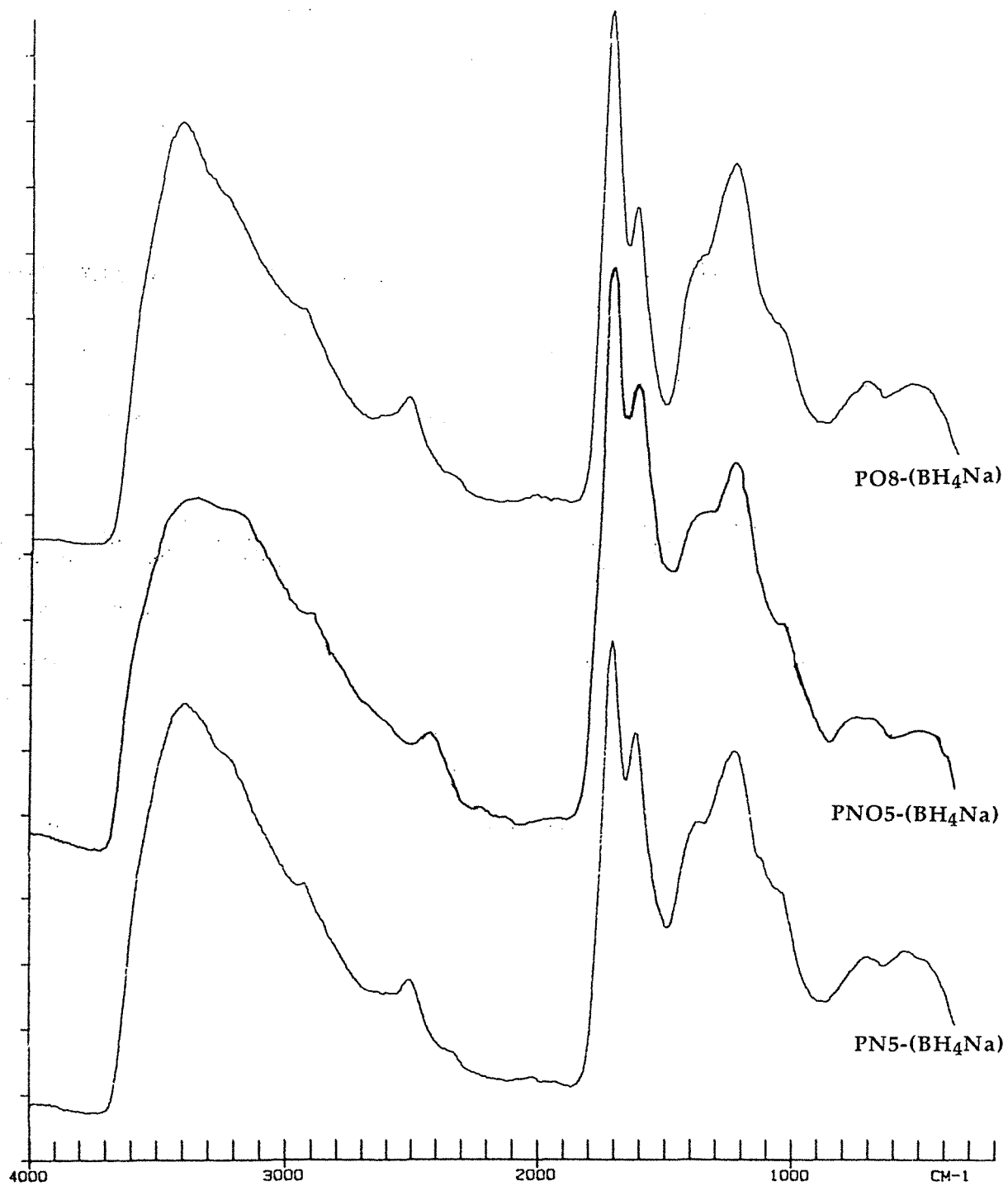


Figure 17.- Spectres d'absorption infra-rouge des polycondensats synthétiques réduits au BH₄Na.

Entre 1400 et 1000 cm^{-1} , il n'y a pas de bande bien individualisée, cependant l'absorption à 1300 cm^{-1} reste importante pour tous les polycondensats. Cette absorption pourrait être attribuée à différents groupements dont l'absorption se situe dans cette région :

- l'intensité de cette bande (1300 cm^{-1}) peut être corrélée avec l'importance des fonctions phénoliques (3400 cm^{-1}) sachant que ces dernières absorbent également dans la région 1400-1000 cm^{-1} .
- les cycles benzéniques substitués absorbent de 1250 à 1000 cm^{-1} , selon le nombre et la position des substituants. Enfin, dans cette région absorbent aussi des fonctions azotées aromatiques de type nitroso ($-\text{N}=\text{O}$: 1410, 1335, 1265 et 1110 cm^{-1}), nitro ($-\text{NO}_2$: 1350 cm^{-1}) ou amine ($-\text{NH}_2$: 1250 et 1315 cm^{-1}).

L'étude des spectres d'absorption dans l'Infra-rouge nous a permis de montrer une grande ressemblance entre les divers polycondensats issus de l'oxydation du pyrogallol. Que ces produits proviennent de l'oxydation du pyrogallol en présence de NO_2^- et/ou de l'oxygène à pH acide ou alcalin, nous avons pratiquement observé l'existence des mêmes bandes d'absorption correspondant aux mêmes fonctions organiques. Toutefois l'intensité relative de ces bandes n'est pas la même d'un polycondensat à un autre, ce qui traduit l'existence de différences quantitatives dans la distribution et les proportions des divers groupements fonctionnels.

III-4.- COMPORTEMENT DES POLYCONDENSATS AZOTÉS PURIFIÉS VIS-A-VIS DE L'HYDROLYSE ACIDE

Dans le but d'apprécier la stabilité chimique de l'azote incorporé, nous avons procédé à la dégradation des polycondensats azotés en milieu acide et à chaud (HCl 3N, 130°C). Cette stabilité est corrélée directement avec le pourcentage d'azote libéré après hydrolyse acide. On considère que l'azote non libéré par hydrolyse acide est stable et correspond à l'azote incorporé dans le résidu de la réaction récupéré par filtration sur filtre Millipore (0,45 μm) après hydrolyse acide durant une nuit.

L'hydrolyse acide se traduit par la précipitation respectivement de 64, 60 et 39% du poids des polycondensats azotés de $\text{P}(\text{NO})\text{O}_5$ (Tableau VII), PN_5 (Tableau VI) et PNO_5 (Tableau VIII) ainsi que par la solubilisation de 48,2, 56,3 et 63 % de l'azote total. Les résultats font apparaître une résistance relativement importante de l'azote vis-à-vis de l'hydrolyse acide. Elle est plus marquée pour PN_5 et $\text{P}(\text{NO})\text{O}_5$ que pour PNO_5 . La nature de l'azote libéré par hydrolyse, ou azote hydrolysable, se répartit entre l'azote ammoniacal (NH_4^+) et l'azote dit non identifié. Ce dernier est en quantité relativement plus élevée pour PNO_5 (29%) que pour PN_5 (21 %) et beaucoup plus faible pour $\text{P}(\text{NO})\text{O}_5$ (4 %) comparativement à l'azote total mis en hydrolyse (Tableau IX).

Tableau VI.- Bilan de l'hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h) du polycondensat azoté (PN5) purifié, obtenu par réaction (5 jours) du pyrogallol avec NO₂⁻ en l'absence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5 à la température du laboratoire (18-20°C).

Hydrolyse acide HCl 3N - 130°C Poids mis en hydrolyse : 50,35 g Résidu après hydrolyse = 30 mg 59,6 % *					Analyse organique élémentaire				
	C (mg)	%	N (mg)	%	C %	N %	H %	C/N	H/C
Polycondensat azoté	24,87	100	1,83	100	49,4	3,6	2,6	13,7	0,63
Résidu (1)	17,39	70	0,72	39,2	58,0	2,4	2,4	24,3	0,49
(2)	18,92	76	0,80	43,7					
Hydrolysats (1)	5,47	22	0,93	50,7					
(2)	5,95	24	1,03	56,3					
Total (1)	22,86	92	1,64	90					
(2)	24,87	100	1,83	100					

(1) mesuré ; (2) ajusté à 100 %

* % en poids du résidu après hydrolyse par rapport au poids mis en hydrolyse.

Le rapport H/C, indice d'aromaticité, des polycondensats azotés se trouve affecté après hydrolyse acide. Ainsi, le H/C des résidus d'hydrolyse passe de 0,62 à 0,5 pour PN5, à 0,55 pour P(NO)O5 et à 0,57 pour PNO5, ce qui indique un accroissement d'aromaticité, encore plus marqué pour PN5 que pour les deux autres polycondensats.

Les résidus d'hydrolyse acide présentent des spectres d'absorption dans l'Infra-rouge (Figure 18a,b,) en tous points comparables à ceux des polycondensats azotés de départ. On peut noter seulement une diminution de l'intensité de la bande spécifique aux groupements C=O des fonctions carboxyliques, ce qui s'explique par une décarboxylation. Par ailleurs on remarque un accroissement relatif des bandes de vibrations des liaisons C=C et C=O α,β -conjuguées (1610 cm⁻¹).

Cet accroissement systématique du degré de conjugaison à la suite de l'hydrolyse acide est clairement mis en évidence par l'augmentation de l'aromaticité exprimée par le rapport H/C (0,5 < H/C < 0,6).

L'hydrolyse acide se traduit aussi par une augmentation des rapports C/N des résidus d'hydrolyse par rapport à ceux des polycondensats azotés de départ. Cette augmentation est plus marquée pour PN5 dont le rapport C/N passe de 13,7 à 24,3 et le P(NO)O5 qui passe de 13,9 à 20,7 que pour PNO5 dont le rapport C/N passe de 7,3 à 11.

Les résultats obtenus par simple hydrolyse acide des polycondensats azotés ne permettent de conclure qu'à l'existence de l'azote sous deux formes classiquement définies comme:

- Azote labile qui est extractible par attaque acide sous forme ammoniacale et sous forme non identifiée. Cette dernière forme peut être attribuée hypothétiquement à des formes nitrosées ou nitrées.
- Azote stable récupéré sous forme résiduelle par hydrolyse acide et qui s'apparente à l'azote hétérocyclique ou juxtanucléaire.

Tableau VII.- Résultats du traitement hydrochlorhydrique (HCl 3N) à chaud (130°C) pendant 16 h, précédé (A) ou non (B) de la réduction par Zn des produits (P(NO)O₅, PM > 2000 dal.) de la réaction de NO avec le pyrogallol en présence d'oxygène moléculaire en milieu tamponné de pH 5.

Hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h)						Analyse organique élémentaire					Distribution de l'azote hydrolysable					
		C (mg)	%	N (mg)	%	C %	N %	H %	C/N	H/C	N-NH ₄ ⁺ (mg)	%	N-Nitroso, N-Nitro (mg)	%	Nn.id. (mg)	%
A Hydrolyse acide HCl 3N 130°C 16 h	Polycondensat azoté initial	23,33	100	2,04	100	48,2	4,2	2,4	13,90	0,60						
	Résidu (1)	16,07	68,9	0,94	46,2	52,0	2,5	2,4	20,70	0,55						
	(2)			1,07	52,6											
	Hydrolysats (1)	7,26	31,1	0,88	42,9						0,81	38,9			0,08	3,9
	(2)			0,98	48,2											
	Total (1)	100,0		1,82	88,7											
	(2)			2,04	100											
B Réduction au Zn suivie de l'hydrolyse acide (HCl 3N) 130°C, 16 h	Polycondensat azoté initial	23,73	100	2,07	100	48,2	4,2	2,4	13,90	0,60						
	Résidu (1)	16,10	67,8	0,89	42,8	53,1	2,5	2,6	21,22	0,58						
	(2)	16,32	68,8	0,89	43,1											
	Hydrolysats (1)	7,31	30,8	1,18	56,9						0,90	43,7	0,10	5,00	0,28	13,6
	(2)	7,41	31,2	1,19	57,7											
	Total (1)	23,41	98,6	2,05	99,1											
	(2)	23,72	100	2,07	100											

(1) mesuré ; (2) ajusté à 100 % ; Nn. id. : Azote non identifié.

Les valeurs en pourcentage de poids sont calculées par rapport au carbone ou à l'azote initial.

A : poids soumis à l'hydrolyse = 48,4 mg ; poids du résidu après hydrolyse = 64,8 %.

B : Poids soumis à la réduction et à l'hydrolyse = 49,2 mg ; Poids du résidu après ce traitement = 61,4 %.

Tableau VIII.- Résultats du traitement hydrochlorhydrique (HCl 3N) à chaud (130°C) pendant 16 h, précédé (A) ou non (B) de la réduction par Zn des produits (PNO5, PM > 2000 dal.) de la réaction de NO₂⁻ avec le pyrogallol en présence d'oxygène moléculaire en milieu tamponné de pH 5.

Hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h)						Analyse organique élémentaire					Distribution de l'azote hydrolysable					
		C (mg)	%	N (mg)	%	C %	N %	H %	C/N	H/C	N-NH ₄ ⁺ (mg)	%	N-Nitroso, N-Nitro (mg)	%	Nn.id. (mg)	%
A Hydrolyse acide HCl 3N 130°C 16 h	Polycondensat azoté initial	23,00	100	3,23	100	47,1	6,5	2,4	7,30	0,62						
	Résidu (1)	11,40	48,3	1,04	32,2	50,3	4,6	2,4	11,00	0,57						
	(2)	12,18	51,6	1,20	37,2											
	Hydrolysats (1)	10,69	45,3	1,76	54,5						1,10	34,00			0,93	28,8
	(2)	11,42	48,4	2,03	62,8											
	Total (1)	22,09	93,6	2,80	86,7											
	(2)	13,60	100	3,23	100											
B Réduction au Zn suivie de l'hydrolyse acide (HCl 3N) 130°C, 16 h)	Polycondensat azoté initial	23,27	100	3,21	100	47,1	6,5	2,4	7,30	0,62						
	Résidu (1)	10,87	46,7	0,90	28,2	51,2	4,2	2,21	12,08	0,52						
	(2)	11,98	54	1,09	33,8											
	Hydrolysats (1)	10,24	44	1,77	55,2						1,24	38,8	0,14	4,4	0,53	16,5
	(2)	11,28	48,5	2,12	66,2											
	Total (1)	21,11	90,7	2,67	83,3											
	(2)	23,70	100	3,21	100											

(1) mesuré ; (2) ajusté à 100 % ; Nn. id. : Azote non identifié.

Les valeurs en pourcentage de poids sont calculées par rapport au carbone ou à l'azote initial.

A : poids soumis à l'hydrolyse = 48,77 mg ; Poids du résidu après hydrolyse = 38,88 %

B : Poids soumis à la réduction et à l'hydrolyse = 49,42 mg ; Poids du résidu après ce traitement = 43,2%.

Tableau IX.- Distribution des formes de l'azote après hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h) des polycondensats azotés purifiés.

		PN5		PNO5		P(NO)O5	
Formes d'azote		N (mg)	% N total	N (mg)	% N total	N (mg)	% N total
Polycondensats azotés		1,83	100	3,23	100	2,04	100
N non hydrolysable		0,8	43,7	1,2	37,2	1,07	52,6
N hydrolysable	N-NH ₄ ⁺	0,65	35,5	1,1	34	0,81	38,9
	N non identifié	0,38	20,8	0,93	28,8	0,08	3,9

PN5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO₂⁻ en l'absence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5.

PNO5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO₂⁻ en présence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5.

P(NO)O5 : Polycondensat obtenu par réaction du pyrogallol avec NO en présence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5.

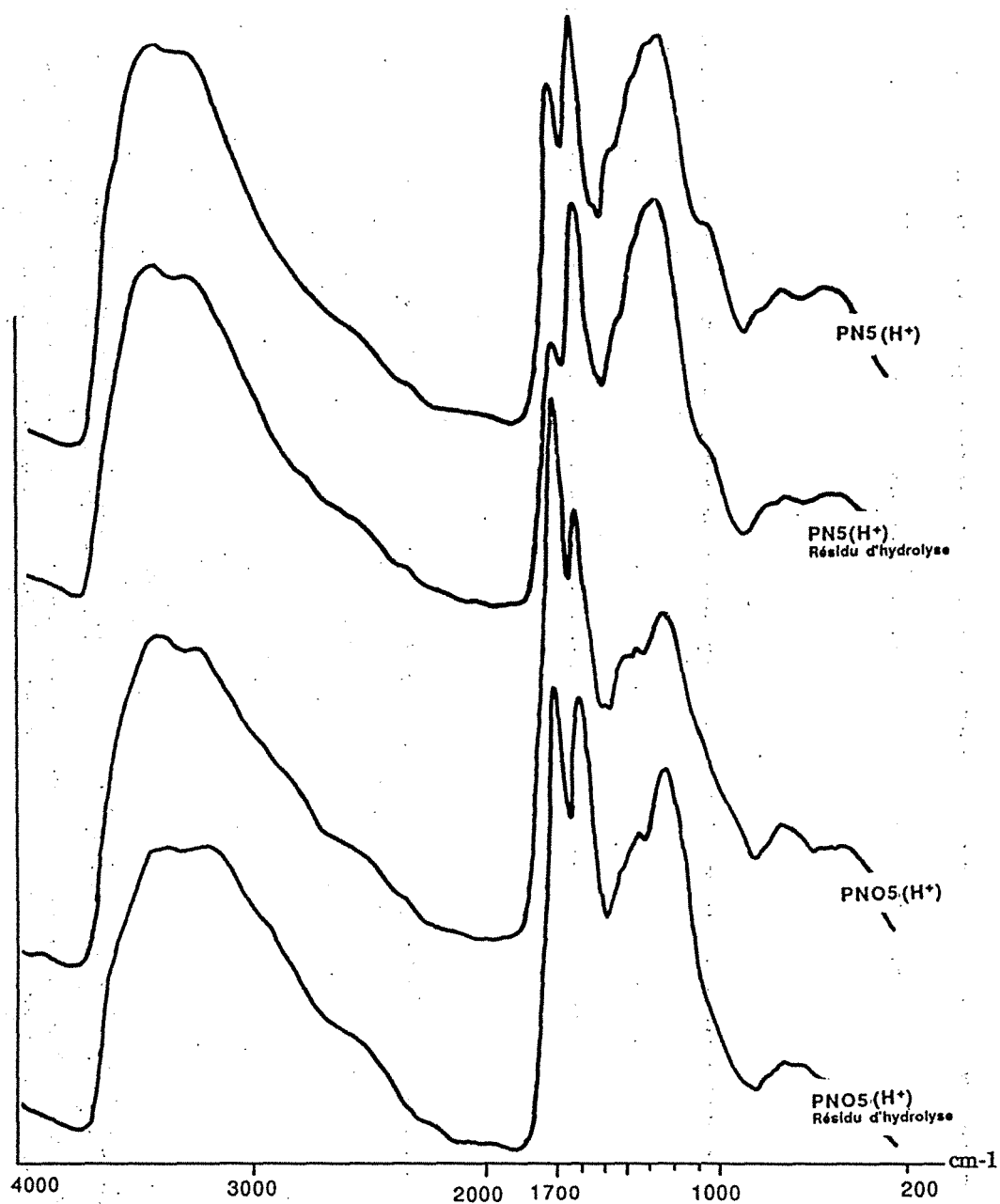


Figure 18a.- Spectres d'absorption Infra-rouge des polycondensats PNO5 et PN5 et de leur résidus d'hydrolyse acide (HCl 3 N, 130°C, 16 h)

- **PN5** : Polycondensats obtenus par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en l'absence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5.
- **PNO5** : Polycondensats obtenus par réaction du pyrogallol avec NO_2^- en présence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5

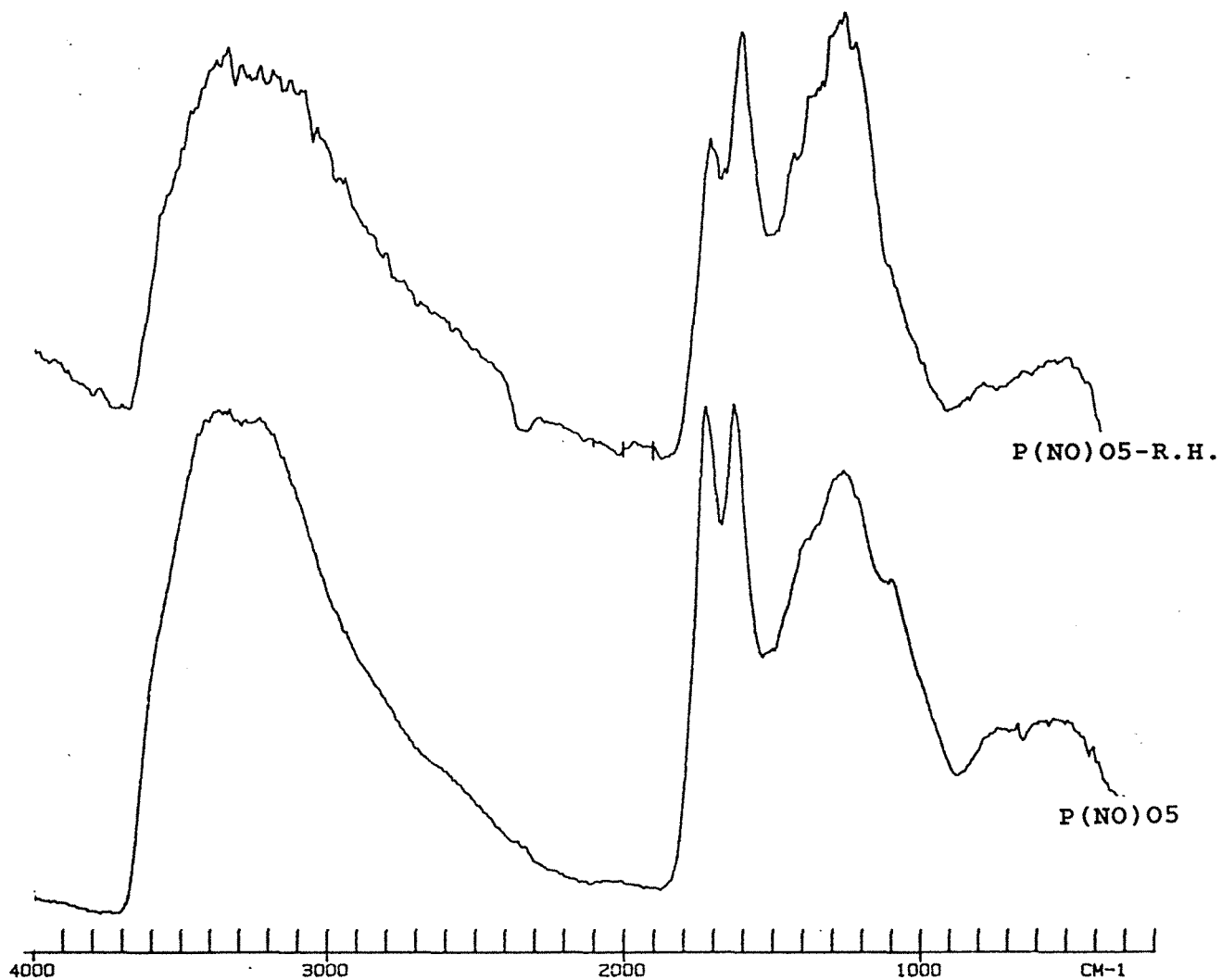


Figure 18b.- Spectres d'absorption Infra-rouge du polycondensat P(NO)O5 et de son résidu d'hydrolyse acide (HCl 3 N, 130°C, 16 h)

- P(NO)O5 : Polycondensats obtenus par réaction du pyrogallol avec NO en présence d'oxygène dans le tampon phosphate de pH 5

III-5.- IDENTIFICATION DE L'AZOTE INCORPORÉ DANS LES POLYCONDENSATS PURIFIÉS

Le traitement par l'acide chlorhydrique des polycondensats azotés issus de la réactivité du pyrogallol avec NO_2^- en milieu acide (pH5) conduit à la récupération de 40 à 60% d'azote incorporé sous forme stable. Le reste de l'azote (azote hydrolysable) est défini comme azote labile qu'on a déterminé sous deux formes, azote ammoniacal et azote non-identifié. Ces deux formes d'azote peuvent provenir en partie de l'azote sous forme nitrosée car l'hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C , 16h) permet de libérer 46% de l'azote de 1-nitroso-2-naphtol et 17% de celui du 2-nitroso-1-naphtol. La forme nitrée est plus stable vis-à-vis de l'attaque acide : l'azote de l'acide dinitrosalicylique extrait par l'attaque acide est négligeable (<0,5%).

Nous avons procédé au traitement chimique des produits obtenus pour l'identification et le dosage de ces groupements fonctionnels ($-\text{N}=\text{O}$ et $-\text{NO}_2$). La technique qui nous a permis d'obtenir des résultats positifs est la réduction en présence de Zn en milieu acide (HCl 12N). Les groupements nitrosés ($-\text{N}=\text{O}$), nitrés ($-\text{NO}_2$) ou azoïques ($\text{R}_1-\text{N}=\text{N}-\text{R}_2$) sont réduits en NH_4OH entraînable par la vapeur suivant la méthode de Kjeldahl. Les résultats de ce traitement conduisent à un pourcentage d'azote attribuable à l'une ou plusieurs des formes $-\text{NO}_2$, $-\text{N}=\text{O}$ et $-\text{N}=\text{N}$, situé entre 3 et 6% par rapport à l'azote total (Tableau X).

Tableau X.- Dosage de l'azote organique sous forme nitrosé, nitré et azoïque, par réduction au Zn en milieu acide (HCl 12N).

	A	B	C = A - B
Produits azotés	(% N_{Zn})	(% $\text{N}_{(\text{Zn} + \text{Hyd})} - \text{Hyd}$)	(% N_{hyd})
1-nitroso-2-naphtol	94,0	48	46
2-nitroso-1-naphtol	96,0	79	17
Acide 3,5-dinitrosalicylique	98,0	98	< 0,5
PN5	3,6	2,7	0,9
PNO5	4,4	3,2	1,2
P(NO)O5	5,8	4,4	1,4

A = (% N_{Zn}) : azote dosé directement par réduction au Zn en milieu acide (HCl 12 N)

B = (% $\text{N}_{(\text{Zn} + \text{Hyd})} - \text{Hyd}$) : quantité d'azote (% N organique) calculée par différence entre l'azote libéré par hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C) après réduction au Zn en milieu acide (HCl 12N) et l'azote libéré par simple hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C).

C = (% N_{hyd}) : quantité d'azote attribuable à l'hydrolyse acide (A - B).

PN5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH5) en l'absence d'oxygène.

PNO5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH5) en présence d'oxygène.

P(NO)O5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de $(\text{NO} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2)$ avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH5).

La réduction est également effectuée en milieu acide concentré (HCl 12N) et à chaud. Nous avons pensé que les conditions de réduction peuvent entraîner une hydrolyse partielle de l'azote polycondensé qui ne doit pas être attribué à l'azote réduit au Zn. Nous avons procédé donc à la comparaison de la quantité d'azote N-NH_4^+ libéré d'une part par simple hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C) à celle obtenue d'autre part par réduction au Zn suivie d'hydrolyse acide. La différence entre ces deux déterminations est attribuable à l'azote libéré par réduction au Zn.

