

Approches combinées globales et moléculaires pour le suivi des caractéristiques de la matière organique dans le bassin de la Seine

Alexandre Thibault², Mahaut Sourzac¹, Christelle Anquetil², Sylvie Derenne²,
Arnaud Huguet^{2*}, Edith Parlanti^{1*}

¹ Université de Bordeaux, UMR EPOC 5805 CNRS, Talence

² Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS, EPHE, UMR 7619 Metis, Paris

* edith.parlanti@u-bordeaux.fr ; arnaud.huguet@upmc.fr

Résumé

La matière organique (MO), composant majeur des eaux naturelles et des eaux usées, est un mélange hétérogène de composés de propriétés chimiques variées et d'origines diverses plus ou moins transformées. De nature très complexe et dynamique, la MO, dissoute/colloïdale (MOD) et particulaire (MOP), joue un rôle clé pour le réseau trophique, l'écodynamique des micropolluants et ainsi plus globalement pour la qualité de l'eau et les processus biogéochimiques en milieu aquatique. Les sources de MO dans les environnements aquatiques sont multiples : autochtone naturelle (algues, bactéries, macrophytes), allochtone naturelle (issue des sols) et allochtone anthropique (rejets agricoles, urbains domestiques et industriels).

Malgré son rôle important dans l'environnement, la caractérisation détaillée de la MO ainsi que sa dynamique dans les écosystèmes aquatiques restent encore largement méconnues. La caractérisation de l'évolution spatio-temporelle de la MO dans les systèmes aquatiques demeure un défi dont l'enjeu est la compréhension / la prédiction de la qualité des cours d'eau. C'est le cas notamment du bassin versant de la Seine exposé à une très grande variété de sources potentielles de MO, tant naturelles qu'anthropiques.

Ces travaux portent sur l'étude de la MOD et de la MOP, sur deux sites (bassin versant de l'Orge et axe Seine), non seulement à l'échelle globale, mais également à l'échelle moléculaire, afin d'approfondir notre connaissance sur les sources de la MO et sur les processus qui gouvernent sa variabilité spatio-temporelle.

Cette approche combinée a pour objectifs de déterminer et comparer les caractéristiques globales et structurales de la MO et donc d'obtenir en une mesure simple et rapide, des renseignements précis sur la composition, l'origine et le degré de maturation de la MO. La spectroscopie de fluorescence tridimensionnelle, méthode rapide, sensible et non invasive, est un outil puissant qui permet ici une caractérisation globale de la MOD (origine, phénomènes d'interaction, transformation, dégradation). La caractérisation globale de la MOP est réalisée par analyses élémentaires et isotopiques.

Les premiers résultats obtenus ont déjà permis de mettre en évidence la grande variabilité spatiale et temporelle des caractéristiques de la MOD et de la MOP dans les sites ateliers de l'Orge, de la Vallée de Seine et de la Bassée. Cette variabilité traduit la grande hétérogénéité des constituants de la MO, de ses sources, naturelles et anthropiques, et des processus de transformation dans les eaux de surface.

L'approche combinée, globale et moléculaire, mise en œuvre dans cette étude, nous permettra d'appréhender toute la variabilité et la complexité physicochimique de la MO et in fine d'augmenter notre degré d'expertise et notre capacité d'interprétation d'indicateurs globaux comme les propriétés optiques de la MOD notamment.

Introduction

La matière organique (MO) est composée de toutes les molécules organiques issues de la production et de la dégradation du matériel biologique végétal ou animal, d'origine aquatique ou terrestre. La MO est omniprésente dans les écosystèmes aquatiques et peut avoir diverses origines. Elle représente un mélange complexe et hétérogène de molécules dans un continuum de tailles allant de la phase dissoute à la phase particulaire définie en fonction du seuil de coupure du filtre utilisé pour séparer ces deux phases. La MO en milieu aquatique se trouve en proportion largement majoritaire sous forme dissoute/colloïdale (MOD), inférieure à $0,70\mu\text{m}$, par rapport à la forme particulaire (MOP), supérieure à $0,70\mu\text{m}$ (Benner and Amon, 2015 ; Leenheer and Croue, 2003). En période de forte poussée algale ou bactérienne, la fraction de carbone organique particulaire (COP) peut représenter jusqu'à 50% du carbone organique total (COT) (Wetzel, 1983). La MO provient de sources multiples que ce soit autochtones (biomasse, activités bactérienne et microbienne), allochtones naturelles (décomposition végétale, lessivage des sols) (Labanowski, 2004) ou encore allochtones anthropiques (rejets domestiques, industriels et agricoles traités ou non-traités) (Mostofa et al., 2013). L'importance relative de ces différentes sources varie largement, spatialement et temporellement et de ce fait la MO diffère entre les différents compartiments aquatiques et les milieux (océan, rivière, aquifère, sol...) (Steinberg et al., 2006).

La qualité et la quantité de la MO influencent la qualité de l'eau et plus globalement les processus biogéochimiques en milieu aquatique (Baldock et al., 2004). De nature très complexe et dynamique, la MO est en effet un acteur clé dans la dispersion des éléments traces, le transport des contaminants, le cycle du carbone organique et la biodisponibilité des micronutriments et des contaminants (Hertkorn et al., 2016 ; Yamashita and Jaffé, 2008). En excès dans les eaux de surface, sous une forme biodégradable, la MO peut également conduire à des déficits en oxygène lors de sa minéralisation.

La MOD est notamment bien connue pour interagir avec de nombreux contaminants en milieu aquatique et pour influencer directement leur transport et leur biodisponibilité (Gjessing et al., 2007 ; Hirose, 2007). L'étude de la spéciation chimique est donc un préalable à la compréhension des mécanismes d'écotoxicité et de transfert dans les milieux (Mowat et Bundy, 2001). Les interactions contaminants-MOD dépendent des caractéristiques de la MOD et des contaminants (nature, structure, taille des molécules, polarité...) ainsi que des paramètres physico-chimiques du milieu (pH, concentration ionique...) (Akkanen et Kukkonen, 2003). Dans l'environnement aquatique, le rôle de la MOD est donc apparu de plus en plus essentiel pour comprendre le devenir des contaminants ainsi que leur impact toxique sur les organismes. La MOD joue d'autre part un rôle important dans l'ensemble des grands cycles biogéochimiques que ce soit pour le carbone, l'azote ou encore le phosphore et représente un élément essentiel, en tant que source de nutriments à la base des chaînes alimentaires pour les organismes vivants (Benner and Biddanda, 1998; Wetzel et al., 1995). Elle est donc considérée comme prépondérante dans le bon fonctionnement des milieux aquatiques de par son rôle dans les premiers niveaux des réseaux trophiques. Néanmoins, malgré son rôle environnemental important, la caractérisation détaillée de la MO ainsi que sa dynamique dans les écosystèmes aquatiques restent encore largement méconnues (Hertkorn et al., 2016). C'est le cas notamment du bassin versant de la Seine exposé à une très grande variété de sources potentielles de MO, tant naturelles qu'anthropiques.

L'investigation des sources et de la variabilité spatio-temporelle de la MOD dans le bassin de la Seine a été initiée lors de la phase 6 du PIREN-Seine (Varrault et al., 2013). Nous avons alors étudié par fluorescence 3D une quarantaine de stations échantillonnées lors de trois campagnes « snapshot » menées en 2011, 2012 et 2013 dans des conditions hydrologiques différentes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence des variations des qualités et des quantités de la matière organique selon les conditions hydrologiques (hautes eaux, basses eaux) et selon le bassin considéré et la localisation dans le bassin. Nous avons ainsi montré tout le potentiel de l'analyse globale par fluorescence 3D pour déterminer les différentes sources/qualités/réactivités de la MOD et la variabilité spatio-temporelle de ces propriétés.

Afin de connaître plus précisément les facteurs contrôlant sa chimiodiversité et son potentiel de libération/rétention des nutriments ou des contaminants, ou encore son évolution au cours des processus d'épuration et son implication dans la formation de sous-produits de désinfection et dans le colmatage des membranes de traitement des eaux, il faut coupler à l'analyse globale une caractérisation structurale plus fine de la MO. Cette approche combinée, globale et moléculaire, nous permettra in fine d'augmenter notre degré d'expertise et capacité d'interprétation des propriétés optiques de la MOD.

Ainsi, afin d'approfondir notre connaissance sur les sources de matière organique et sur les processus qui gouvernent sa variabilité spatio-temporelle, la caractérisation de la MO est donc poursuivie dans le cadre de la phase 7 du PIREN-Seine sur deux sites (bassin versant de l'Orge et axe Seine), par l'étude de la MOD et de la MOP, non seulement à l'échelle globale, mais également à l'échelle moléculaire. La caractérisation globale (fluorescence 3D) de la MOD est également réalisée dans la plaine alluviale de la Bassée (premiers résultats donnés dans le rapport « Caractérisation hydro-géochimique de la plaine de la Bassée en période de crue »).

Les techniques de géochimie organique (METIS UPMC) et les techniques spectroscopiques, analytiques et séparatives (EPOC Université de Bordeaux), sont mises en œuvre pour examiner la variabilité spatio-temporelle des sources, de la qualité et de la réactivité de la MO sous ses formes dissoute/colloïdale et également particulaire.

Les objectifs de cette étude sont donc de déterminer et comparer les caractéristiques globales et structurales de la MO et donc d'obtenir en une mesure simple et rapide, des renseignements précis sur la composition, l'origine et le degré de maturation de la MO et fournir :

- ❖ des paramètres qualitatifs et quantitatifs caractérisant la MO
- ❖ des indicateurs de la variabilité chimique et de la dynamique de la MO

Une approche semblable a été développée dans la partie estuarienne de la Seine (projet Seine-Aval MOSAIC). La stratégie d'échantillonnage proposée dans le cadre de la phase 7 du PIREN, combinée à l'étude menée dans l'estuaire, permettra d'autre part d'appréhender l'évolution de la quantité et de la qualité de la MO (caractéristiques globales et moléculaires) tout le long du continuum depuis le bassin de la Seine jusqu'à l'embouchure de l'estuaire.

Les analyses des échantillons sont en cours, les premiers résultats sont présentés dans ce rapport.

1 Méthodologie

Afin de pouvoir faire le lien entre la variabilité des caractéristiques de la MO et la dynamique des contaminants, les sites d'échantillonnage pour caractériser la MO particulaire et dissoute/colloïdale ont été choisis en lien avec les actions portant sur les flux de contaminants et leurs transferts dans les réseaux trophiques.

