HAL
archives-ouvertes.fr

Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine

Benoît Pernet-Coudrier

To cite this version:

Benoît Pernet-Coudrier. Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine. Sciences de la Terre. Université Paris-Est, 2008. Français. <NNT : 2008PEST0063>. <tel-00366692v2>

HAL Id: tel-00366692

https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-00366692v2

Submitted on 8 Mar 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-EST

Mémoire de thèse présenté pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS EST

Spécialité : Sciences de l'univers et de l'environnement

INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE SUR LA SPECIATION ET LA BIODISPONIBILITE DES METAUX : CAS DE LA SEINE, UN MILIEU SOUS FORTE PRESSION URBAINE

Par

Benoît PERNET-COUDRIER

Thèse soutenue le 4 décembre 2008 devant le jury composé de :

Mme Edith PARLANTI	Rapporteur
Mme Laura SIGG	Rapporteur
M. Jean-Marie GARNIER	Examinateur
M Josep GALCERAN	Examinateur
M. Ricardo RISO	Examinateur
M. Daniel THEVENOT	Examinateur
M. Jean-Marie MOUCHEL	Directeur de thèse
M. Gilles VARRAULT	Co-directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de recherche, initié en 2005, a été réalisé au Centre d'Enseignement et de Recherche sur l'Eau, la Ville et l'Environnement (CEREVE), laboratoire commun à l'Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, l'Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts (ENGREF) et l'Université Paris 12 - Val de Marne. Ce travail fait intégralement partie du projet BIOMET ANR jeunes chercheurs (BIOMET JC05_59809). Je tiens ici à remercier toutes les personnes qui ont participé, d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

J'adresse tout d'abord mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de thèse : Edith Parlanti et Laura Sigg, qui ont accepté sans hésitation d'être rapporteurs de ce travail, ainsi que Josep Galceran, Jean-Marie Garnier, Ricardo Riso et Daniel Thévenot qui ont bien voulu être les examinateurs.

Cette thèse a été réalisée sous la direction de Jean-Marie Mouchel. Je tiens aujourd'hui à lui témoigner ma gratitude. Il a su se rendre disponible pour répondre à la moindre de mes incertitudes et a enseigné, au « petit » chimiste de formation que je suis, le fonctionnement du bassin de la Seine.

Mes remerciements s'adressent également à Gilles Varrault, co-encadrant de ce travail. Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans sa confiance, la grande liberté et les moyens qu'il m'a généreusement accordés. Au-delà de tous les conseils scientifiques, techniques, diplomatiques, il s'est montré d'une aide précieuse.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Jean-Marie Mouchel et Daniel Thévenot respectivement ancien directeur et directeur scientifique du CEREVE ainsi que leurs dignes successeurs Bruno Tassin et Régis Moilleron, pour les nombreux conseils qu'ils m'ont prodigués, mais aussi pour avoir veillé tout au long de cette thèse aux bonnes conditions matérielles de son déroulement. Daniel, je vous souhaite une bonne continuation dans cette retraite heureuse !

L'ensemble de ce travail n'a pu être atteint que par de nombreuses et fructueuses collaborations, les équipements nécessaires pour mener une telle démarche ayant été nombreux, souvent onéreux et parfois très spécifiques. Je voudrais d'abord remercier l'ensemble de ces équipes au contact desquelles mes connaissances et compétences se sont enrichies (dans l'ordre alphabétique): le Département de chimie - Université de Lleida (Lleida - Espagne), le laboratoire de Chimie Analytique UMR-CNRS 6521, – Université de Bretagne Occidentale (Brest), l'ancien laboratoire de Chimie Analytique et Biophysicochimie de l'Environnement (CABE) - Université de Genève (Genève - Suisse), le Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'eau (LCME) - Université de Poitiers, École Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers (Poitiers), le Laboratoire de Géochimie des Eaux (LGE) – Université Denis Diderot Paris 7 (Paris), le Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement (LNHE) – Electricité de France (Chatou), l'Unité de recherche de BIOologie et d'Ecologie des Milieux COntinentaux (BIOEMCO) (Thiverval-Grignon), l'Unité de recherche des Hydrosystèmes et Bioprocédés du groupement d'ANtony (HBAN), Cemagref (Anthony).