Les résultats obtenus à la suite de ces deux traitements sont résumés au tableau X. Ils font apparaître une différence de 0,9 à 2 %, suivant le polycondensat azoté, qui peut être attribuée à l'hydrolyse acide pendant la réduction avec le Zn.

L'analyse détaillée des résultats obtenus par simple hydrolyse acide et par réduction au Zn en milieu acide (HCl 12N) suivi d'une hydrolyse acide (Tableaux VII et VIII) des polycondensats azotés mérite plusieurs remarques.

La réduction au Zn suivie de l'hydrolyse acide accroît l'azote hydrolysable pour les trois polycondensats :

- pour le PN5, l'azote hydrolysable sous forme NH_4^+ est augmenté de 4 % tandis qu'on remarque une réduction des autres formes, -2,5 % pour l'azote non-identifié et -5 % pour l'azote non hydrolysable, autrement dit, l'azote qualifié d'hétérocycle ou juxtanucléaire.
- pour le PNO5, NH_4^+ est augmenté de 4,8 % tandis que l'azote non-identifié se trouve beaucoup affaibli. Il passe de 28,8 à 16,5 %. L'azote non hydrolysable est abaissé de 3,5 %, il passe de 37,2 à 33,8%.
- le P(NO)O5 présente plus de variations quant aux proportions respectives des différentes formes d'azote. Le NH_4^+ et l'azote non-identifié augmentent respectivement de 4,8 et de 10,3 % tandis que l'azote non hydrolysable se trouve beaucoup affecté. Il passe de 52,6 à 43 %, on note une baisse donc de 10 %.

Ces remarques permettent de noter que l'azote non hydrolysable se trouve affecté de 3,5 à 10% selon les polycondensats, par le traitement au Zn, ce qui permet de minimiser les proportions de l'azote non-hydrolysable souvent attribué à des formes hétérocycliques. BREMNER et FÜHR (1964) ont noté que l'azote d'origine nitreuse incorporé dans les substances humiques est résistant à l'hydrolyse acide (HCl 6N à reflux) et s'apparente à l'azote hétérocyclique. Par ailleurs, les travaux de EL SAYED AZHAR *et al.* (1986) ont montré que la nature de l'azote polycondensé à

partir de l'azote d'origine nitreuse s'apparente à divers types. Ces auteurs ont noté que l'azote incorporé est détecté partiellement par I.R. et CG-SM sous formes nitrosée, nitrée et azide.

Ces résultats permettent aussi de noter l'action de l'oxygène quant à la nature de l'azote incorporé dans les polycondensats. La présence de l'oxygène dans le milieu tend à favoriser l'incorporation de l'azote d'origine nitreuse sous des formes oxygénées résistantes à l'hydrolyse acide simple, essentiellement sous forme nitrée.

CHAPITRE IV

*CARACTÉRISATION CHIMIQUE
DU POLYCONDENSAT ISSU DE L'OXYDATION
DE LA PURPUROGALLINE PAR NO₂⁻*

**CARACTÉRISATION CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT ISSU DE
L'OXYDATION DE LA PURPUROGALLINE PAR NO_2^-**
**IV.- POLYCONDENSAT AZOTÉ PROVENANT DE L'OXYDATION DE LA PURPUROGALLINE :
RÉSULTATS ET DISCUSSION**

L'oxydation du pyrogallol par l'ion nitrite en milieu tamponné de pH 5 aboutit à la formation de la purpurogalline comme premier produit stable de polycondensation oxydative. La purpurogalline peut ensuite participer à l'élaboration de macromolécules humiques. Dans le chapitre I (cf. I-4-3) on a précisé la nature de la réaction qui peut avoir lieu entre ce produit et l'ion nitrite à savoir le dégagement de CO_2 et la réduction de NO_2^- en constituants azotés gazeux (NO , N_2O , N_2). La réaction de 5 jours de la purpurogalline avec NO_2^- en l'absence d'oxygène moléculaire en milieu tamponné de pH 5 conduit à la formation de polymère qu'on a isolé par simple dialyse au travers d'une membrane de coupure 2000 dal contre de l'eau distillée. Le polymère est ensuite protoné par passage sur résine échangeuse de cations (H^+), lyophilisé et séché sous vide phosphorique pendant une semaine. Les analyses physiques et chimiques sont effectuées sur ce polymère ainsi préparé.

IV-1.- ANALYSE ELEMENTAIRE

L'analyse élémentaire du polycondensat purifié (PurN5) fait apparaître une teneur en azote de 3,4% et un rapport C/N de 16 (Tableau XI).

Tableau XI.- Analyse élémentaire du polycondensat purifié obtenu par réaction entre purpurogalline et NO_2^- en l'absence d'oxygène moléculaire en milieu tamponné de pH 5.

Polycondensats (PM > 2000 dal.)	C %	N %	H %	O %	C/N	H/C
PurN5	52,8	3,4	2,9	40,9	15,75	0,67

PurN5 : polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec la purpurogalline en milieu acide tamponné (pH 5) en l'absence d'oxygène.

L'oxydation de la purpurogalline en présence de NO_2^- donne lieu à l'incorporation de d'azote d'origine nitreuse. Ceci permet de renforcer l'importance de la contribution de ce produit intermédiaire formé au cours de l'oxydation du pyrogallol, dans la mesure où il participe non seulement à l'élaboration de polymères mais également à la réduction de NO_2^- avec incorporation partielle de son azote. Le rapport atomique H/C du polycondensat PurN5 est inférieur à 1 ($\text{H/C} = 0,67$) ce qui est en faveur d'un caractère aromatique marqué du produit formé.

IV-2.- ANALYSE FONCTIONNELLE DU POLYCONDENSAT AZOTE PurN5

IV-2-1- Titration des fonctions acides

Le polycondensat azoté purifié est titré suivant la méthode développée par BRUNELOT *et al.* (1989) qui permet d'identifier trois types d'acidités. La répartition des différentes acidités mesurées est présentée tableau XII.

Tableau XII.- Acidités du polycondensat azoté purifié (PurN5, PM > 2000 dal.) obtenu par oxydation de la purpurogalline en présence de NO_2^- en milieu tamponné (pH 5) et en l'absence d'oxygène.

Polycondensat	A.T.	Af(-COOH)	Atf(-OH)	%(Af/A.T.)
PurN5 (me/g)	7,02	6,16	0,86	88

A.T. = Acidité totale : Af = acidités faibles de type carboxylique ;
Atf = Acidités très faibles de type phénolique.

Les résultats montrent une prédominance des groupements acides de type carboxylique (88 % de l'acidité totale), tandis que l'acidité attribuée aux hydroxyles titrables ne représente que 12 % de l'acidité totale. La formation de groupements carboxyliques rend donc compte du processus d'oxydation qui aboutit à l'ouverture des cycles aromatiques.

IV-2-2.- Spectrophotométrie d'absorption dans l'Infra-rouge

La figure 19 représente les spectres obtenus pour le polycondensat azoté purifié PurN5, issu de l'oxydation de la purpurogalline en présence de NO_2^- en milieu tamponné de pH5, en même temps que le polycondensat salifié (Na^+) et celui du PurN5 réduit au borohydrure de sodium. Ces spectres font ressortir les principales bandes suivantes :

• une bande située à $3400-3260\text{ cm}^{-1}$ correspondant à des $-\text{OH}$ qui peuvent être attribués aux fonctions : alcool, phénol ou acide organique. Cette bande, d'après sa forme, correspond à la vibration des $-\text{OH}$ associés par des ponts hydrogènes intramoléculaires.

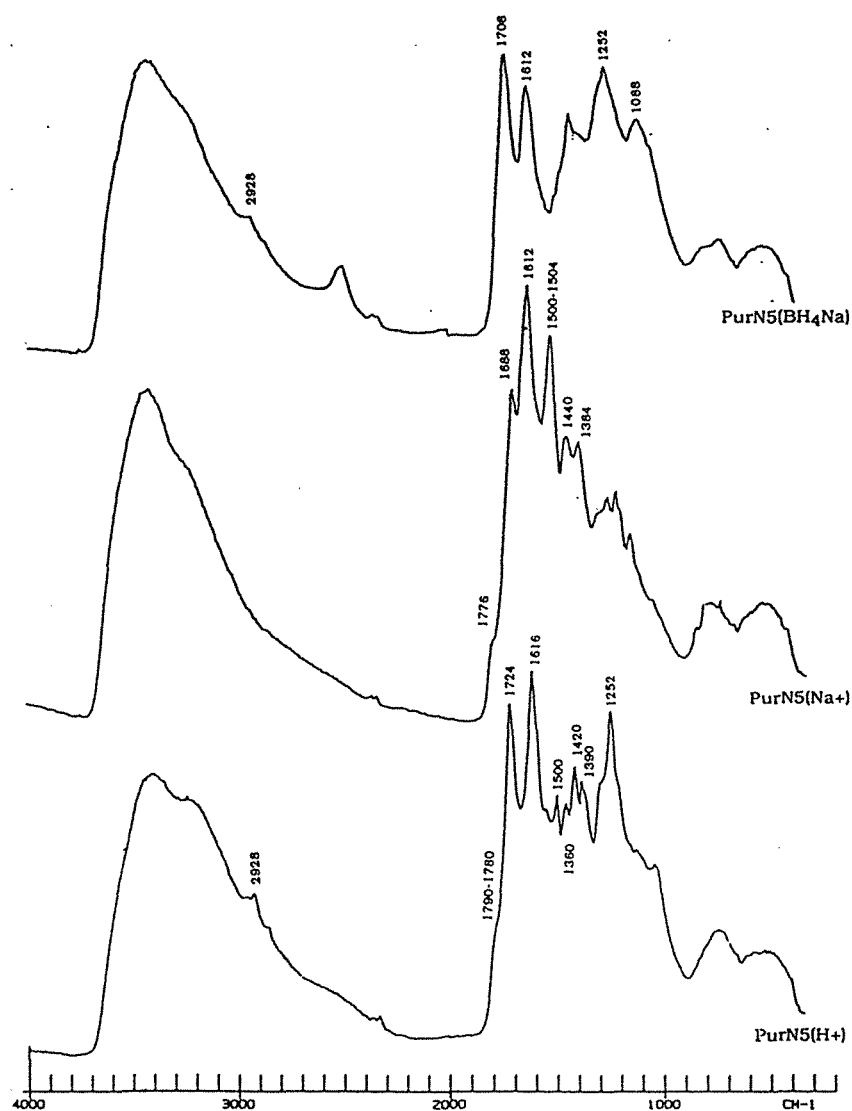


Figure 19- Spectres d'absorption dans l'infra-rouge des polycondensats PurN5(H⁺), PurN5(Na⁺) et PurN5(BH₄Na).

PurN5 : Polycondensat (PM > 2000 dal) sous forme H⁺, obtenu par réaction de NO₂⁻ avec la purpurogalline en milieu tamponné de pH 5 en l'absence de l'oxygène moléculaire.

PurN5 (BH₄Na) : PurN5 (H⁺) réduit au BH₄Na sous atmosphère inerte (N₂)

PurN5(Na⁺) : PurN5 salifié

- les accidents situés à 2928 et 2864 cm^{-1} indiquent la présence de vibration des liaisons -CH aliphatiques appartenant aux -CH₂ et -CH₃ auxquels on peut associer également la bande située à 1460 cm^{-1} . La région située entre 2700 et 2400 cm^{-1} manifeste une faible absorption attribuable à des -OH associés à des fonctions -C=O carboxyliques.

La région du spectre située entre 2000 et 1000 cm^{-1} présente plusieurs bandes plus ou moins résolues dont l'absorption est due principalement à des fonctions oxygénées :

- un épaulement situé vers 1790-1780 cm^{-1} qui indique vraisemblablement la présence de groupements anhydrides cycliques. Le polycondensat salifié (Na^+) comporte la même bande à 1776 cm^{-1} avec en plus une bande nouvelle à 1688 cm^{-1} . Ces bandes disparaissent quand le polycondensat est réduit en milieu alcalin. Par ailleurs on sait que le groupement lactone s'hydrolyse facilement en milieu acide ou basique avec formation de groupement carbonyle. Ceci est en faveur de groupements lactones d'un hétérocycle à six membres car les cycles à cinq membres absorbent vers 1750-1730 cm^{-1} . De tels groupements peuvent être formés au cours de l'oxydation de la purpurogalline selon le mécanisme proposé par CRITCHLOW *et al.* (1967) qui stipule la formation de composés de type anhydride (équation IV, page 52) et qui peuvent ensuite participer à la formation de polycondensats azotés :

La bande située à 1724 cm^{-1} correspond aux -C=O des groupements carboxyliques auxquels il faut attribuer également l'absorption des radiations Infra-rouge de fréquence 1420 cm^{-1} . L'attribution de cette bande à ces groupements est confirmée par ailleurs par le spectre IR du polycondensat salifié (Na^+) où la bande à 1724 cm^{-1} disparaît totalement tandis que les maxima 1384 et 1440 cm^{-1} , attribuée respectivement aux vibrations antisymétriques et symétriques des groupements carboxylates sont renforcés.

- la bande d'absorption située à 1616 cm^{-1} peut être attribuée à deux types de groupements : groupements carbonyles et -C=C- aromatiques. La présence des groupements carbonyles est confirmée par le spectre IR du polycondensat réduit au borohydrure de sodium ; l'intensité de la bande située à 1616 cm^{-1} est fortement réduite avec apparition d'une nouvelle bande centrée à 1088 cm^{-1} attribuable à des fonctions alcools issues de la réduction des groupements carbonylés.

- une bande bien résolue située à 1500 cm^{-1} correspondant à trois types de groupements possibles :
 - ♦ -C=C- des noyaux aromatiques,
 - ♦ groupements nitrés (-NO₂) aromatiques,
 - ♦ groupements nitrosés aromatiques.

On remarque aussi une bande de faible intensité située à 1560 cm^{-1} . La présence des groupements nitrosés aromatiques (-N=O tertiaires) qui ont tendance à se dimériser est difficile à mettre en évidence par Infra-rouge.

L'absorption de groupement nitré aromatique comprise entre 1555 et 1525 cm^{-1} est fortement influencée par son environnement et notamment par les effets de conjugaison. Ainsi le groupement nitré du 1,3-diméthylamino-2,4,6-trinitrobenzène absorbe dans la région située entre 1508 et 1493 cm^{-1} au lieu de 1554 et 1538 cm^{-1} pour le trinitrobenzène (BELLAMY, 1975) ; par ailleurs la salification d'un composé nitré aromatique a pour effet de déplacer la bande de 1560 cm^{-1} à 1501 cm^{-1} . Le p.nitrophénoxyde de sodium absorbe à 1501 cm^{-1} au lieu de 1560 cm^{-1} pour le p.dinitrobenzène. Un tel comportement pour le polycondensat PurN5 permet de conclure à la présence de groupements $-\text{NO}_2$ (1560 cm^{-1}) ; dans le spectre du polycondensat protoné (H^+), cette bande a toute chance d'être recouverte par la bande spécifique des groupements carbonyles. Le spectre du polycondensat salifié (Na^+) présente une résolution parfaite de la bande 1500-1504 cm^{-1} dont l'intensité augmente après salification.

La bande située entre 1300 cm^{-1} et 1000 cm^{-1} , centrée sur 1252 cm^{-1} , est attribuable à l'ensemble des déformations des $-\text{C}-\text{O}$ phénoliques ou carboxyliques. Le groupement $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ absorbe aussi dans cette région entre 1310 et 1210 cm^{-1} .

IV-2-3.- COMPORTEMENT DU POLYCONDENSAT AZOTE (PURN5) SOUMIS A HYDROLYSE ACIDE

Dans le but d'apprécier la stabilité chimique de l'azote incorporé dans le polycondensat purifié (PM > 2000 dal.), nous l'avons maintenu en solution aqueuse acide (HCl 3N) et à reflux (130°C) pendant une nuit (16 h).

Tableau XIII.- Répartition du carbone et de l'azote dans les produits d'hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h) du polycondensat azoté purifié issu de l'oxydation de la purpurogalline par NO_2^- en milieu tamponné (pH 5) et en l'absence d'oxygène.

Hydrolyse acide HCl 3N, 130°C Poids soumis à l'hydrolyse : 50,3 mg Résidu après hydrolyse : 32,9 mg					Analyse organique élémentaire					
					65,4*					
		C (mg)	%	N (mg)	%	C%	N %	H %	C/N	H/C
Polycondensats azotés		26,54	100	1,69	100,0	52,8	3,4	2,9	15,8	0,7
Résidu	(1)	19,73	74,3	0,74	43,7	60,0	2,2	2,3	26,8	0,5
	(2)	20,58	77,5	0,78	46,0					
Hydrolysats	(1)	5,72	21,6	0,86	50,9					
	(2)	5,96	22,5	0,91	54,0					
Total	(1)	25,45	95,9	1,60	94,6					
	(2)	26,54	100	1,69	100,0					

(1) mesuré ; (2) ajusté à 100 %

* % en poids du résidu après hydrolyse, par rapport au poids soumis à l'hydrolyse.

L'attaque acide se traduit à la fin de la réaction d'hydrolyse par l'insolubilisation de 65,4 % du poids total de l'échantillon soumis à hydrolyse. La solution filtrée, de teinte jaune, contient le carbone et l'azote dits hydrolysables. Elle comporte respectivement 22,4 % et 54 % du carbone et de l'azote contenus dans le polycondensat initial, ce qui permet d'apprécier le degré de résistance à l'hydrolyse acide (Tableau XIII). On remarque donc que 77 % et 46 % respectivement du carbone et de l'azote de l'échantillon initial ne sont pas hydrolysés.

L'azote hydrolysable (54 %) est formé en quasi-totalité par l'azote ammoniacal (53 %) (Tableau XIV). Le traitement au Zn en milieu acide (HCl 12N) suivi de l'hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C) permet de noter la présence au moins de 1,5 % de l'azote total incorporé sous forme nitrée et nitrosée. Notons au passage que l'azote hydrolysable sous forme NH_4^+ peut provenir des formes nitrosées.

Tableau XIV.- Répartition des formes d'azote hydrolysable issues de l'hydrolyse acide (HCl 3N 130°C, 16 h) du polycondensat azoté purifié issu de l'oxydation de la purpurogalline par NO_2^- en milieu tamponné (pH 5) et en l'absence d'oxygène.

Formes de l'azote		N (mg)	% N total
Polycondensats azotés (PurN5)		1,69	100
N non hydrolysable		0,78	46,2
N hydrolysable	N- NH_4^+	0,89	52,7
	N non identifié	0,02	1,2

CONCLUSION DU CHAPITRE IV???

CHAPITRE V

CARACTÉRISATION CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT ISSU DE L'OXYDATION PÉROXYDASIQUE DU PYROGALLOL

**CARACTÉRISATION CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT
ISSU DE L'OXYDATION PÉROXYDASIQUE DU PYROGALLOL**

Dans le but de préciser les processus de synthèse des substances humiques, SCHNITZER *et al.* (1984) ont étudié la polymérisation du pyrogallol par la peroxydase en présence de H_2O_2 et de l'air libre. Leurs résultats sont commentés en parallèle avec ceux obtenus dans ce travail. On peut noter toutefois que les conditions de réaction sont différentes. Dans ce travail le pH est fixé à 7 afin de trouver les conditions optimales pour la réactivité enzymatique et la réaction se déroule en l'absence d'oxygène moléculaire. Par contre, SCHNITZER *et al.* (1984) ont étudié la réaction à pH 9 et en présence de l'oxygène de l'air, ce qui favorise dans ces conditions l'auto-oxydation du pyrogallol plutôt que la réaction enzymatique en présence de H_2O_2 .

Par ailleurs, la quantité de polymères obtenus par SCHNITZER *et al.* (1984), par précipitation acide est bien supérieure à celle trouvée après dialyse des molécules ($PM > 12000$ dal). Ceci peut s'expliquer, indépendamment de la dialyse des molécules dont le PM est inférieur à 12000 dal., par la dialyse partielle de la purpurogalline formée au cours de la réaction, comme on l'a montré dans la réaction d'autoxydation à pH 8. Cependant la purpurogalline ne peut pas être éliminée totalement par dialyse car elle n'est pas très soluble en milieu aqueux. Il y a lieu de penser que ces polymères contiennent des résidus purpurogalliques.

V.- POLYCONDENSAT ISSU DE L'OXYDATION DU PYROGALLOL PAR LA PÉROXYDASE EN PRÉSENCE DE PÉROXYDE D'HYDROGÈNE ($P(H_2O_2)_7$). RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le polycondensat $P(H_2O_2)_7$ ($PM > 2000$ dal.) présente une teinte noire et son absorption dans l'UV-Vis se traduit par un spectre monotone dont l'intensité d'absorption augmente du Visible vers l'UV sans bande typique apparente. Ce comportement en spectrophotométrie UV-Vis est en accord avec le caractère condensé. Le caractère aromatique est indiqué par le rapport atomique H/C inférieur à 1 ($=0,52$) (Tableau XV). Le polycondensat $P(H_2O_2)_7$ a un caractère plus aromatique que l'acide humique obtenu par SCHNITZER *et al.* (1984).

Tableau XV.- Analyse élémentaire des polycondensats P(H₂O₂)₇ et A.H.

Polycondensats	C %	N %	H %	O %	H / C
P(H ₂ O ₂) ₇ (PM > 2000 dal.)	50,9	0	2,2	44,9	0,52
A.H. (PM > 12000 dal.)	57,3	0,18	3,4	39	0,7

P(H₂O₂)₇ : polymère purifié issu de l'oxydation du pyrogallol par la peroxydase en présence de H₂O₂ en milieu tamponné (pH 7), en l'absence d'oxygène moléculaire.

A.H. : Acide humique obtenu par oxydation du pyrogallol en présence de peroxydase, de H₂O₂ et de l'oxygène de l'air en milieu alcalin de pH 9 (selon SCHNITZER *et al.*, 1984).

L'analyse fonctionnelle du polycondensat purifié P(H₂O₂)₇ permet de confirmer son caractère acide (A.T. = 5,2). L'acidité carboxylique est prépondérante (83%) (Tableau XVI). L'acide humique de Schnitzer est beaucoup plus acide (A.T = 17,5). L'acidité carboxylique ne représente que 25 % de l'acidité totale. La comparaison entre les deux polymères est sous réserve car ils diffèrent beaucoup d'une part par leur taille moléculaire et, d'autre part par la méthode de détermination des acidités. On peut toutefois noter, dans les deux cas, la création de sites acides de type carboxylique dont l'origine est l'ouverture des cycles aromatiques.

Tableau XVI.- Analyse des acidités des polycondensats P(H₂O₂)₇ et A.H. (me/g).

Polycondensats	A.T.	Af(-COOH)	Atf(-OH)	% (Af/A.T.)
P(H ₂ O ₂) ₇ (PM > 2000 dal)	5,2	4,3	0,9	82,7
A.H. (PM > 12000 dal.)	17,5	4,3	13,2	24,6

P(H₂O₂)₇ : polymère purifié issu de l'oxydation du pyrogallol par la peroxydase en présence de H₂O₂ en milieu tamponné (pH 7) en l'absence d'oxygène moléculaire. Acidité déterminée par la méthode de Brunelot *et al.* (1990).

A.H. : Acide humique obtenu par oxydation du pyrogallol en présence de peroxydase, de H₂O₂ et de l'oxygène de l'air en milieu alcalin (pH 9) (selon SCHNITZER *et al.*, 1984). Acidité déterminée par la méthode de SCHNITZER et GUPTA (1965).

Par ailleurs le spectre infra-rouge du polycondensat, $P(H_2O_2)_7$ (Figure 20) met en évidence la prépondérance des fonctions oxygénées notamment des fonctions acides carboxyliques qui absorbent à 1708 cm^{-1} . On remarque un épaulement situé vers 1764 cm^{-1} qui peut être attribué vraisemblablement à la présence de groupements lactones cycliques. L'existence des groupements carbonylés est indiquée par la bande située à 1616 cm^{-1} où absorbent également les doubles liaisons $-C=C-$ des cycles benzéniques. SCHNITZER *et al.* (1984) notent la présence en outre de l'existence de groupements aryl-éther qui absorbent entre 1200 et 1000 cm^{-1} (SCHNITZER, Figure 20). De tels groupements sont difficiles à mettre en évidence pour le $P(H_2O_2)_7$.

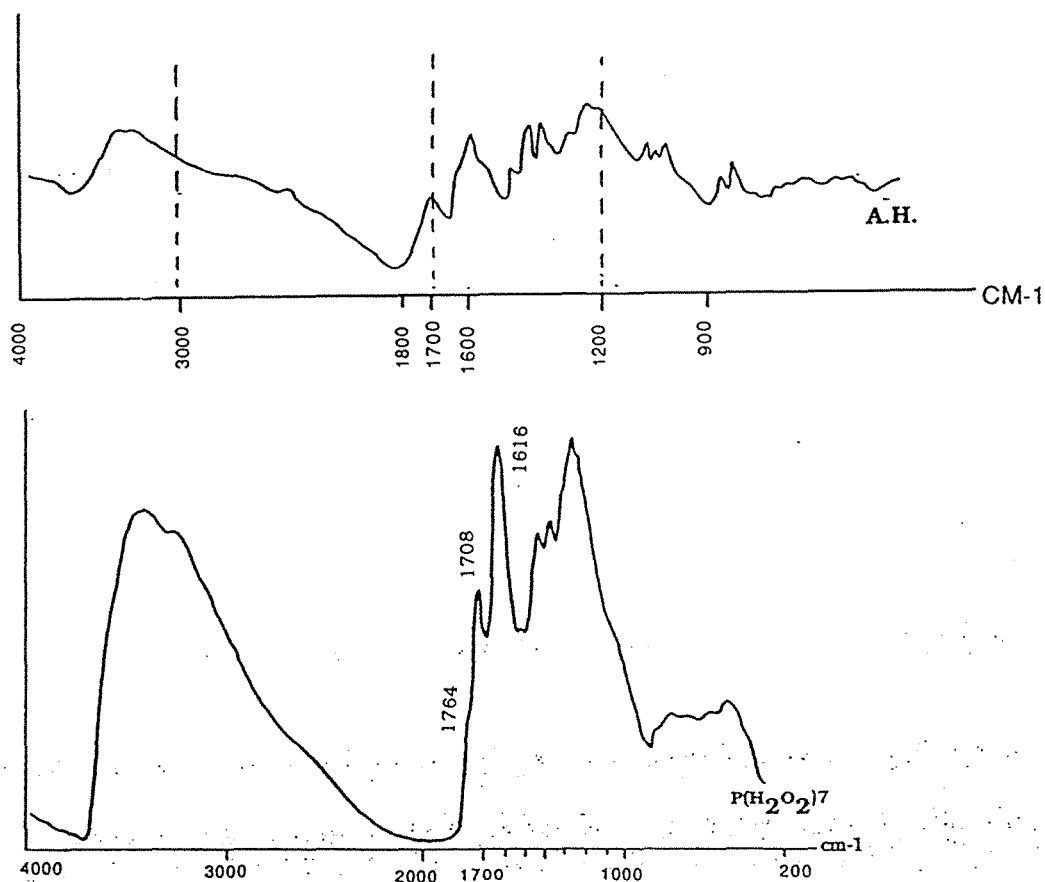


Figure 20.- Spectres d'adsorption infra-rouge des polycondensats, $P(H_2O_2)_7$ et A.H.