1.1 Echantillonnage

Deux sites ateliers ont été échantillonnés (Figure 1) : le site atelier de l'Orge (fort gradient de contamination urbaine) et le site atelier Vallée de Seine (gradient de contamination de l'axe Seine).

Une campagne de prélèvements a été réalisée en septembre 2016 sur le bassin versant de l'Orge :

- ❖ Viry-Châtillon, sur l'Orge - zone urbaine
- ❖ Moulin de l'Ecurie, proche de Souzy-la-Briche, sur la Renarde – zone amont agricole
- ❖ Longvilliers, sur la Rémarde – zone amont forestière

Une deuxième campagne de prélèvement sur le site atelier de l'Orge est programmée fin novembre 2017.

Quatre campagnes de prélèvements ont d'autre part été effectuées sur l'axe Seine Marnay-Bougival-Triel en octobre, novembre et décembre 2016 et en juin 2017.

Enfin, sur les 12 stations MOLONARI (MONitoring LOcal des échanges NAppe-RiVière) échantillonnées en mars 2017 dans la plaine alluviale de la Bassée pour la caractérisation globale par fluorescence 3D de la MOD (voir rapport « Caractérisation hydro-géochimique de la plaine de la Bassée en période de crue »), un prélèvement de 40L d'eau de surface a également été réalisé pour la station T8S1 afin de caractériser également la MOD au niveau moléculaire.

Au total, 10 gros volumes d'eau (entre 40 et 60 L) et 15 petits volumes (3-4L) ont été prélevés et immédiatement filtrés à 0,70 µm afin de séparer la MOD de la MOP déposée sur les filtres en fibre de verre (Whatman GF/F) préalablement pyrolysés à 450°C pendant 1 heure.

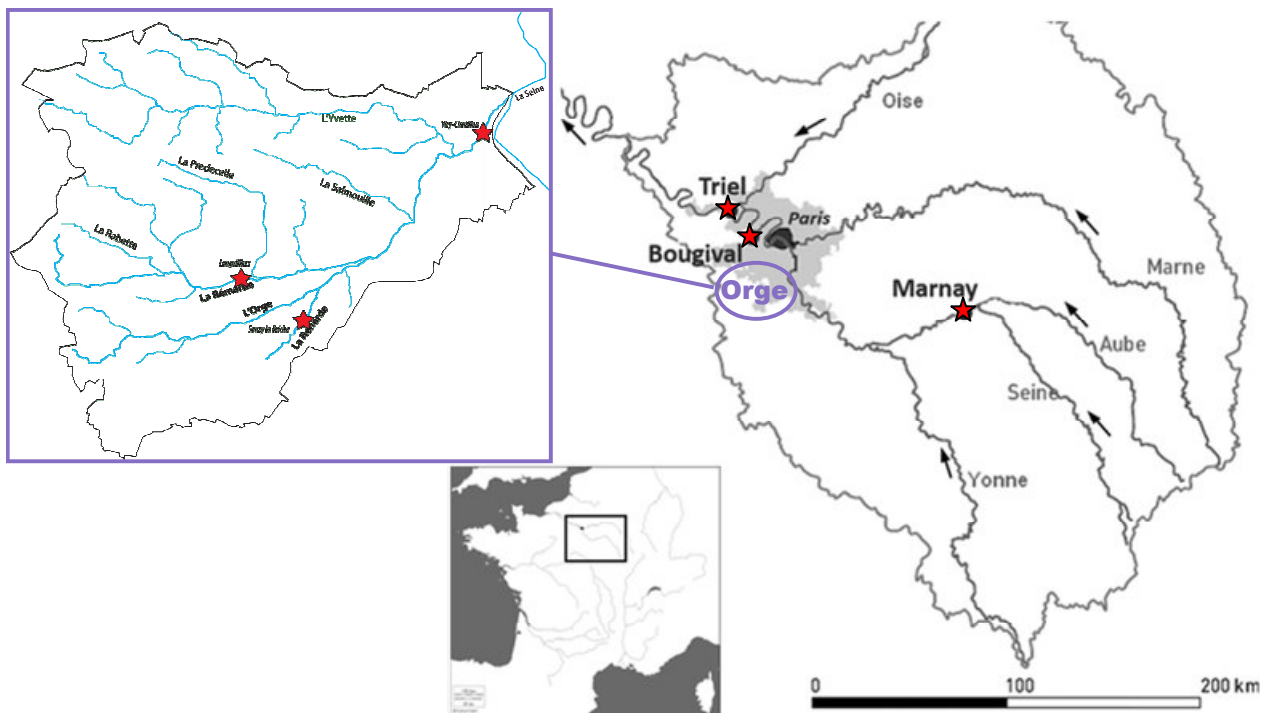


Figure 1. Localisation des sites de prélèvement.

La caractérisation globale de la MOD est réalisée par des techniques spectroscopiques rapides et non-invasives (absorbance UV-Visible et fluorescence 3D) et mesure du carbone organique dissous (COD). Il est d'autre part essentiel d'arriver également à caractériser la MOD plus finement à l'échelle moléculaire. Pour cela de gros volumes d'échantillon doivent être concentrés par osmose inverse (OI) couplée à l'électrodialyse (ED). Cette méthode originale et innovante, développée par un nombre très limité de laboratoires dans le monde, permet de concentrer la MOD sans en modifier la qualité, avec des pertes minimales, tout en dessalant l'échantillon (Koprivnjak et al., 2009 ; Mao et al., 2012).

Les MOP sont caractérisées par analyses élémentaire et isotopique, résonance magnétique nucléaire du carbone à l'état solide (RMN ^{13}C), et par pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse (py-GC-MS). Les mêmes analyses seront ensuite réalisées sur les MOD concentrées.

1.2 Caractérisation globale de la MOD

La matière organique dissoute/colloïdale (MOD) est caractérisée d'un point de vue quantitatif par la mesure des concentrations en carbone organique dissous (COD) et l'investigation de ses sources et de ses variations spatiales a été réalisée par l'étude de ses propriétés optiques (absorption, fluorescence 3D) (Coble 1996 ; Helms et al., 2008 ; Huguet et al., 2009 ; Parlanti et al., 2000 ; Stubbins et al., 2012).

1.1.1 Teneurs en carbone organique dissous (COD)

Les mesures des teneurs en COD sont réalisées par oxydation thermique dans un four à 680°C en présence d'un catalyseur à l'aide des analyseurs de carbone TOC-V CSN et TOC-L CSH/CSN SHIMADZU. L'appareil est étalonné à l'aide de gammes d'étalonnage réalisées à partir d'une solution standard de phtalate de potassium diluée à différentes concentrations. Pour chaque échantillon le résultat donné est la moyenne d'au moins trois mesures satisfaisantes en termes d'écart type et de coefficient de variation. De plus, au moins deux échantillons de référence certifiés (CRM) (ANALAB, Environnement Canada) sont testés, en début et fin de chaque séquence d'analyse d'échantillons, afin de valider les résultats (Parot, 2016).

1.1.2 Absorbance de la MOD

La spectroscopie d'absorption UV-visible est utilisée pour la détermination rapide des propriétés générales de la MOD chromophorique. Les analyses sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Jasco V-560.

Afin d'obtenir des informations sur les propriétés de la MOD à partir des spectres d'absorbance (enregistrés entre les longueurs d'onde de 200 et 800nm), différents indices, tels que le SUVA ou les pentes spectrales, ont été développés et appliqués à l'étude de la MOD en milieu aquatique.

L'absorbance à 254 nm normalisée par la concentration en COD, appelée SUVA (Specific UV Absorbance), est corrélée avec le pourcentage d'aromaticité de la MOD (Weishaar et al., 2003). Le SUVA est donc considéré comme un indicateur de l'aromaticité, de la réactivité et du caractère hydrophobe ou hydrophile de la MOD en milieu aquatique. Quand sa valeur est haute (> 4) la MOD est dite hydrophobe avec un caractère aromatique fort alors que quand elle est faible (< 3) la MOD est dite hydrophile (Matilainen et al., 2011).

Le rapport des pentes spectrales (S_R) est calculé comme le rapport de la pente du spectre d'absorbance pour les courtes longueurs d'onde ($S_{275-295nm}$) sur la pente spectrale de plus grandes longueurs d'onde ($S_{350-400nm}$). Le rapport S_R est négativement corrélé avec la taille de la MOD, quand S_R augmente le poids moléculaire diminue (Helms et al., 2008).

1.1.3 Fluorescence de la MOD

Les propriétés de fluorescence de la MOD permettent d'obtenir des informations sur sa structure et ses propriétés générales. La fluorescence est une technique très sensible qui permet de caractériser la MOD à partir d'un échantillon aqueux de faible volume sans nécessité de concentration ou d'extraction. La fluorescence tridimensionnelle (ou matrices d'excitation-émission (EEM) de fluorescence) est généralement utilisée pour caractériser la MOD et étudier sa dynamique dans les environnements aquatiques (Carstea et al., 2010 ; Huguet et al., 2009 ; Jaffé et al., 2004 ; Tzortziou et al., 2015).

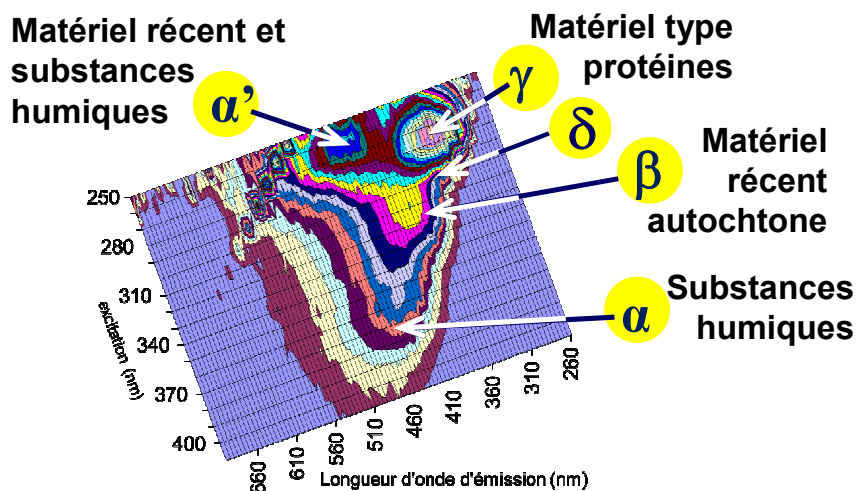


Figure 2. Projection dans le plan d'une matrice EEM d'un échantillon d'eau naturelle. Les lettres représentent les principales bandes de fluorescences spécifiques identifiées.