Parmi ces collaborateurs, je tiens à remercier plus spécifiquement :

- Jaume Puy pour m'avoir accueilli chaleureusement durant près de trois mois au sein du Departament de Quimica de l'Universidad de Lleida, Josep Galceran et Encarna Companys pour leur disponibilité, leur patience, leur grande compréhension, et leurs nombreux conseils scientifiques et linguistiques ainsi que leur sens de l'organisation au laboratoire et du travail en équipe. Merci aussi à toute l'équipe de ce département et en particulier Albert, Cahlin, César, Carlos, Carmen, Diana, Francesca, Luciana, Maria Josep, Marilla, Montse, Pépé, Sandrine,

Sol Mayam, Sylvia, et tous les autres. Le travail à leurs côtés a été un réel plaisir ! Moltes gràcies a tots !

- Montserrat Filella pour sa collaboration, nos nombreuses discussions et son esprit critique, Vincent Chanudet et François Quentel pour leur spontanéité et leur aide dans l'analyse par redissolution cathodique des substances humiques,

- Jean-Philippe Croué et David Violleau pour leurs nombreux conseils sur l'extraction de la matière organique ainsi que leur précieuse aide pour l'analyse par chromatographie d'exclusion de taille,

- Marc Benedetti pour sa disponibilité et m'avoir initié à la modélisation malgré les conditions d'emménagement de son laboratoire,

- Marie-France Dignac pour m'avoir formé à l'analyse par pyrolyse-CG-SM et nos discussions matières organiques ainsi que Gérard Bardoux pour son aide technique en analyse isotopique mais aussi vis-à-vis d'un pyrolyseur parfois capricieux,

- Marie-Hélène Tusseau Vuillemin et Emmanuelle Kuhn Uher, spécialistes ès Daphnies, pour leur précieuse aide et leur compétence écotoxicologique,

- Daniel Ferreira, spécialiste ès bryophytes, pour son aide, ses compétences et connaissances. Je lui souhaite également bon courage dans cette dernière ligne droite,

Je tiens aussi à dire un grand merci à toutes les « Petites Mains » sans qui ce projet n'aurait pu aboutir, dans l'ordre chronologique : Ludiwine Clouzot, Mathieu Cladiere, Leslie Curie, Stéphanie Pouliquen, Benjamin Frasca, Nuria Ruiz Claverol, Margalida Morey et Audrey Pineau. A toutes et à tous, cher(e)s stagiaires je vous souhaite une bonne continuation.

Ces remerciements vont aussi à Catherine Lorgeoux et Mohamed Saad en particulier pour les analyses de COD, une des bases fondamentales de ce travail.

Je souhaite également remercier mes compagnons de route de ces trois dernières années, ceux qui rendent ce parcours (parfois truffé d'embûches) inoubliable. Je pense en particulier : « aux grands frères Cereviens, précédant locataires du bureau 452B » : Vincent Rocher et Sam Azimi, à Bogdan Muresan, pour nos nombreuses discussions et nos affinités métalliques, et à Johnny Gaspery qui a partagé dans la bonne humeur ce cher bureau 452B et m'a tendu le flambeau des doctorants. En cette année olympique, je tiens à le remettre au petit Antoine Van de Voorde qui j'espère en prendra grand soin, bon courage Tonio!

Je profite de ces lignes pour adresser mes plus profonds remerciements à Ronan Jézequel et Ricardo Riso, mes anciens directeurs de stage qui m'ont transmis leur passion pour la recherche. Merci aussi à toute l'équipe de chimie marine de Brest !

Je souhaite également dire merci et bon courage à mes amis, conscrits de thèse : Sarah Jung, Pauline Sainte, Ludovic Lesven, et Estérine Evrard (Désolé de soutenir avant vous les filles !).

Je voudrais également remercier Patricia Caenbergs pour mes nombreuses commandes et ses nombreux conseils administratifs ! Merci aussi à tous les Cereviens pour l'ambiance chaleureuse qui règne dans ce laboratoire, qui comme son l'indique encore, restera pour tous, Ce reve !