$P(H_2O_2)_7$: Polymère purifié issu de l'oxydation du pyrogallol par la peroxydase en présence de H_2O_2 en milieu tamponné de pH 7 en l'absence d'oxygène moléculaire.

A.H. : Acide humique obtenu par oxydation du pyrogallol en présence de peroxydase, de H_2O_2 et de l'oxygène de l'air en milieu alcalin de pH 9 selon SCHNITZER *et al.*, (1984).

La bande large située entre 3500 et 3000 cm^{-1} correspond à l'ensemble des groupements hydroxyles, de type phénolique, alcoolique ou carboxylique associés, dont la largeur de bande indique l'importance des associations. On remarque sur le spectre P(H₂O₂)7 l'absence de bandes spécifiques aux -CH aliphatiques qui absorbent entre 3000 et 2800 cm^{-1} . La région située entre 2700 et 2400 cm^{-1} ne manifeste qu'une faible absorption due à l'association des groupements -OH avec les -C=O carboxyliques. L'absorption entre 1400 et 1200 cm^{-1} peut être attribuée à l'ensemble des déformations des liaisons C-O des différents groupements hydroxyles.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent l'aptitude du pyrogallol à s'oxyder en milieu aqueux à divers pH (acide, neutre ou alcalin) en présence de différents agents oxydants ($\text{NO}_2^- \pm \text{O}_2$, Peroxydase, O_2). D'un point de vue réactionnel, la voie commune à tous ces systèmes d'oxydation est la formation de produits quinoniques comme premiers intermédiaires de réaction. Par ailleurs, la purpurogalline peut être considérée comme le premier produit stable issu de l'oxydation du pyrogallol.

La purpurogalline ainsi formée peut s'oxyder à son tour et participer à la formation de produits complexes (Figure 21).

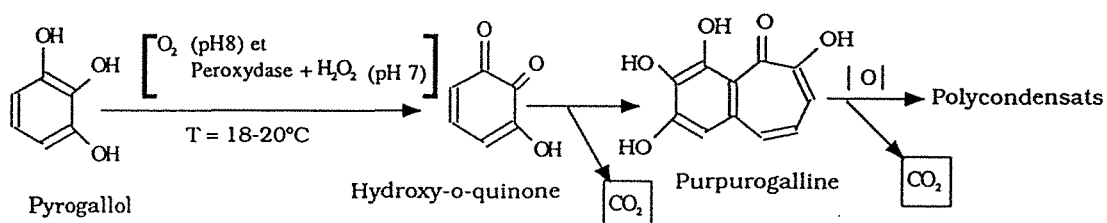


Figure 21 : Mécanisme de formation des polycondensats à caractère humique par auto-oxydation (pH 8) ou oxydation enzymatique en présence de H_2O_2 (pH 7) du pyrogallol.

Dans le cas de l'oxydation du pyrogallol par NO_2^- , et d'après les résultats dont il est fait état dans la littérature (KAINZ et HUBER, 1959), ce mécanisme est en fait plus complexe car la quinone formée par nitrosation peut être la 2,3-hydroxy-p-benzoquinone qui ne peut pas conduire à la formation de la purpurogalline (Figure 22). Ceci tend à montrer la complexité des mécanismes de réaction mis en jeu au cours de l'élaboration des produits brun-noir.

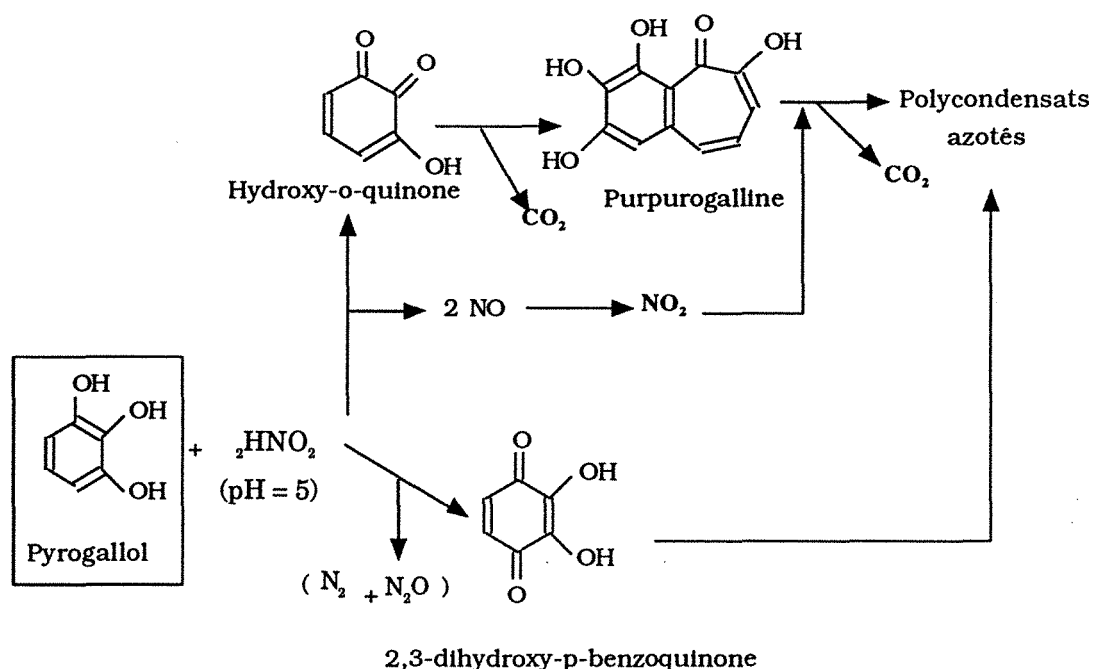


Figure 22.- Mécanisme de formation de polycondensats azotés à caractère humique à partir du pyrogallol et de NO_2^- en milieu acide (pH 5).

La polycondensation oxydative du pyrogallol aboutit dans tous les cas à des produits brun-noir. Ces derniers sont caractérisés par leur poids moléculaire élevé. Leurs spectres d'absorption dans l'UV-Vis (Figure 22) sont dépourvus de bandes caractéristiques. L'intensité d'absorption augmente du Visible vers l'UV ; ce comportement est lié à leur caractère polycondensé comme l'ont noté CHEN *et al.*(1977). RIFFALDI et SCHNITZER (1972b) ont noté qu'il existe une corrélation positive entre le rapport Q4/6 et la condensation moléculaire. Plus le rapport est bas, plus le degré de condensation est important (Tableau XVII).

Tableau XVII.- Indice d'aromaticité (H/C) et coefficient chromatique (Q 4/6) des polycondensats obtenus par oxydation du pyrogallol et de la purpurogalline.

Polycondensats (PM > 2000 dal.)	H/C	Q 4/6
PN5	0,63	6,05
PNO5	0,61	12,85
P(NO)O5	0,68	6,62
PO8	0,58	6,98
P(H ₂ O ₂)7	0,52	2,28
PurN5	0,67	7,67

Légende : voir tableaux précédents

Les analyses fonctionnelles effectuées sur les polycondensats ont montré que la formation de produits brun-noir est accompagnée de la création de sites acides de types carboxyliques dont l'origine est vraisemblablement l'ouverture des cycles quinoniques ou benzéniques. Les polycondensats sont riches aussi en groupements carbonyles de type quinonique dont l'origine est l'oxydation des groupements phénoliques de départ. La présence de tels groupements entraîne pour les polycondensats une certaine aptitude à la réduction par BH_4Na .

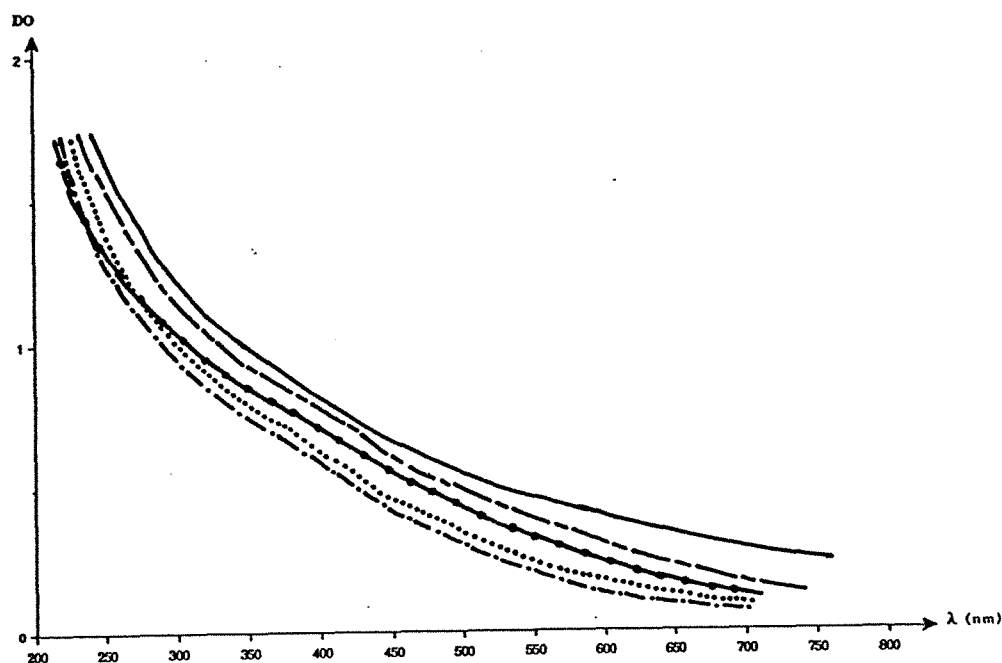


Figure 23.- Spectres d'absorption dans l'UV-Vis (200-800 nm) des polycondensats modèles obtenus par oxydation du pyrogallol.

Concentration : 1 mg/10 ml de NaHCO_3 0,05N.

(—)PN5 : Polycondensat azoté (PM>2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH 5) en absence d'oxygène.

(- - -)PNO5 : Polycondensat azoté (PM>2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH 5) en présence d'oxygène.

(.....)PurN5 : Polycondensat azoté (PM>2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec la purpurogalline en milieu acide tamponné (pH 5) en absence d'oxygène.

(—●—)PO8 : Polycondensat (PM>2000) obtenu par autoxydation du pyrogallol en milieu tamponné de pH 8.

(- - - -)P(H_2O_2)7 : Polycondensat (PM>2000) obtenu par oxydation péroxydasique en présence de H_2O_2 en milieu tamponné de pH 7 en l'absence d'oxygène moléculaire.

Des expériences complémentaires réalisées avec les polycondensats (PN5 et PurN5) en présence de NO_2^- en milieu tamponné de pH5 permettent de constater que ces produits possèdent aussi un pouvoir réducteur vis-à-vis de NO_2^- . On a pu observer en effet la formation de dérivés gazeux (NO , N_2 et N_2O) et le dégagement de CO_2 .

Les systèmes réactionnels formés de pyrogallol et de NO_2^- en absence ou en présence d'oxygène nous ont permis de mieux comprendre l'action de NO_2^- vis-à-vis des substrats polyphénoliques. Ainsi nous pouvons conclure à l'action déterminante de l'oxygène quant à

l'accélération du processus d'incorporation de l'azote d'origine nitreuse dans les polycondensats formés. Cette accélération a pour origine la formation en présence d'oxygène d'un oxydant fort, le peroxyde d'azote (NO_2), qui se comporte comme un radical libre en solution acide (NO_2^+). En absence d'oxygène, nous avons constaté que la réactivité entre NO_2^- et le substrat phénolique est de manière prédominante la transformation de NO_2^- en un mélange de constituants gazeux (60% de l'azote nitreux initial au bout de 5 jours de réaction).

La détermination de l'azote incorporé dans les polycondensats de $\text{PM} > 2000$ dal. a permis d'identifier, par infra-rouge, l'azote des groupements nitrés (R-NO_2) aromatiques dans le polycondensat obtenu par réaction de la purpurogalline avec NO_2^- et, par analyse chimique la présence de l'azote sous formes nitrées et nitrosées à des quantités ne dépassant pas 6% selon le polycondensat considéré. On remarque toutefois que cette quantité est élevée pour les polycondensats issus de l'oxydation du pyrogallol par NO_2^- en présence d'oxygène. Il faut souligner donc l'importance de l'oxygène dans le processus d'interaction de NO_2^- avec les polyphénols en milieu acide car, non seulement il accroît les proportions d'azote incorporé mais favorise la formation de certaines formes oxygénées et particulièrement les formes nitrées qui sont résistantes à l'hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C).

Comparaison avec les substances humiques modèles ou extraites du sol

La synthèse de produits brun-noir à partir de précurseurs modèles de nature polyphénolique en conditions contrôlées nous a permis de mieux comprendre les étapes initiales de la formation des macromolécules humiques. Le NO_2^- est susceptible de participer activement à l'élaboration de telles substances avec incorporation d'azote d'origine nitreuse. La détermination de leurs caractéristiques nous permet de les comparer avec des polycondensats synthétiques ou naturels décrits dans la littérature. Le tableau XVIII résume quelques caractéristiques des polymères obtenus par oxydation de composés polyphénoliques ou extraits des sols.



Tableau XVIII.- Analyses chimiques de différents polycondensats de type humique.

Polycondensats	Méthode d'obtention	Analyse élémentaire						Acidité totale	PM	Réf.
		% C	% H	% N	% O	H/C	C/N			
Pyrogallol	Oxydation enzymatique H_2O_2 + air, pH 9	57,31	3,36	0,18	39	0,7		17,5	> 10000 (dialyse)	Schnitzer <i>et al.</i> , 1984
Mélange de composés polyphénoliques (di-, Tri- et acides phénoliques)	Oxydation catalytique en présence d'argiles, $\text{NH}_4 \text{NH}_2 \text{CO}_2$ pH 5,3	52,1	5,1	4,9	37,9	1,17	10,63	6,1	> 1000 (dialyse)	Wang <i>et al.</i> , 1983
Acide humique (Rendol A ₁)	Extraction (NaOH 0,1N)	47,4	4,6	4,29	39	1,16	11	3,4	> 40000 (dialyse)	Portal <i>et al.</i> , 1986
Acide humique (A ₁ Rendzine)	Extraction $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 M	46,3	5	3,1	45,6	1,3	14,93	4,6	15000-20000 Perméation sur gel G50	Andreux, 1978
Pyrogallol-(PN5)	Oxydation en présence de NO_2^- , pH 5 (en l'absence d'oxygène)	49,4	2,7	3,06	44,4	0,63	16,4	6,22	2500-3500 > 30000* (G50)	la présente étude
Pyrogallol-(PNO5)	Oxydation en présence de NO_2^- et O_2 , pH 5	47,09	2,4	6,45	40,9	0,61	7,3	7,71	6000* > 30000 (G50)	la présente étude
Pyrogallol-(P(NO)O5)	Oxydation en présence de NO et O_2 , pH 5	45,3	2,56	4,5	41,6	0,68	10,07	6,26	4000-4500* 30000(G50)	la présente étude
Pyrogallol-(PO8)	Oxydation en présence de O_2 , pH 8	54,04	2,64	0	43,3	0,58		6,87	3000-3500* > 30000 (G50)	la présente étude
Pyrogallol-(P(H_2O_2)7)	Oxydation enzymatique en présence de H_2O_2 , pH 7	50,86	2,22	0	44,9	0,52		5,2	> 2000 (dialyse)	la présente étude
Purpurogalline-(PurN5)	Oxydation en présence de NO_2^- , pH5	52,8	3,4	2,9	40,9	0,67	15,75	7,02	3000-4000 > 30000 (G50)	la présente étude

*Fraction prédominante.

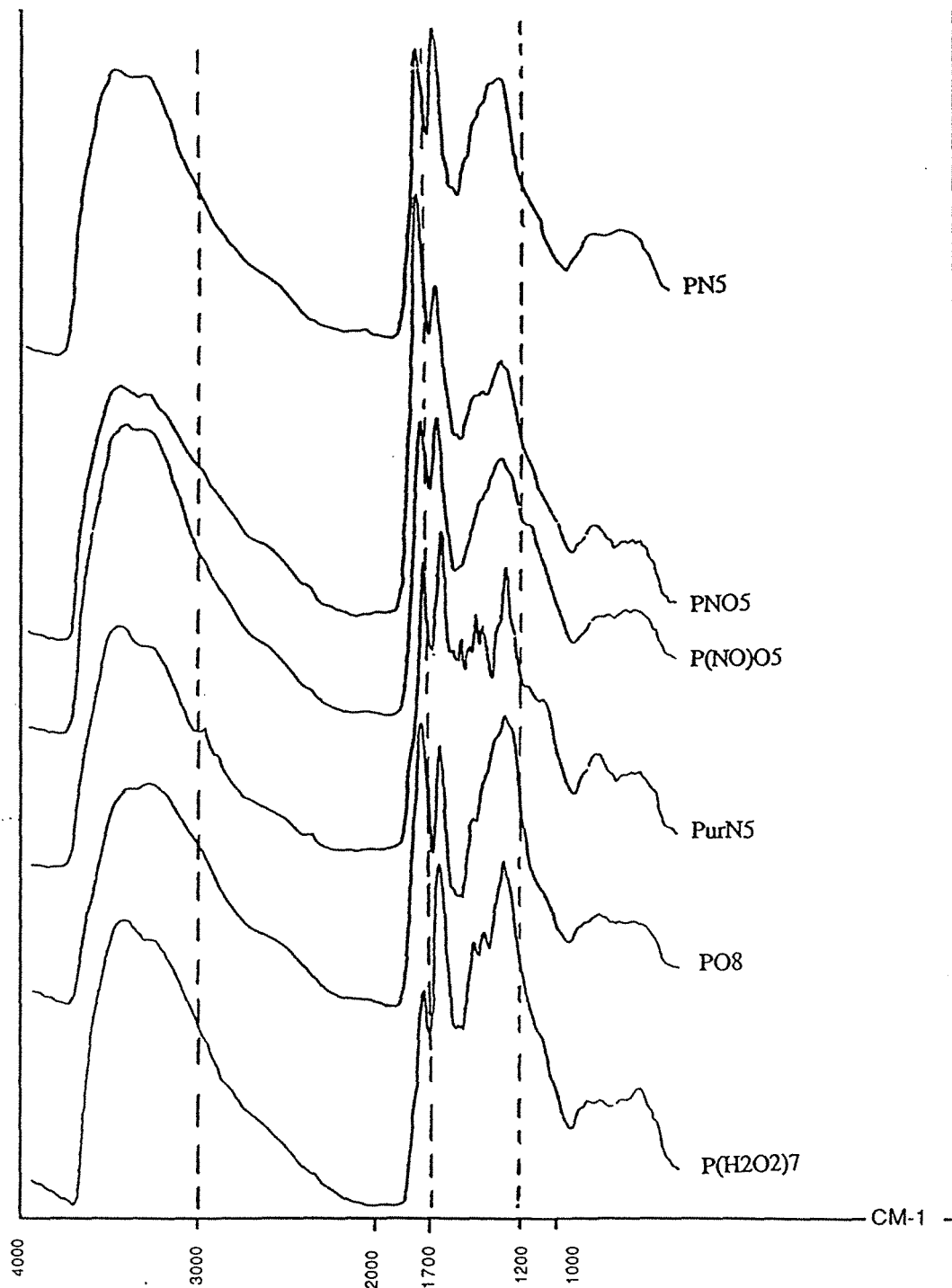


Figure 24.- Spectres d'absorption infra-rouge des polycondensats modèles obtenus par oxydation du pyrogallol. Concentration : 1 mg/200 mg KBr.

PN5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH 5) en absence d'oxygène.

PNO5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH 5) en présence d'oxygène.

P(NO)O5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de $(\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2)$ avec le pyrogallol en milieu acide tamponné (pH 5).

PurN5 : Polycondensat azoté (PM > 2000) obtenu par réaction de NO_2^- avec la purpurogalline en milieu acide tamponné (pH 5) en absence d'oxygène.

PO8 : Polycondensat (PM > 2000) obtenu par autoxydation du pyrogallol en milieu tamponné de pH 8.

P(H_2O_2)7 : Polycondensat (PM > 2000) obtenu par oxydation péroxydasique en présence de H_2O_2 en milieu tamponné de pH 7 en l'absence d'oxygène moléculaire.

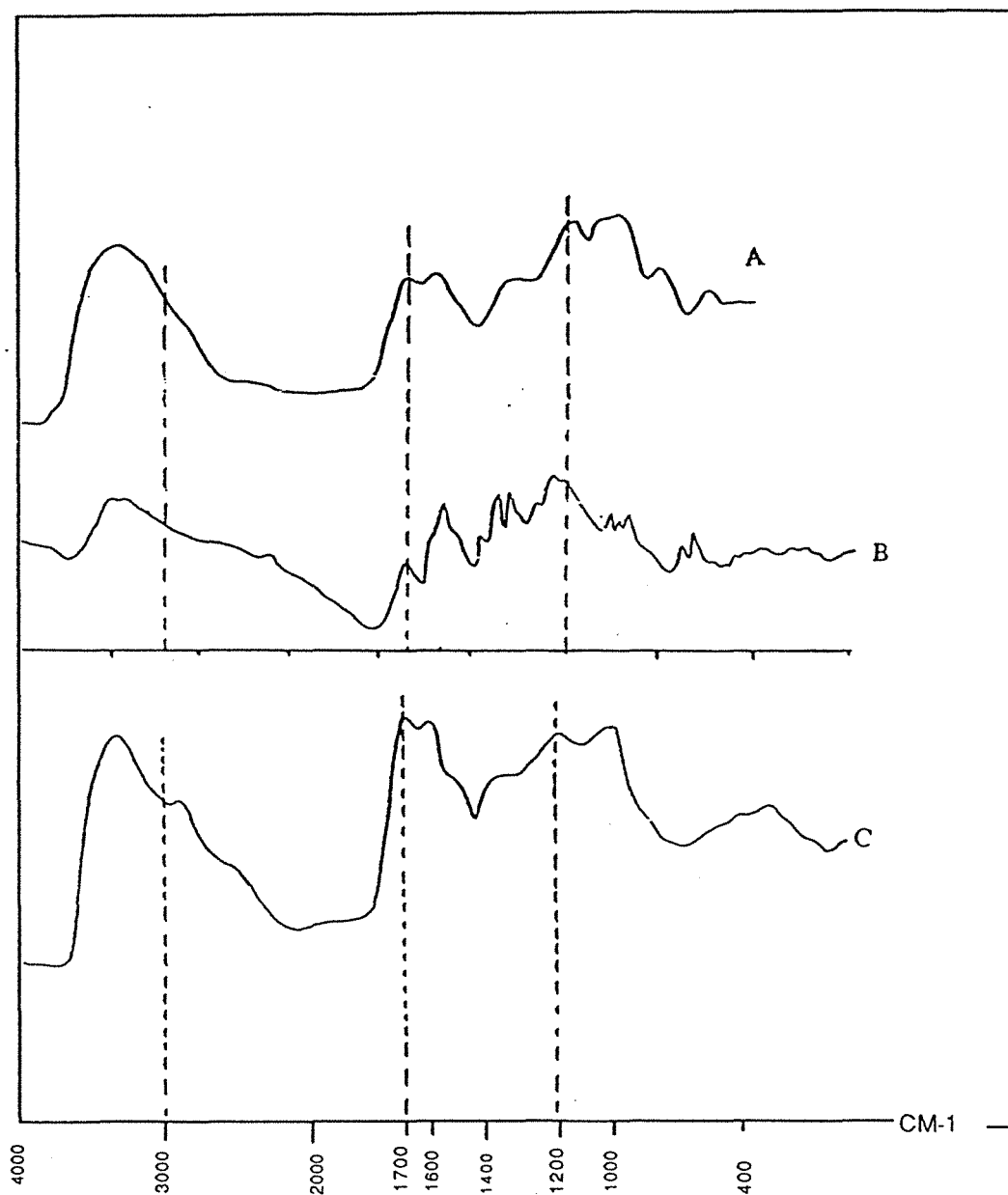


Figure 25.- Spectres Infra-rouges des polycondensats humiques modèles ou extraits des sols:

A - Polycondensat modèle obtenu par oxydation catalytique, en présence d'argiles, d'un mélange de composés phénoliques en milieu tamponné de pH 5,3 d'après WANG *et al.* (1983).

B - Polycondensat modèle obtenu par oxydation péroxydasique du pyrogallol en présence de H_2O_2 et de l'air en milieu tamponné de pH 9 d'après SCHNITZER *et al.* (1984).

C - Acide humique extrait d'une Rendzine (A_1) d'après ANDREUX (1978).

Les polycondensats synthétiques présentent une acidité totale relativement plus élevée ($5 < A.T. < 8$) que celle des acides humiques des sols ($3 < A.T. < 5$). L'analyse élémentaire permet cependant de constater une composition organique très proche. Le C/N est compris entre 7 et 16 ce qui correspond bien à celui aussi trouvé pour les substances humiques des sols ($11 < C/N < 15$). La comparaison du rapport H/C, ou indice d'aromaticité, fait apparaître une aromaticité des polycondensats synthétiques ($0,5 < H/C < 0,7$) supérieure à celle des acides humiques des sols ($H/C > 1$).

La confrontation des spectres IR (Figures 24 et 25) nous permet de noter une analogie fonctionnelle entre les différents polycondensats. Ils présentent tous des fonctions oxygénées -OH, COOH et C=O. Il faut noter toutefois la faible présence de groupements aliphatiques chez les polycondensats synthétisés à partir de composés polyphénoliques modèles.

L'origine des substances humiques des sols a été largement étudiée et la participation de composés polyphénoliques est démontrée. A l'issue de cette étude nous pouvons noter l'importance de la nitrosation dans la formation de substances brun-noir qui ressemblent davantage à des substances humiques naturelles. Ce mécanisme est également accompagné de la formation d'azote organique à partir de l'azote d'origine nitréuse.

TROISIÈME PARTIE

*ÉTUDE DE LA RÉACTION DE NO_2^-
AVEC LE MÉLANGE STœCHIONIÉTRIQUE
CATÉCHOL-GLYCINE*

Pour comprendre le déroulement de la réaction de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine, nous avons analysé les différentes formes de l'azote et du carbone suivant le protocole rappelé brièvement ci-dessous.

① L'oxydation du catéchol a été suivie par spectrophotométrie UV-Vis au cours du temps. La formation du CO_2 en provenance du catéchol a été déterminée à l'aide des produits marqués sélectivement sur le C_1 ou le C_2 de la glycine. Le CO_2 formé est entraîné à l'aide d'un courant d'hélium et fixé dans une solution de NaOH 0,45N. Dans cette solution on dose le CO_2 total fixé par titration en retour par HCl 0,1N en présence de BaCl_2 et de thymolphtaléine cependant que le $^{14}\text{CO}_2$ est déterminé par scintillation liquide. Le CO_2 en provenance du catéchol est déterminé par différence entre le CO_2 total et $^{14}\text{CO}_2$.