Les spectres EEM (Figure 2) mettent en évidence les différents fluorophores (Tableau 1) constituant la MOD et donnent des informations sur sa source, sa composition chimique, son état de dégradation et sa réactivité (Coble et al., 1990 ; Fellman et al., 2010 ; McKnight et al., 2001 ; Parlanti et al., 2000).

Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog Horiba Jobin-Yvon FL3-22. Les données semi-quantitatives et qualitatives à prendre en compte sont l'intensité (proportionnelle à la concentration des fluorophores) et la position des maxima de fluorescence qui varient en fonction de la nature et de l'origine des échantillons et dépendent des espèces moléculaires fluorescentes qu'ils contiennent (type de bande = type de matériel organique fluorescent) (Tableau 1). Des indices de fluorescence (HIX, BIX, FI, les rapports d'intensités des bandes de fluorescence α'/α , β/α et γ/α) sont généralement déterminés afin d'estimer les sources et le degré de maturation de la MOD fluorescente.

Tableau 1. Principales bandes de fluorescence de la MOD citées dans la littérature pour décrire les eaux naturelles (Coble, 1996 ; Parlanti et al., 2000 ; Stedmon et al., 2003).

Nom des fluorophores	Type de fluorophores	Origine	Longueurs d'ondes d'excitation (nm)	Longueurs d'ondes d'émission (nm)
α'	Substances type humique + matériel plus récent	allochtone / autochtone	230-260	380-480
α	Substances type humique	allochtone	330-370	420-480
β	Matériel biologique et origine microbienne / matériel récent	allochtone / autochtone	310-320	360-410
γ	Protéines et activité bactérienne	autochtone	270-280	300-350
δ	Protéines et composés phénoliques	autochtone	280-300	320-380

L'indice d'Humification HIX (Zsolnay et al., 1999) a été développé pour estimer le degré de maturation de la MOD en se basant sur le fait que le maximum d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation de 254nm se décale vers les grandes longueurs d'onde lorsque l'aromaticité et donc le degré de maturation augmente. De fortes valeurs de HIX (>15) indiquent donc la présence d'un matériel organique humifié/aromatique dans les eaux. Les valeurs de HIX diminuent pour des composés présentant un degré d'aromaticité moindre et des masses moléculaires plus faibles.

Un indice d'activité biologique (BIX) a été développé afin de caractériser la production autochtone de MOD en milieu aquatique (Vacher, 2004 ; Huguet et al., 2009). Il correspond au rapport des intensités d'émission de fluorescence à 380nm et à 430nm pour une longueur d'excitation de 310nm et permet d'estimer la présence de matière organique fraîchement produite dans le milieu (une valeur supérieure à 0.8 indique une MOD produite récemment et d'origine autochtone et plus cette valeur se rapproche de 0,5 plus la part de matériel frais est faible).

L'indice FI (rapport des intensités d'émission de fluorescence à 450nm et à 500nm pour une longueur d'excitation de 370nm) permet d'identifier la contribution relative de MOD terrestre (FI = 1,3) ou aquatique/microbienne (FI = 1,9) (Mc Knight et al., 2001 ; Cory et al., 2010).

Les rapports d'intensités des bandes de fluorescence α'/α , β/α et γ/α correspondent au rapport des intensités des fluorophores caractéristiques d'un matériel fraîchement produit dans le milieu (α' , β et γ) sur l'intensité du fluorophore α considéré comme étant le plus mature et réfractaire.

Dans un spectre de fluorescence 3D de MOD, les pics se superposent et ont des influences les uns sur les autres. Afin d'extraire plus d'informations de ces spectres, une méthode numérique de traitement des spectres a été développée et permet une séparation mathématique des différentes contributions spectrales. Cette approche statistique de modélisation nommée PARAFAC (PARAllel FACtors analysis) est devenue incontournable pour traiter les spectres tridimensionnels de MOD en milieux naturels (Stedmon et al., 2003, 2008 ; Chen et al., 2013 ; Guo et al., 2011 ; Osburn et al., 2016). Elle nécessite cependant un jeu de données suffisant (>20-30 échantillons environ) pour pouvoir être appliquée. Elle sera donc mise en œuvre dans le cadre de ce projet quand le jeu de données sera complet.

1.2 Concentration/dessalement de la MOD

La caractérisation de la MOD, fortement diluée dans les eaux de surface (quelques mg/l), nécessite d'en isoler des quantités suffisantes (20 à 100 mg de C) pour réaliser des analyses élémentaires ou moléculaires de ce matériel, tout en enlevant les sels et sans en modifier la composition.

Afin d'atteindre cet objectif, une méthode originale et innovante, l'osmose inverse couplée à l'électrodialyse (OI/ED), disponible à ce jour dans un seul autre laboratoire au niveau mondial (Koprinyjak et al., 2006, 2009) a été mise en œuvre à EPOC. La MOD et les sels sont retenus et concentrés par une membrane d'osmose inverse qui ne laisse passer que les molécules d'eau, et les sels sont ensuite retirés de la solution par électrodialyse pour que les analyses moléculaires soient possibles.

Cette méthode a été optimisée et validée au début de la phase 7 du PIREN en utilisant 40 litres d'eau prélevés à Herblay (environ 30 km en aval de Paris). L'analyse des aliquotes prélevés tout au long de la concentration par OI et du dessalement par ED avait montré que la qualité de la MOD fluorescente n'avait pas été modifiée lors du traitement de l'échantillon et que le couplage de l'OI et de l'ED permettait donc d'obtenir un échantillon concentré représentatif de l'échantillon de départ.

Après concentration par OI et dessalement par ED, les échantillons sont concentrés à l'évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un volume d'eau résiduel (≈ 100 ml) puis sont congelés à -20 °C et lyophilisés. Lors de ces différentes étapes, la qualité de la MOD est testée par fluorescence 3D. La poudre ainsi obtenue peut ensuite être soumise aux mêmes analyses que la MOP.

1.3 Analyses de la MO au niveau global : analyses élémentaires et isotopiques

Les analyses élémentaires (teneur en carbone et azote) et isotopiques en carbone ($\delta^{13}\text{C}$) de la MO sont classiquement utilisées, pour les phases particulières et sédimentaires, pour déterminer la ou les source(s) du matériel organique en milieu aquatique - autochtone (i.e. produit in situ, plancton) et/ou allochtone (i.e. matériel d'origine terrigène) - et son degré de dégradation.

Les végétaux terrestres sont principalement composés de lignine et de cellulose, qui sont pauvres en azote et présentent des rapports C/N généralement supérieurs à 20 et pouvant atteindre 500 (Hedges et al., 1997). Au contraire, les algues et les bactéries sont comparativement enrichies en azote (Talbot et Johannessen, 1992) et contiennent un matériel organique plus labile, conduisant à des rapports C/N généralement inférieurs à 10 (Meyers, 1994).

Les valeurs du $\delta^{13}\text{C}$ de la MO permettent, de manière complémentaire au rapport C/N, d'évaluer l'origine de la MO en milieu aquatique. Le $\delta^{13}\text{C}$ de la MO fluviale dépend des contributions relatives de la MO terrigène (-25 à -33 ‰) et de la MO autochtone, principalement le phytoplancton d'eau douce (-25 à -33 ‰ ; Middelburg et Niewenhuize, 1998).

Ces analyses ont été effectuées sur les échantillons de MOP des différentes campagnes du projet et seront également réalisées sur les échantillons de MOD après concentration/dessalement.

1.4 Analyses de la MO au niveau structural

En complément des caractéristiques globales de la MO, il est nécessaire d'examiner de manière plus approfondie sa composition chimique, cette dernière influençant directement les différents processus biogéochimiques (transfert des contaminants, transformation des nutriments et activité des microorganismes associés etc.) se déroulant en milieu aquatique.

1.4.1 Résonance magnétique nucléaire du carbone à l'état solide (RMN ^{13}C)

La résonance magnétique nucléaire du carbone (RMN ^{13}C) à l'état solide est une méthode d'analyse semi-quantitative permettant de déterminer les principaux groupements fonctionnels liés aux atomes de carbone. On peut distinguer six grands types de fonctions carbonées, présentées dans l'ordre croissant de leurs déplacements chimiques (Figure 3) : les C aliphatiques (CH_3 , CH_2 et CH) ; les groupements méthoxy (OCH_3) ; les C de type alkoxy (C-O) ; les C anomériques (O-C-O) ; les C aromatiques ; les fonctions carboxyliques (COOH).

Enfin, les spectres de RMN ^{13}C peuvent également être utilisés pour préciser les sources de la MO. En effet, un modèle, développé par Baldock et al. (2004) permet de calculer l'abondance relative de six grandes familles de molécules constitutives de la MO (sucres, protéines, lignines, lipides, composés carbonylés, char), les sucres et les protéines étant des composés labiles considérés comme représentatifs de la MO autochtone, à l'inverse de la lignine, biopolymère présent chez les végétaux terrestres (et donc d'origine allochtone).

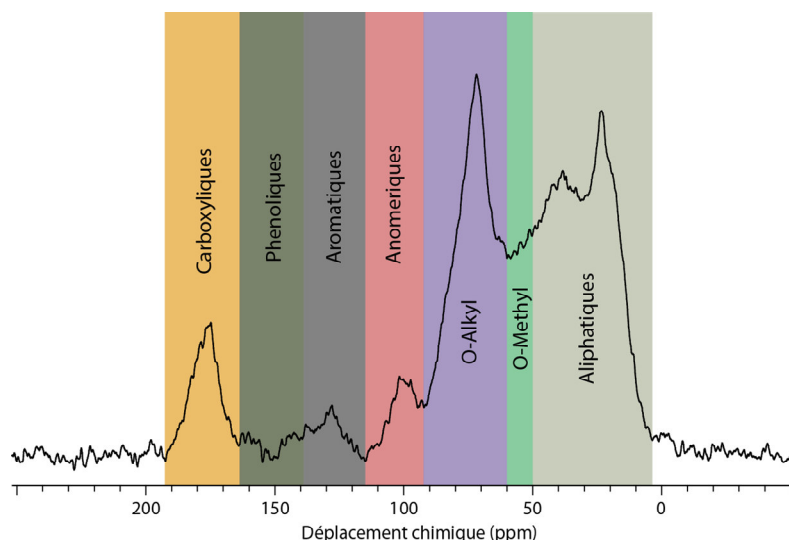


Figure 3. Exemple d'un spectre RMN du ^{13}C et déplacements chimiques associés aux principaux groupements fonctionnels carbonés.