Enfin, je voudrais dédicacer ce travail à ma famille, et à Elodie.

A vous tous … MERCI !

Benoît

« Savoir comment ne pas faire quelque chose est l'accomplissement le plus haut; ne pas savoir comment faire quelque chose est une maladie... »

Lao Zi (≈ -600 av. JC)

INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE SUR LA SPECIATION ET LA BIODISPONIBILITE DES METAUX : CAS DE LA SEINE, UN MILIEU SOUS FORTE PRESSION URBAINE

RESUME

Ce doctorat s'intègre dans le projet ANR BIOMET (JC05_59809) et a eu pour vocation d'améliorer les connaissances actuelles sur l'influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux particulièrement dans le cas de système sous forte pression urbaine tel que la Seine. La compréhension de l'influence de la MOD sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux suppose en outre que l'on connaisse précisément sa composition chimique ou plus exactement ses groupements fonctionnels. C'est pourquoi une partie de ces travaux est consacrée à l'extraction et la caractérisation de la matière organique dissoutes d'origine naturelle et urbaine. La caractérisation des fractions de MOD a été réalisée de manière originale par une approche multidimensionnelle à l'aide d'un véritable éventail de techniques analytiques (analyses élémentaires; isotopiques; fonctionnelles et moléculaires) permettant ainsi de mieux aborder l'influence de la MOD sur la spéciation et la biodisponibilité du cuivre et du plomb. Parallèlement à l'étude de caractérisation de la MOD, ce travail s'attache à mieux cerner le rôle de la MOD d'origine urbaine en particulier de la MOD hydrophile sur la spéciation et la biodisponibilité du cuivre et du plomb. Dans cet objectif, les techniques : potentiométrique à l'aide d'électrode ionique spécifique et la récente technique électrochimique AGNES ainsi que des biotests de toxicité aiguë (*Daphnia magna*) et de bioaccumulation (*Fontinalis antipyretica*) ont permis :

- d'étudier la complexation du cuivre et du plomb par les fractions de MOD obtenues afin notamment de fournir des paramètres de complexations des MOD hydrophiles peu connues jusqu'à présent et ainsi mieux prédire le transport des métaux en milieu urbain.

- d'évaluer le rôle protecteur de la MOD d'origine urbaine sur la biodisponibilité du cuivre.

Les résultats ont montré que la MOD issue des effluents de station d'épuration et rejetée dans le milieu récepteur présente des caractéristiques originales à savoir un fort pourcentage de MOD hydrophile, c'est à dire une faible hydrophobicité et un degré d'aromaticité peu marqué soulignant le caractère peu réfractaire de cette MOD. En revanche une plus grande diversité fonctionnelle de la MOD d'origine urbaine par rapport à la MOD naturelle a été mise en évidence notamment par un taux de structures protéiques très important. Les résultats obtenus ici pour la première fois vis-à-vis des MOD hydrophiles d'origine urbaine ont montré une réactivité particulière vis-à-vis du cuivre. En effet les fractions HPI et plus généralement les fractions issues des effluents de station d'épuration ont montré une teneur en sites complexants plus élevée que ce qu'il avait été déjà observé pour des matières organiques naturelles. Les valeurs des constantes ne semblent pas varier d'une fraction à l'autre et assez peu suivant l'origine de la MOD. Le rôle particulier de l'azote dans la complexation du cuivre notamment sous la forme de groupements amines a été mis en évidence. Les approches utilisées pour évaluer la biodisponibilité du cuivre ont révélé pour l'ensemble des fractions de MOD un effet protecteur vis-à-vis du cuivre sur les organismes vivants. Néanmoins cet effet protecteur ne se trouve pas à la hauteur de celui pouvant être prédit par le modèle de l'ion libre principalement dû à une biodisponibilité de certains complexes organiques. Ceci peut être expliqué par l'important taux de structures protéiques dans ces MOD, les protéines étant connues pour jouer un rôle important dans les mécanismes de transports des métaux au sein des organismes. Par ailleurs, l'outil DGT (Diffusive gradient in thin films) a montré son efficacité pour évaluer la fraction biodisponible du cuivre.

