

Université de Limoges
**École Doctorale Gay Lussac - Sciences pour l'Environnement (ED
523)**
EA1069 - Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Discipline / Spécialité : Chimie Appliquée / Chimie des Substances Naturelles

Présentée et soutenue par
Tom Boucherle

Le 18 mai 2018

**Développement de nouveaux outils de diagnostic de terrain pour
une application au dosage de l'arsenic**

Thèse dirigée par le Professeur Vincent CHALEIX et le Professeur Vincent
GLOAGUEN

JURY :

Président du jury

M. Vincent Sol, Professeur des Universités, PEIRENE EA7500, Université de
Limoges

Rapporteurs

M. Jean-Pierre Souchard, Professeur des Universités, Laboratoire IMRCP, Université
Paul Sabatier – Toulouse III

M. Nicolas Joly, Professeur des Universités, IUT de Béthune, Université d'Artois

Examineurs

Mme. Laurence Raehm, Maître de Conférences, ICGM, Université de Montpellier

M. Vincent Chaleix, Professeur des Universités, PEIRENE EA7500, Université de
Limoges

Invités

M. Nicolas Drogat, Docteur, Président de Novassay





A mon grand-père parti trop tôt, le Professeur André Boucherle





On peut braver les lois humaines mais non résister aux lois de la nature.

Capitaine Némó (Jules Verne), Vingt mille lieues sous les mers (1869-1870)

*On ne vit que deux fois :
La première quand on naît
La deuxième quand on est face à la mort*

James Bond (Ian Fleming), On ne vit que deux fois (1964)

*Oui, je sais bien d'où je viens !
Inassouvi, comme la flamme,
J'arde pour me consumer.
Ce que je tiens devient lumière,
Charbon ce que je délaisse :
Car je suis flamme assurément !*

Nietzsche, Ecce Homo (1908)

*La science, mon garçon, est faite d'erreurs, mais d'erreurs qu'il est bon de commettre, car
elles mènent peu à peu à la vérité.*

Professeur Otto Lidenbrock (Jules Verne), Voyage au centre de la Terre (1864)

*Tu dois désapprendre tout ce que tu as appris.
Fais-le, ou ne le fais pas, mais il n'y a pas d'essai.*

Maître Yoda, Star Wars, épisode V : L'Empire contre-attaque (1980)





Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Nicolas Drogat sans qui cette thèse n'aurait jamais existée, merci de m'avoir fait participer à l'aventure qu'a été Novassay. Une aventure qui a commencé alors que l'entreprise n'existait pas encore, lorsque que tu m'as fait confiance et que nous avons réussi à développer, lors de mon stage de master professionnel, des bandelettes tests destinées au dosage de l'uranium. Ton optimisme, ta prévenance et ton enthousiasme communicatif m'ont donné envie de suivre le parcours des bandelettes que je considérais comme mon « bébé » et que nous étions les seuls au monde à proposer. Grâce à toi, j'ai pu assister à la naissance de l'entreprise Novassay avec le recrutement de Cyril Ringot et de Jean-Pierre Drogat. J'ai pu voir son évolution avec notamment son déménagement dans de plus grands locaux à Saint-Viance, ou bien encore de par tes nombreux déplacements en Australie ou au Kazakhstan. Tu m'as intégré à l'équipe en me recrutant en thèse CIFRE sur le développement d'un nouveau produit destiné à innover dans le domaine analytique appliqué à l'arsenic. Je suis attristé que l'entreprise ait dû se mettre en dormance pour une durée indéterminée, mais cela aura tout de même été une expérience fortement enrichissante et je t'en remercie grandement.

Je remercie le Professeur Vincent Sol, directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci de tout le travail que vous faites pour ce laboratoire depuis tant d'années. Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être Président du jury le jour de la soutenance.

Je remercie le Professeur Vincent Chaleix pour avoir dirigé cette thèse durant ces trois années. Le sujet de l'analyse colorimétrique de l'arsenic n'étant pas dans la thématique du laboratoire du LCSN, il a donc pratiquement fallu partir de zéro et travailler en essayant d'utiliser les compétences qu'on avait. Ce travail n'a pas été facile, loin de là, je me suis souvent retrouvé dépité devant ma paillasse, de ne pas avoir les résultats escomptés alors que cela semblait marcher sur le papier. Mais je savais que par ta grande culture chimique et ton inventivité je ne serais pas bloqué et qu'on trouverait une autre idée à exploiter. Cela m'a amené à réaliser de nombreuses expériences, comme des synthèses organiques, des synthèses de nanoparticules d'or, des optimisations de protocole ou bien encore des montages façon « système D » avec ce qu'on pouvait trouver dans le laboratoire. Tant de choses que je ne savais pas faire et que j'ai pu apprendre durant cette thèse, dont la plus importante aura été de s'adapter devant l'adversité. Merci pour toutes ces corrections apportées au manuscrit et ces conseils de mise en forme et de présentation des idées. Merci pour toute cette expérience que j'ai pu emmagasiner qui me servira inéluctablement pour ma vie future professionnelle ou personnelle.

Je remercie vivement l'ensemble des membres du jury : Monsieur le Professeur Jean-Pierre Souchard et monsieur le Professeur Nicolas Joly pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également Madame le Docteur Laurence Raehm de me faire l'honneur d'être examinateur de mon travail de thèse. Je vous exprime, à tous les trois, ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

Je remercie le Docteur Cyril Ringot d'avoir été mon responsable scientifique au sein de l'entreprise Novassay. Je te suis reconnaissant de l'aide apportée que ce soit pour la recherche



dans la littérature, les conseils scientifiques ou les corrections apportées à la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie le Professeur Vincent Gloaguen pour avoir co-encadré cette thèse et pour avoir regonfler mon moral dans mes moments de doute. Merci d'avoir fait grandir le pôle de recherche de la Faculté des Sciences de Limoges en portant le projet de « fusionner » les trois laboratoires que sont le LCSN, le GRESE et l'UGMA au sein de l'unité PEIRENE.

Je remercie l'Association Nationale Recherche Technologie (ANRT), d'avoir financé pendant trois ans le projet de thèse en Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (Cifre).

Je remercie le Docteur Julien Vergnaud de s'être impliqué dans mon travail de thèse avant même d'avoir été intégré à l'entreprise Novassay. Merci pour ton travail de correction et merci pour tous ces conseils littéraires qui me serviront inexorablement pour la suite.

Je remercie Jean-Pierre Drogat pour toutes ces discussions sur des sujets éclectiques très éloignés de la chimie. Toutes tes expériences passées et ton point de vue affuté sur ces divers sujets m'auront été d'un grand enrichissement personnel.

Je remercie le Docteur et ami Amaury Lepetit. Bien que tu étais la moitié du temps de l'autre côté de l'Atlantique dans une contrée où l'on parle un dialecte étrange, communément appelé le Québec. J'attendais avec impatience ton retour pour pouvoir discuter sur nos thèses respectives, mais aussi sur le rugby, foot, cinéma, jeux vidéos ... Merci de m'avoir encourager pendant mes nombreux et fastidieux dépos CCM. Tu auras été indispensable à mon équilibre dans les moments de grosses fatigues.

Je remercie mon ami Aurélien Glomot de m'avoir gracieusement hébergé lors de mes déplacements dans l'entreprise à Brive. J'ai beaucoup apprécié les expériences culinaires que tu réalisais. J'ai également affectionné ton abonnement à beIN qui nous a permis de passer de bonnes soirées Ligue des champions ou Ligue Europa.

Je remercie le personnel du LCSN que ce soit Sylvie pour tout son travail administratif, Dorothée et Michelle pour leur travail logistique sans quoi le laboratoire ne pourrait pas vivre. Ainsi que tous les permanents qui se sont intéressés de près ou de loin à ce travail.

Je remercie les collègues et amis du laboratoire : Docteur Benjamin Rioux, Guillaume Marchand, Florent Leguern, Soukaina Bouramtane, Zineb Khaldi, Docteur Idelette Plazanet, Docteur Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Docteur Olivier Diebolt, Docteur Amandine Dieu avec qui j'ai passé de très bons moments, que ce soit pour des raisons professionnelles ou amicales, notamment lors des Traditionnels Repas Gras (TRG) instaurés par Monseigneur le Docteur Emmanuel Renault. Je souhaite remercier tout particulièrement Guillaume Marchand dont la gentillesse et la disponibilité m'auront été d'un très grand secours.

Je remercie mon ami Simon dit « mon petit Simon » et Aurélien dit « Le Magicien » qui ont su me faire oublier quelques instants, les tracas du laboratoire. Merci à Benjamin, mon ami de toujours, pour ces week-end de dernière minute à Seignosse ou pour ces longues soirées à refaire le monde jusqu'au bout de la nuit. Je souhaite également dire un grand merci à mon club de tennis le TC Aixe et aux coachs Dudu et Pat pour m'avoir permis de me défouler et de canaliser mon énergie.



Je garde le meilleur pour la fin, je remercie éminemment ma famille pour qui cela a certainement été très compliqué de me supporter au cours de ces trois années. Bien que le concept même de chimie soit très éloigné de ce que vous connaissez, vous vous êtes fortement impliqués pour me soutenir. Ce support moral m'aura été vital quand toutes lumières semblaient m'avoir quitté, cela m'a permis de tenir jusqu'au bout. Vous aurez tous été importants, mais je garde une mention particulière pour ma mère qui se sera démenée pour m'aider du mieux qu'elle le pouvait. Merci à vous tous, j'espère que vous pourrez tous être fiers de moi.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Sommaire

Introduction	23
Chapitre I. Bibliographie	29
I. L'arsenic.....	29
A. L'arsenic et l'homme, une histoire antique	29
B. Spéciation – Répartition - Toxicité.....	32
1. Spéciation	33
2. Répartition.....	36
a) Atmosphère	36
b) Hydrosphère	37
c) Sols	37
(1) Lithosphère.....	37
(2) Pédosphère	38
d) Biosphère	39
3. Toxicité.....	41
C. Enjeu à l'échelle mondiale	46
D. Techniques d'analyse	47
1. Techniques de laboratoire	47
a) Spectrométrie atomique.....	48
b) Spectrométrie de masse	49
2. Techniques de terrain.....	51
a) Voltammétrie	52
b) Bandelettes.....	53
II. Dosage colorimétrique de l'arsenic – Etat de l'art	55
A. Dosages colorimétriques basées sur la formation d'arsine.....	55
1. Test de Marsh	55
2. Dosage au diéthylthiocarbamate	56
3. Méthode de Gutzeit	57
B. Chromophores et fluorophores	58
1. Fluorophores	58
2. Chromophores	60
C. Dosage colorimétrique au bleu de molybdène	61
1. Interférences dues à l'échantillon	64
2. Application à l'arsenic.....	65
3. Dosage colorimétrique au molybdate d'ammonium utilisant des colorants	66
D. Nanoparticules d'or	68
1. Dosage de l'arsenic par des nanoparticules d'or modifiées	69
2. Dosage indirect de l'arsenic par des nanoparticules d'or et de la phytocélatine 3...71	71
III. Objectifs du travail	73
Chapitre II. Résultats et discussions.....	77
I. Dosage de l'arsenic (V) par formation d'un complexe coloré	77
A. Méthode au bleu de molybdène	77
B. Méthode utilisant le molybdate d'ammonium et un colorant	79
1. Optimisation de protocole.....	82

2.	Développement d'une nouvelle méthode visuelle de dosage de l'arsenic par une membrane filtrante	86
3.	Méthode supportée sur format papier.....	91
a)	Dosage de l'arsenic par la technique au bleu de molybdène supportée sur format bandelette.....	92
b)	Dosage de l'arsenic par la technique au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet/vert de malachite supportée sur format bandelette	93
4.	Etude des interférences.....	95
a)	Phosphate	97
b)	Silicate	98
C.	Elimination des interférences	99
1.	Carbonate de calcium (CaCO ₃).....	99
2.	Résines	101
3.	Hydroxyde de lanthane	103
II.	Dosage de l'arsenic (III) par l'utilisation de nanoparticules d'or	106
1.	Présentation de l'objectif	106
B.	Synthèse d'un mime de la phytochélatine 3	109
C.	Synthèse de nanoparticules d'or.....	118
1.	Microscopie électronique à transmission (MET)	120
2.	Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	121
D.	Dosage de l'arsenic (III) par les nanoparticules d'or.....	124
1.	Dosage de l'arsenic (III) par la L-cystéine.....	124
a)	Nanoparticules d'or stabilisées au citrate	124
b)	Nanoparticules d'or stabilisées au xylane	126
2.	Dosage de l'arsenic (III) par le mime de PC ₃	128
a)	Nanoparticules d'or stabilisées au citrate	129
b)	Nanoparticules d'or stabilisées au xylane	131
	Conclusion	135
	Chapitre III. Partie expérimentale	141
I.	Réactifs et solvants	141
II.	Chromatographie	143
A.	Chromatographie analytique	143
B.	Chromatographie préparative	143
III.	Analyses physico-chimiques	144
A.	Spectrophotométrie UltraViolet-Visible.....	144
B.	Résonnance magnétique nucléaire.....	144
C.	Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)	144
D.	Microscopie électronique à transmission.....	144
E.	Mesures en diffusion dynamique de la lumière (DLS) – potentiel Zeta.....	145
IV.	Synthèses.....	145
A.	Mime de PC ₃	145
B.	Nanoparticules d'or	146
C.	Elaboration de bandelettes	147
1.	Bandelettes au molybdate d'ammonium et au tartrate d'antimoine et de potassium 147	
2.	Bandelettes au molybdate d'ammonium et au vert de malachite/ethyl violet.....	147

V. Dosages.....	148
A. Méthode au bleu de molybdène.....	148
B. Méthode utilisant le molybdate d'ammonium et un colorant.....	148
1. Etude spectrophotométrique du comportement entre le vert de malachite et l'arsenic (V) en milieu acide.....	148
2. Dosage de l'arsenic (V) par le molybdate d'ammonium et l'éthyl violet à pH neutre, à pH 2 et à pH 1.....	149
3. Dosage de l'arsenic (V) par le protocole de la littérature.....	149
4. Optimisation du dosage de l'arsenic (V) par l'utilisation de sels de tartrate d'antimoine et de potassium (PAT).....	149
5. Optimisation du dosage de l'arsenic (V) par une réaction préliminaire entre l'arsenic et le molybdate.....	150
6. Développement d'une nouvelle méthode visuelle de dosage de l'arsenic par une membrane filtrante.....	150
C. Bandelettes.....	151
1. Bandelettes au molybdate d'ammonium et au tartrate d'antimoine et de potassium	151
2. Bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet/vert de malachite.....	152
D. Elimination des interférences.....	152
1. Carbonate de calcium.....	152
2. Résines.....	153
3. Hydroxyde de lanthane.....	154
E. Méthode utilisant les nanoparticules d'or.....	154
1. Dosage de l'arsenic (III) par la L-cystéine.....	154
2. Dosage de l'arsenic (III) par le mime de PC ₃	154
Références bibliographiques.....	157



Table des figures

Figure 1. Symbole alchimique de l'arsenic.....	29
Figure 2. Dessin d'Ydel pour l'Almanach 2010 du Garde-mots.....	30
Figure 3. Etiquette d'un flacon de liqueur de Fowler	31
Figure 4. Schéma du cycle global de l'arsenic entre les différents compartiment environnementaux ^{14,15,16,17,18}	32
Figure 5. Diagramme potentiel-pH de l'arsenic dans l'eau à 25°C et une pression de 1 bar ²¹	35
Figure 6. Diagramme de distribution de l'arséniate et de l'arsénite en fonction du pH ²¹	35
Figure 7. Lumbricus rubellus provenant d'un site non contaminé à droite de couleur violet-rougeâtre et de la mine de Devon Great Consols à gauche présentant une couleur jaune ⁵²	39
Figure 8. Structure du complexe formé entre l'arsenic (III) et deux PC ₂ ⁶⁴	40
Figure 9. Concentrations d'arsenic inorganique retrouvées dans notre alimentation ⁶⁹	41
Figure 10. Structure du dimercaprol et de l'acide R-α-lipoïque.....	42
Figure 11. Géométrie proposée du site allostérique de ArsR avec As(III) lié à Cys ¹⁵ , Cys ¹⁶ et Cys ⁵⁵ d'après les angles et les distances obtenues en cristallographie aux rayons X ⁸⁴	43
Figure 12. Kératose arsénicale.....	45
Figure 13. Effets de l'arsénicose sur l'organisme ⁹⁸	46
Figure 14. Répartition mondiale de sources référencées contaminées à l'arsenic (>50 ppb) dans les aquifères et les eaux souterraines ¹⁰⁷	47
Figure 15. Production d'arsine (AsH ₃) par le borohydrure de sodium (NaBH ₄) en milieu acide	48
Figure 16. Méthode de Marsh pour la production d'arsine (AsH ₃) par le zinc (Zn) en milieu acide	48
Figure 17. Interférence polyatomique du polyatome ⁴⁰ Ar ³⁵ Cl sur la détection de ⁷⁵ As par un spectromètre de masse quadripolaire	50
Figure 18. Schéma de principe de la voltammétrie	52
Figure 19. Nano-Band™ Explorer II	53
Figure 20. Abaque de couleur des bandelettes EZ de Hach ¹³⁰	54
Figure 21. Pourcentages d'arsenic retrouvées par des kits de terrain dans des eaux de laboratoire ¹³¹	54
Figure 22. Schéma de l'appareillage utilisé par James Marsh	56
Figure 23. Schéma de l'appareillage utilisé pour le dosage de l'arsenic par le diéthylthiocarbamate d'argent	56
Figure 24. Schéma de l'appareillage utilisé pour la méthode de Gutzeit ¹³⁵	57
Figure 25. Exemples de fluorophores et de chromophores destinés à doser l'arsenic inorganique	58
Figure 26. Mécanismes proposés de liaison entre l'arséniate de sodium et le NAPSAL ou l'APSAL.....	59
Figure 27. Mécanisme proposé de la réaction d'AsI ₃ sur AF1.....	59
Figure 28. Forme énol de la curcumine.....	61
Figure 29. Gamme de couleur obtenue par BF ₂ -curcumine greffée sur résine hydrophobe en solutions contenant des concentrations en arsenic (III) allant de 0 à 375 ppm ¹⁴⁵	61
Figure 30. Structure de Keggin du complexe phosphomolybdique. Le phosphate est au centre et les polyèdres bleus illustrent l'environnement de chaque molécule de molybdate	62
Figure 31 . Mécanisme proposé concernant la réaction d'isomérisation de la forme α en β ¹⁵⁴	63
Figure 32. Spectres d'absorption du complexe phosphomolybdique en fonction de la concentration en HCl. (A) 0,02 M ; (B) 0,2 M ; (C) 0,5 M ; (D) 1 M ; (E) 1,46 M ; (F) 2 M. Avec comme conditions [PO ₄ ³⁻]= 3 mM et [Mo(VI)]= 9 mM ¹⁵⁵	63
Figure 33. Variation de couleur par rétention de complexes arsénomolybdiques par une membrane filtrante d'acétate de cellulose (0,8 μm) à différentes concentrations en arsenic ¹⁶⁹	66
Figure 34. Colorants utilisés avec les complexes phospho- ou arsénomolybdiques	66
Figure 35. Schéma réactionnel et gamme de couleur en plaque micropuits polystyrène pour la détection de l'arsenic (V) par un complexe éthyl violet/arsénomolybdate en milieu acide ¹⁶⁵	67

Figure 36. Gamme de couleur en plaque micropuits polystyrène pour la détection de l'arsenic (V) par un complexe éthyl violet/arsénomolybdate/ ICl_4 en milieu acide ¹⁷³	67
Figure 37. Effets de la taille des nanoparticules sur la résonance de plasmon ¹⁷⁶	68
Figure 38. Schéma de principe du changement de couleur des nanoparticules d'or modifiées en présence d'arsenic	69
Figure 39. Modification de nanoparticules d'or avec du dithiotréitol (DTT) et mécanisme de dosage de l'arsenic (III)	70
Figure 40. Schéma de synthèse des nanoparticules d'or modifiées à l'acide lipoïque et à la thioguanine ¹⁸³ ...	70
Figure 41. Mécanisme schématisé du dosage de l'arsenic(III) par des nanoparticules d'or et de la phytochélatine 3 ¹⁸⁶	71
Figure 42. Dosage de l'arsenic en milieu acide sulfurique (0,1 M) sur une gamme 0 - 2,5 ppm à t= 5 min, 10 min et 30 min.....	77
Figure 43. Structures chimiques du vert de malachite et de l'éthyl violet.....	79
Figure 44. Etude spectrophotométrique du comportement entre le vert de malachite seul et l'arsenic (V) en milieu acide sans avoir former de complexes arsénomolybdiques à t= 0, 5 min, 10 min et 30 min	80
Figure 45. Forme carbinol incolore du vert de malachite ¹⁸⁸	80
Figure 46. Dosage de l'arsenic (V) par le molybdate d'ammonium et l'éthyl violet à pH neutre, à pH 2 et à pH 1	81
Figure 47. Dosage de l'arsenic (V) de 0 à 1 ppm à t= 30 s, 5 min, 10 min et 30 min par ajout successif de molybdate d'ammonium, d'acide chlorhydrique puis d'éthyl violet	81
Figure 48. Dosage de l'arsenic (V) de 0 à 1 ppm à t= 10 min et 30 min par ajout de molybdate d'ammonium, d'acide chlorhydrique et d'éthyl violet en absence ou en présence de 80 μM de tartrate d'antimoine et de potassium (PAT)	83
Figure 49. Dosage de l'arsenic (V) de 0 à 500 ppb à t= 5 min et 10 min après l'ajout d'éthyl violet ou de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate d'ammonium de 5 min)	84
Figure 50. Suivi en spectrophotométrie UV-Vis d'une gamme en arsenic (V) de 0 à 100 ppb à t= 0, 5 min, 10 min et 30 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate d'ammonium de 5 min)	85
Figure 51. Analyse de la régression linéaire des valeurs d'absorbance à 618 nm sur une gamme en arsenic (V) de 0 à 100 ppb à t= 5 min et 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate de 5 min)	85
Figure 52. Analyse de la régression linéaire des valeurs d'absorbance à 618 nm sur une gamme en arsenic (V) de 0 à 100 ppb à t= 5 min et 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate de 5 min)	86
Figure 53. Schéma du montage utilisé par l'équipe d'Okazaki. a) seringue en polypropylène ; b) cartouche en polypropylène ; c) fritté ; d) CaCO_3 en poudre ; e) adaptateur en polypropylène ; f) contenant de la membrane filtrante ; g) membrane filtrante ; h) fritté supportant la membrane ¹⁶⁹	87
Figure 54. Matériel utilisé pour la filtration des particules de complexes arsénomolybdiques/vert de malachite et schéma du montage	88
Figure 55. Schéma du protocole de dosage de l'arsenic (V) par rétention des particules colorées formées lors du dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite, au travers d'une membrane filtrante de porosité 8 μm	89
Figure 56. Analyses en spectrophotométrie UV-Vis. des filtrats d'échantillons passés au travers d'une membrane filtrante de papier Whatman Grade 2 après le protocole au molybdate d'ammonium et au vert de malachite en comparaison d'échantillons non filtrés ayant suivi le même protocole.....	90
Figure 57. Coloration de papier filtre Whatman Grade 2 (8 μm) par rétention de particules formées entre les complexes arsénomolybdiques et le vert de malachite.....	90

Figure 58. Principe d'utilisation des bandelettes tests colorimétriques Uranalyze® commercialisées par Novassay destinées au dosage de l'uranium en solution acide	91
Figure 59. Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au bleu de molybdène à t= 5 min après l'ajout de l'acide ascorbique	92
Figure 60. Photo présentant les bandelettes à l'éthyl violet en haut et les bandelettes au vert de malachite en bas	93
Figure 61. (a) Schéma du protocole de dosage par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à un colorant triarylméthane. (b) Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et au vert de malachite après 60 secondes de contact	94
Figure 62. Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact	94
Figure 63. Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 10 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact	95
Figure 64. Etude d'interférence de divers cations et anions à 100 ppb lors du dosage en solution par le protocole optimisé à t= 10 min (temps de contact entre les ions et le molybdate de 5 min avant l'ajout du vert de malachite).....	96
Figure 65. Etude d'interférence d'échantillons acide de 5 mL contenant divers cations et anions sur les bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact.....	96
Figure 66. Etude de l'interférence du phosphate par spectrophotométrie UV-Vis. sur le dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite par rapport à l'arsenic (V) à t= 0 et à t= 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques/phosphomolybdiques (temps de contact entre As(V)/phosphate et le molybdate d'ammonium de 5 min).....	97
Figure 67. Dosage du phosphate en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact	98
Figure 68. Etude de l'interférence du silicate par spectrophotométrie UV-Vis. sur le dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite par rapport à l'arsenic (V) à t= 0 et à t= 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques/silicomolybdiques (temps de contact entre As(V)/silicate et le molybdate d'ammonium de 5 min).....	98
Figure 69. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche au carbonate de calcium. Etude portée sur des échantillons contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) (10 ml d'échantillon passés à travers 500 mg CaCO ₃ à une vitesse de 10 mL/min) t= 10 min	100
Figure 70. Effet du pH sur l'adsorption par une colonne de résine échangeuse d'anions faiblement basique • 10 ppb As(V) ; ○ 10 ppb As(III) ; Δ 50 ppm phosphate (échantillon de 50 mL passé à 10 mL/min sur 8 g de résine) ¹⁷³	101
Figure 71. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche de résine faiblement basique Amberlite IRA-67. Etude portée sur des échantillons contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) (10 ml d'échantillon passés à travers 1 g de résine à une vitesse de 10 mL/min) t= 10 min	102
Figure 72. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche de résine fortement basique Amberlite IRA-900. Etude portée sur des échantillons contenant 500 pb d'arsenic (III) ou 1 ppm de phosphate (10 ml d'échantillon passés à travers 1 g de résine à une vitesse de 10 mL/min) t= 5 min	102
Figure 73. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche d'hydroxyde de lanthane. Etude portée sur des échantillons contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) (10 ml d'échantillon passés au travers de 500 mg d'hydroxyde de lanthane à une vitesse de 10 mL/min) t= 10 min	104
Figure 74. Structure partielle des unités arabinoglucuronoxylane	107
Figure 75. Mécanisme schématique du dosage de l'arsenic(III) par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane et de la cystéine	108
Figure 76. Structure du complexe As(III)-Cys ₃	108

Figure 77. Molécule mime de PC ₃ , constituée d'une L-cystéine et d'un acide R- α -lipoïque.....	109
Figure 78. Formule de la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate	110
Figure 79. Molécule mime de PC ₃ protégée	110
Figure 80. Mécanisme réactionnel du couplage peptidique par le DCC	111
Figure 81. Réaction de l'hydroxybenzotriazole sur l'O-acylurée	111
Figure 82. Mécanisme réactionnel du couplage peptidique par le CDI	112
Figure 83. Suivi RMN de l'activation sans solvant de l'acide phénylacétique par le CDI ²²⁷	113
Figure 84. Mécanisme réactionnel de l'activation de l'acide R- α -lipoïque	113
Figure 85. Mécanisme réactionnel du double couplage peptidique entre l'acide R- α -lipoïque et la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate	114
Figure 86. Spectre RMN ¹ H, ¹³ C et HMQC du mime de PC ₃ protégé à 500 MHz dans CDCl ₃	115
Figure 87. Spectre de masse ESI haute résolution (HRAM) du mime de PC ₃	116
Figure 88. Spectre RMN ¹ H du xylane de hêtre natif dans D ₂ O	119
Figure 89. Analyse spectrophotométrique des solutions de nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) et des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl)	120
Figure 90. Images en microscopie électronique à transmission (MET) de nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) et de nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl)	121
Figure 91. Schéma illustrant le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta	122
Figure 92. Analyse du diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or par diffusion dynamique de la lumière a) Nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) b) Nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl).....	123
Figure 93. Potentiels zêta des nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) et des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl).....	123
Figure 94. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de L-cystéine)	125
Figure 95. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de L-cystéine).....	125
Figure 96. Suivi cinétique à l'œil nu du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate à t= 0 et à t= 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de cystéine) 126	126
Figure 97. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de cystéine)	127
Figure 98. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de L-cystéine).....	127
Figure 99. Suivi cinétique à l'œil nu du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate à t= 0 et à t= 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de cystéine) 128	128
Figure 100. Schéma réactionnel de la réduction d'un pont disulfure par le TCEP.....	128
Figure 101. Courbe théorique et courbe attendue en spectrophotométrie UV-visible (650 nm) lors du dosage de l'arsenic (III) par le mime de PC ₃ et par des nanoparticules d'or.....	129
Figure 102. Analyse en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate à t= 10 min (échantillon de 1,5 mL contenant 33,33 μ M de mime de PC ₃)	130
Figure 103. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC ₃)	130

Figure 104. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC ₃)	131
Figure 105. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC ₃)	132
Figure 106. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC ₃)	133
Figure 107. Suivi cinétique à l'œil nu du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane à t= 0 et à t= 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC ₃)	133
Figure 108. Protocole de dosage de l'arsenic total par le molybdate d'ammonium, le vert de malachite et une membrane filtrante	137
Figure 109. Structures chimiques des colorants destinés au dosage de l'arsenic (III)	138



Table des tableaux

Tableau 1. Principaux composés arséniés dans l'environnement ²⁰	34
Tableau 2. DL ₅₀ de différentes formes de l'arsenic ⁸⁷	44
Tableau 3. Tableau récapitulatif des caractéristiques des techniques de détection par spectrométrie d'absorption atomique (AAS), par spectrométrie de fluorescence atomique (AFS) et par spectrométrie de masse utilisant plasma à couplage inductif (ICP-MS).....	51
Tableau 4. Etude de quelques interférents concernant le dosage au bleu de molybdène en milieu acide sulfurique 0,1 M à t= 5 min et 10 min	78
Tableau 5. Rendements obtenus lors du double couplage peptidique entre l'acide R- α -lipoïque et la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate en faisant varier le temps et la température (réaction réalisée en pilulier en verre placé en bain-marie après activation de 5 min de l'acide R- α -lipoïque par 1,2 eq. de CDI).....	117
Tableau 6. Réactifs et solvants utilisés	143
Tableau 7. Protocole du dosage de l'arsenic et de l'étude d'interférences par la méthode au bleu de molybdène en milieu acide sulfurique 0,1 M entre 0 et 2,5 ppm	148
Tableau 8. Protocole pour l'étude spectrophotométrique du comportement entre le vert de malachite seul et l'arsenic (V) en milieu acide sans avoir former de complexes arsénomolybdiques.....	148
Tableau 9. Protocoles pour le dosage de l'arsenic (V) par le molybdate d'ammonium et l'éthyl violet à pH neutre, à pH 2 et à pH 1	149
Tableau 10. Protocole de Morita pour le dosage de l'arsenic (V)	149
Tableau 11. Protocole du dosage de l'arsenic (V) par la méthode au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet avec utilisation de sels d'antimoine et de potassium	150
Tableau 12. Protocole d'optimisation du dosage de l'arsenic (V) par réaction préliminaire entre l'arsenic et le molybdate d'ammonium avant l'ajout du colorant.....	150
Tableau 13. Protocole de dosage de l'arsenic (V) par filtration de la coloration obtenue lors de la méthode optimisée en solution	151
Tableau 14. Protocole de l'élimination de l'interférence phosphate par une cartouche au carbonate de calcium lors du dosage en solution par la méthode optimisée	153
Tableau 15. Protocole de dosage de l'arsenic (III) par utilisation de 100 μ M de L-cystéine et de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane	154
Tableau 16. Protocole de dosage de l'arsenic (III) par utilisation de 16,67 μ M de mime de PC ₃ et de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane	155
Tableau 17. Protocole de dosage de l'arsenic (III) par utilisation de 30 μ M de mime de PC ₃ et de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane	155

Liste des abréviations

δ : déplacement chimique

λ : longueur d'onde

AF1 : ArsénoFluor1

AsB : arsénobétaine

APSAL : (4E)-4-(2-hydroxybenzylideneamino)-1,2-dihydro-2,3-diméthyl-1-phénylpyrazol-5-one

ATP : adénosine 5'-triphosphate

BAL : British Anti Lewisite

BPBT : 2,4-Dihydroxy benzophenone-2-amino thiophenol

CCA : arséniate de cuivre et de chrome

CCM : chromatographie sur couche mince

CDI : 1,1'-Carbonyldiimidazole

CIFRE : Conventions Industrielles de Formation par la REcherche

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

CNESST : Commission des Normes, de l'Équité, de la Santé et de la Sécurité du Travail

CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

Cys : cystéine

d : doublet

DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DCU : 1,3-dicyclohexylurée

DL₅₀ : dose létale médiane

DLS : diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)

DMA : acide diméthylarsinique

DMSO : diméthylsulfoxyde

dq : double quadruplet

DRO : dérivé réactif de l'oxygène

dt : double triplet

DTT : dithiothréitol

eq. : équivalent

ESI : ionisation par électronébuliseur (Electrospray Ionization)

EV : éthyl violet

FAAS : spectrométrie d'absorption atomique de flamme

FAFS : spectrométrie de fluorescence atomique de flamme



Gly : glycine
GSH : glutathion
HOAt : 1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt : 1-hydroxybenzotriazole
ICP-MS : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
m : multiplet
M : masse molaire
MET : microscope électronique à transmission
min : minutes
MMA : acide monométhylarsonique
m/z : rapport masse sur charge
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NAPSAL : naphthalene–salisaldehyde
NHS : N-hydroxysuccinimide
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAT : potassium antimonyl tartrate
PC_n : phytochélatine
PDCA : acide 2,4-pyridinedicarboxylique
ppb : partie par billion
ppm : partie par million
ppt : partie par trillion
PVC : poly(chlorure de vinyle)
R_f : rapport frontal
RMN : résonance magnétique nucléaire
rpm : tours par minutes (revolutions per minute)
s : singulet
sext : sextuplet
t : triplet
TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine
TETRA : ion tétraméthylarsonium
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TMA : triméthylarsine
TMAO : oxyde de triméthylarsine



UNICEF : United Nations Children's Fund

Xyl : xylane



Introduction

La contamination de l'environnement par l'arsenic est une problématique émergente et préoccupante à l'échelle mondiale. L'arsenic est un métalloïde retrouvé à l'état de trace dans l'environnement, mais il se retrouve anormalement concentré dans certains de ses compartiments, principalement du fait de l'activité humaine. La mobilisation de l'arsenic par des phénomènes naturels, tels que le lessivage des sols, entraîne une contamination des ressources en eaux et provoque son entrée dans la chaîne trophique et la contamination de l'Homme. La présence d'arsenic dans les ressources en eau est devenue un problème environnemental et éco-toxicologique majeur pour un certain nombre de pays. La population du Bangladesh présente les niveaux d'exposition actuels les plus élevés. En effet, les eaux potables approvisionnant plusieurs centaines de millions de personnes présentent des taux d'arsenic bien supérieurs à celui préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé de 10 ppb soit 10 µg/L. De nombreuses régions sont concernées dans le monde, telles que le Bangladesh, l'Argentine, le Vietnam, la Chine... En France plusieurs régions sont touchées comme le Massif Central, les Vosges, les Alpes et l'Auvergne, par la présence d'arsenic à des taux élevés dans le sous-sol. Certaines sources de la région Limousin (Commune de Vaulry en Haute-Vienne et de Saint-Vaury en Creuse) présentent également des concentrations en arsenic élevées. La directive n° 98/83/CE de l'Union Européenne du 3/11/1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine a fixé en droit européen à 10 ppb la valeur en arsenic pour l'ensemble des eaux potables, à l'exception des eaux minérales naturelles et des eaux médicinales. Le décret n° 2001/1220 du 20/12/2001 a repris la même valeur de 10 ppb en droit français. Il stipule également que la concentration en arsenic d'une eau brute potabilisable (eau souterraine ou de surface pouvant devenir une eau potable) doit être inférieure à 100 ppb.

L'arsenic et ses composés organiques ou inorganiques sont très toxiques pour l'homme et l'environnement. Sa toxicité est liée à sa biodisponibilité et à sa bioaccumulation qui dépend notamment de sa spéciation. En effet l'exposition à l'arsenic par inhalation ou ingestion d'eau contaminée est à l'origine de cancers du poumon, de la peau et de la vessie. L'ingestion d'eau ou d'aliments comme les poissons, les crustacés ou encore le riz constitue la principale voie d'exposition à l'arsenic pour la population

Au vu des risques environnementaux et humains que l'arsenic peut engendrer, l'importance de détecter, suivre et quantifier l'arsenic inorganique dans l'environnement n'est plus à démontrer. La détection et la quantification de l'arsenic dans les eaux de surface, dans les eaux souterraines ou dans les sols apparaissent comme les principaux objectifs de son suivi

dans l'environnement. La clé pour y parvenir est de trouver des méthodes analytiques adaptées. Actuellement, la plupart des analyses dévolues à l'arsenic se font sur des machines en laboratoire. Cet équipement est cher, volumineux et il est généralement situé loin des lieux de collecte. Cela entraîne un délai allant de plusieurs heures à plusieurs jours avant de connaître la concentration en arsenic d'un échantillon. Ce délai pose un réel problème sanitaire car il peut causer des intoxications arsenicales sur des populations en attente des résultats d'analyse de leurs puits. Des outils de terrain efficaces (mesure fiable, rapide et peu coûteuse) pour la détection de la présence d'arsenic dans l'eau et si possible jusqu'à des limites de détection en accord avec les besoins des usagers (normes eaux potables, normes rejet eaux usées) doivent être mis à disposition afin de pouvoir établir un diagnostic rapide de la qualité des eaux. Pour l'heure, il existe deux techniques commercialisées pouvant être utilisées sur le terrain. La première, onéreuse, est basée sur la voltammétrie (appareillage à 7000 €) et nécessite un personnel qualifié pour son utilisation. La seconde à environ 2 €/analyse se présente sous le format de bandelette. Elle permet la mesure de teneurs en arsenic avoisinant les 10 ppb, mais nécessite la génération d'arsine (forme la plus toxique), l'utilisation de bromure de mercure et donne jusqu'à 33% de faux positifs.

C'est pourquoi l'entreprise Novassay entend développer, grâce à son savoir-faire, de nouveaux outils de terrain spécialement dédiés à la détection de l'arsenic inorganique pour répondre à une demande analytique croissante. L'objet du travail de thèse présenté dans ce document, consiste au développement d'une méthode de dosage colorimétrique pour une application à l'arsenic inorganique contenu dans des échantillons liquides.

Le manuscrit présentera tout d'abord dans un premier chapitre bibliographique, une approche historique de la relation entre l'homme et l'arsenic. Ensuite, la spéciation de l'arsenic selon les conditions acido-basiques et oxydo-réductrices du milieu sera abordée. Cela permettra ainsi par la suite de comprendre sa mobilité, de même que sa répartition dans les différents compartiments environnementaux. La toxicité de l'arsenic selon ses différentes espèces vis-à-vis de l'homme sera ensuite décrite, puis une rapide présentation de la répartition mondiale permettra de mettre en lumière l'enjeu sanitaire à l'échelle planétaire. Les actuelles techniques commercialisées de dosage de l'arsenic, qu'il s'agisse des méthodes de laboratoires ou des méthodes nomades pouvant être utilisées directement sur le terrain, seront présentées avec leurs divers avantages et inconvénients. Cela amènera à décrire les différentes méthodes colorimétriques de dosage de l'arsenic présentement existantes dans la littérature, pouvant être candidates à l'élaboration d'un nouveau kit de terrain. Une présentation de l'entreprise Novassay introduira ainsi le souhait de cette dernière de développer une nouvelle méthode de



terrain de dosage de l'arsenic. Dans cette partie, seront présentés les enjeux et les objectifs de la thèse avant d'aborder le chapitre des résultats.

Ainsi, dans un deuxième chapitre, nous présenterons dans un premier temps l'élaboration d'un nouveau protocole de dosage colorimétrique de l'arsenic basé sur la méthode dite au bleu de molybdène. Ce nouveau protocole est issu d'une optimisation des protocoles déjà existants et de l'utilisation d'une membrane filtrante permettant une lecture colorimétrique sur support solide. Dans une deuxième partie, nous détaillerons le développement d'une méthode de dosage inédite de l'arsenic par l'intermédiaire de nanoparticules d'or et nous en discuterons les résultats. Dans cette partie, nous présenterons entre autres choses la synthèse d'une molécule dont le mode d'action est bio-inspiré, analogue à celui d'un complexant naturel de l'arsenic, connue pour avoir une forte affinité avec ce dernier. Les tests de dosage de l'arsenic avec cette molécule seront réalisés sur deux types de nanoparticules d'or, les premières stabilisées par le citrate trisodique, les secondes stabilisées par un xylane, hémicellulose issue du bois.





BIBLIOGRAPHIE





I. L'arsenic

A. L'arsenic et l'homme, une histoire antique

Le dictionnaire *Le Littré* donne la définition suivante concernant l'arsenic :

« Métal d'un gris brillant qui, en se volatilissant au feu, répand une forte odeur d'ail, très friable, volatil à 180°C. Il n'est pas vénéneux tant qu'il reste à l'état métallique, mais les composés sont de violents poisons, à l'exception des alliages. Arsenic ou arsenic blanc, nom vulgaire de l'acide arsénieux, qui est un violent poison. »

Il a pour synonyme « poison » et pour antonyme « remède ». L'arsenic est donc par définition considéré comme un poison violent, mais tel n'a pas toujours été le cas.

Il aurait été isolé pour la première fois sous forme élémentaire en 1250 par l'alchimiste Albert Magnus qui l'aurait préparé en faisant chauffer de la suie avec de l'orpiment. (Figure 1)

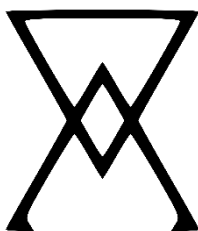


Figure 1. Symbole alchimique de l'arsenic

Le mot « arsenic » vient du grec ancien *arsenikon* qui signifie vaillant, audacieux, puissant et que l'on traduit plus généralement par « qui dompte le mâle » en raison de ses propriétés puissantes. Les grecs de l'antiquité avaient identifié deux minéraux arséniés, l'un rouge appelé *sandarach* et connu aujourd'hui sous le nom de réalgar, l'autre jaune appelé *arsenikon* connu aujourd'hui sous le nom d'orpiment. Les grecs utilisaient ces minéraux sous forme de pâte pour soigner les ulcères cutanés.¹ Au XI^{ème} siècle, les Arabes ont identifié un troisième type d'arsenic, il s'agissait de l'arsenic blanc correspondant au trioxyde d'arsenic. C'est d'ailleurs de cet arsenic blanc dont on parle lorsqu'on utilise le mot « arsenic ». Sous la dynastie Song, les Chinois utilisaient le réalgar pour soigner les problèmes de peau comme les furoncles ou les abcès. Il était dit que les serpents avaient peur du réalgar et qu'il permettait de repousser les bêtes dangereuses. C'est ainsi que le réalgar était souvent porté en amulette car on lui prêtait le pouvoir d'éloigner les fantômes.²

C'est avec cette même croyance que les alchimistes de Moravie brûlaient du réalgar dans les maisons afin d'exorciser les démons. Ces interventions étaient très onéreuses pour les habitants. Ils se sont vite rendu compte que les fumées toxiques d'arsenic avaient une forte odeur aillée et ont ainsi remplacé le réalgar par de l'ail. C'est en associant cette superstition

au mythe des vampires sévissant à l'époque, que serait née la légende que l'ail aurait le pouvoir de les repousser.^{3,4} (Figure 2)



Figure 2. Dessin d'Ydel pour l'Almanach 2010 du Garde-mots

En Inde dans la région du Punjab, l'arsenic blanc était utilisé comme aphrodisiaque.⁵ Il est d'ailleurs toujours ancré dans l'esprit, qu'il possède certains pouvoirs magiques. En effet, après s'être rendu compte que des patients présentaient des cas d'intoxication à l'arsenic, des médecins ont découvert qu'ils prenaient des remèdes délivrés par des « hakims » (équivalent indien de l'herboriste) qui contenaient du trioxyde d'arsenic, du sulfure de mercure et de la strychnine.⁶

Plus proche de nous, en Europe centrale et plus précisément en Styrie dans les Alpes autrichiennes, aux alentours du XVII^{ème} siècle, les habitants étaient connus pour être des « mangeurs d'arsenic ». Cette pratique était sensée leur donner un meilleur teint de peau, de meilleures performances physiques et respiratoires pour crapahuter dans les montagnes, de se prémunir contre les maladies infectieuses, un meilleur appétit et de meilleures performances sexuelles. Au milieu du XVIII^{ème} siècle, les gitans de la région de Vienne avaient l'habitude de donner de l'arsenic à leurs chevaux pour les mêmes raisons. Cela donnait une meilleure condition physique et un poil plus lustré à leurs équidés.⁷

Au cours du XIX^{ème} siècle, la liqueur de Fowler était un tonifiant très populaire à base d'arsenic. C'est une solution hydroalcoolique contenant 1% d'arsénite de potassium. Elle a été créée en 1786 par l'inventeur du même nom et elle était utilisée pour soigner l'épilepsie, l'hystérie, les troubles de la digestion, la syphilis, les ulcères, les cancers et les vers. Les doses étaient établies par le médecin et il devait surveiller chez ses patients, l'apparition de nausées, de sensations de soif et de douleurs abdominales qui étaient les signes que la liqueur avait atteint son niveau toxique.^{8,9} (Figure 3)





Figure 3. Etiquette d'un flacon de liqueur de Fowler

La médecine plus moderne a également utilisé l'arsenic sous forme organique pour certains traitements. La molécule organoarséniée la plus utilisée est l'arsphénamine, connue sous le nom de *Salvarsan* ou de molécule 606. Cette molécule a été synthétisée en 1907 par Paul Ehrlich.^{10,11} L'arsphénamine a été grandement utilisée au début du XX^{ème} siècle comme traitement contre la syphilis notamment pendant les deux Guerres Mondiales en permettant de remettre sur pied les soldats infectés. Cependant, le *Salvarsan* pouvait tuer les hommes de plus faible constitution. Il aura malgré cela été utilisé jusque dans les années 40 où la pénicilline a été commercialisée.¹²



B. Spéciation – Répartition - Toxicité

Avec une concentration aux alentours de 5 ppm (mg/Kg) dans la croûte terrestre, l'arsenic est considéré comme un élément trace et son abondance relative le classe 54^{ème}. Cette abondance est similaire à celle d'autres éléments comme l'uranium, le brome, l'étain, le germanium, le tungstène et le molybdène.¹³ Cependant il peut être trouvé à de bien plus fortes concentrations à cause de phénomènes géologiques ou anthropiques. La distribution de l'arsenic dans les différents compartiments environnementaux dépend de plusieurs facteurs tels que l'activité tectonique, l'activité biologique, l'érosion ... Ces nombreux paramètres font du cycle de l'arsenic, un cycle biogéochimique complexe. (Figure 4)

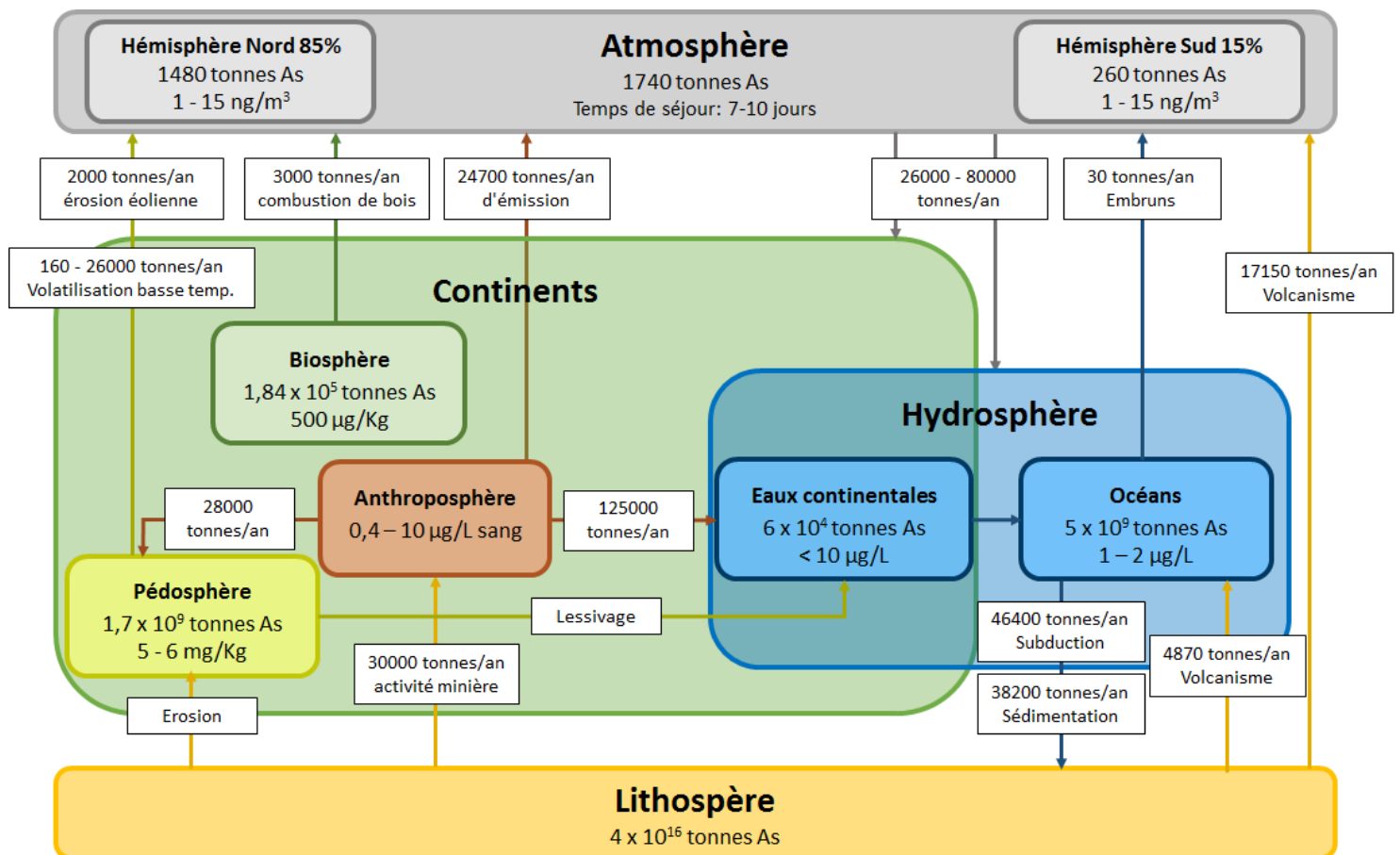


Figure 4. Schéma du cycle global de l'arsenic entre les différents compartiments environnementaux^{14,15,16,17,18}

La concentration en arsenic varie fortement d'un compartiment à un autre. La variation de concentration peut également avoir lieu au sein d'un compartiment selon la localité géographique. Cependant, l'impact de l'arsenic sur l'environnement ne peut seulement être réduit à sa concentration. Du fait de ses transformations chimiques, les transferts entre les compartiments environnementaux seront impactés et sa toxicité sera exaltée ou bien atténuée selon les cas.

1. Spéciation

Selon la classification périodique des éléments, l'arsenic, de numéro atomique 33 et de masse molaire égale à 74,92 g/mol appartient à la quinzième colonne, de même que l'azote et le phosphore, présentant ainsi de fortes analogies physico-chimiques avec eux. L'arsenic possède à la fois des propriétés métalliques et non-métalliques, c'est ce que l'on appelle un métalloïde. C'est un élément monoisotopique, l'arsenic ^{75}As . De par sa structure électronique ($[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^3$) et en raison de trois électrons non appariés sur sa couche externe, l'arsenic présente quatre degrés d'oxydation : -III, 0, +III et +V.¹⁹ Dans les eaux naturelles, il se retrouve sous forme d'oxyanions inorganiques. Les formes organiques de l'arsenic peuvent être produites par l'activité biologique, principalement dans les eaux de surfaces, mais sont rarement en proportions importantes. (Tableau 1)

Nom	Abréviation	Structure chimique	Etat d'oxydation
Arsine	AsH_3		-III
Méthylarsine			-III
Diméthylarsine			-III
Triméthylarsine	TMA		-III
Acide arsénieux / Arsénite	$\text{As}(\text{OH})_3$ / $\text{As}(\text{III})$		+III
Acide arsénique / Arséniate	$\text{AsO}(\text{OH})_3$ / $\text{As}(\text{V})$		+V
Acide monométhylarsonique	MMA(V)		+V
Acide diméthylarsonique	DMA(V)		+V
Oxyde de triméthylarsine	TMAO		+V
Arsénobétaïne	AsB		+V

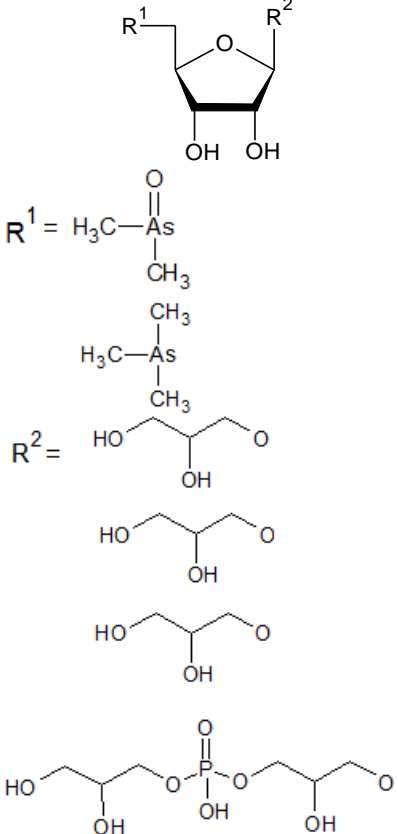
Ion tétraméthylarsonium	TETRA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{As}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	+V
Arsénosucre			+III / +V

Tableau 1. Principaux composés arséniés dans l'environnement²⁰

Dans les écosystèmes aquatiques, l'arsenic se présente sous différentes formes chimiques et comme de nombreux éléments, sa spéciation dépend du pH ainsi que du potentiel d'oxydo-réduction. (Figure 5) En conditions oxydantes, la forme H_2AsO_4^- est prépondérante à pH acide et la forme HAsO_4^{2-} est favorisée en conditions alcalines. En conditions réductrices et à pH inférieur à 9,2 c'est la forme non chargée de l'arsénite H_3AsO_3 qui est majoritaire.



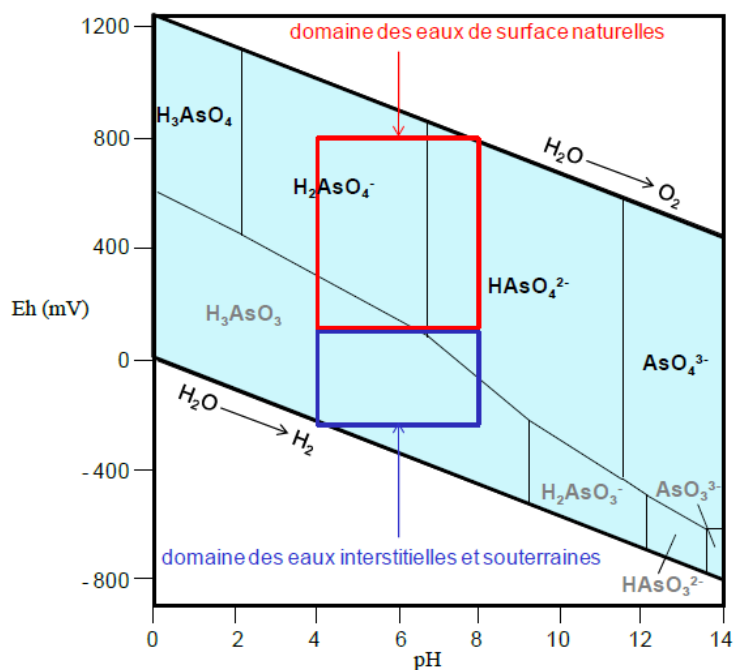


Figure 5. Diagramme potentiel-pH de l'arsenic dans l'eau à 25°C et une pression de 1 bar²¹

Ainsi si l'on se place à pH 6,9 la forme non chargée H_3AsO_3 représente 100% de l'état d'oxydation (+III) de l'arsenic et les formes H_3AsO_4 et $H_2AsO_4^-$ représentent chacune 50% de l'état d'oxydation (+V) de l'arsenic. (Figure 6)

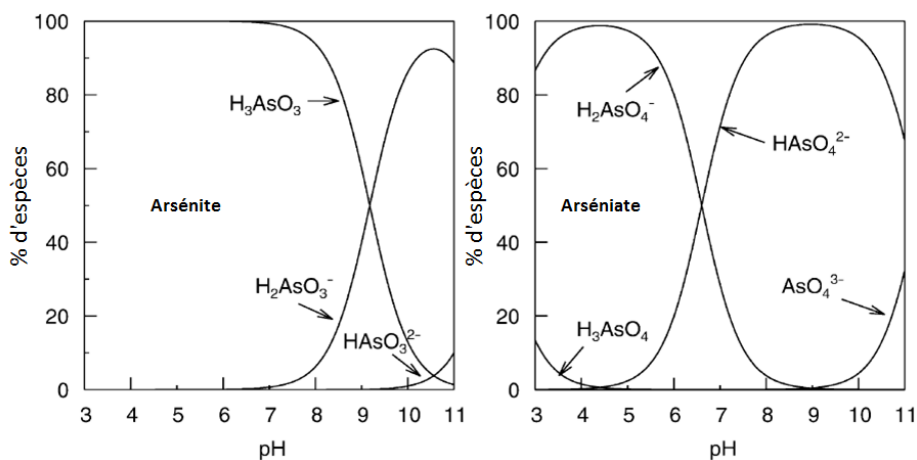


Figure 6. Diagramme de distribution de l'arséniate et de l'arsénite en fonction du pH²¹

Le taux de protonation des oxyanions arsénies est très important car il influe sur sa mobilité dans l'environnement. En effet, le pH des eaux souterraines étant généralement compris entre 6 et 8, l'arsenic (III) sera majoritairement sous la forme mobile H_3AsO_3 non chargé alors que l'arsenic (V) sera sous forme chargée $H_2AsO_4^-$ et $HAsO_4^{2-}$ et pourra être retenu par d'autres particules chargées comme les hydroxydes de fer.²² En conséquence, les concentrations et les transferts entre les différents compartiments environnementaux sont dépendants des conditions physico-chimiques du milieu et donc, de la forme chimique de l'arsenic.

2. Répartition

L'arsenic est un élément ubiquiste présent dans l'atmosphère, les sols, les sédiments, les milieux aquatiques et la biosphère.²³

a) Atmosphère

La teneur en arsenic dans l'atmosphère est de 1740 tonnes à l'échelle planétaire, avec une répartition de 1480 tonnes dans l'hémisphère nord et de 260 tonnes dans l'hémisphère sud. Cette grande différence de répartition s'explique par le fait qu'il y a plus de terres émergées ainsi que plus d'industries dans l'hémisphère nord.