1.4.2 Pyrolyse couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse

Une grande partie de la MO est constituée de macromolécules, qui ne sont pas extractibles à l'aide de solvants organiques et donc non analysables par GC- ou chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS). Leur analyse est cependant possible par pyrolyse couplée à la GC-MS (Christy et al., 1999). En effet, la pyrolyse brise les macromolécules en petites unités qui peuvent ensuite être analysées par GC-MS. Ce couplage est particulièrement utile pour détecter les composés aromatiques, dont ceux dérivés de la lignine.

Pour mieux détecter les composés polaires, de l'hydroxyde de tetraméthylammonium TMAH à 25% est ajouté dans l'échantillon. Ce réactif est une base et un agent méthylant qui va faciliter les coupures lors de la pyrolyse mais aussi permettre une meilleure détection des composés polaires en méthylant les fonctions alcools, acides, amines, et donc en abaissant leur polarité.

Les analyses ont été réalisées avec un pyrolyseur à point de curie à 650°C pendant 9,9s (marque Pilodist). Le pyrolysate arrive ensuite dans l'injecteur à 280°C réglé en mode split (30 mL/min) avec un débit constant d'1 mL/min. L'échantillon est ensuite séparé sur une colonne (95% diméthyl/5% diphenyl polysiloxane Rxi5SilMS ; 30 m x 0.25mm x 0.5 μm) dans un Trace GC ultra (Thermo Scientific). Le programme de température du four utilisé pour la séparation des molécules est le suivant : 10 min à 50 °C, puis augmentation de 2°C/min jusqu'à 320 °C et enfin 30 min à 320 °C.

Les produits de pyrolyse sont identifiés par le spectromètre de masse (DSQ Thermo Scientific) en impact électronique.

2 Résultats

Les analyses des échantillons sont en cours actuellement. Seuls les résultats sur les propriétés de fluorescence de la MOD ainsi que les analyses sur la MOP seront présentées dans ce rapport.

Les gros volumes d'eau (40L) échantillonnés au cours des différentes campagnes de prélèvement, sont en cours de concentration/dessalement (Tableau 2). Les analyses au niveau structural / moléculaire de la MOD n'ont donc pas encore pu être réalisées.

Tableau 2. Avancement des concentrations/dessalement des échantillons

Site atelier	Echantillon	Date prélèvement	Concentration OI	Dessalement ED
Orge	Viry-Châtillon (Orge)	20/09/2016	✓	
	Moulin de l'Ecurie (Renarde)	20/09/2016	✓	
	Longvilliers (Rémarde)	20/09/2016	✓	
Vallée de Seine	Marnay sur Seine	16/11/2016		
		27/06/2017		
	Bougival	16/11/2016	✓	
		27/06/2017		
	Triel sur Seine	16/11/2016	✓	
		27/06/2017		
Bassée	T8S1	17/03/2017	✓	

2.1 Fluorescence 3D de la MOD

2.1.1 Site atelier de l'Orge

Les intensités de fluorescence des 4 principales bandes de fluorescence observées pour les échantillons prélevés le 20/09/2016 sont présentées sur la Figure 4.

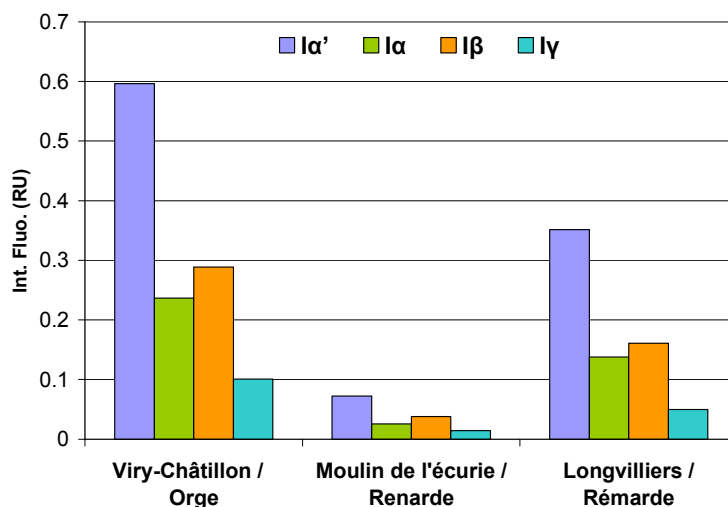


Figure 4. Intensités de fluorescence (unités Raman) des bandes α' (matériel récent et substances humiques), α (substances humiques), β (matériel récent autochtone) et γ (matériel type protéines) pour les échantillons du site atelier de l'Orge du 20/09/2016.

Les concentrations en MOD fluorescente sont plus fortes pour l'échantillon de zone urbaine (Orge/Viry-Châtillon) et les plus faibles dans la zone plus agricole (Renarde). Il faudra cependant normaliser ces intensités par rapport aux teneurs en COD des échantillons, quand ces dernières seront disponibles, pour connaître la proportion de MOD fluorescente pour chacun.

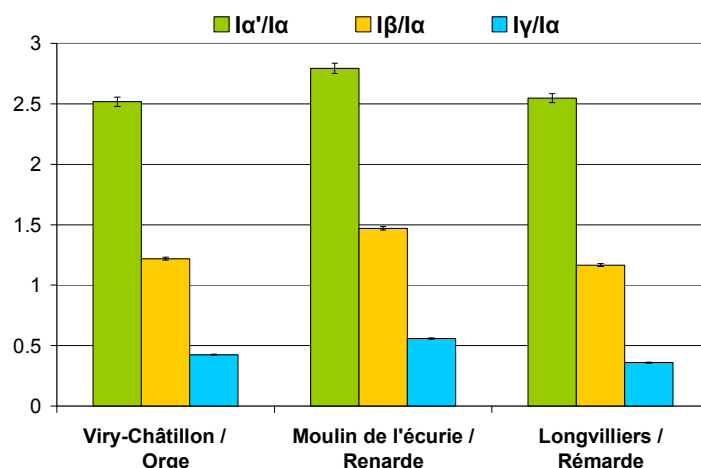


Figure 5. Rapport des intensités de fluorescence $I\alpha'/I\alpha$, $I\beta/I\alpha$ et $I\gamma/I\alpha$ (matériel organique récent / matériel mature) pour les échantillons du site atelier de l'Orge du 20/09/2016.

Les rapports d'intensités des bandes de fluorescence montrent une proportion plus forte de matériel récent pour l'échantillon prélevé sur la Renarde en zone agricole (Figure 5), ce qui est confirmé par les valeurs plus élevées des indices BIX et FI (Figure 6) pour ce même échantillon traduisant une production de MOD en lien avec une activité biologique plus importante.

Nous observons la plus forte valeur de HIX pour l'échantillon prélevé sur la Rémarde. Les sources terrigènes de MOD plus importantes pour cet échantillon sont cohérentes avec sa provenance d'une zone plus forestière.

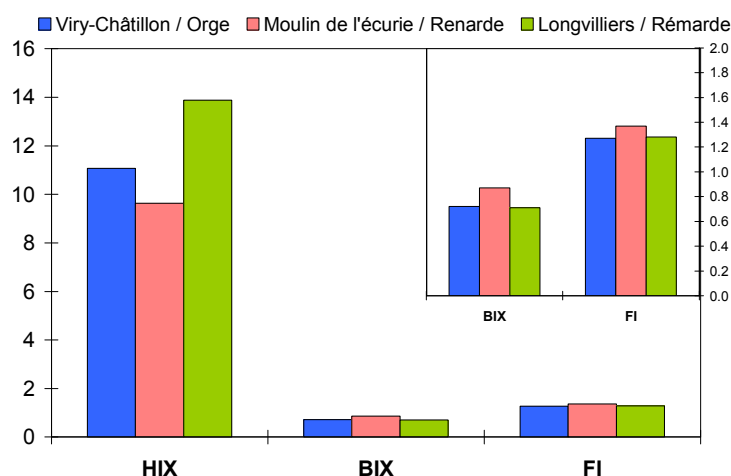


Figure 6. Indices de fluorescence HIX (humification), BIX (production autochtone) et FI (activité microbienne) pour les échantillons du site atelier de l'Orge du 20/09/2016.

2.1.2 Site atelier Vallée de Seine

La Figure 7 montre une augmentation des intensités des 4 principales bandes de fluorescence de l'amont (Marnay sur Seine) à l'aval de Paris (Bougival et Triel sur Seine) sur l'axe Seine, les plus fortes concentrations étant observées pour Triel sur Seine. Ces intensités sont néanmoins inférieures à celles observées à Viry-Châtillon sur l'Orge en septembre 2016. Comme précisé pour le site de l'Orge, ces intensités devront être normalisées par rapport aux teneurs en COD des échantillons, quand ces dernières seront disponibles, pour pouvoir apprécier les proportions de matériel fluorescent par rapport aux teneurs globales en carbone organique. Pour Triel sur Seine et Bougival les concentrations en MOD fluorescente sont plus fortes en décembre 2016 et juin 2017 contrairement à la diminution d'intensité observée pour ces 2 dates à Marnay sur Seine.

Comme précisé pour le site de l'Orge, ces intensités devront être normalisées par rapport aux teneurs en COD des échantillons, quand ces dernières seront disponibles, pour pouvoir apprécier les proportions de matériel fluorescent par rapport aux teneurs globales en carbone organique. Pour Triel sur Seine et Bougival les concentrations en MOD fluorescente sont plus fortes en décembre 2016 et juin 2017 contrairement à la diminution d'intensités observée pour ces 2 dates à Marnay sur Seine.

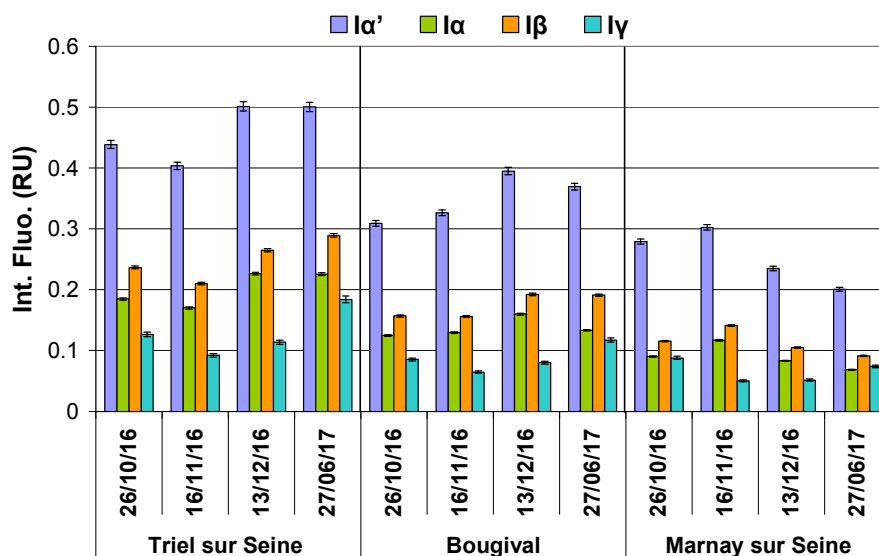


Figure 7. Intensités de fluorescence (unités Raman) des bandes α' (matériel récent et substances humiques), α (substances humiques), β (matériel récent autochtone) et γ (matériel type protéines) pour les échantillons de l'axe Seine prélevés les 26/10/16, 16/11/16, 13/12/16 et 27/06/16.