② Cinétique de la décomposition de NO_2^- : la consommation de NO_2^- au cours du temps a été suivie par dosage de NO_2^- par la méthode de BREMNER et KENNY (1966).

③ Cinétique de la dégradation de la glycine : la transformation de la glycine au cours du temps a été suivie par dosage à la ninhydrine et formation de NH_4OH par distillation suivant la méthode de Kjeldahl. Le $^{14}\text{CO}_2$ formé est déterminé par scintillation liquide après entraînement du CO_2 résultant par un courant d'hélium puis fixation sur NaOH 0,45N.

④ Pour déterminer l'azote et le carbone intégrés dans les polycondensats finaux de $\text{PM} > 2000$ dal. à partir de chaque composé, nous avons utilisé NaNO_2 enrichi en ^{15}N à 5,9 % et la glycine marquée sur le carbone C_1 ou C_2 . A la fin de la réaction (15 jours) nous avons procédé à la dialyse du mélange réactionnel contre de l'eau distillée au travers d'une membrane de point de coupure 2000dal. Dans les deux fractions résultantes, dialysat ($\text{PM} < 2000$ dal) et adialysat ($\text{PM} > 2000$ dal) nous avons déterminé les teneurs en ^{15}N , azote total, carbone total et ^{14}C . Le carbone provenant du catéchol est déterminé par différence entre le carbone total et le ^{14}C , tandis que l'azote provenant de la glycine est déterminé par différence entre l'azote total et l'azote ^{15}N .

Les caractéristiques physiques et chimiques des polycondensats finaux ($\text{PM} > 2000$ dal), recueillis par dialyse après 5 jours de réaction, sont déterminées par analyse de la composition élémentaire et détermination des groupements fonctionnels par spectrophotométrie IR et titration des fonctions acides. La dégradation chlorhydrique (HCl 3N, 130°C) des produits polycondensés permet de déterminer la stabilité de l'azote incorporé.

CHAPITRE I

OXYDATION DU CATÉCHOL

OXYDATION DU CATÉCHOL

I-1.- PRODUITS D'OXYDATION DU CATÉCHOL : SPECTROPHOTOMÉTRIE DANS L'UV-VIS DU MÉLANGE RÉACTIONNEL

La réaction de l'ion nitrite avec le catéchol et la glycine en concentration équimolaire (0,03 M) se déroule en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire à la température du laboratoire (18-20°C). Elle est suivie par spectrophotométrie UV-Vis (200-800 nm) au cours du temps. Le spectre UV-Vis est établi à partir d'une partie aliquote du mélange réactionnel que l'on dilue 50 fois dans H₂O.

Le mélange réactionnel développe rapidement une teinte jaune qui s'intensifie pour devenir brun foncée après 24 heures de réaction.

Le catéchol seul en milieu aqueux acide (tampon phosphate de pH 5) absorbe dans l'UV à 221 et 277 nm. La figure 26 représentant l'absorption dans l'UV-Vis du milieu réactionnel fait apparaître deux bandes supplémentaires à 340 et 430nm dont l'intensité d'absorption augmente au cours du temps. La DO à 330-340 nm se stabilise au bout de 9 jours de réaction alors que celle à 430 nm continue à augmenter jusqu'à la fin de l'expérimentation (15 jours).

Les bandes d'absorption à 330-340 et 430 nm sont attribuables généralement à des produits de nature quinonique. L'oxydation du diphenol par NO₂⁻ conduit donc à la formation de précurseurs quinoniques qui se polycondensent par la suite. Ainsi le suivi de l'absorption du mélange réactionnel dans l'UV-Vis se traduit par un accroissement général de l'absorption dans la région 300-500nm et par la présence des maxima 340 et 430 nm. Tandis que l'absorption à 330-340 nm peut être attribuée à des quinones peu polymérisées, la bande 430 nm dont l'intensité s'accroît lentement au cours du temps semble traduire l'évolution de l'état de polycondensation du système.

L'étude du système réactionnel formé de catéchol et de glycine en milieu tamponné de pH alcalin (pH 7,9) en présence de l'oxygène moléculaire a montré, d'après ANDREUX (1978), la formation de précurseurs quinoniques (ortho-benzoquinone) et la formation d'une combinaison catéchol-glycine. Cette dernière est caractérisée par une coloration rouge qui absorbe dans le visible

à 480 nm et par un épaulement dans l'UV situé à 320 nm (Tableau XIX) attribué à une combinaison glycine-catéchol, car cette bande est absente dans le cas de l'oxydation du catéchol seul (ANDREUX, 1978). Nos résultats tendent à montrer l'existence d'un mécanisme chimique débouchant sur la formation de produits porteurs de fonctions quinoniques autres que celles formées dans le système réactionnel catéchol-glycine en milieu alcalin (pH 7,9).

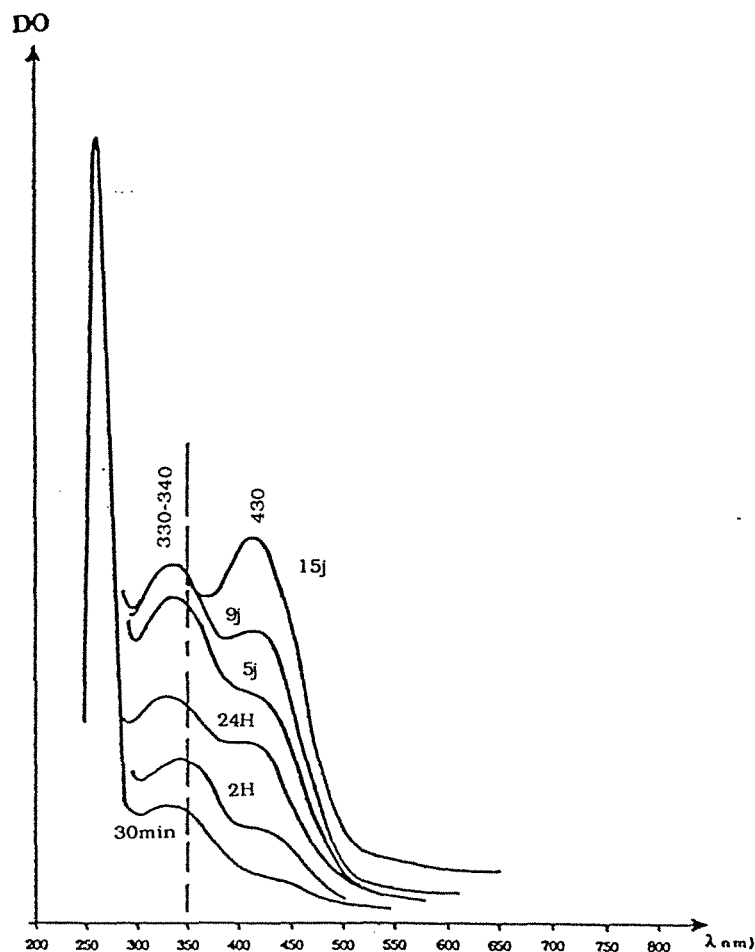
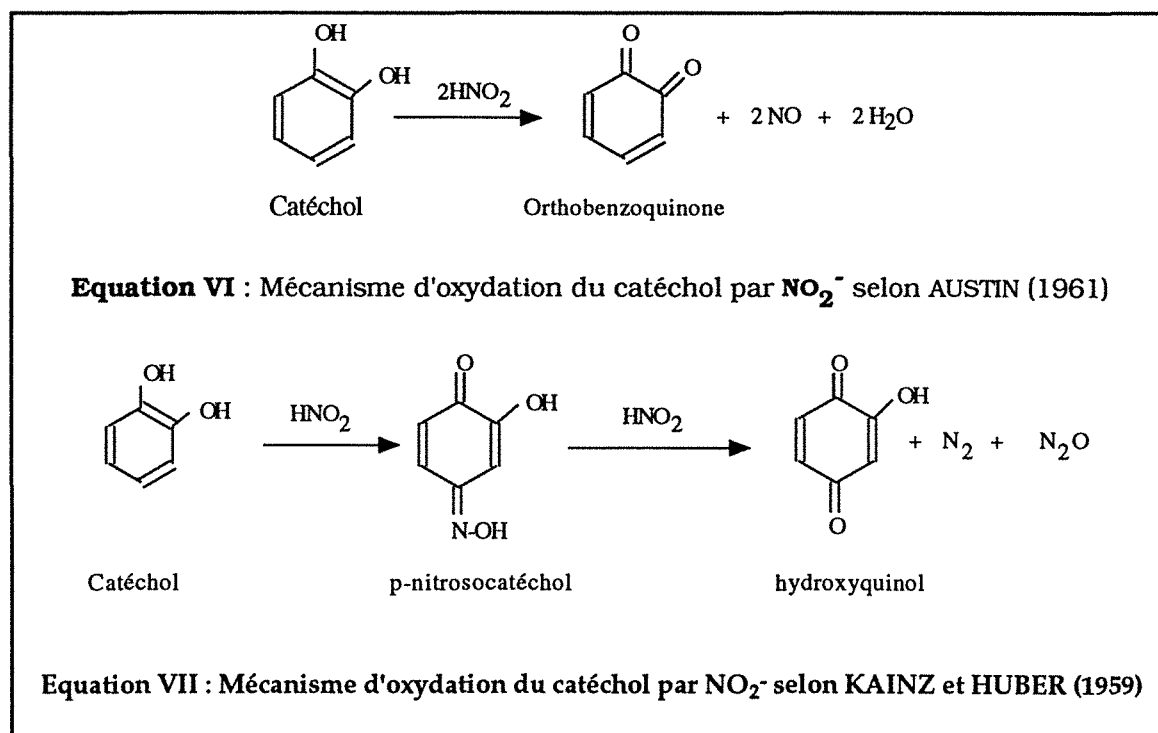


Figure 26.- Evolution au cours du temps de l'absorption dans l'UV-Vis du mélange réactionnel, formé de catéchol, glycine et NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire. Concentration équimolaire : 0,03 M. 1 ml du mélange réactionnel dilué 50 fois avec H_2O .

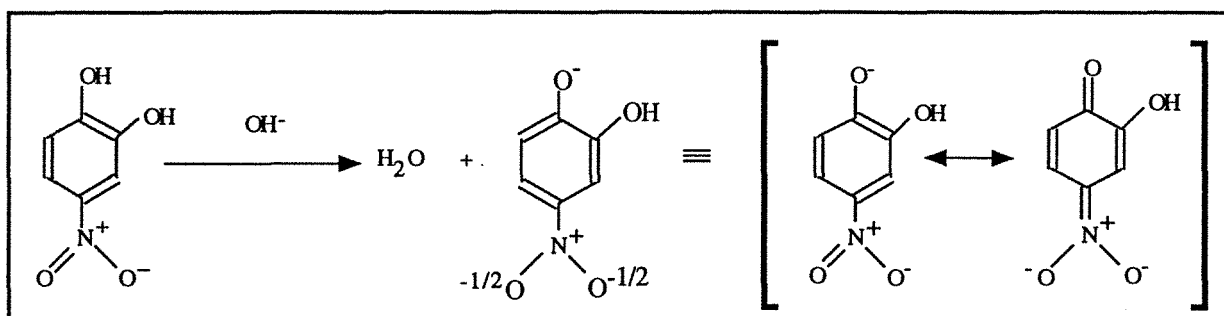
Tableau XIX.- Bandes d'absorption de différents milieux réactionnels à 30 minutes de réaction.

Absorption	Milieux réactionnels		
	Catéchol + O ₂ (pH 7,9) (λ max)nm (Andreux, 1978)	Catéchol + glycine + O ₂ (pH 7,9) (λ max)nm (Andreux, 1978)	Catéchol + glycine + NO ₂ ⁻ (pH 5) (λ max)nm
UV	215 275	215 275 320-330	221 277 330-340
Visible	610-620 (teinte verdâtre)	480 (teinte rouge)	130 (teinte jaune)

La formation de l'ortho-benzoquinone dans le milieu réactionnel catéchol-glycine-NO₂⁻ peut être expliquée par le mécanisme d'AUSTIN (1961) (équation VI). Cependant la même réaction peut conduire à la formation de l'hydroxyquinol selon le mécanisme proposé par KAINZ et HUBER (1959) (équation VII).



Le milieu réactionnel catéchol-glycine- NO_2^- amené à pH alcalin (pH 11) développe rapidement une couleur rouge caractérisée par une λ_{max} située à 510nm tandis qu'on enregistre la disparition de l'absorption à 430 et 330-340 nm (Figure 27-C). Le même résultat est obtenu lorsque le mélange réactionnel n'est formé que de catéchol et NO_2^- (Figure 27-B). La coloration rouge est réversible, elle disparaît après addition de HCl (0,01 N) ce qui est en faveur d'une structure quinonique réductible mais différente de celle trouvée dans le cas du système réactionnel catéchol-glycine en milieu alcalin (pH 7,9). Ce comportement est le même que celui du 4-nitrocatechol qui, en milieu acide (dans un tampon phosphate pH 5) ($6,7 \times 10^{-3}$ M) absorbe dans l'UV à 340, 240 et 211 nm (Figure 27-D). En milieu alcalin le 4-nitrocatechol est caractérisé par une coloration rouge et absorbe fortement dans le Visible avec une λ_{max} située à 510 nm et dans l'UV à 390 et 270 nm, mais avec une intensité inférieure. Ce comportement est certainement lié à l'ionisation des groupements $-\text{OH}$ et $-\text{NO}_2$, en position para, en milieu alcalin comme le montre le schéma suivant :



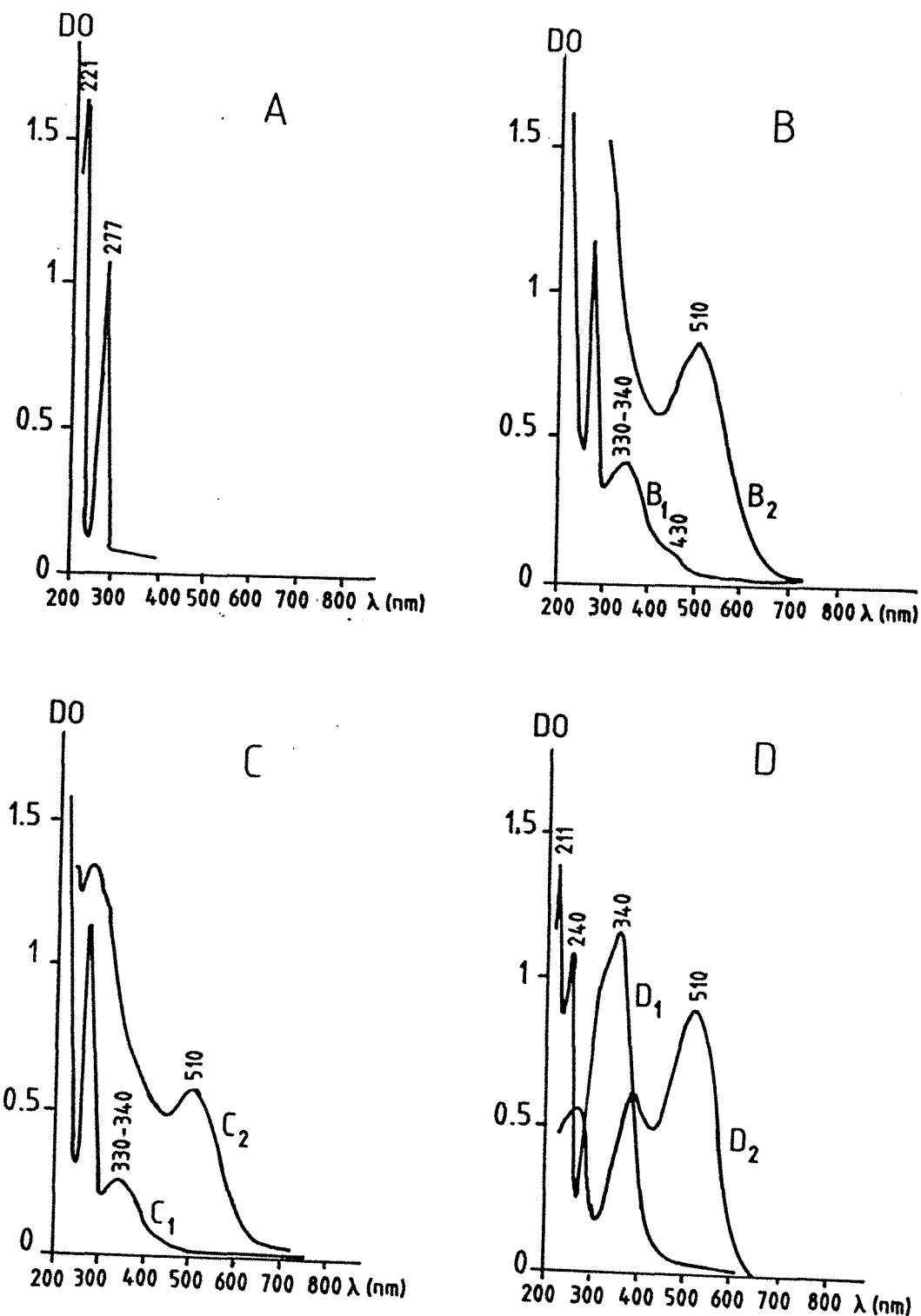


Figure 27.- Spectres d'absorption dans l'UV-Vis (200-800 nm).

A : Catéchol en milieu tamponné de pH 5. Concentration : 0,03 M (spectre obtenu après dilution 50 fois dans H₂O)

B : Catéchol et NaNO₂ en milieu tamponné de pH 5 et en absence d'oxygène. Concentration équimolaire : 0,03M. Temps de réaction : 30 min.

B₁ : Dilution 50 fois dans H₂O,

B₂ : Dilution 50 fois dans NaOH 0,1N.

C : Catéchol, Glycine et NaNO₂ en milieu tamponné de pH 5 et en absence d'oxygène. Concentration équimolaire : 0,03M. Temps de réaction : 30 min.

C₁ : Dilution 50 fois dans H₂O,

C₂ : Dilution 50 fois dans NaOH 0,1N

D : 4-Nitrocatéchol en milieu tamponné de pH 5. Concentration : $6,7 \times 10^{-3}$ M.

D₁ : Dilution 27 fois dans H₂O,

D₂ : Dilution 60 fois dans NaOH 0,1N.

I-2.- OXYDATION DU 4-NITROCATÉCHOL

La formation du 4-nitrocatechol dans le mélange réactionnel formé de NO_2^- et de catéchol-glycine en milieu tamponné de pH 5 est importante dans la mesure où ce composé peut participer à la formation de polycondensats porteurs de fonctions nitrées ($-\text{NO}_2$). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à l'analyse du comportement du 4-nitrocatechol à l'égard du NO_2^- .

Quand on mélange le 4-nitrocatechol et NO_2^- en concentrations équimolaires (0,03 M) en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène moléculaire, le mélange réactionnel, jaune au départ, développe une coloration orange caractérisée par une absorption dans l'UV-Vis et par un épaulement situé à 430 nm, ainsi que par une bande d'absorption à 340 nm avec effacement du maxima 240 nm. Le milieu réactionnel devient brun foncé au bout de 20 heures de réaction et donne lieu à un spectre d'absorption dans l'UV-Vis dont l'intensité augmente du Visible vers l'UV (Figure 28). Ce caractère montre bien la participation du 4-nitrocatechol au processus de polycondensation. Le 4-nitrocatechol est oxydé par NO_2^- en milieu acide (pH 5) en l'absence d'oxygène moléculaire, ce qui donne lieu à un dégagement de CO_2 .

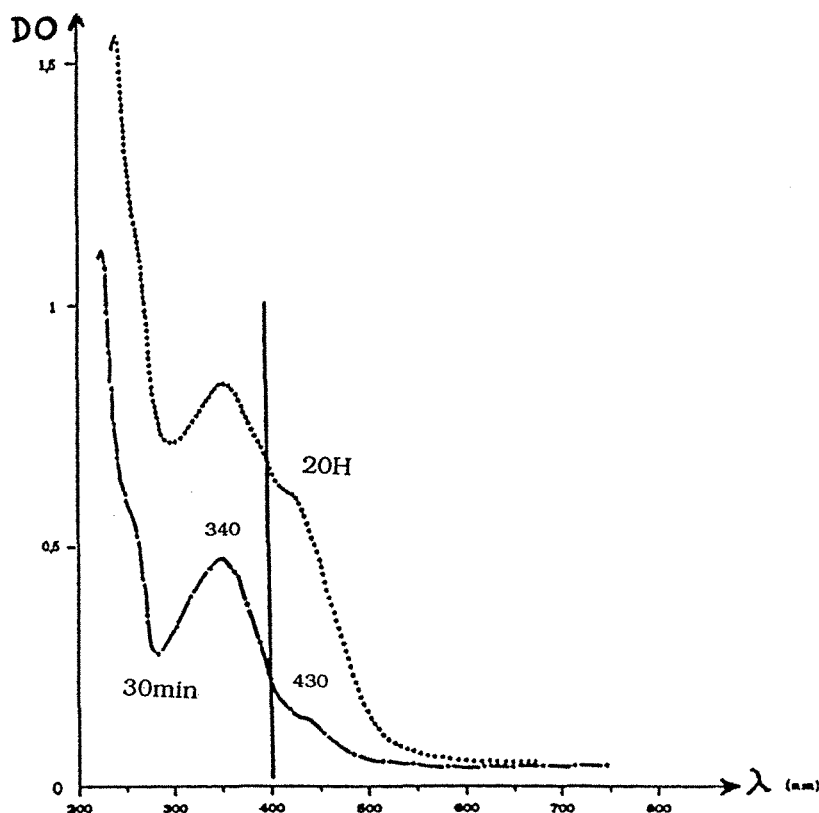
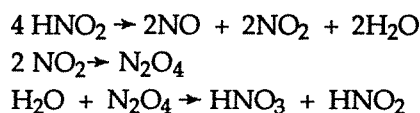
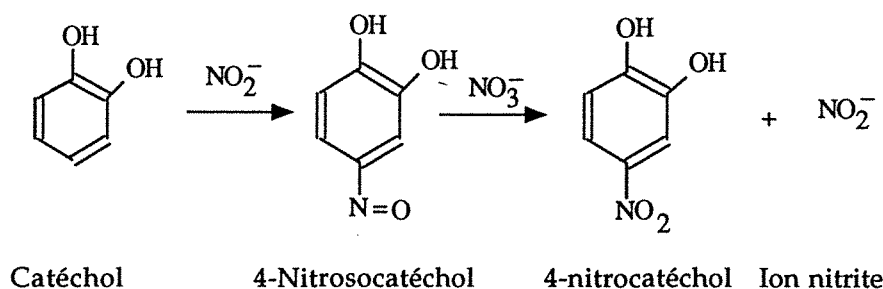


Figure 28- Spectres d'absorption dans l'UV-Vis du mélange réactionnel formé de 4-nitrocatechol et de NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire. Concentration équimolaire : 0,03 M. (dilution 140 fois)
 (—) 30 min. de réaction
 (.....) 20 h de réaction

La formation du 4-nitrocatéchol dans le mélange réactionnel catéchol/glycine- NO_2^- suggère la manifestation d'un mécanisme de nitration. L'ion nitronium (NO_2^+) peut en effet se former en milieu aqueux à partir de NO_2^- selon le mécanisme de SNEED et BRASTED (1956) (équation VIII). Toutefois un autre mécanisme est possible (équation IX), qui met en jeu l'oxydation d'un intermédiaire nitrosé, le nitrosocatéchol formé par réaction de NO_2^- en milieu acide avec le catéchol selon le schéma proposé par KAINZ et HUBER (1959).



Equation VIII : Processus de formation de NO_2 et NO_3^- selon SNEED et BRASTED (1956)



Equation IX : Mécanisme hypothétique de nitration du catéchol dans le système réactionnel catéchol- NO_2^- et catéchol-glycine- NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire.

Ce dernier mécanisme (Equation IX) suppose la participation de NO_3^- dans le milieu réactionnel. Cependant l'étude cinétique de la formation de NO_3^- par chromatographie ionique a montré que NO_3^- est formé en quantités très faibles. Compte tenu du mécanisme débouchant sur la formation de NO_3^- à partir de NO_2^- en milieu aqueux, le mécanisme nitrant prédominant dans nos conditions opératoires serait plutôt celui qui fait intervenir l'ion nitronium (NO_2^+) avant que ce dernier ne puisse être transformé en NO_3^- . Cette hypothèse est appuyée par ailleurs par le fait, d'une part qu'au bout de 2 minutes de réaction on détecte la présence du 4-nitrocatéchol alors qu'il n'y a pas de traces de NO_3^- , et d'autre part, l'analyse (Figure 29) des gaz issus de la réaction de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine ne montre aucune trace de N_2O au bout de 3 heures de réaction. Ce gaz peut être formé si le composé nitrosé et son isomère (oximes) réagissent avec l'excès de NO_2^- suivant l'équation VII.

Par ailleurs, on remarque sur le spectre IR l'absence de bandes spécifiques du CO_2 , ce qui confirme les résultats de titration de CO_2 en retour par HCl, à savoir que le CO_2 n'était détecté qu'à partir de 4H à 5H de réaction.