MOTS CLES :

Biodisponibilité, caractérisation, Cu, *Daphnia magna*, *Fontinalis antipyretica*, hydrophobe/hydrophile, matière organique dissoute, métaux, Pb, spéciation, toxicité, urbain/naturel

ROLE OF DISSOLVED ORGANIC MATTER TO METAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY: THE CASE OF THE SEINE RIVER, ONE HUMAN-IMPACTED SYSTEM

ABSTRACT

This thesis was carried out on the framework of the ANR BIOMET research project (JC05_59809). The main objectives were to improve the current knowledge on the influence of dissolved organic matter (DOM) on metal speciation and bioavailability in urban aquatic system. The understanding of the influence of DOM on trace metal speciation and bioavailability required that the chemical composition of DOM, more exactly its binding sites should be well understood. Therefore, one part of this research focused on the isolation and characterization of DOM. The characterization of DOM, with a multidimensional approach was realized with a lot of various techniques (such as elemental, isotopic, functional and molecular) that were of prime importance to better understand the influence of DOM on trace metal speciation and bioavailability. To accomplish these objectives, the techniques such as potentiometry with ionic selective electrode and the recent electroanalytical technique AGNES and bioassays such as a bioaccumulation test (*Fontinalis antipyretica*) and an acute toxicity test (*Daphnia magna*) were performed in order to:

- study the copper and lead binding by isolated DOM fractions in order to give some binding parameters of hydrophilic DOM and to better predict the fate of the trace metal.

- evaluate the protective role of urban DOM on copper bioavailability.

Results showed some particular characteristics of DOM from wastewater effluent such as a high proportion of hydrophilic DOM, i.e. a low hydrophobicity and a low degree of aromaticity underlying the low refractory character of urban DOM. Nevertheless a higher content of various functional groups was determined in urban DOM than in natural DOM. A very high content of proteinaceous structures was particularly identified in urban DOM. Binding experiments revealed for the first time on urban hydrophilic DOM, a higher content of binding sites than in natural DOM and these sites are strongly correlated to amino groups. The values of binding constant seem to not vary according to the nature of the fraction or the origin. The different approaches used to evaluate copper bioavailability depicted a protective role of DOM to the organisms *Daphnia magna* and *Fontinalis antipyretica*. Nevertheless this protective effect is hardly explained by the free ion concentration due to a bioavailability of some organic complexes. This feature could be explain with the high content of proteinaceous structures in these DOM fractions, since proteins are well know to play an important role in the transport mechanisms of trace metals into the organisms. Moreover, the DGT device (diffusive gradient in thin films) shows a good efficiency to assess the bioavailable copper.

KEYWORDS:

Bioavailability, Cu, characterization, *Daphnia magna*, dissolved organic matter, *Fontinalis antipyretica*, hydrophobic/hydrophilic, metals, Pb, speciation toxicity, urban/natural

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE…….…….....1

CHAPITRE I CARACTERISATION DES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES D'ORIGINE URBAINE ET NATURELLE

I.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 11

I.1.1. Introduction 11
I.1.2. Origine de la matière organique dissoute 11
I.1.3. Concentration en matière organique dissoute 12
I.1.4. Composition de la matière organique dissoute 12
I.1.5. Etude des propriétés de la matière organique dissoute 13
I.1.5.1. Analyse globale de la matière organique dissoute 13
I.1.5.2. Extraction et fractionnement de la matière organique dissoute 14
I.1.5.2.1. Séparation selon la taille 14
I.1.5.2.2. Séparation selon la charge 15
I.1.5.2.3. Séparation selon l'hydrophobicité 15
I.1.5.3. Concentration de la MOD 16
I.1.6. Caractérisation chimique de la matière organique dissoute 17
I.1.6.1. Analyses élémentaires 17
I.1.6.1.1. Analyses élémentaires C, H, O, N, S 17
I.1.6.1.2. Analyses isotopiques 13C et 15N 17
I.1.6.2. Analyses moléculaires 18
I.1.6.2.1. Pyrolyse - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse 19
I.1.6.3. Analyses fonctionnelles 20
I.1.6.3.1. Spectroscopie UV-visible 20
I.1.6.3.2. Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourrier (IRTF) 20
I.1.6.3.3. Spectroscopie de fluorescence 21
I.1.6.3.4. Analyse des substances humiques dites réfractaires 23
I.1.6.3.5. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire 23
I.1.6.3.6. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance 24
I.1.6.3.7. Titration acido-basique 25
I.1.7. Conclusions bibliographiques 26