La distribution des rapports d'intensités des bandes de fluorescence dans le temps (Figure 8-A, B et C) montrent une variabilité spatiale et temporelle des caractéristiques de la MOD. C'est le cas notamment pour Marnay sur Seine avec une signature terrigène nettement plus marquée en novembre 2016. Cette signature d'un matériel organique plus mature / dégradé est également mise en évidence par la distribution des indices de fluorescence HIX (Figure 8D), BIX (Figure 8E) et FI (Figure 8F). Ces indices montrent également une activité biologique plus prononcée pour les sites de Triel et Bougival traduisant une augmentation des apports anthropiques de MOD à l'aval de Paris. On note également une tendance à l'augmentation de la production de MOD en juin 2017.

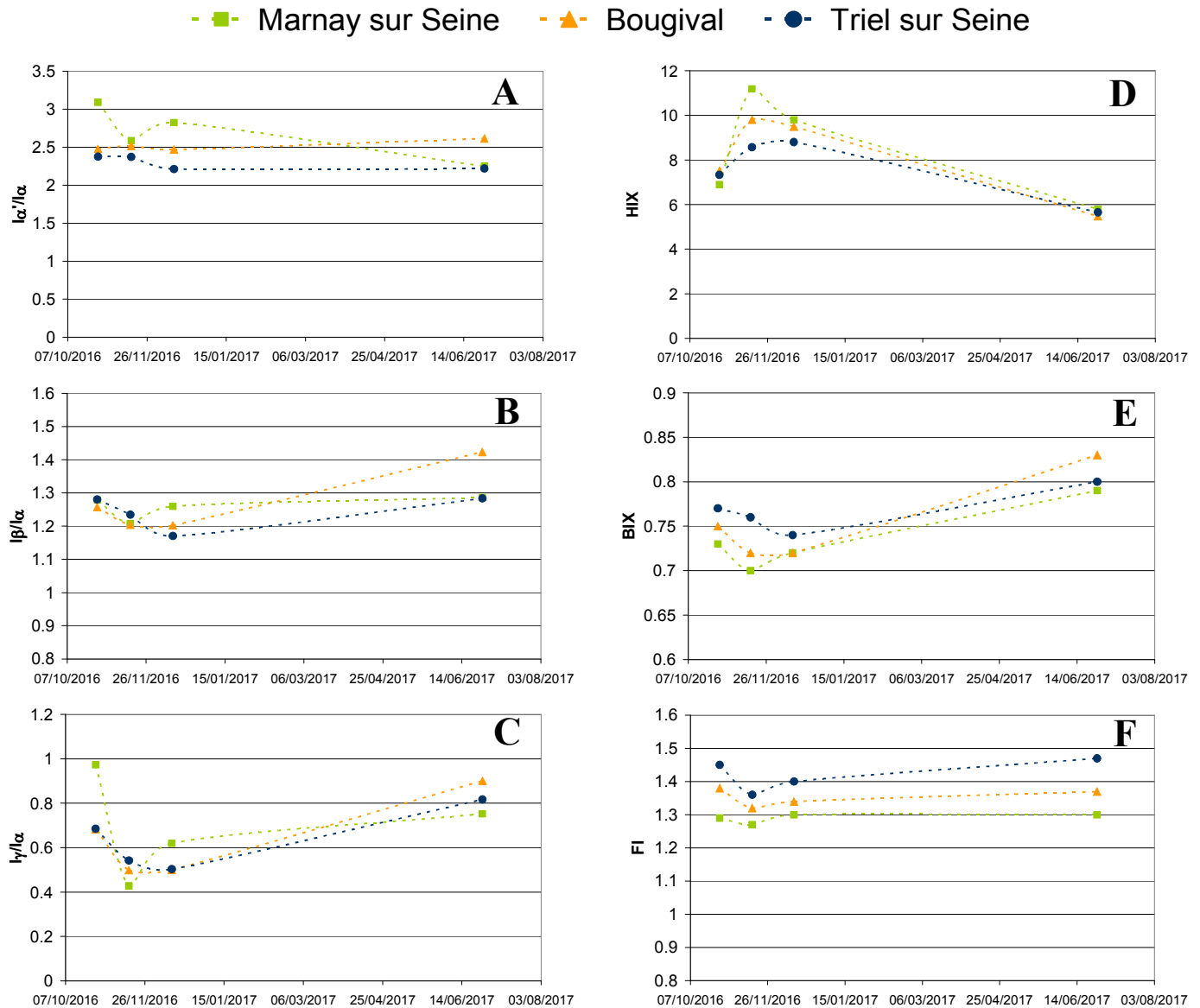


Figure 8. Rapport des intensités de fluorescence (matériel organique récent / matériel mature) (A) Ia'/Ia , (B) $I\beta/Ia$ et (C) $I\gamma/Ia$ et indices de fluorescence (D) HIX (humification), (E) BIX (production autochtone) et (F) FI (activité microbienne) pour les échantillons de l'axe Seine prélevés les 26/10/16, 16/11/16, 13/12/16 et 27/06/17.

2.1.3 Comparaison des sites ateliers

Les caractéristiques de la MOD fluorescente ont été comparées pour l'ensemble des échantillons d'eaux de surface du site de l'Orge (septembre 2016), de la Bassée (mars 2017) et de l'axe Seine (octobre, novembre, décembre 2016 et juin 2017). La Figure 9 présente les distributions de l'indice BIX en fonction de l'indice HIX pour les eaux de surface de l'ensemble de ces sites de prélèvement. Nous observons à nouveau des différences des caractéristiques de la MOD pour les 3 zones d'étude (Figure 9A) avec une signature plus terrigène pour les échantillons de la Bassée (prélèvement en période de crue en mars 2017) et de la Rémarde (septembre 2016) (Figure 9B). L'échantillon de la Renarde se singularise à nouveau par un matériel récent issu d'une activité biologique plus forte (Figure 9B). La valeur de HIX moyenne pour cet échantillon prélevé en zone agricole traduit probablement différentes sources de MOD.

Pour l'axe Seine nous observons une augmentation des caractéristiques terrigènes et/ou mature de la MOD de juin à novembre (Figure 9B), cette signature étant toutefois moins prononcée pour les échantillons de décembre 2016 et la plus marquée pour les échantillons de la Bassée de mars 2017 (crue).

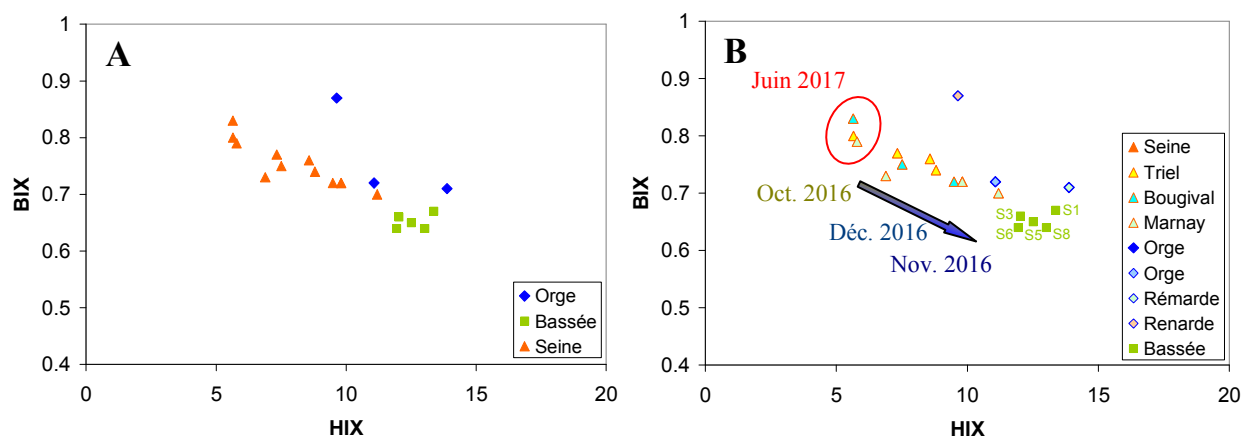


Figure 9. Distribution de l'indice de fluorescence BIX (production autochtone) en fonction de l'indice HIX (humification), (A) pour les 3 sites atelier et (B) pour les 3 sites atelier avec le détail des eaux de surface étudiées.

2.2 Analyse élémentaire et isotopique de la MOP

La Figure 10 présente l'évolution du rapport C/N de l'amont à l'aval de Paris.

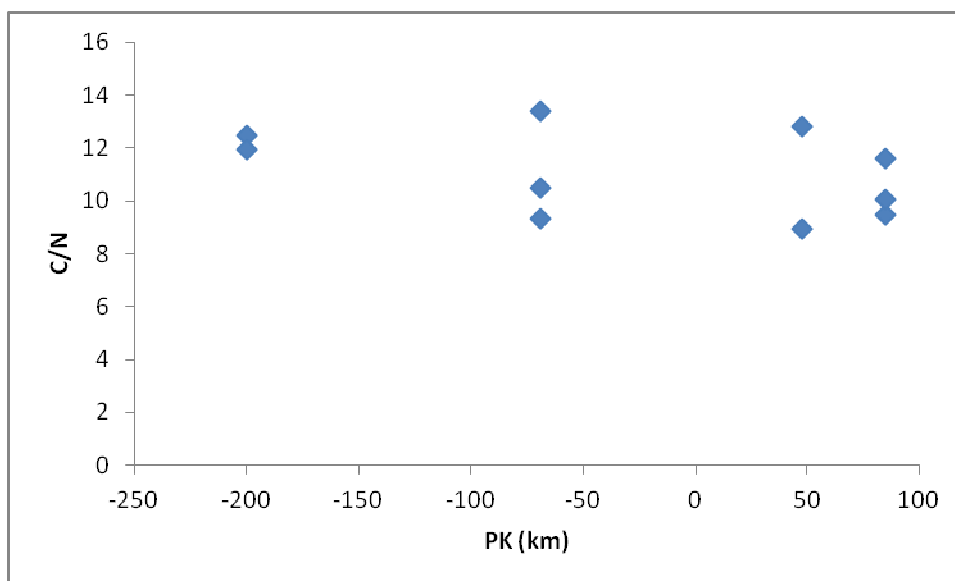


Figure 10. Rapport C/N en fonction du PK des sites étudiés :
Marnay sur Seine PK= -200 km ; Bassin versant de l'Orge PK= -69 km ; Bougival PK= 48 km ; Triel sur Seine PK= 85 km.