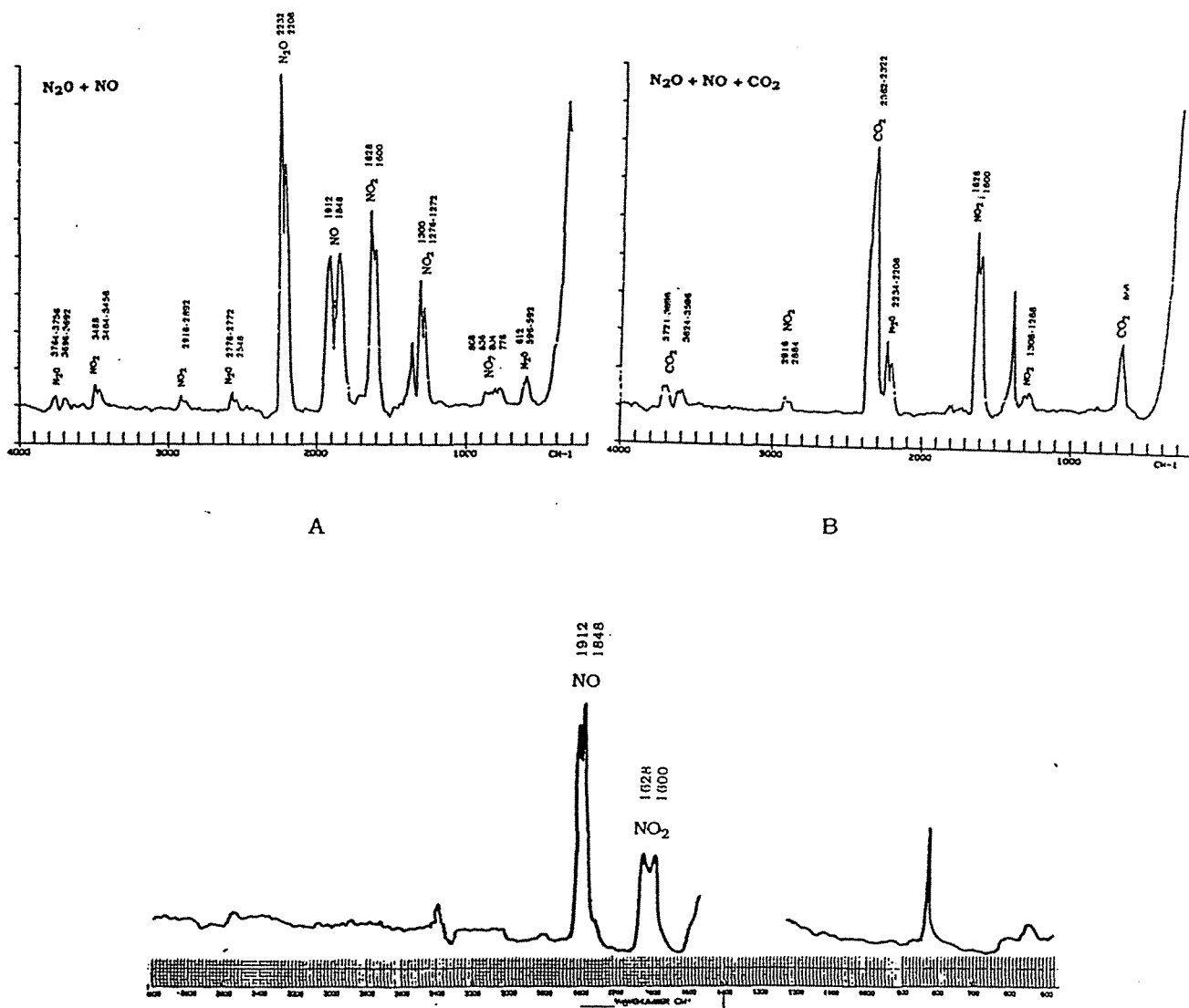
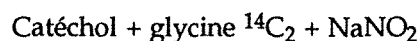
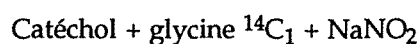


Figure 29.- Spectres Infra-rouges des gaz dégagés au bout de 3 heures de réaction par le milieu réactionnel composé de NO_2^- , catéchol et glycine en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène moléculaire. A et B : Gaz témoins

I-3.- FORMATION DE GAZ CARBONIQUE DANS LE MILIEU RÉACTIONNEL

Le mélange réactionnel équimolaire (0,03 M), formé de catéchol, glycine et NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène moléculaire, dégage du CO_2 que nous avons détecté par chromatographie en phase gazeuse. Le CO_2 peut avoir pour origine l'oxydation des substrats ou encore la décarboxylation de la glycine. Afin de préciser cette origine et le mécanisme de formation, nous avons mis en réaction des précurseurs marqués sélectivement au ^{14}C et de radioactivités spécifiques connues :



Le CO_2 dégagé par le milieu réactionnel est entraîné par un courant d'hélium et fixé dans une solution de NaOH 0,45N. Dans la solution alcaline, on dose le CO_2 marqué par scintillation liquide et CO_2 total par titration en retour par HCl 0,1N en présence de BaCl_2 et de thymolphaléine. La différence entre la quantité de CO_2 total et $^{14}\text{CO}_2$ est attribuée au CO_2 provenant de l'oxydation du catéchol.

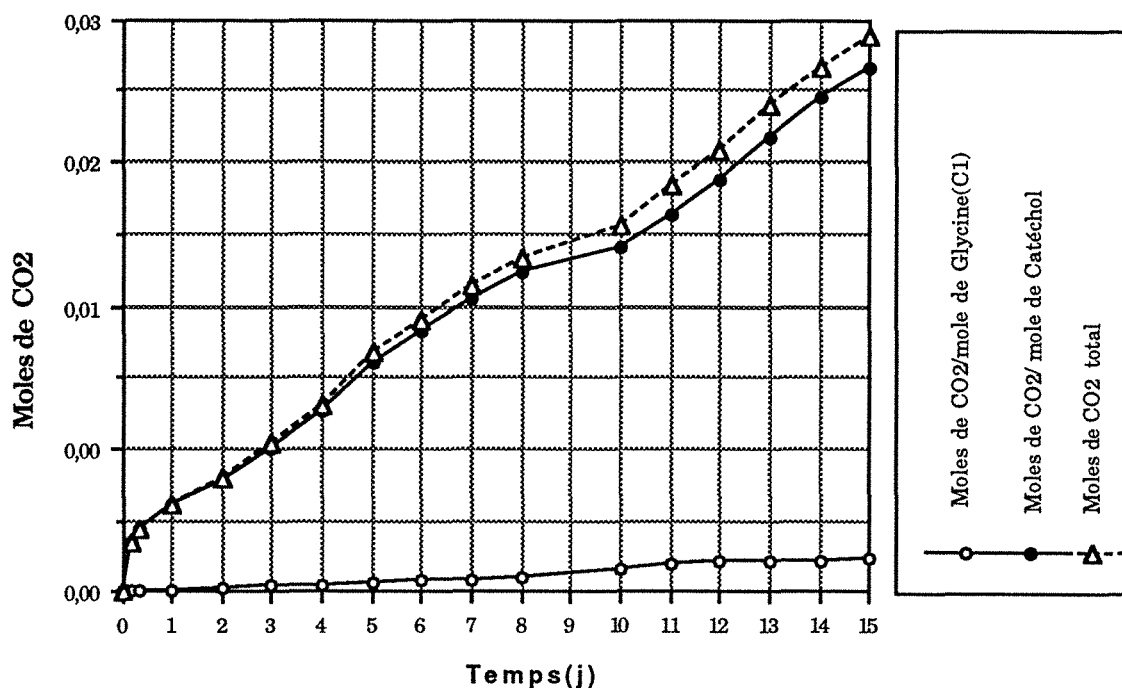


Figure 30.-Courbes de dégagement de CO_2 par le mélange réactionnel, formé de catéchol, glycine et NO_2^- en concentrations équimolaires (0,03 M), en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire. Température : 18-20°C.

L'étude cinétique du dégagement de CO_2 par le mélange réactionnel montre que le CO_2 ne se forme qu'à partir de 4 heures de réaction, tandis que le processus d'oxydation tend à dégrader le noyau aromatique de préférence à la glycine. La détermination du CO_2 en provenance du catéchol tend à montrer qu'un peu plus de 20% de C- CO_2 sont dégagés en fin d'expérimentation (15 jours), ce qui représente 1,2 mole de CO_2 par mole de catéchol mis en réaction. Cependant le CO_2 marqué, en provenance de la glycine n'est détecté qu'à partir de la 8ème heure de réaction. La décarboxylation de la glycine n'intéresse que le groupement carboxylique (C_1), le carbone (C_2) ne participe pratiquement pas au dégagement de CO_2 . Au bout de 15 jours de réaction, environ 9 % du C_1 sont transformés en CO_2 .

L'examen des courbes de formation de CO_2 respectivement à partir du diphéhol et de la glycine (Figure 30) tend à montrer que l'oxydation du catéchol est beaucoup plus rapide que celle de la glycine. La vitesse d'oxydation du noyau aromatique est supérieure ($V_o = 0,468 \text{ mM/l/h}$) à la vitesse d'oxydation des formes quinone-imines ($V_o = 0,02 \text{ mM/l/h}$) issues de la fixation de l'azote a-aminé sur l'o-quinone si l'on se réfère au mécanisme proposé par TRAUTNER et ROBERTS (1950). La formation de CO_2 à partir de la glycine peut en effet être expliquée par un mécanisme similaire à celui décrit par ces auteurs et repris ultérieurement par FLAIG et REIMER (1971) (Figure 31).

Les résultats de l'étude cinétique du dégagement du CO_2 par le mélange catéchol-glycine- NO_2^- peuvent expliquer le mécanisme prédominant qui conduirait à la formation de précurseurs quinoniques. L'absence de formation de CO_2 pendant les quatre premières heures renforce l'hypothèse avancée lors de l'étude spectrophotométrique dans l'UV-Vis du mélange réactionnel, à savoir que le mécanisme prédominant est celui qui donne naissance au 4-nitrocatechol d'une part tandis que les combinaisons catéchol-glycine, d'autre part, sont absentes au moins dans les 7-8 premières heures de la réaction.

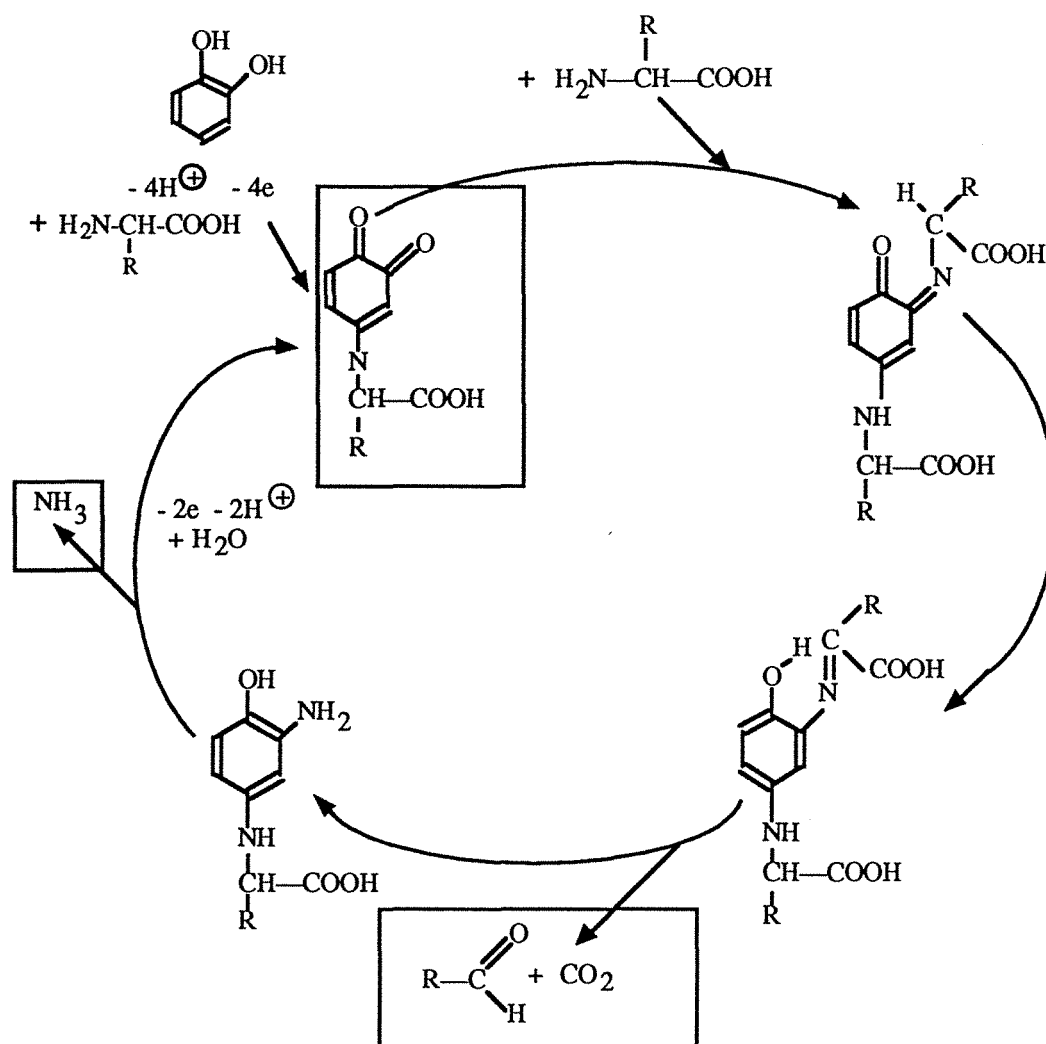


Figure 31.- Réactions de l'ortho-quinone avec les acides aminés selon TRAUTNER et ROBERTS (1950).

CHAPITRE II

DÉGRADATION DE LA GLYCINE ET DÉCOMPOSITION DE NO₂⁻

DÉGRADATION DE LA GLYCINE ET DÉCOMPOSITION DE NO_2^-

II-1.- CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DE LA GLYCINE

La réactivité de la glycine dans le mélange réactionnel a été suivie au cours du temps par dosage de l'azote α -aminé par la méthode à la ninhydrine. Parallèlement on a déterminé l'azote libre sous forme de NH_4^+ par distillation suivant la méthode Kjeldahl. Les résultats sont représentés sur la figure 32. On a représenté également sur la même figure les résultats de la cinétique de formation de CO_2 provenant de l'oxydation de la glycine.

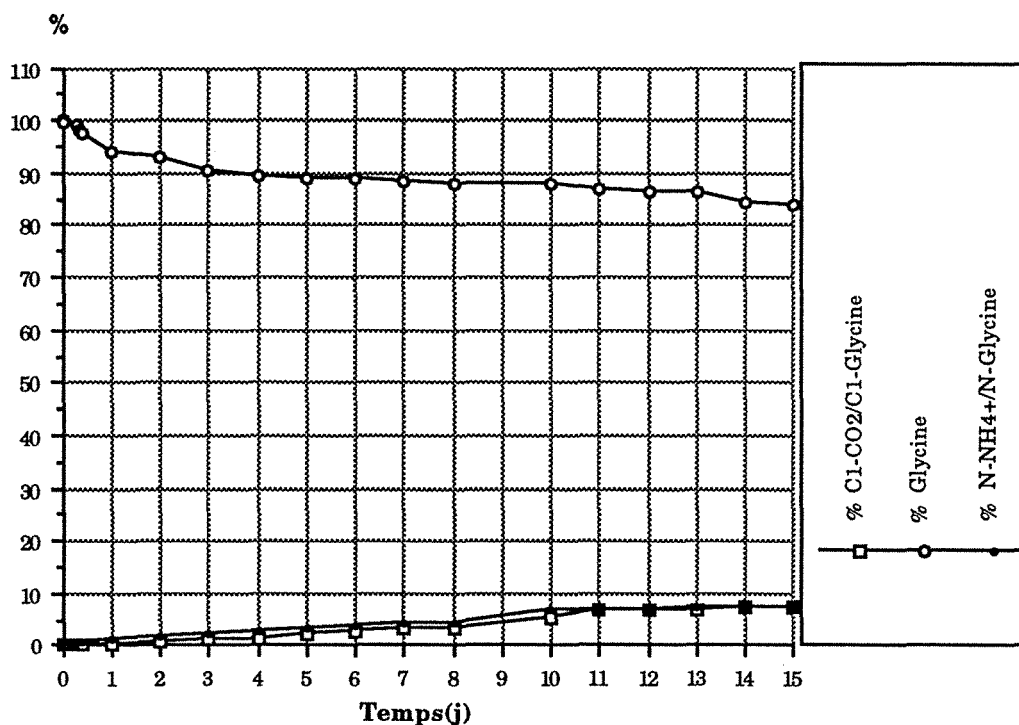


Figure 32- Courbes de dégradation de la glycine dans le milieu réactionnel formé de catéchol, glycine et NO_2^- en concentrations équimolaires en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire. Température : 18-20°C.

L'allure générale des courbes cinétiques (Figure 32) montre la faible réactivité de la glycine. D'autant plus que NH_4^+ et CO_2 provenant de la dégradation de la glycine ne sont détectés dans le milieu qu'à partir de 7 à 8 heures de réaction. La quantité de glycine présente à ce moment là est égale à 99 %. La quantité de NH_4^+ et CO_2 formés au cours du temps est sensiblement la même. A la

fin de la réaction (15 jours) la quantité de C_1 - CO_2 dégagé est égale à celle de NH_4^+ , soit respectivement 9,03 et 8,95% du carbone C_1 et de l'azote α -aminé de départ.

II-2- CINÉTIQUE DE LA DÉCOMPOSITION DE NO_2^-

Le suivi de la disparition de NO_2^- dans le mélange réactionnel catéchol-glycine- NO_2^- a été effectué par dosage de NO_2^- au cours du temps par la méthode préconisée par KEENEY et BREMNER et KEENEY (1966).

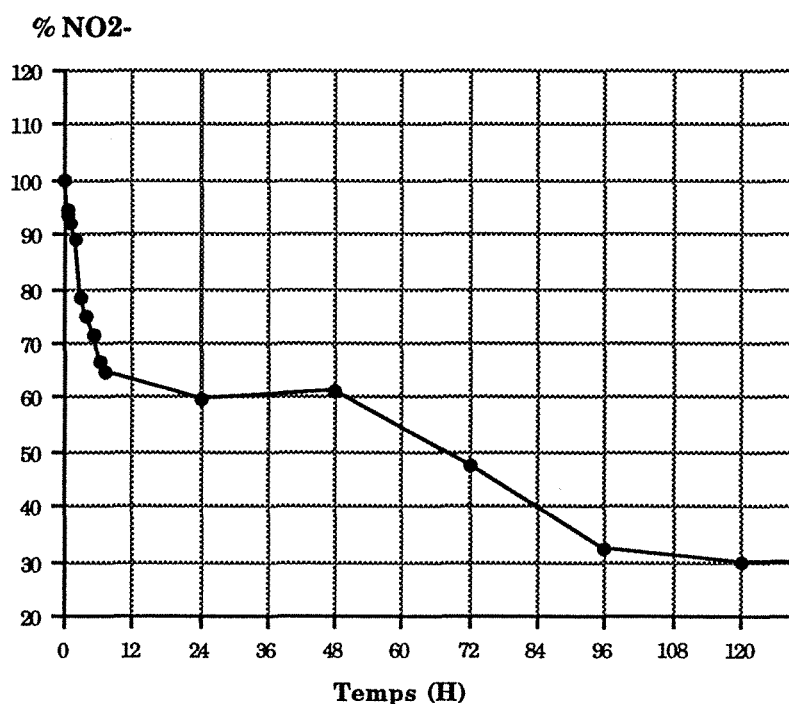


Figure 33.- Courbe de disparition de NO_2^- dans le milieu réactionnel formé de catéchol, glycine et NO_2^- en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire. Concentration équimolaire : 0,03 M.

La décomposition de NO_2^- est très rapide. Au bout de 5 h de réaction, 30 % de NO_2^- ont réagi avec une vitesse initiale V_0 de 7,66 mM/l/h (fig. 32). A la fin de la réaction (15 jours) le NO_2^- résiduel représente entre 22 et 27,2 % de NO_2^- introduit initialement dans le système réactionnel. L'azote total en provenance de ^{15}N - NO_2^- présent dans ce mélange réactionnel au bout de 15 jours ne représente que 26,6 à 33,4 % de ^{15}N - NO_2^- initial, ce qui veut dire que plus des 2/3 de NO_2^- sont transformés en produits gazeux (N_2 , NO , N_2O). Un résultat similaire est obtenu quand le mélange réactionnel est formé de catéchol et NO_2^- à pH 5 (32 % de NO_2^- au bout de 15 jours). Le milieu réactionnel témoin contenant NO_2^- seul ou NO_2^- en présence de glycine ne montre qu'une très faible décomposition de NO_2^- ; on récupère dans ces conditions respectivement 98 et 96,2 % de NO_2^- au bout

de 15 jours. Ces résultats signifient d'une part que NO_2^- réagit préférentiellement avec le diphénol et d'autre part que la principale voie de transformation de NO_2^- , dans ces conditions opératoires, est celle de la réduction chimique. Ceci confirme les conclusions établies lors de l'étude de la cinétique de dégradation de la glycine et du dégagement de CO_2 par le milieu réactionnel, à savoir la préférence de NO_2^- à réagir avec le diphénol.

II-3- POLYCONDENSATION DE LA GLYCINE AVEC LE CATÉCHOL EN PRÉSENCE DE NO_2^-

Après avoir étudié le déroulement de la réaction et la cinétique de transformation des substrats, dans le but de préciser l'incorporation de l'azote d'origine nitreuse et le degré de polycondensation de la glycine avec le catéchol dans nos conditions opératoires, nous avons analysé la distribution du carbone et de l'azote dans les différents compartiments : dialysat ($\text{PM} > 2000$ dal) et adialysat ($\text{PM} < 2000$ dal) obtenus par dialyse en fin de réaction (15 jours). Les résultats obtenus sont reportés au tableau XX.

Au terme du processus expérimental (15 jours), le dialysat renferme près de 97% d'azote en provenance de l'acide aminé initial. Cet azote est réparti sous deux formes, azote α -aminé et azote libre sous forme de NH_4^+ , représentant respectivement 87,95 et 8,95 % de l'acide aminé initial. Il renferme aussi de 22 à 27,2 % d'azote sous forme NO_2^- et 3,72 à 6,1 % d'azote non identifié en provenance de NO_2^- .

L'azote de l'adialysat constituant l'azote intégré dans les produits de polycondensation ($\text{PM} > 2000$ dal) ne représente qu'une très faible proportion de l'azote initial, soit 1,52 et 0,9 % en provenance respectivement de l'acide aminé et de NO_2^- .

La distribution de l'azote et du carbone en provenance de l'acide aminé dans les différents compartiments de la réaction nous permet de comprendre le comportement de la glycine dans le mélange réactionnel. La dégradation de la glycine suivant le processus de TRAUTNER et ROBERTS (1950) conduit à la formation :

- d'azote ammoniacal : $\text{NH}_3 + \text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+$
- de CO_2
- de formaldéhyde : ($\text{H}_2\text{C}=\text{O}$)

La proportion de C_1 de la glycine transformé en CO_2 (9,03 %) est à peu près égale à celle de l'azote α -aminé transformé en ions ammonium (8,95 %) ce qui veut dire qu'il y a 9 % de glycine dégradée par réaction avec le diphénol suivant le cycle de TRAUTNER et ROBERTS (1950) (Figure 31). Le carbone de la glycine incorporé dans le polycondensat contient autant de C en provenance de C_1 que de C_2 (3,5 %). La proportion d'azote de la glycine incorporé dans le polycondensat n'est que de 1,6 %, ce qui correspond sensiblement à la moitié du carbone correspondant

Tableau XX.- Bilan du carbone et de l'azote à la fin de la réaction (15 jours) de NO_2^- avec le mélange stœchiométrique catéchol-glycine en milieu tamponné (pH 5) en l'absence d'oxygène moléculaire. Concentration : 0,03 M, température : 18-20°C.

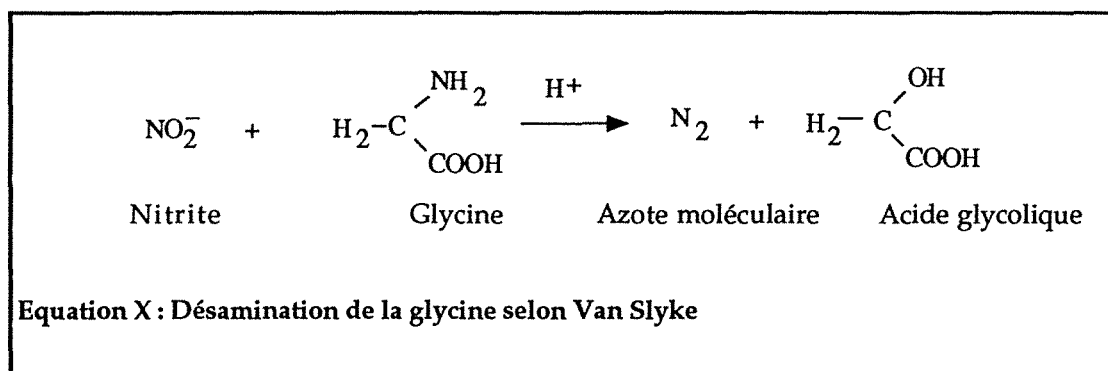
Carbone Catéchol (%)					Carbone Glycine (%)								Azote NO ₂ ⁻ (%)						Azote glycine (%)					
	Dialysat	Adialysat	CO ₂	Total	Dialysat		Adialysat		CO ₂		Total		Dialysat		Adialysat	Phase gazeuse N ₂	Total	Dialysat		Adialysat	Phase gazeuse N ₂ , NO, N ₂ O	Total		
					C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂	N α-aminé	NH ₄ ⁺				N polycondensé	NO ₂ ⁻				N n.id.	
Quantité mesurée en %	70,3	11,9	20,4	102,6	73,34	81	2,9	2,9	7,6	0,01	83,9	83,9	83,7	8,5	1,52	1,42*	95,1	22 à 27,2	3,7 à 6,1	0,9	65,8** à 73,4**	100		
Quantité ajustée à 100 %	68,5	11,6	19,8	100	87,47	96,4	3,5	3,5	9	0,02	100	100	88	9	1,6	1,5 1,90*	100							

Les résultats sont donnés en pour cent de poids par rapport à la quantité introduite dans le système au temps 0.

* Valeurs déterminées par rapport à la quantité (%) correspondante du C_1 ou C_2 de l'adialysat.

** Valeurs déterminées par différence entre la quantité initiale d'azote d'origine nitreuse ($^{15}\text{N-NO}_2^-$) introduit dans le système et la quantité d'azote d'origine nitreuse ($^{15}\text{N-dialysat} + ^{15}\text{N-adialysat}$) à la fin de la réaction (15 jours).

de la glycine incorporée dans le polycondensat. Ce résultat tend à montrer que 1,6% de la glycine sont incorporés intégralement dans le polycondensat cependant que 1,9 % pourraient être incorporés après élimination de l'azote. Toutefois, la quantité correspondante d'azote α -aminé (1,9 %) n'est pas retrouvée sous forme de cations ammonium dans le dialysat, ce qui laisse à penser que cette proportion (1,9 %) correspond en fait à la quantité de glycine qui a été désaminé par NO_2^- selon le processus de Van Slyke (Equation X).



On peut conclure que la réaction de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine met essentiellement en jeu l'oxydation du catéchol par le NO_2^- , tandis que l'oxydation de la glycine par l'o-quinone semble moins favorisée. Le mécanisme de la polycondensation oxydative développé au cours du processus d'oxydation du catéchol peut se résumer ainsi :

- le NO_2^- réagit préférentiellement avec le substrat polyphénolique avec formation principalement de dérivés quinoniques qui sont à la fois l'objet de polycondensation et de décarboxylation en même temps que l'ouverture d'un certain nombre de cycles aromatiques. Ces réactions qui s'effectuent au hasard sont imputables à la transformation des o-quinones en milieu aqueux. *A priori ce processus présente beaucoup de ressemblance avec l'oxydation du catéchol par d'autres agents oxydants.* L'azote est en majorité (66 à 74 %) transformé en azote moléculaire (N_2) et en oxydes d'azote (NO , N_2O), cependant qu'une faible proportion (0,9 %) se retrouve intégrée sous formes nitrée et peut-être nitrosée .

- la réaction de Van Slyke n'est pas la voie principale d'oxydation de la glycine (1,9 %).
- la glycine réactive (12-13%) est en grande partie dégradée (9 %) tandis qu'une faible proportion (3,5 %) est intégrée dans les produits de polycondensation.