La teneur en arsenic fixé sur des particules organiques en suspension dans l'air est estimée entre 89 et 99% par rapport à l'arsenic gazeux libre sous forme d'arsine ou d'arsine méthylé.²⁴ Ces poussières contiennent de l'arsenic sous forme de sulfides ou d'oxyde et proviennent de la combustion de métaux arséniés. Les particules issues de combustion ont un diamètre moyen de 1 μm avec un temps de séjour dans l'atmosphère estimé entre sept et dix jours.^{16,25} La quantité d'arsenic libérée dans l'atmosphère en une année est estimée entre 28000 et 84000 tonnes par les différentes sources connues que sont les volcans, les feux de forêt, l'érosion des sols par le vent, les aérosols marins ...^{18,26}

L'impact de l'homme sur la teneur en arsenic dans l'atmosphère est difficile à déterminer. Cependant, des estimations proposent un rapport sources naturelles/anthropiques à environ 40/60. Ces 60% de sources anthropiques sont majoritairement dus aux centrales à charbon et à la métallurgie, notamment celle du cuivre.¹⁴ D'autres sources comme l'utilisation d'herbicides, la verrerie, les produits de conservations du bois et l'incinération des déchets participent à la libération totale de 24700 tonnes d'arsenic dans l'atmosphère par an.¹⁴

En France, les dérogations du décret 2004-1227 autorisent l'utilisation de sels d'arséniate de cuivre et de chrome (CCA) pour la conservation du bois si celui-ci n'entre pas en contact avec la population. Cela comprend entre autres les poteaux électriques et de télécom retrouvés au bord des routes, les poteaux de clôture, les traverses de chemin de fer et les charpentes de bâtiments publics, agricoles, administratifs et industriels. La durée de vie du bois traité au CCA est estimée à environ 50 ans. Lorsqu'il arrive en fin de vie, le bois est brûlé. Selon les conditions de combustion, le bois CCA peut relâcher jusqu'à 68% de l'arsenic qu'il contient dans ses fumées.²⁷

D'après des données non exhaustives, les concentrations en arsenic atmosphériques seraient aux alentours de 1 ng/m^3 dans les zones isolées et de 15 ng/m^3 en zones polluées.²⁸ Les concentrations en arsenic dans les eaux de pluies seraient quant à elle de 80 ng/L dans les

zones isolées, de 370 ng/L en zone rurale et de 12,3 µg/L dans les zones polluées, alimentant ainsi les autres compartiments environnementaux.

b) Hydrosphère

Dans les eaux de surface, la teneur en arsenic peut fortement varier selon le lieu de prélèvement et le niveau de pollution. Par exemple, une eau de surface non contaminée par des pollutions naturelles ou humaines, contient généralement des concentrations en arsenic inférieures à 10 µg/L.^{29,30} En comparaison, les lacs environnant l'exploitation d'or dans la région Canadienne du Yellowknife présentent des concentrations en arsenic supérieures à 5000 µg/L.³¹ Dans les eaux souterraines, les teneurs en arsenic sont sensiblement les mêmes bien que certaines eaux puissent atteindre des teneurs avoisinant les 1000 µg/L.³² La présence de l'arsenic dans les eaux souterraines est liée à sa mobilisation dans les sols. Comme cela a été expliqué dans la partie sur la spéciation, les conditions géochimiques du sol traversé par les eaux continentales conditionnent les teneurs en arsenic.³³ Dans les océans, les teneurs en arsenic relevées sont homogènes et restent inférieures à 3 µg/L avec une moyenne estimée entre 1 et 2 µg/L.^{34,35} Bien que les composés inorganiques de l'arsenic soient majoritaires dans les eaux,³⁶ il peut également être rencontré sous forme organique, du fait de l'activité biologique (phytoplancton, bactéries, champignons).²¹ L'arsenic peut ainsi être méthylé par des bactéries méthanogènes qui conduisent à la formation de l'acide monométhylarsonique, de l'acide diméthylarsonique, de l'oxyde de triméthylarsine et de la triméthylarsine.^{29,37} Les composés organiques complexes de l'arsenic comme l'arsénobétaïne ou les arsénosucres excrétés par les organismes aquatiques après leur mort sont rarement détectés à cause des techniques d'analyses, notamment la génération d'hydrures, qui ne sont pas adaptées.³⁸ Ce compartiment est alimenté naturellement par des phénomènes de lessivage, d'érosion et de volcanisme sous-marin³⁹ et alimente principalement le compartiment lithosphérique par sédimentation et subduction.^{17,40}

c) Sols

Les sols sont séparés en deux catégories, la lithosphère qui est composée de la croûte terrestre et d'une partie du manteau supérieur et la pédosphère qui est la couche la plus externe de la croûte terrestre abritant la faune et la flore du sol.

(1) Lithosphère

Dans la croûte terrestre, la masse totale d'arsenic est estimée à 4×10^{16} tonnes faisant de lui le vingtième élément le plus abondant avec une concentration moyenne de 2 mg/Kg.⁴¹ Les

principales formes minérales d'arsenic retrouvées dans la lithosphère sont l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (AsS), la niccolite (NiAs) et la cobaltite (CoAsS).^{28,42,28} La principale source de contamination en arsenic de la lithosphère provient de l'océan par des phénomènes de sédimentation et de subduction. Le volcanisme représente quant à lui la principale source de contamination en arsenic des autres compartiments environnementaux avec un volume de 17150 tonnes par an.^{17,40}

(2) Pédosphère

Selon la nature de la roche source, la concentration en arsenic dans les sols varie entre 5 et 6 mg/Kg.^{43,44,45} La concentration en arsenic inorganique dans les sols est due à sa mobilité et donc à sa spéciation qui est liée aux conditions physico-chimiques (pH et potentiel Redox). Ainsi en conditions oxydantes, la forme inorganique majoritaire est l'arsenic (V) sous forme d'arséniate (AsO_4^{3-}) qui est retenue par sorption ou précipitation sur des argiles minérales, des oxydes/hydroxydes de fer, de manganèse et d'aluminium.^{21,46} Dans les sols en conditions réductrices et acides, les oxydes et les sulfures d'arsenic (III) sont les formes les plus stables. L'arsénopyrite (FeAsS) est la forme la plus couramment rencontrée, notamment dans les mines d'or. L'arsénopyrite est stable en conditions anaérobiques où l'arsenic est sous l'état d'oxydation (III). Lorsqu'elle est soumise à des conditions aérobiques, elle relargue de l'acide sulfurique, de l'acide orthoarsénieux (H_3AsO_3) et de l'acide arsénique (H_3AsO_4).⁴⁷

La forme inorganique n'est pas la seule trouvée dans les sols, en effet l'arsenic peut également se lier à de la matière organique et les plus fortes concentrations en arsenic dans la pédosphère ont été trouvées dans des sols riches en carbone organique.⁴⁸ Cela s'explique par l'activité de certains micro-organismes capables de réduire ou d'oxyder l'arsenic minéral en forme mono-, di- et triméthylée.⁴⁹ Cependant la présence de ces composés est aussi liée en partie à l'agriculture qui utilise des pesticides et des engrais.⁵⁰ L'alimentation de la pédosphère en arsenic se fait naturellement par les pluies, l'érosion et le volcanisme. Mais l'enrichissement des sols en arsenic peut également être d'origine humaine notamment par l'activité minière qui relargue des formes soufrées de l'arsenic dans ses eaux usées ou d'exhaures. Les métallurgies contribuent également à l'introduction d'arsenic dans les sols en rejetant des oxydes d'arsenic. Ces émissions anthropiques génèrent localement des concentrations anormalement élevées et deviendront des sources secondaires pouvant contaminer les autres compartiments pendant des décennies voir des siècles. Dans ces zones, les concentrations moyennes observées de 5-6 mg/Kg peuvent facilement atteindre les 100 mg/Kg. L'enrichissement en arsenic des couches supérieures du sol entraîne un rabougrissement des racines, des problèmes de croissance des plantes et la mort des vers de terre.⁵¹

La pédosphère contamine les autres compartiments par des phénomènes de dégradation couplés à une érosion éolienne et hydrique ainsi que par de la volatilisation basse température induite par l'activité biologique du sol.¹⁵

d) Biosphère

La biosphère, comportant tous les êtres vivants, constitue également un compartiment à l'intérieur duquel l'arsenic va se concentrer tout au long de la chaîne trophique. Certaines espèces ont pour cela développé des résistances face à de fortes concentrations en arsenic. Ainsi, dans une ancienne mine de cuivre en Angleterre à Devon Great Consols, le ver *Lumbricus rubellus* présente un moyen de défense bien particulier. La mine de Devon Great Consols a été au cours du XIX^{ème} siècle la plus grande source d'arsenic jusqu'à sa fermeture en 1903. Aujourd'hui les sols sont fortement contaminés. Ils présentent des teneurs en cuivre d'environ 1645 mg/Kg et des teneurs en arsenic d'environ 9845 mg/Kg, alors que les sols non contaminés aux alentours présentent respectivement des teneurs de 0,1 et 1,2 mg/Kg. Le ver a ainsi développé une grande tolérance à l'arsenic et des spécimens prélevés sur le site minier ont présenté des concentrations de 18 à 37 mg/Kg (masse sèche) alors que d'autres spécimens prélevés sur un site sain présentaient quant à eux des concentrations en arsenic de 1-3 mg/Kg (masse sèche). Ce ver change de couleur en milieu fortement arsénié. Normalement violet rougeâtre, il devient jaune pour les espèces tolérantes.⁵² (Figure 7)



Figure 7. *Lumbricus rubellus* provenant d'un site non contaminé à droite de couleur violet-rougeâtre et de la mine de Devon Great Consols à gauche présentant une couleur jaune⁵²

Cette tolérance à l'arsenic et cette modification de couleur seraient dues à une adaptation du tissu chloragène (tissu intestinal des annélides). L'arsenic réagirait avec les molécules soufrées du tissu chloragène et induirait la synthèse de métallothionéines dans les chloragocytes.⁵³



Un autre ver, d'origine marine, le *Tharyx marioni*, a développé une forte résistance vis-à-vis de l'arsenic et il est également capable de le bioaccumuler. Il peut ainsi accumuler jusqu'à 2739 mg/Kg d'arsenic (masse sèche) qui est concentré dans ses palpes autour de la bouche où il peut atteindre des concentrations de 13048 mg/Kg.^{54,55}

L'algue *Chlorella vulgaris* peut accumuler jusqu'à 20000 mg/Kg d'arsenic lorsqu'elle a grandi dans un milieu contenant 100 mg/L d'arséniate. Elle arrive même à se développer normalement dans un milieu contenant 10000 mg/L d'arséniate.⁵⁶

Il existe également une plante terrestre qui est capable de pousser sur des sols fortement pollués en arsenic, la fougère *Pteris Vittata*. Cette plante est capable d'accumuler de fortes concentrations en arsenic, c'est pourquoi elle est qualifiée d'hyperaccumulatrice. Elle peut accumuler jusqu'à 64 mg/Kg d'arsenic dans ses frondes lorsqu'elle pousse sur des sols faiblement contaminés (0,47 – 7,56 mg/Kg) et jusqu'à 23000 mg/Kg lorsqu'elle pousse sur des sols fortement contaminés (1500 mg/Kg).⁵⁷ La fougère aurait développé cette capacité comme moyen de défense dissuasive contre les insectes herbivores.⁵⁸ Cette capacité particulière de *Pteris Vittata* est due au fait qu'elle peut réduire l'arsenic (V) en arsenic (III) puis le stocker dans ses vacuoles grâce à un polypeptide équivalent de la métallothionéine, la phytochélatine.⁵⁹ Il s'agit d'un polypeptide soufré synthétisé par la phytochélatine synthase à partir du glutathion (γ -Glu-Cys). C'est un polymère de glutathion terminé par un motif glycine dont la formule générale est $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ avec n variant de deux à onze.^{60,61} Le polypeptide majoritaire retrouvé chez *Pteris Vittata* est la phytochélatine 2 (PC₂) composée de deux sous-unités glutathion.^{62,63} L'arsenic (III) se complexe avec 3 fonctions thiols de deux PC₂.⁶⁴ (Figure 8)

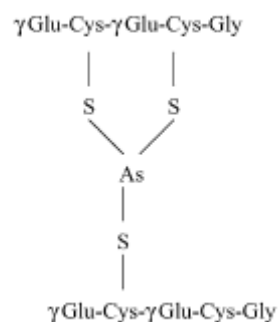


Figure 8. Structure du complexe formé entre l'arsenic (III) et deux PC₂⁶⁴

Le tabac est connu pour être une plante accumulatrice de métaux lourds⁶⁵ et elle est capable de concentrer, entre autres, l'arsenic dans le tissu de ses feuilles.⁶⁶ Ainsi lors des premières analyses faites sur le tabac de cigarette au début du XX^{ème} siècle, les teneurs en arsenic étaient de 150 mg/Kg.⁶⁷ Ces concentrations très importantes peuvent s'expliquer par le fait qu'à l'époque, les insecticides utilisés étaient principalement constitués de sels d'arsenic inorganique. Par la suite, les analyses sont devenues plus fréquentes et plus précises



poussant ainsi l'industrie du tabac à éliminer l'arsenic. Vers la fin des années 90, les concentrations en arsenic dans le tabac étaient de 0,5 - 0,9 mg/Kg.⁶⁸

L'arsenic peut se retrouver en quantité plus ou moins importante dans tout organisme vivant, ce qui sous-entend qu'il y en a dans la nourriture que nous ingérons. Une étude a été menée sur 156 aliments représentatifs de ce que nous consommons.⁶⁹ (Figure 9)

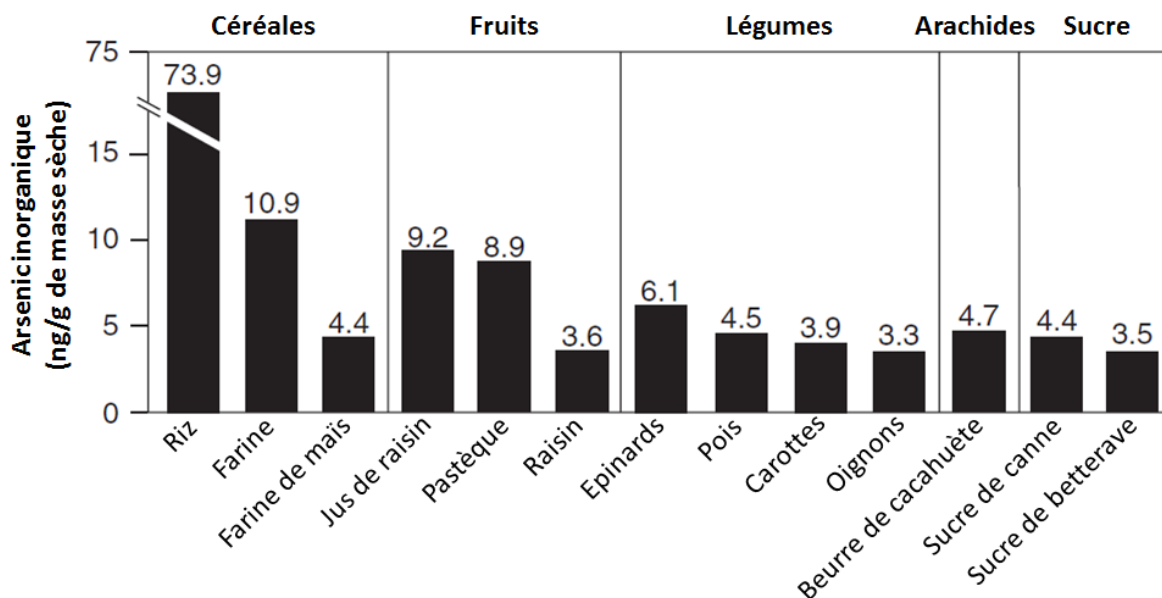


Figure 9. Concentrations d'arsenic inorganique retrouvées dans notre alimentation⁶⁹

C'est pourquoi il est important de connaître son devenir à la cuisson, mais malheureusement très peu d'études ont été réalisées sur ce sujet. Toutefois, nous savons que lors de la cuisson du riz, l'arsenic ne subit aucune modification de spéciation ou autre.⁷⁰ Les plus hautes teneurs en arsenic sont retrouvées dans les poissons et les fruits de mer où elles sont en moyenne entre 5 et 300 µg/Kg et jusqu'à 100 mg/Kg dans certains crustacés.⁷¹ Ces fortes teneurs retrouvées dans les produits de la mer sont à relativiser car 90% de l'arsenic est sous forme d'arsénobétaïne peu toxique. Cependant, l'arsénobétaïne se transforme en ion tétraméthylarsonium à la cuisson. Le taux de conversion est dépendant de la méthode de cuisson.⁷² Cette transformation est très importante à prendre en compte car la dose létale médiane (DL₅₀) de l'arsénobétaïne chez la souris est de 10000 mg/Kg alors qu'elle est quasiment dix fois supérieure pour l'iodure de tétraméthylarsonium avec une DL₅₀ de 900 mg/Kg.⁷³ La dose létale médiane est la quantité de substance qui cause la mort de la moitié de la population exposée lors de l'expérience

3. Toxicité

En dépit de sa réputation dans la culture populaire, l'arsenic n'est pas le plus toxique des éléments. Il est en effet surclassé par d'autres éléments bien plus toxiques comme le mercure. De plus, l'arsenic est un élément essentiel du métabolisme des organismes vivants.⁷⁴ La dose

journalière recommandée pour l'être humain est de 20 µg par jour. Ainsi, des carences en arsenic peuvent entraîner des symptômes au niveau du système nerveux et du système vasculaire.⁷⁵ Cependant, à de plus fortes doses l'arsenic est hautement toxique.

Ce caractère toxique fut utilisé par l'homme lors d'un sombre passage dans l'histoire de l'humanité. C'est ainsi que la Lewisite, un trichlorure d'arsine, fut créé par les Américains en 1918. Mais elle fut surtout utilisée ultérieurement par les Japonais lorsqu'ils envahirent la Mandchourie en 1937.⁷⁶ Les halogénures d'arsine se lient aux fonctions thiols des cystéines des peptides et des protéines, entraînant une rupture des ponts disulfures qui maintiennent leur structure générale inhibant ainsi leur activité.⁷⁷ Afin de contrer la menace de la Lewisite, les Anglais ont utilisé de la British Anti-Lewisite (BAL), qui n'est autre que du dimercaprol. La BAL se lie à l'halogénure d'arsine avant que ce dernier n'ait le temps de réduire les ponts disulfures des protéines et de changer leur conformation.⁷⁸ La BAL utilisée par les Anglais est efficace contre la Lewisite car il mime le comportement de l'acide lipoïque. (Figure 10)

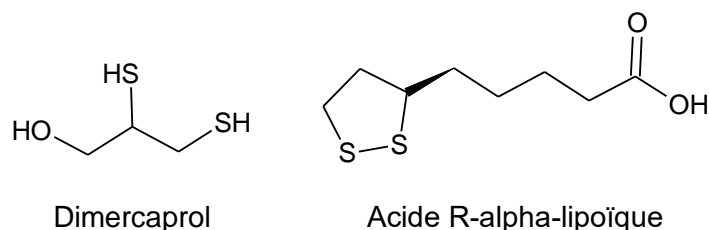


Figure 10. Structure du dimercaprol et de l'acide R- α -lipoïque

En effet, la toxicité de l'arsenic (III) est dû au fait qu'il inhibe l'action de la pyruvate déshydrogénase en se liant à l'acide lipoïque compris dans sa structure. C'est une enzyme permettant d'oxyder le pyruvate en acétyl-CoA qui est un précurseur du cycle de Krebs produisant l'ATP.⁷⁹ Des études ont montré que l'acide monométhylarsénieux (MMA(III)) se lie plus fortement à la pyruvate déshydrogénase que l'arsenic inorganique, ce qui pourrait expliquer la différence de toxicité entre ces deux formes.⁸⁰ (Tableau 2) L'inhibition de la pyruvate déshydrogénase entraîne une diminution de la teneur en nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) dans les mitochondries, impliquant par là même une augmentation du stress oxydatif et la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Des souris soumises à une toxicité chronique à l'arsenic présentent des symptômes de stress oxydatif se traduisant par la diminution de la teneur en glutathion réduit (GSH). L'administration d'acide α -lipoïque permet de réduire la teneur en arsenic en plus d'avoir un caractère antioxydant (diminution de la quantité de DRO).⁸¹ L'acide α -lipoïque est effectivement considéré depuis longtemps comme un agent protecteur contre l'arsenic.⁸² Une étude réalisée sur des rats a révélé que l'arsenic peut s'accumuler dans le cerveau en se liant aux fonctions thiols des protéines. Cependant, si les rats ingèrent de l'acide α -lipoïque en même temps que l'arsenic (III) intégré à leur alimentation, la concentration en arsenic retrouvée dans le cerveau est plus faible que

chez ceux n'ayant pas reçu d'acide lipoïque. De plus, l'ingestion d'acide α -lipoïque permet la décorporation du toxique en augmentant l'excrétion de l'arsenic dans les urines.⁸³

Dans la nature, afin de se protéger du caractère toxique, les organismes vivants se sont adaptés à cette aptitude de l'arsenic (III) à se lier fortement aux cystéines.⁸⁴ Ainsi, la bactérie *Escherichia coli* a développé la protéine de défense ArsR. Cette protéine comporte trois fonctions thiols de trois cystéines spatialement proches, portées sur une hélice α qui se déplie pour complexer l'arsenic (III).⁸⁵ L'arsenic (III) se lie avec trois fonctions thiols pour établir un complexe en forme de pyramide trigonale. (Figure 11)

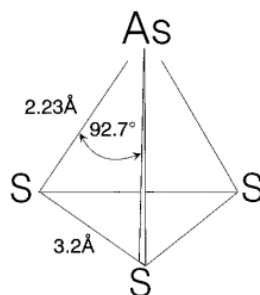


Figure 11. Géométrie proposée du site allostérique de ArsR avec As(III) lié à Cys¹⁵, Cys¹⁶ et Cys⁵⁵ d'après les angles et les distances obtenues en cristallographie aux rayons X.⁸⁴

D'après des analyses en cristallographie aux rayons X, lorsque l'arsenic (III) forme un complexe pyramide trigonale, les liaisons As-S seraient de 2,23 Å et les liaisons S-S seraient de 3,2 Å. Les angles S-As-S seraient quant à eux de 92,7°.⁸⁶

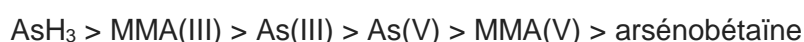
Lorsqu'il est sous forme de trioxyde As_2O_3 , l'arsenic peut se lier à plus de quarante protéines différentes qui contiennent au moins deux cystéines spatialement voisines. Cela entraîne ainsi une déstructuration de ces protéines et une modification/suppression de leur activité.⁸⁷ Cette capacité toxique d'annihiler l'action de protéines soufrées est utilisée en médecine humaine comme traitement contre la leucémie promyélocitaire aiguë. Les leucémies sont des maladies se traduisant par une prolifération de cellules malignes dans la moelle osseuse et le sang. Les personnes atteintes de leucémie promyélocitaire aiguë sont porteuses d'une anomalie spécifique de deux chromosomes menant à la synthèse d'une oncoprotéine appelée PML/RAR α responsable de la prolifération de cellules malignes. Le trioxyde d'arsenic utilisé sous le nom pharmaceutique de Trisenox[®], crée un stress oxydatif qui entraîne la formation de ponts disulfures au sein de l'oncoprotéine PML/RAR α qui finit par s'agglutiner. Le Trisenox[®] se lie également aux fonctions thiols de PML/RAR α facilitant son agglutination.⁸⁸

La toxicité de l'arsenic est donc dépendante de sa spéciation et de sa forme chimique. Des mesures de doses létales médiane (DL₅₀) ont été réalisées sur des souris et des hamsters.⁸⁹ (Tableau 2)

Forme chimique de l'arsenic	Espèce animale	DL ₅₀ (mg As/Kg)
Trioxyde d'arsenic As ₂ O ₃	Souris	26
Trioxyde d'arsenic As ₂ O ₃	Rat	15
Arsénite AsO ₃	Souris	8
Arsénite AsO ₃	Hamster	8
Arséniate AsO ₄	Souris	22
Acide monométhylarsénieux MMA(III)	Hamster	2
Acide monométhylarsonique MMA(V)	Souris	916
Acide diméthylarsinique DMA(V)	Souris	648
Oxyde de triméthylarsine (TMAO)	Souris	5500
Arsénobétaïne	Souris	>4260

Tableau 2. DL₅₀ de différentes formes de l'arsenic⁸⁹

Il apparaît que l'acide monométhylarsonique MMA(V) possède une DL₅₀ somme toute relative alors que sa forme réduite MMA(III) est hautement toxique. La même chose a été observée concernant l'acide diméthylarsinique DMA(V).⁹⁰ La forme la plus toxique de l'arsenic se retrouve lorsqu'il est sous sa forme gazeuse arsine AsH₃ avec une dose létale de 250 mg/m³ après trente minutes d'exposition et l'apparition de symptômes d'intoxication après quelques heures d'exposition à 3-10 mg/m³.⁹¹ Le classement des différentes formes de l'arsenic selon leur toxicité est donc le suivant :



L'arsenic peut pénétrer dans l'organisme par plusieurs voies différentes : par inhalation, par contact avec la peau ou bien par ingestion. Les concentrations de l'arsenic dans l'air sont généralement trop faibles pour entraîner de réelles pathologies et l'arsenic a du mal à passer à travers la barrière dermique (absorption généralement inférieure à 10%).⁹² C'est pourquoi ces deux voies d'entrée sont souvent considérées comme négligeables vis-à-vis de la contamination par ingestion d'aliments ou d'eau. Dans les céréales, la teneur en arsenic inorganique peut être plus ou moins importante et variée selon les régions. La concentration en arsenic dans le riz dépend de sa zone de culture, de la méthode agricole utilisée et de son bagage génétique. Des teneurs en arsenic supérieures à 1,7 mg/Kg ont ainsi été retrouvées dans du riz cultivé au Bangladesh.⁹³ Concernant les eaux de boissons provenant de nappes souterraines, l'arsenic est généralement sous forme inorganique.

Lors d'une intoxication à l'arsenic, celui-ci va se concentrer dans le foie, les reins et les phanères (ongles et cheveux).⁹⁴ L'arsenic (V) est généralement réduit en arsenic (III) par le glutathion, puis il est méthylyé afin de faciliter son excrétion.⁹⁵ Des études ont montré que la capacité du corps humain à méthyler l'arsenic sature à partir d'une dose journalière supérieure à 0,5 mg.⁹⁶

L'ingestion de fortes doses d'arsenic entraîne des symptômes visibles dans les trente à soixante minutes, cela peut être retardé s'il est ingéré avec de la nourriture. Une intoxication aiguë à l'arsenic commence généralement avec un goût d'ail ou un goût métallique dans la bouche, les lèvres qui brûlent et une difficulté à déglutir (dysphagie). Ces symptômes sont suivis de vomissements violents, de douleurs abdominales, de diarrhées, de crampes musculaires, de picotements dans les pieds et dans les mains, de convulsions ...^{43,89,97} Ces symptômes gastro-intestinaux sont le résultat de lésions intestinales causées par la dilatation des vaisseaux splanchniques. Les survivants d'une intoxication aiguë à l'arsenic subissent souvent des dommages de leur système nerveux périphérique.⁹⁸

La majorité des intoxications à l'arsenic se font sur le long terme et sont dites chroniques. Cette intoxication chronique à l'arsenic porte un nom, l'arsénicisme. Lors d'une étude réalisée au Bangladesh, l'arsénicisme a été classifié en trois étapes.⁹⁹

Les symptômes du premier stade se traduisent notamment par des mélanoses, des kératoses, des conjonctivites, des bronchites, des gastro-entérites et du diabète. La mélanose est une hyperpigmentation qui se manifeste par des taches noires plus ou moins étendues au niveau de la peau, des gencives et de la langue. La kératose entraîne une augmentation localisée de l'épaisseur de l'épiderme. Les mélanoses et les kératoses localisées sur les paumes de main et les plantes de pieds sont spécifiques de l'arsénicisme.¹⁰⁰ (Figure 12)



Figure 12. Kératose arsénicale

Le deuxième stade se caractérise par une dépigmentation des zones hyperpigmentées, cela se traduit par des taches blanches sur des zones noires. Une extension de la kératose à d'autres parties du corps et une neuropathie périphérique sont également observées.¹⁰¹

Lors du troisième stade, apparaissent des néphropathies, des hépatopathies, des hémopathies et des troubles cardiovasculaires s'accompagnant parfois de gangrène. L'arsenic est également responsable de l'apparition de cancers.¹⁰²

L'arsenic est classé par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) dans le premier groupe des cancérogènes avérés pour l'homme depuis 1980 et en particulier pour le cancer de la peau. Des études ont montrés qu'il n'y avait aucun doute que l'arsenic pouvait également entraîner des cancers des poumons ou de la vessie.¹⁰³ Lors d'une consommation régulière d'une eau contaminée avec 50 µg/L (ppb) d'arsenic, l'augmentation du risque de

développer un cancer est de 1 à 5 pour mille concernant le cancer de la vessie masculine et de 1 pour 100 pour tout autre type de cancer.¹⁰⁴ (Figure 13)

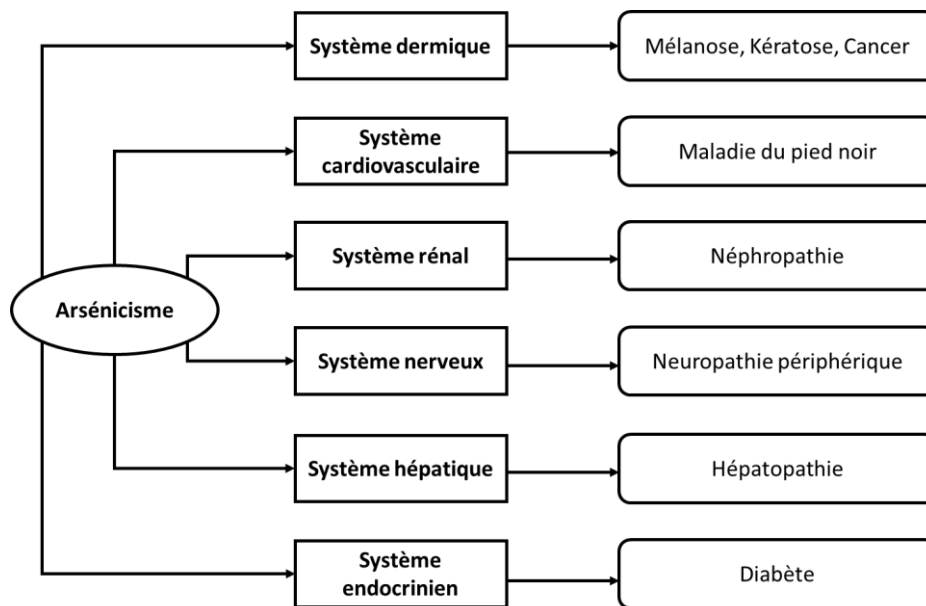


Figure 13. Effets de l'arsénicisme sur l'organisme⁹⁸

Lorsqu'il est associé à une malnutrition, l'arsénicisme peut entraîner une altération progressive de la circulation sanguine périphérique des pieds, se manifestant par une sensation de froid et d'engourdissement, des ulcérations et une coloration noire de la peau due à la gangrène. Cette maladie est appelée la « maladie du pied noire » (blackfoot disease).¹⁰⁵

C. Enjeu à l'échelle mondiale

Ainsi une norme internationale de l'organisation mondiale de la santé (OMS) et la directive 98/83/CE déclarent que l'arsenic ne doit pas dépasser 10 µg/L (10 ppb) dans les eaux de boissons. Cependant dans certains pays à fortes expositions naturelles à l'arsenic (Bangladesh), les normes nationales ont été rehaussées à 50 µg/L (50 ppb).¹⁰⁶ L'omniprésence de l'arsenic concerne 100 millions de personnes dans le monde (Figure 14) qui n'ont pas accès à l'eau potable (concentration supérieure à 10 ppb).





Figure 14. Répartition mondiale de sources référencées contaminées à l'arsenic (>50 ppb) dans les aquifères et les eaux souterraines¹⁰⁷

Sur ces 100 millions, 45 millions sont exposées à des concentrations supérieures à 50 ppb dans le Sud/Sud-Est de l'Asie (Bangladesh, Cambodge, Chine, Inde, Laos, Myanmar, Nepal, Pakistan, Taiwan et Vietnam).¹⁰⁸

Le plus grand danger de l'arsenic est donc l'intoxication chronique du fait de son caractère insidieux avant que les symptômes ne deviennent vraiment visibles. L'arsenic possède la capacité de se mouvoir et de contaminer tous les compartiments environnementaux et notamment les aquifères. Cette contamination peut être d'origine naturelle ou industrielle (agriculture, mines, sidérurgie ...). C'est pourquoi il est indispensable d'avoir des techniques d'analyse capable de suivre les évolutions de concentrations en arsenic dans les aquifères.

D. Techniques d'analyse

A l'heure actuelle, les techniques d'analyse peuvent se diviser en deux catégories. Il y a les techniques d'analyse utilisant de l'appareillage de laboratoire et les techniques d'analyse nomades pouvant être utilisées sur le terrain.

1. Techniques de laboratoire

Il existe de nombreuses méthodes d'analyse de laboratoire, mais les plus utilisées concernant l'arsenic sont la spectrométrie atomique et la spectrométrie de masse.

a) Spectrométrie atomique

La spectroscopie atomique est une technique qui mesure les absorptions ou les émissions de lumière par un atome libre. Elle permet de doser plus d'une soixantaine d'éléments, métaux et non-métaux en solution. Les spectrométries d'absorption atomique et de fluorescence atomique de flamme utilisées seules ne permettent pas de descendre à des seuils de sensibilité pertinents concernant l'arsenic. Le seuil de détection se situe entre 150 et 300 ppb pour la spectroscopie d'absorption atomique de flamme (FAAS) selon le constructeur, et de 800 ppb concernant la technique de spectroscopie de fluorescence atomique de flamme (FAFS).¹⁰⁹ Il est possible d'abaisser les seuils de sensibilité en utilisant la particularité qu'ont certains éléments (Ge, As, Se, Sn, Sb, Te, Pb et Bi) à former des hydrures volatils. L'échantillon doit être préalablement traité avant d'être injecté dans l'appareil, pour être transformé en hydrures par l'action de dihydrogène. La procédure consiste à acidifier un échantillon de quelques dizaines de millilitres, à le placer sous gaz inerte (azote ou argon) puis d'ajouter du borohydrures de sodium (NaBH_4) stabilisé par de l'hydroxyde de sodium ou de potassium.¹¹⁰ (Figure 15)

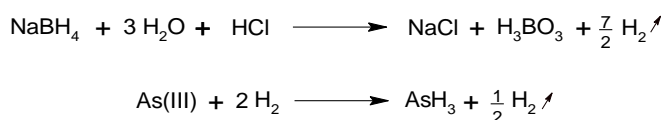


Figure 15. Production d'arsine (AsH_3) par le borohydrures de sodium (NaBH_4) en milieu acide

Lors de la décomposition du borohydrures de sodium, il y a libération de dihydrogène très réactif qui produit de l'arsine en réagissant uniquement sur l'arsenic (III). Le borohydrures de sodium réduit lentement l'arsenic (V) en arsenic (III) et permet à terme de produire lentement de l'arsine. La production d'arsine à partir de l'arsenic (V) est quatre fois plus lente qu'à partir de l'arsenic (III).¹¹¹ Le dosage de l'arsenic total se fait donc par réduction préalable de l'arsenic (V) en arsenic (III) par l'action de l'iodate de potassium (KIO_3) en milieu acide, ou bien par action cumulée de l'iodate de potassium et du chlorure stanneux (SnCl_2) pour réduire également le diméthylarsinate (DMA).¹¹²

Il existe une autre technique afin de produire de l'arsine, il s'agit de celle développée par James Marsh en 1836. Lorsque l'arsenic (III) est en présence de zinc en milieu acide, il produit un dégagement gazeux ayant une odeur d'ail, l'arsine.¹¹³ (Figure 16)

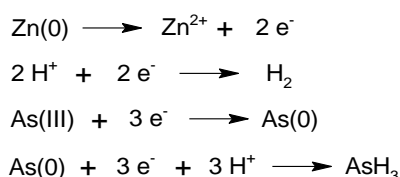


Figure 16. Méthode de Marsh pour la production d'arsine (AsH_3) par le zinc (Zn) en milieu acide



L'arsine produit est soit directement injecté dans l'atomiseur par l'intermédiaire d'un flux d'azote ou d'argon, soit il peut être préalablement concentré en passant dans un tube en verre plongé dans un bain d'azote liquide. Le dosage des hydrures permet de descendre à des seuils de détection beaucoup plus pertinents. Il est de 0,5-5 ppb pour la spectrométrie d'absorption atomique et d'environ 1 ppb pour la spectrométrie de fluorescence atomique.^{114,115} Afin d'augmenter la précision des résultats concernant les différentes formes d'un même élément et de diminuer la probabilité de résultats erronés dus aux interférents présents dans l'échantillon, il est possible d'utiliser une technique séparative comme la chromatographie gazeuse ou liquide.

b) Spectrométrie de masse

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions, à l'état gazeux, à partir de l'échantillon.

Le couplage ICP-MS permet d'analyser simultanément plusieurs éléments, jusqu'à 75 éléments de la classification périodique et a l'avantage d'analyser plusieurs isotopes d'un même élément. Elle permet d'atteindre des limites de détections très faibles, de l'ordre du ng/L (ppt) en cas de matrice simple. En effet, cette matrice peut entraîner des interférences dites non spectrales.

En ICP-MS, il existe deux types d'interférences :

- Les interférences non spectrales sont dues à des effets de matrice et entraîne une diminution ou une augmentation du signal. Elles peuvent être minimisées en adaptant la matrice à l'échantillon ou en ajoutant un étalon interne. Cependant concernant l'arsenic ne possédant qu'un seul isotope ⁷⁵As, As(III) et As(V) ont un comportement différent dans le nébuliseur entraînant des difficultés à résoudre les interférences non spectrales.
- Les interférences spectrales sont dues à la superposition du signal d'un autre isotope ou d'un ion moléculaire sur le signal de la masse analysée ayant un rapport masse/charge trop proche. Elles se divisent en trois catégories :
 - Les interférences isobariques : elles sont le résultat d'isotopes de masse égale mais d'éléments différents et les spectromètres à basse résolution comme le quadripôle ne peuvent pas les différencier.¹¹⁶
 - Les interférences polyatomiques : ce sont les interférences principales de l'ICP-MS, elles sont dues aux gaz utilisés pour la nébulisation ou la formation du plasma, à la matrice de l'échantillon ou bien à l'oxygène/azote de l'air ambiant. Les éléments des différentes sources d'interférents se dissocient et se

recombinent dans le plasma sous forme polyatomique dont la masse résultante interfère avec celle de l'analyte. Par exemple, l'isotope principal de l'argon, ^{40}Ar avec une abondance naturelle de 99,6%, se recombine avec l'isotope ^{35}Cl , ayant une abondance naturelle de 75,77% pour former $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$. Ce polyatome possède un rapport m/z de 75 égale à celle du monoisotope de l'arsenic ^{75}As et les deux pics détectés se superposent entraînant une valeur erronée de la teneur en arsenic. (Figure 17) Liste des interférences connues de l'arsenic : $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$, $^{12}\text{C}^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$.^{117,118,119,120,121,122,123}

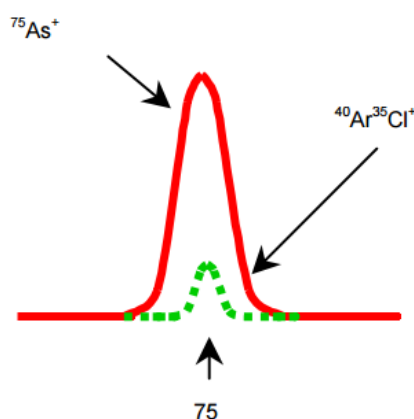


Figure 17. Interférence polyatomique du polyatome $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ sur la détection de ^{75}As par un spectromètre de masse quadripolaire

- Les interférences dues aux ions doublement chargés : en fonction du second potentiel d'ionisation de certains éléments, ainsi que de leur abondance, on observe la présence d'ions monoatomiques ou polyatomiques doublement chargés. Ceci a pour effet de donner un rapport m/z égal à la moitié de la valeur attendue et donc susceptible d'interférer sur un autre isotope.¹²⁴ Le néodyme et le samarium possèdent chacun un isotope de 150 unités de masse atomique (uma). Lorsqu'ils sont doublement chargés leur rapport m/z est de 75 m/z soit le même que celui de ^{75}As .¹²⁵

L'ICP-MS permet d'atteindre des seuils de détection de l'ordre du ppt, cependant elle ne permet pas de discriminer les différentes formes de l'arsenic. Tout comme pour la spectrométrie atomique, cette discrimination est possible en utilisant une technique séparative en amont de l'injection dans le nébuliseur. La chromatographie liquide haute performance est la plus couramment utilisée. En adaptant les différentes phases mobiles et stationnaires et à condition de disposer des composés étalons correspondant, il est possible de séparer et de quantifier les différentes formes organiques et inorganiques de l'arsenic. Les protocoles de séparation par ICP-MS sont complexes à mettre en œuvre et s'ajoutent à la complexité de préparation d'échantillons à injecter dans le nébuliseur.

En résumé, la spectrométrie d'absorption atomique, la spectrométrie de fluorescence atomique et la spectrométrie de masse utilisant un plasma à couplage inductif sont les trois techniques de laboratoire les plus utilisées pour le dosage de l'arsenic élémentaire. Elles permettent d'atteindre de faibles seuils de détection, de l'ordre du ppt pour l'ICP-MS et de l'ordre du ppb pour les spectrométries atomique, tout en ayant une bonne reproductibilité.¹²⁶ (Tableau 3)

	Technique de détection		
	AAS	ICP-MS	AFS
Limite de détection (ppb)	1	0.001	1
Reproductibilité (% déviation standard de reproductibilité)	<10	<10	<10
Volume d'échantillon (µL)	>1000	2-200	20-200
Temps requis	Analyse monoélémentaire un élément ≈ 10 s plusieurs éléments > 10 min	Analyse multiélémentaire ≈ 5 min + préparation d'échantillon	Analyse monoélémentaire un élément ≈ 10 s plusieurs éléments > 10 min
Coût à l'achat (K€)	60	200	60

Tableau 3. Tableau récapitulatif des caractéristiques des techniques de détection par spectrométrie d'absorption atomique (AAS), par spectrométrie de fluorescence atomique (AFS) et par spectrométrie de masse utilisant plasma à couplage inductif (ICP-MS)

Les spectromètres d'absorption et de fluorescence atomique effectuent des analyses monoélémentaires. C'est un avantage si l'analyse a pour but de détecter un élément en particulier, il suffit de paramétrer la lampe à cathode creuse pour cet élément et ensuite l'analyse en elle-même prend une dizaine de secondes. En revanche, s'il faut doser plusieurs éléments d'un même échantillon cela devient un inconvénient car il faut reparamétrer le spectromètre pour chaque élément et l'analyse prend finalement plusieurs dizaines de minutes. L'ICP-MS quant à elle effectue des analyses multiélémentaires, elle peut quantifier les différents isotopes de plusieurs éléments en une seule analyse. L'analyse en elle-même, sans prendre en compte la préparation d'échantillon, dure environ 5 minutes.

Ce sont des machines qui représentent un gros investissement à l'achat, de l'ordre de 60000 € pour les spectromètres atomiques et de l'ordre de 200000 € pour un ICP-MS. De plus, la grande consommation de gaz lors de l'utilisation entraîne un surcoût de l'analyse. La spectrométrie d'absorption de de fluorescence atomique avec un atomiseur à flamme consomment un gaz qui sert de combustible (acétylène, dihydrogène, ...) ainsi qu'un gaz qui sert de vecteur (argon, azote, ...). L'ICP-MS est la technique qui utilise la plus grosse quantité de gaz, de l'ordre de 15 L/min pour la production du plasma et de l'ordre du litre par minute pour la vectorisation de l'échantillon.¹²⁷

2. Techniques de terrain

Les techniques de laboratoire sont celles qui donnent les meilleurs résultats en termes de seuil de détection et de reproductibilité. Cependant, les besoins analytiques concernant l'arsenic

sont rarement proches géographiquement des laboratoires d'analyse. De plus, il est souvent nécessaire d'avoir un résultat rapidement car cela a un impact sur la santé publique.

La voltammétrie, du fait de son principe, a permis une miniaturisation de ses éléments et de la rendre portable sous forme de mallette. Le dosage colorimétrique dit de la « méthode de Gutzeit » supporté sur papier, se présente sous forme de bandelette qui donne une réponse colorée dépendante de la concentration en arsenic dans l'échantillon. Ces deux méthodes sont les seules commercialisées à l'heure actuelle.

a) Voltammétrie

La voltammétrie est une méthode d'analyse électrochimique. Elle est basée sur la mesure de flux d'électrons résultant de la réduction ou de l'oxydation des molécules de l'échantillon, soumises à une variation contrôlée de différence de potentiel entre deux électrodes spécifiques. Cette technique permet de détecter et de mesurer quantitativement un grand nombre de composés simultanément (cations, anions, composés organiques). La méthode voltammétrique repose sur l'usage d'une cellule électrochimique avec une électrode de travail (électrode en carbone recouverte d'or) sous conditions de polarisation, couplée à une électrode auxiliaire et une électrode de référence.¹²⁸ (Figure 18)

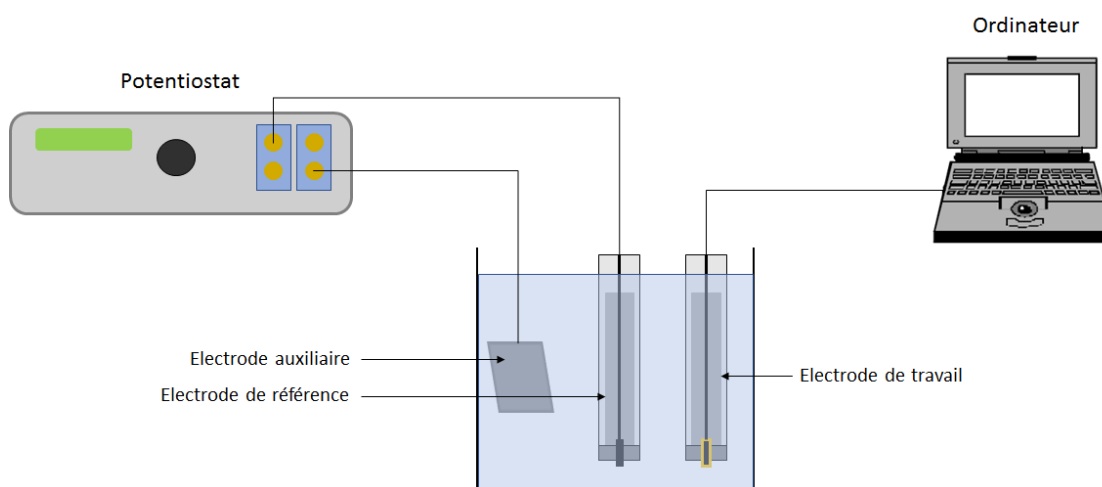


Figure 18. Schéma de principe de la voltammétrie

Cette méthode présente l'avantage d'être très sensible puisque la limite de détection est de l'ordre du ppb ($\mu\text{g/L}$), d'être très précise et d'être simple d'utilisation. Il s'agit d'une technique de laboratoire qui a été miniaturisée et optimisée pour la rendre transportable sur le terrain. La société américaine TraceDetect commercialise un kit voltammétrique de terrain sous le nom de « Nano-Band™ Explorer II ». (Figure 19)



Figure 19. Nano-Band™ Explorer II

Cette technique électrochimique présente néanmoins des inconvénients majeurs. Elle nécessite un étalonnage préalable à chaque analyse car ses performances sont limitées par les conditions extérieures (pH, température, oxygène dissous, ...). La valeur du potentiel mesuré peut quant à elle être faussée par la présence d'agents complexants. Le coût d'investissement du Nano-Band™ Explorer II reste élevé (environ 7000 € + achat d'un ordinateur portable). De plus, la fragilité des électrodes implique une maintenance importante.

***b)* Bandelettes**

Il existe des bandelettes tests colorimétriques dont la simplicité du matériel permet une utilisation directe sur le terrain. Il existe divers kits de test de l'arsenic vendus par différents fournisseurs. Les kits les plus connus sont Merckoquant® commercialisé par Merck, QUANTOFIX® Arsenic 10 vendu par Macherey Nagel, les bandelettes "EZ Arsenic" commercialisé par Hach et Quick™ Test commercialisé par Industrial Test Systems. Tous ces kits fonctionnent sur le même principe basé sur la méthode de Gutzeit.¹²⁹ Le principe de cette méthode repose sur la formation *in situ* d'un gaz hautement toxique, l'arsine, puis de faire réagir ce gaz avec une bandelette papier imprégnée de bromure de mercure (HgBr_2) qui va former un complexe marron. L'intensité de la coloration obtenue est dépendante de la quantité d'arsine formé par l'échantillon. (Figure 20)



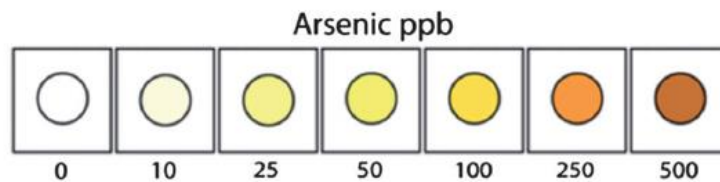


Figure 20. Abaque de couleur des bandelettes EZ de Hach¹³⁰

La méthode de Gutzeit présente l'avantage de pouvoir doser de faibles doses d'arsenic (III) de l'ordre de la dizaine de ppb. Cependant, cette technique nécessite la manipulation d'arsine et de bromure de mercure qui sont des produits potentiellement dangereux pour un manipulateur non formé aux règles de sécurités chimiques. De plus il s'agit d'un dosage indirect qui ne permet pas de quantifier directement l'arsenic (III) mais l'arsine issu de la réaction avec l'hydrogène. Ce dosage indirect entraîne donc des problèmes de reproductibilité et de faux positifs ou négatifs. (Figure 21)

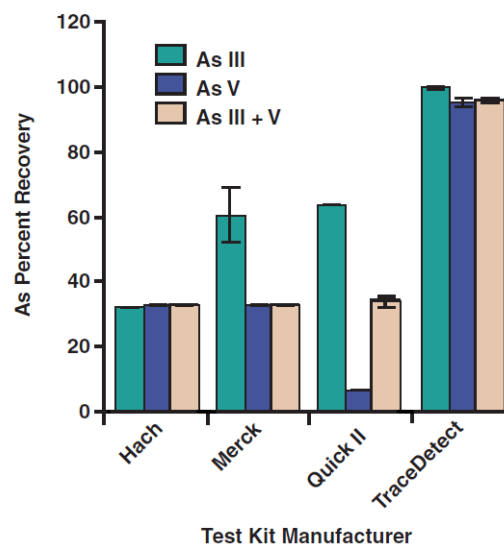


Figure 21. Pourcentages d'arsenic retrouvées par des kits de terrain dans des eaux de laboratoire¹³¹

Les bandelettes tests présentent l'avantage d'être simple d'utilisation, il n'est pas nécessaire d'avoir été formé et d'être peu onéreuses (0,5-4 \$ par analyse contre 8-10 \$ pour l'ICP-MS). Cependant, elles sont potentiellement dangereuses pour le manipulateur (arsine et bromure de mercure) et ont une fiabilité relative, jusqu'à 33% de faux positifs pour des concentrations inférieures à 70 ppb.¹³²

C'est pourquoi la communauté scientifique travaille à développer de nouvelles méthodes utilisables sur le terrain. Les dosages colorimétriques sont les plus prometteurs et l'état de l'art actuel les concernant sera présenté dans la deuxième partie.



II. Dosage colorimétrique de l'arsenic – Etat de l'art

A. Dosages colorimétriques basées sur la formation d'arsine

Jusqu'à la fin du XVIII^{ème} siècle, l'identification de l'arsenic dans n'importe quel échantillon n'était pas chose aisée. Il fallait faire chauffer l'échantillon dans un pot en fer afin de ne récupérer qu'un résidu solide de matière sèche. En jetant ce résidu au feu, la présence d'arsenic se caractérisait alors par une fumée blanche à la forte odeur d'ail. Une autre méthode consistait à ajouter du sulfure d'hydrogène (H₂S) dans l'échantillon. Un changement de couleur vers le jaune ou la formation d'un précipité d'orpiment (As₂S₃) indiquait la présence d'arsenic.

1. Test de Marsh

En 1832, James Marsh fut appelé en tant qu'expert sur une affaire de meurtre par empoisonnement. Il examina notamment la cafetière et les tasses à café, il fit le test avec ajout de sulfure d'hydrogène et obtint une coloration jaune. Il tenta de convaincre le jury que le suspect était bien coupable de meurtre par empoisonnement à l'arsenic, mais le jury voulait « voir » l'arsenic pour être sûr de sa culpabilité. Ne pouvant leur montrer l'arsenic, le suspect fut libéré. Sept ans plus tard, l'acquitté admit cependant qu'il avait bien empoisonné son grand-père à l'arsenic. Le verdict avait grandement irrité James Marsh qui travailla à développer une méthode infaillible pour la détection de l'arsenic. Il découvrit d'après les travaux de Scheele sur les pigments arséniés qu'il était possible de générer facilement et de façon reproductible de l'arsine (AsH₃) à partir d'un échantillon arsénié lorsque celui-ci était mis en contact avec de l'hydrogène libéré par l'action du zinc sur un acide dilué :



Il a également découvert que lorsque ce gaz était enflammé et que la flamme était mise en contact avec un morceau de verre ou de porcelaine froide, il se formait un miroir d'arsenic métallique. La taille du miroir formé servait à évaluer la teneur en arsenic.¹³³ (Figure 22)



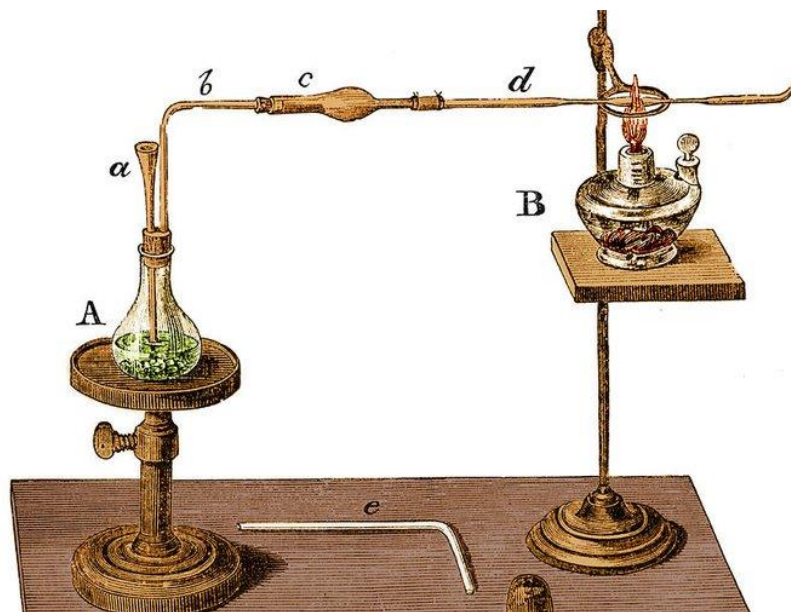


Figure 22. Schéma de l'appareillage utilisé par James Marsh

Cette technique permet de doser indirectement l'arsenic inorganique contenu dans un échantillon liquide. Encore aujourd'hui, un grand nombre des méthodes proposées pour le dosage de l'arsenic passe par la formation d'arsine comme l'a développée James Marsh.

2. Dosage au diéthylthiocarbamate

En 1952, Vasak et Sedivek ont proposé une nouvelle méthode pour doser l'arsenic après la génération d'arsine. Au lieu d'enflammer le gaz, ils ont eu l'idée de le faire buller dans une solution de diéthylthiocarbamate d'argent dissous dans la pyridine. (Figure 23)

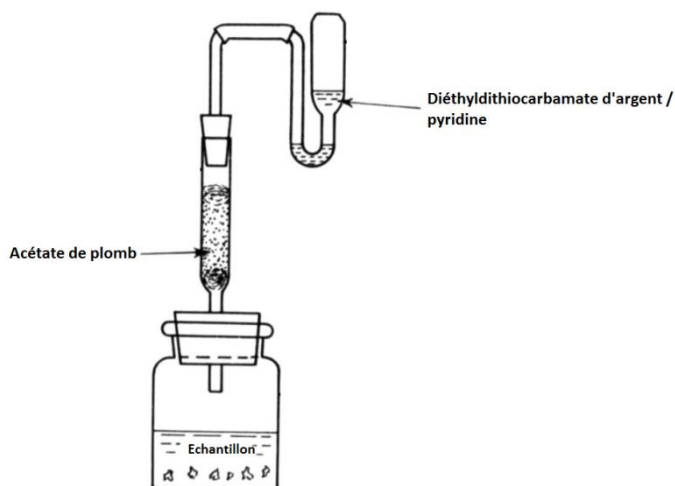


Figure 23. Schéma de l'appareillage utilisé pour le dosage de l'arsenic par le diéthylthiocarbamate d'argent

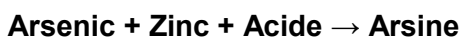
L'arsenic est tout d'abord réduit en arsenic (III) par de l'iodure de potassium (KI) et du chlorure d'étain (SnCl_2) en milieu acide pendant quinze minutes. Puis du zinc métallique est ajouté à l'échantillon afin de produire un dégagement d'arsine. Ensuite, un montage constitué d'une



colonne de coton imprégné d'acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), pour éliminer les potentiels sulfures d'hydrogène formés, reliée à un réservoir contenant le diéthylthiocarbamate d'argent est rapidement connecté au récipient. Lorsque l'arsine entre en contact avec le diéthylthiocarbamate d'argent, il se forme un complexe rouge dont l'absorbance est mesurée à 520 nm après trente minutes de réaction. Cette technique permet de doser des concentrations en arsenic de l'ordre de la dizaine de ppb et n'a pas d'interférence mis à part l'antimoine qui forme un complexe avec le diéthylthiocarbamate d'argent absorbant à 510 nm.¹³⁴

3. Méthode de Gutzeit

Le gaz arsine produit par le test de Marsh a la capacité de réagir avec des sels d'argent ou de mercure imprégnés sur du papier pour donner une coloration marron dont l'intensité est dépendante de la teneur en arsenic, cette technique fut nommée plus tard « méthode de Gutzeit ». Les sels de mercure sont ceux qui ont donné les meilleurs résultats.



La méthode consiste à faire réagir de l'acide chlorhydrique sur du zinc dans un contenant en verre pendant dix minutes afin que l'atmosphère soit saturée en dihydrogène, puis l'échantillon contenant l'arsenic est ajouté. L'arsenic est alors réduit en gaz arsine volatile puis il est filtré en passant sur du coton chargé en acétate de plomb ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$). Enfin, il est mis en contact avec une bandelette de papier imprégnée de chlorure de mercure (HgCl_2).¹³⁵ (Figure 24)

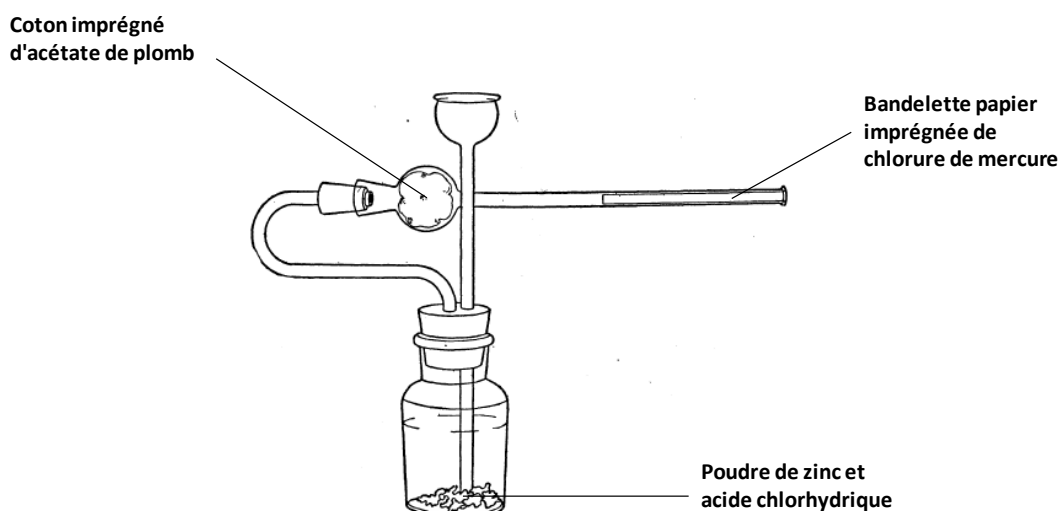


Figure 24. Schéma de l'appareillage utilisé pour la méthode de Gutzeit¹³⁵

La méthode de Gutzeit est celle employée par les actuels tests de terrain commercialisés sous format de bandelette. Elle permet de doser l'arsenic dans des gammes de 0-500 ppb et 0-3000 ppb. Comme cela a été expliqué précédemment, cette technique présente d'un côté

l'avantage d'être peu onéreuse et utilisable sur le terrain par du personnel non qualifié. De l'autre côté, elle nécessite la manipulation de produits toxiques et donne des résultats peu pertinents.