Une très légère tendance à la diminution du rapport C/N est observée de l'amont vers l'aval de Paris. Il est stable à Marnay sur Seine, mais varie beaucoup dans le bassin de l'Orge et en aval de Paris.

Dans le bassin de l'Orge, l'échantillon de la Renarde a un rapport C/N beaucoup plus élevé (13) que ceux de la Rémarde (10) et de Viry-Châtillon (9). Ceci traduit une MOP plus terrigène dans la Renarde que dans les autres rivières. Ce résultat est en bon accord avec ce qui a été observé pour la MOD.

Les variations du rapport $\delta^{13}\text{C}$ de la MOP (Figure 11) montrent une forte augmentation en aval de Paris. Cette augmentation traduit probablement des apports de MO anthropique potentiellement plus importants, le $\delta^{13}\text{C}$ de la MO anthropique étant en effet globalement plus élevé (-26 à -22 ‰) que celui de la MO terrigène (-30 à -24 ‰ ; Barros et al., 2010).

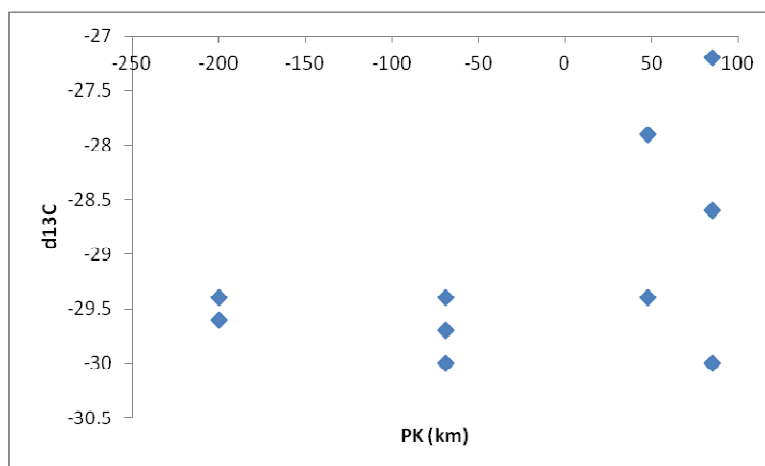


Figure 11. Variations du rapport isotopique $\delta^{13}\text{C}$ en fonction du PK des sites étudiés : Marnay sur Seine PK= -200 km ; Bassin versant de l'Orge PK= -69 km ; Bougival PK= 48 km ; Triel sur Seine PK= 85 km.

2.3 Analyse par RMN ^{13}C

Les analyses par RMN ^{13}C ont été réalisées pour l'ensemble des échantillons de MOP mais sont toujours en cours d'interprétation à ce jour.

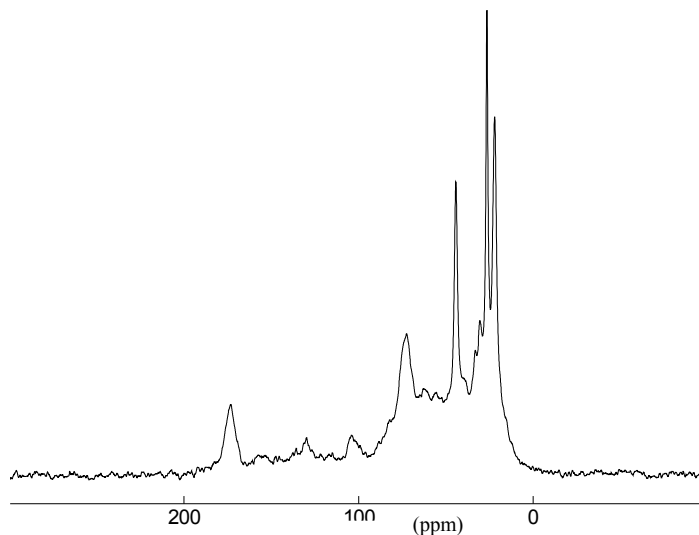


Figure 12. Spectre de RMN ^{13}C de l'échantillon de Marnay sur Seine prélevé en novembre 2016.

Deux spectres de RMN ont mis en évidence des bandes fines étranges qui pourraient correspondre à une pollution des sites d'échantillonnage comme pour l'échantillon de Marnay sur Seine (Figure 12). 6 types de carbone ont été identifiés dans les différents échantillons de la Seine (aliphatiques, O-CH₃, C-O, aromatiques, carboxyliques et phénoliques). La proportion de chaque famille de C dans ces échantillons sera prochainement comparée.

2.4 Analyse par py-GC-MS

Pour compléter les données moléculaires obtenues par RMN du ^{13}C , des analyses en pyrolyses couplée à la chromatographie gazeuse et à la spectrométrie de masse sont menées. Cette méthode permet d'obtenir la composition macromoléculaire de la MO des échantillons. L'ajout de TMAH dans l'échantillon va induire une méthylation des fonctions alcool, acides, amines, etc... Les familles de molécules identifiées sont décrites ci-dessous sans tenir compte de cette méthylation. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en estuaire de Seine dans le cadre du projet Seine-Aval MOSAIC.

Au total, 7 grandes familles de molécules ont pu être identifiées dans tous les échantillons. Les acides gras dominent l'ensemble des échantillons. De nombreux composés phénoliques, dérivés de la lignine, ont pu être identifiés. A l'inverse, très peu d'alcanes et d'alcènes ont été identifiés dans les pyrolyses avec TMAH, leur signal étant trop faible par rapport à celui des molécules polaires. De nombreux alkyl cyclohexanes ont par ailleurs été détectés dans deux échantillons, et pourraient provenir d'une pollution des sites d'échantillonnage.

Les acides gras

Parmi les acides gras, les homologues ramifiés les plus abondants sont ceux à 15 et 17 atomes de carbone. Ces acides gras sont utilisés pour décrire la présence des bactéries dans les sédiments (Harwood et Russell, 1984). La variation de la proportion de ces acides gras ramifiés par rapport à l'ensemble des acides gras le long de la Seine dans la phase particulaire (Figure 13) permet de mettre en évidence plusieurs tendances :

- Diminution globale de la proportion des acides gras ramifiés en C15 et C17 de l'amont vers l'aval (13% à Marnay sur Seine contre 1,3% dans la baie de Seine)
- Dans la zone du bouchon vaseux de l'estuaire (zone la plus turbide), la proportion d'acide gras ramifiés est très élevée en comparaison du reste de l'estuaire (jusqu'à 15,3%)
- Forte variabilité dans le bassin de l'Orge, à confirmer après les futurs prélèvements dans l'Orge, dans la Rémarde et dans la Renarde.

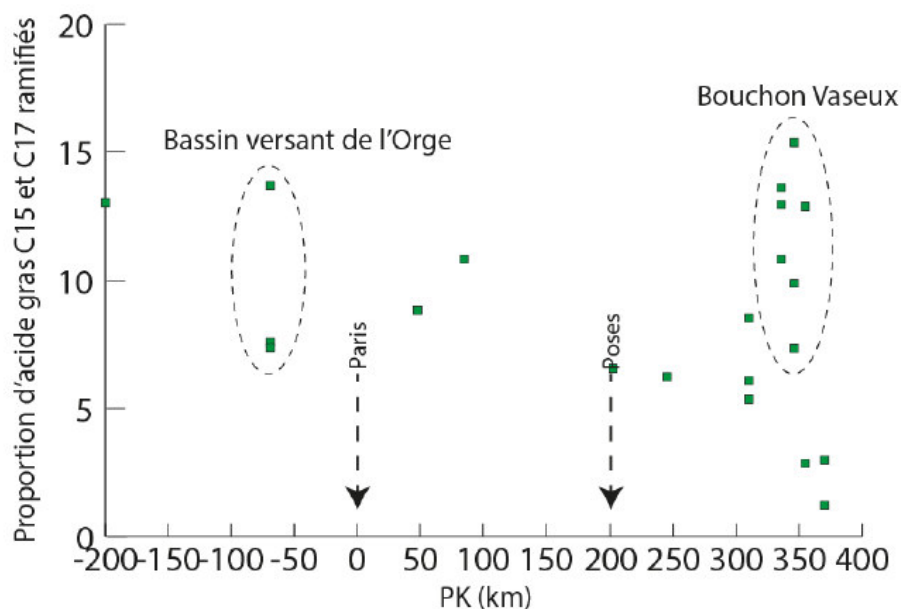


Figure 13. Variation de la proportion d'acide gras ramifiés le long de la Seine dans la phase particulaire

Les indoles

Les indoles sont des molécules azotées qui peuvent être associées à la pyrolyse d'unité tryptophane des protéines (Gallois et al., 2007). 3 molécules principales sont présentes, sous forme méthylée, dans la phase particulaire de la Seine :

- L'indole (intégré en utilisant le rapport m/z 130)
- Le méthyl-Indole (quantifié en utilisant le rapport m/z 145)
- Le diméthyl-Indole (quantifié en utilisant le rapport m/z 158)

L'aire des 3 indoles a été normalisée à celle de l'acide gras C₁₆ pour pouvoir suivre leurs concentrations (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Cet acide gras est en effet ubiquiste et très abondant dans la nature, également dans tous les échantillons de la Seine.

La tendance globale ressemble (Figure 14) beaucoup à celle obtenue à partir de la proportion d'acides gras ramifiés en C₁₅ et C₁₇ (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), avec une faible variabilité de la proportion d'indoles par rapport à l'acide gras C₁₆ dans la partie fluviale de la Seine puis une diminution le long de l'estuaire. Cependant, ce rapport est bien plus important dans le bouchon vaseux de l'estuaire. Les indoles, d'origine protéique, pourraient donc résulter de la forte activité bactérienne associée aux MES, comme les acides gras ramifiés.