CHAPITRE III

*CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE
DU POLYCONDENSAT ISSU DE LA RÉACTION DE NO_2^-
AVEC LE MÉLANGE STœCHIO MÉTRIQUE
CATÉCHOL-GLYCINE*

**CARACTÉRISATION PHYSIQUE ET CHIMIQUE DU POLYCONDENSAT
ISSU DE LA RÉACTION DE NO_2^-
AVEC LE MÉLANGE STOCHIOMÉTRIQUE CATÉCHOL-GLYCINE**

III.- ÉTUDE DU POLYCONDENSAT ISSU DE LA RÉACTION DE NO_2^- AVEC LE MÉLANGE CATÉCHOL-GLYCINE

III-1.- COMPOSITION ELEMENTAIRE

L'analyse élémentaire du polymère isolé par dialyse (fraction > 2000 dal), décationisé par passage sur résine échangeuse de cations (H^+), lyophilisé et séché sous vide (P_2O_5), montre qu'il a une teneur en carbone comprise entre 48 et 50,4%, une teneur en azote comprise entre 6,6 et 7,4 % et un pourcentage d'hydrogène de 2,6-2,7 % (Tableau XXI).

Tableau XXI.- Analyse élémentaire du polycondensat (CGN5, PM > 2000 dal.) issu de la réaction de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire. Concentration des réactifs : 0,03 M. Température 18-20°C.

Polycondensats	C %	N %	H %	C/N	H/C
(1)	48,2	6,6	2,6	7,2	0,6
(2)	50,4	7,0	2,6	7,1	0,6
(3)	49,5	7,4	2,6	6,6	0,6

* (1), (2) et (3) : Polycondensats issus de trois synthèses distinctes opérées dans les mêmes conditions.

L'incorporation de l'azote dans le polycondensat synthétique se traduit par un rapport C/N compris entre 6,7 et 7,3, une teneur en azote relativement élevée, d'origine aminée ou nitreuse. Cet azote est donc fortement incorporé dans la structure macromoléculaire du polycondensat obtenu. Sa distribution est étudiée à l'aide de la réaction entre $^{15}\text{NO}_2^-$ et le mélange catéchol-glycine, ce qui permet de connaître son pourcentage d'intégration dans le polycondensat. La différence entre ces

déterminations de ^{15}N et N totalest attribuable à l'azote incorporé à partir de l'acide aminé. Les résultats montrent que l'azote incorporé provient à 63 % de l'acide α -aminé et à 37 % de NO_2^- , ce qui confirme à priori la présence de groupements fonctionnels nitrosés et nitrés dans ces structures. Par ailleurs le rapport H/C est égal à 0,63 dans le polycondensat, donc nettement inférieur à 1, ce qui est en faveur d'une structure de caractère aromatique.

III-2.- CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE DEXTRANE "SEPHADEX G50"

Le fractionnement du polycondensat par chromatographie sur gel de dextrane "Sephadex G50" fait apparaître deux ensembles de pics nettement séparés. Le premier pic de faible surface correspond à des composés exclus du gel dont la masse moléculaire est supérieure à 30.000dal. Le second pic de plus grande surface peut être attribué à des composés retenus de $K_{av} = 0,67$ dont les masses moléculaires sont comprises entre 3000 et 3500 (Figure 34). Cette distribution tend à privilégier la prédominance des composés de faible masse moléculaire par rapport aux polycondensats macromoléculaires. Toutefois l'abondance relative d'une fraction par rapport à une autre n'est qu'un critère subjectif car la détermination des poids moléculaires par chromatographie de perméation sur gel n'apporte que des informations relatives sur la taille des polymères. Ce critère est utilisé, dans le cas des substances humiques, par plusieurs auteurs notamment pour la comparaison de leur taille.

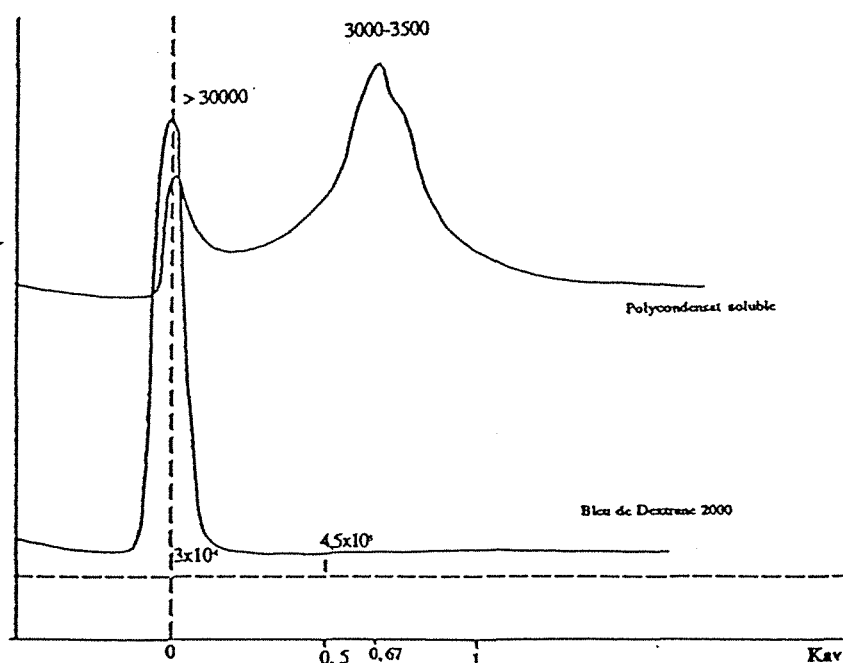


Figure 34.- Eluogramme du polycondensat, issu de la réaction de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine, par passage sur gel de dextrane "Sephadex G50".
1 mg de polycondensat dissous dans 10ml de tampon Tris (pH 7,5). Solution d'élution : tampon Tris de pH 7,5.

La réaction de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine conduit donc à des polymères de haut poids moléculaire, qui présentent des caractères comparables à ceux des composés humiques naturels.

III-3.- SPECTRE UV-VIS DU POLYCONDENSAT SYNTHETIQUE

Le polymère purifié présente une teinte brun-noir, il est soluble en milieu aqueux acidifié par HCl 0,01N. Nous avons déjà signalé au cours de l'étude du mélange réactionnel que l'absorption de ce dernier dans l'UV-Vis augmente au cours de la période d'expérimentation, avec persistance des maxima à 330, 430 et 270 nm. Le spectre UV-Vis du polycondensat recueilli par dialyse (fraction > 2000 dal) ne présente aucun pic caractéristique, l'absorption s'accroît de manière continue du Visible vers l'UV (Figure 35). C'est un spectre monotone caractéristique des composés hautement polycondensés et aromatiques. Le coefficient chromatique ($Q4/6 = 2$) tend à confirmer ce caractère.

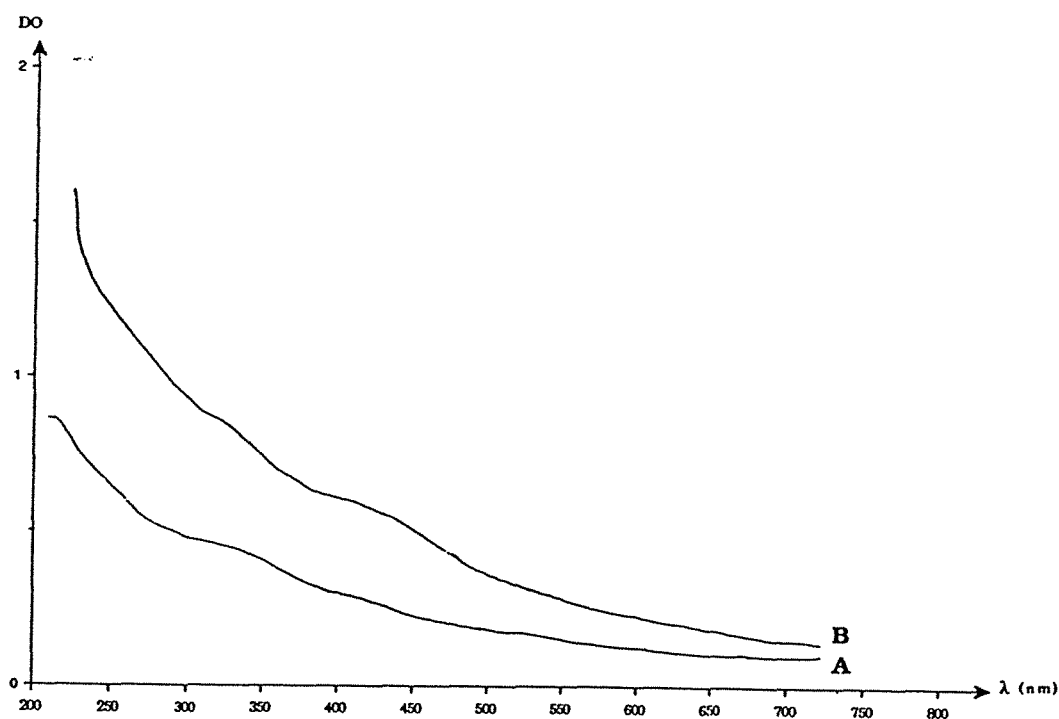


Figure 35.- Spectres d'absorption UV-Vis (200-800nm) du polycondensat (CGN5) recueilli par dialyse (fraction > 2000dal).

A : solution dans H_2O : 1mg/10ml,

B : solution dans NaOH 0,01N : 0,5ml de la solution aqueuse (A) dans 5ml de NaOH 0,01N

$Q4/6 = 2,07$

III-4.- ANALYSE FONCTIONNELLE DU POLYCONDENSAT SYNTHETIQUE

III-4-1.-Titration des acidités

Les différentes acidités sont estimées par la méthode développée par BRUNELOT *et al.*(1989). Les différentes acidités sont présentées au tableau XXII.

Tableau XXII.- Distribution des acidités (me/g) des polycondensats recueillis par dialyse (fraction > 1000 dal.) à la fin de la réaction (5 jours) de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine. Titration des acidités par la méthode de BRUNELOT *et al.* (1989).

	Acidité totale (A.T.)	Acidité -COOH (Af + A.F.)	Acidité -OH (Atf)
Polycondensat (me/g)	6,5	3,07	3,43

A.T. : acidité totale ; Af : acidité faible de type carboxylique ; Atf : acidité très faible de type phénolique ;
A.F. : acidité forte correspondant à des fonctions carboxyliques fortement dissociées.

Les résultats montrent la prédominance relative des acidités de type phénolique (52,7%). Les acidités de type carboxylique peuvent être attribuées à la fois aux fonctions acides portées par les molécules de glycolle intégrées dans le polycondensat ou à des fonctions carboxyles issues de l'ouverture des noyaux aromatiques ou quinoniques.

III-4-2.- Spectroscopie dans l'infrarouge

Le spectre IR du polycondensat (Figure 36), décationisé par passage sur résine échangeuse de cations(H^+) et séchés sous vide (P_2O_5) est composé de bandes attribuées aux vibrations de valences des groupements oxygénés ou à leur déformation. Les fonctions oxygénées sont représentées en grande partie par des hydroxyles de type phénolique qui absorbent dans la région $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$. Dans cette région on rencontre aussi les vibrations de valence attribuées aux groupements fonctionnels -NH amines ou amides. A cette région sont associées les vibrations de valence ou de déformation des liaisons C-O, O-H et -N-H qui absorbent entre 1400 et 1100 cm^{-1} . En effet le spectre du polymère comporte, indépendamment des bandes caractéristiques des C=O et C=C, une bande large centrée à 1290 cm^{-1} avec un certain nombre d'épaulements secondaires à 1388 , 1296 , 1228 et 1100 cm^{-1} , que l'on peut attribuer à l'un ou plusieurs de ces groupements fonctionnels. Par ailleurs le spectre ne présente qu'une très faible bande située à 2928 cm^{-1} , montrant la très faible aliphatité du polycondensat.

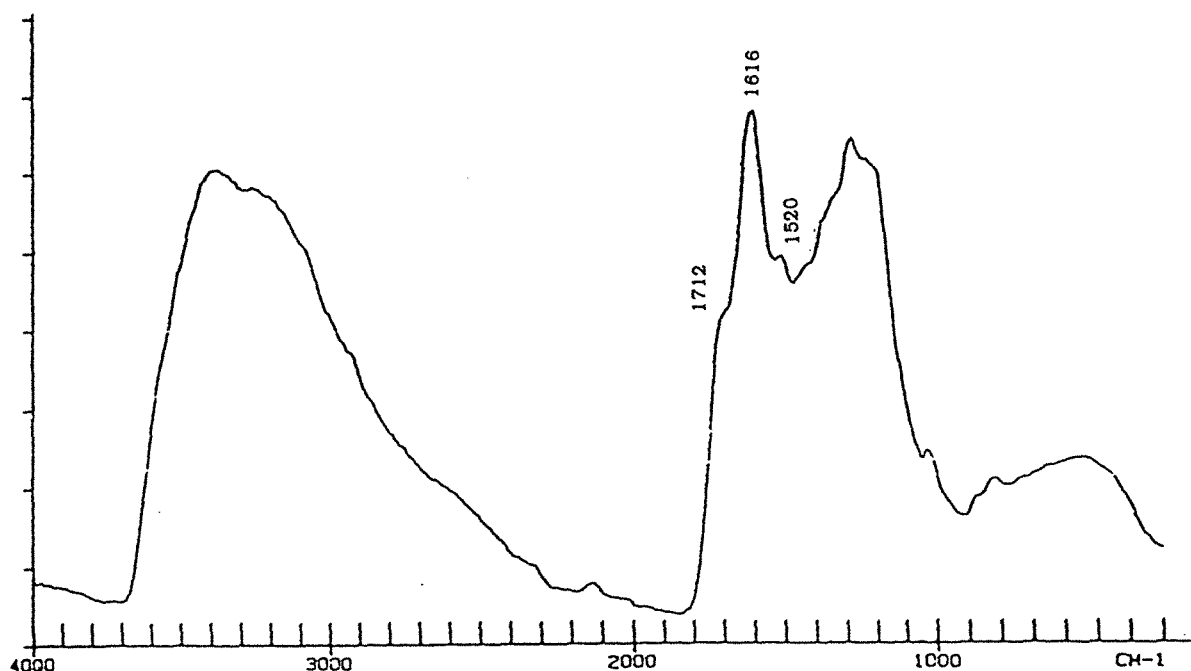


Figure 36.-Spectre IR du polycondensat recueilli par dialyse ($PM > 2000$ dal) à la fin de la réaction (5 jours) de NO_2^- avec le mélange catéchol-glycine. 1 mg/200 mg KBr.

Les bandes situées dans la région de 1400 à 1000cm^{-1} peuvent être attribuées à diverses vibrations de valence et de déformation imputables à des groupements tels que C-N, C-C et C-O ou encore aux vibrations des groupements nitro et nitroso. Cependant ces attributions restent aléatoires et il y a lieu d'être réservé notamment sur l'identification des groupements NO_2 et NO .

La bande située à 1712cm^{-1} est caractéristique du groupement C=O des fonctions carboxyles. Cette bande est en fait de faible intensité ce qui est en conformité avec l'existence d'une bande large comprise entre 2700 et 2400cm^{-1} , caractéristique des associations par liaisons hydrogènes entre groupements carboxyles. La bande de forte intensité 1616cm^{-1} met en évidence la présence de fonctions C=O de type quinonique en même temps que des liaisons C=C aromatiques, et peut être aussi des doubles liaisons C=N et -N=N-(azo). La bande située à 1520cm^{-1} représentative des C=C aromatiques pourrait être corrélée en même temps aux groupements nitro ($1550\text{-}1520\text{cm}^{-1}$) et nitroso aromatiques ($1600\text{-}1500\text{cm}^{-1}$).

III-5.- DEGRADATION ACIDE DU POLYCONDENSAT SYNTHETIQUE

L'attaque du polymère (isolé par dialyse, fraction > 2000 dal) par HCl 3N à reflux pendant 16 heures conduit à l'insolubilisation d'un résidu de teinte noire que l'on isole aisément par filtration

sur filtre "Millipore 0,45 μm ", de la solution acide de couleur jaune pâle. Notons que les polymères sont solubles dans le milieu acide. Les résultats sont présentés au Tableau XXIII.

L'hydrolyse acide se traduit par la solubilisation de 24,6% de carbone et d'un peu plus de 30% de l'azote initial.

L'analyse élémentaire du résidu montre que l'attaque en milieu acide tend à accroître la teneur relative en carbone tandis que celles de l'azote et de l'hydrogène sont abaissées. Les variations des teneurs pondérales en azote et en carbone sont à peu près les mêmes car le rapport C/N a faiblement varié, de 6,7 à 8 après hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C). Ce résultat constitue un argument de poids en faveur de la résistance de l'azote incorporé qui a toute chance d'être engagé dans des liaisons de type C-N. D'autre part l'aromaticité traduite par le rapport H/C (= 0,62) est accrue (H/C = 0,53) après hydrolyse acide dans HCl, ce qui autorise à penser que l'on est confronté à des structures comportant une proportion plus grande de cycles aromatiques. L'hydrolyse acide se traduit par ailleurs par un renforcement des structures conjuguées des macromolécules. Leur absorption dans l'IR se manifeste par l'accroissement de l'intensité de la bande située à 1610cm^{-1} attribuée aux groupements C=O et C=C aromatiques (Figure 37).

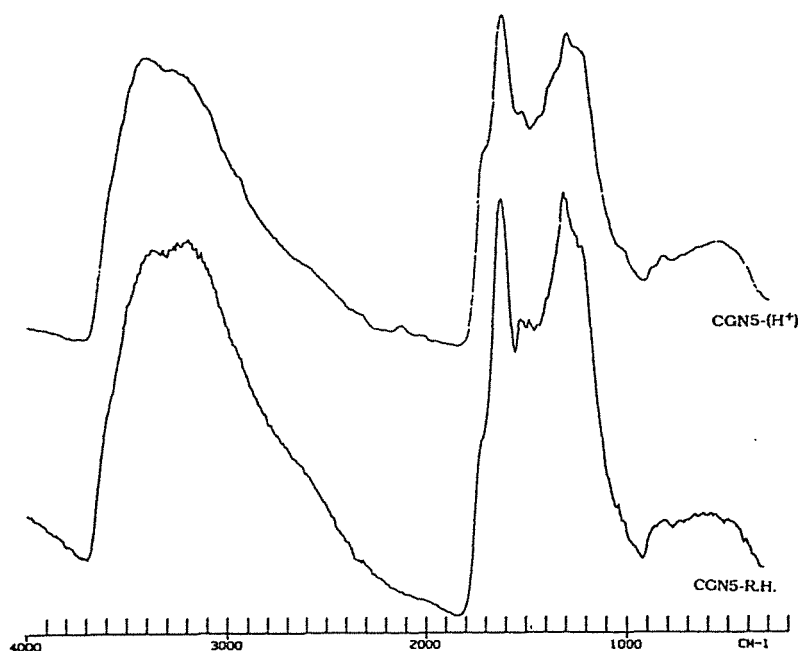


Figure 37.- Spectres d'absorption Infra-rouge du polycondensat (CGN5) et de son résidu d'hydrolyse acide (R.H.) (HCl 3 N, 130°C, 16 h).

Tableau XXIII.- Résultats du traitement hydrochlorhydrique (HCl 3N) à chaud (130°C) pendant 16 h, précédé (B) ou non (A) de la réduction par Zn des produits (CGN5, PM > 2000 dal.) de la réaction de NO₂⁻ sur le mélange stœchiométrique catéchol-glycine (0,03 M).

Hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h)							Analyse organique élémentaire				Distribution de l'azote hydrolysable							
		C (mg)	%	N (mg)	%	C %	N %	H %	C/N	H/C	N-NH ₄ ⁺ (mg)	%	N-aminé (mg)	%	N-Nitroso, Nitro (mg)	%	N n.i.d. (mg)	%
	Polycondensat azoté initial	25,1	100,0	3,7	100	49,3	7,3	2,7	6,75	0,66								
A Hydrolyse acide	Résidu (1)	18,9	75,4	2,3	63,1	52,1	6,5	2,2	8,06	0,51	0,50	13,37	0,00	0,00			0,66	17,93
	(2)			2,4	66,9													
	Hydrolysats (1)	6,1	24,5	1,1	31,2													
	(2)			1,2	33,1													
	Total (1)	25,1	100,0	3,5	94,3													
	(2)			3,7	100													
	Polycondensat azoté initial	24,5	100,0	3,6	100	49,3	7,3	2,7	6,75	0,66								
B Réduction au Zn suivie de l'hydrolyse acide	Résidu (1)	18,3	74,6	2,2	60,7	52,51	6,32	2,41	8,31	0,55	0,54	14,90	0,00	0,00	0,05	1,53	0,75	20,50
	(2)			2,3	63,2													
	Hydrolysats (1)	6,2	25,3	1,2	35,4													
	(2)			1,3	36,8													
	Total (1)	24,5	100,0	3,5	96,2													
	(2)			3,6	100													

(1) mesuré ; (2) ajusté à 100 %

Les valeurs en pourcentage de poids sont calculées par rapport au carbone et à l'azote initiaux.

N n.i.d. : azote non identifié.

L'azote hydrolysable (31,3 % de l'azote total) se répartit en deux fractions :

- *fraction ammoniacale*, soit 44,6 % de l'azote hydrolysable soit encore 13,4 % de l'azote total contenu dans le polymère de départ, pouvant être attribué à des formes d'azote labile.

- *fraction non identifiée*, soit 55,4 % de l'azote hydrolysable ou encore 17,9 % de l'azote total contenu dans le polymère de départ. L'azote contenu dans cette fraction peut être sous les formes nitro ou nitroso. La détermination de ces fonctions à l'aide du Zn en milieu acide fait apparaître des proportions qui ne dépassent pas 2% de l'azote total organique (Tableau XXIII).

La détermination de l'azote α -aminé et de l'azote ammoniacal dans la fraction hydrolysable par la méthode à la ninhydrine permet de conclure à l'absence d'azote α -aminé libéré par hydrolyse acide.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS DE LA TROISIÈME PARTIE

L'étude de la réaction de NO_2^- avec le mélange stœchiométrique catéchol-glycine en milieu tamponné de pH acide (pH 5) a permis de déterminer la nature des interactions entre les différents réactifs et le rôle de NO_2^- dans le système réactionnel.

Le système catéchol-glycine- NO_2^- montre l'aptitude du catéchol à s'oxyder et à fournir des produits brun-noir incorporant de la glycine et de l'azote nitreux à pH 5.

La formation de CO_2 dans le mélange réactionnel ne laisse aucun doute sur l'oxydation du catéchol, l'ouverture des cycles aromatiques et la dégradation de la glycine. Il est très important de noter la diversité des réactions mises en jeu dans le système étudié. On peut noter en premier lieu la substitution du catéchol par NO_2^- qui aboutit essentiellement à la formation d'un dérivé nitré, le 4-nitrocatéchol. Il semble que le mécanisme de nitration du catéchol soit prédominant au cours des premières heures de la réaction (4 h). La dégradation de la glycine suivant le cycle de TRAUTNER et ROBERTS (1950) fait apparaître l'importance du mécanisme réactionnel conduisant à la formation de l'orthobenzoquinone, nécessaire pour expliquer le mécanisme d'oxydation du glycolle, selon le mécanisme décrit par AUSTIN (1961).

Les calculs effectués d'après les résultats de la réaction entre $^{15}\text{NO}_2\text{Na}$, catéchol et glycine marquée sur les carbones C_1 et C_2 permettent de conclure à une faible interaction entre NO_2^- et l'acide aminé, suivant le modèle de Van Slyke. Notons au passage que cette interaction serait d'avantage favorisée pour des pH inférieurs ($\text{pH} \leq 4$).

Le système catéchol-glycine- NO_2^- à pH 5 fait ressortir l'affinité de NO_2^- pour le diphénol tandis que l'interaction entre diphénol et glycine semble moins favorisée. Le pH bas de la réaction semble être un facteur limitant car l'interaction entre orthodiphénol et acide aminé est plutôt favorisée à partir de pH 6,5 si on se réfère aux travaux de HAIDER *et al.* (1965). Par ailleurs l'auto-oxydation du système catéchol-glycine, étudié par ANDREUX (1978) à pH 7,9, GOLEBIOWSKA et SCZODROWSKA (1979) à pH 7 et ADRIAN (1985) à pH 9,4, a montré la formation de liaisons entre catéchol et acides aminés ou polypeptides dès les premières heures de la réaction. ANDREUX (1978) a noté par ailleurs que le maximum d'association catéchol-glycine est atteint au bout de 5 heures de réaction.

Comme nous l'avons souligné au début de ce travail, la comparaison des résultats obtenus à partir de l'étude des deux systèmes réactionnels, le catéchol-glycine- O_2 à pH alcalin et le catéchol-glycine- NO_2^- à pH acide, permettent de spécifier la nature des interactions qui semblent s'établir quand NO_2^- , polyphénol et acide α -aminé sont présents en milieu acide. Nos résultats montrent bien la prédominance de la réactivité entre NO_2^- et polyphénols aux dépens de la réactivité entre polyphénol et glycine ou encore NO_2^- et acide α -aminé.

Le polycondensat azoté de $\text{PM} > 2000\text{dal.}$ obtenu à l'issue de 5 jours de réaction est caractérisé par une couleur noire, il absorbe fortement dans l'UV-Vis et présente un Q4/6 faible ($\text{Q4/6} = 2$). Ces propriétés sont comparables à celles des polycondensats modèles ou naturels. Nous avons reporté au tableau XXIV les principales caractéristiques physico-chimiques des polycondensats issus respectivement de l'oxydation du système catéchol-glycine par NO_2^- en milieu acide (pH 5) en même temps que de l'auto-oxydation du système catéchol-glycine en milieu alcalin et de deux composés humiques extraits du sol par ANDREUX (1978).

La comparaison de ces résultats fait ressortir tout d'abord l'importance de l'azote incorporé dans les polycondensats issus du système réactionnel catéchol-glycine- NO_2^- . Le rapport C/N y est presque trois fois supérieur à celui des polycondensats obtenus par autoxydation du système catéchol-glycine. De même le rapport H/C, l'indice d'aromaticité, et l'acidité sont beaucoup plus élevés pour le polycondensat (CGN5) que pour le produit provenant de l'auto-oxydation du système catéchol-glycine ou encore que pour les composés humiques (Tableau XXIV).

Tableau XXIV.- Caractéristiques physico-chimiques des polycondensats synthétiques et des composés humiques extraits de deux sols différents.

Polycondensats	C %	N %	H %	H/C	C/N	PM	Acidité	Références
CGN5*	49,3	7,3	2,7	0,66	6,75	> 30000	6,5	ANDREUX (1978) - -
CGO7,9**	48,2	2,7	3,8	0,94	17,8	3000-3500	3,63	
A ₁ Rendzine	46,3	3,1	5	1,29	17,4	15000-25000	4,6	
A ₁ Chernozem	53,1	3,1	3,6	0,81	20	4000-7000 > 200000 4000-5000 "	4,76	

*CGN5 : Polycondensat azoté obtenu à partir du système Cathécol-Glycine- NO_2^- en milieu acide (pH 5) en l'absence d'oxygène moléculaire.