B. Chromophores et fluorophores

Les chromophores et les fluorophores sont généralement des molécules possédant des liaisons π entraînant une conjugaison. (Figure 25)

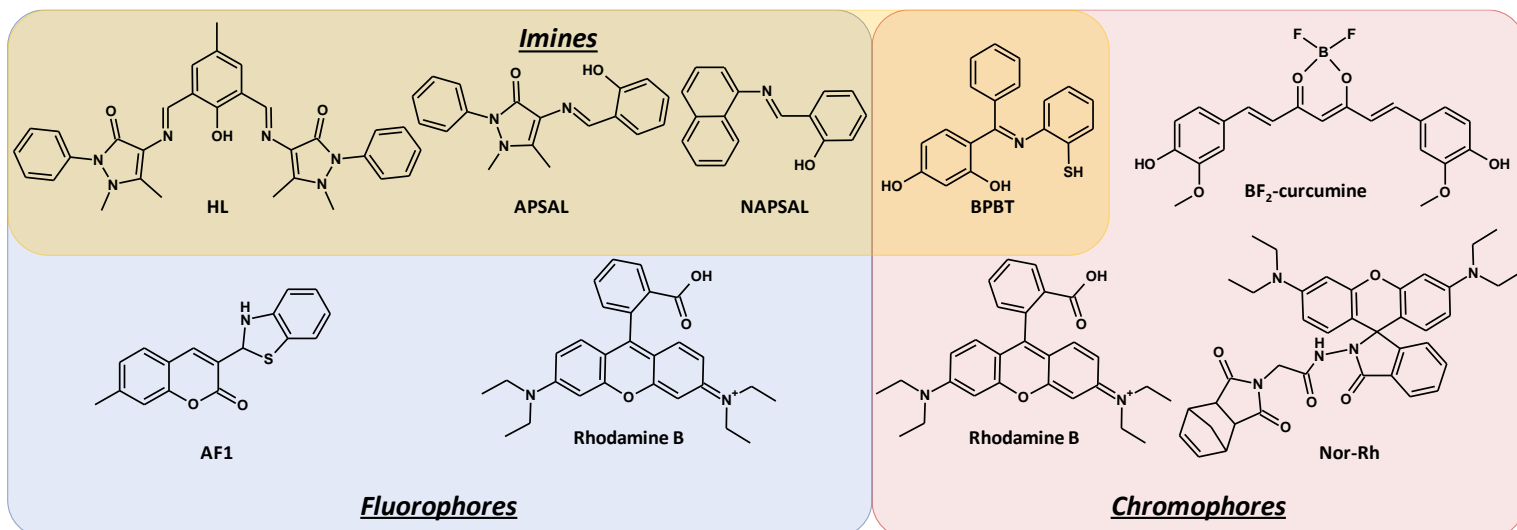


Figure 25. Exemples de fluorophores et de chromophores destinés à doser l'arsenic inorganique

Ces molécules réagissent de manière spécifique ou non avec l'arsenic. Ce dernier déclenche un changement dans la conjugaison ce qui entraîne un changement de couleur ou bien une réponse fluorescente. Ce type de composés permet généralement un dosage direct de l'arsenic, ce qui facilite une adaptation éventuelle pour un dosage de terrain.

1. Fluorophores

Dans la littérature, beaucoup de fluorophores étudiés pour le dosage de l'arsenic sont des molécules comportant des liaisons imines. D'autres sont des composés à base de coumarine ou de rhodamine B. (Figure 25) Les fluorophores comportant une liaison imine n'ont pas de fluorescence naturelle. En revanche, en présence d'arsenic (III) ou d'arsenic (V), ces molécules absorbent les longueurs d'ondes autour de 350 nm et émettent des photons aux alentours de 500 nm.

Le (4E)-4-(2-hydroxybenzylideneamino)-1,2-dihydro-2,3-diméthyl-1-phenylpyrazol-5-one (APSAL) et le naphthalène-salaldéhyde conjugué (NAPSAL) réagissent spécifiquement avec l'arsenic (V) en milieu hydroalcoolique. Divers cations métalliques et autres anions ont été testés mais n'interfèrent pas dans la détection, même le phosphate. Cependant la limite de

détection de ces deux molécules est très différente, en effet elle est de 0,5 ppb pour le NAPSAL alors qu'elle est de 225 ppb pour l'APSAL.^{136,137} (Figure 26)

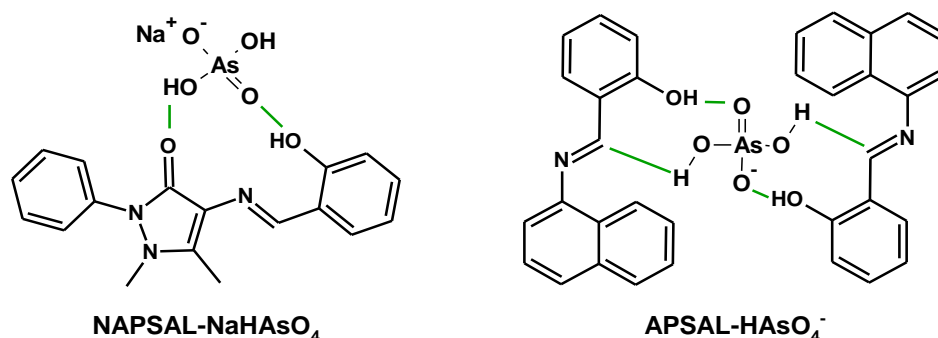


Figure 26. Mécanismes proposés de liaison entre l'arsénite de sodium et le NAPSAL ou l'APSAL

La molécule HL est issue de la condensation de deux molécules de 4-aminoantipyrine sur une molécule de 2,6-diformyl-*p*-crésol. Cette molécule comportant deux liaisons imines, permet de doser l'arsénite dans un mélange DMSO/H₂O (1:9). Avec une limite de détection estimée à 4 ppb en arsénite, ce fluorophore permet ainsi d'atteindre les seuils fixés par l'OMS. Cependant, si les anions n'interfèrent pas, notamment le phosphate et l'arsénite, les cations quant à eux entraînent une forte diminution de la réponse fluorescente.¹³⁶

Bien que la Rhodamine B soit connue pour être un colorant rose, elle peut également être utilisée pour ses capacités fluorescentes. En effet, elle absorbe les longueurs d'onde se situant à 562 nm et réémet des photons à 579 nm. Lorsque la rhodamine B en milieu acide se retrouve en présence d'iodate de potassium (KIO₃) et d'arsénite, sa réponse fluorescente diminue en raison de libération de diiode (I₂). Le dosage de l'arsenic (III) se fait donc par mesure de la différence d'intensité à 579 nm par rapport à une référence. Cette méthode présente l'avantage d'avoir une faible limite de détection estimée à 0,5 ppb et de ne pas avoir d'interférents. Cependant, le protocole nécessite de chauffer l'échantillon à 100°C pendant 12 minutes, ce qui complique une éventuelle adaptation nomade de la méthode.¹³⁸

La molécule d'ArsénoFluor1 (AF1) est issue d'une condensation entre un dérivé de la coumarine portant une fonction aldéhyde et le 4-(trifluorométhyl)-2-aminothiophenol. Lors de la synthèse, un réarrangement se produit en donnant un groupe fonctionnel benzothiazoline qui réagit avec l'arsenic (III).¹³⁹ (Figure 27)

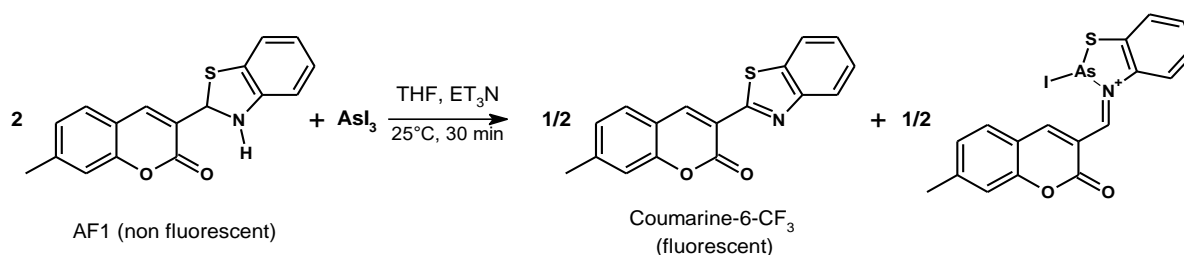


Figure 27. Mécanisme proposé de la réaction d'AsI₃ sur AF1

En présence de triiodure d'arsenic (AsI_3), la réponse fluorescente d'AF1 est exaltée d'un facteur vingt-cinq. La technique utilisant AF1 ne présente pas d'interférence et sa limite de détection a été estimée à 0,25 ppb après un temps de contact de 30 minutes avec AsI_3 . Toutefois le dosage est réalisé sur le triiodure d'arsenic, qui est une espèce jamais retrouvée en milieu naturel. Les tests n'ont pas été réalisés sur de l'arsenic (III) sous forme d'arsénite. L'inconvénient de cette méthode est que le dosage nécessite d'être réalisé dans le tétrahydrofurane (THF) et la triéthylamine (Et_3N), ce qui peut entraîner des complications pour un test de terrain. Cela dit, la méthode fonctionne dans un mélange THF/ H_2O (50:50) mais les temps de contact nécessaires sont alors de 5 h et les résultats obtenus sont inconstants.¹⁴⁰ La rhodamine B et AF1 donnent une réponse fluorescente en présence d'arsenic (III), mais elles peuvent également donner une réponse colorimétrique.

2. Chromophores

Le principe des chromophores est qu'ils changent de couleur en présence d'un réactif. Ce changement de couleur est dû à un déplacement de leur maximum d'absorption vers de plus grandes ou de plus petites longueurs d'onde du fait d'une modification de leur conjugaison.

La valeur d'absorbance d'AF1 se situe à 379 nm. Lorsqu'il est en présence d' As^{3+} , cette longueur d'onde est progressivement remplacée par deux autres longueurs d'onde à 290 et 443 nm. AF1 permet alors de doser de faibles teneurs en arsenic (III) en 30 minutes dans le THF et en 3 h dans un mélange THF/ H_2O (50:50) avec quelques interférences notables comme Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} .¹⁴¹

La rhodamine B peut servir de chromophore destiné à doser l'arsenic (III). C'est une molécule qui absorbe naturellement à 553 nm. Lorsqu'elle est en présence de diiode (I_2), cette absorbance diminue. Le dosage consiste donc à faire réagir de l'arsenic (III) avec de l'iodate de potassium afin de libérer du diiode. Cette méthode présente un certain nombre d'interférences dont Cu^+ , Fe^{2+} , ClO_4^- , Sn^{2+} , Hg^{2+} et NO_3^{2-} avec une gamme de dosage entre 40 et 400 ppb.^{142,143} Il existe une version modifiée de la rhodamine B sur laquelle a été greffée une molécule de norbornène (Nor-Rh). En présence de diiode, la couleur rose de Nor-Rh disparaît et une nouvelle couleur marron apparaît avec des valeurs d'absorbance situées à 288 et 356 nm. Il est possible d'imprégner Nor-Rh sur du papier et la limite de détection est alors de la centaine de ppb.¹⁴⁴

Un autre chromophore bien connu qui est la curcumine, issu du curcuma, peut être utilisé pour doser l'arsenic (III). (Figure 28)

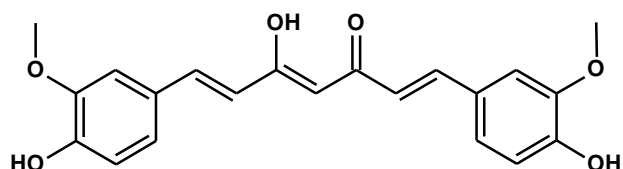


Figure 28. Forme énoï de la curcumine

La curcumine à l'état naturel ne réagit pas avec l'arsenic. Mais elle en est capable lorsqu'elle est modifiée avec du borontrifluoride diethyletherate pour donner la BF₂-curcumine. En présence d'arsenic (III), le maximum d'absorption passe de 509 à 632 nm avec une couleur qui passe du rose au bleu. BF₂-curcumine permet de détecter des teneurs en arsenic (III) de 20 ppb en milieu liquide. Elle peut être greffée sur une résine hydrophobe, donnant alors une coloration allant de l'orange au bleu selon la concentration en arsenic (III). (Figure 29)

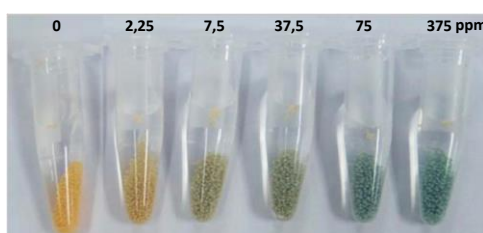


Figure 29. Gamme de couleur obtenue par BF₂-curcumine greffée sur résine hydrophobe en solutions contenant des concentrations en arsenic (III) allant de 0 à 375 ppm¹⁴⁵

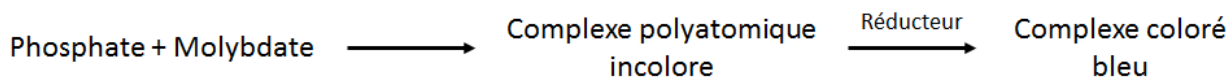
Le greffage sur résine permet de simplifier grandement la méthode, mais dégrade fortement le seuil de détection qui passe alors à 2,25 ppm.¹⁴⁵ Le dosage de l'arsenic par BF₂-curcumine ne présente aucun interférent connu, aucune étude n'ayant été faite à ce sujet. Cependant cette molécule est également utilisée pour doser les ions comme les cyanures CN⁻ ainsi que les amas β-amyloïdes de la maladie d'Alzheimer, suggérant qu'elle n'est pas hautement spécifique de l'arsenic (III).^{146,147}

Les molécules comportant une liaison imine peuvent également être des chromophores, c'est le cas du 2,4-Dihydroxy benzophenone-2-amino thiophenol (BPBT). Lorsqu'elle est en solution, cette molécule est de couleur marron avec un maximum d'absorbance à 343 nm. Lorsqu'il est couplé à de la spectrophotométrie UV-Visible, le BPBT permet le dosage de l'arsenic (III) dans la gamme 125 ppb – 2,5 ppm. Mais il interagit avec d'autres cations métalliques tel que Cd²⁺, V⁵⁺, Ag⁺, Tl³⁺, Pt⁴⁺, Au³⁺ et Fe³⁺.¹⁴⁸

C. Dosage colorimétrique au bleu de molybdène

En 2004, une étude a estimé que 40% des eaux continentales dans le monde étaient touchées par les phénomènes d'eutrophisation.¹⁴⁹ La concentration en orthophosphates est donc un des paramètres clef pour déterminer la qualité de l'eau vu qu'ils interviennent de façon déterminante dans les phénomènes d'eutrophisation des cours d'eau et étangs. La détection

par spectrophotométrie développé par Murphy et Riley en 1962, utilisant le molybdate d'ammonium est le moyen le plus utilisé pour déterminer cette concentration.¹⁵⁰ La méthode consiste à faire réagir l'orthophosphate avec le molybdate en milieu acide afin de former un complexe polyatomique, qui une fois réduit donne une forte couleur bleue. Cette technique peut également être utilisée pour la détermination de silicates, d'arséniates et de germanates.



L'intensité de la couleur bleue obtenue est dépendante de la concentration en phosphate et elle est généralement mesurée par spectrophotométrie. Cette réaction a été mentionnée pour la première fois par Carl Wilhelm Scheele en 1782, mais sa découverte est généralement attribuée à J. J. Berzelius en 1826.¹⁵¹ Elle n'a vraiment été utilisée qu'après que J. F. Keggin eut proposé une structure pour le complexe formé de douze hétéropolyacides.¹⁵² (Figure 30)

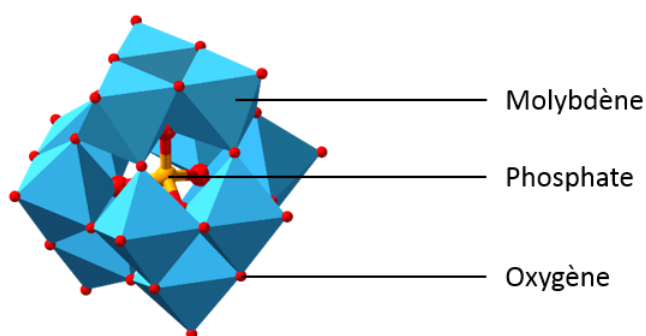
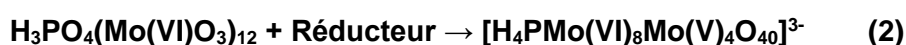


Figure 30. Structure de Keggin du complexe phosphomolybdique. Le phosphate est au centre et les polyèdres bleus illustrent l'environnement de chaque molécule de molybdate

La réaction chimique de la méthode au bleu de molybdène se divise en deux étapes. La première consiste à former une structure de Keggin autour de l'anion à analyser. La seconde consiste à réduire cette structure afin d'obtenir un produit de couleur bleue.¹⁵³



Il existe différents protocoles pour la méthode au bleu de molybdène, mais tous nécessitent un acide fort, une source de molybdène (VI) ainsi qu'un réducteur en solution aqueuse. Le complexe composé de douze hétéropolyacides peut se présenter sous deux formes possibles. L'isomère α est la forme classique et stable de la structure de Keggin. L'isomère β est obtenu par rotation de 60° d'un groupement Mo_3O_{13} . C'est la forme bêta qui donne la couleur bleue. Comme la forme bêta est thermodynamiquement favorisée, le chauffage permet d'accélérer la réduction.¹⁵⁴ (Figure 31)

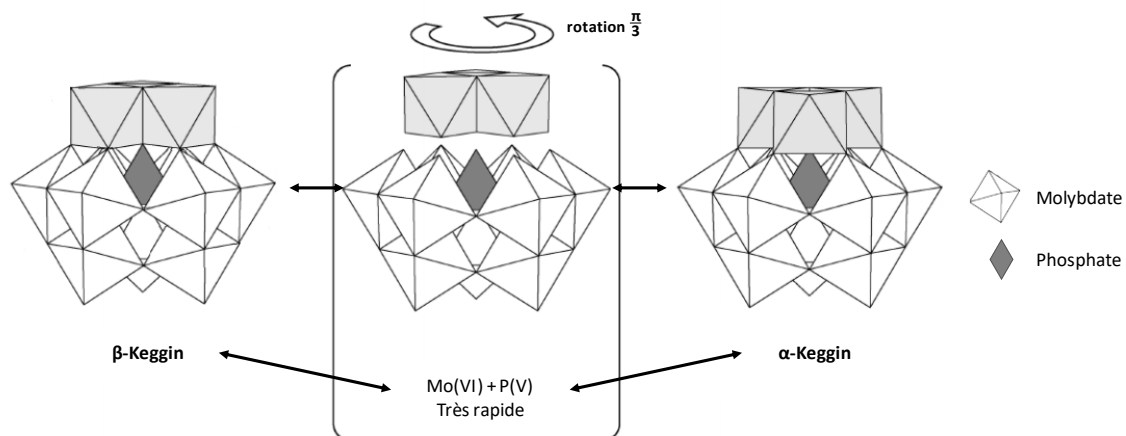


Figure 31 . Mécanisme proposé concernant la réaction d'isomérisation de la forme α en β ¹⁵⁴

La réduction du complexe phosphomolybdique est déterminée par différents facteurs comme la nature du réducteur, le pH, le temps de réaction, la température ou la présence d'interférents. Le réducteur peut être de nature organique comme l'acide ascorbique ou le sulfate d'hydrazine. Le spectre UV-Visible se caractérise par un maximum d'absorption à 820 nm avec un épaulement à 660 nm. (Figure 32)

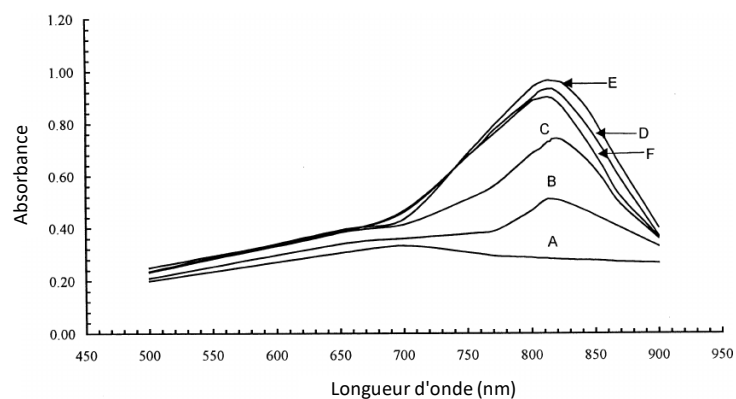


Figure 32. Spectres d'absorption du complexe phosphomolybdique en fonction de la concentration en HCl. (A) 0,02 M ; (B) 0,2 M ; (C) 0,5 M ; (D) 1 M ; (E) 1,46 M ; (F) 2 M. Avec comme conditions $[\text{PO}_4^{3-}] = 3 \text{ mM}$ et $[\text{Mo(VI)}] = 9 \text{ mM}$ ¹⁵⁵

L'utilisation de réducteur métallique comme l'étain Sn(II) ou l'antimoine Sb(III) permet de réduire très rapidement la structure de Keggin. L'utilisation de l'antimoine permet d'accélérer la réduction normalement lente par l'acide ascorbique. Les temps sont de l'ordre de la dizaine de minutes sans chauffage et la coloration obtenue est stable pendant plusieurs heures.¹⁵⁶ L'acide ascorbique est le réducteur le plus communément utilisé du fait de sa non-toxicité pour le manipulateur ou pour la nature. La structure de Keggin réduite par l'acide ascorbique en présence d'antimoine Sb(III), lorsqu'elle est analysée en spectrophotométrie présente un maximum d'absorbance à 880 nm, ainsi qu'un second pic à 710 nm et un épaulement à 550 nm.¹⁵⁷ La structure de ce nouveau complexe phosphoantimonymolybdate et la raison pour laquelle l'antimoine accélère la cinétique de réduction ne sont pas encore bien établies.

Cependant, il est reconnu que le ratio antimoine/phosphore dans le complexe est de deux pour un.¹⁵⁸ Une des hypothèses proposées par Going et Eisenreich est que l'accélération de la vitesse de réduction en présence d'antimoine Sb(III) peut être due soit à un changement structurel du complexe hétéropolyacide qui facilite la réduction, soit qu'il réduise le complexe en se transformant en Sb(V), pour être ensuite immédiatement réduit par l'acide ascorbique en Sb(III).¹⁵⁸ Toutefois, même si l'antimoine Sb(III) n'interfère pas dans le processus chimique de réduction, une forte augmentation de la quantité d'antimoine n'accélère pas pour autant la réduction. La seule limite concernant la quantité d'antimoine Sb(III) utilisée est sa limite de solubilité lorsque le dosage a lieu à des concentrations anormalement élevées.^{156,159}

Une fois que la forme réduite est obtenue et que la totalité de réducteur a été consommée, la forme bêta reste stable pendant plusieurs heures malgré la présence de dioxygène dissous.¹⁶⁰

1. Interférences dues à l'échantillon

Afin de garantir que le molybdate soit sous forme Mo(VI), il faut que le pH de l'échantillon soit situé entre 0 et 1. La nature de l'acide est donc très importante. En effet, s'il possède un pouvoir oxydant comme l'acide nitrique (HNO₃) ou l'acide perchlorique (HClO₄), il va interférer sur l'étape de réduction de la structure de Keggin. Les contre-anions quant à eux peuvent interagir avec le molybdate Mo(VI) et perturber la formation du complexe d'hétéropolyacides.¹⁶¹ Les sulfates de l'acide sulfurique (H₂SO₄) réagissent avec les hétéropolyacides des complexes et forment un précipité composé de (NH₄)₁₄(PO₄)₄SO₄.53MoO₃.¹⁶² Tout comme le sulfate, le chlorure est connu pour former des complexes avec les cations molybdate sous formes MoO₂Cl₂(H₂O)₂ et MoOCl₃(OH)(H₂O).¹⁶³ Ces complexes sont néanmoins beaucoup moins stables que ceux formés avec le sulfate. L'acide chlorhydrique est pour cette raison, le plus couramment utilisé en association avec un sel d'antimoine et de l'acide ascorbique comme réducteur.

Le silicate est connu depuis longtemps comme étant le principal interférent de la méthode au bleu de molybdène. En effet, il peut former des complexes d'hétéropolyacides similaires de couleur bleu.¹⁶¹ L'interférence des silicates peut être réduite d'environ 47% s'il y a de l'antimoine sous forme de tartrate d'antimoine et de potassium dans l'échantillon et que celui-ci est chauffé à 70°C.¹⁶⁴ Lors de ses travaux, l'équipe de Morita a quant à elle masqué l'interférence des silicates par l'utilisation de fluorure de sodium (NaF).¹⁶⁵

Tout comme le phosphate et le silicate, l'arséniate (AsO₄³⁻) peut également former des complexes d'hétéropolyacides. Les propriétés chimiques ainsi que les profils spectraux obtenus avec les complexes bleus arsénomolybdiques sont très similaires de ceux obtenus avec les complexes bleus phosphomolybdiques. De plus, il existe une synergie entre l'arsenic (V) et le phosphore (V). Quand ces deux espèces sont présentes dans l'échantillon avec du

molybdate (VI), il se forme des composés molybdiques bleus plus rapidement.¹⁶⁶ Cette synergie s'explique par le fait que les complexes molybdiques contiennent de l'arsenic (V) et du phosphore (V) avec un ratio un pour un.¹⁶⁷

2. Application à l'arsenic

La méthode au bleu de molybdène avec des protocoles adaptés au dosage de l'arsenic (V) permet lorsqu'elle est couplée à un spectrophotomètre d'atteindre des limites de détections de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/L}$ (ppb) en quelques dizaines de minutes.¹⁶⁷ La principale limite de cette méthode est d'uniquement doser l'arsenic inorganique (V). La très forte analogie chimique entre l'arsenic (V) et le phosphore (V) entraîne alors de fortes interférences. Une méthode proposée par l'équipe de Dasgupta, consiste à doser l'arsenic sous forme As(III) après avoir filtré l'échantillon à travers une colonne de résine fortement basique. L'arsenic (V) et le phosphore (V) sont ainsi retenus alors que l'arsenic (III) reste en solution. L'éluat contenant l'arsenic (III) est ensuite oxydé en arsenic (V) en présence de bromate de potassium KBrO_3 . L'arsenic (V) formé est alors dosé par la méthode au bleu de molybdène. Il est également possible de doser l'arsenic total par réduction préalable de l'arsenic (V) en As(III) grâce à une solution de cystéine, avant de passer l'échantillon sur la colonne de résine.¹⁶⁸

L'équipe d'Okazaki a développé une variante qui repose également sur l'élimination de l'arsenic (V) et du phosphore (V), puis le dosage de l'arsenic (III) restant. A la différence que l'élimination du phosphate et de l'arséniate se fait par un passage de l'échantillon chargé en chlorure de calcium (CaCl_2) à travers une colonne de carbonate de calcium (CaCO_3). L'arsenic (III) est oxydé en arsenic (V) en cinq minutes par ajout de permanganate de potassium, puis un mélange de réactifs (molybdate, antimoine et acide) est ajouté et la concentration en arsenic est déterminée par mesure de l'absorbance à 810 nm.¹⁶⁹

L'inconvénient de ces différentes techniques, est qu'elles nécessitent l'utilisation d'un spectrophotomètre pour la détermination de la concentration en arsenic. En se basant sur les travaux de Taguchi, l'équipe d'Okazaki a développé une méthode de rétention par une membrane filtrante d'acétate de cellulose possédant une porosité de 0,8 μm .¹⁷⁰ Afin d'améliorer la rétention du complexe d'hétéropolyacides, un surfactant cationique, le bromure de n-dodécyltriméthylammonium, est ajouté dans l'échantillon après obtention de la coloration bleue. Cette technique permet de discriminer à l'œil nu des concentrations de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g/L}$ (ppb).¹⁶⁹ (Figure 33)



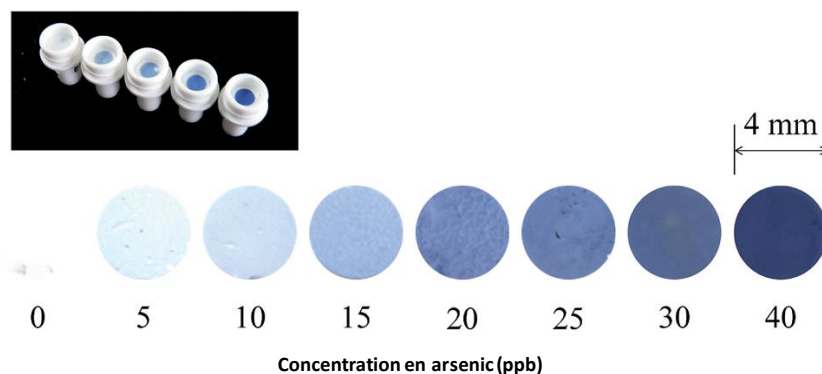


Figure 33. Variation de couleur par rétention de complexes arsénomolybdiques par une membrane filtrante d'acétate de cellulose (0,8 µm) à différentes concentrations en arsenic¹⁶⁹

La méthode au bleu de molybdène est une technique simple, et ne nécessite pas de manipuler de produits toxiques. Cependant, c'est une technique qui requiert environ trente-cinq minutes pour le protocole avec membrane filtrante.

Il est possible d'obtenir une réponse colorée du complexe molybdique en s'affranchissant de l'étape de réduction. La forme alpha de la structure de Keggin peut en effet donner une gamme de couleur selon sa concentration en présence de colorants.

3. Dosage colorimétrique au molybdate d'ammonium utilisant des colorants

Itaya et Ui ont été parmi les premiers à décrire le comportement de différents colorants, comme la safranine, le vert de malachite ou l'éthyl violet, en présence de complexes phospho- ou arsénomolybdiques.¹⁷¹ (Figure 34)

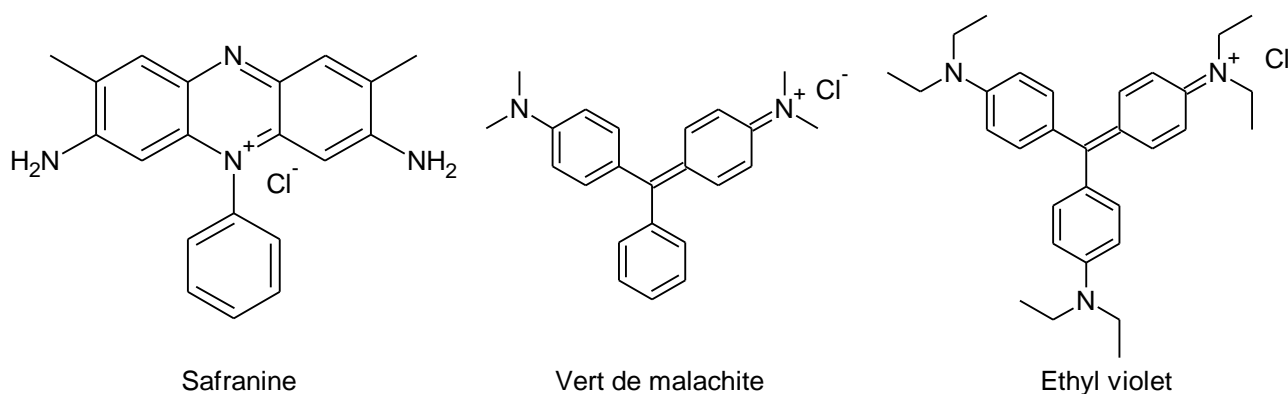


Figure 34. Colorants utilisés avec les complexes phospho- ou arsénomolybdiques

Le colorant le plus utilisé, au vu de ses résultats, est l'éthyl violet, un colorant de type triarylméthane. Le colorant forme avec les complexes molybdiques des microparticules colorées qui finissent par précipiter au cours du temps. Le mécanisme de formation de ces particules est encore inconnu à ce jour. En milieu acide, l'éthyl violet donne une coloration



bleue en présence d'arsénomolybdate et l'éthyl violet qui ne réagit pas est transformé en carbinol incolore.¹⁶⁵ (Figure 35)

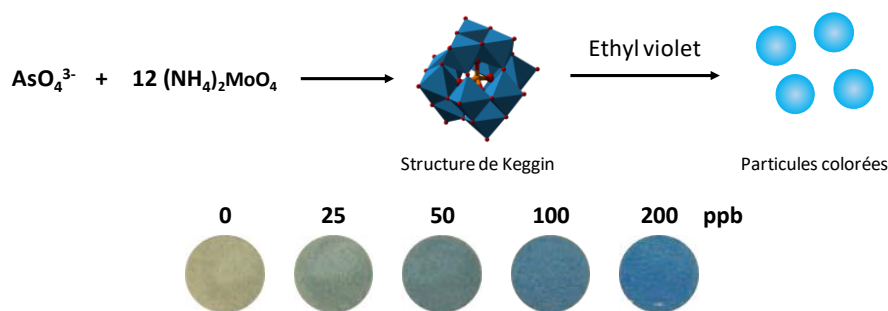
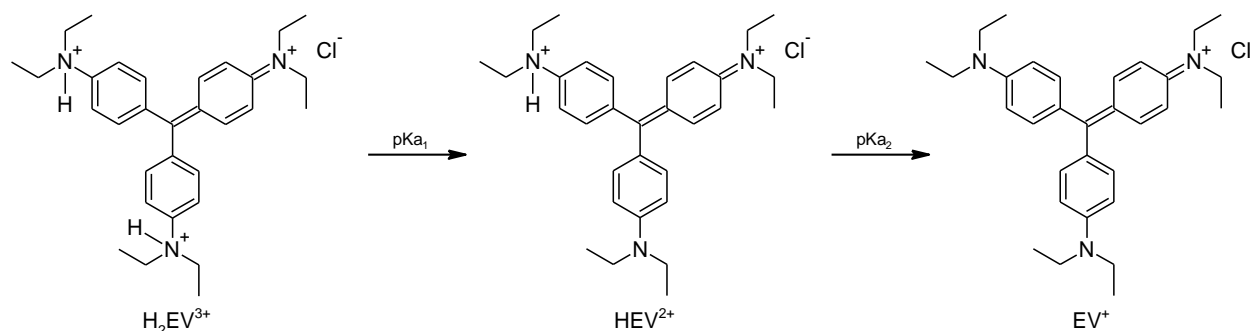


Figure 35. Schéma réactionnel et gamme de couleur en plaque micropuits polystyrène pour la détection de l'arsenic (V) par un complexe éthyl violet/arsénomolybdate en milieu acide¹⁶⁵

Lorsque de l'arséniate est ajouté à une solution contenant du vert de malachite et du molybdate d'ammonium, il se forme un complexe vert instable absorbant entre 640 et 660 nm. Il est possible de stabiliser la coloration par ajout d'un surfactant, le Tween 20 ou par un alcool polyvinylique.¹⁷²

L'éthyl violet (EV) présente trois états de protonation avec des pK_{a1} et pK_{a2} de 1,66 et 3,68 respectivement. Ces trois états de protonation ont des absorbances différentes, elle est de 638 nm pour la forme EV^+ , de 428 nm pour la forme HEV^{2+} et de 434 nm pour la forme H_2EV^{3+} .



Cette version différente de la méthode au bleu de molybdène permet de doser à l'œil nu des concentrations en arsenic de l'ordre de la centaine de ppb. Mais elle nécessite d'utiliser des volumes d'échantillons importants (50 mL) et demande un temps de repos de trente minutes avant analyse de la couleur. Morita et al a observé que lorsqu'il était rajouté du tétrachlorure d'iode (ICl_4) dans l'échantillon, il était possible de former des nanoparticules d'éthyl violet avec le complexe arsénomolybdate/ ICl_4 . (Figure 36)

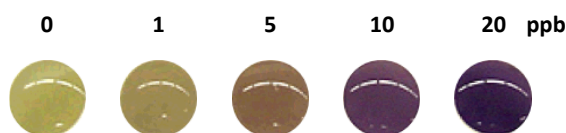


Figure 36. Gamme de couleur en plaque micropuits polystyrène pour la détection de l'arsenic (V) par un complexe éthyl violet/arsénomolybdate/ ICl_4 en milieu acide¹⁷³

Ce nouveau type de particule donne une couleur violette et permet d'obtenir une gamme de couleur à de plus faibles concentrations en arsenic.¹⁷³

D. Nanoparticules d'or

Plus récemment, quelques travaux de recherche de la communauté scientifique destinés au dosage de l'arsenic ont utilisé des nanoparticules d'or.

L'or est un des deux métaux natifs naturellement qui ne soit pas de couleur grise (le deuxième est le cuivre). L'or est un métal noble, chimiquement inaltérable qui garde ses propriétés indéfiniment. Le seul moyen de le solubiliser est d'utiliser de l'eau régale, un mélange d'un tiers d'acide nitrique concentré et de deux tiers d'acide chlorhydrique concentré, qui donne de l'acide chloraurique HAuCl_4 . Cependant, malgré cette forte stabilité il est possible de conditionner l'or sous forme de nanoparticules et il prend alors une coloration entre le rouge et le bleu.

La méthode de synthèse des nanoparticules consiste à réduire de l'or ionique Au(III) en or métallique Au(0) par l'intermédiaire d'un agent réducteur. Les atomes d'or vont alors cristalliser dans un système cubique face centrée (cfc) et sont maintenus sous forme de nanoparticules par l'ajout d'un agent stabilisant. La technique de synthèse la plus courante est celle dite de Turkevich où le rôle d'agent réducteur et d'agent stabilisant sont joués par le même réactif, le citrate trisodique. Elle permet d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques d'un diamètre variable selon les conditions de synthèse et de répartition homogène. Chaque nanoparticule contient environ 110 000 atomes d'or.^{174,175} Lorsque l'or se trouve sous forme de nanoparticules, il acquiert des propriétés optiques particulières. Ces modifications sont dues au phénomène de résonance de plasmon. Elle entraîne une forte absorption dans le vert (≈ 520 nm) et donne une couleur rouge. La résonance de plasmon moyenne de 520 nm peut être déplacée par la forme et/ou la taille des nanoparticules. Ainsi, des nanoparticules de tailles inférieures à 15 nm engendrent un déplacement du maximum d'absorption vers des longueurs d'ondes plus faibles et inversement pour des nanoparticules de tailles supérieures.¹⁷⁶ (Figure 37)

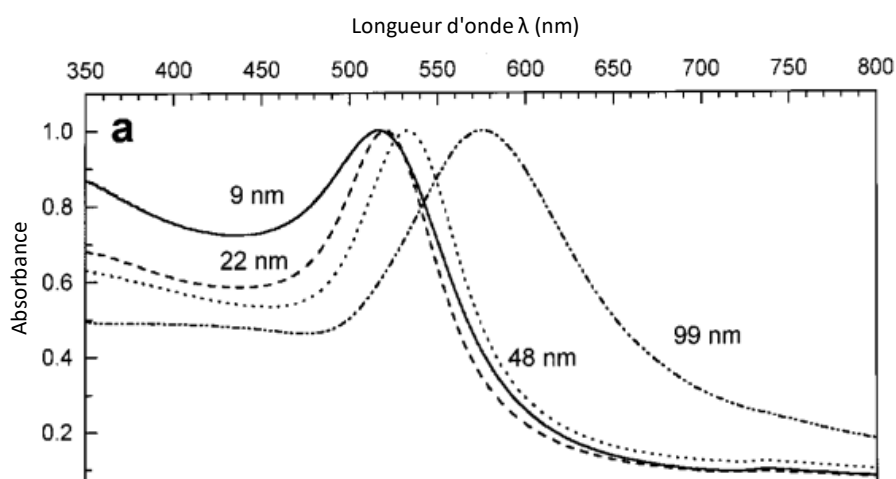


Figure 37. Effets de la taille des nanoparticules sur la résonance de plasmon¹⁷⁶

Les dosages colorimétriques utilisant des nanoparticules d'or sont basés sur le fait que lorsque ces dernières s'agglomèrent, elles changent de coloration. Ainsi, lors de l'agglomération la taille moyenne des nanoparticules augmente et le maximum d'absorption se décale alors vers de plus hautes longueurs d'onde. La coloration passe à ce moment-là du rouge au bleu.¹⁷⁷ (Figure 38)

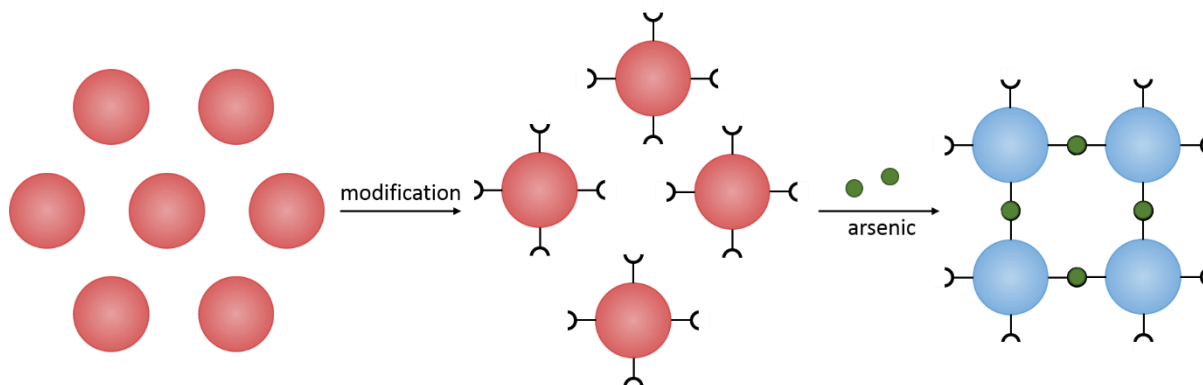


Figure 38. Schéma de principe du changement de couleur des nanoparticules d'or modifiées en présence d'arsenic

Le principe sera de modifier les nanoparticules d'or pendant ou après leur synthèse afin qu'elles présentent des motifs réactifs de l'arsenic. Lorsque les nanoparticules se trouveront en présence d'arsenic, ce dernier réagira avec les motifs, entraînant ainsi une agglomération et donc un changement de couleur. Peu d'études concernant le dosage de l'arsenic par les nanoparticules ont été réalisées, nous en présenterons ici quelques-unes d'entre-elles.

1. Dosage de l'arsenic par des nanoparticules d'or modifiées

Il est possible d'effectuer des modifications post-synthèse sur des nanoparticules d'or de 50 nm par des protéines de surface. Ces protéines sont extraites de la couche S de la bactérie *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Les nanoparticules d'or modifiées aux protéines de surface permettent de doser à l'œil nu des concentrations en arsenic (V) de 240 ppb et de 24 ppb lorsqu'elle est couplée à de la spectrophotométrie UV-Visible. Cette technique ne présente pas d'interférences de la part de divers cations métalliques.¹⁷⁸

Il est également possible de synthétiser des nanoparticules d'or en présence d'un liquide ionique et d'un surfactant, le trihexyl(tetradecyl)phosphonium chloride (Cyphos® IL 10) et le Triton™ X-114 respectivement. Ces nanoparticules d'or réagissent spécifiquement avec l'arsenic (III) dans un tampon ammonium à pH 10. Afin de doser l'arsenic total (As(III) + As(V)), il faut préalablement réduire l'arsenic (V) en arsenic (III) par ajout d'acide ascorbique dans l'échantillon. Elles permettent alors de détecter à l'œil nu des concentrations en arsenic de 7,5 ppb et ne présentent pas d'interférences, sauf de la part du phosphate à partir de 10 mM.¹⁷⁹ Le pH alcalin est important pour ce test car il permet de s'affranchir de certaines interférences.

En effet, le même liquide ionique est utilisé pour immobiliser les ions mercureux Hg^{2+} sur résine à pH acide.¹⁸⁰

Les composés soufrés quant à eux sont connus pour avoir une forte affinité pour l'arsenic. Par exemple, la cystéine fonctionnalisée sur des nanoparticules de thorium permet de préconcentrer les échantillons en arsenic avant de les injecter en ICP-MS.¹⁸¹ Ainsi, des nanoparticules d'or de 15 nm peuvent être modifiées après leur synthèse par de la cystéine, du dithiothréitol (DTT) ou du glutathion (GSH). Elles acquièrent alors la possibilité de déplacer la bande d'absorption de 520 à 670 nm lorsqu'elles sont mises en présence d'arsenic (III) ou d'arsenic (V). Ces nanoparticules d'or permettent d'atteindre une limite de détection à l'œil nu de 100 ppt et de 3 ppt lorsque la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) est utilisée en plus. Il n'y a pas d'interférences de la part des cations métalliques mis à part Hg^{2+} . Cette interférence peut être négligée par l'ajout d'acide 2,4-pyridinedicarboxylique (PDCA) dans l'échantillon.¹⁸² (Figure 39)

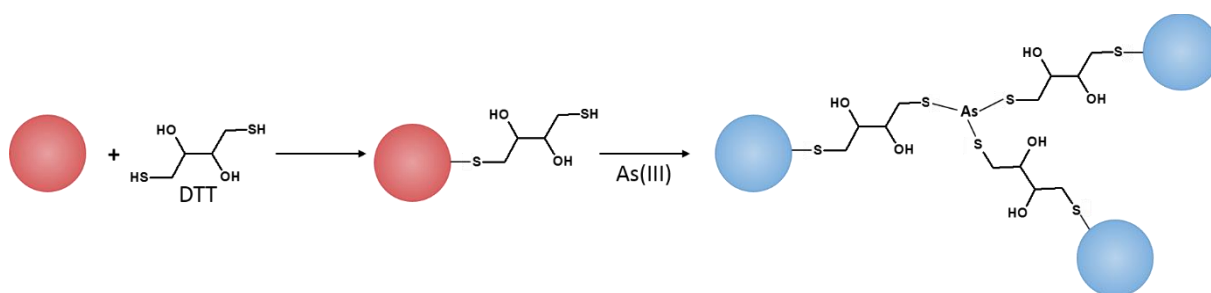


Figure 39. Modification de nanoparticules d'or avec du dithiothréitol (DTT) et mécanisme de dosage de l'arsenic (III)

La thioguanine est un composé soufré qui peut également être utilisé pour la complexation de l'arsenic. Il ne peut cependant pas être directement fixé sur les nanoparticules d'or. Il est greffé par une liaison amide sur un acide lipoïque, lui-même fonctionnalisant les nanoparticules. (Figure 40)

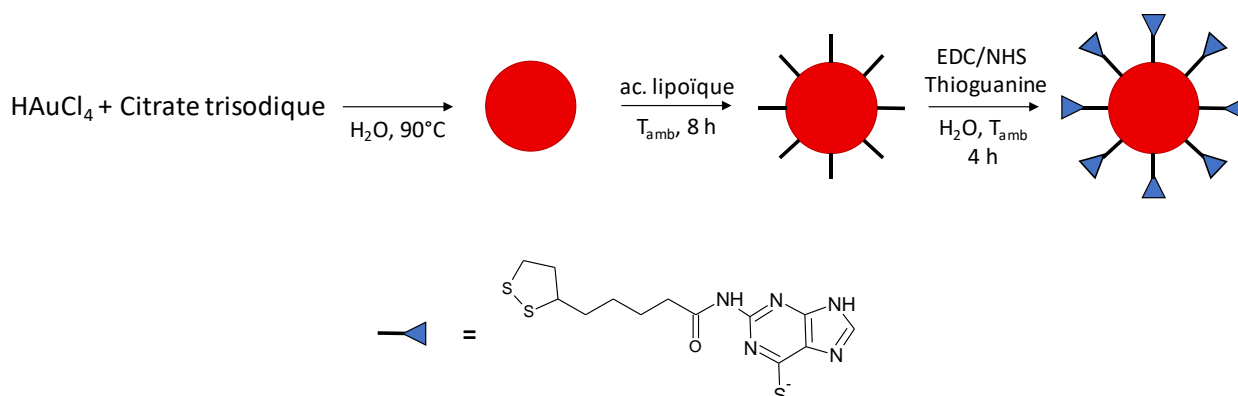


Figure 40. Schéma de synthèse des nanoparticules d'or modifiées à l'acide lipoïque et à la thioguanine¹⁸³

Les fonctions thiols libres des thioguanines servent de sites actifs vis-à-vis de l'arsenic. Ces nanoparticules utilisées avec une technique de microfluidique permettent d'atteindre à l'œil nu des détections de concentrations en arsenic de l'ordre de la dizaine de ppb. La technique

consiste en une bande de papier Whatman découpée en forme de Y plongeant d'une part dans la solution de nanoparticules d'or et d'autre part dans l'échantillon. La capillarité du papier entraîne un mouvement lent et constant des fluides, de l'ordre de 2-3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Ce faible débit permet de concentrer l'arsenic, ainsi qu'un temps de contact suffisamment long avec les nanoparticules d'or. Il n'y a pas d'interférences à ce test, cependant l'étude n'a porté que sur quelques cations métalliques (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ et Fe^{3+}).¹⁸³

2. Dosage indirect de l'arsenic par des nanoparticules d'or et de la phytochélatine 3

Une autre façon de doser l'arsenic est de le faire entrer en compétition avec des nanoparticules d'or vis-à-vis d'un composé ayant une forte affinité pour les deux. Comme cela a été expliqué dans la partie I.B.2.d) *Biosphère*, la fougère *Pteris vittata* peut accumuler de fortes concentrations en arsenic en le complexant par de la phytochélatine 2. Cependant, une étude a montré que lorsque l'arsenic (III) se trouve en solution avec du glutathion, de la phytochélatine 2 et de la phytochélatine 3, les complexes As-PC₃ sont largement favorisés d'un facteur 2,5 par rapport aux complexes As-PC₂.¹⁸⁴ L'arsenic forme un complexe pyramidal base triangle en se liant avec trois fonctions thiols.¹⁸⁵ Le complexe As-PC₃ est favorisé car il comporte trois fonctions thiols sur la même molécule, entraînant une stabilité des complexes plus importante. Sur ce principe, l'équipe de Xia a mis en place un test colorimétriques utilisant des nanoparticules d'or stabilisées au citrate avec de la phytochélatine 3 afin de doser l'arsenic (III). (Figure 41)

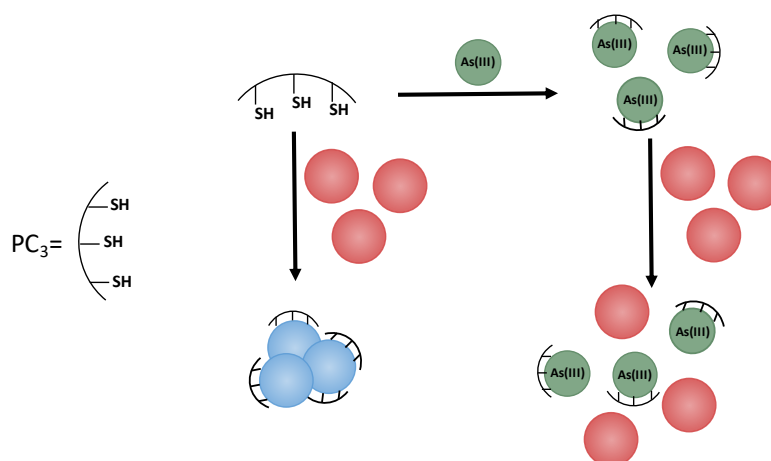


Figure 41. Mécanisme schématique du dosage de l'arsenic(III) par des nanoparticules d'or et de la phytochélatine 3¹⁸⁶

C'est un dosage indirect qui se déroule en deux étapes. La phytochélatine 3 est ajoutée dans l'échantillon et se complexent avec l'arsenic (III) s'il est présent. Ensuite des nanoparticules d'or sont ajoutées et dosent la quantité de phytochélatine 3 qui n'a pas réagi. La limite de détection empirique de cette méthode est de 30 ppb et la limite estimée est de 1,5 ppb. L'étude n'a pas

décelé d'interférences mis à part le plomb Pb^{2+} , qui peut être éliminée par ajout d'acide 2,4-pyridinedicarboxylique (PDCA).¹⁸⁶

Toutes ces techniques colorimétriques présentent des avantages mais aussi des inconvénients qui font qu'elles ne sont pas utilisables sur le terrain à l'heure actuelle.



III. Objectifs du travail

Lauréat du concours national d'aide à la création d'entreprise de technologies innovantes dans la catégorie « Émergence » en 2013, le projet NOVASSAY a intégré l'incubateur technologique du Limousin le 6 mars 2013 et l'entreprise NOVASSAY SAS a été créée le 8 janvier 2014. Elle est composée d'un président et d'un chef de projet scientifique. Elle est adossée au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN EA 1069) de l'Université de Limoges. NOVASSAY SAS est une Jeune Entreprise Innovante qui développe des outils de terrain pour le diagnostic environnemental. Le savoir-faire de Novassay repose sur le développement de kits d'analyses rapides, en effet l'entreprise a mis au point un système sous forme de bandelettes test colorimétriques, capable de doser l'uranium entre 0 et 100 ppm (mg/L) en 60 secondes. Cette innovation mondiale a permis la conception et la commercialisation du premier produit appelé Uranalyze®.

NOVASSAY souhaite donc étendre ses activités en développant de nouveaux outils fiables, précis et spécifiques d'éléments posant des problèmes au niveau environnemental tel que l'arsenic.

L'objectif du travail de cette thèse, cofinancée par une convention CIFRE, est de développer un nouveau kit de terrain destiné au dosage de l'arsenic en solution, en s'appuyant sur ce que propose la littérature et sur le savoir-faire de l'entreprise NOVASSAY. Ce kit de dosage sera avant tout destiné aux secteurs industriels susceptibles de rejeter de l'arsenic dans les cours d'eau. Les rejets étant soumis aux normes environnementales, les concentrations en arsenic dans les effluents ne doivent donc pas dépasser les 10 µg/L.

Lors d'une étude de marché concernant les bandelettes Uranalyze® dédiées au dosage de l'uranium et commercialisées par NOVASSAY, les acteurs du secteur minier, des centres d'enfouissement technique et d'Areva se sont dit très intéressés par un nouveau kit de dosage de l'arsenic. En effet, la problématique arsenic étant très présente, les besoins analytiques sont constants et permanents. Il n'existe sur la marché qu'une seule sorte de bandelette Arsenic, celle-ci étant peu performante, au temps de traitement prohibitif et au mode opératoire trop pénalisant.

C'est pourquoi NOVASSAY se propose de mettre au point une nouvelle méthode de détection et de quantification de l'arsenic afin de développer de nouveaux tests colorimétriques répondants aux demandes des prospects. Ces secteurs industriels souhaiteraient avoir un produit qui puisse être utilisable sur le terrain par du personnel non qualifié, qui ne soit pas dangereux pour le manipulateur et qui donne une réponse colorimétrique fiable en moins de dix minutes avec une gamme de détection intégrant 10 et 50 ppb d'arsenic.



Le cahier des charges établi est le suivant :

- Utilisation simple et rapide (< 10 min)
- Aucune utilisation ou formation *in situ* de produits toxiques
- Détection spécifique de l'arsenic inorganique
- Limite de détection située à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$
- Gamme de détection 0-100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 0-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 0-3000 $\mu\text{g.L}^{-1}$
- Matériel d'analyse réduit au minimum

Le kit de dosage que NOVASSAY souhaite développer pourra se présenter sous la forme d'un test colorimétrique en solution ou bien sur format solide.

Les bandelettes tests existantes basées sur la méthode de Gutzeit ne répondent pas à ces critères. Il faut donc développer une nouvelle technique colorimétrique destinée à l'analyse de l'arsenic qui puisse y répondre.

La méthode au bleu de molybdène est celle qui semble la plus prometteuse pour répondre à ces contraintes. Ainsi, l'objectif sera dans un premier lieu de tenter d'améliorer les protocoles décrits dans la littérature afin de réduire les temps de réactions actuellement supérieurs à vingt minutes, tout en ayant une sensibilité se situant à 10 ppb. Afin d'éprouver la robustesse du procédé et ainsi anticiper la faisabilité d'un transfert vers la production industrielle de kits commercialisables, il convient d'une part d'étudier les éventuelles interférences avec d'autres éléments, en particulier le phosphate et d'autre part d'imaginer le développement de dispositif simplifiant l'utilisation, comme par exemple le format bandelette test.

Comme nous venons de le voir, la voie du dosage colorimétrique par l'intermédiaire de nanoparticules d'or semble particulièrement prometteuse car elles semblent pouvoir donner une réponse spécifique à l'arsenic si elles sont utilisées en combinaison avec des molécules complexantes de structures chimiques bien choisies. Pour cela une molécule au mode d'action bio-inspiré, destinée au dosage de l'arsenic (III), sera synthétisée, puis des tests préliminaires de dosage par les nanoparticules d'or seront effectués.



RÉSULTATS ET DISCUSSION





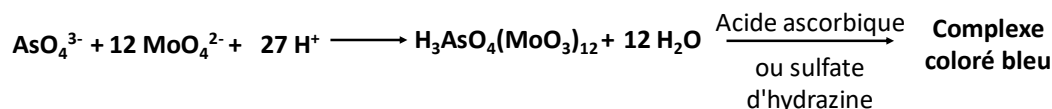
I. Dosage de l'arsenic (V) par formation d'un complexe coloré

Comme cela a été présenté dans la première partie, il est possible de doser l'arsenic (V) en formant un complexe intermédiaire entre ce dernier et le molybdate d'ammonium. Ce complexe, appelé structure de Keggin est ensuite soit réduit, soit mis à réagir avec un colorant.

A. Méthode au bleu de molybdène

La méthode au bleu de molybdène est une technique couramment utilisée pour la détermination rapide de concentrations en phosphate dans des échantillons. Compte tenu de la forte analogie chimique qu'il existe entre le phosphate et l'arsenic (V), cette méthode est également utilisée pour le dosage de ce dernier. Ainsi, il est uniquement possible de doser l'arsenic sous son état d'oxydation (+V) par cette méthode qui ne fonctionne pas avec l'état d'oxydation (+III). Le dosage réalisé sur des échantillons de 50 mL permet de déterminer en 10 minutes des concentrations de l'ordre de 750 ppb.¹⁶⁷

Le principe repose sur la formation *in situ* d'un complexe incolore entre l'arséniate et le molybdate qui, une fois réduit, prend une coloration bleue.



Nous avons réalisé une étude préliminaire consistant à refaire le protocole classique de la méthode au bleu de molybdène, afin d'en déterminer les limites. Pour cela, nous avons utilisé les conditions expérimentales des travaux de Tsang et al. avec des concentrations finales en réactifs dans l'échantillon de : (Figure 42)¹⁸⁷

- Molybdate d'ammonium à 3,4 mM
- Sels de tartrate d'antimoine et de potassium (PAT) à 20,7 μM
- Acide ascorbique à 11,4 mM
- Acide sulfurique à 0,1 M

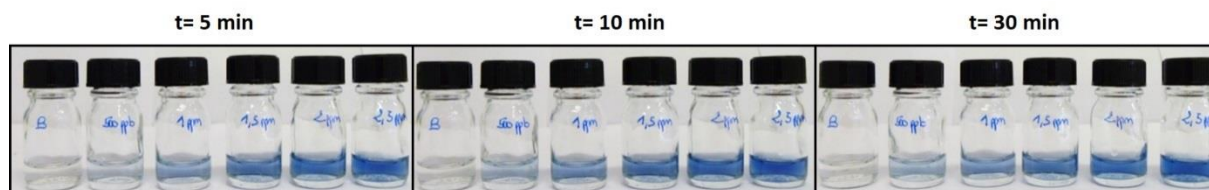


Figure 42. Dosage de l'arsenic en milieu acide sulfurique (0,1 M) sur une gamme 0 - 2,5 ppm à t= 5 min, 10 min et 30 min

L'intensité de la coloration bleue obtenue est dépendante de la concentration en arsenic. La couleur évolue progressivement jusqu'à 10 minutes puis se stabilise par la suite. En définitif, cette méthode permet donc de doser à l'œil nu, en 10 minutes de réaction, une gamme de concentration en arsenic qui débute à 500 ppb. En outre, des tests réalisés sur quelques interférents ont permis de mettre en lumière que seuls l'arsenic et le phosphate donnent cette coloration bleue contrairement aux autres éléments testés. (Tableau 4)

	t= 5 min	t= 10 min
Arsenic		
Phosphate		
Sulfate		
Nitrate		
Magnésium		
Mercure		

Tableau 4. Etude de quelques interférents concernant le dosage au bleu de molybdène en milieu acide sulfurique 0,1 M à t= 5 min et 10 min

Sur les 5 interférences testées, seul le phosphate donne une réponse colorée similaire à l'arsenic (V). Cette méthode présente l'avantage de donner une réponse colorée permettant un dosage à l'œil nu et en 10 minutes de différentes concentrations en arsenic. Elle présente également l'avantage d'utiliser des réactifs commercialisés à bas prix, simplifiant ainsi sa mise en œuvre. Les limites de la méthode au bleu de molybdène révélées par cette étude préliminaire sont doubles. La limite de détection est cinquante fois supérieure à celle que nous

souhaiterions atteindre (10 ppb). De plus, elle n'est pas spécifique de l'arsenic en réagissant notamment avec le phosphate.