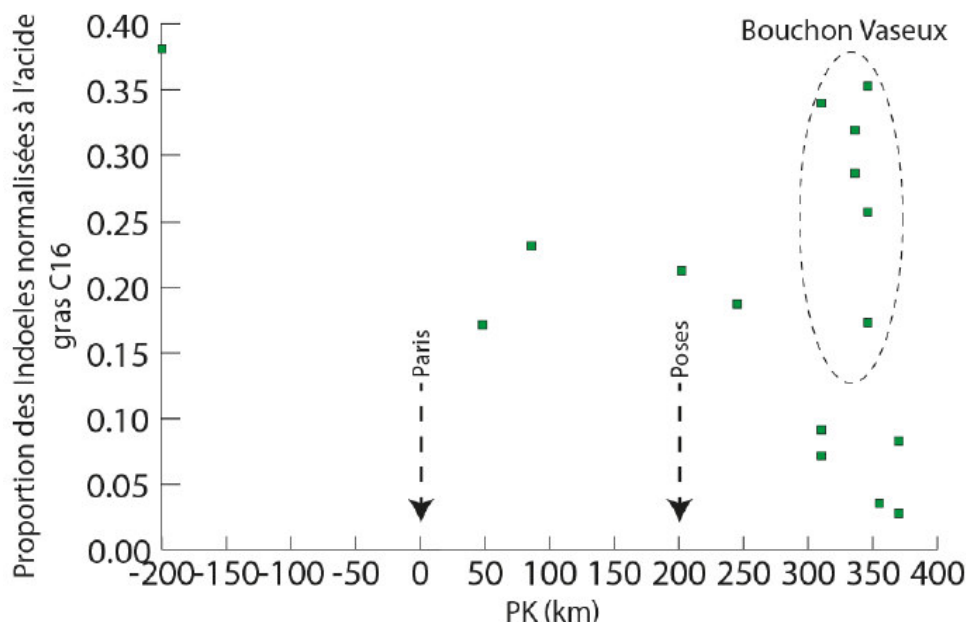


Figure 14. Variation de la proportion d'indoles le long de la Seine dans la phase particulaire.

Composés phénoliques

La lignocellulose compose une grande partie de la biomasse des plantes et est composée d'un assemblage de cellulose, d'hémicellulose et de lignine (Bugg et al., 2011). Parmi ces 3 biopolymères, la lignine est la plus résistante à la dégradation en raison de ses liaisons éther et C-C (Bugg et al., 2011) et est pour cette raison souvent utilisée pour tracer les sources continentales de la MO. De plus, la lignine est présente dans tous les environnements (sols, sédiment continentaux et zone côtières, océan) qu'ils soient récents ou anciens et sous toutes les formes (phases dissoutes, particulaire et sédimentaire ; Hedges et al., 1988).

La lignine est constituée de 3 monomères : les unités p-hydroxyphényl (P), guaiacyl (G) et syringyl (S). Elles sont composées d'un cycle benzénique, de groupement hydroxy et méthoxy ainsi que d'une chaîne latérale. L'analyse des composés de la lignine par pyrolyse avec TMAH permet de mieux détecter les dérivés de la lignine (Kaal et al., 2017), mais entraîne aussi une méthylation des groupements hydroxy, les transformant en groupement méthoxy (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les dérivés méthylés de la lignine

pouvant être confondus avec d'autres produits de pyrolyse, des analyses sans TMAH sont en cours. Les résultats des pyrolyses avec et sans TMAH seront comparés.

Les chaînes latérales des unités de la lignine sont variables et peuvent être de type aliphatique (CH_3 , CH_2), alcool (OH), aldéhyde ($=\text{O}$) ou bien acide (COOH). De plus, la longueur de la chaîne peut elle aussi varier, étant comprise entre 0 et 3 atomes de carbone. La nature de ces chaînes peut refléter l'état de dégradation de la lignine.

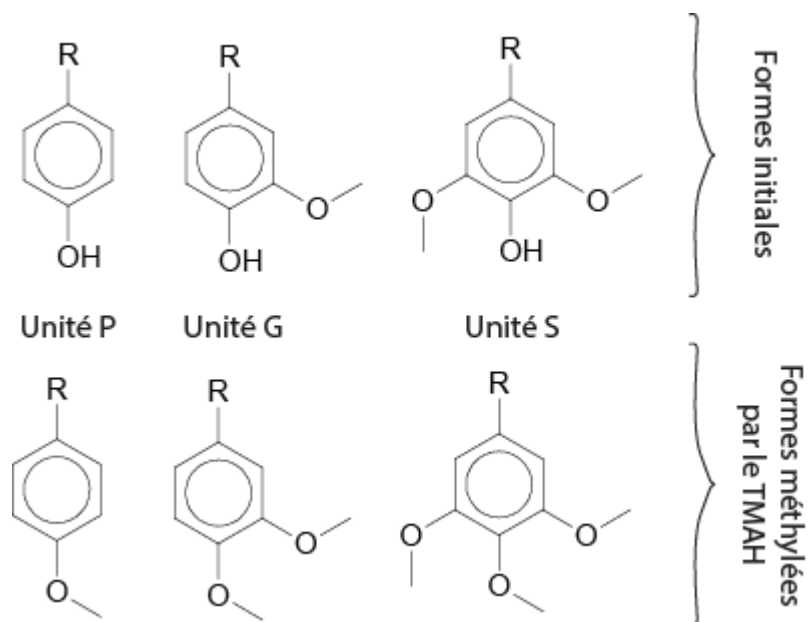


Figure 15. Unités structurales de la lignine.

Dans un premier temps, les rapports acides sur aldéhydes (Ad/Al) des unités G et P ont été calculés. Lors de la dégradation de la lignine, les aldéhydes sont oxydés en acide, conduisant à une augmentation du rapport Ad/Al (Hedges et al., 1988).

Dans la partie fluviale de la Seine, le rapport Ad/Al des unités G est plutôt constant, alors que le rapport Ad/Al des unités S diminue vers l'aval. Les unités S semblent donc moins dégradées en allant vers l'estuaire de Seine. Ceci pourrait s'expliquer par une nouvelle source moins dégradée de lignine alors qu'en amont, la lignine pourrait venir des sols où elle est dégradée par les champignons blancs, principal agent de dégradation de la lignine (Figure 16).

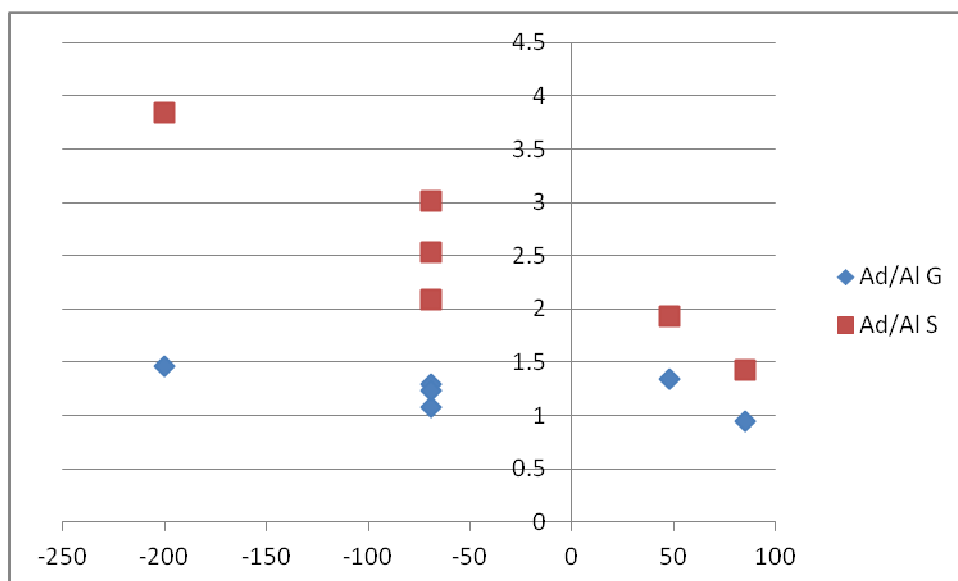


Figure 16. Variation du rapport Ad/Al des unités S et G de la lignine dans la partie fluviale de la Seine.

fluviale de la Seine.

La variation de la longueur de chaîne latérale le long de la Seine est différente pour chaque unité de la lignine (Figure 17). En effet, pour les unités P, la longueur de chaîne a tendance à augmenter jusqu'au bouchon vaseux de l'estuaire de Seine, avant de diminuer à l'embouchure. Pour les unités G, la longueur moyenne des chaînes est plutôt stable jusqu'au bouchon vaseux de l'estuaire, avant de diminuer fortement dans la partie marine. Enfin, pour les unités S, la longueur de chaîne augmente jusqu'à l'estuaire, puis diminue fortement comme pour les unités P et G.

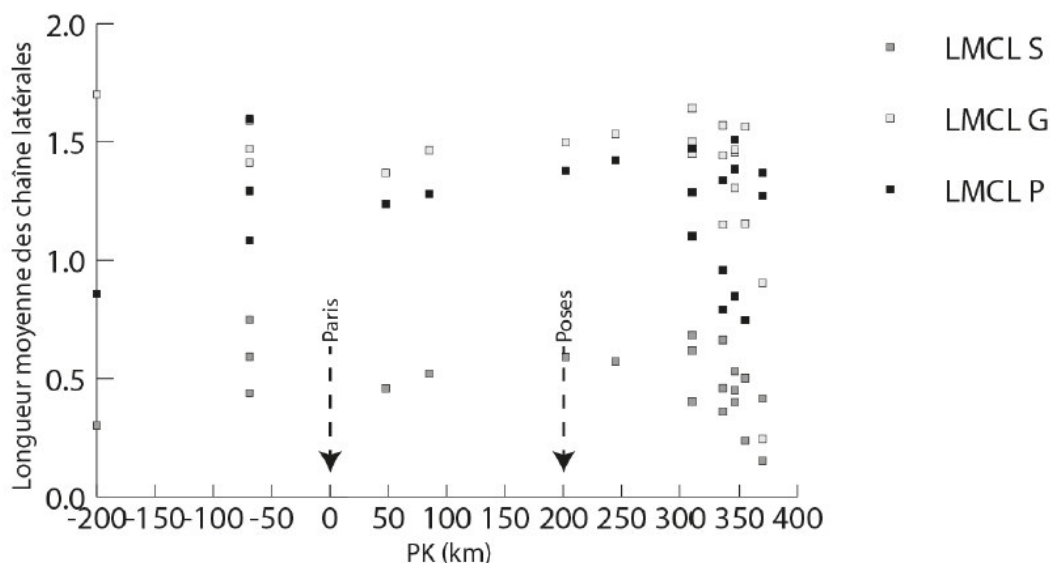


Figure 17. Variation de la longueur de chaîne moyenne des trois unités de la lignine dans la phase particulière le long de la Seine.