** CGO 7,9 : Polycondensat azoté obtenu à partir du système Catéchol-Glycine- O_2 en milieu alcalin (pH 7,9). D'après Andreux (1978).

A₁ Rendzine : acide humique extrait d'un rendzine (Andreux, 1978)

A₁ Chernozem : acide humique extrait d'un chernozem (Andreux, 1978).

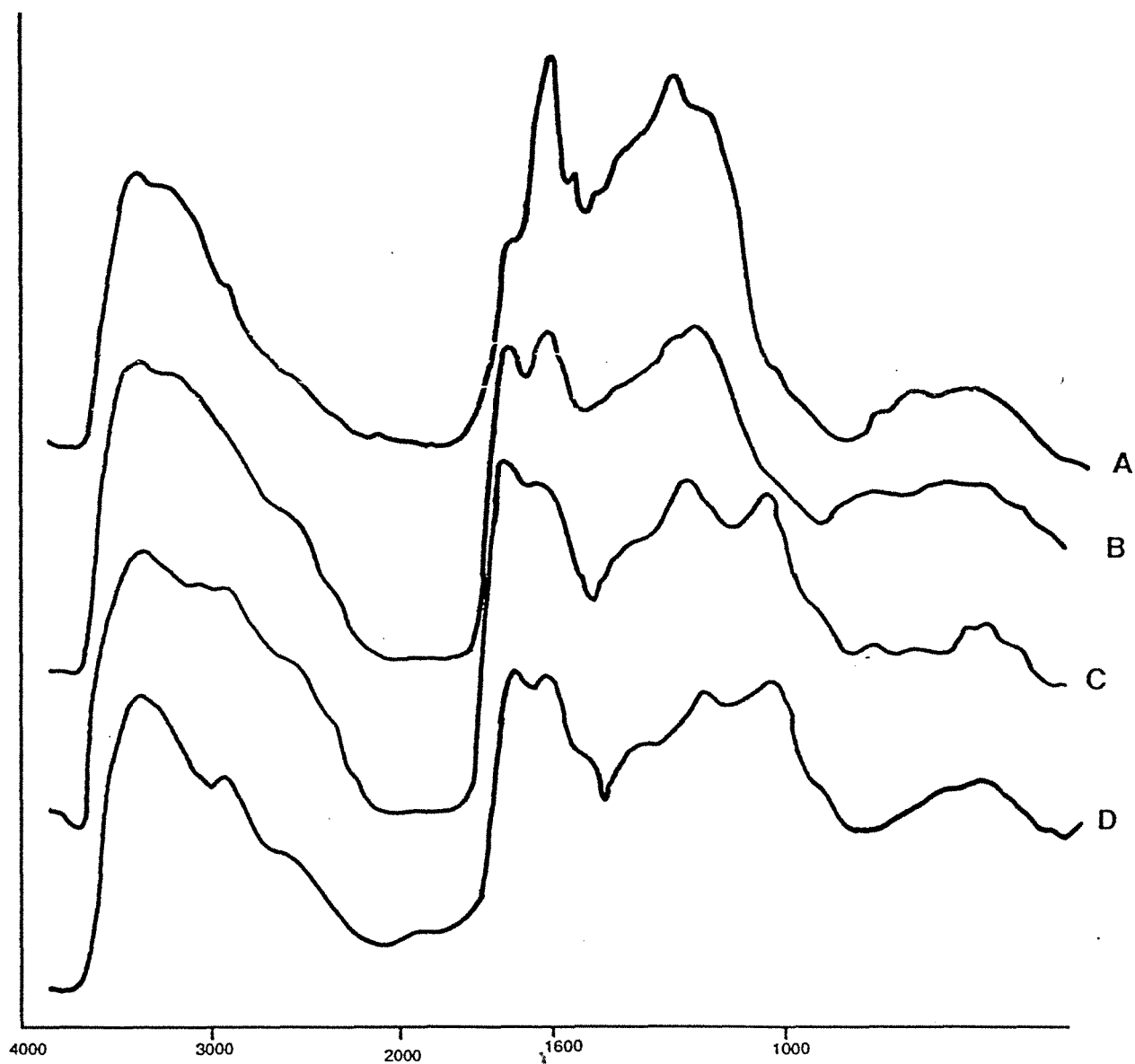


Figure 38.- Spectres d'absorption Infra-rouge des polycondensats synthétiques et acides humiques extraits des sols.

A : Polycondensat synthétique (PM>2000dal) issu de la réaction (5 jours) entre NO_2^- , catéchol et glycine en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire à la température ambiante (18-20°C)

B : Polycondensat synthétique issu de l'auto-oxydation du catéchol-glycine en milieu tamponné de pH 7,9 d'après ANDREUX (1978).

C : Acide humique extrait de A₁ Rendzine d'après ANDREUX (1978)

D : Acide humique de A₁ Chernozem d'après ANDREUX (1978)

L'allure générale des spectres d'absorption Infra-rouge des différents polycondensats (Figure 38) fait ressortir la complexité des structures chimiques caractéristiques des substances humiques. Les critères fonctionnels dans l'Infra-rouge sont comparables d'un polycondensat à l'autre. On note de manière générale la présence des bandes attribuables aux carboxyles, aux hydroxyles (phénoliques ou alcooliques) et aux carbonyles.

L'azote organique présente une résistance à l'hydrolyse acide (HCl 3N, 10°C) relativement plus grande dans le cas des polycondensats synthétiques (50-60 %) comparativement aux polycondensats extraits du sol (25 à 50 %). Cela permet de conclure à la stabilité de l'azote incorporé dans de telles structures quelle qu'en soit la provenance, acides aminés ou nitrite.

En conclusion, l'azote incorporé, dans le polycondensat de PM > 2000 dal., à partir de NO₂⁻ n'existe qu'en très faibles proportions sous forme nitrée ou nitrosée ce qui permet de supposer qu'il est en majorité structuré sous une forme résistante hétérocyclique ou juxtanucléaire. Il convient de noter par ailleurs l'importance de l'azote non identifié libéré par hydrolyse dont les proportions atteignent 20 %, ce qui pour le moment constitue une véritable énigme.

QUATRIÈME PARTIE

*ACTION DE NO₂⁻
SUR LE POLYCONDENSAT
CATÉCHOL-GLYCINE*

ACTION DE NO_2^- SUR LE POLYCONDENSAT CATÉCHOL-GLYCINE

INTRODUCTION

Au cours de la troisième partie de ce travail, nous avons étudié l'action de l'ion nitrite sur le catéchol et la glycine en conditions contrôlées. L'action de NO_2^- se traduit notamment par la nitrosation, la nitrification et l'oxydation du catéchol, ce qui conduit ultérieurement à la formation de produits polycondensés incorporant de l'azote à caractère humique. En vue de préciser l'action de NO_2^- sur les substances humiques, nous avons choisi un polycondensat modèle issu de l'oxydation du système catéchol-glycine. Ce dernier a été déjà étudié par ANDREUX (1978) et ADRIAN (1985) et de ce fait les caractéristiques physico-chimiques en sont bien déterminées.

Le polycondensat catéchol-glycine (PCG) est préparé par réaction (5 jours) entre catéchol et glycine, en concentration équimolaire (0,03M), en milieu tamponné de pH 7,9 en présence d'oxygène moléculaire à température ambiante. Après 5 jours de réaction, le mélange réactionnel est dialysé au travers d'une membrane de point de coupure 4000 dal contre de l'eau distillée. L'adialysat résultant est protoné par passage sur résine échangeuse de cations (H^+), lyophilisé et séché sous vide phosphorique.

I.- CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU POLYCONDENSAT PCG

Le polycondensat synthétique est caractérisé par sa couleur brun-noir. Il est soluble en milieu aqueux et absorbe fortement en continu dans l'UV-Vis avec accroissement progressif de l'intensité d'absorption du Vis vers l'UV sans bande apparente résolue. Son spectre IR fait apparaître des bandes attribuables essentiellement à des fonctions oxygénées telles que -OH phénoliques et -C=O carbonyles et carboxyles. Son acidité s'élève à 3,7 meq./g. Elle correspond à l'ensemble des fonctions acides titrables et se répartit en acidité phénolique (0,6 meq/g) et en acidité carboxylique provenant soit de l'ouverture des cycles aromatiques (1 me/g) ou des groupements -COOH provenant de la glycine incorporée (2 me/g) (ANDREUX, 1978). L'analyse élémentaire du PCG est présentée AU Tableau XXV. Les proportions en carbone et en azote s'élèvent respectivement à 50,5 et 4,95 % ce qui conduit à un rapport C/N de 10,2. Le PCG présente en outre une aromaticité élevée, indiquée par le rapport H/C (= 0,56) inférieur à 1.

II.- OXYDATION DU POLYCONDENSAT CATECHOL-GLYCINE (PCG)

La réaction entre NO_2^- (0,075 M) et le polycondensat PCG (100 mg) se déroule en milieu aqueux tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire à température ambiante (18-20°C). La réaction conduit à un dégagement de CO_2 , ainsi qu'à la réduction de NO_2^- en oxydes d'azote, essentiellement NO identifié par spectroscopie Infra-rouge. Le dégagement de CO_2 s'accroît avec le temps de réaction et à la fin de 5 jours, le C- CO_2 dégagé représente 2,7% du carbone PCG mis en réaction au temps 0. Le dégagement des produits gazeux (CO_2 , NO) à partir du mélange réactionnel montre d'une part le caractère oxydatif de NO_2^- vis-à-vis du PCG et inversement le caractère réducteur du PCG à l'égard de NO_2^- . La formation de l'oxyde nitrique dans le mélange réactionnel peut mettre en cause l'existence de groupements α -diénols, qui s'oxydent en groupements α -dicarbonylés correspondants, comme cela a été montré dans le cas de la réaction entre NO_2^- et les substrats phénoliques simples, le catéchol et le pyrogallol. Ceci peut expliquer l'ouverture des cycles aromatiques avec formation de CO_2 . Ce dernier peut provenir en partie de la décarboxylation des groupements carboxyliques de la glycine incorporée.

III.- CARACTÉRISTIQUES DU POLYCONDENSAT ISSU DE LA RÉACTION ENTRE NO_2^- ET PCG

III-1.- COMPOSITION ELEMENTAIRE

Les polycondensats sont obtenus par réaction (5 jours) entre NO_2^- et PCG en milieu tamponné de pH 5 et en l'absence d'oxygène moléculaire. Après 5 jours de réaction le mélange réactionnel est purifié par dialyse au travers d'une membrane de coupure 4000 dal contre de l'eau distillée. L'adialysat (polycondensat de PM > 4000 dal) ainsi obtenu est protoné par passage sur résine échangeuse de cations (H^+). Les caractéristiques analytiques sont déterminées sur le polycondensat (PCG- NO_2^-) après purification et lyophilisation.

Tableau XXV.- Composition élémentaire des polycondensats synthétiques.

	C %	N %	H %	O %	C/N	H/C
PCG	50,53	4,95	2,22	42,3	10,2	0,56
PCG- NO_2^-	45,03	6,36	2,37	46,2	7,1	0,59

PCG : Polycondensat (PM > 4000 dal.) obtenu par réaction (5 jours) entre catéchol (0,03M) et glycine (0,03M) en milieu tamponné (pH 7,9) en présence d'oxygène moléculaire.

CG- NO_2^- : Polycondensat (PM > 4000 dal.) obtenu par réaction entre NO_2^- (0,075M) et PCG (100 mg) en milieu tamponné (pH 5) en l'absence d'oxygène moléculaire.

L'analyse élémentaire du PCG-NO_2^- montre un rapport C/N (=7) inférieur à celui du polycondensat PCG de départ dont le rapport est de 10,2, ce qui montre que la réaction d'oxydo-réduction s'accompagne de l'incorporation partielle de l'azote d'origine nitreuse. Le pourcentage d'azote passe de 4,95 à 6,36% après réaction du PCG avec NO_2^- tandis que le rapport H/C varie très peu. Il passe de 0,56 pour le PCG à 0,59 pour le PCG-NO_2^- , ce qui veut dire que le caractère aromatique est conservé après action de NO_2^- sur le PCG.

III-2.- SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE DU POLYCONDENSAT PCG-NO_2^-

Le spectre Infra-rouge du polycondensat PCG-NO_2^- est présenté à la figure 39. C'est un spectre classique de substances humiques, caractérisé par la présence de bandes attribuables généralement à des fonctions oxygénées.

Le spectre Infra-rouge du polycondensat PCG-NO_2^- est comparable en tout points à celui du polycondensat PCG.

La région du spectre IR située entre 3600 et 3200cm^{-1} est attribuée aux groupements $-\text{OH}$ associés. Entre 2700 et 2400cm^{-1} , on distingue un épaulement qu'on attribue à des ponts hydrogènes entre les $-\text{OH}$ et les $-\text{C}=\text{O}$ carboxyliques. Par ailleurs, on peut mettre en évidence la présence des $-\text{C}=\text{O}$ carboxyliques par la bande située à 1720cm^{-1} . Cette dernière pratiquement absente du spectre IR du polycondensat PCG-NO_2^- salifié avec en contre-partie manifestation d'une bande située à 1390cm^{-1} caractéristique des groupements carboxylates. La bande située à 1615cm^{-1} est attribuable aux groupements carbonyles ($-\text{C}=\text{O}$) et aux liaisons $\text{C}=\text{C}$ aromatiques. Le massif situé entre 1400 et 1100cm^{-1} peut être attribué aux déformations des groupements $-\text{OH}$ et aux vibrations des différentes liaisons $-\text{C}-\text{O}$ (phénoliques, alcooliques, carboxyliques). On note par ailleurs l'absence de bandes attribuables à des groupements aliphatiques ($-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$).

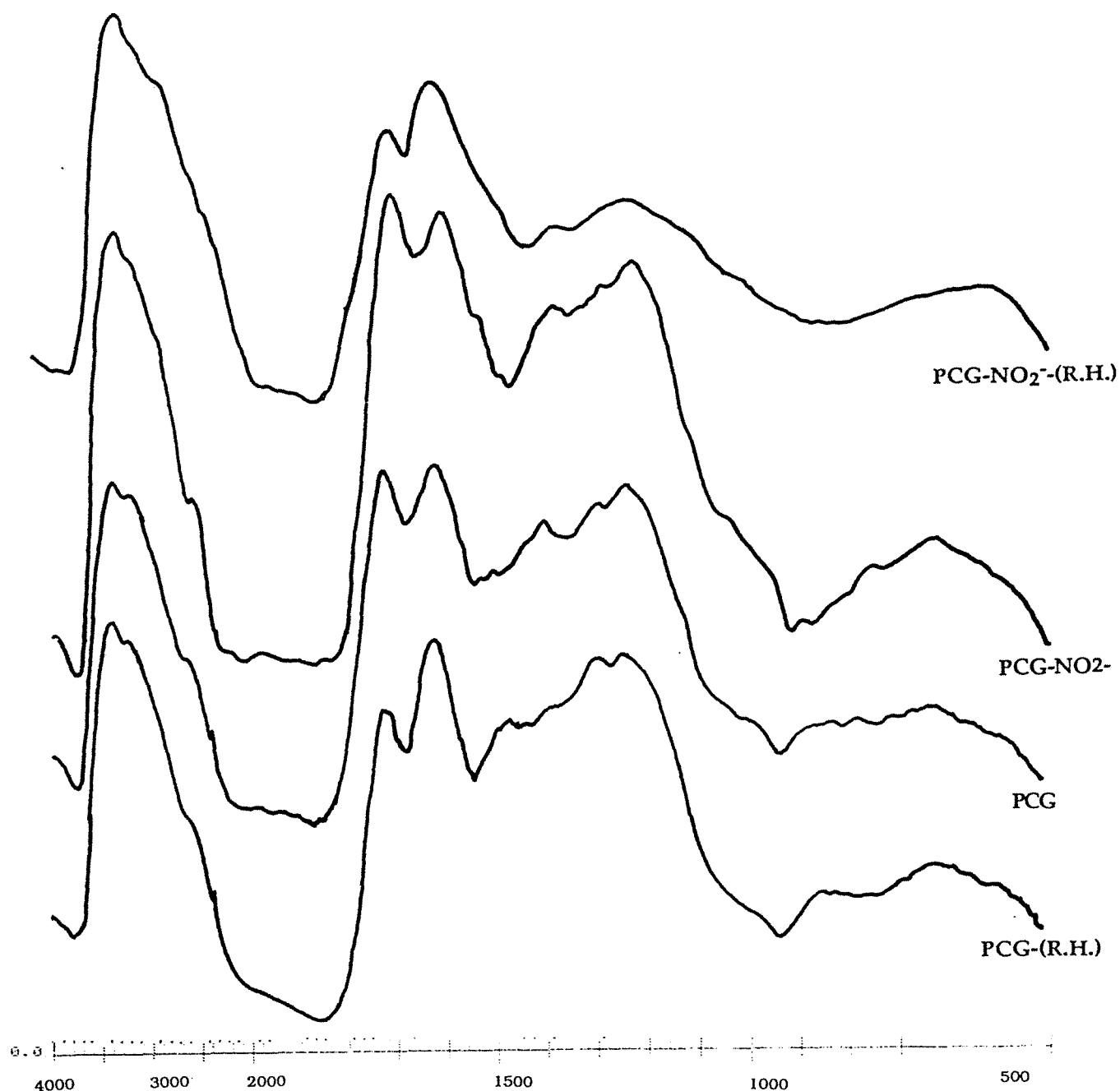


Figure 39.- Spectres d'absorption Infra-rouge des polycondensats synthétiques, PCG et PCG- NO₂⁻ et de leurs produits d'hydrolyse acide (R.H.).

Concentration : 1mg/200 mgKBr.

PCG : Polycondensat (PM>4000dal) obtenu par réaction (5 jours) entre catéchol (0,03 M) et glycine (0,03 M) en milieu tamponné de pH 7,9 en présence de l'oxygène moléculaire.

PCG-NO₂⁻ : Polycondensat (PM > 4000 dal) obtenu par réaction entre NO₂⁻ (0,075 M) et PCG (100 mg) en milieu tamponné de pH 5 en l'absence d'oxygène moléculaire.

III-3.- DEGRADATION ACIDE DU POLYCONDENSAT PCG-NO₂⁻

L'hydrolyse acide (HCl 3N, 130°C, 16 h) des polycondensats PCG-NO₂⁻ et PCG permet d'estimer la stabilité structurale de l'azote par sa mise en solution après attaque acide.

La dégradation acide des polycondensats se traduit par la récupération respectivement de 48,8 et 50,5 % des de PCG et de PCG-NO₂⁻ soumis à l'hydrolyse. La composition élémentaire des résidus récupérés est présenté au tableau XXVI.

Tableau XXVI.- Composition élémentaire des polycondensats synthétiques et de leurs résidus d'hydrolyse acide (R.H.).

	C %	N %	H %	C/N	H/C
PCG	50,5	5,0	2,2	10,2	0,
PCG-R.H.	51,8	3,4	2,7	15,4	0,63
PCG-NO ₂ ⁻	45,0	6,4	2,4	7,1	0,59
PCG-NO ₂ ⁻ R.H.	44,4	4,2	2,3	10,6	0,61

PCG : Polycondensat (PM W 4000 dal.) obtenu par réaction (5 jours) entre catéchol (0,03M) et glycine (0,03M) en milieu tamponné (pH 7,9) en présence d'oxygène moléculaire.

PCG-NO₂⁻ : Polycondensat (PM > 4000 dal.) obtenu par réaction entre NO₂⁻ (0,075M) et PCG (100 mg) en milieu tamponné (pH 5) en l'absence d'oxygène moléculaire.

Les résultats de l'analyse élémentaire des produits d'hydrolyse permettent d'observer une diminution des teneurs en azote. Le rapport C/N rend compte de l'importance de cette diminution, les valeurs passent de 10,2 à 15,4 pour le PCG et de 7,1 à 10,6 pour le PCG-NO₂⁻ après attaque acide. L'indice d'aromaticité reste encore élevé, ce qui indique que l'attaque acide n'a pas beaucoup affecté l'aromaticité des polycondensats.

Les proportions d'azote qui résistent à l'hydrolyse acide correspondent respectivement à 36,6 et 33,2 % de l'azote total soumis à l'hydrolyse des polycondensats PCG et PCG-NO₂⁻.

Les spectres Infra-rouge des résidus d'hydrolyse ne montrent pas de modifications quant aux principales fonctions oxygénées mises en évidence dans les polycondensats de départ.

L'azote hydrolysable représente respectivement 63,4 et 66,8 % de l'azote total soumis à l'hydrolyse acide des polycondensats PCG et PCG-NO₂⁻. Cet azote se répartit en azote ammoniacal 16 % et en azote non identifié 47,6 % dans le cas du PCG, tandis que l'azote libéré par hydrolyse acide du PCG-NO₂⁻ est représenté par 18% d'azote ammoniacal et 49 % d'azote non identifié.

Les résultats du traitement acide des polycondensats PCG et PCG-NO₂⁻ ne permettent pas de noter des différences significatives de leur comportement vis-à-vis de l'hydrolyse acide.

CONCLUSIONS

L'étude de la réaction entre NO₂⁻ et un polycondensat modèle représentatif des substances humiques a permis de mettre en évidence la réactivité de ces substances de caractère phénolique vis-à-vis de l'ion nitrite en milieu acide. Nos résultats permettent de confirmer l'importance de cette réactivité qui non seulement conduit à la dégradation de NO₂⁻ mais parallèlement s'accompagne de l'incorporation partielle d'azote d'origine nitreuse.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La formation des nitrites n'est qu'une étape intermédiaire du processus de nitrification dans les sols. L'anion NO_2^- est instable en milieu acide. Dans ces conditions NO_2^- peut réagir avec les composés polyphénoliques provenant de la sénescence des végétaux ou de l'activité microbienne du sol. Les produits qui en découlent sont mal connus et restent jusqu'à maintenant plus ou moins hypothétiques.

En vue de déterminer le rôle joué par NO_2^- , nous avons procédé à une étude sur modèles afin de mieux cerner la nature des processus réactionnels mis en jeu. Nous avons fixé le pH des réactions à 5 pour ne faire intervenir que l'effet des polyphénols dans la transformation de NO_2^- (à pH < 5 le NO_2^- se décompose spontanément). Les polyphénols choisis pour cette étude sont deux orthodiphénols, le pyrogallol et le catéchol. Le catéchol en tant que modèle a fait l'objet de nombreux travaux en vue de l'étude de la formation de substances humiques par auto-oxydation en présence ou en absence d'acide aminé tel que le glycocolle. Il nous a paru intéressant d'étudier le rôle de NO_2^- dans l'oxydation et la transformation du catéchol en présence de glycine en milieu acide dans la mesure où ces deux composés sont susceptibles de réagir rapidement avec NO_2^- . Le catéchol réagit en tant qu'orthodiphénol tandis que la glycine en tant qu'acide aminé peut réagir avec NO_2^- suivant le modèle de Van Slyke. D'autre part, l'étude de la polycondensation oxydative du catéchol avec la glycine en milieu alcalin selon ANDREUX (1978) a permis d'obtenir un polymère dont les caractéristiques physiques et chimiques sont bien établies. Ce polymère synthétique peut être considéré comme un modèle de substances humiques. L'étude de la réaction de NO_2^- avec ce polycondensat permet de se faire une idée de la réactivité de NO_2^- à l'égard des substances humiques.

I.- OXYDATION DU PYROGALLOL

Le pyrogallol est transformé en quinones avec l'aide de différents agents oxydants tant en milieu neutre (peroxydase + H_2O_2) ou alcalin (O_2) qu'en milieu acide (NO_2^-). La formation de purpurogalline est significative de la condensation du pyrogallol avec l'hydroxy-o-benzoquinone, premier intermédiaire réactionnel issu de l'oxydation du pyrogallol. Dans ces conditions, *la purpurogalline peut être considérée comme le premier produit stable issu de la polycondensation oxydative du pyrogallol.*

Les propriétés oxydantes de NO_2^- développées en milieu acide se traduisent par la formation, indépendamment de l'hydroxy-o-benzoquinone, de la 2,3-dihydroxy-p-benzoquinone. Toutefois, la formation prédominante de l'oxyde nitrique, dès le début de la réaction, suivant le modèle de AUSTIN (1961), permet de considérer le processus de formation de la purpurogalline comme déterminant dans le système réactionnel composé de pyrogallol et de NO_2^- en milieu acide. Ce processus est accompagné d'un dégagement de CO_2 suivant le mécanisme de CRITSCHLOW *et al.*, (1951 et 1967).

La formation de la 2,3-dihydroxy-p-benzoquinone, entraîne celle d'intermédiaires C-Nitrosés qui réagissent avec l'excès de NO_2^- pour former des produits gazeux azotés tels que N_2 et N_2O .

II.- FORMATION DE POLYCONDENSATS SYNTHÉTIQUES

L'action de NO_2^- sur le pyrogallol se traduit en fin de réaction (5 jours) par la formation de produits brun-noir incorporant de l'azote. Ces polymères de poids moléculaire élevé (fraction dominante de $\text{PM} > 30000$) sont porteurs de fonctions hydroxyles, carbonyles et carboxyles. La présence de ces groupements fonctionnels tend à confirmer les mécanismes réactionnels mis en œuvre certainement similaires à ceux décrit par CRITSCHLOW *et al.* (1951 et 1967), qui débouchent sur l'ouverture d'une partie des cycles aromatiques. Les polycondensats formés accusent un caractère nettement aromatique ; leurs caractéristiques physiques et chimiques permettent de les comparer aux substances humiques extraits des sols.

III.- INCORPORATION DE L'AZOTE D'ORIGINE NITREUSE DANS LES POLYCONDENSATS

L'azote d'origine nitreuse est incorporé, dans les polycondensats formés, avec une proportion pondérale de 2 à 7 % suivant qu'on est en présence ou en absence d'oxygène. La présence de l'oxygène se traduit surtout par l'accroissement d'azote incorporé ainsi que par la quantité de polymères formés. En anaérobiose, la teneur en azote incorporé est comprise entre 2 et 4 %. Il est certain que le rôle de l'oxygène dans le processus d'incorporation de l'azote est étroitement dépendant de la peroxydation de NO formé par réaction de NO_2^- avec le pyrogallol. La réaction développée entre NO et le pyrogallol en présence d'oxygène confirme pleinement cette hypothèse. La présence d'oxygène tend donc à accroître l'incorporation de l'azote d'origine nitreuse sous la forme de groupements nitrosés et nitrés. Les résultats issus de la dégradation en milieu acide (HCl 3N, 130°C, 16 h) des polymères purifiés permettent d'observer des différences notables entre le comportement de l'azote incorporé en provenance de NO_2^- et celui en provenance de NO_2 .

En résumé, l'azote d'origine nitreuse incorporé dans les polycondensats résiste à raison de 35 à 55 % à l'hydrolyse acide, suivant que cette incorporation a lieu en présence ou en l'absence d'oxygène. L'action de l'oxygène tend à accroître la formation de fonctions azotées de type nitré.