Pour que cette méthode prometteuse puisse respecter le cahier des charges établi, il faudra d'une part abaisser le seuil de détection afin de déterminer à l'œil nu des concentrations de l'ordre de la dizaine de ppb. D'autre part, il faudra réussir à limiter l'impact des interférents.

B. Méthode utilisant le molybdate d'ammonium et un colorant

Comme cela a été expliqué précédemment, il est possible de remplacer l'étape de réduction du complexe hétéromolybdique par l'ajout d'un colorant de type triarylméthane (éthyl violet ou vert de malachite). (Figure 43)

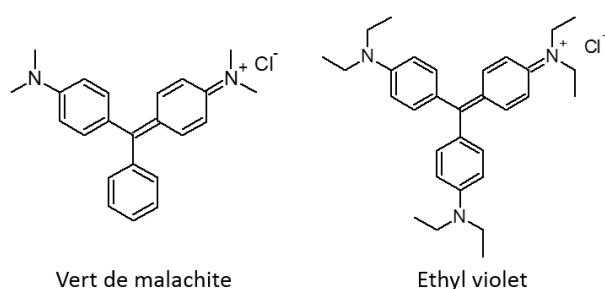


Figure 43. Structures chimiques du vert de malachite et de l'éthyl violet

Le vert de malachite et l'éthyl violet sont des colorants indicateurs de pH, en solution acide (pH 4) ils donnent respectivement une couleur vert-turquoise et violet alors qu'à des pH plus acides, ils donnent une coloration jaune peu intense. Ils ont la capacité de réagir de la même façon avec les complexes molybdiques en milieu acide, pour former des microparticules colorées qui finissent par précipiter au cours du temps et le colorant qui n'a pas réagi forme des carbinols incolores.

Une étude du comportement entre le vert de malachite seul et l'arsenic (V) en milieu acide que nous avons réalisé, a montré que le colorant ne réagissait pas directement sur l'arsenic. Il est donc nécessaire, tout comme pour la méthode au bleu de molybdène, de former des complexes arsénomolybdiques. (Figure 44)

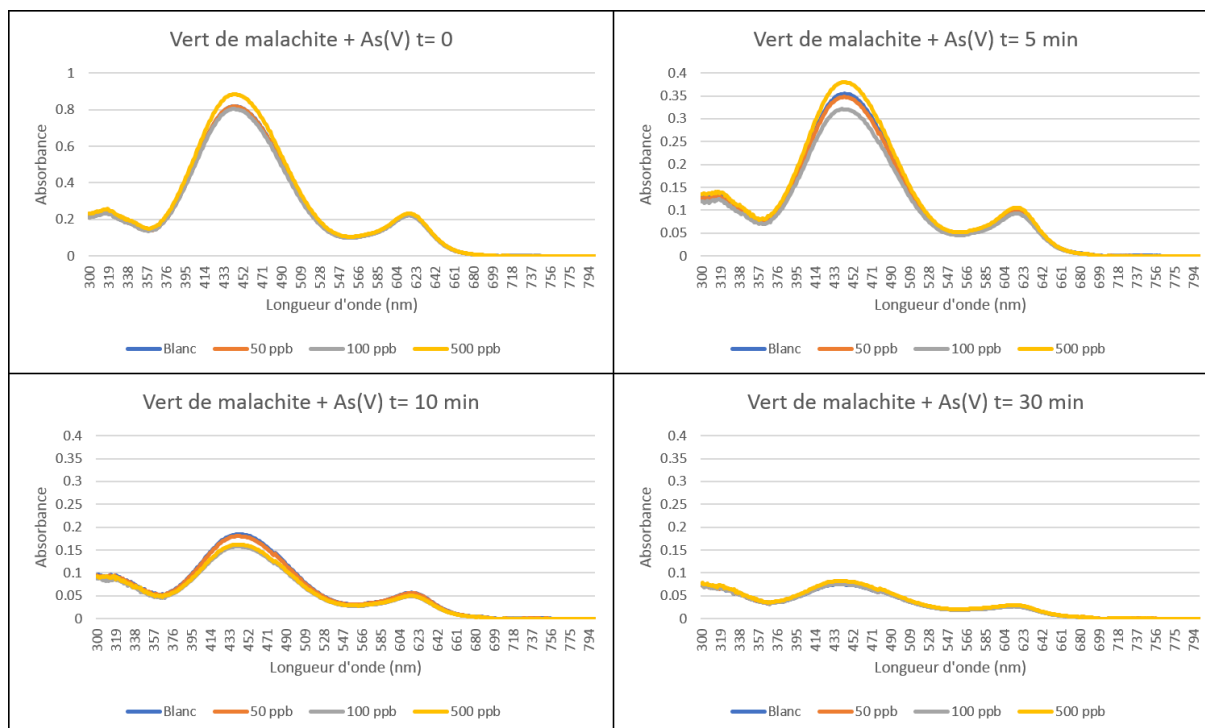


Figure 44. Etude spectrophotométrique du comportement entre le vert de malachite seul et l'arsenic (V) en milieu acide sans avoir former de complexes arsénomolybdiques à t= 0, 5 min, 10 min et 30 min

Du fait de sa structure chimique fortement conjuguée, le vert de malachite possède deux maximums d'absorption aux longueurs d'ondes de 440 et de 618 nm correspondant à deux états de protonation. Cette étude indique que l'acidité de l'échantillon entraîne une chute de l'intensité de la coloration au cours du temps se traduisant par un déplacement hypochrome de la bande spectrale. Ce phénomène est certainement dû à la formation de carbinols incolores.¹⁸⁸ (Figure 45)

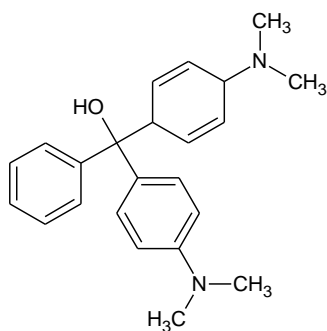


Figure 45. Forme carbinol incolore du vert de malachite¹⁸⁸

Dans l'optique d'une simplification de protocole et d'obtenir une intensité de couleur la plus importante possible, s'affranchir d'une étape d'acidification des échantillons pourrait être une option envisageable. Cependant, des tests réalisés avec l'éthyl violet sur des échantillons arséniés en présence de molybdate d'ammonium à pH neutre, pH 2 et pH 1 ont montrés que l'acide jouait un rôle très important dans la méthode de dosage. (Figure 46)

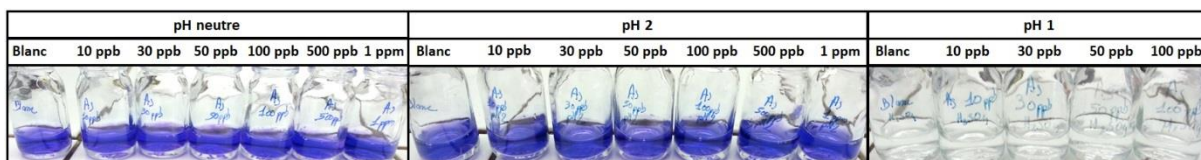


Figure 46. Dosage de l'arsenic (V) par le molybdate d'ammonium et l'éthyl violet à pH neutre, à pH 2 et à pH 1

Les échantillons arséniés et l'éthyl violet sont préparés dans de l'eau MilliQ ou dans de l'acide sulfurique à 0,01 M ou à 0,1 M. Lorsque le pH est inférieur ou égal à 1, l'éthyl violet se situe à une zone de virage qui ne donne pas de coloration aux échantillons quel que soit la concentration en arsenic (V). A l'inverse, lorsque le pH est supérieur ou égal à 2, l'éthyl violet donne une coloration violette intense aux échantillons ce qui empêche l'observation d'une gamme. Afin de pouvoir obtenir une gamme de coloration selon la concentration en arsenic, il faudrait donc que le pH des échantillons soit préalablement fixé entre 1 et 2.

Dans l'optique de développer une méthode standardisée consistant à ajouter des quantités prédéfinies en réactifs dans l'échantillon, les variations de pH des eaux naturelles selon les lieux de collecte pourraient poser problème. Par exemple, une eau initialement plus acide que la moyenne donnerait après l'ajout d'une quantité d'acide prédéfinie, un échantillon au pH inférieur à 1 qui ne réagirait pas.

D'après les travaux de l'équipe de Morita présentés dans la première partie, il est possible de réaliser les dosages sur des échantillons qui ont été acidifiés après l'ajout du molybdate d'ammonium. C'est-à-dire d'abaisser le pH après avoir ajouté les réactifs dans l'échantillon, contrairement à la méthode précédente où l'acide était ajouté avant les réactifs. Bien que la concentration finale en acide dans l'échantillon soit de 0,4 M, cela donne tout de même une coloration dépendante de la concentration en arsenic. Cela permet ainsi de s'affranchir de l'étape préalable d'acidification des échantillons qui entraîne des erreurs de mesure.

Afin de vérifier qu'il était possible de doser l'arsenic par une forte acidification intervenant après l'ajout de molybdate d'ammonium, nous avons réalisé le test avec les mêmes conditions expérimentales de l'équipe de Morita utilisant l'éthyl violet comme colorant. (Figure 47)

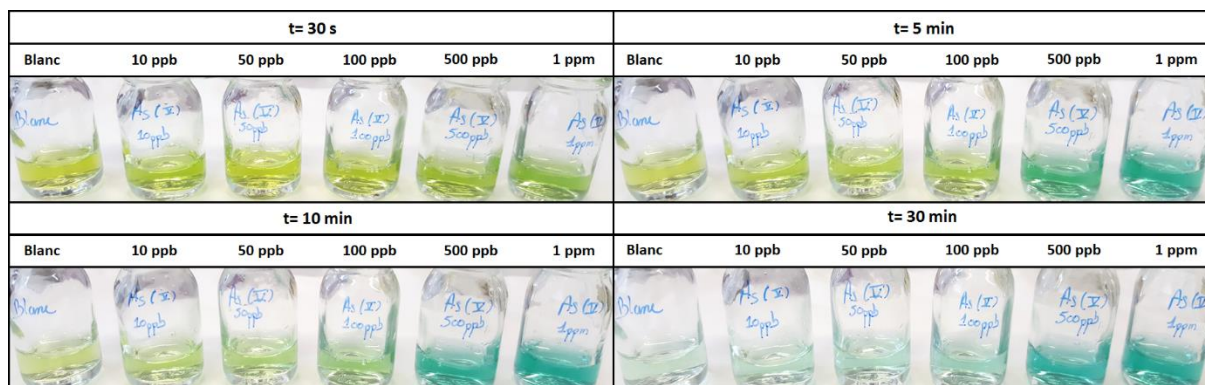


Figure 47. Dosage de l'arsenic (V) de 0 à 1 ppm à t= 30 s, 5 min, 10 min et 30 min par ajout successif de molybdate d'ammonium, d'acide chlorhydrique puis d'éthyl violet

Au moment de l'ajout de l'éthyl violet, ce dernier donne une couleur jaune/vert à l'échantillon, puis un changement de coloration se fait au cours du temps. Cette coloration se dissipe progressivement au cours du temps pour être remplacée par une coloration bleu/vert en approximativement 30 minutes. L'intensité observée de cette couleur est dépendante de la concentration en complexes arsénomolybdiques. Ainsi, après 30 minutes, l'échantillon de référence est quasiment incolore alors que l'échantillon contenant 1 ppm d'arsenic (V) donne une couleur bleu turquoise intense.

Cette technique permet de discriminer à l'œil nu des teneurs de 50 ppb en arsenic (V) en 30 minutes de réaction. L'utilisation d'un colorant de type triarylméthane a ainsi permis d'abaisser la limite de détection d'un facteur 10 (500 → 50 ppb). Néanmoins, l'amélioration de la sensibilité s'est faite au détriment du temps d'analyse qui est passé de 10 à 30 minutes.

Un travail complémentaire d'optimisation, consistant à abaisser les temps de réaction de la méthode utilisant du molybdate d'ammonium et un colorant triarylméthane a alors été réalisé.

I. Optimisation de protocole

Concernant le dosage au bleu de molybdène, comme cela a été présenté dans la première partie, l'utilisation de réducteur métallique comme l'étain Sn(II) ou l'antimoine Sb(III) permet de grandement accélérer la réduction de la structure de Keggin.^{156,157,158} Pour rappel, l'hypothèse avancée par Going et Eisenreich est que l'accélération de la vitesse de réduction en présence d'antimoine Sb(III) peut être due soit à un changement structurel du complexe d'hétéropolyacides qui facilite la réduction, soit qu'il réduit le complexe en se transformant en Sb(V), pour être ensuite immédiatement réduit par l'acide ascorbique en Sb(III).¹⁵⁸

Si l'utilisation d'antimoine permet effectivement un changement structurel du complexe arsénomolybdique qui augmente sa réactivité, alors peut-être qu'il est possible qu'il puisse accélérer la formation de particules entre le colorant et le complexe arsénomolybdique.

Afin de le vérifier, nous avons réalisé des tests en présence de sels de tartrate d'antimoine et de potassium avec les proportions habituellement utilisées lors du dosage au bleu de molybdène. (Figure 48)



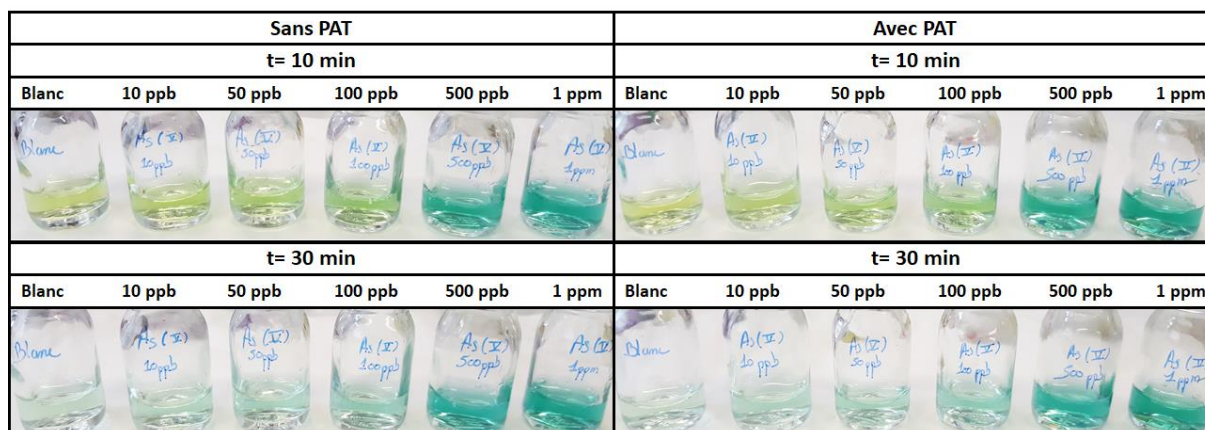


Figure 48. Dosage de l'arsenic (V) de 0 à 1 ppm à t= 10 min et 30 min par ajout de molybdate d'ammonium, d'acide chlorhydrique et d'éthyl violet en absence ou en présence de 80 μ M de tartrate d'antimoine et de potassium (PAT)

La gamme obtenue est identique, qu'il y ait ou pas présence de sels d'antimoine. Cela indique que l'accélération de la réaction lors du dosage au bleu de molybdène, serait plutôt due au caractère réducteur de l'antimoine et non pas à un changement structural du complexe arsénomolybdique. La réduction du complexe n'intervenant pas dans cette méthode, l'utilisation du sel de tartrate d'antimoine et de potassium n'a donc pas permis d'accélérer la cinétique de décoloration, un autre moyen de descendre à un temps d'analyse de 10 minutes a alors été imaginé.

D'après la littérature, l'éthyl violet développe des microparticules avec la structure de Keggin formée entre l'arsenic (V) et le molybdate. Les vitesses d'ajout des réactifs font que le molybdate d'ammonium et le colorant sont quasiment ajoutés en même temps. Le colorant réagirait donc avec les complexes qui se forment progressivement au cours du temps. Si l'on émet l'hypothèse que le colorant interfère avec la formation des complexes arsénomolybdiques, cela pourrait expliquer l'augmentation du temps de réaction.

En partant de cette supposition, il serait possible d'accélérer la cinétique de décoloration en faisant réagir au préalable le molybdate d'ammonium avec l'arsenic (V) avant d'ajouter le colorant.

La Figure 49 montre les résultats obtenus avec un temps de contact de 5 minutes entre l'arsenic (V) et le molybdate d'ammonium avant l'ajout d'éthyl violet ou de vert de malachite. (Figure 49)

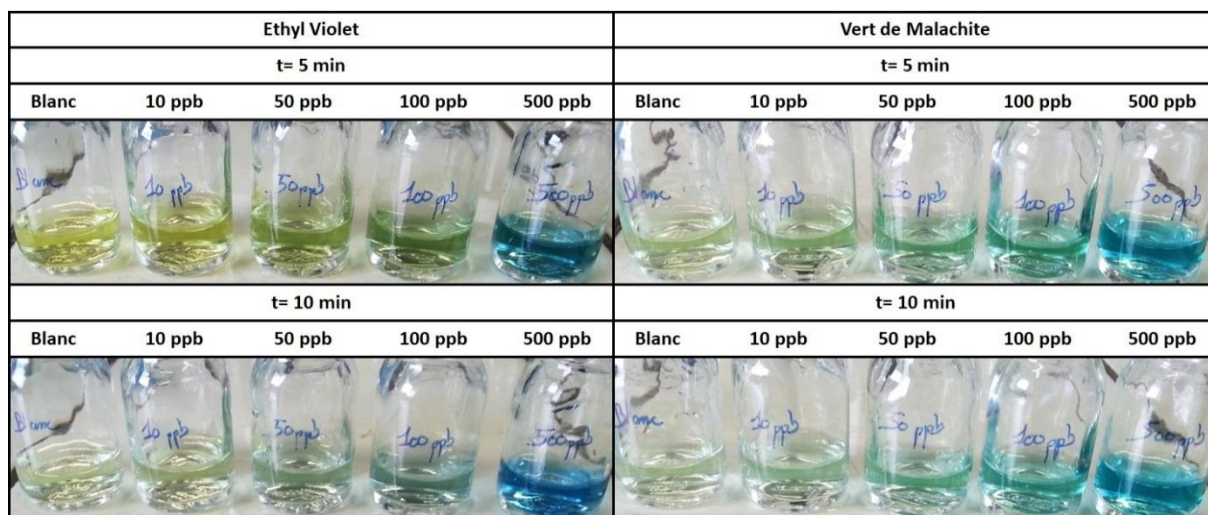


Figure 49. Dosage de l'arsenic (V) de 0 à 500 ppb à t= 5 min et 10 min après l'ajout d'éthyl violet ou de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate d'ammonium de 5 min)

Le fait de préalablement former les complexes arsénomolybdiques pendant 5 minutes avant l'ajout du colorant, permet de diminuer grandement le temps de décoloration, conduisant à l'observation d'une gamme à partir de 5 minutes. En effet, la gamme obtenue en 10 minutes de décoloration avec cette nouvelle méthode est similaire à celle obtenue en 30 minutes avec la méthode précédente. De plus, il est à noter que le vert de malachite donne de meilleurs résultats que l'éthyl violet lors d'un dosage en solution. Avec cette nouvelle méthode, nous avons pu diminuer les temps de réaction en permettant la détection de quelques dizaines de ppb d'arsenic (V) à l'œil nu en 10 minutes (5 minutes de contact entre l'arsenic(V) et le molybdate d'ammonium + 5 minutes de décoloration).

Le changement de couleur des différents échantillons se traduit en spectrophotométrie UV-Visible par une forte baisse de l'absorbance à 440 nm et par une baisse moins marquée de l'absorbance à 618 nm. (Figure 50)

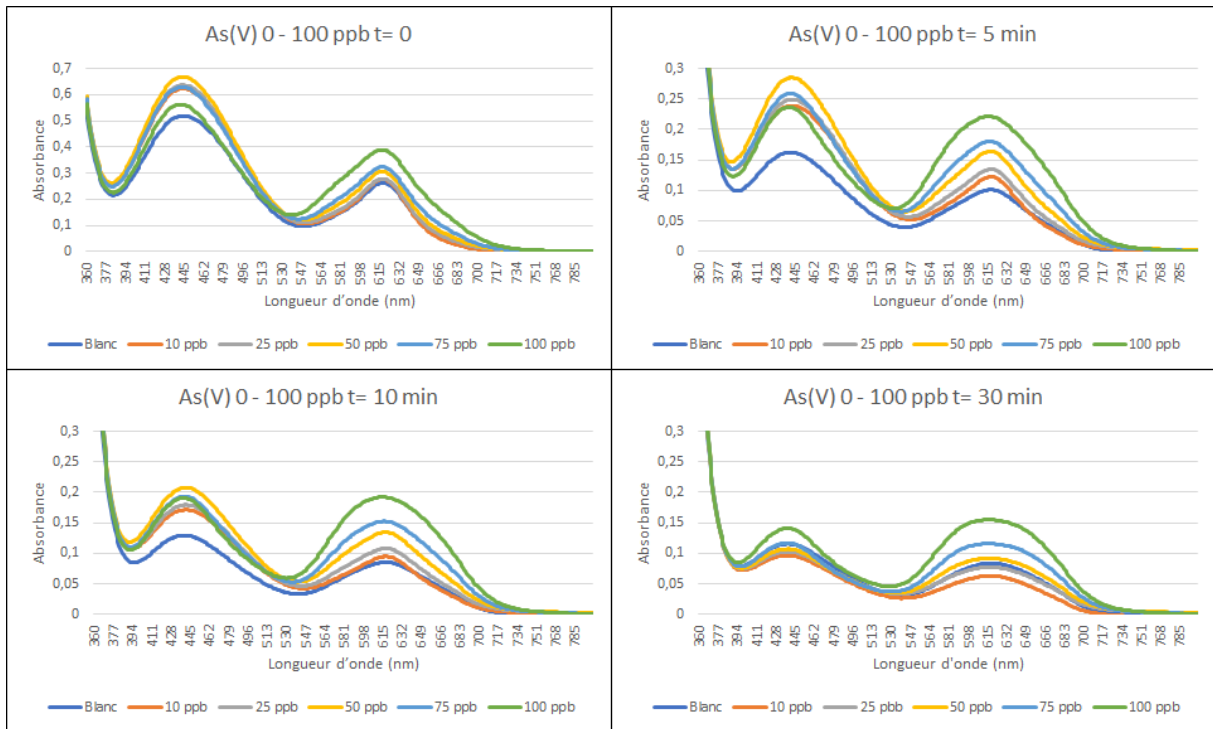


Figure 50. Suivi en spectrophotométrie UV-Vis d'une gamme en arsenic (V) de 0 à 100 ppb à t= 0, 5 min, 10 min et 30 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate d'ammonium de 5 min)

L'évolution de l'absorbance observée au cours du temps à 440 nm ne permet pas de déterminer les concentrations en arsenic (V) de la gamme, du fait des faibles variations de valeur. (Figure 51)

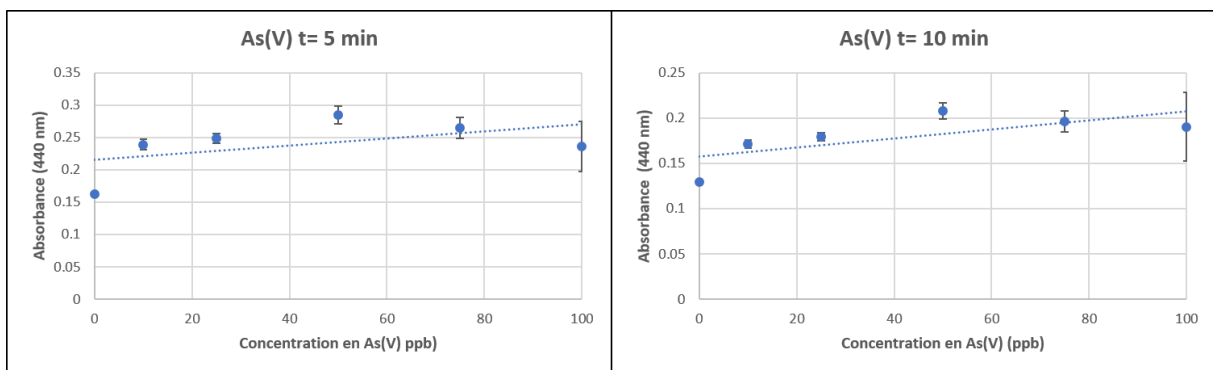


Figure 51. Analyse de la régression linéaire des valeurs d'absorbance à 440 nm sur une gamme en arsenic (V) de 0 à 100 ppb à t= 5 min et 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate de 5 min)

Les valeurs d'absorbance à 440 nm pour des concentrations en arsenic (V) de 10, 25, 75 et 100 ppb sont en effet pratiquement similaires ce qui empêche d'en sortir une tendance. A *contrario*, les valeurs d'absorbance observées à 618 nm sont clairement identifiables selon la concentration en arsenic (V). Ainsi, les études de linéarité à 618 nm révèlent qu'il est possible de déterminer avec précision la teneur en arsenic (V) dans l'échantillon aux temps de 5 et 10 minutes. (Figure 52)



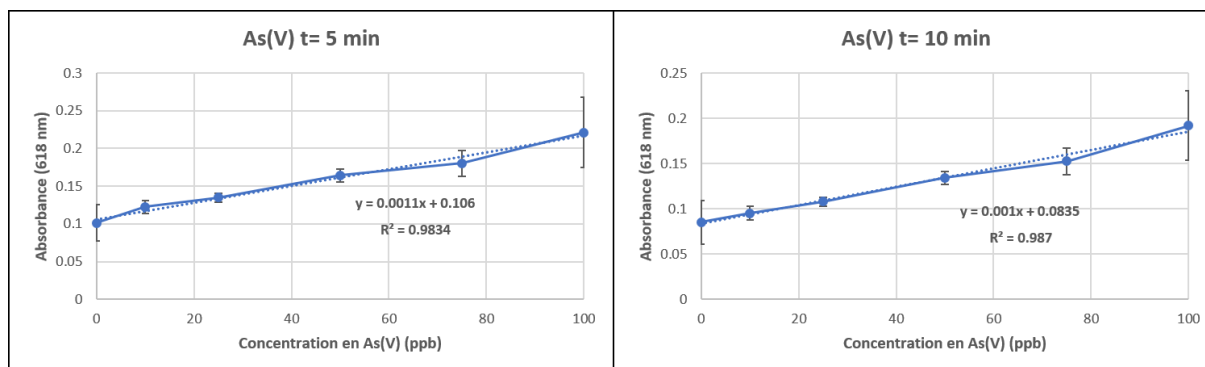


Figure 52. Analyse de la régression linéaire des valeurs d'absorbance à 618 nm sur une gamme en arsenic (V) de 0 à 100 ppb à t= 5 min et 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques (temps de contact entre As(V) et le molybdate de 5 min)

Les valeurs des coefficients de corrélation R^2 proches de 1 confirment l'évolution linéaire de la réponse à 618 nm en fonctions de la concentration en arsenic (V). Les mesures à 5 et à 10 minutes après l'ajout du vert de malachite sont celles qui possèdent ainsi les meilleures résolutions. En prenant en compte les 5 minutes de réaction préalable entre le molybdate d'ammonium et l'arsenic (V), cela correspond *in fine* à un temps d'analyse situé entre 10 et 15 minutes.

Cette nouvelle méthode que nous avons développée se basant sur la formation des complexes arsénomolybdiques avant l'ajout du colorant permet la mesure des concentrations en arsenic (V) de l'ordre de la dizaine de ppb visées. Cependant, la détermination à l'œil nu des concentrations aux alentours de 10 ppb s'avère délicate. L'utilisation d'un spectrophotomètre UV-Visible se révèle nécessaire pour lever toute ambiguïté de détection à l'œil nu. Néanmoins, bien qu'il existe des modèles miniaturisés portables, il serait souhaitable de ne pas utiliser ce type de matériel coûteux et de trouver une solution plus simple.

La difficulté de détermination à l'œil nu de faibles teneurs en arsenic (V) est due à la forte dilution de la coloration en solution. S'il était possible de concentrer la coloration obtenue lors de ce dosage, il serait envisageable de surmonter cette difficulté. Lors de ses travaux sur le dosage de l'arsenic par la méthode au bleu de molybdène, l'équipe d'Okazaki a pu concentrer la coloration par rétention des complexes arsénomolybdiques réduits sur une membrane filtrante d'acétate de cellulose.¹⁷⁰ Il est donc possible de concentrer les structures de Keggin réduites sur un filtre papier, mais cela n'a encore jamais été essayé avec la méthode au molybdate d'ammonium et au vert de malachite. Le travail qui suit présente les essais de rétention des particules colorées formées entre le complexe arsénomolybdique et le colorant.

2. Développement d'une nouvelle méthode visuelle de dosage de l'arsenic par une membrane filtrante

Rappelons que l'arsenic, lorsqu'il est sous son état d'oxydation (+III), ne possède plus la capacité de former des complexes arsénomolybdiques et qu'ainsi, il ne peut pas être doser.

Cependant, il est possible d'oxyder rapidement l'arsenic (III) en arsenic (V) pour ensuite le doser par la méthode au bleu de molybdène. De plus, la forte analogie chimique qui existe entre l'arsenic (V) et le phosphate entraîne par conséquent des réponses surestimées lorsque ce dernier est présent dans l'échantillon. Lors de ses travaux, l'équipe d'Okazaki s'est basée sur ces deux constatations pour développer une méthode permettant de doser l'arsenic (III). Le principe consiste à éliminer indifféremment le phosphate et l'arsenic (V) pour ne récupérer que l'arsenic (III). (Figure 53)

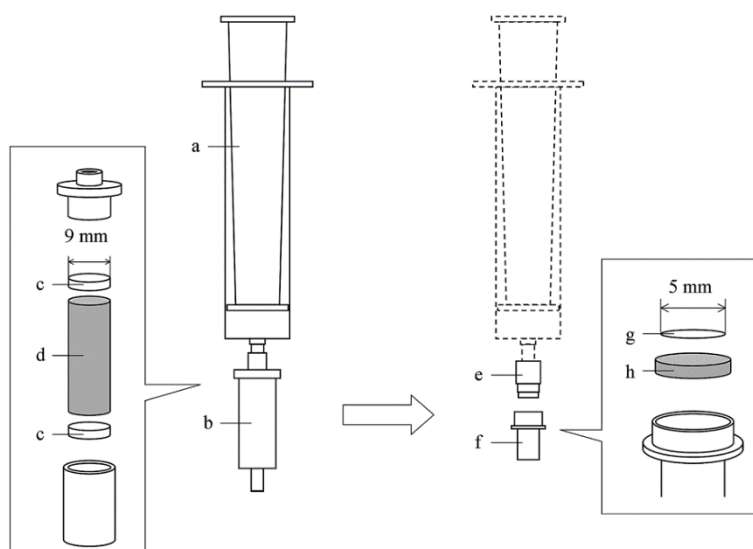


Figure 53. Schéma du montage utilisé par l'équipe d'Okazaki. a) seringue en polypropylène ; b) cartouche en polypropylène ; c) fritté ; d) CaCO_3 en poudre ; e) adaptateur en polypropylène ; f) contenant de la membrane filtrante ; g) membrane filtrante ; h) fritté supportant la membrane¹⁶⁹

La méthode développée par l'équipe d'Okazaki pour doser l'arsenic (III) consiste ainsi à éliminer l'arsenic (V) et le phosphate en aspirant 10 mL d'échantillon au travers d'une cartouche composée de 500 mg de carbonate de calcium (CaCO_3). La cartouche est ensuite retirée et l'échantillon est acidifié en prélevant 200 μL d'acide sulfurique 2,5 M dans la seringue. Puis l'arsenic (III) est ensuite oxydé en arsenic (V) en deux minutes en prélevant du permanganate de potassium 0,3%. Les complexes arsénomolybdiques réduits sont ensuite formés en prélevant et en laissant réagir pendant 15 minutes, 900 μL d'un mélange de molybdate d'ammonium, de tartrate d'antimoine et de potassium et de sulfate d'hydrazine. Ensuite, 100 μL de bromure de *n*-dodécyltriméthylammonium (0,1% w/v) sont prélevés dans la seringue pour former un ion associé avec le bleu de molybdène. La seringue est ensuite connectée à l'embout collecteur et l'échantillon est passé au travers d'une membrane filtrante. La mesure de la concentration en arsenic (III) se fait par comparaison à l'œil nu de la couleur obtenue avec un abaque proposé. (Figure 33)

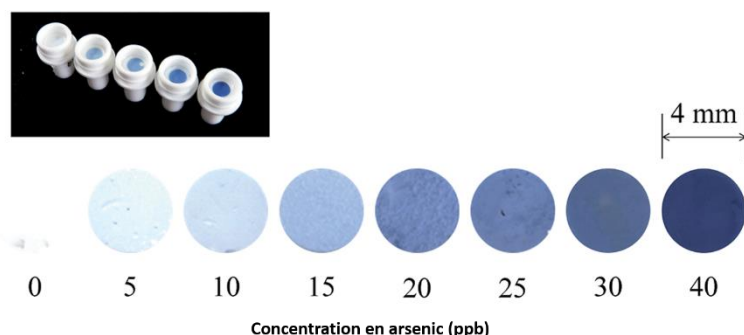


Figure 33. Variation de couleur par rétention de complexes arsénomolybdiques par une membrane filtrante d'acétate de cellulose (0,8 µm) à différentes concentrations en arsenic

La nature de la membrane filtrante utilisée peut influencer la rétention de coloration. En effet, les membranes composées d'ester ou d'acétate de cellulose sont celles qui ont été définies comme ayant la meilleure capacité de rétention du bleu de molybdène.¹⁶⁹

En s'inspirant du travail réalisé par l'équipe d'Okazaki, nous avons imaginé un montage composé d'un disque de membrane filtrante contenu entre deux disques de frittés en polyéthylène, eux-mêmes contenus dans une précolonne Chromabond® de chromatographie flash. Cette précolonne peut être connectée à une seringue. (Figure 54)

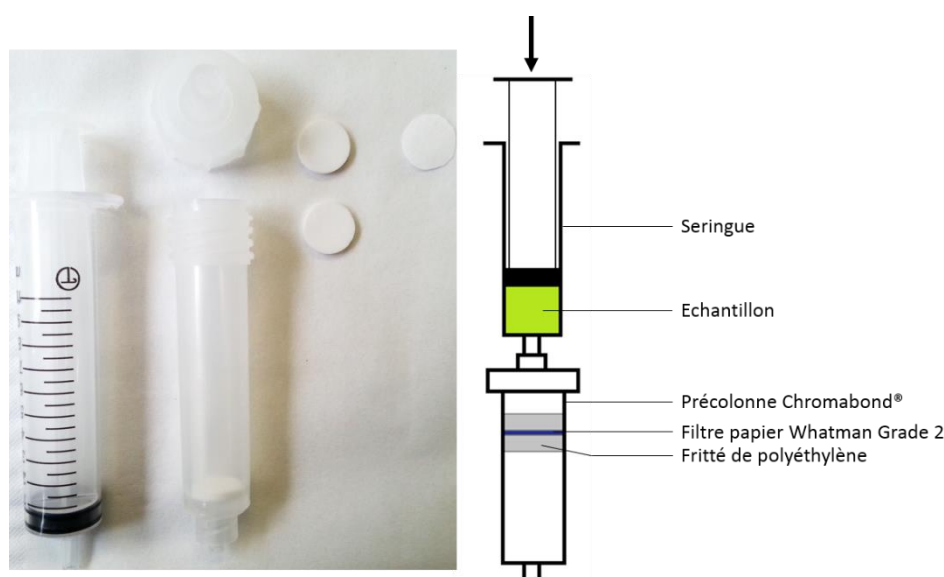


Figure 54. Matériel utilisé pour la filtration des particules de complexes arsénomolybdiques/vert de malachite et schéma du montage

Le disque de membrane filtrante est un disque de papier composé de cellulose traitée afin de résister aux acides. Nous avons utilisé des filtres papier Whatman Grade 2 et 41 possédant respectivement une porosité de 8 et 20 µm.

L'objectif est ici de transposer la méthode que nous avons optimisée en solution à la méthode de rétention de coloration développée par l'équipe d'Okazaki. Le principe étant de retenir la coloration obtenue en solution sur un support solide, il est préférable de passer l'échantillon

au travers de la membrane filtrante au moment où elle est la plus forte. C'est-à-dire juste après l'ajout du vert de malachite, avant que la cinétique de décoloration n'entre en jeu.

La nouvelle méthode que nous avons développée consiste ainsi à prélever un échantillon dans une seringue en polypropylène, à l'acidifier, à ajouter du molybdate d'ammonium et laissé à réagir pendant 5 minutes. Après ajout de vert de malachite, la seringue est branchée à une cartouche contenant un disque de papier Whatman. L'échantillon est passé à travers le filtre, la cartouche est finalement ouverte et le disque de papier filtre est récupéré pour analyse visuelle. (Figure 55)

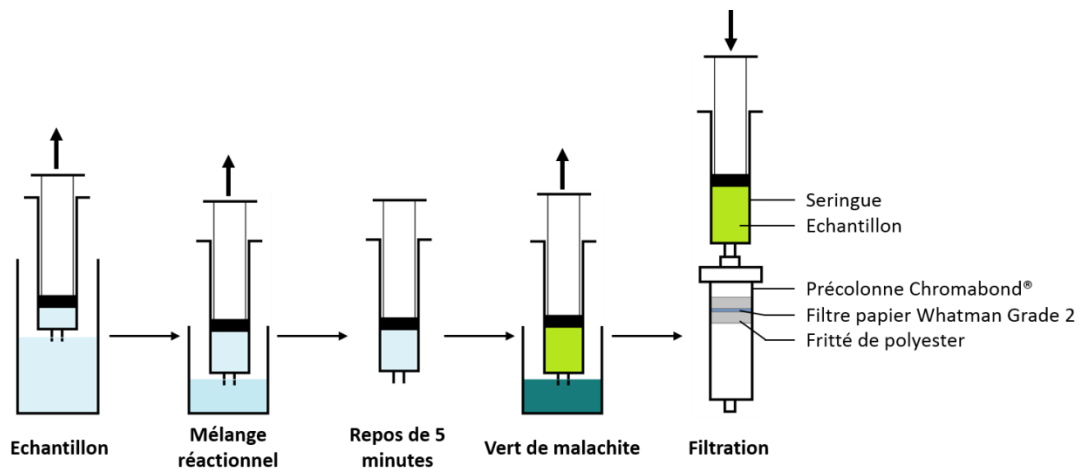


Figure 55. Schéma du protocole de dosage de l'arsenic (V) par rétention des particules colorées formées lors du dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite, au travers d'une membrane filtrante de porosité 8 µm

Les analyses en spectrophotométrie UV-Visible des filtrats indiquent que les particules formées entre les complexes arsénomolybdiques et le vert de malachite sont en parties retenues par le disque de papier lors du passage de l'échantillon à travers la précolonne. (Figure 56)

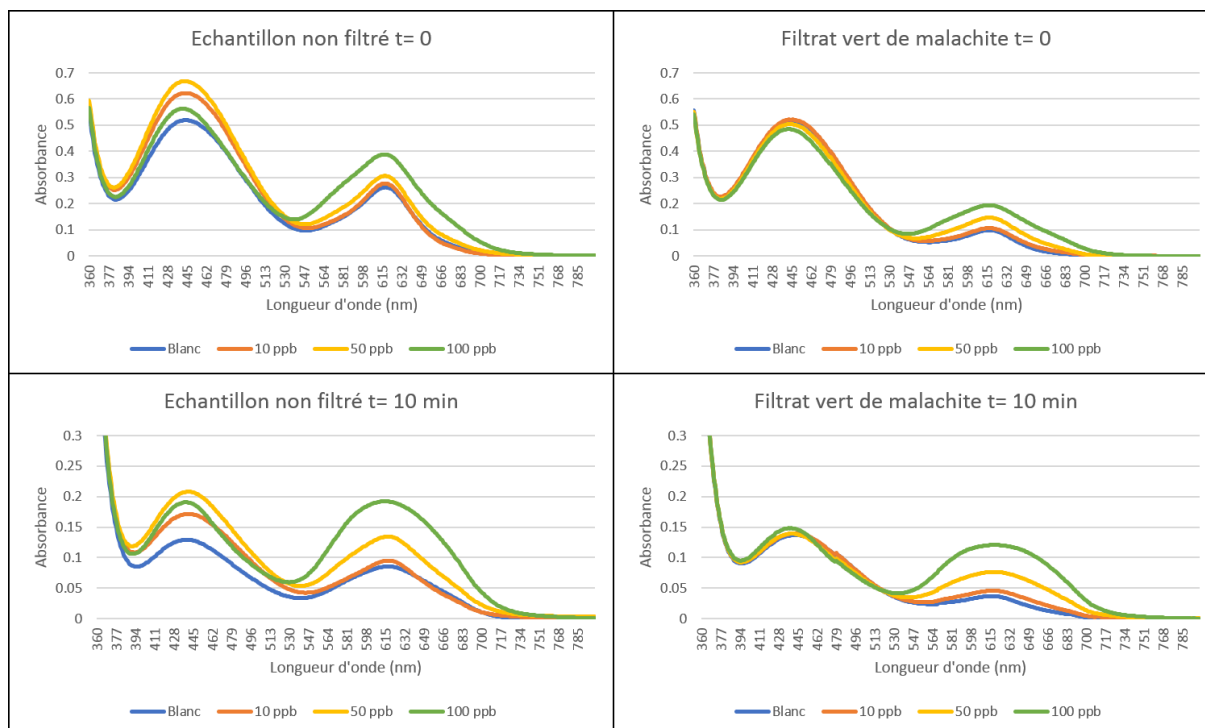


Figure 56. Analyses en spectrophotométrie UV-Vis. des filtrats d'échantillons passés au travers d'une membrane filtrante de papier Whatman Grade 2 après le protocole au molybdate d'ammonium et au vert de malachite en comparaison d'échantillons non filtrés ayant suivi le même protocole

Pour les échantillons passés au travers de la membrane filtrante, l'intensité de l'absorbance aux maximums d'absorption est environ inférieure d'un facteur deux par rapport aux échantillons de référence.

Une fraction des particules formées entre les complexes arsénomolybdiques et le vert de malachite passe dans le filtrat qui se colore légèrement. Les autres sont retenues par la membrane filtrante qui se colore en bleu et dont l'intensité de coloration dépend de la concentration en arsenic (V). C'est le papier Whatman Grade 2 qui a donné les meilleures capacités de rétention de la coloration. (Figure 57)

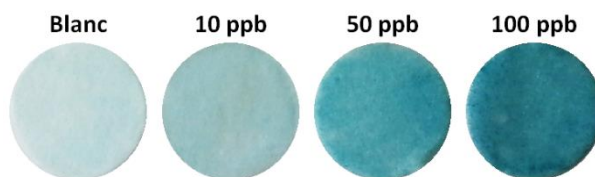


Figure 57. Coloration de papier filtre Whatman Grade 2 (8 µm) par rétention de particules formées entre les complexes arsénomolybdiques et le vert de malachite

Afin d'avoir une coloration suffisante du filtre, il a fallu comme dans la littérature, augmenter les volumes d'échantillons. Un volume de 10 mL permet d'avoir une coloration correcte du filtre pour faire une différence à l'œil nu entre la référence et une concentration en arsenic (V) de 10 ppb.

En plus d'abaisser fortement le seuil de détection à l'œil nu, l'utilisation d'une membrane filtrante donne donc l'avantage supplémentaire de s'affranchir du temps d'attente de 10 minutes, nécessaire pour l'obtention d'une gamme lors du dosage en solution.

Cette nouvelle méthode de dosage de l'arsenic utilisant une membrane filtrante que nous avons développée, permet *in fine* de quantifier à l'œil nu des teneurs entre 0 et 100 ppb. Le dosage se fait en seulement 5 minutes tout en permettant de détecter les concentrations seuils en arsenic de 10 et 50 ppb fixées par l'OMS. Cette méthode présente également l'intérêt d'utiliser des réactifs qui ne sont pas considérés comme dangereux par la commission des normes, de l'équité, de la santé et de la sécurité du travail (CNESST), sauf en cas d'ingestion. Elle respecte donc un grand nombre des conditions du cahier des charges que ce soit pour le temps d'analyse, l'absence de formation de produits toxiques, la limite de détection et l'obtention d'une gamme entre 0 et 100 ppb. Cependant, elle ne correspond pas à une méthode simple à appliquer pour une personne novice dans les manipulations de dosage. Lors de l'étude de marché, les prospects ont exprimé leur préférence pour un dosage simple sous le format de bandelette. Nous venons de voir qu'il est possible de retenir les complexes colorés par un filtre papier, mais est-il possible de former les complexes directement dans le papier ?

3. Méthode supportée sur format papier

Le transfert d'une méthode de dosage en solution à une méthode de dosage sur un support solide permet de grandement réduire les temps d'analyse ainsi que le nombre de manipulations dû à l'ajout des réactifs. Le format bandelette est le support physique le plus simple à utiliser pour un manipulateur. L'entreprise Novassay est familière à ce format, en effet elle commercialise sous le nom d'Uranalyze®, des bandelettes tests colorimétriques permettant le dosage de l'uranium entre 0 et 100 ppm en 60 secondes.¹⁸⁹ (Figure 58)

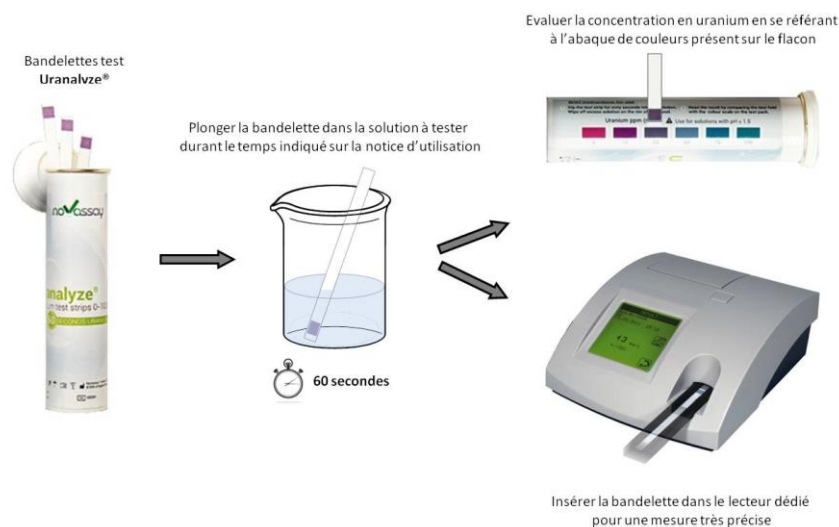


Figure 58. Principe d'utilisation des bandelettes tests colorimétriques Uranalyze® commercialisées par Novassay destinées au dosage de l'uranium en solution acide

Le protocole d'utilisation consiste simplement à immerger la bandelette dans un échantillon acide ($\text{pH} < 1$) de 5 mL pendant 60 secondes. Puis de comparer la couleur obtenue avec



l'abaque de couleur fournie sur le tube afin de déterminer à l'œil nu la concentration en uranium. Dans le cas où l'utilisateur aurait besoin d'une valeur numérique, Novassay commercialise un lecteur de bandelette basé sur la colorimétrie permettant d'obtenir une valeur plus précise de la concentration en uranium.¹⁹⁰

En s'inspirant des connaissances et du savoir-faire de Novassay dans l'élaboration de bandelettes tests colorimétriques, différents types de formulation ont été essayés pour adapter la technique au bleu de molybdène au format bandelette.

a) Dosage de l'arsenic par la technique au bleu de molybdène supportée sur format bandelette

L'élaboration d'une bandelette consiste à plonger un carré de papier filtre Whatman Grade 41 (1x1 cm) dans un bain d'imprégnation, de sécher ce carré puis de le coller sur une bandelette de PVC transparent (7x1 cm). Le bain d'imprégnation dont la formulation a été développée et brevetée par Novassay est constitué d'un solvant, d'un agent mouillant, d'un agent stabilisant, d'un agent homogénéisant et d'un agent actif.¹⁸⁹

Dans le cas de la formulation du bain d'imprégnation concernant la méthode au bleu de molybdène, l'agent actif est constitué de molybdate d'ammonium et de tartrate d'antimoine et de potassium. Une fois que les bandelettes sont fabriquées, le protocole consiste ensuite à les plonger dans des échantillons de 5 mL au pH inférieur à 1 pendant 2 minutes. Puis de les sécher sur du papier absorbant avant d'ajouter une goutte (50 µL) d'acide ascorbique à 80 mM sur les carrés de papier. (Figure 59)

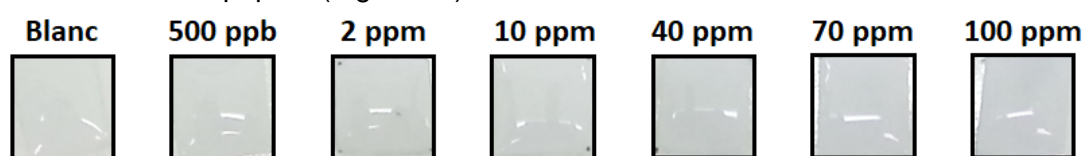


Figure 59. Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au bleu de molybdène à t= 5 min après l'ajout de l'acide ascorbique

Les tests ont montré que la méthode au bleu de molybdène classique n'était pas transférable au dosage sous format de bandelette test. Même à de très fortes concentrations de l'ordre de la centaine de ppm, le papier ne se colore pas alors qu'une coloration bleue était attendue. Cela signifie qu'il n'y a pas de réduction de la structure de Keggin, nous avons essayé de forcer la réduction en augmentant les concentrations en acide ascorbique, mais ça n'a pas fonctionné. Cela peut être dû à différentes raisons comme le fait que le molybdate d'ammonium ou que le tartrate d'antimoine et de potassium ne sont pas suffisamment retenus par le support papier qui les relargue lors du contact avec l'échantillon. Ou bien qu'il y ait des interactions avec le support papier qui empêche soit la formation, soit la réduction de la structure de Keggin.

b) Dosage de l'arsenic par la technique au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet/vert de malachite supportée sur format bandelette

Les tests en solution présentés précédemment ont indiqué que la méthode au molybdate d'ammonium couplée à un colorant de type triarylméthane donnait de meilleurs résultats en termes de détection que la technique au bleu de molybdène classique. Concernant le transfert de cette méthode au format bandelette, l'agent actif du bain d'imprégnation est ici composé de molybdate d'ammonium et d'un colorant, l'éthyl violet ou le vert de malachite. Après imprégnation, les bandelettes à l'éthyl violet possèdent une couleur violette uniforme et celles au vert de malachite, une couleur turquoise uniforme. (Figure 60)

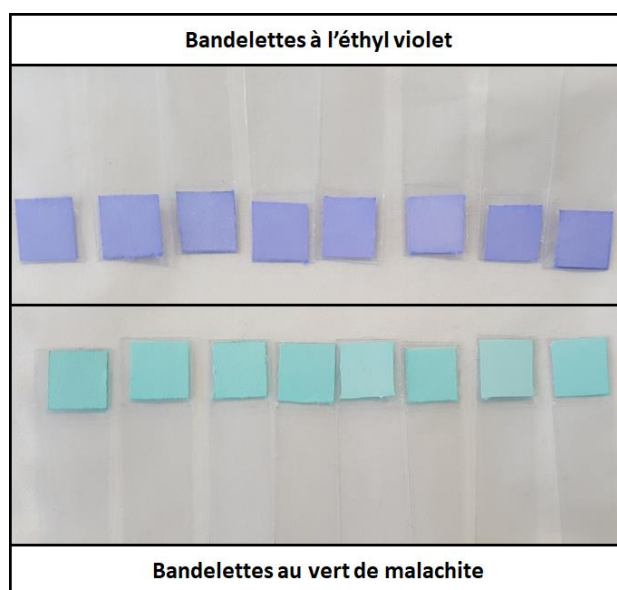


Figure 60. Photo présentant les bandelettes à l'éthyl violet en haut et les bandelettes au vert de malachite en bas

Une fois que les bandelettes sont fabriquées, elles sont plongées dans des échantillons de 5 mL au pH inférieur à 1 pendant 60 secondes, puis elles sont égouttées sur du papier absorbant. (Figure 61)

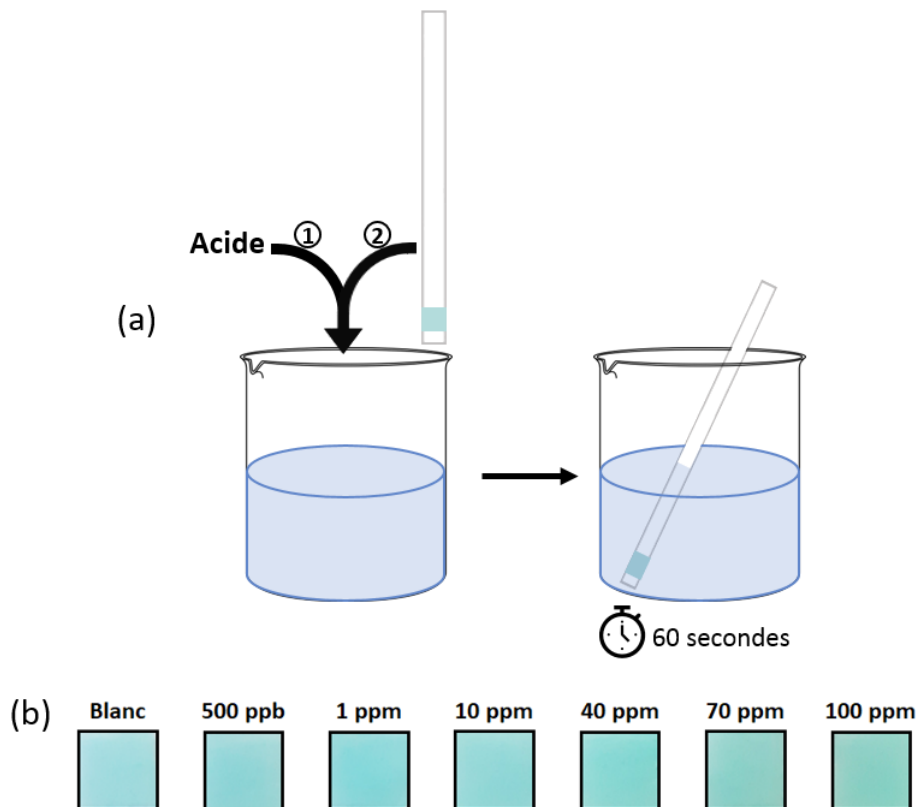


Figure 61. (a) Schéma du protocole de dosage par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à un colorant triarylméthane. (b) Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et au vert de malachite après 60 secondes de contact

L'évolution de la coloration obtenue avec les bandelettes au vert de malachite est très peu marquée avec l'augmentation de la concentration en As(V). La seule observation possible est un assombrissement de la couleur turquoise de l'échantillon à 100 ppm par rapport à la référence, mais il n'est pas réellement possible de faire le *distinguo*.

Contrairement aux bandelettes au vert de malachite, celles à l'éthyl violet donnent quant à elles une réponse vis-à-vis de l'arsenic (V). (Figure 62)

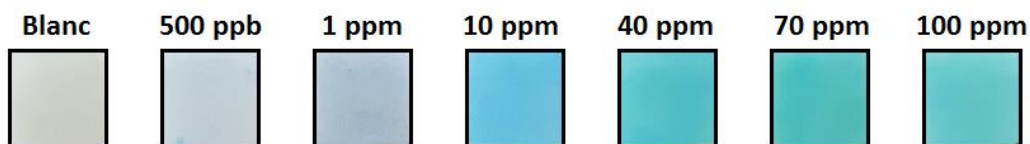


Figure 62. Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact

Les bandelettes à l'éthyl violet réagissent avec l'arsenic (V) en donnant une gamme de couleur allant du blanc cassé au turquoise en passant par le bleu. Ce qui permet d'affirmer qu'il est donc possible de former *in situ* les complexes colorés, directement dans la matrice papier. Ces bandelettes permettent de déterminer très facilement et très rapidement (60 secondes) des concentrations en arsenic (V) à l'échelle de la dizaine de ppm. Toutefois, après des concentrations en arsenic (V) de 40 ppm, il est difficile de bien différencier les nuances de couleur du fait d'une saturation de la coloration. La gamme de dosage peut cependant être resserrée entre 0 et 10 ppm. (Figure 63)

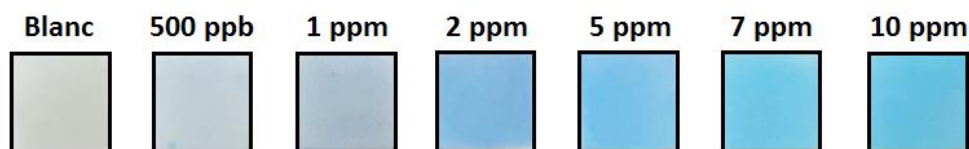


Figure 63. Dosage de l'arsenic (V) en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 10 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact

Entre 0 et 10 ppm, les bandelettes à l'éthyl violet donnent une coloration différente pour chaque concentration en arsenic (V). La méthode au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet supportée sur papier permet ainsi de doser à l'œil nu des concentrations comprises entre 0 et 10 ppm avec une limite de détection située aux alentours de 500 ppb. Contrairement au dosage de l'arsenic (V) en solution, c'est ici l'éthyl violet qui donne les meilleurs résultats lors du dosage en bandelette.

Le transfert de la méthode au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet du format liquide au format bandelette a permis de grandement simplifier la méthode que ce soit en termes de préparation d'échantillon ou de temps d'analyse. Néanmoins, cela s'est fait au détriment de la sensibilité, puisqu'elles sont uniquement capables de doser de fortes concentrations en arsenic (V), à l'échelle du ppm. Elles pourront toutefois être affectées au développement d'un produit destiné à une gamme de dosage entre 0 et 10 ppm.