I.2. MATERIEL ET METHODES 27

I.2.1. Protocole d'extraction de la matière organique dissoute 27
I.2.1.1. Phase I : prétraitement de l'eau brute 27
I.2.1.2. Phase II : concentration des MOD par osmose inverse 28
I.2.1.3. Phase III : protocole d'extraction sur résines macroporeuses non ioniques 29
I.2.1.4. Phase IV : Purification et extraction des substances hydrophiles 31
I.2.1.5. Conclusion : nature des fractions obtenues 32
I.2.2. Les sites d'étude 32
I.2.3. Outils analytiques de caractérisation 37
I.2.3.1. Dosage du carbone organique dissous (COD) 37
I.2.3.2. Analyses élémentaires 37
I.2.3.3. Spectroscopie d'absorption UV-visible 37
I.2.3.4. Spectroscopie de fluorescence moléculaire 38
I.2.3.5. Spectroscopie InfraRouge (IR) à transformée de Fourrier (IRTF) 38
I.2.3.6. Dosage des fonctions acido-basiques 39
I.2.3.7. Dosage des substances humiques dites substances réfractaires 40
I.2.3.8. Détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote 41
I.2.3.9. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance 41
I.2.3.10. Pyrolyse - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse 41

I.3. RESULTATS 42

I.3.1. Extraction de la MOD 42
I.3.1.1. Concentration de la MOD par osmose inverse 42
I.3.1.2. Fractionnement et extraction de la MOD par adsorption sur les résines DAX-8 et XAD-4 44
I.3.1.2.1. Adsorption de la MOD sur les résines DAX-8 et XAD-4 44
I.3.1.2.2. Elution des MOD adsorbées sur les résines : bilan d'extraction 45
I.3.1.3. Extraction de la MOD hydrophile 45
I.3.1.4. Bilan global d'extraction de la MOD issue des sites d'étude 46
I.3.2. Caractérisation des fractions de MOD 47
I.3.2.1. Analyse élémentaire 47
I.3.2.2. Spectroscopie d'absorption UV-visible 49
I.3.2.3. Spectroscopie de fluorescence moléculaire 52
I.3.2.4. Spectroscopie InfraRouge (IR) à transformée de Fourrier (FTIR) 58
I.3.2.5. Dosage des fonctions acido-basiques 62
I.3.2.6. Dosage des substances humiques dites réfractaires 65
I.3.2.7. Détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote 67
I.3.2.8. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance 69
I.3.2.9. Pyrolyse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse 74

I.4. DISCUSSIONS 79

I.4.1. Concentration en COD et caractéristiques des eaux étudiées 79
I.4.2. Extraction de la MOD : une succession d'opérations 80
I.4.2.1. Osmose inverse : une approche efficace pour la concentration des MOD 80
I.4.2.2. Efficacité des résines DAX-8 et XAD-4 82
I.4.2.3. Extraction des MOD hydrophiles : recherche d'une approche quantitative 84
I.4.3. Comparaison des propriétés structurales des différentes classes de MOD extraites 84
I.4.4. Comparaison des propriétés structurales des différents échantillons 89