IV.- ACTION DE NO_2^- SUR LE CATÉCHOL EN PRÉSENCE D'ACIDE AMINÉ

L'action de NO_2^- sur le catéchol ne semble pas trop modifiée par la présence de l'acide aminé dans le milieu réactionnel. Cette action est caractérisée par la prédominance de la réaction entre NO_2^- et le catéchol avec formation de NO et de 4-nitrocatéchol. Le mécanisme débouchant sur la formation de ce dérivé nitré implique la formation de NO_2^+ , agent nitrant, formé par protonation de NO_2 en milieu aqueux acide, comme le montre le modèle de SNEED et BRASTED (1956) sans toutefois négliger le mécanisme qui fait intervenir la formation d'intermédiaires C-nitrosés.

La réaction entre catéchol et glycine est dominée par la transformation de la glycine avec incorporation d'une faible quantité de glycine dans les polycondensats formés suivant le modèle de TRAUTNER et ROBERTS (1950). Toutefois dans ces conditions la réaction entre NO_2^- et la glycine suivant le mécanisme de Van Slyke apparaît comme négligeable. Ces réactions s'accompagnent d'un dégagement de CO_2 en provenance, en grande partie, de la dégradation oxydative du catéchol.

Les polycondensats issus de cette réaction sont riches en fonctions oxygénées de types hydroxyles, carbonyles et carboxyles. La nature de l'azote incorporé à partir de NO_2^- et la glycine

se répartit en azote stable et en azote labile (N-NH_4^+) après dégradation en milieu acide. L'azote nitré ou nitrosé, identifié par réduction avec Zn en milieu acide, ne dépasse pas 2 % de l'azote incorporé.

En résumé, NO_2^- se comporte à la fois en oxydant et en agent nitration du catéchol ; la formation de 4-nitrocatechol semble toutefois prédominante par rapport à la formation d'un polycondensat catéchol-glycine.

V.- ACTION DE NO_2^- SUR LE POLYCONDENSAT MODÈLE, CATÉCHOL-GLYCINE (PCG)

Le polycondensat modèle PCG présente une certaine réactivité caractérisée par la réduction de NO_2^- en oxydes d'azote (NO et N_2O) et N_2 . En même temps, l'oxydation du PCG par NO_2^- se traduit par un dégagement de CO_2 . Ces réactions s'accompagnent d'une incorporation partielle de l'azote d'origine nitreuse dans le polycondensat, sans toutefois en modifier les propriétés physiques et chimiques générales. L'azote incorporé présente également une résistance marquée à l'hydrolyse acide.

Ceci permet de confirmer l'importance de la nature polyphénolique des composés organiques, simples ou complexes, de structure ortho-diphénolique, qui participent à la transformation de l'azote d'origine nitreuse en azote organique.

A l'issue de cette étude nous pouvons confirmer le rôle déterminant de NO_2^- sur la transformation des polyphénols en polycondensats de type humique dans les milieux acides. Cette transformation est nettement accentuée en présence d'oxygène.

Indépendamment du blocage de l'azote sous des formes non minéralisables, la formation d'intermédiaires nitrés et nitrosés peut avoir lieu en parallèle avec la nitrification.

Il y a lieu de noter encore que les réactions entre NO_2^- et polyphénols se développent en milieu acide. Cette acidification peut avoir des origines multiples. indépendamment des causes naturelles, l'acidification des sols s'est trouvée notablement accrue ces dernières années d'une part par l'augmentation de la pollution atmosphérique et d'autre part par des causes anthropogéniques telles que l'épandage de matières fertilisantes (les engrais azotés ammoniacaux abaissent fortement le pH si leur effet n'est pas contrebalancé par l'application de chaux) dans les cultures. Les polyphénols présents dans le sol peuvent alors réagir avec NO_2^- pour former des dérivés, nitrés et nitrosés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- ADRIAN Ph., 1985- Influence des ions Fe^{2+} et Mn^{2+} sur la formation des composés humiques. Autoxydation et polymérisation des systèmes Catéchol-Aminoacide et Catéchol-Peptide. Thèse Univ. Nancy I, 101 p.
- ALEEM H.I.H., ENGEL M.S. and ALEXANDER M., 1957 - Bact. Proc. Soc. AM. Bacteriol., 9.(cité par ALLISON , 1973)
- ALEXANDER M., 1977 - Nitrification. In : Introduction to soil microbiology. 2nd. ed. John Wiley & Sons, New York, 251-271.
- ALLISON F.E., 1963 - Losses of gaseous nitrogen from soils by chemical mechanisms involving nitrous acid and nitrites. Soil Sci. 96, 404-409.
- ALLISON F.E., DOETSCH J.H. and STERLING L.D., 1952 - Nitrogen gas formation by interaction of nitrites and amino acids. Soil Sci. 74, 311-314.
- ALLISON F.E. and DOETSCH J.H., 1951 - Nitrogen gas production by the reaction of nitrites with amino acids in slightly acid media. Soil Sci. Soc. Am. Proc.. 15, 163-166.
- ANDREUX F., 1978 - Etude des étapes initiales de la stabilisation physico-chimique et biologique d'acides humiques modèles. Thèse Doct. Etat, Univ. Nancy I, 180 p.
- ANDREUX F. et METCHE M., 1974. Formation d'allomélanines préhumiques au cours de l'autolyse de feuilles de Jugans regia. II. Variations des propriétés fonctionnelles avec l'encombrement moléculaire. In : "Biodégradation et Humification". G. Kilbertus, O. Reisinger, A. Mourey et J.A. Cancela da Fonseca (Eds). 1er Coll. Int. Univ. Nancy I, 479-490.
- ANDREUX F., METCHE M. et JACQUIN F., 1971 - Incorporation de l'azote aminé dans la phytomélanine issue de la polymérisation oxydative de l' α -hydrojuglone. C. R Acad. Sc. Paris, 272D, 2729-2731
- ANDREUX F., BOUDOT J.P., CHONE Th. and GUENIOT B., 1983 - Relation entre la biodégradation de la glycine libre ou combiné et la nature du complexe d'altération des sols. Agronomie, 3, 247-257.
- ANDREWS P., 1964.- Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration. Biochem. J., 91, 222-233.
- AUSTIN A. T., 1961 - Nitrosation in organic chemistry. Sci. Prog. (Oxford) 49, 619-640.

B

- BARRIUSO E., ANDREUX F. et PORTAL J.-M., 1990 - Caractérisation par hydrolyse acide de l'azote des fractions organiques et organo-minérales d'un sol humifère. *Science du sol*, 28, 223-236.
- BARRIUSO E., 1985 - Caractérisation des fractions organo-minérales et des constituants humiques d'un sol de pelouse subalpine. Thèse d'Université Nancy I.
- BARTELETT R.J., 1981 - Nonmicrobial nitrite-to-nitrate transformation in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45, 1054-1058.
- BEL HADJ BRAHIM A., 1987. - Influences des constituants alumineux et ferriques non cristallins sur les cycles du carbone et de l'azote dans les sols montagnards acides. Thèse d'Université Nancy I.
- BELLAMY L.J., 1975 - *The infrared spectra of complex molecules*. John Wiley and sons, New York.
- BOLLAG J.-M., DRZYMALA S. and KARDOS L.T. 1973 - Biological versus chemical nitrite decomposition in soil. *Soil Sci.*, 116, 44-50.
- BOUDOT J.-P., 1982 - Relations entre l'altération minérale et le cycle de l'azote sur matériel chloriteux du massif schisto-grauwackeux vosgien. Thèse Doct. Etat, Univ. Nancy I, 168 p.
- BOUDOT J.-P., BEL HADJ B.A. and CHONE Th., 1986 - Carbon mineralization in Andosols and aluminium-rich soils. *Soil Biol. Biochem.*, 18, 457-461.
- BOUDOT J.-P., BEL HADJ B.A. and CHONE Th., 1986 - Dependence of carbon and nitrogen mineralization rates upon amorphous metallic constituents and allophanes in highland soils. *Geoderma*, 42, 345-260.
- BREMNER J.M. and NELSON D.M., 1968 - Chemical decomposition of nitrite in soils. 9th Int. Congress of Soil science, Adelaide, 11, 495-503.
- BREMNER J.M. and FÜHR F., 1966 - Tracer studies of the reaction of soil organic matter with nitrite. *In : The use of isotopes in soil organic matter studies*. Pergamon Press, Oxford, 337-346.
- BREMNER D.R. and KEENEY J. M., 1966 - Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils : 3. Exchangeable ammonium, nitrate, and nitrite by extraction-distillation methods. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 30, 577-582.
- BREMNER F.E. and SHAW K., 1957 - The mineralization of some nitrogenous materials *In Soil. J. Sci. Food Agr.* 8, 341-347.
- BREMNER J. M., 1957 - Studies on soil humic acid. II. Observation on the estimation of free amino groups. Reactions of humic acid and lignin preparations with nitrous acid. *J. Agr. Sci.*, 48, 352-360.
- BROADBENT F.E. and CLARK F.E., 1965 - Denitrification. *In : Soil nitrogen*. Bartholomew W.V. and Clark F.E. (Eds.). American Society of Agronomy, Madison, 344-359.

- BROADBENT F.E, TYLER K.B. and HILL G.N., 1957 - Nitrification of ammoniacal fertilizers in some California soils. *Hilgardia* 27, 247-267 (cit   par Nommik H., 1965). *In : Soil nitrogen*. Bartholomew W.V. and Clark F.E. (Eds.) American Society of Agronomy, Madison).
- BRUNELOT G., ADRIAN P., ROUILLER J., GUILLET B. and ANDREUX F., 1989 - Determination of dissociable acid groups of organic compounds extracted from soils, using automated potentiometric titration. *Chemosphere* 19, 1413-1419.

C

- CHALK P.M. and SMITH C.J., 1983 - Chemodenitrification. *In : Gaseous loss of nitrogen from plant-soil systems*. Freney J.R. and Simpsom J.R (Eds.) Nijhoff/Junk Publishers.
- CHAPMAN H.D. and LIEBIG G.F., 1952 - Field and laboratoy studies of nitrite accumulation in soils. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 16, 276-282 (cit   par Nommik H. (1965). *In : Soil nitrogen*. Bartholomew W.V. and Clark F.E. (Eds.) American Society of Agronomy, Madison).
- CHEN Y., SENESI N. and SCHNITZER M., 1977 - Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Amer. J.*, 41, 352-358.
- CLARK F.E., BEARD W.E. and SMITH D.H , 1960 - Dissimilar nitrifying capacities of soils in relation to losses of applied nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 24, 50-54.
- CLARK F.E., 1962 - Losses of nitrogen accompagning nitrification. *In : Int. Soc. Soil Sci., Trans., comm. IV, V* (Palmerston, N.Z.), 173-176 (cit   par Nelson D.M., 1982 - Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. *In : Nitrogen in agricultural soils*. Stevenson F.J. (Ed). Am. Soc. Agr. Inc. Madison, Usa. , 327-363.
- CRITCHLOW A. , HASLAM E. , HAWORTH R.D. and TINKER P.B., 1967.- The oxidation of some pyrogallol and purpurogallin derivatives. *Tetrahedron*, 23, 2829-2847.
- CRITCHLOW A., HAWORTH R.D. and PAUSON P.L., 1951.- Purpurogallin. Part VI. Mechanism of the oxidation of pyrogallol. *J. Chem. Soc.*, 1318-1925.

D

- DE NOBILI M., GJESSING E. and SEQUI P., 1989. - Sizes and shapes of humic substances by gel chromatography. *In : Humic Substances II, In Search of Structure Part III : Physicochemical studies of the structures of humic substances*. Hayes M.H.B. (Ed.), John Willey & Sons, New York.
- DETERMANN H., 1969 - *Chromatographie sur gel*. Masson, Paris, 193p.
- DORMAAR J.F., 1967 - Infrared spectra of humic acids from soils formed under grass or trees. *Geoderma*, 1, 37-45.

E

EDWARDS A.P. and BREMNER J.M., 1966 - Formation of methyl nitrite in reaction of lignin with nitrous acid. *In* The use of isotopes in soil organic matter studies. **Report of FAO-IAEA Technical Meeting, Brunswick Wölkenrode (1963), 347-348.** Pergamon Press, New York (1966).

EL SAYED Azhar, VERHE R., PROOT M., SANDRA P. and VERSTRAETE W., 1986. - Binding of nitrite nitrogen on polyphenols during nitrification. **Plant and Soil, 94, 369-382.**

F

FLAIG W., BEUTELSPACHER H. and RIETZ E., 1975 - Chemical composition and physical properties of humic substances. *In* : **Soil components. I. Organic components.** J.E. Gieseking (Ed.), Springer Verlag, Berlin Publ., 1-211.

FLAIG W. and REIMER H., 1971 - Polarographische Untersuchungen zum Verhalten von Trihydroxytoluolen bei der Reaktion mit Glycin unter oxydierenden Bedingungen. **Leibigs Ann. Chem., 746, 81-85.**

FUJII K., KOBAYASHI M. and TAKAHASHI E., 1974 - Amines in the mixture of plant residues and sand incubated aerobic and waterlogged conditions. **J. Sci. Soil Manure, Japan, 43, 160-164** *In* : **Soil Sci. Plant Nutr. (Tokyo), 20, 101-102.**

G

GAMBLE D.S., 1970 - Titration curves of fulvic acid : the analytical chemistry of a weak acid polyelectrolyte. **Can. J. Chem., 48, 2662-2669.**

GOLEBIEWSKA et SCZODROWSKA, 1979. - Caractéristique spectrale de la polycondensation du système catéchol-glycine et du processus qui mène à la création de substances humiques modèles. **C.R. Assemblée Générale du Groupe Polyphénol, Logrono, 9, 244-256.**

GUCKERT A., ROGER P. et JACQUIN F., 1968 - Contribution à l'utilisation des techniques radioisotopiques pour l'étude de la matière organique du sol. **Bull.E.N.S.A. Nancy, X, 69-100.**

GUIRAUD G. and BUSCARLET L.A., 1975 - **Int. J. Appl. Radiat. Isot., 26, 187-193.**

H

HAIDER K. and MARTIN J.P., 1965 - Reactions between amino acid compounds and phenols during oxidation. **Plant & Soil, 22, 49-64.**

J

- JOCTEUR-MONROZIER L. et DUCHAUFOR Ph., 1986 - Données récentes sur l'humification. *Science du sol*, 25, 377-388.
- JOCTEUR-MONROZIER L. et ANDREUX F., 1981 - L'azote organique dans les sols. Exemples de quantification des formes protéiques et des combinaisons complexes. *Science du sol*, 3, 219-242.
- JONES R.W. and HEDLIN R.A., 1970 - Nitrite instability in three Manitoba soils. *Can. J. Soil Sci.*, 50, 339-345.

K

- KAINZ G and HUBER H., 1959 - Anomalous reactions in amino nitrogen determination. V- The anomaly of phenols. *Microchimica Acta* 1959, 891-902.
- KUMADA K. and KATO H., 1970 - Browing of pyrogallol as affected by clay minerals. I. Classification of clay minerals based of their catalytic effects on the browning reaction of pyrogallol. *Soil Sci. Plant Nutr. (Tokyo)* 16, 195-200.
- KUPREVICH V.F. and SCHCHERBAKOVA T.A., 1971 - Comparative enzymatic activity in diverse types of soil. *In : Soil Biochemistry*, Vol. 2. Mc Laren A.D. and Skujins J. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 167-201.
- KYUMA K. and KAWAGUCHI K., 1964 - Oxidative changes of polyphenols as influenced by allophan. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 28, 371-374.

M

- MARTIN F., MAUDINAS B., CHEMARDIN M. and GADAL P., 1981 - Preparation of submicrogram nitrogen samples for isotopes analysis by the GS 1 emission spectrometer. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, Vol. 00, , 000 to 000.
- MARTIN J.P. and HAIDER K., 1976 - Decomposition of specifically Carbon-labelled ferulic acid : Free and linked into model humic acid-type polymers. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 40, 377-380.
- MARTIN J.P., ZUNINO H., PEIRANO P., CAIZOZZI M. and HAIDER K., 1982 - Decomposition of Carbon-14-labelled lignins, model humic acid polymers and fungal melanins in allophanic soils. *Soil Biol. Biochem.*, 14, 289-293.
- MARTIN J.P. and HAIDER K., 1986 - Influence of mineral colloides on turnover rates of soil organic carbon. *In : Interactions of soil minerals with natural organics and microbes*. SSSA Spec. Pub. N°17. Soil Sci. Soc. Am., Madison, USA.
- METCHE M., MANGENOT F. et JACQUIN F., 1970 - A propos des interactions Plante-Sol. II. Formation et structure du pigment noir de *Melandryum Rubrum*. *Soil Biol. Biochem.* 2, 81-98.

MORTLAND M.M. and HALLORAN L.J., 1976. - Polymerization of molecules aromatics on smectites. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **40**, 367-370.

MOORE S. and STEIN W.H., 1954. - Dosage colorimétrique des amino-acides. *J. Biol. Chem.*, **24**, 207.

N

NELSON D.W. and BREMNER J.M., 1970 - Gaseous products of nitrite in soils. *Soil Biol. Biochem.*, **2**, 203-215.

NELSON D.W. and BREMNER J.M., 1969 - Factors affecting chemical transformations of nitrite in soils. *Soil Biol. Biochem.*, **1**, 229-239.

NELSON D.M., 1982 - Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. *In : Nitrogen in agricultural soils*. Severson F.J. (Ed). Am. Soc. Agr. Inc. Madison, USA, 327-363.

NORMAN L. ALLIGER, CAVA M.P., De JONGH D.C., JOHNSON C.R., LEBEL N.A. and STEVENS C.L., 1987 - *Chimie organique. Tome 2. Réactions*. Edit. Universitaire, Groupe McGraw-Hill.

P

PARSONS J.W., 1989 - Hydrolytic degradations of humic substances. *In : Humic Substances II, In Search of Structure Part I : Degradative studies of the structures of humic substances*. Hayes M.H.B. (ed)., John Willey & Sons, New York.

PIERSON R. H., FLETCHER A. N. and GANTZ E. C., 1956 - Catalog of infrared spectra for quantitative analysis of gases. *Anal. Chem.*, **28**, 1218-1238.

POHL C.A. and JOHANSON E.L., 1980 - Dionex Corporation Department Research and Development, 1228 Titan Way, Sunnyval, California, 94086. *Am. Proc.* **29**, 274-277.

PORTAL J. M., PILLON P., JEANSON P. and GERARD B., 1986 - Oxygen containing functional groups in land-derived humic acids. - I. Evaluation by derivatization methods. *Org. Geochem.*, **9**, 6, 305-311.

PORTER L.K., 1969. - Gaseous products produced by anaerobic reaction of sodium nitrite with oxime compounds and oximes sunthesized from organic matter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **33**, 696-702.

R

REUSS J.O. and SMITH R.L., 1965 - Chemical reactions of nitrites in acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **29**, 267-270.

RIFFALDI R. and SCHNITZER M., 1972. - Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 36 : 301-305.

S

SABBE W.E. and REED L.W., 1964 - Investigations concerning nitrogen loss through chemical reactions involving urea and nitrite. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 28, 478-481.

SAMRAKANDI M.A., 1987 - Contribution à l'étude de la nitrosation des polyphénols. D.E.A. INPL-Nancy.

SCHVARTZ Ch., 1975 - Evolution des hydrosolubles de litières de callune et de hêtre au cours des processus d'umification. Thèse doct. ing. Univ. Nancy I. 81p.

SCHNITZER M., BARR M. and HARTENSTEIN R., 1984 - Kinetics and characteristics of humic acids produced from simple phenols. *Soil Biol. Biochem.*, 16, 371-376.

SCHNITZER M. and KHAN S.U., 1972 - *Humic substances in the environnement*. Marcel Dekker, New York, Publ., 327p.

SCHNITZER M. and GUPTA U.C., 1965 - Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Soc.*, 29, 274-277.

SHINDO H. and HUANG P.M., 1984 - Catalytic effects of manganese(IV), iron(III), aluminium and silicon on the formation of polymers. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48, 927-934.

SJOBLAD R. D. and BOLLAG J.-M., 1981 - Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. In : *Soil Biochemistry*. Vol. 5. E.A. Paul and J. N. Ladd (Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York., 113-152.

SMALL H., STEVENS T.S. and BAUMAN W.C., 1975 - Novel ion exchange chromatographic method using conductivity detection. *An. Chem.* 47: 47. *Composition, reactions*, 93-119. John Willey & Sons, New York.

SMITH C.T. and CHALK P.M., 1980 - Fixation and loss of nitrogen during transformation of nitrite in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44, 288-291.

SMITH D.H. and CLARK F.E. 1960 - Volatile losses from acid or neutral soils containing nitrite and ammonium ions. *Soil Sci.*, 90, 86-92.

SNEED M.C., and BRasted R.C., 1956 - *Comprehensive inorganic chemistry*. V. D. Van Nostrand CO., Inc. Princeton, N.J.

STEVENSON F.J., 1982 - IV. Dynamics of soil nitrogen transformations. In : *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions*. John Willey & Sons, New York, 93-119.

STEVENSON F.J., HARRISON R.M., WETSELAAR R. and LEEPER R.A., 1970 - Nitrosation of organic matter : III. Nature of gases produced by reaction of nitrite with lignins, humic substances and phenolic constituents. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 34, 430-435.

STEVENSON F.J. and SWABY R.J., 1964 - Nitrosation of organic matter : I. Nature of gases evolved during nitrous acid treatment of lignin and humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **28**, 773-777.

SUZAWA T., HONDA M., MANABE O. and HIJAMA M., 1955 - Decomposition of nitrous acid in aqueous solution. *J. Chem. Soc. Japan, Ind. Chem. Sec.* **58**, 744-746.

T

TAN K. H., 1986 - Degradation of soil minerals by organic acids. *In* Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. SSSA Spec. Pub. N° 17. Soil Sci. Soc. Am., Madison, USA.

TATE R.L. and ALEXANDER M., 1974 - Formation of dimethylamine and diethylamine in soil treated with pesticides. *Soil Sci.*, **118**, 317-321.

TRAUTNER W. and ROBERTS E.A.H., 1950 - The chemical mechanism of the oxidative deamination of amino acids by catechol and polyphenolase. *Austr. J. Sci. Res.*, **3**, 356-380.

TYLER K.B. and BROADBENT F.E. 1960. - Nitrite transformation in California soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **24**, 279-282.

W

WANG T.S.C., LI S.W. and FERNG Y.L., 1978 - Catalytic polymerization of phenolic compounds by clay minerals. *Soil Sci.*, **126**, 15-21.

WANG T.S.C. , HUANG P.M. , CHOU Chang-Hung and CHEN Jen-Hshuan, 1986. - The role of soil minerals in the abiotic polymerization of phenolic compounds and formation of humic substances. *In* ; Interactions of soil minerals with natural organics and microbes. SSSA Spec. Pub. N°17. Soil Sci. Soc. Am., Madison, USA.

WANG T.S.C., WANG M.C. and FERNG Y.L., 1983 - Catalytic synthesis of humic substances by natural clays, silts and soils. *Soil Science*, **135**, 350-360.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur BOLLAG J.Marc, Professeur, Université Pennsylvanie (USA),
Monsieur BOUDOT J.Pierre, Chargé de Recherche, CPB Vandoeuvre.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur SAMRAKANDI Moulay Abdeslam

**à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse
intitulée :**

**"Rôle des nitrites dans l'oxydation des polyphénols et la formation de
polycondensats de type humiques"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : "BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"

Fait à Vandoeuvre le, 16 Novembre 1992

Le Président de l'I.N.P.L.,

M. LUCIUS



**Pour le Président
Le Vice-Président**

J. Ch. CHEVRIER

Résumé

"Rôle des nitrites dans l'oxydation des polyphénols et la formation de polycondensats de type humique"

Cette étude vise à préciser certains processus chimiques encore mal connus d'incorporation de l'azote minéral, en particulier nitreux, dans la matière organique des sols. Le processus de dénitrification chimique est, dans l'ensemble, bien connu. Il croît généralement en intensité avec l'acidité du sol et sa teneur en matière organique (sols de montagne, sols volcaniques), particulièrement en composés polyphénoliques. Dans ces conditions, les quantités d'azote incorporé augmentent parallèlement aux teneurs en carbone organique du sol. C'est ainsi que vers pH 4,5, où la décomposition des ions nitrites est quasi-totale, la formation de produits gazeux (NO , N_2 , NO_2 , N_2O) devient négligeable, tandis que l'incorporation d'azote constitue le processus dominant. Les mécanismes réactionnels sont par contre incertains et les formes d'azote qui en résultent tout aussi mal définies.

Dans ce contexte, il a été procédé à l'étude d'un modèle simple faisant intervenir l'ion nitrite et de o. et p.diphénols, en milieu tamponné de pH 5, en aérobiose comme en anaérobiose. Le rôle oxydant de NO_2^- a été mis en évidence, grâce au suivi des cinétiques de dégagement de CO_2 et NO et de la formation de produits quinoniques. Les produits de la polycondensation oxydative des polyphénols ont été caractérisés. Les résultats font apparaître l'incorporation, dans les polycondensats (fraction de PM > 2000), d'une quantité d'azote d'origine nitreuse comprise entre 2 et 6 % selon les substrats polyphénoliques. Les techniques utilisées pour la détermination de la nature fonctionnelle de l'azote incorporé ont permis de considérer deux formes bien définies : une forme labile par le traitement acide (HCl 3N, 130°C , 16 heures) et une forme stable vis-à-vis de ce traitement. Seule une faible proportion (2 à 5 %) de l'azote incorporé a pu être identifiée sous forme nitrée et nitrosée. L'ensemble des déterminations structurales des polycondensats obtenus permet de les rapprocher des substances humiques isolées du sol.

Le suivi de la réaction entre o.diphénol (catéchol), glycine et NO_2^- en l'absence d'oxygène et à pH 5 a permis de préciser l'action de NO_2^- en présence simultanée de ces deux composés organiques susceptibles de réagir avec NO_2^- . Les résultats ont montré, dans ces conditions, la prédominance de la réaction entre o.diphénol et NO_2^- par rapport à celle entre o.diphénol et acide aminé, tandis que la réaction de Van Slyke entre acide aminé et NO_2^- est négligeable. Ces réactions conduisent en revanche à la formation de polycondensats noirs incorporant de l'azote d'origine nitreuse et de la glycine. Les caractéristiques structurales de ces polycondensats (fraction de PM > 2000) sont à nouveau très proches de celles des substances humiques, et leur teneur en azote est plus élevée (7,3 %) qu'en l'absence de glycine.

Cette étude a permis de montrer l'influence déterminante de la nitrosation dans les environnements acides et faiblement aérés, sur l'élaboration des substances humiques. De telles réactions d'incorporation peu réversible de l'azote nitreux ont notamment pour conséquence une altération du cycle interne de l'azote, par blocage plus ou moins intense de la nitrification.

Mots-clés : *Oxydation - Nitrites - Polyphénols - Oxydes d'azote - Nitrosophénols - Polycondensats humiques.*