4. Étude des interférences

La méthode au molybdate d'ammonium couplé à un colorant de type triarylméthane que nous avons développée, permet de doser en 5 minutes des concentrations en arsenic (V) de l'ordre de la dizaine de ppb. Comme cela est possible grâce à la formation de complexes arsénomolybdiques, les interférences connues du dosage au bleu de molybdène seront très certainement les mêmes. (Figure 64)

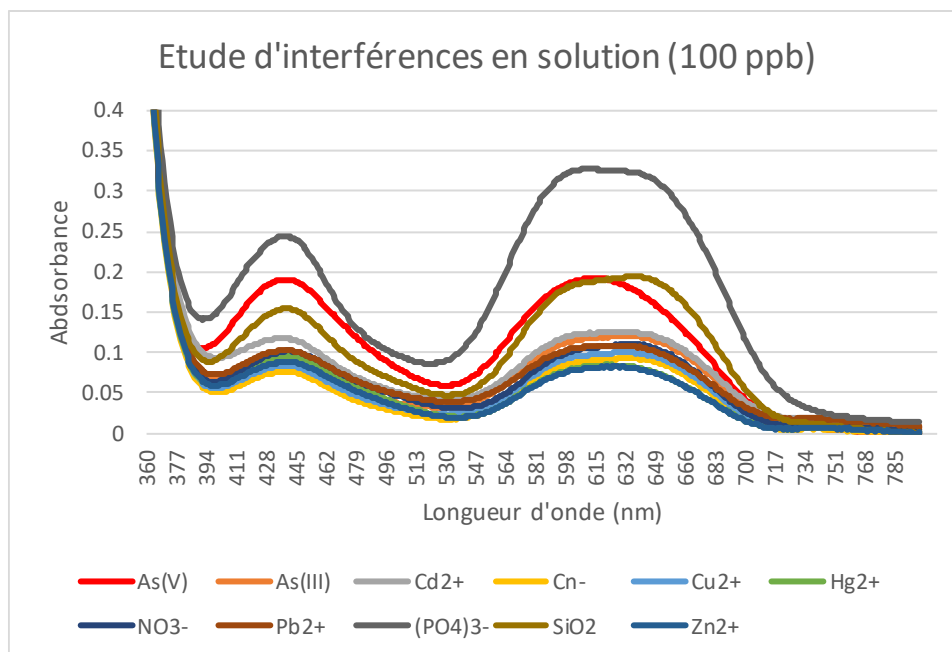


Figure 64. Etude d'interférence de divers cations et anions à 100 ppb lors du dosage en solution par le protocole optimisé à $t = 10$ min (temps de contact entre les ions et le molybdate de 5 min avant l'ajout du vert de malachite)

Sur les différents anions et cations testés, seul deux se révèlent réagir avec la méthode améliorée que nous avons mis en place. Il s'agit du silicate et du phosphate qui sont les deux interférences connues. L'étude d'interférences a également été portée sur les bandelettes à l'éthyl violet. (Figure 65)

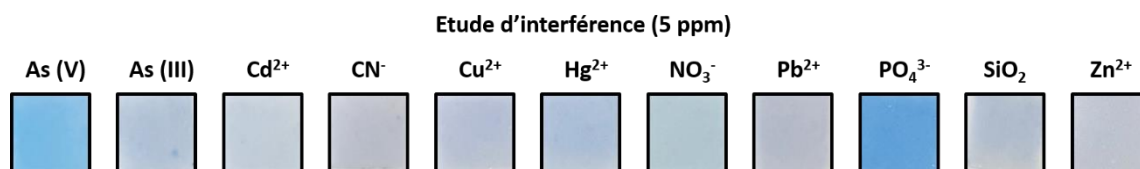


Figure 65. Etude d'interférence d'échantillons acide de 5 mL contenant divers cations et anions sur les bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact

Le silicate qui est un interférent lors du protocole en solution ne l'est plus lors du transfert du protocole au format de bandelettes à l'éthyl violet. Cette constatation peut s'expliquer par le fait que le silicate peut réagir avec les fibres de papier.^{191,192,193,194} Bien que le test sous format bandelette ne puisse doser que de fortes concentrations de l'ordre du ppm, il présente malgré cela l'avantage de supprimer l'interférence liée au silicate et de n'avoir plus que le phosphate comme interférent.

Pour que les méthodes de dosage de l'arsenic (V) que nous avons développées puissent être exploitées, il faut pouvoir limiter l'action du phosphate et du silicate contenus dans les échantillons.

a) Phosphate

L'analyse en spectrophotométrie UV-Visible révèle que le phosphate est bien un interférent dans le dosage en solution de l'arsenic par la méthode au molybdate d'ammonium et au vert de malachite. (Figure 66)

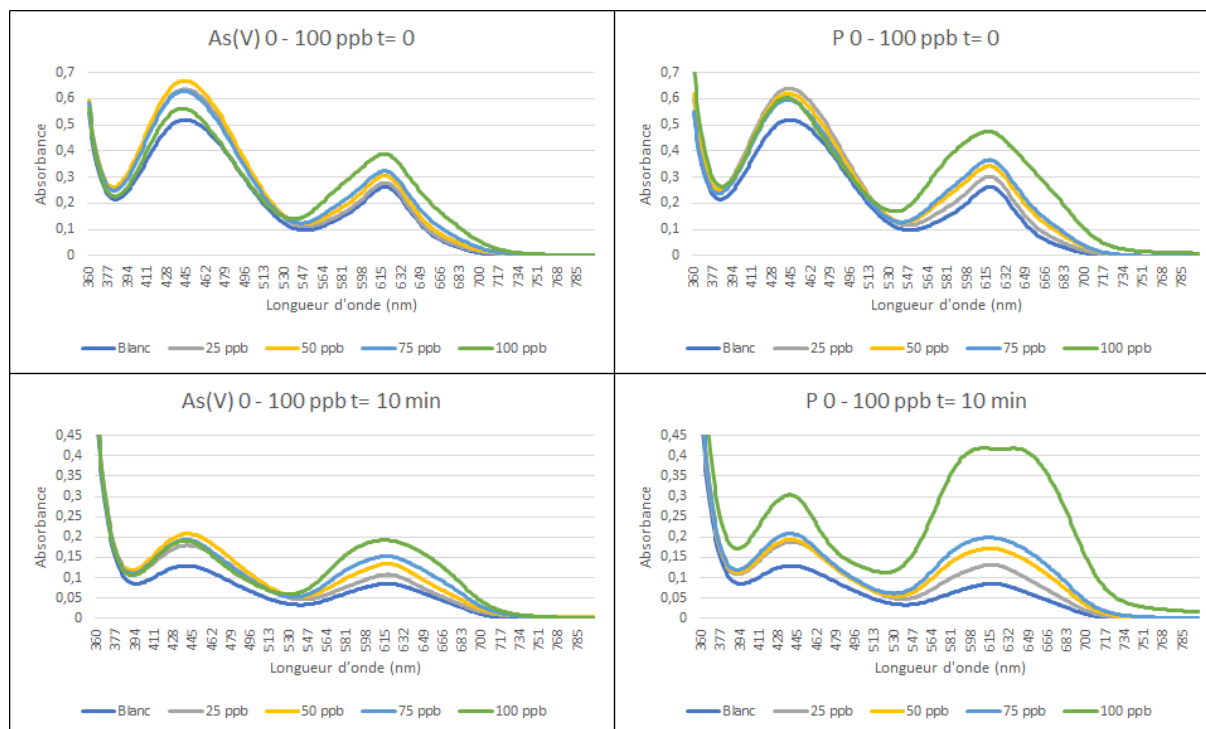


Figure 66. Étude de l'interférence du phosphate par spectrophotométrie UV-Vis. sur le dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite par rapport à l'arsenic (V) à t= 0 et à t= 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques/phosphomolybdiques (temps de contact entre As(V)/phosphate et le molybdate d'ammonium de 5 min)

Cette étude indique également que le phosphate n'a pas le même comportement que l'arsenic (V) au cours du temps. Si à t= 0, la réponse spectrophotométrique du phosphate est pratiquement la même que celle de l'arsenic (V), il n'en est pas de même après 10 minutes de réaction. En effet, les valeurs d'absorbance du complexe phosphaté sont plus élevées au niveau du maximum d'absorption à 618 nm. Il y a également apparition d'un épaulement à 644 nm pour la concentration en phosphate de 100 ppb. Nous avons également observé cet épaulement sur de plus fortes concentrations en arsenic (V) supérieures à 100 ppb. Cela signifie que pour des concentrations équivalentes en arsenic (V), le phosphate donne une réponse plus intense.

Cette interférence liée au phosphate lors du dosage en solution est également observable lors du transfert au format bandelette. (Figure 67)

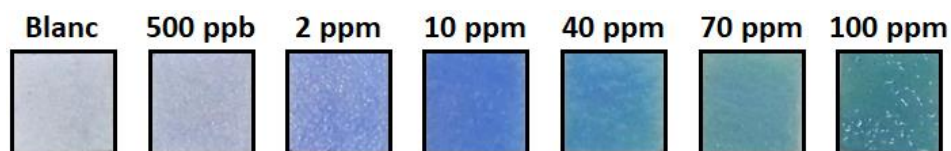


Figure 67. Dosage du phosphate en échantillon acide (5 mL) entre 0 et 100 ppm par des bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet après 60 secondes de contact

Les couleurs obtenues par les bandelettes à l'éthyl violet après avoir été plongées dans des échantillons phosphatés acides sont les mêmes que celles obtenues avec des échantillons arséniés acides.

b) Silicate

Le silicate est également un interférent bien connu de la méthode au bleu de molybdène. C'est pourquoi nous avons effectué un test d'interférence du silicate sur le test au vert de malachite. (Figure 68)

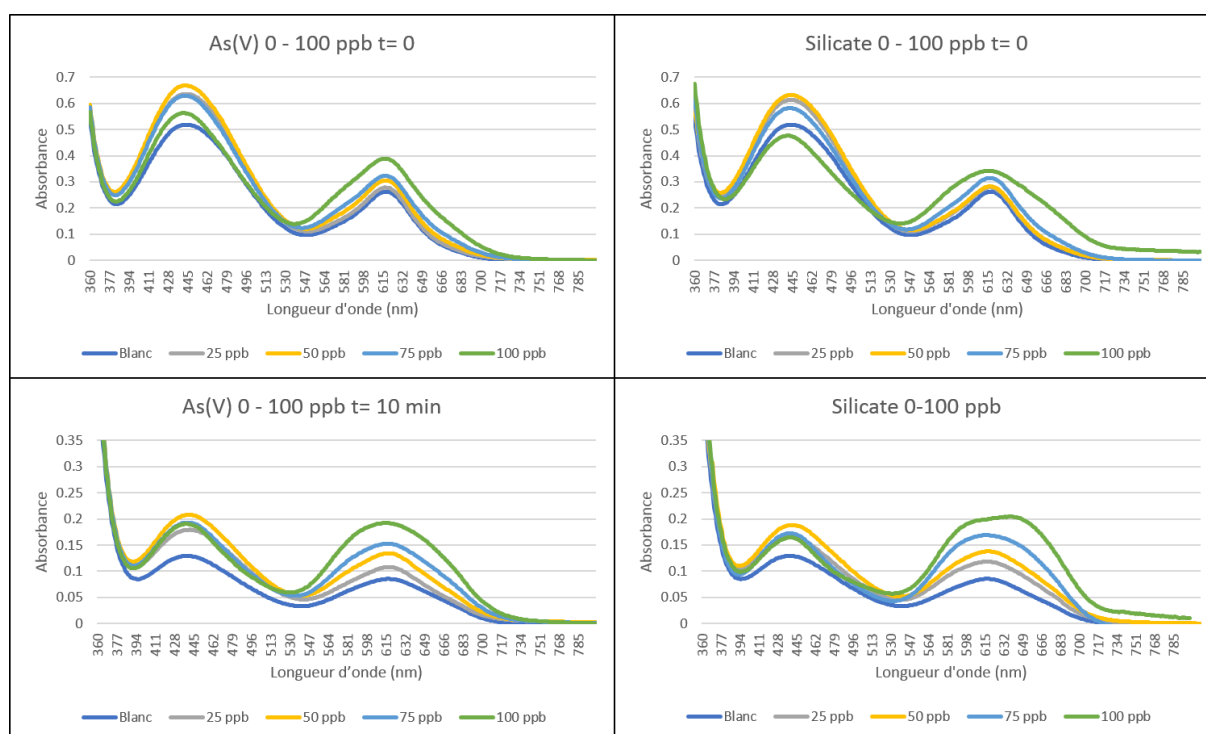


Figure 68. Etude de l'interférence du silicate par spectrophotométrie UV-Vis. sur le dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite par rapport à l'arsenic (V) à t= 0 et à t= 10 min après l'ajout de vert de malachite dans un échantillon acide contenant des complexes arsénomolybdiques/silicomolybdiques (temps de contact entre As(V)/silicate et le molybdate d'ammonium de 5 min)

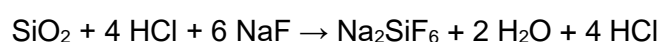
Pour des concentrations équivalentes, les spectres UV-visibles du silicate sont proches de ceux de l'arsenic (V). Pour une concentration en silicate de 100 ppb, à partir de 10 minutes de décoloration, le même épaulement que celui observé pour 100 ppb de phosphate est ici constaté. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cet épaulement observé à 644 nm uniquement pour le silicate et le phosphate à 100 ppb.

Soit il y a une différence de réactivité dans la formation des complexes molybdiques, soit il y a une différence de comportement entre les complexes arsénomolybdiques et ses équivalents phosphates et silicates avec le colorant. Soit c'est une combinaison de ces deux hypothèses. Malheureusement, comme les mécanismes sont inconnus que ce soit pour la formation des complexes molybdiques ou pour la formation des particules avec le colorant, il est difficile de donner une explication à cette observation. Cependant, on peut noter que la différence la plus marquée qu'il y a entre l'arsenic d'une part et le phosphore et le silicium d'autre part, concerne la taille. En effet, le rayon atomique est de 1,10 Å pour le phosphore, de 1,18 Å pour le silicium et de 1,21 Å pour l'arsenic.¹⁹⁵ Alors peut-être que la taille des atomes pourraient jouer un rôle dans la cinétique de formation des complexes.

Ces deux interférences liées au phosphate et au silicate sont bien connues de la communauté scientifique qui a proposé diverses solutions pour y remédier.

C. Élimination des interférences

Dans la littérature, le silicate est exclusivement éliminé par l'ajout de fluorure de sodium (NaF) dans un échantillon acide. Cet ajout permet de former du fluorosilicate de sodium qui inhibe la formation des complexes silicomolybdiques.^{196,197}



L'interférence phosphate quant à elle, peut être éliminée de différentes manières d'après la littérature. Il est possible de le retenir conjointement avec l'arsenic (V) par un passage sur une colonne de carbonate de calcium (CaCO_3) puis, de doser après oxydation, l'arsenic (III) qui n'a pas été éliminé.¹⁶⁹ Il est également possible d'éliminer spécifiquement le phosphate grâce à une résine faiblement basique.¹⁷³ Il existe une troisième méthode peu étudiée dans la littérature mais qui est cependant utilisée par les collectivités d'Amérique du Nord pour enrayer les phénomènes d'eutrophisation dus au phosphate. Cette troisième méthode consiste à utiliser de l'hydroxyde de lanthane ($\text{La}(\text{OH})_3$).¹⁹⁸

I. Carbonate de calcium (CaCO_3)

Lors de ses travaux sur la rétention de couleur des complexes arsénomolybdiques, l'équipe d'Okazaki a pu éliminer l'interférence phosphate. Le processus consiste à éliminer simultanément le phosphate et l'arsenic (V) par aspiration de l'échantillon au travers d'une cartouche de carbonate de calcium et de récupérer l'arsenic (III) qui n'a pas été éliminé. Il faut ensuite oxyder l'arsenic (III) en arsenic (V) afin de pouvoir le doser.

Pour que l'élimination du phosphate et de l'arsenic (V) se fasse, il faut avoir préalablement ajouté du chlorure de calcium (CaCl_2) dans l'échantillon. En effet, en présence de carbonate

et de chlorure de calcium, à pH supérieur à 8, ce dernier minéralise pour former de la vatérite. La vatérite de formule chimique CaCO_3 correspond à du carbonate de calcium sous forme cristalline. Elle possède un fort pouvoir adsorbant envers le phosphate.¹⁹⁹ L'arsenic (V) réagit de la même façon que le phosphate et il est rapidement éliminé par le carbonate de calcium en présence de chlorure de calcium à pH supérieur à 8.²⁰⁰

Nous avons réalisé des tests d'élimination du phosphate, de l'arsenic (V) et de l'arsenic (III) en utilisant la méthode optimisée de dosage en solution par le molybdate d'ammonium et le vert de malachite. La phase d'élimination des interférents basée sur celle utilisée par l'équipe d'Okazaki consiste au passage d'un échantillon de 10 mL, auquel a été rajouté du chlorure de calcium, au travers d'une cartouche contenant 500 mg de carbonate de calcium.

Lors du passage l'échantillon se charge en carbonate de calcium et donne une laitance blanche, qui peut être éliminée par un filtre seringue de 0,45 μM . Néanmoins, une partie du carbonate de calcium se solubilise et modifie le pH des échantillons. Afin de conserver l'intégrité du témoin, il faut augmenter la quantité d'acide ajouté pour qu'il ne se colore pas. (Figure 69)

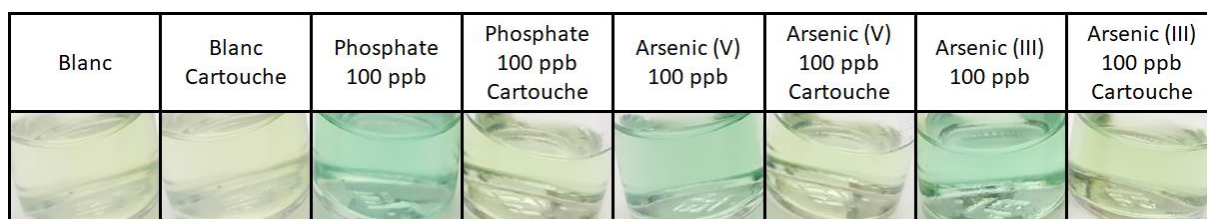


Figure 69. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche au carbonate de calcium. Etude portée sur des échantillons contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) (10 ml d'échantillon passés à travers 500 mg CaCO_3 à une vitesse de 10 mL/min) t= 10 min

Les échantillons de référence contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) qui ne sont pas passés à travers la cartouche donnent une coloration verte. Les échantillons contenant les mêmes concentrations qui sont passés à travers la cartouche de carbonate de calcium donnent tous la même coloration, correspondant au témoin (Blanc Cartouche).

L'utilisation d'une cartouche au carbonate de calcium permet bien d'éliminer l'interférence liée au phosphate. Elle élimine également l'arsenic (V) tout comme dans le protocole de l'équipe d'Okazaki. Cependant, nous avons observé une élimination de l'arsenic (III) lors du passage sur la colonne. Ce phénomène a été décrit par l'équipe de Román-Ross qui a observé que l'arsenic (III) pouvait être piégé dans le réseau cristallin lors de la minéralisation de la vatérite.²⁰¹

L'utilisation de cette cartouche au carbonate de calcium sur le protocole que nous avons élaboré ne donne pas les mêmes résultats que ceux obtenus par l'équipe d'Okazaki. Cela peut notamment s'expliquer par la différence de matériel. L'équipe d'Okazaki a utilisé des cartouches de 13 mm de diamètre et 49 mm de hauteur faites sur mesure, avec du carbonate de calcium de granulométrie 12 μm contenu entre deux frittés en verre. Alors que nous avons

utilisé une cartouche Chromabond® de 12 mm de diamètre et de 65 mm de hauteur, avec du carbonate de calcium de granulométrie hétérogène contenu entre deux frittés de polyéthylène qui pourraient peut-être interagir avec l'arsenic (III). Il serait intéressant pour des recherches futures de pousser les investigations en faisant la manipulation avec simplement le fritté ou en utilisant du matériel passivé qui ne réagirait pas avec l'arsenic (III).

2. Résines

D'après les travaux réalisés par Morita, il serait possible d'éliminer spécifiquement le phosphate, jusqu'à 50 mg/L (ppm), en passant l'échantillon au travers d'une colonne de résine faiblement basique (Dowex Marathon WBA). L'élimination du phosphate se ferait sans pour autant modifier la concentration ni en arsenic (III) ni en arsenic (V) si le pH de l'échantillon se situe entre 2 et 7. (Figure 70)

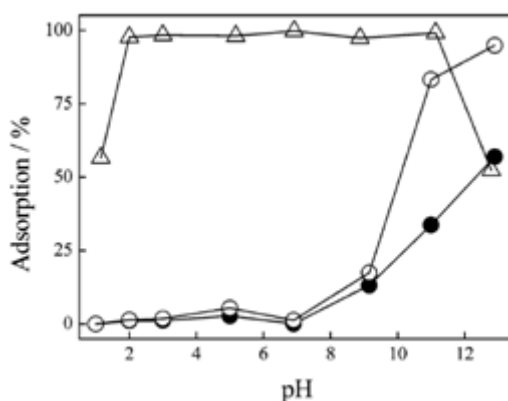


Figure 70. Effet du pH sur l'adsorption par une colonne de résine échangeuse d'anions faiblement basique • 10 ppb As(V) ; ○ 10 ppb As(III) ; △ 50 ppm phosphate (échantillon de 50 mL passé à 10 mL/min sur 8 g de résine)¹⁷³

Ce comportement est étrange, car pour une gamme de pH situé entre 2 et 7, seul l'arsenic (III) sous forme H_3AsO_3 non chargée ne devrait pas être retenu sur la résine. Alors que l'arsenic (V) sous forme chargée $H_2AsO_4^-$ devrait quant à lui se comporter comme le phosphate et être retenu par la résine. La référence de résine utilisée par l'équipe de Morita n'est plus commercialisée. Il s'agissait d'une résine faiblement basique composée de billes de styrène-divinylbenzène de 500 μm de diamètre portant des ammoniums comme groupe actif matriciel avec une capacité d'échange d'1,5 meq/mL. Nous avons à la place utilisé une résine ammonium faiblement basique ayant la même taille de particules avec une capacité d'échange d'1,6 meq/mL. Les échantillons de 10 mL dont le pH est d'environ 5,5 sont passés sur une colonne de résine Amberlite IRA-67 contenue dans une cartouche en polypropylène avant d'être soumis au protocole optimisé de dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite. (Figure 71)

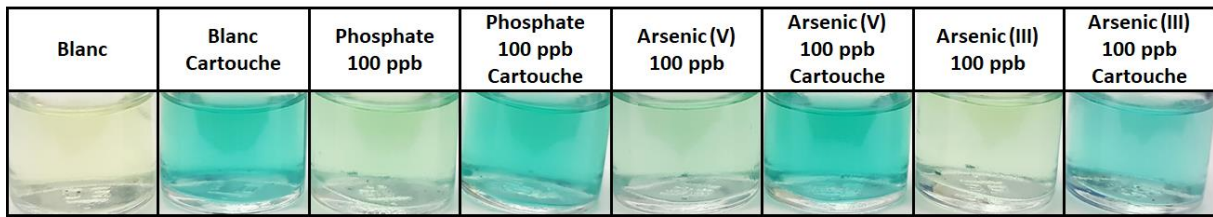


Figure 71. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche de résine faiblement basique Amberlite IRA-67. Etude portée sur des échantillons contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) (10 ml d'échantillon passés à travers 1 g de résine à une vitesse de 10 mL/min) t= 10 min

Le pH des échantillons en sortie de cartouche est le même que celui à leur entrée, cependant le passage sur la résine Amberlite IRA-67 modifie la qualité de l'échantillon, ainsi le témoin (Blanc Cartouche) prend une coloration bleu turquoise au lieu d'avoir une coloration jaune. Tous les échantillons qui sont passés sur la résine donnent la même coloration et il est impossible d'affirmer ou d'infirmer qu'elle permet l'élimination de l'interférence liée au phosphate. Nous avons conditionné la résine de la même façon que l'équipe de Morita, en utilisant de l'acide nitrique 1 M, de la soude 1 M et du chlorure de sodium 1 M. Ensuite nous avons abondamment rincée la résine avec de l'eau ultrapure MilliQ. Du chlorure de sodium résiduel a peut-être pu réagir avec le test au molybdate d'ammonium et au vert de malachite. Nous avons également fait des tests d'élimination du phosphate en utilisant une résine Amberlite IRA- 400 dont la taille des billes est un peu plus grande, à 600 µm de diamètre possédant une charge d'1,4 meq/mL. Ou bien encore une résine Amberlite IRA- 900 fortement basique qui a une taille de billes encore plus grande, à 650 µm ayant une capacité d'échange d'1 meq/mL. (Figure 72)

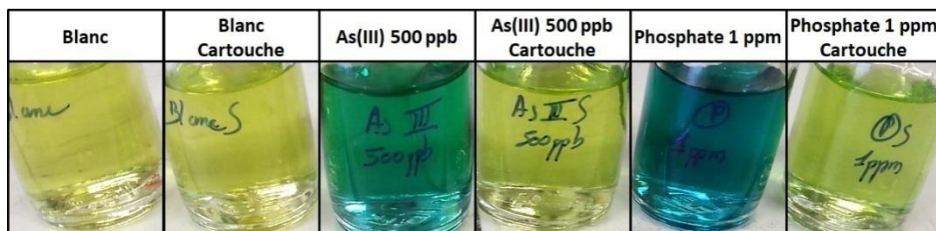


Figure 72. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche de résine fortement basique Amberlite IRA-900. Etude portée sur des échantillons contenant 500 pb d'arsenic (III) ou 1 ppm de phosphate (10 ml d'échantillon passés à travers 1 g de résine à une vitesse de 10 mL/min) t= 5 min

La résine fortement basique Amberlite IRA-900 présente l'avantage de ne pas modifier le comportement de l'échantillon contrairement à la résine Amberlite IRA-67. Ainsi, l'échantillon témoin passé à travers la cartouche de résine donne la même coloration que l'échantillon de référence. Un échantillon contenant 1 ppm de phosphate passé à travers une cartouche d'un gramme de résine Amberlite IRA-900 donne par la suite une coloration légèrement plus verte que le témoin. Cette résine permet donc la rétention de concentrations de phosphate pouvant aller jusqu'à 1 ppm. Cependant elle possède le même comportement vis-à-vis de l'arsenic (V) et de l'arsenic (III) en éliminant des teneurs équivalentes.

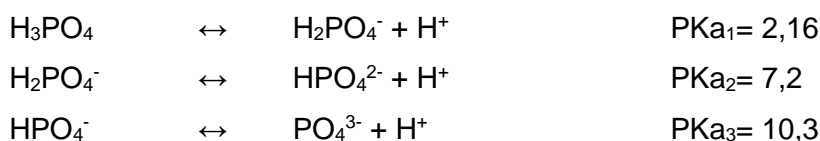
L'utilisation de résines ammonium fortement basiques en micro-colonne élimine de grandes teneurs en phosphate, en arsenic (V) et en arsenic (III). Cette capacité de ces résines est

d'ailleurs exploitée pour dépolluer des eaux contaminées en arsenic, mais elles ne permettent pas ici d'éliminer spécifiquement le phosphate.^{202,203}

Ces trois types de résine ne donnent pas les mêmes résultats que ceux obtenus lors des travaux de l'équipe de Morita. Cette différence pourrait être expliquée par différentes raisons comme la qualité et la structure de la résine ou bien la hauteur de la colonne et le tassement des billes de résine qui ne seraient pas les mêmes.

3. Hydroxyde de lanthane

Dans les années 90, le CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) a développé une argile minérale enrichie en lanthane pour endiguer les phénomènes d'eutrophisation liés au phosphate. Cette argile est actuellement commercialisée sous le nom de Phoslock™. Il est composé de bentonite enrichie en hydroxyde de lanthane et il a la capacité de réagir avec le phosphate pour former un composé insoluble dans l'eau appelé rhabdophane de formule chimique LaPO_4 . Le Phoslock™ peut adsorber jusqu'à 10 mg de phosphate par gramme lorsqu'il est sous forme H_2PO_4^- , c'est-à-dire lorsque le pH est inférieur à 7.



La cinétique d'adsorption du phosphate par le Phoslock™ est de 3 mg/g en 10 minutes à 23°C.²⁰⁴ Il permet ainsi d'éliminer 93% d'une concentration de 100 ppb de phosphate dans 50 mL d'échantillon légèrement acide (pH 6) avec seulement 20 mg de Phoslock™ (temps de contact de 3 h).²⁰⁵ La capacité du Phoslock™ à capter le phosphate est due au lanthane qu'il contient.

Le lanthane peut être utilisé sous différentes formes, ainsi il est possible de modifier une résine Chelex-100 pour qu'elle présente des motifs lanthane (III) capables d'adsorber environ 1,4 mg de phosphate par gramme quand le pH est situé entre 5 et 8.²⁰⁶ Il est également possible d'utiliser l'hydroxyde de lanthane $\text{La}(\text{OH})_3$ directement en batch dans l'échantillon où il peut adsorber jusqu'à 55 mg de phosphate par gramme. Ainsi, lorsque 40 mg d'hydroxyde de lanthane sont ajoutés dans un échantillon de 40 mL (pH < 7) contenant 100 ppm de phosphate, il élimine 80% de la teneur en phosphate en une heure, soit une capacité d'adsorption de 80 mg/g.²⁰⁷

Cette aptitude que présente le lanthane envers le phosphate peut être exploitée et nous avons imaginé une nouvelle méthode pour supprimer cette interférence. Le montage est le même que celui concernant le carbonate de calcium. Soit une quantité de 500 mg d'hydroxyde de lanthane contenue entre deux frittés de polyester dans une précolonne Chromabond®. Cette



quantité de lanthane a potentiellement la capacité de retenir jusqu'à 40 mg de phosphate. Les échantillons de 10 mL sont passés au travers de la cartouche d'hydroxyde de lanthane, puis nous leur avons appliqué le protocole au molybdate d'ammonium et au vert de malachite. (Figure 73)

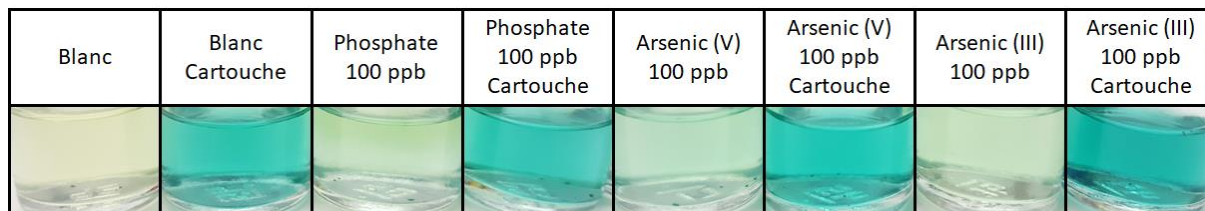


Figure 73. Elimination de l'interférence phosphate par une cartouche d'hydroxyde de lanthane. Etude portée sur des échantillons contenant 100 ppb de phosphate, d'arsenic (V) ou d'arsenic (III) (10 ml d'échantillon passés au travers de 500 mg d'hydroxyde de lanthane à une vitesse de 10 mL/min) t= 10 min

L'échantillon de référence qui est passé à travers la cartouche d'hydroxyde de lanthane se colore fortement en vert/bleu, alors que la couleur attendue était un jaune clair. Tous les autres échantillons qui sont passés au travers d'une cartouche d'hydroxyde de lanthane donnent la même couleur vert/bleu, peu importe qu'ils contiennent du phosphate, de l'arsenic (V) ou de l'arsenic (III).

L'hydroxyde de lanthane que nous avons utilisé provient d'Alfa Aesar, dont la pureté est estimée à 99,95%. Sa solubilité dans l'eau a été calculée à quelques milligrammes par litre, ainsi une partie doit se solubiliser lors du passage de l'échantillon.²⁰⁸ En effet s'il est vrai qu'il ne modifie pas le pH, il doit pour autant interférer dans le protocole au molybdate d'ammonium en donnant une forte coloration vert turquoise. Le lanthane (III) est peut-être un interférent de la méthode au molybdate d'ammonium et au vert de malachite, que nous n'avons pas étudié car il est peu présent dans les échantillons naturels.

L'hydroxyde de lanthane permet peut-être en définitif d'éliminer le phosphate, mais il ne pourra pas être utilisé comme solution pour remédier à cette interférence dans notre protocole.

D'autres méthodes ont été essayées pour supprimer l'interférence liée au phosphate lors du dosage au molybdate d'ammonium et au vert de malachite :

- Passage des complexes arséno/phosphomolybdiques sur CaCO_3 , résines ou $\text{La}(\text{OH})_3$
- Utilisation en batch du CaCO_3 , des résines ou de l'hydroxyde de lanthane
- Utilisation en cartouche ou en batch de carbonate de lanthane $\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$
- Utilisation en cartouche ou en batch d'hydroxyde d'aluminium $\text{Al}(\text{OH})_3$.^{209,210}
- Utilisation de différents mélanges de poudres en cartouche constitués avec $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{CaCO}_3/\text{La}(\text{OH})_3/\text{La}_2(\text{CO}_3)_3$
- Ajout de cérium dans l'échantillon^{211,212,213}
- Utilisation de résines modifiées au molybdate ou au tungstate²¹⁴

Mais aucune n'a donné de résultats exploitables permettant d'envisager une commercialisation éventuelle. Effectivement, soit elles interagissent lors du protocole en donnant de faux positifs soit elles éliminent l'arsenic total et donnent des faux négatifs.

En conclusion, nous avons réussi à développer une nouvelle méthode permettant la détection à l'œil nu et en 5 minutes de concentration en arsenic de 10 ppb correspondant aux normes fixées par l'OMS. Cependant, bien qu'elle ne présente que peu d'interférences, celle liée au phosphate est difficilement surmontable. Cette difficulté est liée à la forte analogie chimique qui existe entre le phosphate et l'arsenic (V). C'est d'ailleurs cette analogie qui est à l'origine de la toxicité de l'arsenic sous son état d'oxydation (+5). Ainsi, la méthode que nous avons développée ne répond pas au critère du cahier des charges concernant la spécificité. L'absence de solution permettant d'éliminer spécifiquement le phosphate sans modifier les concentrations en arsenic de l'échantillon, implique que notre nouvelle technique de dosage de l'arsenic ne pourra malheureusement pas être commercialisée en l'état.

Afin de pouvoir exploiter cette nouvelle méthode prometteuse, il conviendra donc de trouver une solution permettant d'éliminer spécifiquement le phosphate.



II. Dosage de l'arsenic (III) par l'utilisation de nanoparticules d'or

1. Présentation de l'objectif

Comme cela a été présenté dans la première partie, l'arsenic (III) présente une forte affinité pour les fonctions thiols, en particulier celles des cystéines et de l'acide lipoïque. L'arsenic (III) se lie ainsi avec trois fonctions thiols pour établir un complexe en forme de pyramide trigonale. (Figure 11)

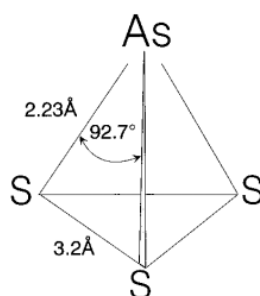


Figure 11. Géométrie proposée du site allostérique de ArsR avec As(III) lié à Cys¹⁵, Cys¹⁶ et Cys⁵⁵ d'après les angles et les distances obtenues en cristallographie aux rayons X⁸⁴

Les fonctions thiols présentent même une très forte affinité envers l'or.²¹⁵ L'objectif du travail concernant cet axe de recherche est de réussir à utiliser cette double affinité des fonctions thiols pour réussir à doser l'arsenic (III) par l'intermédiaire de nanoparticules d'or.

La méthode consistera à faire réagir l'arsenic (III) avec les fonctions thiols d'une molécule en quantité connue, puis à ajouter une quantité connue de solution de nanoparticules d'or afin de doser les thiols libres restants. En développant une méthode standardisée il pourrait ainsi être possible de remonter à la concentration en arsenic (III)

La cystéine se présente comme un bon candidat pour jouer ce rôle de molécule thiolée, car elle n'est pas chère, elle est soluble dans l'eau et il existe déjà différents protocoles dans la littérature permettant de la doser par l'intermédiaire de nanoparticules d'or.

Il est ainsi possible de doser la cystéine par des nanoparticules d'or de 13 nm de diamètre stabilisées au citrate, en formant des complexes entre de l'acide aspartique et la cystéine.²¹⁶

Une autre solution est d'enrober des nanoparticules stabilisées au citrate avec de la rhodamine B, l'équipe de Xin Fu a de cette façon, réussi à doser la cystéine à la fois par fluorescence et par absorbance.²¹⁷ Dans la littérature, une nouvelle méthode issue de la chimie verte et de la valorisation de co-produit de l'industrie de la canne à sucre est apparue récemment. Il s'agit de synthétiser des nanoparticules d'or stabilisées avec du xylane issu de bagasse.²¹⁸ C'est un polysaccharide constitué principalement de xylose qui compose les hémicelluloses. Pour être plus précis, il s'agit d'arabinoglucuronoxylane, c'est un xylane

portant des arabinofuranoses et des acides glucuroniques sur sa chaîne de xylose. (Figure 74)

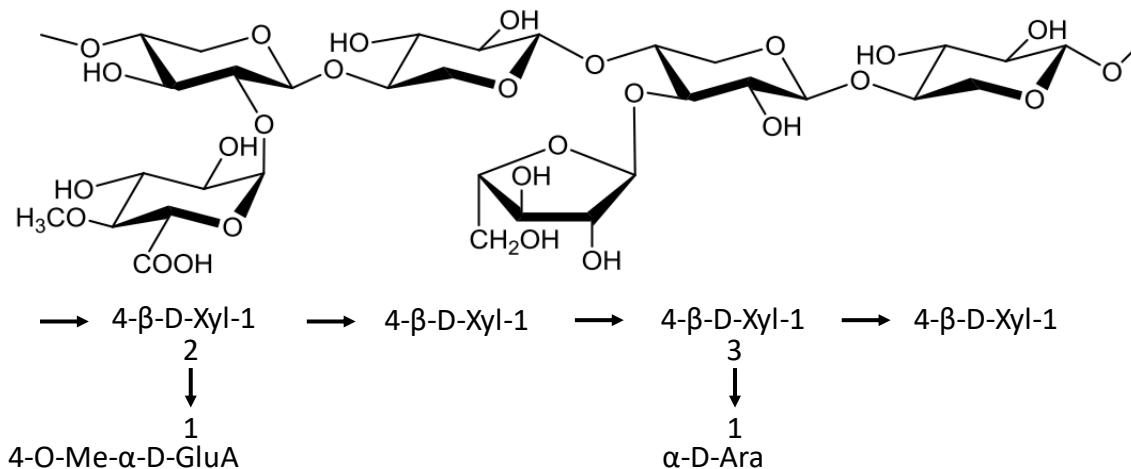


Figure 74. Structure partielle des unités arabinoglucuronoxylane

Ce sont les fonctions carboxylates des acides glucuroniques qui permettent de stabiliser les nanoparticules d'or. Après l'addition de cystéine, les interactions entre la fonction thiol et l'or sont plus fortes que celles avec le carboxylate. Ce qui a pour effet de substituer le xylane par la cystéine à la surface des nanoparticules d'or. La cystéine est un acide aminé, et de ce fait, porte une amine primaire et un acide carboxylique qui peuvent former des liaisons hydrogène avec l'acide et l'amine d'une autre cystéine. Cela entraîne ainsi le rapprochement des nanoparticules d'or et leur agglomération, provoquant par là même un changement de couleur passant du rouge au bleu. Ces nanoparticules ont la faculté de détecter des concentrations en cystéine de 100 μ M lors d'une analyse en spectrophotométrie UV-Visible. La cystéine est le seul des 22 acides aminés ayant cette capacité d'agglomération des nanoparticules d'or stabilisées au xylane, ce qui indique que c'est bien la fonction thiol libre qui permet cette réactivité.²¹⁸

En s'inspirant de ce travail, nous pourrions de cette manière développer une méthode de dosage de l'arsenic (III) basée sur l'utilisation de composés d'origine naturelle (hémicellulose) et de ce fait, se placer en partie dans un concept de chimie verte. Le protocole que nous avons imaginé consiste à doser l'arsenic (III) d'un échantillon par réaction avec une quantité connue d'une molécule formant des complexes avec ce dernier, la L-cystéine. Puis d'ajouter une quantité connue de solution de nanoparticules d'or stabilisées par un xylane issu du bois de façon à doser la L-cystéine libre. Le concept du dosage est présenté sur la Figure 75.

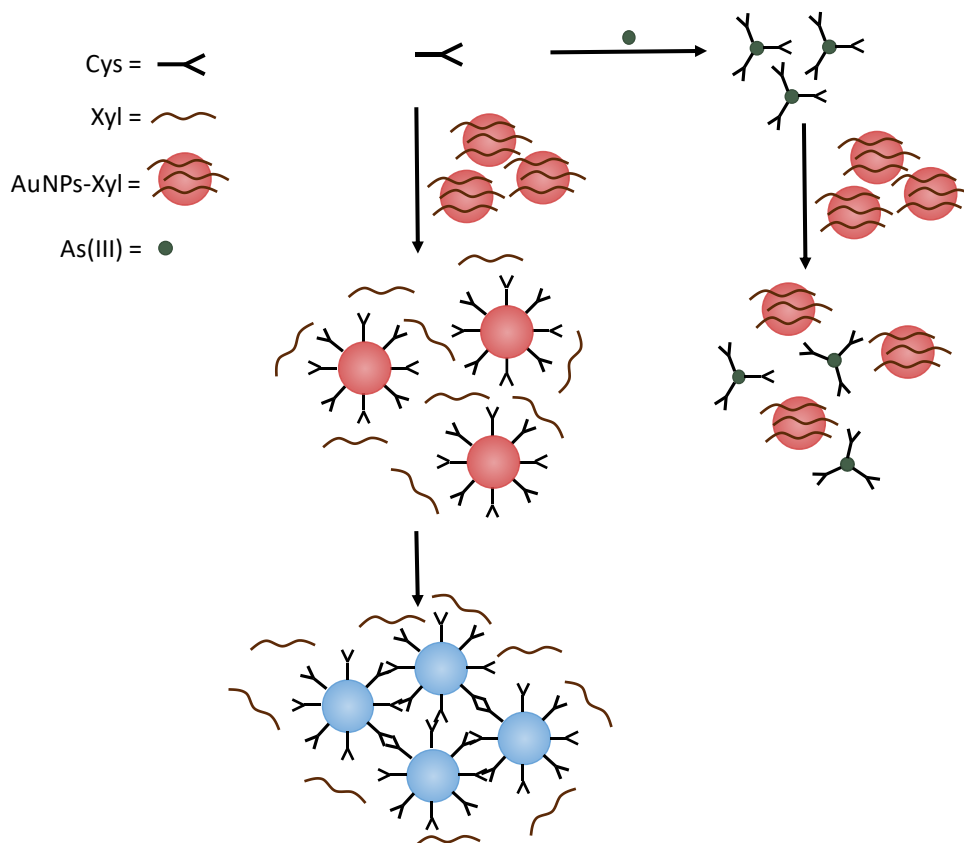


Figure 75. Mécanisme schématique du dosage de l'arsenic(III) par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane et de la cystéine

Ainsi, un échantillon ne contenant pas d'arsenic (III) donnerait une coloration bleue alors que des échantillons en contenant donneraient une coloration entre le bleu et le rose selon la concentration.

Cependant, la liberté en solution de la cystéine pourrait entraîner des cinétiques lentes de formation des complexes As(III)-Cys₃. (Figure 76)

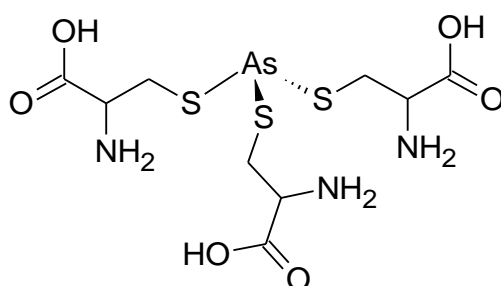


Figure 76. Structure du complexe As(III)-Cys₃

A contrario, une molécule comportant trois fonctions thiol et une pré-organisation spatiale aurait une capacité de former des complexes avec l'arsenic (III) bien plus stables que trois cystéines isolées.

Lors de ses travaux que nous avons présentés dans la première partie, l'équipe de Xia a justement travaillé avec de la phytochélatine 3 qui comporte trois fonctions thiol et possède une pré-organisation spatiale favorisant la formation du complexe As(III)-PC₃. Le problème est que la phytochélatine 3 n'est commercialisée que par très peu de fournisseurs et que son prix

de vente se situe entre 120000 et 130000 \$/g. Le fait que son prix soit beaucoup trop élevé et que sa synthèse soit compliquée et non décrite dans la littérature font que l'utilisation de la phytochélatine 3 est nullement envisageable dans le kit de dosage que Novassay souhaite concevoir.

Par conséquent, il faudra synthétiser une molécule mimant le rôle de la phytochélatine 3 afin de pouvoir développer un protocole utilisant les nanoparticules d'or.

B. Synthèse d'un mime de la phytochélatine 3

La molécule destinée à jouer le rôle de la phytochélatine 3 devra donc prioritairement comporter trois fonctions thiols. Nous avons vu que l'arsenic (III) avait une forte affinité pour la cystéine. Nous avons également vu que l'acide lipoïque possédait un fort pouvoir de complexation de l'arsenic (III). C'est pourquoi nous avons imaginé une molécule constituée d'une cystéine et d'un acide lipoïque. (Figure 77)

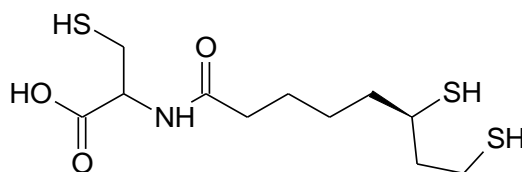


Figure 77. Molécule mime de PC₃, constituée d'une L-cystéine et d'un acide R-α-lipoïque

La formule brute de ce composé est C₁₁H₁₉NO₃S₃, il comporte trois atomes de soufre tout comme la phytochélatine 3. Cette molécule est l'association d'une molécule de L-cystéine et d'une molécule d'acide R-α-lipoïque liées par l'intermédiaire d'une liaison peptidique (ou amide).

Le couplage peptidique consiste donc à former une liaison amide entre un acide carboxylique et une amine. Pour que la réaction puisse avoir lieu, il faut préalablement activer l'acide en passant par un produit intermédiaire. Lorsque l'acide R-α-lipoïque est activé, la substitution du groupe partant peut se faire par n'importe quelle fonction nucléophile. Par conséquent, pour qu'il y est uniquement la fonction amine qui réagisse, il faut que la fonction acide carboxylique et que la fonction thiol de la cystéine soient protégées. Habituellement, les cystéines commerciales sont utilisées en synthèse peptidique sur support solide et sont protégées sur l'une ou l'autre de ces fonctions selon les stratégies conventionnelles, c'est-à-dire en série N-Boc ou N-Fmoc. De ce fait, il n'existe pas de source commerciale de cystéine protégée à la fois sur les fonctions -SH et -COOH avec la fonction amine libre. La synthèse de la molécule mime de PC₃ que nous présentons implique donc une synthèse préalable de cette molécule de cystéine protégée. Toutefois, une alternative à ce travail de synthèse fastidieux, au regard du domaine d'application visé, est d'utiliser la L-cystine. (Figure 78)

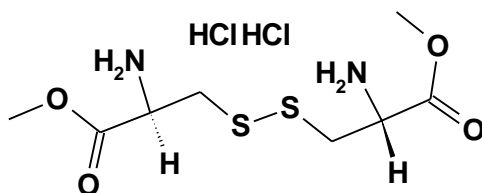


Figure 78. Formule de la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate

C'est un dimère de L-cystéine liées entre-elles par un pont disulfure. La L-cystine diméthylester étant commerciale et la réduction des ponts disulfures facilement réalisables, le choix de cette molécule nous a semblé pertinent pour réaliser la synthèse du mème de PC₃ finalement en seulement deux étapes (couplage/déprotection). La stratégie sera donc de réaliser un double couplage peptidique sur la molécule de L-Cystine pour donner une molécule présentée Figure 79.

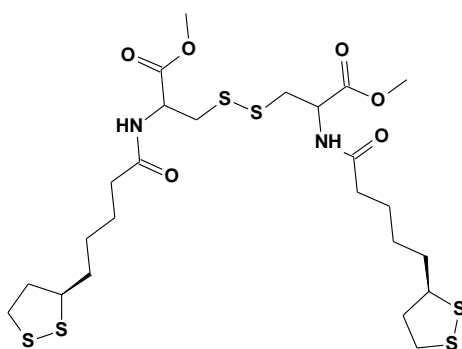


Figure 79. Molécule mème de PC₃ protégée

Depuis plusieurs décennies, de nombreux agents de couplage ont été décrits. Parmi les plus utilisés, il y a les carbodiimides, les sels de phosphonium ou d'uronium, les chlorures d'acyle et les acylazoles.

Le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide ou DCC est l'un des premiers agents de couplage à avoir été utilisé par Sheehan et Hess en 1955.²¹⁹ Le DCC réagit sur l'acide carboxylique pour former de l'O-acylurée qui réagit par la suite avec une amine pour former une liaison amide et de la dicyclohexylurée (DCU).²²⁰ (Figure 80)



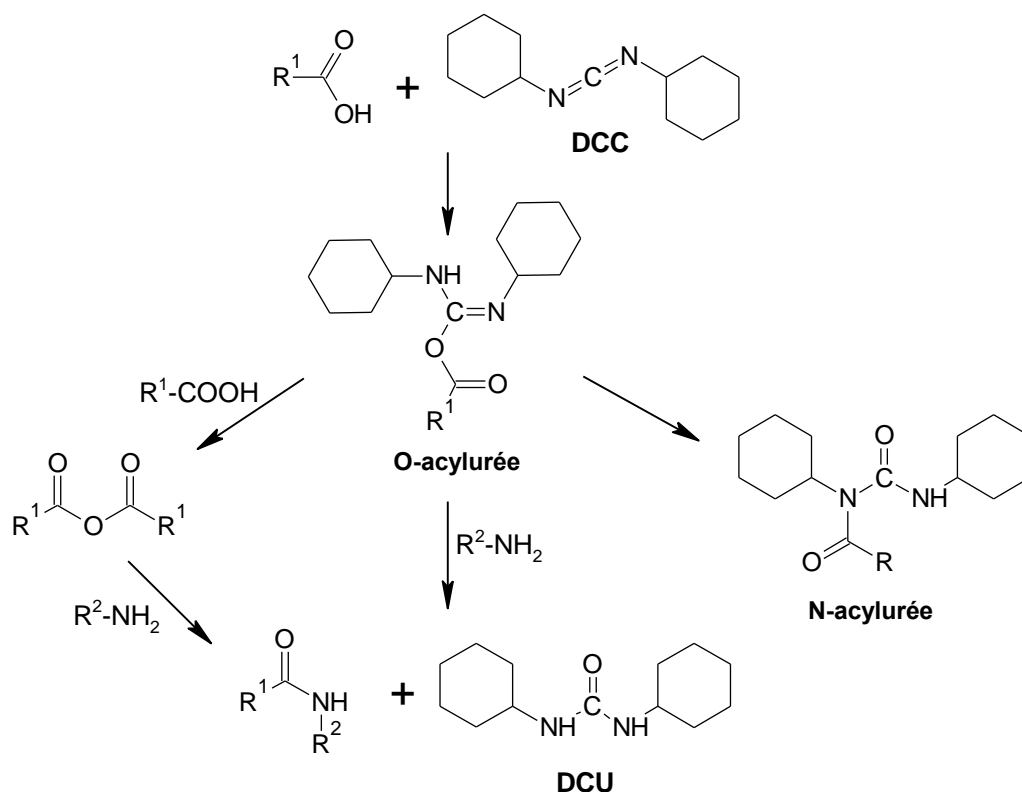


Figure 80. Mécanisme réactionnel du couplage peptidique par le DCC

Cependant, si la réactivité de l'amine est trop lente et qu'il y a de l'acide carboxylique en excès, ce dernier peut réagir avec l'O-acylurée pour former de l'anhydride. De plus, si la réactivité de l'amine est trop faible, il peut également y avoir une transposition de la O-acylurée en N-acylurée. L'utilisation d'une benzotriazole comme additif permet de former un produit intermédiaire avec l'O-acylurée encore plus réactive, qui permet d'éviter cette transposition.²²¹ (Figure 81)

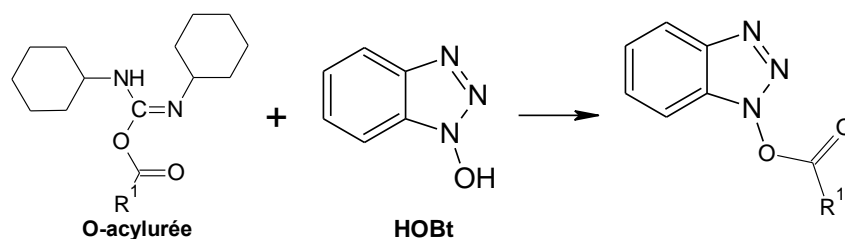


Figure 81. Réaction de l'hydroxybenzotriazole sur l'O-acylurée

Le DCC est souvent utilisé en association avec l'hydroxybenzotriazole (HOBT), bien que l'1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt) soit plus efficace, car il est beaucoup moins cher tout en donnant des résultats corrects. Il est tout de même à noter que la benzotriazole peut réagir avec le DCC pour former de la diazétidine.²²² Il faut malgré tout garder à l'esprit que le stockage et l'utilisation des benzotriazoles peut entraîner des risques d'explosion.²²³ Le N-hydroxysuccinimide (NHS) peut être utilisé à la place d'HOBT et ainsi éviter le stockage de benzotriazoles.



La dicyclohexylurée (DCU) coproduite n'est soluble que dans l'acide trifluoroacétique (TFA) et précipite lors de la réaction. Cette impureté est éliminée par filtration, mais il en reste toujours des traces en solution qui contamine le produit final.²²⁴

Nous avons essayés des couplages entre l'acide R- α -lipoïque et la L-cystine diméthyl ester dichlorhydrate en utilisant DCC/HOBt ou DCC/NHS dans le tétrahydrofurane anhydre. Mais le suivi réactionnel en chromatographie sur couche mince (CCM) indique que la réactivité est limitée et de surplu la purification est compliquée à cause des sels qui précipitent. Généralement, le DCC est plutôt utilisé pour la synthèse peptidique en phase solide et les purifications se font par lavages des résines.

Concernant les agents de couplage acylazoles, le plus utilisé est le carbonyldiimidazole (CDI) qui fut créé en 1960.²²⁵ Il est utilisé en recherche de laboratoire à petite échelle tout comme en industrie à grande échelle car il n'est pas cher et il est commercialisé en gros volume (plusieurs kilogrammes).²²⁶ Les co-produits formés par le CDI lors du couplage peptidique, sont du dioxyde de carbone (CO_2) et de l'imidazole qui ont l'avantage de ne pas être dangereux et d'être facilement éliminables. (Figure 82)

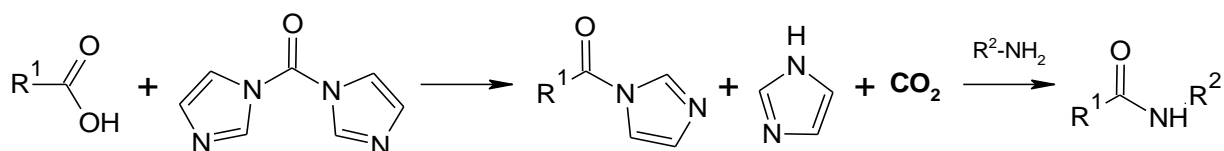


Figure 82. Mécanisme réactionnel du couplage peptidique par le CDI

Le CDI est moins réactif que les autres agents de couplage et son utilisation est ainsi limitée aux amines primaires peu encombrées.²²⁷ Cela dit, un des avantages du CDI est qu'il permet un couplage one-pot. C'est-à-dire que l'activation de l'acide carboxylique se fait pendant 1 h avant que l'amine ne soit directement ajoutée dans le milieu réactionnel. L'ajout d'une faible quantité d'acide dans le milieu de réaction permet la protonation de l'oxygène de l'intermédiaire imidazolide. L'utilisation d'1,5 équivalents d'imidazole.HCl ou d'amine sous forme de chlorhydrate suffit à accélérer le couplage de plusieurs dizaine d'heures.²²⁸ Le couplage peptidique one-pot par le CDI, se fait sous azote en solvant anhydre et permet un couplage en environ 4-12 h selon les réactifs.^{229,230} L'équipe de Verma a travaillé au développement d'un couplage peptidique sans solvant utilisant le CDI.²²⁷ La chimie sans solvant, qui s'inscrit dans le processus de chimie verte, est d'un grand intérêt en milieu industriel car elle apporte un avantage à la fois économique et écologique. La suppression du solvant anhydre pour la réaction de couplage au CDI, permet par conséquent de s'affranchir de la manipulation sous atmosphère inerte et permet également de grandement réduire le temps d'activation de l'acide carboxylique. Ce temps passerait ainsi d'environ 1 h en solvant à environ 5 minutes sans solvant. (Figure 83)

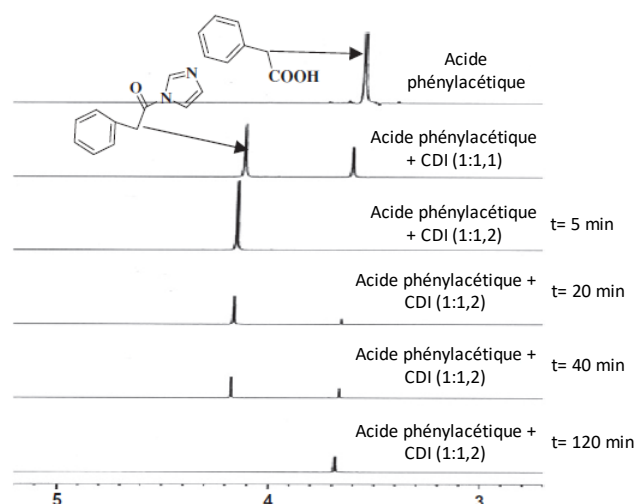


Figure 83. Suivi RMN de l'activation sans solvant de l'acide phénylacétique par le CDI²²⁷

Le suivi RMN de l'activation sans solvant de l'acide phénylacétique par le CDI montre qu'après 5 minutes de réaction, la totalité de l'acide de départ a disparu. En revanche, à des temps supérieurs à 5 minutes, l'intermédiaire imidazolide se dégrade avant de totalement disparaître au bout de deux heures.