Au final, toutes les unités structurales de la lignine se dégradent le long du bassin de la Seine. Toutefois, le long de la partie fluviale, la longueur moyenne des chaînes P et S augmente, suggérant une meilleure préservation de la lignine vers l'aval. Cela peut également témoigner d'une nouvelle source de lignine, dont les chaînes latérales sont plus longues.

3 Conclusion

Ces travaux ont porté sur une approche combinée de caractérisation globale et moléculaire de la MO, à la fois dissoute/colloïdale et particulière, sur le Bassin de la Seine. Les analyses étant encore en cours d'acquisition d'analyse ou d'interprétation, seuls les premiers résultats ont été présentés dans ce rapport.

Ces derniers ont néanmoins déjà permis de mettre en évidence une grande variabilité spatiale et temporelle des caractéristiques de la MOD et de la MOP dans les sites ateliers de la Vallée de Seine, de l'Orge et de la Bassée et jusqu'à l'estuaire de Seine pour la MOP. Cette variabilité traduit la grande hétérogénéité des constituants de la MO, de ses sources, naturelles et anthropiques, et des processus de transformation dans les eaux de surface.

Le nombre d'échantillons analysés n'est, pour l'instant, pas encore suffisant pour pouvoir croiser les résultats des analyses globales et structurales à la recherche d'indicateurs des sources et de la dynamique de la MO dans le Bassin de la Seine. La poursuite des analyses en cours et les prochaines campagnes de prélèvement prévues fin 2017 et en 2018 permettront d'enrichir le jeu de données actuel.

Bibliographie

- Baldock J.A., Masiello C.A., Gélinais Y., Hedges J.I., 2004. Cycling and composition of organic matter in terrestrial and marine ecosystems. *Marine Chemistry* 92, 39-64.
- Akkanen J. and Kukkonen J.V.K., 2003. Biotransformation and bioconcentration of pyrene in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem.* 22, 518-524.
- Barros, G.V., Martinelli, L.A., Oliveira Novais, T.M., Ometto, J.P., Zuppi, G.M., 2010. Stable isotopes of bulk organic matter to trace carbon and nitrogen dynamics in an estuarine ecosystem in Babitonga Bay (Santa Catarina, Brazil). *Sci. Total Environ.* 408, 2226-2232.
- Benner, R., Amon, R.M.W., 2015. The size-reactivity continuum of major bioelements in the ocean. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 7, 185-205.
- Benner, R., Biddanda, B., 1998. Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter: Effects on bacterial growth. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1373-1378.
- Bugg T. D. H., Ahmad M., Hardiman E. M. and Rahmanpour R., 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1883-1896.
- Carstea, E.M., Baker, A., Bieroza, M., Reynolds, D., 2010. Continuous fluorescence excitation-emission matrix monitoring of river organic matter. *Water Res.* 44, 5356-5366.
- Chen, H., Meng, W., Zheng, B., Wang, C., An, L., 2013. Optical signatures of dissolved organic matter in the watershed of a globally large river (Yangtze River, China). *Limnol. - Ecol. Manag. Int. Waters* 43, 482-491.
- Christy, A., Bruchet, A., Rybacki, D., 1999. Characterization of natural organic matter by pyrolysis/GC-MS. *Environ. Int.* 25, 181-189.
- Coble, P.G., Green, S.A., Blough, N.V., Gagosian, R.B., 1990. Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature* 348, 432-435.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51, 325-346.
- Cory R.M., Miller M.P., McKnight D.M., Guerard J.J., Miller P.L., 2010. Effect of instrument-specific response on the analysis of fulvic acid fluorescence spectra. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 8, 67-78.
- Fellman, J.B., Hood, E., Spencer, R.G.M., 2010. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnol. Oceanogr.* 55, 2452-2462.
- Gallois N., Templier J. and Derenne S., 2007. Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of the 20 protein amino acids in the presence of TMAH. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 80, 216-230.
- Gjessing ET, Steiro C, Becher G, Christy A., 2007. Reduced analytical availability of polychlorinated biphenyls (PCB's) in colored surface water. *Chemosphere* 66, 644-649.
- Guo, W., Yang, L., Hong, H., Stedmon, C.A., Wang, F., Xu, J., Xie, Y., 2011. Assessing the dynamics of chromophoric dissolved organic matter in a subtropical estuary using parallel factor analysis. *Mar. Chem.* 124, 125-133.
- Harwood J. L. and Russell N. J., 1984. *Lipids in Plants and Microbes.*, G. Allen & Unwin.
- Hedges J. I., Blanchette R. A., Weliky K. and Devol A. H., 1988. Effects of fungal degradation on the CuO oxidation products of lignin: A controlled laboratory study. *Geochim. Cosmochim. Acta* 52, 2717-2726.
- Hedges J.I., Keil R.G., Benner R., 1997. What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic Geochemistry* 27, 195-212.
- Helms, J.R., Stubbins, A., Ritchie, J.D., Minor, E.C., Kieber, D.J., Mopper, K., 2008. Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 53, 955-969.
- Hirose K., 2007. Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Applied Geochemistry* 22: 1636-1645.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.-M.J.M., Parlanti, E., 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org. Geochem.* 40, 706.
- Jaffé, R., Boyer, J.N., Lu, X., Maie, N., Yang, C., Scully, N.M., Mock, S., 2004. Source characterization of

dissolved organic matter in a subtropical mangrove-dominated estuary by fluorescence analysis. *Mar. Chem.* 84, 195–210.

- Koprivnjak J.F., Perdue E.M., Pfromm P.H., 2006. Coupling reverse osmosis with electrodialysis to isolate natural organic matter from fresh waters. *Water Research* 40, 3385–3392.
- Koprivnjak J.F., Pfromm P.H., Ingall E., Vetter T.A., Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N., Frommberger M., Knicker H., Perdue, E.M., 2009. Chemical and spectroscopic characterization of marine dissolved organic matter isolated using coupled reverse osmosis-electrodialysis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 73, 4215–4231.
- Labanowski, J., 2004. Matière organique naturelle et anthropique : vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation. <http://epublications.unilim.fr/theses>.
- Leenheer, J.A., Croue, J.P., 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, 18A–26A.
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.* 46,
- Mao J., Kong X., Schmidt-Rohr K., Pignatello J.J., Perdue E.M., 2012. Advanced Solid-State NMR Characterization of Marine Dissolved Organic Matter Isolated Using the Coupled Reverse Osmosis/Electrodialysis Method. *Environ. Sci. Technol.*, 46, 5806–5814.
- Matilainen, A., Gjessing, E.T., Lahtinen, T., Hed, L., Bhatnagar, A., Sillanpää, M., 2011. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* 83, 1431–1442.
- Meyers P.A., 1994. Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chemical Geology* 114, 289–302.
- Middelburg J.J., Nieuwenhuize J., 1998. Carbon and nitrogen stable isotopes in suspended matter and sediments from the Schelde Estuary. *Marine Chemistry* 60, 217–225.
- Mostofa, K.M.G., Liu, C., Mottaleb, M.A., Wan, G., Ogawa, H., Vione, D., Yoshioka, T., Wu, F., 2013. Dissolved organic matter in natural waters, in: *Photobiogeochemistry of Organic Matter*. Springer, pp. 1–137.
- Mowat FS, Bundy KJ., 2001. Correlation of field-measured toxicity with chemical concentration and pollutant availability. *Environment International*, 27, 479–489.
- Osburn, C.L., Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Bianchi, T.S., Coffin, R.B., Paerl, H.W., 2016. Optical Proxies for Terrestrial Dissolved Organic Matter in Estuaries and Coastal Waters. *Front. Mar. Sci.* 2, 127.
- Parlanti, E., Worz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Org. Geochem.* 31, 1765–1781.
- Parot J., 2016. Développement méthodologique du fractionnement par couplage flux / force (AF4) et spectroscopie optique pour l'étude de la matière organique dissoute aquatique : Application aux estuaires de Seine et de Gironde. Thèse de l'Université de Bordeaux, 332 pages.
- Stedmon, C.A., Markager, S., Bro, R., 2003. Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.* 82, 239–254.
- Stedmon, C.A., Bro, R., 2008. Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnol. Ocean. Methods* 6, 572–579.
- Steinberg CEW, Kamara S, et al. (2006) Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology* 51 (2006), p. 1189–1210.
- Stubbins, A., Hood, E., Raymond, P. a., Aiken, G.R., Sleighter, R.L., Hernes, P.J., Butman, D., Hatcher, P.G., Striegl, R.G., Schuster, P., Abdulla, H. a. N., Vermilyea, A.W., Scott, D.T., Spencer, R.G.M., 2012. Anthropogenic aerosols as a source of ancient dissolved organic matter in glaciers. *Nat. Geosci.* 5, 198–201.
- Talbot M.R., Johannessen T., 1992. A high resolution paleoclimatic record for the last 27,500 years in tropical West Africa from the carbon and nitrogen isotopic composition of lacustrine organic matter. *Earth and Planetary Science Letters* 110, 23–37.
- Tzortziou M., Zeri C., Dimitriou E., Ding Y., Jaffé R., Anagnostou E., Pitta E., Mentzafou A., 2015. Colored dissolved organic matter dynamics and anthropogenic influences in a major transboundary river and its coastal wetland. *Limnol. Oceanogr.* 60, 1222–1240.
- Vacher, L., 2004. Etude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes

estuariens. Cas des estuaires de la Gironde et de la Seine. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 255 pages.

- Varrault, Nguyen, Bonnot, Soares-Pereira, Guo, Parot, Parlanti², Benedetti, Garnier, Derenne, Gelabert, Bressy, Boudahmane, Mercier, Martinez, Cordier, Cordier, Anquetil, Tharaud and Saad (2013). Caractérisation de la variabilité spatio-temporelle des qualités et des quantités de matière organique dans l'Oise, la Seine et la Marne. Rapport 25 p.
- Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B. a, Fram, M.S., Fujii, R., Mopper, K., 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4702–8.
- Wetzel, R. G., 1983. *Limnology*. New York, CBS College Publishing.
- Wetzel, R.G., Hatcher, P.G., Bianchi, T.S., 1995. Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1369–1380.
- Yamashita, Y. and Jaffé, R., 2008. Characterizing the Interactions between Trace Metals and Dissolved Organic Matter Using Excitation-Emission Matrix and Parallel Factor Analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 7374–7379.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38, 45–50.