Le mime de PC₃ protégé que nous souhaitons synthétiser (Figure 79) résulte du couplage peptidique entre l'acide R- α -lipoïque et la L-cystine diméthyl ester dichlorhydrate qui comporte deux amines primaires. Nous avons réalisé des tests d'activation de l'acide lipoïque par le CDI sans utiliser de solvant. (Figure 84)

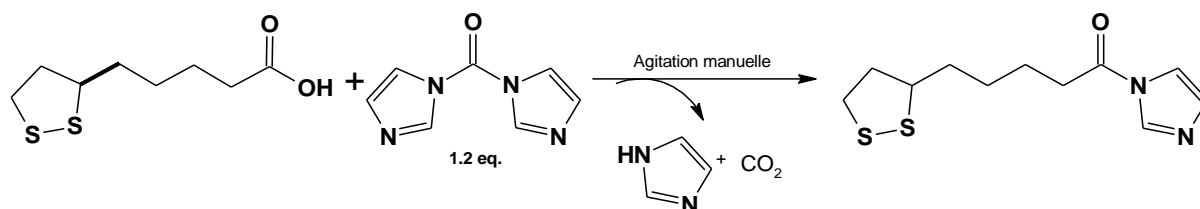


Figure 84. Mécanisme réactionnel de l'activation de l'acide R- α -lipoïque

L'acide R- α -lipoïque est une poudre jaune et le carbonyldiimidazole est une poudre blanche. Ces deux poudres sont ajoutées dans un pilulier en verre puis sont mélangées et broyées à l'aide d'une spatule. L'acide R- α -lipoïque et le CDI réagissent ensemble pour former un liquide jaune hautement visqueux et mousseux, signe du dégagement gazeux de dioxyde de carbone. Le dégagement de CO₂ se fait pendant environ 4-5 minutes pour une masse initiale d'acide R- α -lipoïque d'un gramme. Conformément à ce qui a été observé sur le suivi RMN (Figure 83) le suivi en CCM indique qu'il faut un temps de 5 minutes pour activer l'acide R- α -lipoïque. Lors de ses travaux sur le couplage peptidique sans solvant, l'équipe de Verma a utilisé du chlorure d'imidazole en quantité catalytique (0,1 eq.) afin d'accélérer la réaction. Nous avons utilisé de la L-cystine sous forme de sels de chlorhydrate et comme l'a décrit l'équipe de Woodman, cela permet d'éviter d'ajouter du chlorhydrate d'imidazole.²²⁸ (Figure 85)

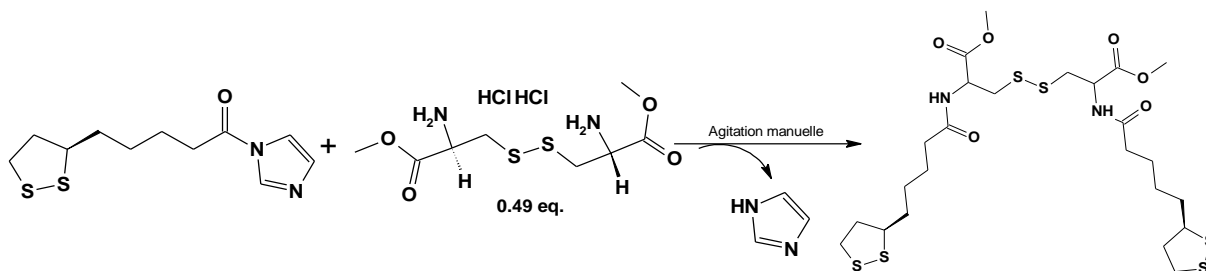


Figure 85. Mécanisme réactionnel du double couplage peptidique entre l'acide R- α -lipoïque et la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate

Après 5 minutes d'activation de l'acide R- α -lipoïque, la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate en léger défaut (0,49 eq. soit 0,98 eq. d'amine par acide carboxylique) est ajoutée directement dans le pilulier en verre. Le suivi de réaction est ensuite réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) avec une révélation au periodate de sodium (NaIO_4) et à la benzidine permettant de faire apparaître les composés soufrés en blanc sur fond bleu.²³¹ Le produit de couplage est ensuite purifié par l'intermédiaire d'un CombiFlash[®] Rf de Teledyne Isco puis caractérisé en résonance magnétique nucléaire (RMN). (Figure 86)

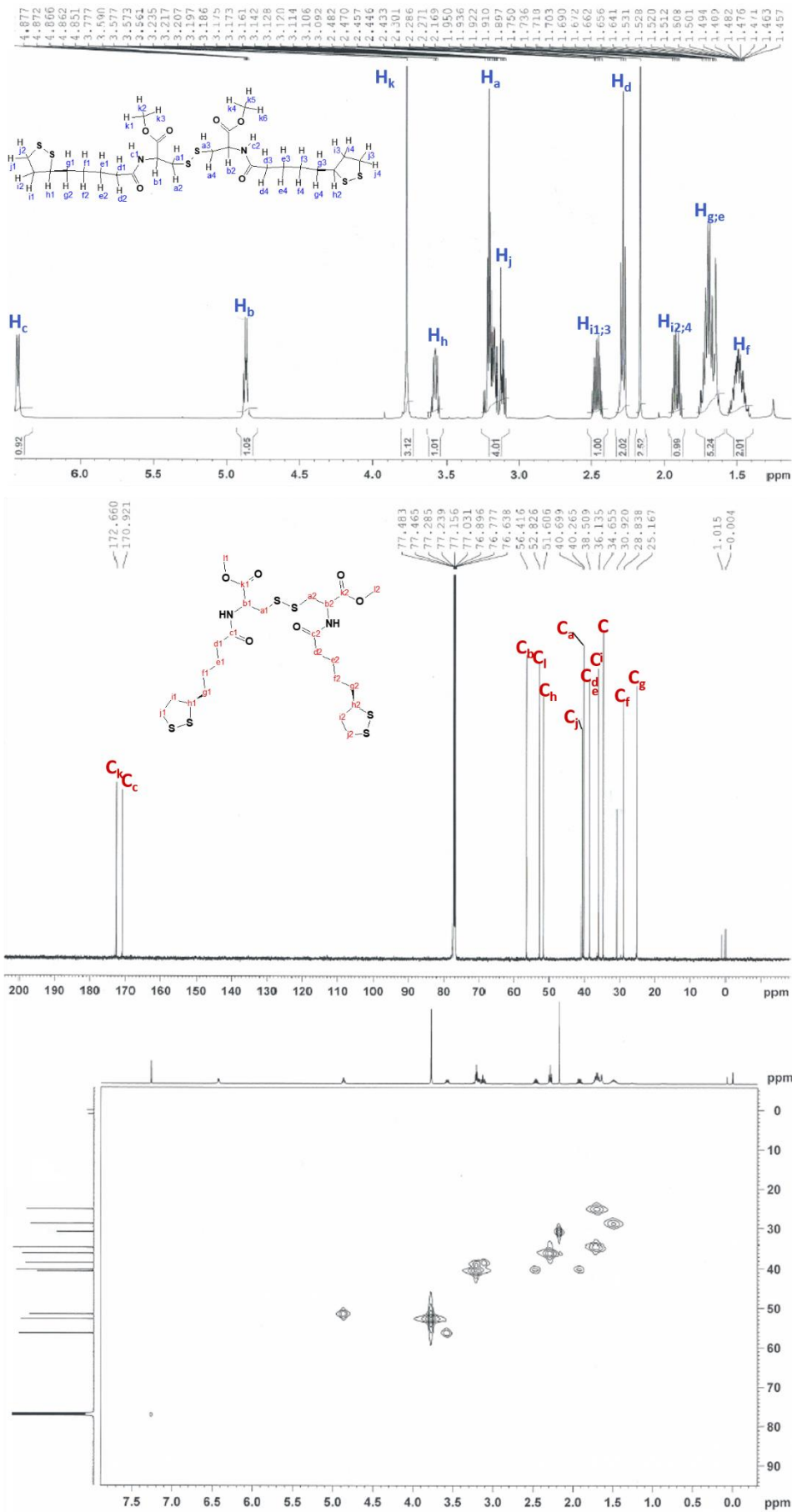


Figure 86. Spectre RMN ¹H, ¹³C et HMQC du mème de PC₃ protégé à 500 MHz dans CDCl₃

L'attribution des différents signaux proton a pu être effectuée en exploitant en partie les données relatives aux deux fragments cystine et acide lipoïque pris séparément. Le signal déblindé résonant à 6,40 ppm est facilement attribuable au proton porté par l'atome d'azote de la fonction amide formée lors du couplage. Ceci est notamment visible par l'absence de tache de corrélation proton-carbone pour ce signal sur la carte HMQC. En outre sa multiplicité, un doublet, est en accord avec la présence du proton H_b voisin porté par le carbone α du motif cystine. Le double triplet observé pour le signal de ce proton H_b, à 4,87 ppm confirme également le couplage peptidique. En effet, une amine restée libre sur le fragment cystine engendrerait, par la présence de plusieurs protons (2 ou 3) sur l'azote terminal, une multiplicité supérieure pour le proton H_b. Enfin, la symétrie de la molécule attendue résultant du double couplage peptidique est également démontrée par le nombre de signaux observés, et leurs intégrations respectives. Finalement l'acquisition d'une carte HMQC a permis l'attribution complète des signaux carbone. Ainsi, les différents spectres obtenus en RMN 500 MHz tendent à affirmer que le double couplage peptidique entre l'acide R-α-lipoïque et la L-cystine diméthylester a bien fonctionné.

Le spectre obtenu en spectrométrie de masse ESI haute résolution confirme l'obtention du mime de PC₃. (Figure 87)

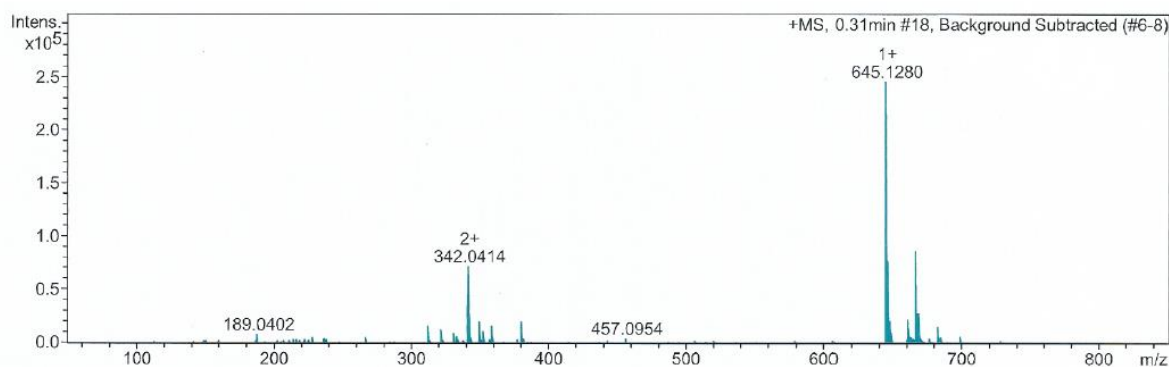


Figure 87. Spectre de masse ESI haute résolution (HRAM) du mime de PC₃

La masse monoisotopique du mime de PC₃ protégé est de 644,12 Da et le pic majoritaire obtenu est de 645.12 m/z correspondant au cation M+H⁺. Le pic à 667,11 m/z correspond au cation M+Na⁺. Le spectre indique que le produit analysé est composé majoritairement de mime de PC₃ protégé, il révèle cependant également la présence de traces de L-cystine monosubstituée (457,09 m/z).

Le mime de PC₃ protégé obtenu est une gelée jaune uniquement soluble dans le chloroforme, le dichlorométhane, le tétrahydrofurane et le diméthylsulfoxyde. Nous avons réalisé différents protocoles afin d'obtenir le meilleur rendement en un temps le plus court possible. Pour cela, nous avons fait varier le facteur temps et le facteur température. (Tableau 5)

Protocole	Température	Temps	Rendement
1	ambiante	8h	73%
2	35°C	5h	77%
3	40°C	5h	87%
4	40°C	4h	82%
5	42°C	2h	79%
6	45°C	2h	72%
7	48°C	2h	17%
8	48°C	1h	32%

Tableau 5. Rendements obtenus lors du double couplage peptidique entre l'acide R- α -lipoïque et la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate en faisant varier le temps et la température (réaction réalisée en pilulier en verre placé en bain-marie après activation de 5 min de l'acide R- α -lipoïque par 1,2 eq. de CDI)

Le temps de réaction de 8 h du protocole n°1 réalisé à température ambiante correspond au temps qu'il a fallu pour observer la disparition de la L-cystine dimethyl ester dichlorhydrate lors du suivi CCM. L'augmentation de la température permet à la fois de diminuer les temps de réaction et d'augmenter les rendements. Ainsi lorsque la réaction a lieu à 40°C cela permet de diminuer le temps de réaction d'un facteur deux et d'augmenter le rendement de neuf points de pourcentage par rapport à la réaction à température ambiante. Il est possible de diminuer le temps de réaction d'un facteur deux supplémentaire, tout en gardant un rendement quasi-similaire, en augmentant encore la température de deux degrés Celsius. Toutefois, l'augmentation de la température au-dessus de 42°C entraîne une diminution des rendements. Notamment à partir de 48°C où le rendement chute drastiquement à 17%. Cela signifie que le produit final, le produit intermédiaire ou l'un des réactifs est thermosensible. La thermosensibilité d'un des réactifs ou d'un des produits est confirmée par le protocole n°8, puisqu'en diminuant le temps de réaction de 2 h à 1 h, le rendement obtenu remonte à 32%. Les températures de décomposition des réactifs ne sont pas communiquées par les fournisseurs, il est juste à noter que la température de 48°C correspond au point de fusion de l'acide R- α -lipoïque. Néanmoins, la fusion de l'acide lipoïque ne devrait pourtant pas poser de soucis, au contraire, il est très courant en chimie sans solvant que l'un des composés soit liquide et qu'il serve à la fois de réactif et de solvant.²³² Ce n'est donc pas l'acide lipoïque le facteur limitant, mais très certainement l'intermédiaire imidazolide. Une augmentation de la température entraînerait ainsi une dégradation du produit activé et il se passerait la même chose qu'observée par l'équipe de Verma. (Figure 83) Par conséquent, la dégradation de l'imidazolide diminuerait le rendement d'une part en diminuant la quantité de réactif pour la L-cystine et d'autre part en reformant de l'acide R- α -lipoïque qui compliquerait la purification. Comme nous l'avons dit plus haut, la molécule mime de PC₃ protégée n'est pas soluble dans l'eau. Cette molécule étant destinée à doser l'arsenic en milieu aqueux il convient d'augmenter

son hydrosolubilité. Afin de déprotéger les acides carboxyliques de leur fonction méthyl, nous avons effectué une saponification par la soude dans un mélange THF/H₂O.²³³ Bien que la déprotection soit efficace, les ponts disulfures, lors de la neutralisation du milieu, se réduisent pour ensuite se réoxyder et provoquer une polymérisation. De ce fait, la purification de la molécule mime de PC₃ que nous souhaitons obtenir n'a pu fonctionner. (Figure 77) C'est pour cela que nous avons décidé de conserver le mime de PC₃ sous sa forme protégée stable et de le rendre hydrosoluble en réduisant les ponts disulfures au dernier moment, juste avant le dosage de l'arsenic (III).

L'obtention de la molécule mime de PC₃ ayant abouti, nous allons maintenant nous consacrer à la synthèse de nanoparticules d'or.

C. Synthèse de nanoparticules d'or

Il existe actuellement plusieurs méthodes chimiques comme l'utilisation de stabilisants, de ligands, de polymères ou de nanoparticules « graines » préalablement formées ainsi que des méthodes physiques comme la radiolyse, la sonochimie et la photochimie pour obtenir des nanoparticules d'or.^{234,235,236,237,238} La technique de synthèse la plus utilisée est très certainement celle développée par Turkevich en 1951.²³⁹ Cela consiste à porter une solution de sels d'or à ébullition puis à ajouter sous forte agitation, 7,6 équivalents de citrate trisodique. La réaction dure cinq minutes et donne des nanoparticules d'or d'environ 200 nm de diamètre de couleur rouge foncé. Le citrate trisodique sert ici à la fois de réducteur et de stabilisant. L'augmentation du rapport Citrate/Sel d'or entraîne une diminution du diamètre moyen des nanoparticules. *A contrario*, une augmentation de la température entraîne une augmentation de la taille des nanoparticules. Lorsque les nanoparticules sont destinées à réaliser des dosages, leur diamètre moyen se situe généralement entre 15 et 30 nm.^{179,182,183,186} Dans la littérature un peu plus récente, des protocoles basés sur celui de Turkevich propose la synthèse de nanoparticules d'or de tailles inférieures à 30 nm.^{240,241,242}

Concernant les nanoparticules d'or stabilisées au xylane, il n'existe pour l'instant qu'une seule publication connue qui explique comment les synthétiser.²¹⁸ La méthode consiste à chauffer une solution de sels d'or HAuCl₄ à 80°C, à y ajouter dix équivalents massiques de xylane de bagasse solubilisés dans de la soude à 2% puis à laisser réagir pendant 40 minutes. Les nanoparticules ainsi formées ont un diamètre moyen se situant entre 10 et 30 nm. Le xylane de bagasse est un arabinoglucuronoxylane qui possède une masse molaire de 49 KDa et qui comporte environ 9% d'arabinose et 2% d'acide glucuronique.²¹⁸



Nous avons appliqué ce protocole à un glucuronoxylane commercial de hêtre issu de la valorisation du bois. C'est un xylane possédant une masse molaire d'environ 31 KDa.²⁴³ Le xylane de hêtre a été caractérisé par RMN du proton. (Figure 88)

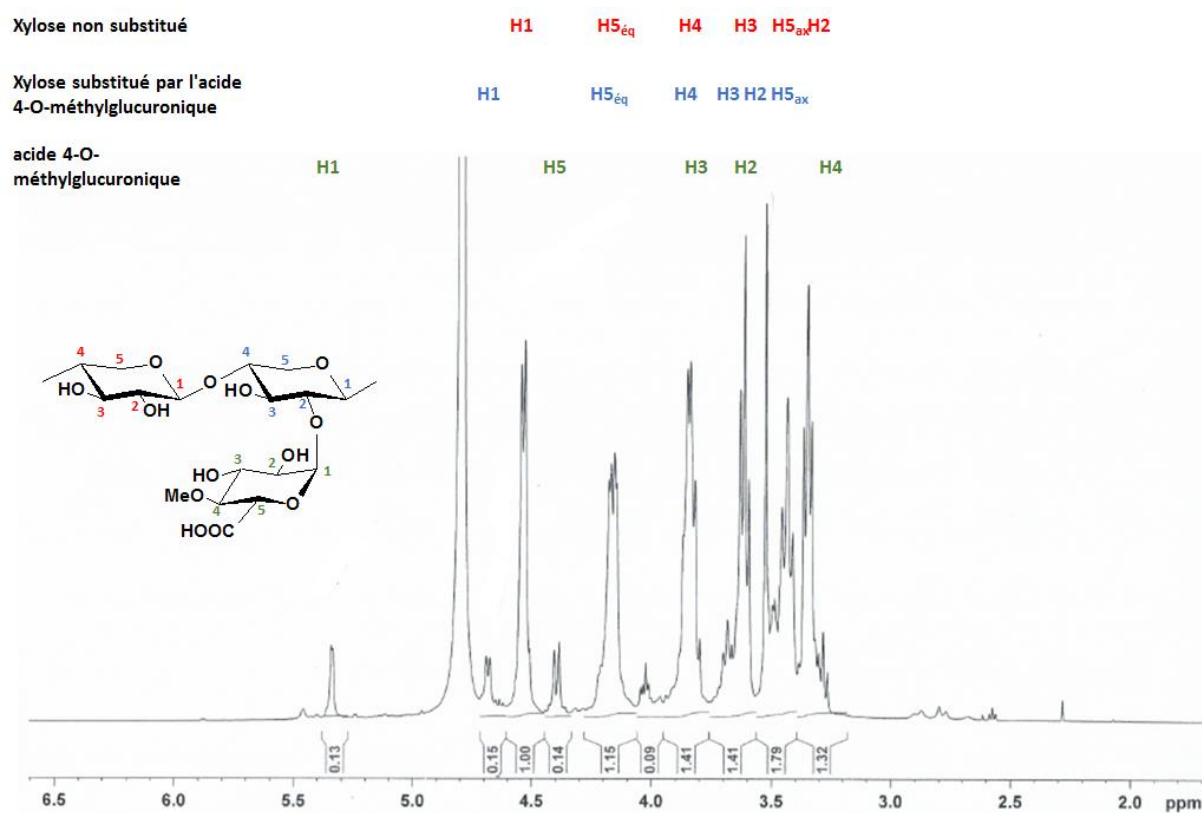


Figure 88. Spectre RMN ¹H du xylane de hêtre natif dans D₂O

Les protons anomériques des unités xylose apparaissent sous forme de doublets à 4,5 ppm pour les xyloses substitués et 4,7 ppm pour les non substitués. Ces doublets ont une constante de couplage d'environ 7 Hz caractéristique des liaisons osidiques de type β. Les protons anomériques des acides uroniques présentent un doublet à 5,3 ppm avec une constante de couplage d'environ 2 Hz caractéristique d'une liaison osidique de type α. Il est également possible d'observer la présence d'un singulet à 3,5 ppm, correspondant aux hydrogènes du O-méthyle porté par l'acide uronique. Cela confirme la présence de l'acide 4-O-méthylglucuronique. Ce spectre permet de calculer le degré de substitution du xylane en acide uronique, en faisant le rapport entre l'intégration du proton anomérique de l'acide 4-O-méthylglucuronique et la somme des intégrations des protons anomériques des unités xyloses substituées et non substituées.

$$DS = \frac{\text{H1 acide 4-O-méthylglucuronique}}{\text{H1 xylose substitué} + \text{H1 xylose non substitué}} = 0,11$$

Il s'agit donc d'un 4-O-méthylglucuronoxylane qui comporte environ 10% d'acide glucuronique. Mais le protocole adapté à l'arabinoglucuronoxylane de bagasse, comportant 2% d'acide

glucuronique, ne fonctionne pas avec le 4-O-méthylglucuronoxylane de hêtre. En effet, il entraîne une agglomération des nanoparticules qui précipitent rapidement.

En s'inspirant des protocoles proposés dans la littérature, nous avons développé notre propre protocole pouvant être appliqué à la fois pour la synthèse de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ainsi que pour des nanoparticules stabilisées au xylane. Ce protocole consiste à chauffer une solution de sels d'or à différentes températures selon les essais (80 à 120°C) puis à ajouter rapidement et sous forte agitation, trois équivalents massiques de citrate trisodique ou de xylane solubilisé dans la soude 2%. La réaction est maintenue sous agitation et chauffage pendant 10 minutes afin d'obtenir une solution rouge bordeaux intense. Ensuite, nous avons effectué sur les solutions de nanoparticules d'or une série de centrifugation jusqu'à 13000 rpm, permettant ainsi d'éliminer le xylane, la soude et les sels qui n'ont pas réagi et de surcroît, de contrôler la concentration par reprise du culot dans un volume déterminé d'eau MilliQ.

Nous avons effectué des synthèses à 80 et 100°C qui donnent des populations de nanoparticules d'or fortement hétérogènes en taille. Seul le protocole à 120°C a permis d'obtenir de manière répétable, que ce soit avec le citrate ou le xylane, des solutions de nanoparticules d'or de taille homogène. (Figure 89)

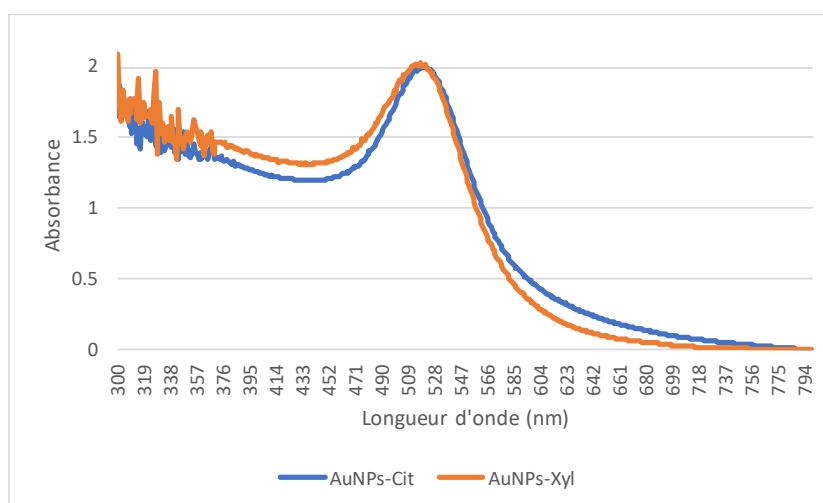


Figure 89. Analyse spectrophotométrique des solutions de nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) et des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl)

Les nanoparticules d'or stabilisées au citrate possèdent un maximum d'absorbance situé à 520 nm et celles stabilisées au xylane à 518 nm ce qui correspond à une taille moyenne de nanoparticules aux environs de 20 nm.²⁴⁰

1. Microscopie électronique à transmission (MET)

Le MET est un microscope électronique qui permet de visualiser des objets dont la taille est supérieure à 0,2 nm. Son principe de fonctionnement est le même que celui du microscope optique où un faisceau de photons est focalisé sur un échantillon. Le MET quant à lui, utilise

un faisceau d'électrons à haute tension émis par un canon à électrons. La différence de résolution avec la microscopie optique s'explique par la différence des longueurs d'onde du faisceau. Elles se situent entre 400 et 800 nm pour les photons alors qu'elle est de l'ordre du picomètre pour l'électron accéléré. Le faisceau d'électrons traverse les atomes de l'échantillon pour donner deux sortes de rayonnement. Les électrons transmis d'une part qui servent à la formation d'une image agrandie de la zone soumise au faisceau. Les électrons diffractés d'autre part qui interfèrent avec les électrons transmis pour former une image haute résolution à l'échelle de l'atome qui donne une indication sur l'organisation cristalline de l'échantillon. Les types d'interactions entre le faisceau d'électrons et la matière traversée permettent essentiellement d'observer de la matière inorganique. Pour pouvoir observer des échantillons biologiques, il faut utiliser des agents de contraste.

Nous avons utilisé un microscope électronique à transmission JEOL 100CX-II afin de pouvoir visualiser les nanoparticules d'or (Figure 90)

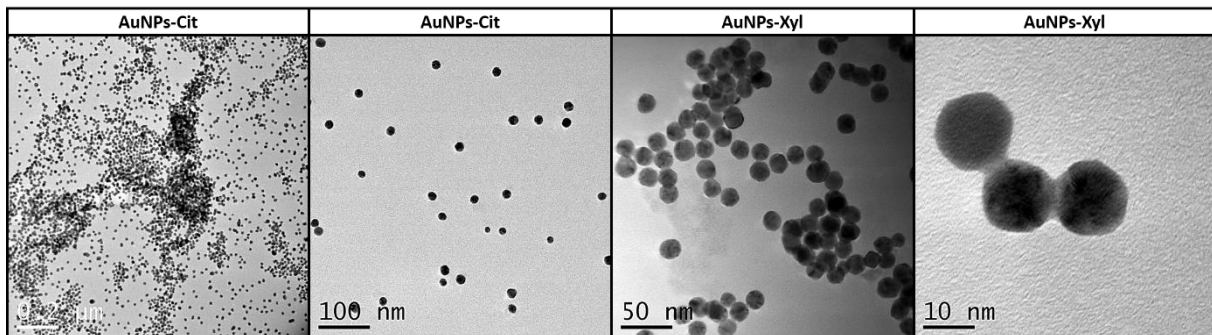


Figure 90. Images en microscopie électronique à transmission (MET) de nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) et de nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl)

Les images obtenues en microscopie électronique à transmission révèlent qu'il y a une répartition homogène de la taille et de la forme des nanoparticules d'or obtenues. Elles sont de forme sphérique avec une taille moyenne située entre 15 et 20 nm. Cela confirme donc l'estimation de taille faite en spectrophotométrie et montre qu'il n'y a pas de différence de forme des nanoparticules d'or entre celles stabilisées au citrate et celles stabilisées au xylane.

2. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les analyses en diffusion dynamique de la lumière (DLS) permettent de donner une mesure du diamètre hydrodynamique ainsi que du potentiel zêta de particules à l'échelle submicronique. Les particules en solution sont soumises à un mouvement thermique aléatoire appelé mouvement Brownien qui est représenté par la relation de Stokes-Einstein :

$$D_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_t}$$

- D_h : le diamètre hydrodynamique
- D_t : le coefficient de diffusion transversal (mesuré par DLS)
- K_B : constante de Boltzmann ($1,38064852 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$)
- T : la température thermodynamique (qui est contrôlée)
- η : la viscosité dynamique (qui est connue)

La taille des particules D_h mesurée en DLS est le diamètre hydrodynamique qui correspond à la taille d'une sphère qui diffuserait la lumière de la même façon dans les mêmes conditions. Le diamètre hydrodynamique donné par l'appareil ne correspond donc pas à la taille physique de la particule mais à son cœur entouré de sa couche de solvation (double couche électrique à sa surface). Il y a aura en conséquence, une surestimation par rapport à une mesure en microscopie électronique.

Le potentiel zêta quant à lui représente la charge électrique au niveau du plan de cisaillement, qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure quand elle est en solution. (Figure 91)

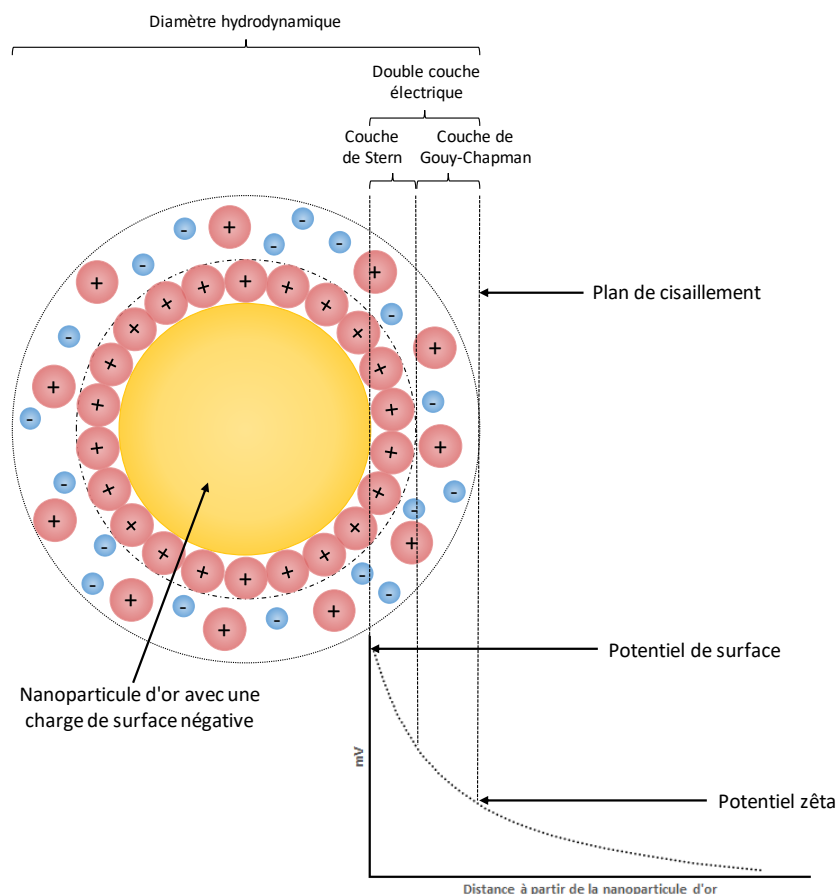


Figure 91. Schéma illustrant le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta

Ainsi, le potentiel zêta est mesuré à l'extérieur de la couche de solvation et non à la surface des nanoparticules d'or. La valeur de ce potentiel indique les forces de répulsions existantes, ce qui permet de prédire les interactions entre les particules et de ce fait, la stabilité de la

suspension au cours du temps. Généralement, les suspensions ayant un potentiel zêta inférieur à -30 mV ou supérieur à 30 mV sont considérées comme stables car les charges électrostatiques sont telles que les particules se repoussent mutuellement.^{244,245} Dans le cas contraire, la suspension est instable et les particules s'agrègent.²⁴⁶

Les nanoparticules d'or ont donc été analysées par diffusion dynamique de la lumière grâce à un appareil Zetasizer Nano ZS. (Figure 92)

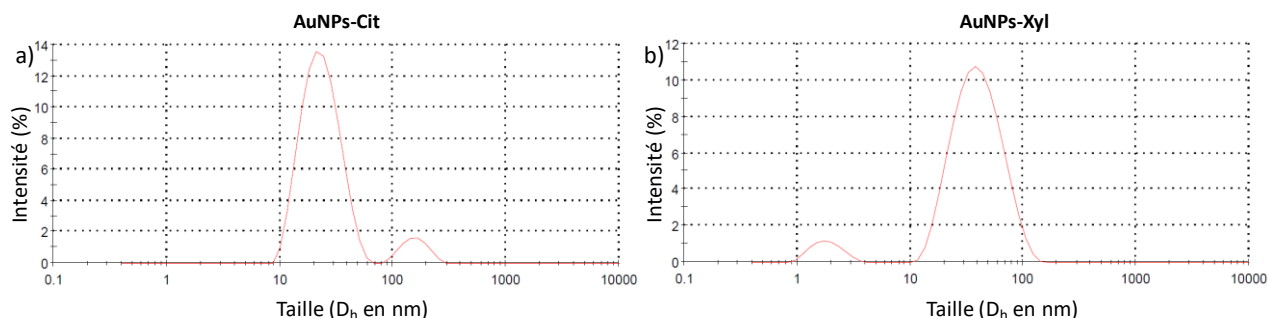


Figure 92. Analyse du diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or par diffusion dynamique de la lumière a) Nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) b) Nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl)

Comme cela était attendu, la taille donnée par l'analyse DLS est supérieure à celle observée en microscopie électronique, du fait de la couche de solvation. Elle révèle que la solution de nanoparticules d'or stabilisées au citrate est composée essentiellement de particules dont le diamètre est de 24 nm. Alors que la solution de nanoparticules d'or stabilisées au xylane quant à elle, est composée majoritairement de particules dont le diamètre hydrodynamique se situe à 43 nm. La forte différence de tailles entre les deux types de nanoparticules s'explique par la différence de nature des deux stabilisants utilisés. En effet, le citrate trisodique est une petite molécule de 258 g/mol alors que le xylane est un polysaccharide dont la masse se mesure en dizaine de kilodaltons.²⁴⁷ Le xylane pourrait hypothétiquement stabiliser les nanoparticules d'or en s'enroulant autour de ces dernières ou en formant des pelotes à leur surface, ce qui augmente grandement leur diamètre hydrodynamique.

L'analyse du potentiel zêta des nanoparticules d'or a été réalisée avec le même appareil Zetasizer Nano ZS. (Figure 93)

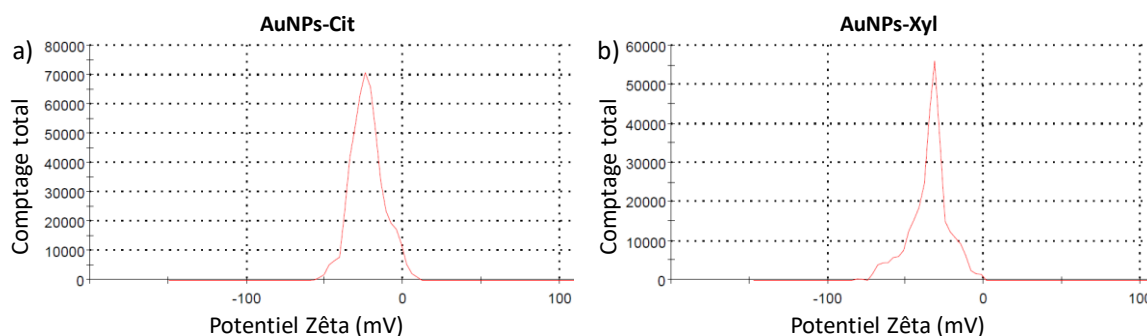


Figure 93. Potentiels zêta des nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) et des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl)

La valeur du potentiel zêta pour les nanoparticules d'or stabilisées au citrate est de -22,7 mV alors qu'elle est de -34,4 mV pour celles stabilisées au xylane. Ainsi les nanoparticules d'or stabilisées au xylane seront plus stables au cours du temps que celles stabilisées au citrate. Nous avons observé cette instabilité qui se manifeste par une agglomération des nanoparticules d'or qui précipitent sous la forme d'un dépôt bleu très foncé. Ce dépôt commence à se former quelques jours après la synthèse pour des nanoparticules d'or stabilisées au citrate conservées à température ambiante, tandis que la solution reste rouge, limpide et sans traces de dépôt pour les nanoparticules d'or stabilisées au xylane. Nous avons donc d'une part réussi à synthétiser une molécule destinée à former des complexes avec l'arsenic (III) et d'autre part des nanoparticules d'or stabilisées avec un xylane, polymère naturel issu du bois de hêtre. Nous allons maintenant présenter les tests de dosage de l'arsenic (III).

D. Dosage de l'arsenic (III) par les nanoparticules d'or

Pour rappel le dosage consiste à complexer l'arsenic (III) avec une quantité connue de fonctions thiols, puis de doser les thiols libres non complexés avec des nanoparticules d'or afin de remonter à la concentration en arsenic (III).

Tous les tests de dosage de l'arsenic (III) utilisant les nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane par l'intermédiaire de la L-cystéine ou du mime de phytochélatine 3 ont été réalisés en volume de 1,5 mL dans des cuves en quartz. Cela afin d'avoir une technique standardisée permettant d'obtenir à la fois un résultat qualitatif par une analyse à l'œil nu et un résultat quantitatif par une analyse en spectrophotométrie UV-Visible.

I. Dosage de l'arsenic (III) par la L-cystéine

Dans la littérature la limite de détection de la L-cystéine dosée par les nanoparticules d'or stabilisées au xylane est de 100 μM .²¹⁸ Nous avons utilisé cette concentration en L-cystéine pour réaliser les dosages.

a) Nanoparticules d'or stabilisées au citrate

Le dosage consiste à ajouter 150 nmol de L-cystéine dans un échantillon de 1,5 mL contenant une quantité variable d'arsenic (III), auquel sont ensuite ajoutées des nanoparticules d'or stabilisées au citrate. L'agglomération des nanoparticules d'or se fait progressivement au cours du temps et elle peut être suivie par spectrophotométrie UV-visible. (Figure 94)



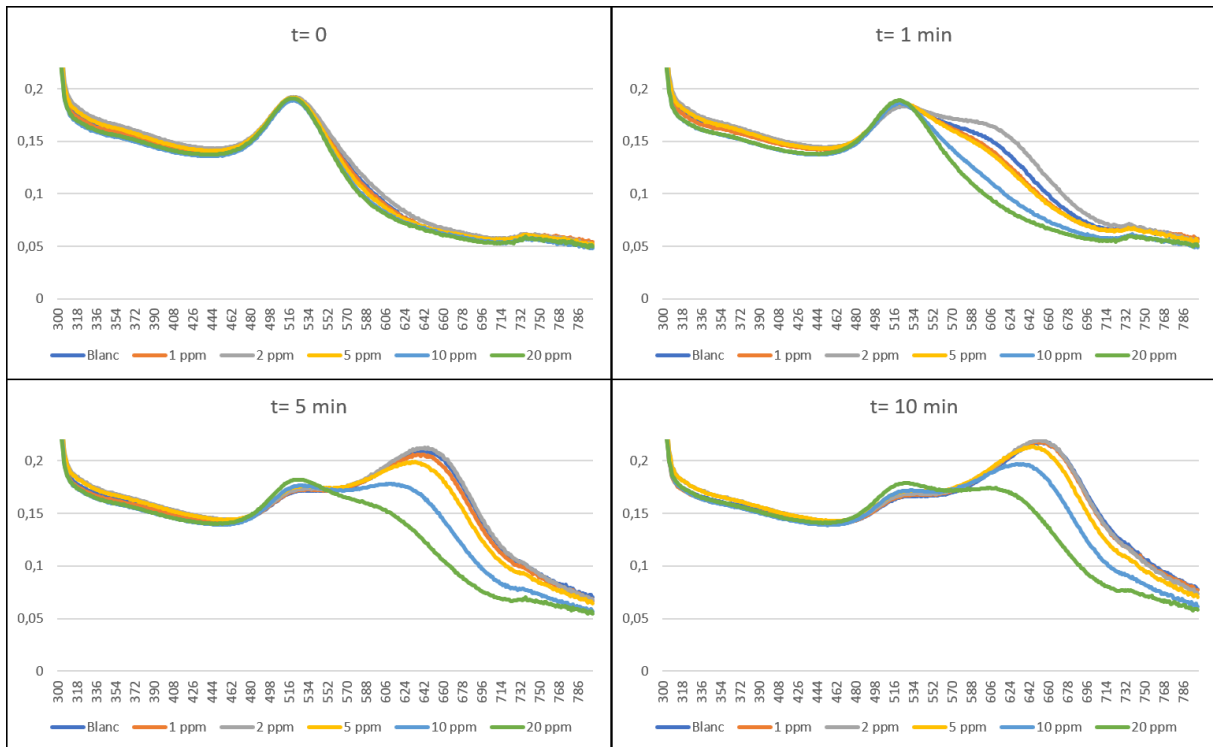


Figure 94. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de L-cystéine)

L'agglomération des nanoparticules d'or induite par la L-cystéine se traduit en spectrophotométrie par un effet hypochrome à 520 nm et par un effet hyperchrome à 650 nm. La présence de fortes teneurs en arsenic (III) amoindrit le phénomène d'agglomération déclenché par la L-cystéine. Ainsi, à des concentrations supérieures à 5 ppm en arsenic (III) après 10 minutes de réaction, les valeurs d'absorbance à 650 nm sont plus faibles que celle de la référence. Alors que pour les concentrations inférieures à 5 ppm, les valeurs d'absorbance à 650 nm sont quasi-similaires à celle de la référence. (Figure 95)

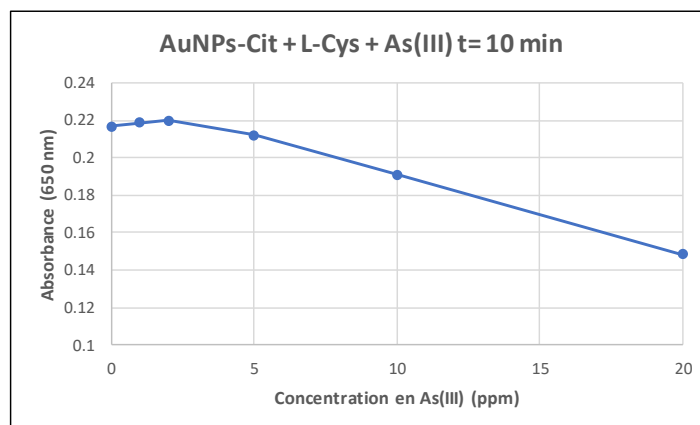


Figure 95. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de L-cystéine)



Les concentrations en arsenic (III) jusqu'à 2 ppm n'ont pas d'incidence sur le phénomène d'agglomération engendrée par la L-cystéine. Ensuite il y a une diminution de l'agglomération de plus en plus importante avec l'augmentation de la concentration en arsenic (III).

Nous avons également effectué un suivi à l'œil nu de l'évolution de l'agglomération afin de déterminer s'il était possible d'observer une gamme de dosage. (Figure 96)

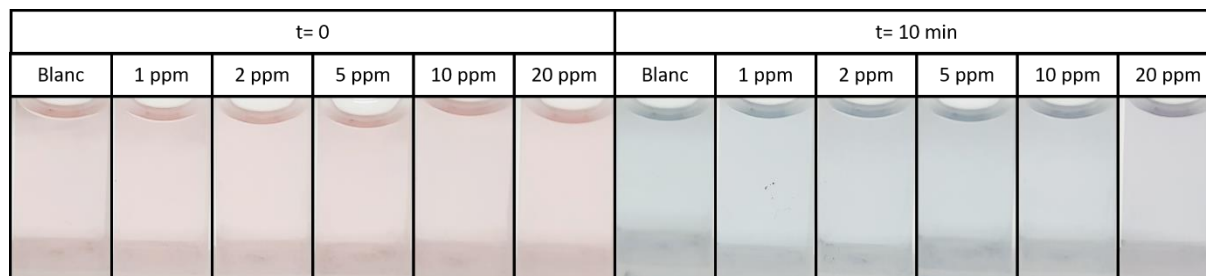


Figure 96. Suivi cinétique à l'œil nu du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate à t= 0 et à t= 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 µM de cystéine)

Les effets hypo- et hyperchromes observés en spectrophotométrie se traduisent à l'œil nu par un changement de couleur passant du rose au bleu. Cependant, les différences constatées avec la référence pour des concentrations en arsenic (III) supérieures à 5 ppm ne sont pas visibles à l'œil nu. Mis à part pour des teneurs de 20 ppm, où la coloration bleue obtenue après 10 minutes de réaction est légèrement plus nuancée (couleur rose plus prononcée) que celle des autres échantillons. Ce résultat indique que le test fonctionne à l'œil nu pour des concentrations en arsenic (III) supérieures à 20 ppm.

***b)* Nanoparticules d'or stabilisées au xylane**

Le dosage est le même que celui réalisé précédemment, à la différence que ce sont des nanoparticules d'or stabilisées au xylane qui sont ici utilisées. (Figure 97)



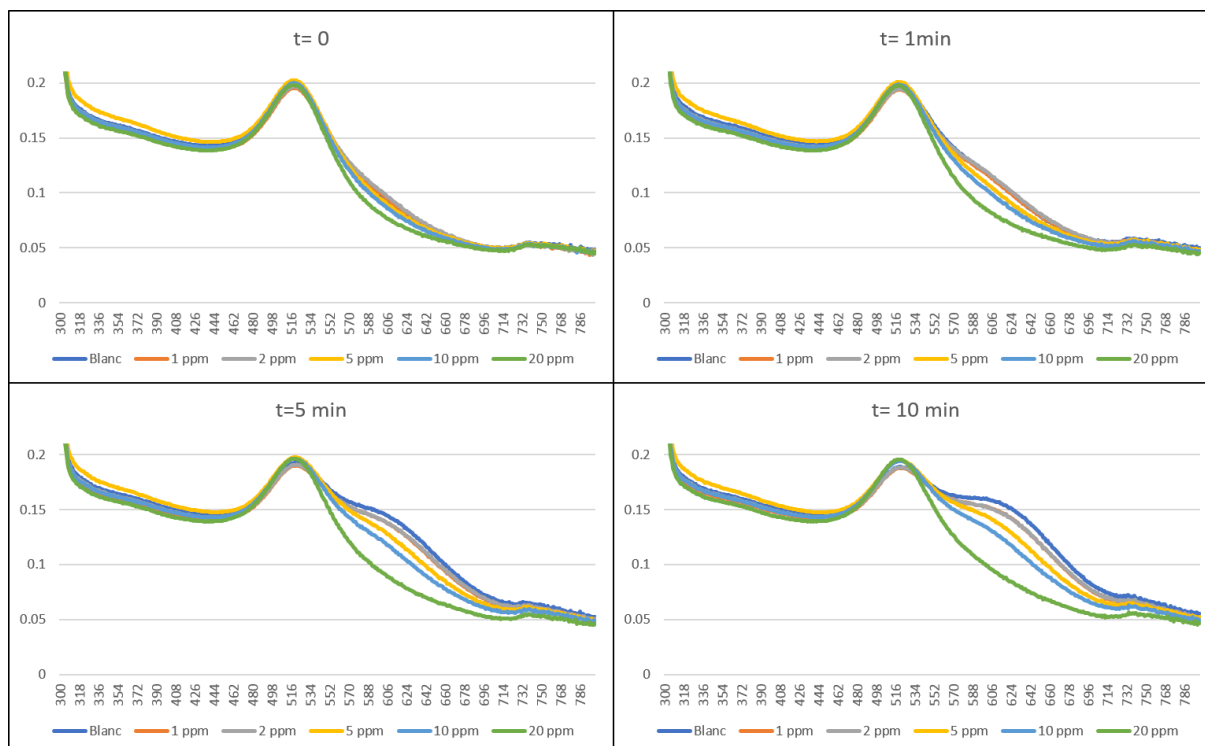


Figure 97. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de cystéine)

Les effets hypo- et hyperchromes induits par la L-cystéine sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec les nanoparticules d'or stabilisées au citrate. Cela signifierait donc que Les nanoparticules d'or stabilisées au xylane sont moins réactives. Du fait d'une couche de solvation plus importante, la cystéine doit avoir plus de mal à substituer le xylane que le citrate. Toutefois, bien que l'intensité soit plus faible, les valeurs d'absorbance à 650 nm pour les différentes concentrations en arsenic (III) semblent être mieux différenciables. (Figure 98)

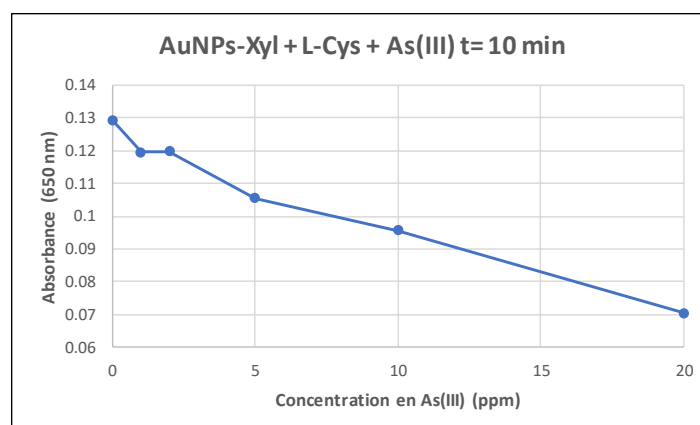


Figure 98. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de L-cystéine)

Après 10 minutes de réaction, les valeurs d'absorbance à 650 nm de tous les échantillons sont inférieures à celle de la référence. Le seuil de détection de l'arsenic (III) par le dosage aux nanoparticules d'or stabilisées au xylane et à la L-cystéine se situe donc plus bas que celui du

dosage aux nanoparticules d'or stabilisées au citrate. La plus faible réactivité des nanoparticules d'or stabilisées au xylane, permet de plus, d'avoir une évolution de la coloration au cours du temps beaucoup plus nuancée. (Figure 99)

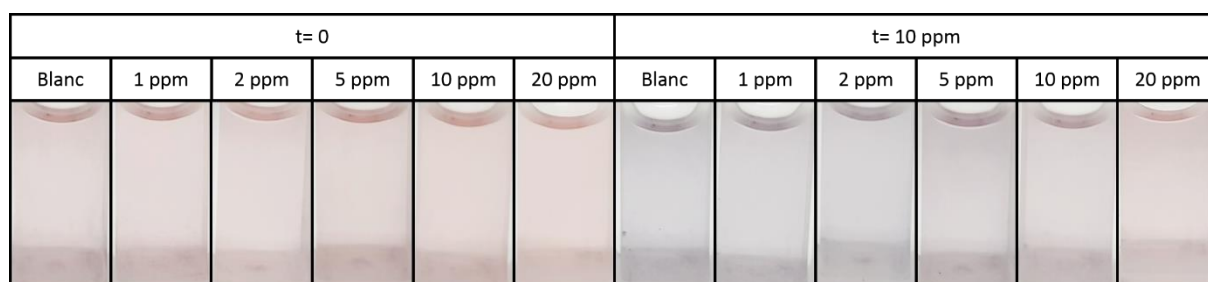


Figure 99. Suivi cinétique à l'œil nu du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate à t= 0 et à t= 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 100 μ M de cystéine)

Les nanoparticules d'or stabilisées au xylane sont donc en définitive moins réactives que celles stabilisées au citrate, mais ce défaut se révèle finalement être un atout à l'encontre de ces dernières. Ainsi, au bout d'un temps de réaction de 10 minutes, il est possible de doser à l'œil nu des concentrations en arsenic (III) à partir de 5 ppm.

2. Dosage de l'arsenic (III) par le mime de PC_3

Pour que le mime de PC_3 puisse complexer l'arsenic (III), il faut que les sulfures qu'il porte soient sous la forme réduite -SH. Généralement, les réducteurs de ponts disulfures utilisés sont à base de soufre comme le dithiothréitol (DTT). Mais afin de ne pas fausser le test en ajoutant des thiols supplémentaires dans l'échantillon, nous avons choisi d'utiliser de la Tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP). (Figure 100)

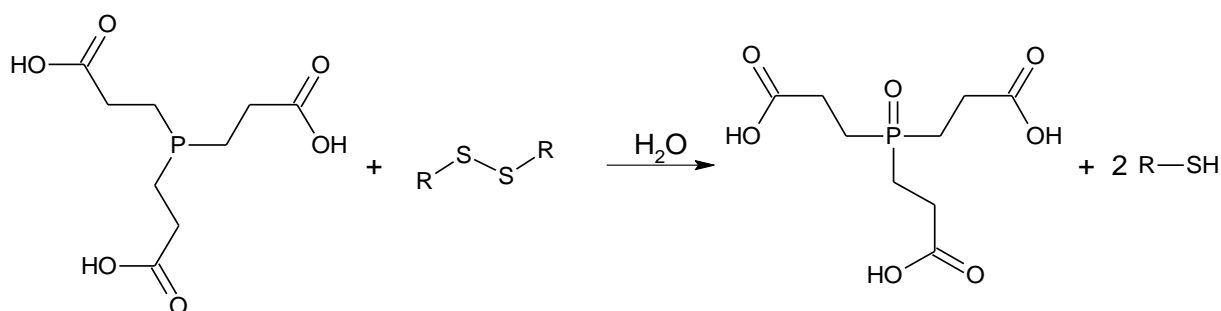


Figure 100. Schéma réactionnel de la réduction d'un pont disulfure par le TCEP

Le mime de PC_3 protégé n'étant pas soluble dans l'eau, l'ensemble des essais de dosage ont été utilisés en utilisant comme solvant de ce composé un mélange DMSO/ H_2O (1:9). Pour cela, il faut d'abord solubiliser la molécule dans le DMSO afin d'avoir une solution mère de concentration connue. La solution est ensuite fortement diluée dans de l'eau MilliQ et il se forme une laitance blanche. La solution est mise sous agitation en présence de 3,6 équivalents de TCEP (1,2 eq/pont disulfure), et elle devient limpide au bout de 24 h. Afin d'avoir une teneur en sites actifs (thiols) comparable à celle utilisée avec la L-cystéine, la quantité d'ajout molaire de mime de PC_3 protégé devra être six fois inférieure.

Si l'on effectue une mesure d'absorbance à une longueur d'onde fixe de 650 nm comme précédemment pour effectuer les dosages, la courbe théorique de l'absorbance mesurée en fonction de la concentration en arsenic (III) devrait décroître régulièrement jusqu'à une valeur plateau. Traduisant une diminution de l'agglomération des nanoparticules d'or induite par le mime de PC₃ avec l'augmentation de la concentration en arsenic (III). Si l'on considère l'hypothèse que l'arsenic (III) forme exclusivement des complexes trivalents avec les molécules mimes de PC₃, alors la courbe attendue aurait une allure de décroissance linéaire jusqu'à atteindre une concentration en arsenic (III) égale à la concentration en mime de PC₃ avant d'atteindre un plateau, correspondant à une agrégation nulle. (Figure 101)

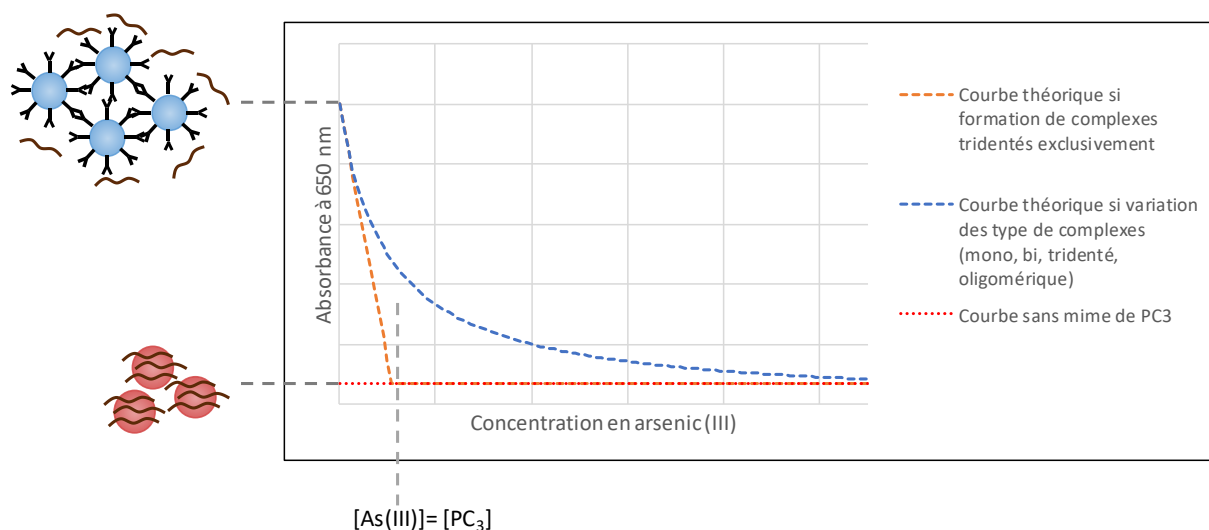


Figure 101. Courbe théorique et courbe attendue en spectrophotométrie UV-visible (650 nm) lors du dosage de l'arsenic (III) par le mime de PC₃ et par des nanoparticules d'or

L'obtention d'une courbe expérimentale différente de la courbe théoriquement attendue pour des complexes uniquement tridentés, ce qui est le plus probable, suggère la coexistence dans le milieu du dosage de plusieurs formes de complexe, dont les formes mono ou bidenté voir oligomérique pourraient contribuer à maintenir un certain taux d'aggrégation des nanoparticules.

a) Nanoparticules d'or stabilisées au citrate

Le dosage consiste à ajouter 50 nmol de mime de PC₃ réduit dans un échantillon de 1,5 mL contenant plus ou moins d'arsenic (III), auquel sont ensuite ajoutées des nanoparticules d'or stabilisées au citrate. (Figure 102)

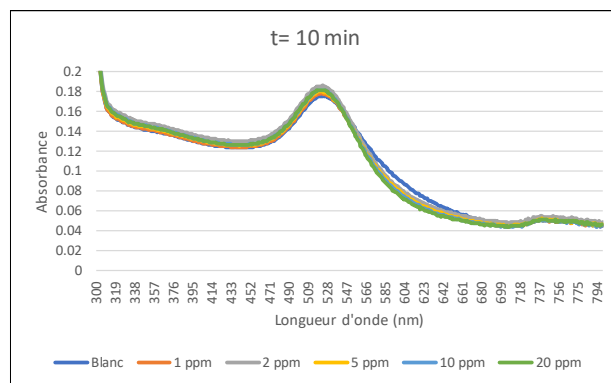


Figure 102. Analyse en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate à t= 10 min (échantillon de 1,5 mL contenant 33,33 μM de mime de PC_3)

Pour une quantité molaire en thiols équivalente, le mime de PC_3 est beaucoup moins réactif vis-à-vis des nanoparticules d'or stabilisées au citrate que la L-cystéine. Il est nécessaire de monter à des concentrations de 60 μM dans l'échantillon par l'ajout de 90 nmol de mime de PC_3 , pour obtenir un début d'agrégation des nanoparticules d'or en 10 minutes. (Figure 103)

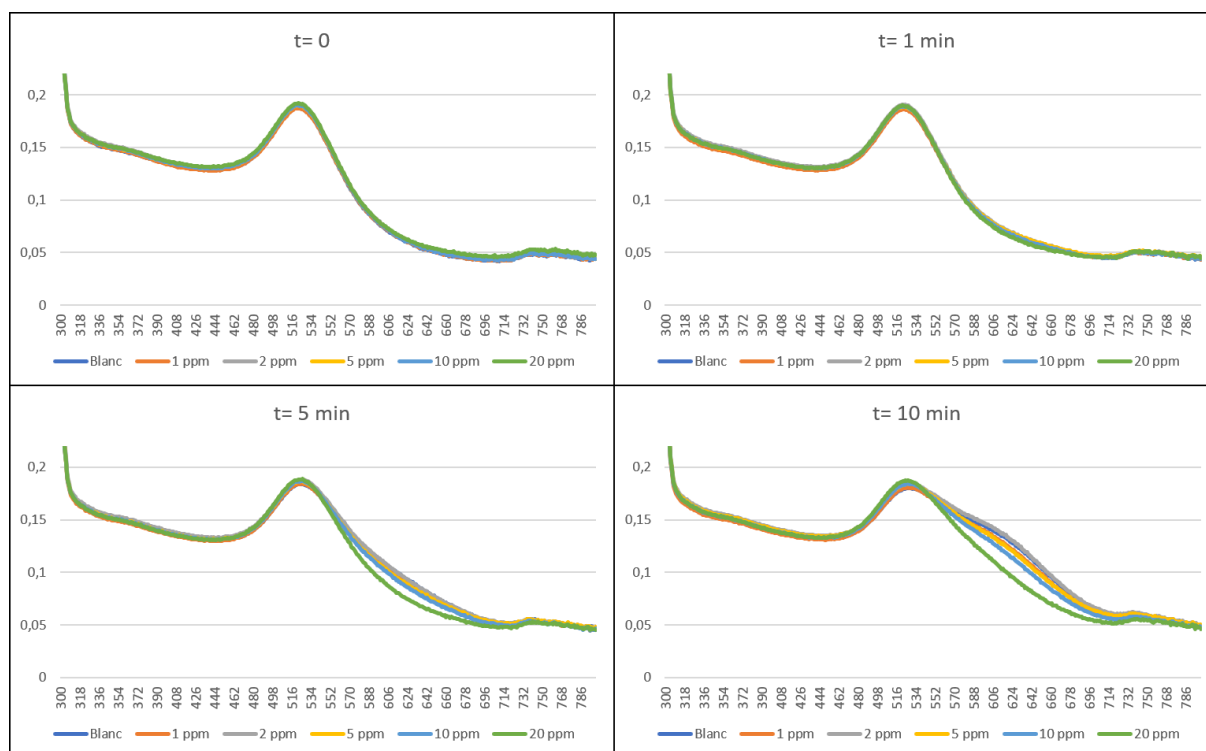


Figure 103. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au citrate de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μM de mime de PC_3)

Même pour une quantité molaire en fonctions thiol 1,8 fois supérieure, l'agglomération reste plus faible que celle observée avec l'utilisation de la L-cystéine. Cela pourrait être due à la structure de la molécule plus volumineuse que celle de la L-cystéine, ce qui entraînerait un encombrement stérique qui diminuerait sa réactivité avec les nanoparticules d'or et donc diminuerait leur agrégation. Une autre hypothèse serait qu'en présence d'eau dans le mélange DMSO/ H_2O , la chaîne lipophile de l'acide se replierait ce qui pourrait empêcher les

nanoparticules d'or d'avoir accès aux fonctions thiol du motif acide lipophile. Toutefois, nous pouvons tout de même observer une décroissance de l'absorbance à 650 nm proportionnelle à l'augmentation de la concentration en arsenic (III). (Figure 104)

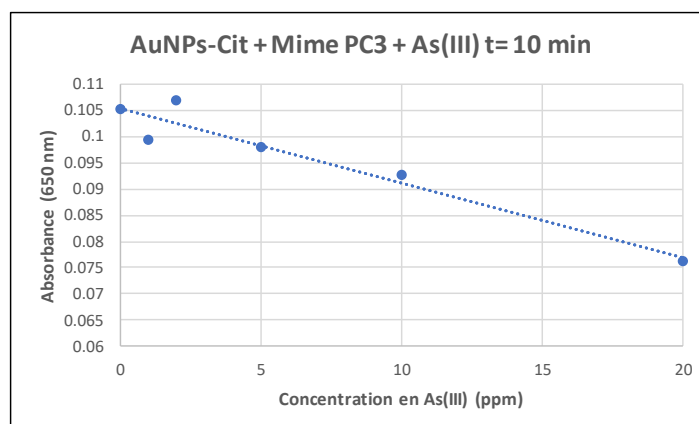


Figure 104. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au citrate (AuNPs-Cit) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 60 µM de mime de PC₃)

Tout comme lors du dosage avec la L-cystéine, les concentrations en arsenic (III) inférieures à 2 ppm n'ont pas de réelles incidences sur le taux d'agrégation des nanoparticules d'or stabilisées au citrate par le mime de PC₃. Ensuite, une linéarité de la diminution de l'agrégation est observée pour des concentrations supérieures. Cependant, pour une concentration en mime de PC₃ de 60 µM, la concentration massique en arsenic (III) équivalente est de 4,5 ppm. Cette courbe ne concorde donc pas avec la courbe attendue qui aurait consisté en une diminution linéaire jusqu'à une concentration en arsenic (III) de 4,5 ppm avant d'atteindre un plateau, correspondant à une agrégation nulle. Cette différence pourrait être due à une plus forte affinité du soufre pour l'or que pour l'arsenic (III) ce qui entraînerait une déstabilisation des complexes. Cela pourrait également être dû au probable repliement en milieu aqueux de la chaîne lipophile expliqué précédemment, ce qui amènerait une difficulté de l'arsenic (III) à former des complexes avec le mime de PC₃.

***b)* Nanoparticules d'or stabilisées au xylane**

Le dosage consiste à ajouter 90 nmol de mime de PC₃, réduit pendant 24 h, dans un échantillon de 1,5 mL contenant une quantité variable d'arsenic (III), auquel sont ensuite ajoutées des nanoparticules d'or stabilisées au xylane. (Figure 105)

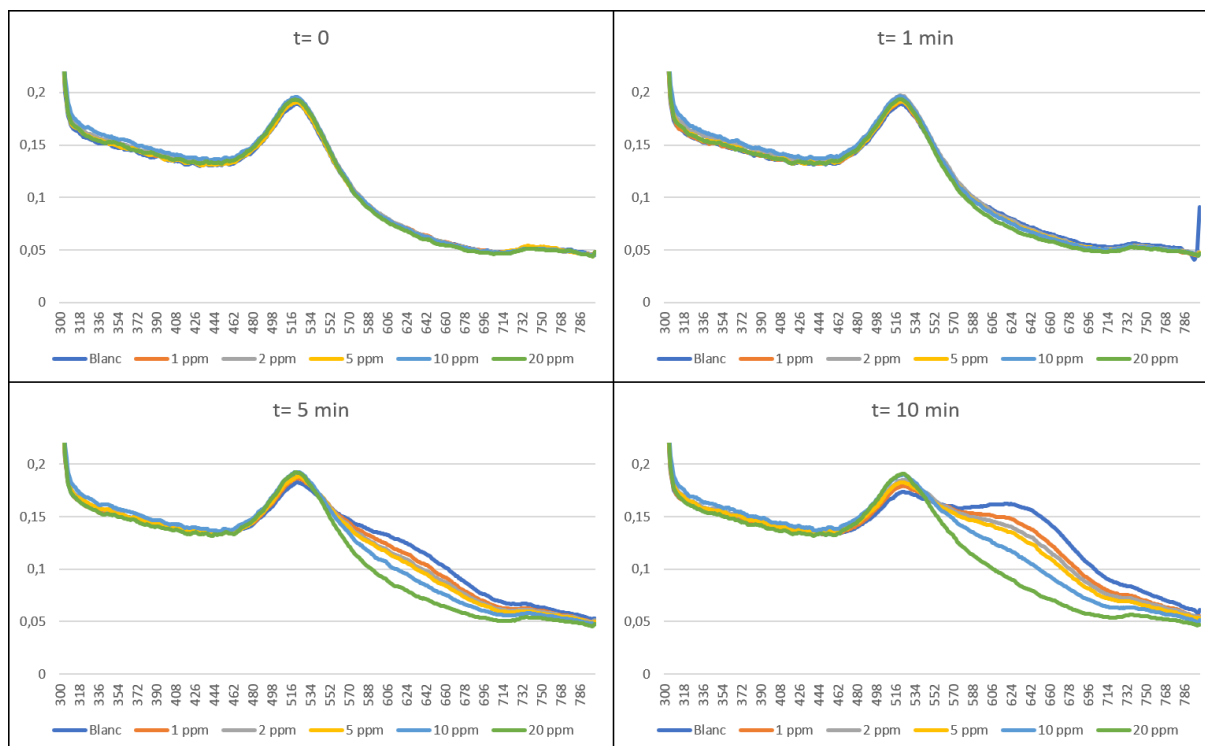


Figure 105. Suivi cinétique en spectrophotométrie UV-visible du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane de 0 à 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC₃)

Nous observons ici le même phénomène que lors des précédents dosages. Soit une augmentation des valeurs d'absorbance à 650 nm plus ou moins importantes selon les concentrations en arsenic (III). Les nanoparticules d'or stabilisées au xylane sont plus réactives comparées à celles stabilisées au citrate en donnant une plus forte réponse en spectrophotométrie. La faible réponse obtenue avec les nanoparticules d'or stabilisées au citrate ne serait donc pas due à un manque de réactivité du mime de PC₃ mais plutôt à un manque d'affinité. Cela signifierait que la molécule que nous avons synthétisée réagirait plus fortement avec le xylane ou le déplacerait plus facilement que le citrate à la surface des nanoparticules d'or.

Toutes les valeurs d'absorbance obtenues à 650 nm pour les échantillons arséniés sont inférieures à celle de la référence, avec une absorbance qui diminue lorsque la concentration en arsenic (III) augmente. (Figure 106)

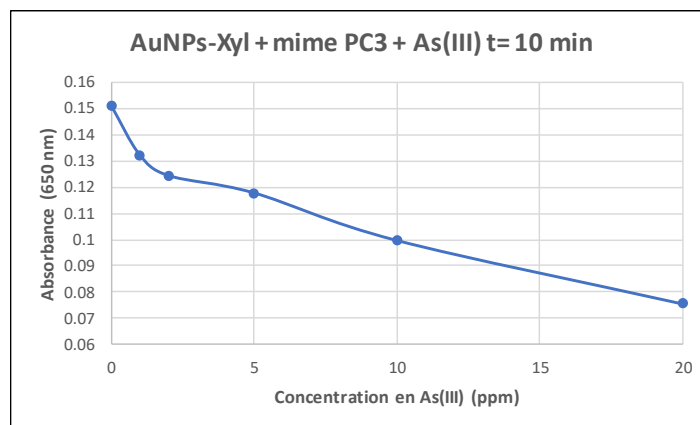


Figure 106. Evolution des valeurs d'absorbance des nanoparticules d'or stabilisées au xylane (AuNPs-Xyl) à 650 nm (t= 10 min) pour des concentrations croissantes en As(III) (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC₃)

Après 10 minutes de réaction, il y a une forte diminution de la valeur d'absorbance à 650 nm pour les concentrations en arsenic (III) allant jusqu'à 2 ppm. Puis on remarque un plateau entre 2 et 5 ppm. Ensuite, pour des concentrations plus élevées en arsenic, il y a toujours une réduction de l'absorbance mais la diminution observée est plus faible. Cette courbe se rapproche de la courbe attendue avec un plateau se situant aux alentours de 4,5 ppm d'arsenic (III), correspondant à 60 μ M de mime de PC₃. Néanmoins ce plateau n'est pas définitif et la diminution des valeurs d'absorbance continue après cette valeur de 4,5 ppm. Cette constatation tend à confirmer l'hypothèse que le soufre a une plus forte affinité pour l'or que pour l'arsenic (III), entraînant une déstabilisation des complexes. Le dosage de l'arsenic (III) pourrait donc ici se diviser en deux gammes. Tout d'abord une gamme de dosage allant de 0 à 2 ppm et ensuite une deuxième gamme de dosage à partir de 5 ppm.

Bien que l'allure des courbes en spectrophotométrie UV-visible soit voisine de celle obtenue lors du dosage de l'arsenic (III) par la L-cystéine et les nanoparticules d'or stabilisées au xylane, traduisant une réduction de l'agrégation en fonction de la concentration en arsenic (III). Le changement de couleur au bout de 10 minutes, dans le cas de l'utilisation du mime de PC₃, est beaucoup moins prononcé. (Figure 107)

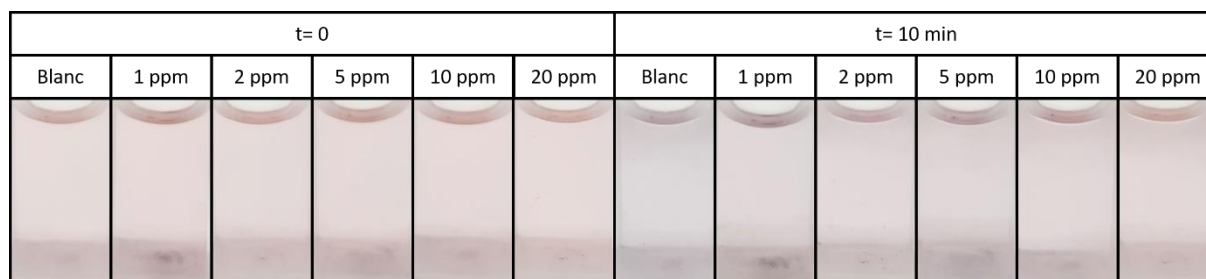


Figure 107. Suivi cinétique à l'œil nu du dosage de l'arsenic (III) entre 0 et 20 ppm par des nanoparticules d'or stabilisées au xylane à t= 0 et à t= 10 minutes (échantillon de 1,5 mL contenant 60 μ M de mime de PC₃)

Malgré un temps de réaction de 10 minutes, la coloration bleue s'est très peu développée, même pour l'échantillon de référence. Néanmoins, en présence d'arsenic (III), la forte

diminution de la valeur d'absorbance à 650 nm est clairement visible. Il est ainsi possible de nettement faire la différence entre un échantillon contenant 1 ppm d'arsenic (III) et un échantillon n'en contenant pas.

Sur les quatre techniques de dosage de l'arsenic (III) utilisant des nanoparticules d'or présentées, c'est celle employant des nanoparticules d'or stabilisées au xylane et le mime de PC_3 qui a donné les meilleurs résultats en termes de sensibilité. Cette technique a permis le dosage à l'œil nu d'une concentration en arsenic (III) de 1 ppm dans un échantillon aqueux. C'est très loin des potentiels 30 ppb détectés visuellement par la phytochélatine 3 et encore plus loin du seuil de détection de 10 ppb souhaité.¹⁸⁶ La technique utilisant les nanoparticules d'or stabilisées au xylane et la L-cystéine est quant à elle, celle qui a permis d'obtenir la meilleure gamme de couleur.

Pour les tests futurs, il sera très certainement possible de reprendre le dosage de l'arsenic (III) par les nanoparticules d'or stabilisées au xylane et par le mime de PC_3 . Les résultats obtenus indiquent qu'il est envisageable de descendre à des détections à l'œil nu en dessous de l'échelle du ppm grâce à cette méthode. Cela pourrait permettre dans l'avenir de développer un nouveau kit de dosage de l'arsenic (III) utilisant des nanoparticules d'or. Il faudra également réaliser des tests d'interférences en vue de déterminer la spécificité ou non de la L-cystéine ou de notre molécule mime de PC_3 envers l'arsenic (III).



Conclusion

Nous avons présenté deux axes de recherches destinés au dosage de l'arsenic, l'un basé sur l'utilisation de molybdate d'ammonium, l'autre sur l'utilisation de nanoparticules d'or.

Concernant le premier axe de recherche, nous avons dans un premier temps réussi à optimiser un protocole de dosage de l'arsenic (V) en solution en diminuant les temps d'analyse d'un facteur deux. Ce protocole optimisé nous a permis de doser en 15 minutes à l'œil nu des concentrations en arsenic (V) de 50 ppb, ainsi que des concentrations de 10 ppb par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre UV-Visible. Nous avons par la suite développé une nouvelle méthode basée sur ce protocole optimisé. Cette nouvelle méthode a consisté à retenir par l'intermédiaire d'une membrane filtrante, la coloration obtenue en solution. Par ce moyen, nous avons pu descendre par une détection à l'œil nu à des concentrations de 10 ppb en arsenic (V). De plus, cette nouvelle méthode a permis de diminuer le temps d'un facteur trois supplémentaire en portant le temps d'analyse à seulement 5 minutes. Parallèlement, nous avons réussi à adapter cette méthode à un format bandelette en nous appuyant sur des méthodologies développées par la société Novassay pour le dosage de l'uranium.¹⁸⁹ Le format bandelette est celui qui permet *in fine* le protocole le plus simple, en donnant un résultat coloré à l'œil nu en seulement 60 secondes. Cependant, la sensibilité obtenue de la part des bandelettes n'est pas suffisante pour atteindre les concentrations à l'œil nu de 10 ppb fixées par l'OMS concernant les eaux de boissons. Toutefois, bien que le seuil de détection soit cinquante fois supérieur à cette concentration, les bandelettes pourraient trouver une application dans les secteurs industriels soumis à de fortes concentrations en arsenic, comme les mines d'or ou le secteur de la tannerie par exemple.

La limite que nous avons rencontrée lors de l'utilisation du molybdate d'ammonium, est l'interférence de la part du phosphate lors du dosage. En effet, ce dernier réagit plus fortement avec le molybdate d'ammonium que l'arsenic (V), entraînant ainsi des erreurs d'interprétations lors du dosage. Malgré de nombreux essais, nous n'avons malheureusement pas réussi à éliminer le phosphate sans modifier la concentration en arsenic dans les échantillons que nous avons testés.

Concernant le deuxième axe de recherche, nous avons réussi à développer une nouvelle méthode de dosage de l'arsenic (III) par l'utilisation de nanoparticules d'or. Nous avons utilisé la L-cystéine de façon inédite afin de doser l'arsenic (III) par l'intermédiaire de nanoparticules d'or stabilisées au xylane. Ces nanoparticules donnent de meilleurs résultats que celles stabilisées au citrate classiquement utilisées et présente, de plus, l'avantage sur ces dernières d'être bien plus stables à température ambiante. Parallèlement, nous avons synthétisé une molécule issue d'un double couplage peptidique entre la L-cystine et l'acide R- α -lipoïque. Le double couplage a pu être réalisé grâce à un protocole optimisé n'utilisant pas de solvant, en

seulement deux heures et avec un très bon rendement de 80%. L'utilisation de cette molécule, mimant le comportement de la phytochélatine 3 permet le dosage de l'arsenic (III) grâce à son aptitude à interagir de manière compétitive avec l'arsenic et une solution de nanoparticules d'or. Avec l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, cette méthode permet ainsi de doser des concentrations en arsenic (III) supérieures au ppm.

Du point de vue de la valorisation des résultats présentés, compte tenu de leur facilité d'utilisation, de leur innocuité comparativement à celles actuellement sur le marché, les bandelettes test développées sur la base de la stratégie au molybdate d'ammonium semblent les plus intéressantes à exploiter à court terme. Pour cela, il conviendra d'optimiser la formulation d'imprégnation avec l'objectif d'abaisser encore le seuil de détection. Ainsi, le dépôt d'un brevet est prévu à court terme pour une exploitation exclusive par la société Novassay.

Le développement de la technique de mesure colorimétrique utilisant des cartouches filtrantes mérite également d'être poursuivie. Dans ce cas encore, c'est le manque de sélectivité qui constitue le principal verrou à briser. Le travail exploratoire de cette thèse montre que deux approches peuvent être exploitées : la formation de complexes colorés spécifiquement avec l'arsenic, stratégie qui, en utilisant le molybdate d'ammonium a montré ses limites, ou l'élimination préalablement au test soit du phosphate seul soit du phosphate et de l'arsenic (V). C'est cette deuxième approche qui nous semble la plus pertinente à poursuivre dans la suite de ce travail. En effet, et bien que nos résultats n'aient malheureusement pas permis d'apporter de solutions satisfaisantes à ce problème de sélectivité, il serait intéressant de compléter les tests d'élimination des phosphates et de l'arsenic (V) par l'utilisation de résines cationiques de structures variées tout en limitant au maximum les interactions avec l'arsenic (III). Ainsi une simple étape d'oxydation de l'arsenic (III) résiduel en arsenic (V), suivi d'un dosage devrait permettre de déterminer la quantité d'arsenic totale de l'échantillon. Le protocole final optimisé pourrait être le suivant. (Figure 108)



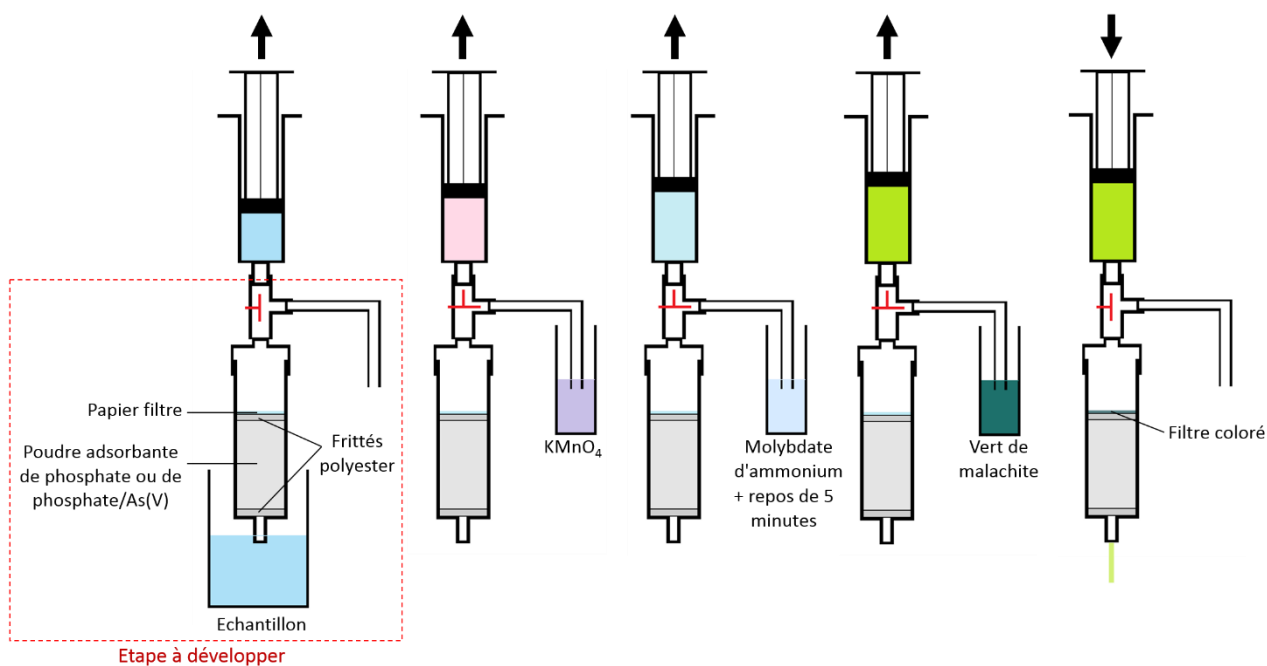


Figure 108. Protocole de dosage de l'arsenic total par le molybdate d'ammonium, le vert de malachite et une membrane filtrante

La première étape consistant à aspirer dans une seringue, un volume déterminé d'échantillon à travers une cartouche adsorbante de manière à éliminer l'arsenic (V) et/ou l'interfèrent phosphate sans modifier la concentration en arsenic (III) doit être optimisée pour envisager le développement industriel d'un tel kit. L'identification d'une résine capable de remplir cet objectif conduira au dépôt d'un second brevet.

Concernant les travaux présentés dans le second chapitre, utilisant de manière combinée un chromophore (nanoparticules d'or) et un agent complexant de l'arsenic, les perspectives immédiates pourraient à priori prendre deux directions :

Dans un premier temps, il serait pertinent de proposer la synthèse de nouveaux mimes de la PC3, analogues à la molécule présentée dans ce travail. Pour cela des variations des fonctions de liaison entre les motifs lipoïque et cystéine pourraient être étudiées dans le but de moduler la distance entre les différentes fonctions thiol mais également la mobilité de la chaîne carbonée. Le recourt à la modélisation moléculaire pourrait permettre d'optimiser les choix de structures en identifiant les complexes de l'arsenic (III) les plus stables.

Dans une deuxième approche, il serait également intéressant de combiner le chromophore et le complexant en une seule plateforme moléculaire. Ainsi, nous pensons que des molécules conjuguées colorées, formant une pince di ou tridentée capable de complexer l'arsenic pourrait conduire à une réponse colorimétrique dépendante de la concentration en arsenic(III) d'un échantillon. De telles molécules existent déjà, développée pour le dosage de certains



éléments. Nous pouvons citer par exemple le dosage colorimétrique de l'uranium par l'arsénazo III.²⁴⁸

La Figure 109 présente quelques structures hypothétiques pouvant répondre à ces objectifs. La chimie utilisée pour la préparation de ce type de molécules reposerait alors sur la synthèse diazoïque ou la synthèse d'imine par exemple.

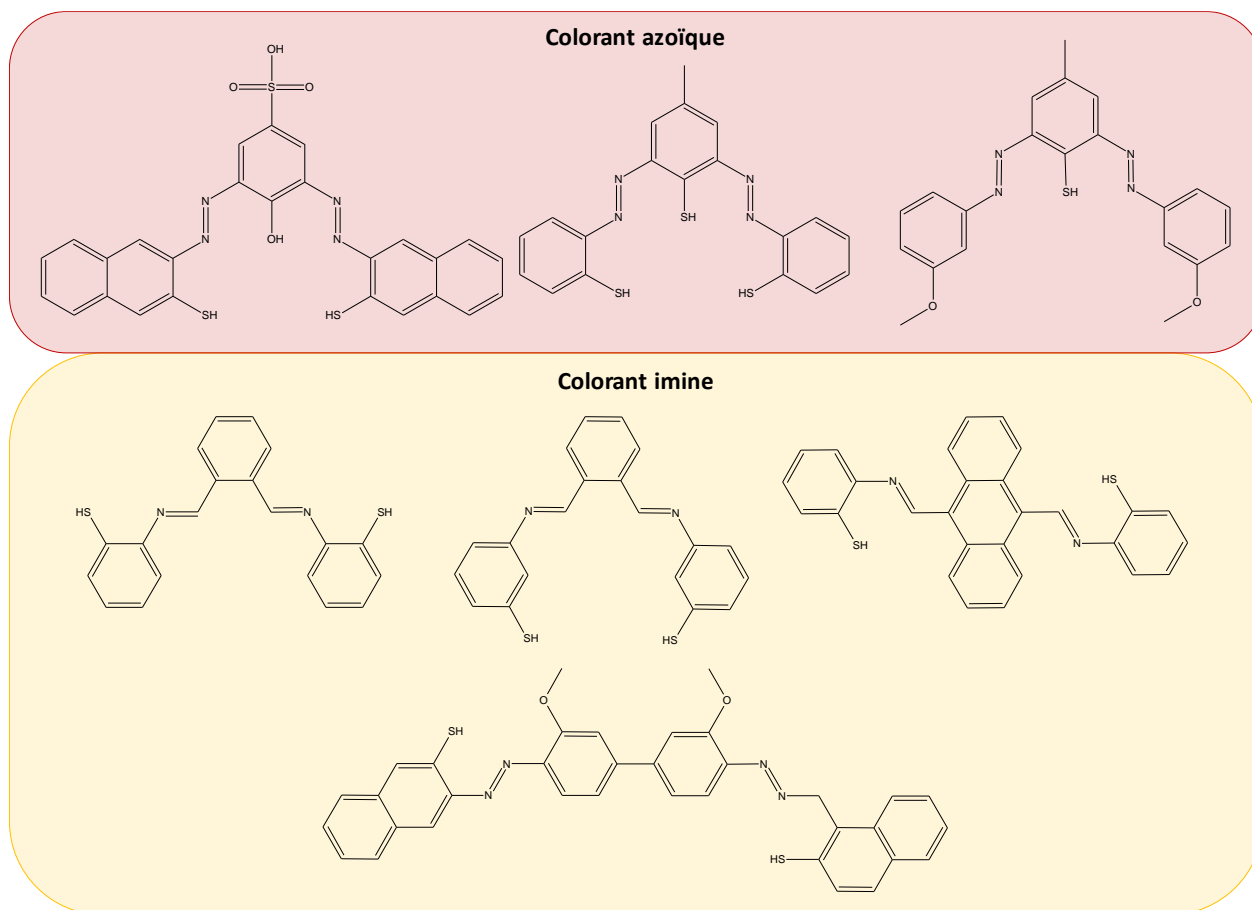


Figure 109. Structures chimiques des colorants destinés au dosage de l'arsenic (III)

Nous avons dans la dernière période réaliser quelques essais de synthèse préliminaires (données non présentées) dans le but d'évaluer le potentiel de cette approche méthodologique. Il ressort de ces essais que l'accès à de telles structures n'est pas trivial et impose la mise en œuvre de stratégie de synthèse multi-étapes basées sur l'utilisation entre autres choses de groupes protecteurs. Bien que complexes à obtenir, l'utilisation de ces chromophores, s'il est démontré qu'ils sont capables de complexer l'arsenic pour conduire à une réponse colorimétrique dépendante de la concentration en arsenic (III), permettrait une amélioration sensible du protocole transposable au format bandelette.

PARTIE EXPÉRIMENTALE





Chapitre III. Partie expérimentale

I. Réactifs et solvants

Les réactifs utilisés sont des produits certifiés de qualité pour analyse et utilisés sans purification ultérieure. Ils présentent des pourcentages massiques en arsenic les plus faibles possibles. Toutes les solutions sont préparées dans de l'eau ultrapure (système Milli-Q : résistivité 18,2 M Ω .cm). La verrerie et les piluliers utilisés pour la préparation des solutions, le stockage et l'analyse des échantillons sont lavés à l'eau régale puis rincés à l'eau MilliQ.

Réactifs et solvants	Fournisseurs	Abréviations	N° CAS
Acétate d'éthyle	Carlo Erba	EtOAc	141-78-6
Acide acétique glacial	VWR Chemicals	AcOH	64-19-7
Acide ascorbique	TCI	ac.Asc.	50-81-7
Acide chlorhydrique	Carlo Erba	HCl	7647-01-0
Acide R- α -lipoïque	TCI	-	1200-22-2
Acide nitrique 69%	Prolabo	HNO ₃	7697-37-2
Acide sulfurique 96%	Carlo Erba	H ₂ SO ₄	7664-93-9
Arsenic 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	-	-
Arséniate de sodium heptahydraté	Alfa Aesar	Na ₂ HAsO ₄ .7H ₂ O	10048-95-0
(méta)arsénite de sodium	Sigma Aldrich	NaAsO ₂	7784-46-5
Benzidine	Prolabo	-	92-87-5
Brij [®] 93	Sigma Aldrich	-	9004-98-2
n-Butanol	Carlo Erba	n-BuOH	71-36-3
Cadmium 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Cd ²⁺	-
Carbonate de calcium	Chem-Lab	CaCO ₃	471-34-1
Carbonate de lanthane	Alfa Aesar	La ₂ (CO ₃) ₃	54451-24-0
Carbonyldiimidazole	TCI	CDI	530-62-1
Cérium 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Ce ⁴⁺	-
Chloroforme	VWR Chemicals	CHCl ₃	67-66-3
Chloroforme deutéré	Euriso-top	CDCl ₃	865-49-6
Chlorure de calcium	Alfa Aesar	CaCl ₂	10043-52-4
Chlorure de sodium	Alfa Aesar	NaCl	7647-14-5
Chlorure d'or (III) trihydraté	Sigma Aldrich	HAuCl ₄ .3H ₂ O	16961-25-4
Citrate trisodique dihydraté	Sigma Aldrich	-	6132-04-3
Cuivre 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Cu ²⁺	-
Cyanure 1000 ppm (solution standard)	Fluka	CN ⁻	-
L-cystéine	Alfa Aesar	Cys	52-90-4
L-cystine dimethylester dichlorhydrate	Sigma Aldrich	-	32854-09-4
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide	Alfa Aesar	DCC	538-75-0
N,N-Diisopropyléthylamine	Alfa Aesar	DIPEA	7087-68-5

p-dimethylaminocinnamaldehyde	TCI	-	6203-18-5
Diméthylsulfoxyde	Fisher Scientific	DMSO	67-68-5
Ethanol absolu	VWR Chemicals	EtOH	64-17-5
Ether de pétrole	VWR Chemicals	Petet	64742-49-0
Ethyl violet	Alfa Aesar	EV	2390-59-2
Florisil®	Acros Organics	-	1343-88-0
Glycérol	Sigma Aldrich	-	56-81-5
1-Hydroxybenzotriazole hydraté	Acros Organics	HOBt	123333-53-9
Hydroxyde d'aluminium	Alfa Aesar	Al(OH) ₃	21645-51-2
Hydroxyde de lanthane	Alfa Aesar	La(OH) ₃	14507-19-8
N-Hydroxysuccinimide	Acros Organics	NHS	6066-82-6
Magnésium 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Mg ²⁺	-
Mercure 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Hg ²⁺	-
Méthanol	VWR Chemicals	MeOH	67-56-1
Molybdate d'ammonium tétrahydraté	Sigma Aldrich	MA	12054-85-2
Molybdate de sodium	Sigma Aldrich	-	7631-95-0
Ninhydrine	TCI	-	485-47-2
Nitrate 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	NO ₃ ⁻	-
Nitrate de cérium et d'ammonium	Alfa Aesar	CAN	16774-21-3
Oxyde de cérium	Acros Organics	CeO ₂	1306-38-3
(méta)periodate de sodium	Alfa Aesar	NaIO ₄	7790-28-5
Permanganate de potassium	Alfa Aesar	KMnO ₄	7722-64-7
Phosphate 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	PO ₄ ³⁻	-
Plomb 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Pb ²⁺	-
Poly(methyl vinyl ether-alt-maleic acid monoethyl ester) solution	Sigma Aldrich	-	25087-06-3
Potassium antimonyl tartrate trihydrate	Sigma Aldrich	PAT	28300-74-5
Résine Amberlite® IRA-67	Sigma Aldrich	-	65899-87-8
Résine Amberlite® IRA-400	Sigma Aldrich	-	60177-39-1
Résine Amberlite® IRA-900	Sigma Aldrich	-	9050-97-9
Silicate 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	SiO ₂	-
Solutions tampon	Alfa Aesar	-	-
Sulfate 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	SO ₄ ²⁻	-
Tétrahydrofurane	Acros Organics	THF	109-99-9
Tris(2-carboxyethyl)phosphine	Alfa Aesar	TCEP	51805-45-9
(para)Tungstate d'ammonium	Sigma Aldrich	-	11120-25-5
Tungstate de sodium	Sigma Aldrich	-	10213-10-2
Vert de malachite, Oxalate	Alfa Aesar	GM	2437-29-8
Xylane de hêtre	Sigma Aldrich	-	9014-63-5

Zinc 1000 ppm (solution standard)	GFS Chemicals	Zn ²⁺	-
-----------------------------------	---------------	------------------	---

Tableau 6. Réactifs et solvants utilisés

II. Chromatographie

A. Chromatographie analytique

L'évolution des réactions ainsi que la pureté des produits sont contrôlées par chromatographie sur couche mince (CCM), silice déposée sur plaque d'aluminium : gel de silice 60 F254 Merck de 0,2 mm d'épaisseur. La révélation des plaques CCM peut être effectuée par :

- lampe UV 6 W à 254 nm ou 365 nm
- vaporisation d'une solution de ninhydrine (0,25% dans le butanol) suivie d'un chauffage supérieur à 100°C pour révéler les composés aminés par une coloration violette
- vaporisation d'une solution de p-diméthylaminocinnamaldehyde (1% dans l'éthanol) + repos 5 minutes + vaporisation d'acide sulfurique (1% dans l'éthanol) pour révéler les composés aminés par une coloration rose
- vaporisation de periodate de sodium (NaIO₄ 0,1% dans H₂O MilliQ/acide acétique glacial 1:1) + repos 5 minutes + vaporisation benzidine (0,5% dans butanol/acide acétique glacial 4:1) pour révéler les composés soufrés par une tache blanche sur fond bleu

B. Chromatographie préparative

Les purifications sur plaques préparatives sont réalisées par étalement d'un gel de silice (80 g de gel de silice 60 PF254 dispersée dans 210 mL d'eau) en une couche de 2 mm d'épaisseur sur six plaques de verre (20 x 20 cm) alignées sur un banc. Après séchage à l'air libre pendant une nuit, les plaques sont finalement activées 2 heures à 100 °C avant usage.

Les purifications sur colonne sont réalisées avec des colonnes de silice de 12, 24, 40 ou 80 g de marque Redisep® Rf, Grace™ ou Chromabond® par un appareil de chromatographie flash CombiFlash® Rf de Teledyne Isco.



III. Analyses physico-chimiques

A. Spectrophotométrie UltraViolet-Visible

Les spectres UV-Visible ont été réalisés sur un spectrophotomètre Thermo Scientific Evolution 201 et ont été effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique. Les longueurs d'onde λ correspondantes sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire ϵ en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

B. Résonance magnétique nucléaire

Les analyses RMN ont été réalisées par le Docteur Yves Champavier, à la plate-forme du « Service Commun de Recherche et d'Analyse de Biomolécules de Limoges » (SCRABL) de l'institut « Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques » (GEIST) de l'Université de Limoges sur un appareil Bruker 500 MHz Avance III HD (passeur d'échantillons refroidi 24 positions, sonde de mesure BBFO) à une fréquence de 500,15 MHz pour le proton (1H) et 125,78 MHz pour le carbone (^{13}C). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm, le tétraméthylsilane est pris comme référence interne ($\delta = 0$ ppm), les constantes de couplages J sont exprimées en Hz. Les abréviations retenues sont : s (singulet), d (doublet), t (triplet), dt (double triplet), q (quadruplet), dq (double quadruplet), sext (sextuplet), m (multiplet).

C. Spectrométrie de masse haute résolution (HRMS)

Les spectres d'HRMS sont réalisés par le Docteur Cyril Colas, de la plate-forme « Spectrométrie de Masse Haute Résolution de la Fédération de Recherche Physique et Chimie du Vivant » de « l'Institut de Chimie Organique et Analytique » (ICOA) de l'Université d'Orléans (UMR 7311), sur un spectromètre de masse Bruker maXis UHR-Q-TOF.

D. Microscopie électronique à transmission

Les photographies ont été réalisées par l'ingénieur de recherche Pierre Carles du Service Commun CARMALIM (CARactérisation des MATériaux du LIMousin) sur un microscope électronique à transmission JEOL 100CX-II.

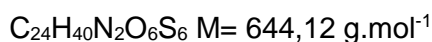
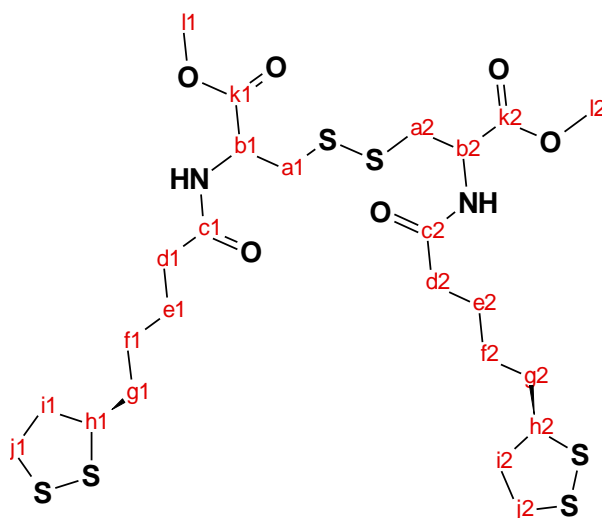


E. Mesures en diffusion dynamique de la lumière (DLS) – potentiel Zeta

Les analyses des diamètres hydrodynamiques en DLS et des potentiels Zeta ont été réalisées sur un appareil Zetasizer Nano ZS.

IV. Synthèses

A. Mime de PC₃



Dans un contenant en verre de 20 mL, sont ajoutés 1 g d'acide R- α -lipoïque (4,85 mmol ; 1 eq.) et 944 mg de carbonyldiimidazole (CDI ; 5,82 mmol ; 1,2 eq.). Les poudres sont vivement malaxées à l'aide d'une spatule pendant 5 minutes. Ensuite est ajouté directement dans le contenant 811 mg de cystine dimethyl ester dichlorhydrate (2,38 mmol ; 0,49 eq.). Le contenant est placé au bain-marie à 40°C et le mélange est régulièrement malaxé à la spatule pendant 5 h. Le mélange est ensuite repris dans 30 mL d'un mélange CHCl₃/MeOH 50:50, puis adsorbé sur Florisil®. Le produit est purifié sur une colonne de silice RediSep® Rf Normal de 40 g par un CombiFlash® Rf de Teledyne Isco. L'élution est réalisée à 20 mL/min par un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle 95:5 pendant 3 volumes de colonne, puis par du chloroforme pendant 3 volumes de colonnes, puis par une augmentation progressive du pourcentage d'éthanol jusqu'à un mélange chloroforme/éthanol 90:10. Le solvant est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif et le produit est obtenu sous l'aspect d'une gelée jaune est obtenu avec un rendement de 87% (m= 1,334 g). Le produit est conservé sous atmosphère inerte afin de le protéger de polymérisations éventuelles par l'intermédiaire des ponts disulfures.

R_f = 0,75 (chloroforme/méthanol 90:10)

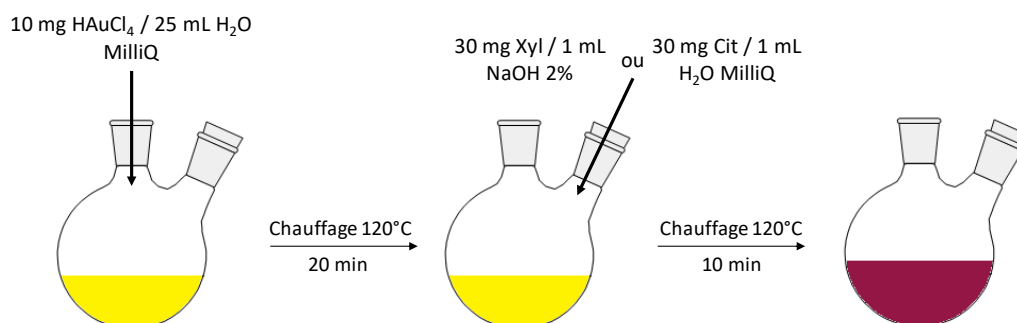


RMN ^1H (500,15 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ (ppm) : 6,43 (2H, d, $J = 7,5$ Hz, NH) ; 4,87 (2H, dt, $J = 5,5$ et $7,5$ Hz, H_b) ; 3,78 (6H, s, H_i) ; 3,58 (2H, dq, $J = 5$ et $7,5$ Hz, H_h) ; 3,21 (4H, t, $J = 5$ Hz, H_a) ; 3,13 (4H, t, $J = 7$ Hz, H_j) ; 2,46 (2H, sext, $J = 6,5$ Hz, H_i) ; 2,29 (4H, t, $J = 7,5$ Hz, H_d) ; 1,92 (2H, sext, $J = 7$ Hz, H_i) ; 1,69 (8H, m, $\text{H}_{e,g}$) ; 1,49 (4H, m, H_f)

RMN ^{13}C (125,78 MHz, CDCl_3 , 25°C) δ (ppm) : 172,66 (C_k) ; 170,92 (C_c) ; 56,42 (C_b) ; 52,83 (C_i) ; 51,61 (C_h) ; 40,70 (C_j) ; 40,26 (C_d) ; 38,51 (C_a) ; 36,13 (C_e) ; 34,65 (C_i) ; 28,84 (C_f) ; 25,17 (C_g)

Spectrométrie de masse haute résolution (ESI) : $m/z = 645,13$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

B. Nanoparticules d'or



Dans un bicol de 100 mL, 10 mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans 25 mL H_2O MilliQ. Le bicol est placé sous agitation à reflux dans un bain d'huile à 120°C pendant 20 minutes.

Dans un tube à hémolyse, 30 mg de citrate trisodique ou de xylane de hêtre sont solubilisés dans 1 mL H_2O MilliQ ou 1 mL NaOH 2% respectivement.

Le citrate ou le xylane est ajouté dans le bicol à 120°C sous forte agitation en 10 secondes par l'intermédiaire d'une aiguille au travers d'un bouchon à jupe. Le bicol est maintenu sous forte agitation à 120°C pendant 10 minutes, la solution initialement jaune, devient bleue/noire au moment de l'ajout puis rouge vin en une dizaine de minutes. Après retour à température ambiante, la solution de nanoparticules est centrifugée 10 minutes à 6000 rpm par une centrifugeuse Sigma 3-16P. Le surnageant est récupéré et centrifugé 10 minutes à 8000 rpm par une centrifugeuse Sigma 3-16P. Le surnageant est récupéré et centrifugé 10 minutes à 13000 rpm par une centrifugeuse Eppendorf 5415R. Le culot est repris dans 12,5 mL H_2O MilliQ afin d'obtenir une solution de nanoparticules d'or absorbant à environ 520 nm pour une valeur d'absorbance de 2.

Les solutions sont conservées en pilulier en verre de 20 mL à température ambiante. La stabilité est d'environ 4-5 jours pour les nanoparticules d'or stabilisées au citrate et elle est de plusieurs semaines pour celles stabilisées au xylane.

C. Elaboration de bandelettes

1. Bandelettes au molybdate d'ammonium et au tartrate d'antimoine et de potassium

Solution A :

- 1 g poly(methyl vinyl ether-*alt*-maleic acid monoethyl ester), 50wt.% solution in ethanol
- 550 μ L de Brij[®]93
- 15 mL d'éthanol absolu
- 3 mL d'acétone

Solution B :

- 250 mg de citrate trisodique
- 250 mg de glycérol
- 150 mg de molybdate d'ammonium
- 30 mg de PAT
- 15 mL H₂O MilliQ

La solution B est ajoutée au goutte à goutte à la solution A, la solution (incolore) se trouble, mais il n'y a pas de précipité. Des carrés de papier Whatman 41 (1x1 cm) sont imprégnés dans le bain puis posés sur du papier absorbant et séchés 60 minutes à l'étuve 85°C. Ces papiers imprégnés sont ensuite collés sur du PVC transparent découpé en bandelettes de 7x1 cm par du ruban adhésif double face.

2. Bandelettes au molybdate d'ammonium et au vert de malachite/ethyl violet

Solution A :

- 1 g poly(methyl vinyl ether-*alt*-maleic acid monoethyl ester), 50wt.% solution in ethanol
- 550 μ L Brij[®]93
- 15 mL d'éthanol absolu
- 3 mL d'acétone

Solution B :

- 250 mg de citrate trisodique
- 250 mg de glycérol
- 500 mg de molybdate d'ammonium
- 5 mL de solution éthyl violet/vert de malachite 2 mM dans H₂O MilliQ
- 10 mL H₂O MilliQ

La solution B est très lentement ajoutée au goutte à goutte à la solution A et sous forte agitation, afin d'éviter la précipitation de sels. Des carrés de papier Whatman 41 (1x1 cm) sont imprégnés dans le bain puis posés sur du papier absorbant et séchés 60 minutes à l'étuve



85°C. Ces papiers imprégnés sont ensuite collés sur du PVC transparent découpé en bandelettes de 7x1 cm par du ruban adhésif double face.

V. Dosages

A. Méthode au bleu de molybdène

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 494 mg de molybdate d'ammonium + 20 mL H₂SO₄ 0,1 M
- Tartrate d'antimoine et de potassium 750 µM : 10 mg de PAT + 20 mL H₂SO₄ 0,1 M
- Acide ascorbique 80 mM : 282 mg d'acide ascorbique + 20 mL H₂SO₄ 0,1 M
- Solutions d'anions ou de cations 10 ppm : 100 µL d'une solution standard 1000 ppm + 9900 µL H₂SO₄ 0,1 M

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 7)

	Blanc	500 ppb	1 ppm	1,5 ppm	2 ppm	2,5 ppm
H ₂ SO ₄ 0,1 M	1320 µL	1220 µL	1120 µL	1020 µL	920 µL	820 µL
Solution 10 ppm	-	100 µL	200 µL	300 µL	400 µL	500 µL
MA 20 mM	340 µL	340 µL	340 µL	340 µL	340 µL	340 µL
PAT 750 µM	55 µL	55 µL	55 µL	55 µL	55 µL	55 µL
ac.Asc. 80 mM	285 µL	285 µL	285 µL	285 µL	285 µL	285 µL

Tableau 7. Protocole du dosage de l'arsenic et de l'étude d'interférences par la méthode au bleu de molybdène en milieu acide sulfurique 0,1 M entre 0 et 2,5 ppm

B. Méthode utilisant le molybdate d'ammonium et un colorant

1. Etude spectrophotométrique du comportement entre le vert de malachite et l'arsenic (V) en milieu acide

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Vert de malachite 2 mM : 37 mg de vert de malachite oxalate + 20 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (V) 100 ppm : 41,7 mg Na₂HAsO₄.7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 8)

	Blanc	50 ppb	100 ppb	500 ppb
H ₂ O MilliQ	1800 µL	1700 µL	1600 µL	1700 µL
As(V) 1 ppm	-	100 µL	200 µL	-
As(V) 10 ppm	-	-	-	100 µL
HCl 6 M	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
GM 2 mM	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Tableau 8. Protocole pour l'étude spectrophotométrique du comportement entre le vert de malachite seul et l'arsenic (V) en milieu acide sans avoir former de complexes arsénomolybdiques

2. Dosage de l'arsenic (V) par le molybdate d'ammonium et l'éthyl violet à pH neutre, à pH 2 et à pH 1

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 123 mg de molybdate d'ammonium + 5 mL H₂O MilliQ, H₂SO₄ 0,01 M ou H₂SO₄ 0,1 M
- Ethyl violet 2 mM : 20 mg d'éthyl violet + 20 mL H₂O MilliQ, H₂SO₄ 0,01 M ou H₂SO₄ 0,1 M
- Arsenic (V) 100 ppm : 41,7 mg Na₂HAsO₄.7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ, H₂SO₄ 0,01 M ou H₂SO₄ 0,1 M

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 9)

	Blanc	10 ppb	30 ppb	50 ppb	100 ppb	500 ppb	1 ppm
H ₂ O MilliQ ou H ₂ SO ₄ 0,01 M ou H ₂ SO ₄ 0,1 M	1925 µL	1905 µL	1865 µL	1825 µL	1725 µL	1825 µL	1725 µL
As(V) 1 ppm	-	20 µL	60 µL	100 µL	200 µL	-	-
As(V) 10 ppm	-	-	-	-	-	100 µL	200 µL
MA 20 mM	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
EV 2 mM	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Tableau 9. Protocoles pour le dosage de l'arsenic (V) par le molybdate d'ammonium et l'éthyl violet à pH neutre, à pH 2 et à pH 1

3. Dosage de l'arsenic (V) par le protocole de la littérature

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 123 mg de molybdate d'ammonium + 5 mL H₂O MilliQ
- Ethyl violet 2 mM : 20 mg d'éthyl violet + 20 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (V) 100 ppm : 41,7 mg Na₂HAsO₄.7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 10)

	Blanc	10 ppb	50 ppb	100 ppb	500 ppb	1 ppm
H ₂ O MilliQ	1300 µL	1280 µL	1200 µL	1100 µL	1200 µL	1100 µL
As(V) 1 ppm	-	20 µL	100 µL	200 µL	-	-
As(V) 10 ppm	-	-	-	-	100 µL	200 µL
MA 20 mM	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
HCl 6 M	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
EV 2 mM	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Tableau 10. Protocole de Morita pour le dosage de l'arsenic (V)

4. Optimisation du dosage de l'arsenic (V) par l'utilisation de sels de tartrate d'antimoine et de potassium (PAT)

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 123 mg de molybdate d'ammonium + 5 mL H₂O MilliQ

- Tartrate d'antimoine et de potassium 800 μM : 11 mg de PAT + 20 mL H₂O milliQ
- Ethyl violet 2 mM : 20 mg d'éthyl violet + 20 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (V) 100 ppm : 42 mg Na₂HAsO₄.7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 11)

	Blanc	10 ppb	50 ppb	100 ppb	500 ppb	1 ppm
H ₂ O MilliQ	1100 μL	1180 μL	1000 μL	900 μL	1000 μL	900 μL
As(V) 1 ppm	-	20 μL	100 μL	200 μL	-	-
As(V) 10 ppm	-	-	-	-	100 μL	200 μL
MA 20 mM	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
PAT 800 μM	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
HCl 6 M	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL
EV 2 mM	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

Tableau 11. Protocole du dosage de l'arsenic (V) par la méthode au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet avec utilisation de sels d'antimoine et de potassium

5. Optimisation du dosage de l'arsenic (V) par une réaction préliminaire entre l'arsenic et le molybdate

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 246 mg de molybdate d'ammonium + 10 mL H₂O MilliQ
- Ethyl violet 2 mM : 20 mg d'éthyl violet + 20 mL H₂O MilliQ
- Vert de malachite 2 mM : 37 mg de vert de malachite oxalate + 20 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (V) 100 ppm : 41,7 mg Na₂HAsO₄.7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 12)

	Blanc	10 ppb	50 ppb	100 ppb	500 ppb
H ₂ O MilliQ	1100 μL	1180 μL	1000 μL	900 μL	1000 μL
As(V) 1 ppm	-	20 μL	100 μL	200 μL	-
As(V) 10 ppm	-	-	-	-	100 μL
MA 20 mM	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
PAT 800 μM	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
HCl 6 M	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL	150 μL
	Repos de 5 minutes				
EV ou GM 2 mM	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL	50 μL

Tableau 12. Protocole d'optimisation du dosage de l'arsenic (V) par réaction préliminaire entre l'arsenic et le molybdate d'ammonium avant l'ajout du colorant

6. Développement d'une nouvelle méthode visuelle de dosage de l'arsenic par une membrane filtrante

L'élaboration de la cartouche filtrante consiste à utiliser un filtre papier et une cartouche vide servant de précolonne en chromatographie flash.

Des disques de 12 mm de diamètre de papier Whatman Grade 41 ou Grade 2 sont découpés manuellement. Ils sont ensuite insérés entre deux frittés en polyéthylène afin qu'il conserve sa forme. Le disque de papier et les deux frittés sont ensuite insérés au 2/3 de la hauteur dans une cartouche en polypropylène Chromabond® de 12 mm de diamètre et 65 mm de hauteur. Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 494 mg de molybdate d'ammonium + 20 mL H₂O MilliQ
- Vert de malachite 2 mM : 37 mg de vert de malachite oxalate + 20 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (V) 100 ppm : 41,7 mg Na₂HAsO₄·7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées en pilulier en verre et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. Les échantillons sont ensuite aspirés dans une seringue en polypropylène Norm-Ject de 12 mL. La seringue est branchée à la cartouche filtrante et l'échantillon est passé au travers à une vitesse de 1 mL/s. (Tableau 13)

	Blanc	10 ppb	50 ppb	100 ppb
H₂O MilliQ	6250 µL	6240 µL	6200 µL	6150 µL
As(V) 10 ppm	-	10 µL	50 µL	100 µL
MA 20 mM	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL
HCl 6 M	1000 µL	1000µL	1000 µL	1000µL
Repos de 5 minutes				
GM 2 mM	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
	Filtration	Filtration	Filtration	Filtration

Tableau 13. Protocole de dosage de l'arsenic (V) par filtration de la coloration obtenue lors de la méthode optimisée en solution

La cartouche est par la suite ouverte, le disque de filtre papier est récupéré à l'aide d'une spatule et déposé sur de la céramique blanche (préalablement lavée à l'acide).

C. Bandelettes

1. Bandelettes au molybdate d'ammonium et au tartrate d'antimoine et de potassium

Les échantillons contenant une quantité variable d'arsenic (V) sont préparés à partir d'une solution mère de 100 ppm afin d'obtenir un volume final de 4,7 mL. Le volume de l'échantillon est complété jusqu'à 5 mL avec l'ajout de 300 µL d'acide chlorhydrique 6 M.

Les bandelettes au molybdate d'ammonium et au tartrate d'antimoine et de potassium sont immergées dans les échantillons pendant 120 secondes puis sont égouttées rapidement sur du papier absorbant afin d'éliminer le liquide résiduel.

Ensuite, 50 µL d'acide ascorbique à 80 mM sont déposés sur les carrés de papier par l'intermédiaire d'une micropipette Transferpette® S Brand.



2. Bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet/vert de malachite

Les échantillons contenant une quantité variable d'arsenic (V) ou de phosphate sont préparés à partir d'une solution mère de 100 ppm en arsenic (V) ou d'une solution standard de 1000 ppm en phosphate afin d'obtenir un volume final de 4,7 mL. Le volume de l'échantillon est complété jusqu'à 5 mL avec l'ajout de 300 µL d'acide chlorhydrique 6 M.

Les bandelettes au molybdate d'ammonium et à l'éthyl violet/vert de malachite sont immergées dans les échantillons pendant 60 secondes puis sont égouttées rapidement sur du papier absorbant afin d'éliminer le liquide résiduel.

Les échantillons de l'étude d'interférences sont préparés de la même façon à partir d'une solution standard de 1000 ppm afin d'obtenir une concentration de 5 ppm. A l'exception de l'échantillon d'arsenic (III) qui est préparé à partir d'une solution mère de 100 ppm (17,3 mg NaAsO₂ + 100 mL H₂O MilliQ).

D. Elimination des interférences

1. Carbonate de calcium

Les cartouches de carbonate de calcium sont réalisées dans des cartouches vides en polypropylène Chromabond® de 12 mm de diamètre et 65 mm de hauteur. Une quantité de 500 mg de CaCO₃ est ajoutée dans les cartouches, puis est tassée et comprimée entre deux frittés en polyéthylène sur une hauteur d'environ 1 cm. Les cartouches sont ensuite branchées à un filtre seringue en acétate de cellulose 0,45 µM.

Les solutions mères sont préparées extemporanément :

- Molybdate d'ammonium 20 mM : 618 mg de molybdate d'ammonium + 25 mL H₂O MilliQ
- Vert de malachite 2 mM : 37 mg de vert de malachite oxalate + 20 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (V) 100 ppm : 41,7 mg Na₂HAsO₄.7H₂O + 100 mL H₂O MilliQ
- Arsenic (III) 100 ppm : 17,3 mg NaAsO₂ + 100 mL H₂O MilliQ
- Chlorure de calcium 0,1 M : 111 mg CaCl₂ + 10 mL H₂O MilliQ
- Permanganate de potassium 0,3% : 15 mg KMnO₄ + 5 mL H₂O MilliQ

Les échantillons sont préparés dans des piluliers en verres, ils sont ensuite aspirés dans une seringue en polypropylène Norm-Ject de 12 mL puis passés au travers d'une cartouche de carbonate de calcium à 10 mL/min. Les échantillons sont récupérés dans de nouveaux piluliers en verre avant d'être dosés en solution par la méthode optimisée. Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations d'échantillons dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 14)



	Blanc	Blanc Cartouche	As(V) 100 ppb	As(V) Cartouche 100 ppb	As(III) 100 ppb	As(III) Cartouche 100 ppb	P 100 ppb	P Cartouche 100 ppb
H ₂ O MilliQ	6100 µL	6100 µL	6000 µL	6000 µL	6000 µL	6000 µL	6000 µL	6000 µL
As(V) 10 ppm	-	-	100 µL	100 µL	-	-	-	-
As(III) 10 ppm	-	-	-	-	100 µL	100 µL	-	-
P 10 ppm	-	-	-	-	-	-	100 µL	100 µL
CaCl ₂ 0,1 M	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
	-	Cartouche	-	Cartouche	-	Cartouche	-	Cartouche
HCl 6 M	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
KMnO ₄ 0,3%	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
MA 20 mM	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL
	Repos de 5 minutes							
GM 2 mM	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL

Tableau 14. Protocole de l'élimination de l'interférence phosphate par une cartouche au carbonate de calcium lors du dosage en solution par la méthode optimisée

2. Résines

Chaque type de résine est conditionnée de la même façon : 50 g de résine sont placés dans un erlenmeyer dans 100 mL d'acide nitrique 1 M et sont agités doucement pendant 10 minutes. L'acide est éliminé en filtrant la résine sur filtre papier. Elle est ensuite reprise dans 100 mL de soude 1 M et mise sous agitation lente pendant 10 minutes. La soude est ensuite éliminée en filtrant les billes de résine sur un filtre papier. La résine est ensuite reprise dans 100 mL de chlorure de sodium et mise sous agitation lente pendant 10 minutes. Le chlorure de sodium est éliminé en filtrant la résine sur filtre papier. La résine est reprise dans 100 mL d'eau MilliQ et mise sous agitation douce pendant 30 minutes. La résine est ensuite filtrée sur filtre papier et rincée avec 500 mL d'eau MilliQ.

La résine est conservée en pilulier en plastique (polypropylène) avec de l'eau MilliQ.

Les cartouches de résine sont réalisées dans des cartouches vides en polypropylène Chromabond® de 12 mm de diamètre et 65 mm de hauteur. Une quantité de 1 g de résine est ajoutée dans les cartouches, puis est tassée entre deux frittés en polyéthylène sur une hauteur d'environ 1,5 cm.

Le protocole d'élimination du phosphate appliqué est le même que celui présenté précédemment. (Tableau 14)

3. Hydroxyde de lanthane

Les cartouches d'hydroxyde de lanthane sont réalisées dans des cartouches vides en polypropylène Chromabond® de 12 mm de diamètre et 65 mm de hauteur. Une quantité de 500 mg d'hydroxyde de lanthane est ajoutée dans les cartouches, puis est tassée entre deux frittés en polyéthylène sur une hauteur d'environ 1,5 cm.

Le protocole d'élimination du phosphate appliqué est le même que celui présenté dans la partie carbonate de calcium. (Tableau 14)

E. Méthode utilisant les nanoparticules d'or

1. Dosage de l'arsenic (III) par la L-cystéine

La solution mère de L-cystéine 4 mM est préparée dans l'eau MilliQ (9,7 mg + 20 mL H₂O MilliQ). La solution de L-cystéine doit être utilisée dans la journée. Effectivement, en conditions oxydantes de l'atmosphère et à température ambiante, la L-cystéine forme des ponts disulfures pour donner de la L-cystine, ce qui fait drastiquement chuter sa réactivité.

Les tests sont réalisés en cuves en quartz, permettant ainsi de photographier la coloration et d'effectuer une analyse en spectrophotométrie UV-Visible à l'instant *t*.

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations en arsenic (III) dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 15)

	Blanc	1 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm
H ₂ O MilliQ	1342,5 µL	1327,5 µL	1312,5 µL	1267,5 µL	1192,5 µL	1042,5 µL
Cys 4 mM	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL
As(III) 100 ppm	-	15 µL	30 µL	75 µL	150 µL	300 µL
Tampon pH 3	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
AuNPs	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Tableau 15. Protocole de dosage de l'arsenic (III) par utilisation de 100 µM de L-cystéine et de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane

2. Dosage de l'arsenic (III) par le mime de PC₃

Comme le mime de PC₃ n'est pas soluble dans l'eau, il faut d'abord faire une solution dans le DMSO avant de la diluer dans l'eau. Ainsi, 64,4 mg de mime de PC₃ sont solubilisés dans 5 mL de DMSO (20 mM). Ensuite, afin d'avoir une solution mère de 2 mM, 1 mL de cette solution à 20 mM sont dilués dans 9 mL d'eau MilliQ contenant 3,6 équivalents molaire de TCEP (18,6 mg/9 mL). La solution est une laitance blanche et elle est mise sous agitation. Après quelques heures d'agitation, la solution devient limpide. Elle est utilisée pour les tests de dosage après 24 heures d'agitation.

Les tests sont réalisés en cuves en quartz, permettant ainsi de photographier la coloration et d'effectuer une analyse en spectrophotométrie UV-Visible à l'instant *t*.

Le tableau suivant présente en horizontal les différentes concentrations en arsenic (III) dosées et en vertical l'ordre d'ajout des réactifs. (Tableau 16, Tableau 17)

	Blanc	1 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm
H₂O MilliQ	1367,5 µL	1352,5 µL	1337,5 µL	1292,5 µL	1217,5 µL	1067,5 µL
Mime 2 mM	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL	12,5 µL
As(III) 100 ppm	-	15 µL	30 µL	75 µL	150 µL	300 µL
Tampon pH 3	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
AuNPs	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Tableau 16. Protocole de dosage de l'arsenic (III) par utilisation de 16,67 µM de mime de PC₃ et de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane

	Blanc	1 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	20 ppm
H₂O MilliQ	1357,5 µL	1342,5 µL	1327,5 µL	1282,5 µL	1207,5 µL	1057,5 µL
Mime 2 mM	22,5 µL	22,5 µL	22,5 µL	22,5 µL	22,5 µL	22,5 µL
As(III) 100 ppm	-	15 µL	30 µL	75 µL	150 µL	300 µL
Tampon pH 3	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
AuNPs	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Tableau 17. Protocole de dosage de l'arsenic (III) par utilisation de 30 µM de mime de PC₃ et de nanoparticules d'or stabilisées au citrate ou au xylane



Références bibliographiques

- (1) Oettel, H. Toxicity of Arsenic Compounds. Von W. D. Buchanan. Elsevier Monographs on Toxic Agents. Herausgeg. von Ethel Browning. Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York 1962. 1. Aufl., VIII, 155 S., 6 Abb., 4 Tab., hfl. 12.50. *Angew. Chem.* **1964**, 76 (3), 155–155.
- (2) *Innovation in Chinese Medicine*, 1. paperback ed.; Hsu, E., Ed.; Needham Research Institute studies; Cambridge University Press: Cambridge, 2010.
- (3) Calmet, A.; Christmas, H.; Warren, B. R.; Calmet, A. *Treatise on the Apparitions of Spirits and on Vampires or Revenants of Hungary, Moravia, et Al. The Complete Volumes I & II The Complete Volumes I & II*; 2015.
- (4) Murgoci, A. The Vampire in Roumania. *Folklore* **1926**, 37 (4), 320–349.
- (5) Eldridge, A. A. A Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry. By J. W. Mellor, D.Sc., F.R.S. Vol. IX. As, Sb, Bi, V, Cb, Ta. Pp. Xiv + 967. London: Longmans, Green & Co., 1929. 63s. *J. Soc. Chem. Ind.* **1929**, 48 (14), 348–349.
- (6) Kew, J.; Morris, C.; Aihie, A.; Fysh, R.; Jones, S.; Brooks, D. Arsenic and Mercury Intoxication due to Indian Ethnic Remedies. *BMJ* **1993**, 306 (6876), 506–507.
- (7) Lewin, L. *Phantastica: une encyclopédie des drogues*; Camion blanc: Rosières-en-Haye, 2013.
- (8) Haller, J. S. Therapeutic Mule: The Use of Arsenic in the Nineteenth Century Materia Medica. *Pharm. Hist.* **1975**, 17 (3), 87–100.
- (9) Sass, U.; Grosshans, E.; Simonart, J. M. Chronic Arsenicism: Criminal Poisoning or Drug-Intoxication? *Dermatology* **1993**, 186 (4), 303–305.
- (10) Leake, C. D. Behind the Sulfa Drugs. Iago Galdston. *Isis* **1943**, 34 (6), 531–531.
- (11) Lloyd, N. C.; Morgan, H. W.; Nicholson, B. K.; Ronimus, R. S. The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44 (6), 941–944.
- (12) Swann, J. P. Paul Ehrlich and the Introduction of Salvarsan. *Med. Herit.* **1985**, 1 (2), 137–138.
- (13) Krauskopf, K. B.; Bird, D. K. *Introduction to Geochemistry*, 3rd ed.; McGraw-Hill: New York, 1995.
- (14) Magos, L. Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment. T. C. Hutchinson and K. M. Meema (Editors). Scope 31. John Wiley & Sons, Chichester, 1987; 360 Pp, £48.00. *J. Appl. Toxicol.* **1988**, 8 (2), 150–151.
- (15) Mestrot, A.; Planer-Friedrich, B.; Feldmann, J. Biovolatilisation: A Poorly Studied Pathway of the Arsenic Biogeochemical Cycle. *Environ. Sci. Process. Impacts* **2013**, 15 (9), 1639.
- (16) Pacyna, J. M.; Lindgren, E. S. Atmospheric Transport and Deposition of Toxic Compounds. In *The Global Environment*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 1997; pp 386–407.
- (17) Chester, R. *Marine Geochemistry*; John Wiley & Sons: Chichester, 2009.
- (18) Matschullat, J. Arsenic in the Geosphere — a Review. *Sci. Total Environ.* **2000**, 249 (1–3), 297–312.
- (19) Francesconi, K. A.; Kuehnelt, D. Determination of Arsenic Species: A Critical Review of Methods and Applications, 2000–2003. *The Analyst* **2004**, 129 (5), 373–395.

- (20) Martell, A. E. *Critical Stability Constants: First Supplement.*; Springer, 2014.
- (21) Smedley, P. .; Kinniburgh, D. . A Review of the Source, Behaviour and Distribution of Arsenic in Natural Waters. *Appl. Geochem.* **2002**, 17 (5), 517–568.
- (22) Domenico, P. A.; Schwartz, F. W. *Physical and Chemical Hydrogeology*, 2nd ed.; Wiley: New York, 1998.
- (23) Cullen, W. R.; Reimer, K. J. Arsenic Speciation in the Environment. *Chem. Rev.* **1989**, 89 (4), 713–764.
- (24) Challenger, F. Biological Methylation. *Chem. Rev.* **1945**, 36 (3), 315–361.
- (25) Duce, R. A. The Atmospheric Input of Trace Species to the World Ocean. *Glob. Biogeochem. Cycles* **1991**, 5 (3), 193–259.
- (26) Lantzy, R. J.; Mackenzie, F. T. Atmospheric Trace Metals: Global Cycles and Assessment of Man's Impact. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1979**, 43 (4), 511–525.
- (27) Lundholm, K.; Rogers, J. M.; Haynes, B. S.; Boström, D.; Nordin, A. Fate of Cu, Cr, and As during the Combustion Stages of CCA-Treated Wood Fuel Particles. *Energy Fuels* **2008**, 22 (3), 1589–1597.
- (28) Reimann, C.; Caritat, P. de; Reimann-Caritat. *Chemical Elements in the Environment: Factsheets for the Geochemist and Environmental Scientist*, Softcover reprint of the original 1st ed. 1998.; Springer: Berlin, 2011.
- (29) Anderson, L. C. D.; Bruland, K. W. Biogeochemistry of Arsenic in Natural Waters: The Importance of Methylated Species. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, 25 (3), 420–427.
- (30) Mandal, B. Speciation of Arsenic in Biological Samples. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, 198 (3), 307–318.
- (31) Bright, D.; Dodd, M.; Reimer, K. Arsenic in subArctic Lakes Influenced by Gold Mine Effluent: The Occurrence of Organoarsenicals and “hidden” Arsenic. *Sci. Total Environ.* **1996**, 180 (2), 165–182.
- (32) Gong, Z.; Lu, X.; Watt, C.; Wen, B.; He, B.; Mumford, J.; Ning, Z.; Xia, Y.; Le, X. C. Speciation Analysis of Arsenic in Groundwater from Inner Mongolia with an Emphasis on Acid-Leachable Particulate Arsenic. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 555 (1), 181–187.
- (33) Kim, M.-J.; Nriagu, J.; Haack, S. Arsenic Behavior in Newly Drilled Wells. *Chemosphere* **2003**, 52 (3), 623–633.
- (34) Neff, J. M. Ecotoxicology of Arsenic in the Marine Environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, 16 (5), 917–927.
- (35) Nakazato, T.; Taniguchi, T.; Tao, H.; Tominaga, M.; Miyazaki, A. Ion-Exclusion Chromatography Combined with ICP-MS and Hydride Generation-ICP-MS for the Determination of Arsenic Species in Biological Matrices. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15 (12), 1546–1552.
- (36) Daus, B. Kinetics of the Arsenite Oxidation in Seepage Water from a Tin Mill Tailings Pond. *Talanta* **2000**, 51 (6), 1087–1095.
- (37) Irgolic, K. J.; Stockton, R. A. Element-Specific Detectors for Liquid Chromatography: The Determination of Arsenic Compounds. *Mar. Chem.* **1987**, 22 (2–4), 265–278.
- (38) de Bettencourt, A. M.; Duarte, M. F.; Facchetti, S.; Florêncio, M. H.; Gomes, M. L.; van't Klooster, H. A.; Montanarella, L.; Ritsema, R.; Vilas-Boas, L. F. Evidence of the Presence of Dimethylated, Trimethylated and "Refractory" Arsenic Compounds in Estuarine Salt-Marsh Halophytes. *Appl. Organomet. Chem.* **1997**, 11 (5), 439–450.

- (39) Rahim, M.; Mas Haris, M. R. H. Application of Biopolymer Composites in Arsenic Removal from Aqueous Medium: A Review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2015**, *8* (2), 255–263.
- (40) Von Damm, K. .; Edmond, J. .; Grant, B.; Measures, C. .; Walden, B.; Weiss, R. . Chemistry of Submarine Hydrothermal Solutions at 21 °N, East Pacific Rise. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1985**, *49* (11), 2197–2220.
- (41) Basu, A.; Saha, D.; Saha, R.; Ghosh, T.; Saha, B. A Review on Sources, Toxicity and Remediation Technologies for Removing Arsenic from Drinking Water. *Res. Chem. Intermed.* **2014**, *40* (2), 447–485.
- (42) *Trace Elements in Natural Waters*; Salbu, B., Chemical Rubber Company, Eds.; CRC Press: Boca Raton, Fla., 1995.
- (43) Mandal, B. Arsenic Round the World: A Review. *Talanta* **2002**, *58* (1), 201–235.
- (44) Wang, S.; Mulligan, C. N. Occurrence of Arsenic Contamination in Canada: Sources, Behavior and Distribution. *Sci. Total Environ.* **2006**, *366* (2–3), 701–721.
- (45) Lahermo, P. *Suomen Geokemian Atlas = Till 2 2*; Geologian Tutkimuskeskus: Espoo, 1992.
- (46) Martin, M. H. The Heavy Elements—Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. *Environ. Pollut.* **1991**, *69* (4), 354–356.
- (47) Nesbitt, H. W.; Muir, I. J.; Prarr, A. R. Oxidation of Arsenopyrite by Air and Air-Saturated, Distilled Water, and Implications for Mechanism of Oxidation. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, *59* (9), 1773–1786.
- (48) Goldschmidt, V. M. The Principles of Distribution of Chemical Elements in Minerals and Rocks. The Seventh Hugo Müller Lecture, Delivered before the Chemical Society on March 17th, 1937. *J Chem Soc* **1937**, *0* (0), 655–673.
- (49) Ahmann, D.; Krumholz, L. R.; Hemond, H. F.; Lovley, D. R.; Morel, F. M. M. Microbial Mobilization of Arsenic from Sediments of the Aberjona Watershed. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31* (10), 2923–2930.
- (50) Lombi, E.; Sletten, R. S.; Wenzel, W. W. Sequentially Extracted Arsenic from Different Size Fractions of Contaminated Soils. *Water. Air. Soil Pollut.* **2000**, *124* (3–4), 319–332.
- (51) Däßler, H.-G. *Influence of air pollutants on vegetation: causes, effects and countermeasures.*, 4., überarb. Aufl.; Umweltforschung; Fischer: Jena, 1991.
- (52) Pearce, T. Yellow Earthworms: Distinctive Pigmentation Associated with Arsenic- and Copper-Tolerance in *Lumbricus Rubellus*. *Soil Biol. Biochem.* **2002**, *34* (12), 1833–1838.
- (53) Morgan, A. Speed-Mapping of Arsenic Distribution in the Tissues of Earthworms Inhabiting Arsenious Soil. *Cell Biol. Int.* **1994**, *18* (9), 911–914.
- (54) Gibbs, P. E.; Langston, W. J.; Burt, G. R.; Pascoe, P. L. Tharyx Marioni (Polychaeta): A Remarkable Accumulator of Arsenic. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **1983**, *63* (2), 313.
- (55) Waring, J.; Maher, W. Arsenic Bioaccumulation and Species in Marine Polychaeta. *Appl. Organomet. Chem.* **2005**, *19* (8), 917–929.
- (56) Murray, L. A.; Raab, A.; Marr, I. L.; Feldmann, J. Biotransformation of Arsenate to Arsenosugars by *Chlorella Vulgaris*. *Appl. Organomet. Chem.* **2003**, *17* (9), 669–674.
- (57) Ma, L. Q.; Komar, K. M.; Tu, C.; Zhang, W.; Cai, Y.; Kennelley, E. D. A Fern That Hyperaccumulates Arsenic. *Nature* **2001**, *409* (6820), 579–579.

- (58) Rathinasabapathi, B.; Rangasamy, M.; Froeba, J.; Cherry, R. H.; McAuslane, H. J.; Capinera, J. L.; Srivastava, M.; Ma, L. Q. Arsenic Hyperaccumulation in the Chinese Brake Fern (*Pteris Vittata*) Deters Grasshopper (*Schistocerca Americana*) Herbivory. *New Phytol.* **2007**, *175* (2), 363–369.
- (59) Lombi, E.; Zhao, F.-J.; Fuhrmann, M.; Ma, L. Q.; McGrath, S. P. Arsenic Distribution and Speciation in the Fronds of the Hyperaccumulator *Pteris Vittata*. *New Phytol.* **2002**, *156* (2), 195–203.
- (60) Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H. Phytochelatins, a Class of Heavy-Metal-Binding Peptides from Plants, Are Functionally Analogous to Metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84* (2), 439–443.
- (61) Grill, E.; Löffler, S.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H. Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, Are Synthesized from Glutathione by a Specific Gamma-Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86* (18), 6838–6842.
- (62) Zhang, W.; Cai, Y. Purification and Characterization of Thiols in an Arsenic Hyperaccumulator under Arsenic Exposure. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (24), 7030–7035.
- (63) Zhao, F. J.; Wang, J. R.; Barker, J. H. A.; Schat, H.; Bleeker, P. M.; McGrath, S. P. The Role of Phytochelatins in Arsenic Tolerance in the Hyperaccumulator *Pteris Vittata*. *New Phytol.* **2003**, *159* (2), 403–410.
- (64) Zhang, W.; Cai, Y.; Downum, K. R.; Ma, L. Q. Arsenic Complexes in the Arsenic Hyperaccumulator *Pteris Vittata* (Chinese Brake Fern). *J. Chromatogr. A* **2004**, *1043* (2), 249–254.
- (65) Stephens, W. E.; Calder, A.; Newton, J. Source and Health Implications of High Toxic Metal Concentrations in Illicit Tobacco Products. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (2), 479–488.
- (66) Jung, M. C.; Thornton, I.; Chon, H. T. Arsenic, Cadmium, Copper, Lead, and Zinc Concentrations in Cigarettes Produced in Korea and the United Kingdom. *Environ. Technol.* **1998**, *19* (2), 237–241.
- (67) Report of the Royal Commission on Arsenical Poisoning in Food. *The Analyst* **1904**, *29* (February), 60.
- (68) Mierzwa, J.; Adeloju, S. B.; Dhindsa, H. S. Slurry Sampling for Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometric Determination of Arsenic in Cigarette Tobaccos. *The Analyst* **1997**, *122* (6), 539–542.
- (69) Schoof, R. .; Yost, L. .; Eickhoff, J.; Crecelius, E. .; Cragin, D. .; Meacher, D. .; Menzel, D. . A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37* (8), 839–846.
- (70) Ackerman, A. H.; Creed, P. A.; Parks, A. N.; Fricke, M. W.; Schwegel, C. A.; Creed, J. T.; Heitkemper, D. T.; Vela, N. P. Comparison of a Chemical and Enzymatic Extraction of Arsenic from Rice and an Assessment of the Arsenic Absorption from Contaminated Water by Cooked Rice. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (14), 5241–5246.
- (71) Bowen, H. J. M. Chapter 1 Trace Elements in Biological Samples. In *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*; Elsevier, 1988; Vol. 8, pp 1–17.
- (72) Devesa, V.; Martínez, A.; Súnier, M. A.; Vélez, D.; Almela, C.; Montoro, R. Effect of Cooking Temperatures on Chemical Changes in Species of Organic Arsenic in Seafood. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (5), 2272–2276.
- (73) Kaise, T.; Fukui, S. The Chemical Form and Acute Toxicity of Arsenic Compounds in Marine Organisms. *Appl. Organomet. Chem.* **1992**, *6* (2), 155–160.

- (74) Uthus, E. O. Evidence for Arsenic Essentiality. *Environ. Geochem. Health* **1992**, *14* (2), 55–58.
- (75) Brown, K. G.; Ross, G. L. Arsenic, Drinking Water, and Health: A Position Paper of the American Council on Science and Health. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2002**, *36* (2), 162–174.
- (76) Yoshida, T. *The Making of the “Rape of Nanking”: History and Memory in Japan, China, and the United States*; A study of the Weatherhead East Asian Institute, Columbia University; Oxford University Press: New York, 2006.
- (77) Stocken, L. A.; Thompson, R. H. S. Reactions of British Anti-Lewisite with Arsenic and Other Metals in Living Systems. *Physiol. Rev.* **1949**, *29* (2), 168–194.
- (78) Abernathy, C. O.; Liu, Y.-P.; Longfellow, D.; Aposhian, H. V.; Beck, B.; Fowler, B.; Goyer, R.; Menzer, R.; Rossman, T.; Thompson, C.; et al. Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions, and Research Issues. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107* (7), 593.
- (79) Oremland, R. S. The Ecology of Arsenic. *Science* **2003**, *300* (5621), 939–944.
- (80) Petrick, J. S.; Jagadish, B.; Mash, E. A.; Aposhian, H. V. Monomethylarsonous Acid (MMA^{III}) and Arsenite: LD₅₀ in Hamsters and In Vitro Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (6), 651–656.
- (81) E-Tabassum, N. Effect of Alpha-Lipoic Acid on the Removal of Arsenic from Arsenic-Loaded Isolated Liver Tissues of Rat. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2008**, *1* (1).
- (82) Grunert, R. R. The Effect of DL- α -Lipoic Acid on Heavy-Metal Intoxication in Mice and Dogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *86* (2), 190–194.
- (83) Shila, S.; Kokilavani, V.; Subathra, M.; Panneerselvam, C. Brain Regional Responses in Antioxidant System to α -Lipoic Acid in Arsenic Intoxicated Rat. *Toxicology* **2005**, *210* (1), 25–36.
- (84) Bhattacharjee, H.; Rosen, B. P. Spatial Proximity of Cys¹¹³, Cys¹⁷², and Cys⁴²² in the Metalloactivation Domain of the ArsA ATPase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (40), 24465–24470.
- (85) Ordóñez, E.; Thiyagarajan, S.; Cook, J. D.; Stemmler, T. L.; Gil, J. A.; Mateos, L. M.; Rosen, B. P. Evolution of Metal(loid) Binding Sites in Transcriptional Regulators. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (37), 25706–25714.
- (86) Sowerby, D. B. Structural Chemistry of Organic Compounds Containing Arsenic, Antimony and Bismuth. In *The Chemistry of Functional Groups*; Patai, S., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 1994; pp 25–88.
- (87) Zhang, T.; Lu, H.; Li, W.; Hu, R.; Chen, Z. Identification of Arsenic Direct-Binding Proteins in Acute Promyelocytic Leukaemia Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (11), 26871–26879.
- (88) Zhang, H.; Yang, L.; Ling, J.; Czajkowsky, D. M.; Wang, J.-F.; Zhang, X.-W.; Zhou, Y.-M.; Ge, F.; Yang, M.; Xiong, Q.; et al. Systematic Identification of Arsenic-Binding Proteins Reveals That Hexokinase-2 Is Inhibited by Arsenic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (49), 15084–15089.
- (89) Hughes, M. F. Arsenic Toxicity and Potential Mechanisms of Action. *Toxicol. Lett.* **2002**, *133* (1), 1–16.
- (90) Nesnow, S.; Roop, B. C.; Lambert, G.; Kadiiska, M.; Mason, R. P.; Cullen, W. R.; Mass, M. J. DNA Damage Induced by Methylated Trivalent Arsenicals Is Mediated by Reactive Oxygen Species †. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (12), 1627–1634.

- (91) Fowler, B. A.; Chou, C.-H. S. J.; Jones, R. L.; Chen, C.-J. Arsenic. In *Handbook on the Toxicology of Metals*; Elsevier, 2007; pp 367–406.
- (92) Wester, R. C.; Maibach, H. I.; Sedik, L.; Melendres, J.; Wade, M. In Vivo and in Vitro Percutaneous Absorption and Skin Decontamination of Arsenic from Water and Soil. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* **1993**, *20* (3), 336–340.
- (93) Meharg, A. A.; Rahman, M. M. Arsenic Contamination of Bangladesh Paddy Field Soils: Implications for Rice Contribution to Arsenic Consumption. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37* (2), 229–234.
- (94) *Arsenic in Drinking Water: 2001 Update*; National Research Council (U.S.), Ed.; National Academy Press: Washington, DC, 2001.
- (95) Gebel, T. W. Arsenic Methylation Is a Process of Detoxification through Accelerated Excretion. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2002**, *205* (6), 505–508.
- (96) Buchet, J. P.; Lauwerys, R.; Roels, H. Urinary Excretion of Inorganic Arsenic and Its Metabolites after Repeated Ingestion of Sodium Metaarsenite by Volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1981**, *48* (2), 111–118.
- (97) Bissen, M.; Frimmel, F. H. Arsenic — a Review. Part I: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2003**, *31* (1), 9–18.
- (98) Mohammed Abdul, K. S.; Jayasinghe, S. S.; Chandana, E. P. S.; Jayasumana, C.; De Silva, P. M. C. S. Arsenic and Human Health Effects: A Review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *40* (3), 828–846.
- (99) Das, B.; Rahman, M. M.; Nayak, B.; Pal, A.; Chowdhury, U. K.; Mukherjee, S. C.; Saha, K. C.; Pati, S.; Quamruzzaman, Q.; Chakraborti, D. Groundwater Arsenic Contamination, Its Health Effects and Approach for Mitigation in West Bengal, India and Bangladesh. *Water Qual. Expo. Health* **2009**, *1* (1), 5–21.
- (100) Caussy, D. Case Studies of the Impact of Understanding Bioavailability: Arsenic. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2003**, *56* (1), 164–173.
- (101) Jain, C. ;; Ali, I. Arsenic: Occurrence, Toxicity and Speciation Techniques. *Water Res.* **2000**, *34* (17), 4304–4312.
- (102) Liao, C.-M.; Shen, H.-H.; Lin, T.-L.; Chen, S.-C.; Chen, C.-L.; Hsu, L.-I.; Chen, C.-J. Arsenic Cancer Risk Posed to Human Health from Tilapia Consumption in Taiwan. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2008**, *70* (1), 27–37.
- (103) *Arsenic in Drinking Water: 2001 Update*; National Academies Press: Washington, D.C., 2001.
- (104) *Arsenic in Drinking Water*; National Research Council (U.S.), Ed.; National Academy Press: Washington, D.C, 1999.
- (105) Tsai, S.-M.; Wang, T.-N.; Ko, Y.-C. Mortality for Certain Diseases in Areas with High Levels of Arsenic in Drinking Water. *Arch. Environ. Health Int. J.* **1999**, *54* (3), 186–193.
- (106) Flanagan, S.; Johnston, R.; Zheng, Y. Arsenic in Tube Well Water in Bangladesh: Health and Economic Impacts and Implications for Arsenic Mitigation. *Bull. World Health Organ.* **2012**, *90* (11), 839–846.
- (107) *Essentials of Medical Geology*, Rev. ed.; Selinus, O., Alloway, B., Eds.; Springer: Dordrecht, 2013.
- (108) Sharma, A. K.; Tjell, J. C.; Sloth, J. J.; Holm, P. E. Review of Arsenic Contamination, Exposure through Water and Food and Low Cost Mitigation Options for Rural Areas. *Appl. Geochem.* **2014**, *41*, 11–33.

- (109) Barnett, W. B.; Kahn, H. L. Comparison of Atomic Fluorescence with Atomic Absorption as an Analytical Technique. *Anal. Chem.* **1972**, *44* (6), 935–939.
- (110) Ding, W.-W.; Sturgeon, R. E. Minimization of Transition Metal Interferences with Hydride Generation Techniques. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (3), 527–531.
- (111) Gettar, R. .; Garavaglia, R. .; Gautier, E. .; Batistoni, D. . Determination of Inorganic and Organic Anionic Arsenic Species in Water by Ion Chromatography Coupled to Hydride Generation–inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2000**, *884* (1–2), 211–221.
- (112) Quináia, S. P.; Rollemberg, M. do C. E. Selective Reduction of Arsenic Species by Hydride Generation: Atomic Absorption Spectrometry Part 1 - Reduction Media. *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8* (4), 349–356.
- (113) Marsh, J. Beschreibung eines neuen Verfahrens, um kleine Quantitäten Arsenik von den Substanzen abzuscheiden, womit er gemischt ist. *Ann. Pharm.* **1837**, *23* (2), 207–216.
- (114) Lindberg, A.-L.; Goessler, W.; Grandér, M.; Nermell, B.; Vahter, M. Evaluation of the Three Most Commonly Used Analytical Methods for Determination of Inorganic Arsenic and Its Metabolites in Urine. *Toxicol. Lett.* **2007**, *168* (3), 310–318.
- (115) Macedo, S. M.; dos Santos, D. C.; de Jesus, R. M.; da Rocha, G. O.; Ferreira, S. L. C.; de Andrade, J. B. Development of an Analytical Approach for Determination of Total Arsenic and Arsenic (III) in Airborne Particulate Matter by Slurry Sampling and HG-FAAS. *Microchem. J.* **2010**, *96* (1), 46–49.
- (116) Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, Third edition.; Practical spectroscopy; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2013.
- (117) Evans, E. H.; Giglio, J. J. Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. A Review. *J. Anal. At. Spectrom.* **1993**, *8* (1), 1.
- (118) Goossens, J.; Dams, R. Anion Exchange for the Elimination of Spectral Interferences Caused by Chlorine and Sulfur in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **1992**, *7* (8), 1167.
- (119) Vanhoe, H. A Review of the Capabilities of ICP-MS for Trace Element Analysis in Body Fluids and Tissues. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **1993**, *7* (3), 131–139.
- (120) Tan, S. H.; Horlick, G. Background Spectral Features in Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry. *Appl. Spectrosc.* **1986**, *40* (4), 445–460.
- (121) Campbell, M. J.; Demesmay, C.; Ollé, M. Determination of Total Arsenic Concentrations in Biological Matrices by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J Anal Spectrom* **1994**, *9* (12), 1379–1384.
- (122) Platzner, I.; Sala, J. V.; Mousty, F.; Trincherini, P. R.; Poletini, A. L. Signal Enhancement and Reduction of Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with an Argon–trifluoromethane Mixed Aerosol Carrier Gas. *J Anal Spectrom* **1994**, *9* (6), 719–726.
- (123) Laborda, F.; Baxter, M. J.; Crews, H. M.; Dennis, J. Reduction of Polyatomic Interferences in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry by Selection of Instrumental Parameters and Using an Argon–nitrogen Plasma: Effect on Multi-Element Analyses. *J Anal Spectrom* **1994**, *9* (6), 727–736.
- (124) Pupyshev, A. A. Formation of Doubly Charged Atomic Ions in an Inductively Coupled Plasma Discharge. *J. Anal. Chem.* **2001**, *56* (1), 2–7.

- (125) Jackson, B. P.; Liba, A.; Nelson, J. Advantages of Reaction Cell ICP-MS on Doubly Charged Interferences for Arsenic and Selenium Analysis in Foods. *J Anal Spectrom* **2015**, *30* (5), 1179–1183.
- (126) Gomez-Ariza, J. A Comparison between ICP-MS and AFS Detection for Arsenic Speciation in Environmental Samples. *Talanta* **2000**, *51* (2), 257–268.
- (127) Klaue, B.; Blum, J. D. Trace Analyses of Arsenic in Drinking Water by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: High Resolution versus Hydride Generation. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (7), 1408–1414.
- (128) Buffle, J.; Tercier-Waeber, M.-L. Voltammetric Environmental Trace-Metal Analysis and Speciation: From Laboratory to in Situ Measurements. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2005**, *24* (3), 172–191.
- (129) Sanger, C. R.; Black, O. F. The Quantitative Determination of Arsenic by the Gutzeit Method. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **1907**, *43* (8), 297.
- (130) Kearns, J.; Tyson, J. Improving the Accuracy and Precision of an Arsenic Field Test Kit: Increased Reaction Time and Digital Image Analysis. *Anal. Methods* **2012**, *4* (6), 1693.
- (131) George, C. M.; Zheng, Y.; Graziano, J. H.; Rasul, S. B.; Hossain, Z.; Mey, J. L.; van Geen, A. Evaluation of an Arsenic Test Kit for Rapid Well Screening in Bangladesh. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (20), 11213–11219.
- (132) Luong, J. H. T.; Majid, E.; Male, K. B. Analytical Tools for Monitoring Arsenic in the Environment. *Open Anal. Chem. J.* **2007**, *1* (1), 7–14.
- (133) Webster, S. H. The Development of the Marsh Test for Arsenic. *J. Chem. Educ.* **1947**, *24* (10), 487.
- (134) Sandhu, S. S.; Nelson, P. Ionic Interference in the Determination of Arsenic in Water by the Silver Diethyldithiocarbamate Method. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (2), 322–325.
- (135) Sanger, C. R.; Black, O. F. The Quantitative Determination of Arsenic by the Gutzeit Method. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* **1907**, *43* (8), 297.
- (136) Lohar, S.; Pal, S.; Sen, B.; Mukherjee, M.; Banerjee, S.; Chattopadhyay, P. Selective and Sensitive Turn-on Chemosensor for Arsenite Ion at the Ppb Level in Aqueous Media Applicable in Cell Staining. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (22), 11357–11361.
- (137) Sahana, A.; Banerjee, A.; Lohar, S.; Panja, S.; Kanti Mukhopadhyay, S.; Sanmartín Matalobos, J.; Das, D. Fluorescence Sensing of Arsenate at Nanomolar Level in a Greener Way: Naphthalene Based Probe for Living Cell Imaging. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (65), 7231.
- (138) Zhu, R. H.; Chen, L. H. Spectrofluorimetric Determination of Arsenic(III) in Water Samples. *Asian J Chem* **2011**, *23* (12), 5271–5274.
- (139) Ezeh, V. C.; Patra, A. K.; Harrop, T. C. Four-Coordinate As(III)-N,S Complexes: Synthesis, Structure, Properties, and Biological Relevance. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (6), 2586–2588.
- (140) Ezeh, V. C.; Harrop, T. C. A Sensitive and Selective Fluorescence Sensor for the Detection of Arsenic(III) in Organic Media. *Inorg. Chem.* **2012**, *51* (3), 1213–1215.
- (141) Ezeh, V. C.; Harrop, T. C. Synthesis and Properties of Arsenic(III)-Reactive Coumarin-Appended Benzothiazolines: A New Approach for Inorganic Arsenic Detection. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (5), 2323–2334.
- (142) Yamamoto D.; Kisu K. Indirect fluorometric determination of arsenic(III) with Rohdamine B. *Bunseki Kagaku* **1974**, *23* (6), 638–644.

- (143) Pillai, A.; Sunita, G.; Gupta, V. . A New System for the Spectrophotometric Determination of Arsenic in Environmental and Biological Samples. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *408* (1–2), 111–115.
- (144) Bhattacharya, S.; Sarkar, S.; Shunmugam, R. Unique Norbornene Polymer Based “in-Field” sensor for As(III). *J. Mater. Chem. A* **2013**, *1* (29), 8398.
- (145) Sirawatcharin, S.; Saithongdee, A.; Chaicham, A.; Tomapatanaget, B.; Imyim, A.; Praphairaksit, N. Naked-Eye and Colorimetric Detection of Arsenic(III) Using Difluoroboron-Curcumin in Aqueous and Resin Bead Support Systems. *Anal. Sci.* **2014**, *30* (12), 1129–1134.
- (146) Chaicham, A.; Kulchat, S.; Tumcharern, G.; Tuntulani, T.; Tomapatanaget, B. Synthesis, Photophysical Properties, and Cyanide Detection in Aqueous Solution of BF₂-Curcumin Dyes. *Tetrahedron* **2010**, *66* (32), 6217–6223.
- (147) Ran, C.; Xu, X.; Raymond, S. B.; Ferrara, B. J.; Neal, K.; Bacskai, B. J.; Medarova, Z.; Moore, A. Design, Synthesis, and Testing of Difluoroboron-Derivatized Curcumins as Near-Infrared Probes for in Vivo Detection of Amyloid- β Deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (42), 15257–15261.
- (148) Deepa, K.; Lingappa, Y. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Arsenic in Industrial and Environmental Samples Using 2,4-Dihydroxy Benzophenone-2-Amino Thiophenol. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *124*, 102–107.
- (149) Valsami-Jones, E. Phosphorus in Environmental Technology: Principles and Applications. *Water Intell. Online* **2015**, *4* (0), 9781780402758–9781780402758.
- (150) Worsfold, P.; Gimbert, L.; Mankasingh, U.; Omaka, O.; Hanrahan, G.; Gardolinski, P.; Haygarth, P.; Turner, B.; Keithroach, M.; Mckelvie, I. Sampling, Sample Treatment and Quality Assurance Issues for the Determination of Phosphorus Species in Natural Waters and Soils. *Talanta* **2005**, *66* (2), 273–293.
- (151) Berzelius, J. J. Beitrag zur näheren Kenntniss des Molybdäns. *Ann. Phys.* **1826**, *82* (4), 369–392.
- (152) Keggin, J. F. The Structure and Formula of 12-Phosphotungstic Acid. *Proc. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **1934**, *144* (851), 75–100.
- (153) McKelvie, I. D.; Peat, D. M. W.; Worsfold, P. J. Analytical Perspective. Techniques for the Quantification and Speciation of Phosphorus in Natural Waters. *Anal. Proc. Anal. Commun.* **1995**, *32* (10), 437.
- (154) Ueda, T.; Isai, K. Effects of Organic Solvents and Salts on the Isomerization Reaction ($\beta \rightarrow \gamma \rightarrow \alpha$) of Keggin-Type 12-Molybdophosphate Anion. *Anal. Sci.* **2013**, *29* (4), 447–453.
- (155) Zatar, N. A.; Abu-Eid, M. A.; Eid, A. F. Spectrophotometric Determination of Nitrite and Nitrate Using Phosphomolybdenum Blue Complex. *Talanta* **1999**, *50* (4), 819–826.
- (156) Murphy, J.; Riley, J. P. A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Anal. Chim. Acta* **1962**, *27*, 31–36.
- (157) Gupta, P. K.; Ramachandran, R. Spectrophotometric Determination of Phosphorus in Steel Using Phosphoantimonyl Molybdate Complex. *Microchem. J.* **1981**, *26* (1), 32–39.
- (158) Going, J. E.; Eisenreich, S. J. Spectrophotometric Studies of Reduced Molybdoantimonylphosphoric Acid. *Anal. Chim. Acta* **1974**, *70* (1), 95–106.
- (159) Harwood, J. E.; van Steenderen, R. A.; Kühn, A. L. A Rapid Method for Orthophosphate Analysis at High Concentrations in Water. *Water Res.* **1969**, *3* (6), 417–423.

- (160) Katewa, S. D.; Katyare, S. S. A Simplified Method for Inorganic Phosphate Determination and Its Application for Phosphate Analysis in Enzyme Assays. *Anal. Biochem.* **2003**, 323 (2), 180–187.
- (161) Truesdale, V. W.; Smith, C. J. The Formation of Molybdosilicic Acids from Mixed Solutions of Molybdate and Silicate. *The Analyst* **1975**, 100 (1188), 203.
- (162) Falk, K. G.; Sugiura, K. THE PRECIPITATION OF PHOSPHORUS AS AMMONIUM PHOSPHOMOLYBDATE IN THE PRESENCE OF SULFURIC ACID. *J. Am. Chem. Soc.* **1915**, 37 (6), 1507–1515.
- (163) Coddington, J. M.; Taylor, M. J. Molybdenum-95 Nuclear Magnetic Resonance and Vibrational Spectroscopic Studies of molybdenum(VI) Species in Aqueous Solutions and Solvent Extracts from Hydrochloric and Hydrobromic Acid: Evidence for the Complexes $[\text{Mo}_2\text{O}_5(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, $[\text{MoO}_2\text{X}_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ (X = Cl or Br), and $[\text{MoO}_2\text{Cl}_4]^{2-}$? *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1990**, No. 1, 41.
- (164) Zhang, J. Optimization of Performance and Minimization of Silicate Interference in Continuous Flow Phosphate Analysis. *Talanta* **1999**, 49 (2), 293–304.
- (165) Morita, K.; Kaneko, E. Spectrophotometric Determination of Arsenic in Water Samples Based on Micro Particle Formation of Ethyl Violet-Molybdoarsenate. *Anal. Sci.* **2006**, 22 (8), 1085–1089.
- (166) López Carreto, M.; Sicilia, D.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. Simultaneous Determination of Arsenate and Phosphate by Use of the Kinetic Wavelength-Pair Method. *Anal. Chim. Acta* **1993**, 283 (1), 481–488.
- (167) Dhar, R. K.; Zheng, Y.; Rubenstone, J.; van Geen, A. A Rapid Colorimetric Method for Measuring Arsenic Concentrations in Groundwater. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 526 (2), 203–209.
- (168) Dasgupta, P. Photometric Measurement of Trace As(III) and As(V) in Drinking Water. *Talanta* **2002**, 58 (1), 153–164.
- (169) Okazaki, T.; Wang, W.; Kuramitz, H.; Hata, N.; Taguchi, S. Molybdenum Blue Spectrophotometry for Trace Arsenic in Ground Water Using a Soluble Membrane Filter and Calcium Carbonate Column. *Anal. Sci.* **2013**, 29 (1), 67–72.
- (170) Taguchi, S.; Itooka, E.; Masuyama, K.; Kasahara, I.; Goto, K. Application of Organic Solvent-Soluble Membrane Filters in the Preconcentration and Determination of Trace Elements: Spectrophotometric Determination of Phosphorus as Phosphomolybdenum Blue. *Talanta* **1985**, 32 (5), 391–394.
- (171) Itaya, K.; Ui, M. A New Micromethod for the Colorimetric Determination of Inorganic Phosphate. *Clin. Chim. Acta* **1966**, 14 (3), 361–366.
- (172) Oshima, M.; Goto, N.; Susanto, J. P.; Motomizu, S. Determination of Phosphate as Aggregates of Ion Associates by Light-Scattering Detection and Application to Flow Injection. *The Analyst* **1996**, 121 (8), 1085.
- (173) Morita, K.; Kaneko, E. Spectrophotometric Determination of Trace Arsenic in Water Samples Using a Nanoparticle of Ethyl Violet with a Molybdate–Iodine Tetrachloride Complex as a Probe for Molybdoarsenate. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (22), 7682–7688.
- (174) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, 11, 55.
- (175) Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, 241 (105), 20–22.

- (176) Link, S.; El-Sayed, M. A. Spectral Properties and Relaxation Dynamics of Surface Plasmon Electronic Oscillations in Gold and Silver Nanodots and Nanorods. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (40), 8410–8426.
- (177) Chegel, V.; Rachkov, O.; Lopatynskiy, A.; Ishihara, S.; Yanchuk, I.; Nemoto, Y.; Hill, J. P.; Ariga, K. Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116* (4), 2683–2690.
- (178) Lakatos, M.; Matys, S.; Raff, J.; Pompe, W. Colorimetric As (V) Detection Based on S-Layer Functionalized Gold Nanoparticles. *Talanta* **2015**, *144*, 241–246.
- (179) Tan, Z.-Q.; Liu, J.-F.; Yin, Y.-G.; Shi, Q.-T.; Jing, C.-Y.; Jiang, G.-B. Colorimetric Au Nanoparticle Probe for Speciation Test of Arsenite and Arsenate Inspired by Selective Interaction between Phosphonium Ionic Liquid and Arsenite. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (22), 19833–19839.
- (180) Guibal, E.; Gavilan, K. C.; Bunio, P.; Vincent, T.; Trochimczuk, A. CYPHOS IL 101 (Tetradecyl(Trihexyl)Phosphonium Chloride) Immobilized in Biopolymer Capsules for Hg(II) Recovery from HCl Solutions. *Sep. Sci. Technol.* **2008**, *43* (9–10), 2406–2433.
- (181) Pereira, F. J.; Vázquez, M. D.; Debán, L.; Aller, A. J. Determination of Arsenic by ICP-MS after Retention on Thoria Nanoparticles. *Anal Methods* **2015**, *7* (2), 598–606.
- (182) Kalluri, J. R.; Arbnesi, T.; Afrin Khan, S.; Neely, A.; Candice, P.; Varisli, B.; Washington, M.; McAfee, S.; Robinson, B.; Banerjee, S.; et al. Use of Gold Nanoparticles in a Simple Colorimetric and Ultrasensitive Dynamic Light Scattering Assay: Selective Detection of Arsenic in Groundwater. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (51), 9668–9671.
- (183) Nath, P.; Arun, R. K.; Chanda, N. A Paper Based Microfluidic Device for the Detection of Arsenic Using a Gold Nanosensor. *RSC Adv* **2014**, *4* (103), 59558–59561.
- (184) Raab, A. The Nature of Arsenic-Phytochelatin Complexes in *Holcus Lanatus* and *Pteris Cretica*. *PLANT Physiol.* **2004**, *134* (3), 1113–1122.
- (185) Rey, N. A.; Howarth, O. W.; Pereira-Maia, E. C. Equilibrium Characterization of the As(III)–cysteine and the As(III)–glutathione Systems in Aqueous Solution. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98* (6), 1151–1159.
- (186) Xia, N.; Shi, Y.; Zhang, R.; Zhao, F.; Liu, F.; Liu, L. Simple, Rapid and Label-Free Colorimetric Assay for Arsenic Based on Unmodified Gold Nanoparticles and a Phytochelatin-like Peptide. *Anal. Methods* **2012**, *4* (12), 3937.
- (187) Tsang, S.; Phu, F.; Baum, M. M.; Poskrebyshev, G. A. Determination of Phosphate/arsenate by a Modified Molybdenum Blue Method and Reduction of Arsenate by S₂O₄²⁻. *Talanta* **2007**, *71* (4), 1560–1568.
- (188) Fischer, A. R.; Werner, P.; Goss, K.-U. Photodegradation of Malachite Green and Malachite Green Carbinol under Irradiation with Different Wavelength Ranges. *Chemosphere* **2011**, *82* (2), 210–214.
- (189) Drogat, N.; Vergnaud, J.; Granet, R.; Chaleix, V.; Sol, V.; Gloaguen, V. Systeme de Detection et de Quantification D'un Ion de L'uranium. WO2015049343 A1, April 9, 2015.
- (190) Drogat, N.; Morlet, J.-P.; Ringot, C.; Vergnaud, J.; Boucherle, T. Uranalyze®, Une Innovation Pour La Détection de L'uranium. N°402. L'Actualité Chimique Décembre 2015, pp 42–44.
- (191) Lagaly, G.; Tufar, W.; Minihan, A.; Lovell, A. Silicates. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2000.

- (192) Johnston, J. H.; McFarlane, A. J.; Borrmann, T.; Moraes, J. Nano-Structured Silicas and Silicates—new Materials and Their Applications in Paper. *Curr. Appl. Phys.* **2004**, *4* (2–4), 411–414.
- (193) Le Fevre, G.; Hanuman, P. D.; Graham Hagens, R. Paper Strength Enhancement by Silicate/starch Treatment. WO1999016972 A1, April 8, 1999.
- (194) *Technology of Paper Recycling*; McKinney, R. W. J., Ed.; Blackie Academic & Professional; Chapman & Hall: London : New York, 1995.
- (195) Shriver, D. F.; Atkins, P. W.; Pousse, A. *Chimie inorganique*; De Boeck université: Paris; Bruxelles, 2001.
- (196) Crosby, N. T. Equilibria of Fluorosilicate Solutions with Special Reference to the Fluoridation of Public Water Supplies. *J. Appl. Chem.* **2007**, *19* (4), 100–102.
- (197) Semmens, B.; Meggy, A. B. The Reaction of Kaolin with Fluorides: I. Effect of Neutral and Acid Sodium Fluoride Solutions. *J. Appl. Chem.* **2007**, *16* (4), 122–125.
- (198) Martel, M.-È. Le Phoslock Pour Lutter Contre Le Phosphore? *La Voix de l'Est*. Montréal October 27, 2014.
- (199) Sawada, K.; Yoshida, S.; Suzuki, T. Adsorption of Phosphate on Vaterite. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88* (15), 2227.
- (200) Sørensen, H. U.; Postma, D.; Jakobsen, R.; Larsen, F. Sorption and Desorption of Arsenate and Arsenite on Calcite. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2008**, *72* (24), 5871–5884.
- (201) Román-Ross, G.; Cuello, G. J.; Turrillas, X.; Fernández-Martínez, A.; Charlet, L. Arsenite Sorption and Co-Precipitation with Calcite. *Chem. Geol.* **2006**, *233* (3–4), 328–336.
- (202) Korngold, E.; Belayev, N.; Aronov, L. Removal of Arsenic from Drinking Water by Anion Exchangers. *Desalination* **2001**, *141* (1), 81–84.
- (203) Barakat, M. A.; Ismat-Shah, S. Utilization of Anion Exchange Resin Spectra/Gel for Separation of Arsenic from Water. *Arab. J. Chem.* **2013**, *6* (3), 307–311.
- (204) Haghseresht, F.; Wang, S.; Do, D. D. A Novel Lanthanum-Modified Bentonite, Phoslock, for Phosphate Removal from Wastewaters. *Appl. Clay Sci.* **2009**, *46* (4), 369–375.
- (205) Zamparas, M.; Gavriil, G.; Coutelieiris, F. A.; Zacharias, I. A Theoretical and Experimental Study on the P-Adsorption Capacity of Phoslock™. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *335*, 147–152.
- (206) Wu, R. S. S.; Lam, K. H.; Lee, J. M. N.; Lau, T. C. Removal of Phosphate from Water by a Highly Selective La(III)-Chelex Resin. *Chemosphere* **2007**, *69* (2), 289–294.
- (207) Xie, J.; Wang, Z.; Lu, S.; Wu, D.; Zhang, Z.; Kong, H. Removal and Recovery of Phosphate from Water by Lanthanum Hydroxide Materials. *Chem. Eng. J.* **2014**, *254*, 163–170.
- (208) Kolthoff, I. M.; Elmquist, R. THE SOLUBILITIES OF LANTHANUM OXALATE AND OF LANTHANUM HYDROXIDE IN WATER. THE MOBILITY OF THE LANTHANUM ION AT 25°. *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, *53* (4), 1217–1225.
- (209) Tanada, S.; Kabayama, M.; Kawasaki, N.; Sakiyama, T.; Nakamura, T.; Araki, M.; Tamura, T. Removal of Phosphate by Aluminum Oxide Hydroxide. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *257* (1), 135–140.
- (210) Xie, J.; Lin, Y.; Li, C.; Wu, D.; Kong, H. Removal and Recovery of Phosphate from Water by Activated Aluminum Oxide and Lanthanum Oxide. *Powder Technol.* **2015**, *269*, 351–357.

- (211) Recillas, S.; García, A.; González, E.; Casals, E.; Puentes, V.; Sánchez, A.; Font, X. Preliminary Study of Phosphate Adsorption onto Cerium Oxide Nanoparticles for Use in Water Purification; Nanoparticles Synthesis and Characterization. *Water Sci. Technol.* **2012**, *66* (3), 503.
- (212) Abo Markeb, A.; Alonso, A.; Dorado, A. D.; Sánchez, A.; Font, X. Phosphate Removal and Recovery from Water Using Nanocomposite of Immobilized Magnetite Nanoparticles on Cationic Polymer. *Environ. Technol.* **2016**, *37* (16), 2099–2112.
- (213) Ding, H.; Zhao, Y.; Duan, Q.; Wang, J.; Zhang, K.; Ding, G.; Xie, X.; Ding, C. Efficient Removal of Phosphate from Aqueous Solution Using Novel Magnetic Nanocomposites with Fe₃O₄@SiO₂ Core and Mesoporous CeO₂ Shell. *J. Rare Earths* **2017**, *35* (10), 984–994.
- (214) Zhang, J.; Liu, X.; Chen, X.; Li, J.; Zhao, Z. Separation of Tungsten and Molybdenum Using Macroporous Resin: Competitive Adsorption Kinetics in Binary System. *Hydrometallurgy* **2014**, *144–145*, 77–85.
- (215) Pensa, E.; Cortés, E.; Corthey, G.; Carro, P.; Vericat, C.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A. A.; Salvarezza, R. C. The Chemistry of the Sulfur–Gold Interface: In Search of a Unified Model. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1183–1192.
- (216) Qian, Q.; Deng, J.; Wang, D.; Yang, L.; Yu, P.; Mao, L. Aspartic Acid-Promoted Highly Selective and Sensitive Colorimetric Sensing of Cysteine in Rat Brain. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (21), 9579–9584.
- (217) Fu, X.; Liu, Y.; Wu, Z.; Zhang, H. Highly Sensitive and Naked Eye Dual-Readout Method for L-Cysteine Detection Based on the NSET of Fluorophore Functionalized Gold Nanoparticles. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2014**, *35* (4), 1159–1164.
- (218) Luo, Y.; Shen, Z.; Liu, P.; Zhao, L.; Wang, X. Facile Fabrication and Selective Detection for Cysteine of xylan/Au Nanoparticles Composite. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *140*, 122–128.
- (219) Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (4), 1067–1068.
- (220) Benoiton, N. L.; Chen, F. M. F. Not the Alkoxy-carbonylamino-Acid O-Acylisourea. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, No. 11, 543.
- (221) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Minor, C. A.; Albericio, F. Advantageous Applications of Azabenzotriazole (Triazolopyridine)-Based Coupling Reagents to Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, No. 2, 201.
- (222) Williams, A.; Ibrahim, I. T. Carbodiimide Chemistry: Recent Advances. *Chem. Rev.* **1981**, *81* (6), 589–636.
- (223) Wehrstedt, K. D.; Wandrey, P. A.; Heitkamp, D. Explosive Properties of 1-Hydroxybenzotriazoles. *J. Hazard. Mater.* **2005**, *126* (1–3), 1–7.
- (224) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–6602.
- (225) Paul, R.; Anderson, G. W. N,N'-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (17), 4596–4600.
- (226) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. Analysis of the Reactions Used for the Preparation of Drug Candidate Molecules. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (12), 2337.
- (227) Verma, S. K.; Acharya, B. N.; Kaushik, M. P. Imidazole-Catalyzed Monoacylation of Symmetrical Diamines. *Org. Lett.* **2010**, *12* (19), 4232–4235.

- (228) Woodman, E. K.; Chaffey, J. G. K.; Hopes, P. A.; Hose, D. R. J.; Gilday, J. P. *N,N'*-Carbonyldiimidazole-Mediated Amide Coupling: Significant Rate Enhancement Achieved by Acid Catalysis with Imidazole-HCl. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (1), 106–113.
- (229) Rannard, S. P.; Davis, N. J. The Selective Reaction of Primary Amines with Carbonyl Imidazole Containing Compounds: Selective Amide and Carbamate Synthesis. *Org. Lett.* **2000**, *2* (14), 2117–2120.
- (230) Larrivé-Aboussafy, C.; Jones, B. P.; Price, K. E.; Hardink, M. A.; McLaughlin, R. W.; Lillie, B. M.; Hawkins, J. M.; Vaidyanathan, R. DBU Catalysis of *N,N'*-Carbonyldiimidazole-Mediated Amidations. *Org. Lett.* **2010**, *12* (2), 324–327.
- (231) Stephan, R.; Erdman, J. G. Detection of Divalent Sulphur Compounds on Paper and Thin-Layer Chromatograms. *Nature* **1964**, *203* (4946), 749–749.
- (232) All Solutions Have a Solvent. *Green Chem* **2006**, *8* (1), 13–13.
- (233) Markworth, C. J.; Marron, B. E.; Swain, N. A. Benzamide Derivatives. WO2010035166, April 1, 2010.
- (234) Alexandridis, P. Gold Nanoparticle Synthesis, Morphology Control, and Stabilization Facilitated by Functional Polymers. *Chem. Eng. Technol.* **2011**, *34* (1), 15–28.
- (235) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105.
- (236) Elsupikhe, R. F.; Shameli, K.; Ahmad, M. B.; Ibrahim, N. A.; Zainudin, N. Green Sonochemical Synthesis of Silver Nanoparticles at Varying Concentrations of κ -Carrageenan. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10* (1).
- (237) Toshima, N.; Takahashi, T. Colloidal Noble Metal Catalysts Protected by Surfactant Micelles. Regio-Selectivity in the Hydrogenation of Unsaturated Fatty Acids in Organized Media. *Chem. Lett.* **1988**, *17* (4), 573–576.
- (238) Cataldo, F.; Ursini, O.; Angelini, G. Synthesis of Silver Nanoparticles by Radiolysis, Photolysis and Chemical Reduction of AgNO₃ in Hibiscus Sabdariffa Infusion (Karkadé). *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2016**, *307* (1), 447–455.
- (239) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- (240) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4215–4221.
- (241) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puentes, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105.
- (242) Grabar, K. C.; Freeman, R. G.; Hommer, M. B.; Natan, M. J. Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (4), 735–743.
- (243) Moine, C. EXTRACTION, CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET VALORISATION D'UNE FAMILLE D'HÉMICELLULOSES DU BOIS. Obtention de Matériaux Plastiques Par Modification Des Xylanes., Limoges: Limoges, 2005.
- (244) Kunze, J.; Burgess, I.; Nichols, R.; Buess-Herman, C.; Lipkowski, J. Electrochemical Evaluation of Citrate Adsorption on Au(111) and the Stability of Citrate-Reduced Gold Colloids. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *599* (2), 147–159.
- (245) Deryabin, D. G.; Efremova, L. V.; Vasilchenko, A. S.; Saidakova, E. V.; Sizova, E. A.; Troshin, P. A.; Zhilenkov, A. V.; Khakina, E. A. A Zeta Potential Value Determines the

Aggregate's Size of Penta-Substituted [60]fullerene Derivatives in Aqueous Suspension Whereas Positive Charge Is Required for Toxicity against Bacterial Cells. *J. Nanobiotechnology* **2015**, 13 (1).

- (246) Kah, J. C. Y.; Zubieta, A.; Saavedra, R. A.; Hamad-Schifferli, K. Stability of Gold Nanorods Passivated with Amphiphilic Ligands. *Langmuir* **2012**, 28 (24), 8834–8844.
- (247) Chemin, M. Valorisation Des Xylanes Du Bois : Vers La Synthèse de Copolymères Amphiphiles Bio-Sourcés, Bordeaux, 2014.
- (248) Jauberty, L.; Drogat, N.; Decossas, J.-L.; Delpech, V.; Gloaguen, V.; Sol, V. Optimization of the Arsenazo-III Method for the Determination of Uranium in Water and Plant Samples. *Talanta* **2013**, 115, 751–754.



Résumé

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé en 1998 la concentration maximale en arsenic dans l'eau de consommation à 10 ppb ($\mu\text{g/L}$). Dans le monde, plus de 100 millions de personnes sont exposées à des concentrations supérieures à 50 ppb. La toxicité, l'omniprésence et la mobilité de l'arsenic entraînent la nécessité de pouvoir le doser immédiatement sur le terrain. Il existe actuellement deux méthodes de dosage de terrain commercialisées. La première, onéreuse, est basée sur la voltammétrie (> 7000 €). La seconde à environ 2 €/analyse se présente sous le format de bandelette. Elle permet la mesure de teneurs en arsenic avoisinant les 10 ppb, mais nécessite la génération d'arsine (forme la plus toxique), l'utilisation de bromure de mercure et donne jusqu'à 33% de faux positifs. L'entreprise Novassay souhaite développer une nouvelle méthode de dosage de l'arsenic simple, rapide et efficace pouvant être utilisée directement sur le terrain. Ce travail présente dans un premier temps, un nouveau protocole issu d'une optimisation de la méthode dite au bleu de molybdène et de l'utilisation d'une membrane filtrante permettant une lecture colorimétrique sur support solide. Dans un deuxième temps, seront présentés les résultats obtenus sur le développement d'une méthode de dosage inédite de l'arsenic par l'intermédiaire de nanoparticules d'or. Dans cette partie, une molécule imaginée à partir de la structure d'un complexant naturel de l'arsenic sera synthétisée. Les tests de dosage de l'arsenic avec cette molécule seront réalisés sur deux types de nanoparticules d'or, les premières stabilisées au citrate, les secondes stabilisées au xylane.

Mots-clés : Arsenic, dosage, colorimétrie, bleu de molybdène, support physique, bandelette, nanoparticules d'or, xylane, phytochélatine 3

Abstract

In 1998, the World Health Organization (WHO) set the maximum concentration of arsenic in drinking water at 10 ppb ($\mu\text{g/L}$). In the world, more than 100 million people are exposed to concentrations upper than 50 ppb. The toxicity, ubiquity and mobility of arsenic imply the need to be able to dose it immediately on the field. There are currently two commercially available field dosing methods. The first, expensive, is based on voltammetry (> €7000). The second at about €2/analysis is available in the strip format. It allows the measurement of arsenic concentrations close to 10 ppb but requires the generation of arsine (the most toxic form of arsenic), the use of mercury bromide and gives up to 33% false positives. Novassay wants to develop a new simple, fast and efficient arsenic method that can be used directly in the field. Firstly, this work shows a new protocol resulting from an optimization of the molybdenum blue method and the use of a filtering membrane allowing a colorimetric reading on a solid support. In the second part of this work, the results obtained on the development of a novel method of dosing arsenic by the utilisation of gold nanoparticles will be presented. In this part, an imagined molecule from the structure of a natural complexant of arsenic will be synthesized. The arsenic assay with this molecule will be performed on two types of gold nanoparticles, the first stabilized with citrate, the second stabilized with xylan.

Keywords : Arsenic, determination of arsenic, colorimetry, molybdenum blue, physical support, test-strip, gold nanoparticles, xylan, phytochelatin 3