I.5. CONCLUSION 93

I.6. BIBLIOGRAPHIE 95

CHAPITRE II INFLUENCE DES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES SUR LA SPECIATION DES METAUX

II.1. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE 115

II.1.1. Métaux traces dans les écosystèmes aquatiques 115
II.1.1.1. Généralités 115
II.1.1.2. Sources des métaux traces 115
II.1.1.2.1. Sources naturelles 115
II.1.1.2.2. Sources anthropiques 116
II.1.1.3. Spéciation des métaux traces 117
II.1.2. Rôle de la MOD vis-à-vis des métaux traces 119
II.1.3. Analyse et modélisation des propriétés de complexation de la MOD 120
II.1.3.1. Analyse globale de la MOD 121
II.1.3.2. Fractionnement de la MOD et concentration 121
II.1.4. Analyse des interactions matières organiques – métaux traces 122
II.1.4.1. Techniques séparatives 122
II.1.4.1.1. DGT (Diffusive Gradient in Thin film) 122
II.1.4.1.2. Autres techniques séparatives 123
II.1.4.2. Techniques non séparatives 124
II.1.4.2.1. Spectroscopie de fluorescence 124
II.1.4.2.2. Techniques électrochimiques 124
II.1.5. Modélisation des propriétés de complexation de la MOD 133
II.1.5.1. Problématique 133
II.1.5.2. Représentation des propriétés de la MOD 135

II.1.5.3. Approche discrète 135
II.1.5.4. Approche continue 136
II.1.5.5. Modèle continu : modèle NICA-Donnan 138
II.1.5.5.1. Modèle NICA 138
II.1.5.5.2. Modèle Donnan 141
II.1.6. Conclusions bibliographiques 143

II.2. MATERIEL ET METHODES 145

II.2.1. Interactions matière organique – proton 145
II.2.2. Interactions matière organique – cuivre 145
II.2.3. Interactions matière organique – plomb 147

II.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS 153

II.3.1. Interactions matière organique – cuivre 153
II.3.1.1. Teneurs en sites complexants 156
II.3.1.2. Constantes de complexation vis-à-vis du cuivre 158
II.3.1.3. Pouvoir complexant des MOD extraites : affinité et capacité 160
II.3.1.4. Influence de la force ionique sur la complexation non spécifique 162
II.3.2. Interactions matière organique – plomb 163
II.3.2.1. Problème lié à la cinétique de complexation 163
II.3.2.2. Altération de la MOD 164
II.3.2.3. Teneur en sites complexants 165
II.3.2.4. Titrations par le plomb de la MOD 165

II.4. CONCLUSION 168

II.5. BIBLIOGRAPHIE 169

CHAPITRE III INFLUENCE DES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES SUR LA BIODISPONIBILITE DU CUIVRE

III.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 189

III.1.1. Cadre conceptuel 189
III.1.1.1. Modèle de l'ion libre 189
III.1.1.2. Modèle du ligand biotique 191
III.1.2. Echecs du FIAM et du BLM dans l'explication de la biodisponibilité des métaux 191
III.1.2.1. Interaction métal - organisme 192
III.1.2.2. Etablissement d'un état stationnaire 193
III.1.2.3. Modification de la surface biologique 193
III.1.3. Accumulation et effet toxique 194
III.1.4. Mesures de la biodisponibilité 195
III.1.5. Détermination de la biodisponibilité à l'aide de biotests 196
III.1.5.1. Daphnie : un organisme très utilisé pour les études de toxicité 196
III.1.5.2. Bryophyte : d'excellents bioaccumulateurs 197
III.1.6. Conclusions bibliographiques 198

III.2. MATERIEL ET METHODES 199

III.2.1. Biotests de toxicité 199
III.2.1.1. Préparation du matériel biologique 199
III.2.1.2. Protocole du biotest 199
III.2.2. Biotests de bioaccumulation 201
III.2.2.1. Préparation du matériel biologique 201
III.2.2.2. Protocole du biotest 201

III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS 204

III.3.1. Biotests de toxicité 204
III.3.2. Biotests de bioaccumulation 207
III.3.3. Evaluation du cuivre biodisponible en présence de MOD : 3 approches 209
III.3.3.1. Evaluation du cuivre biodisponible par l'étude de la spéciation 210
III.3.3.2. Evaluation du cuivre biodisponible par l'effet toxique induit chez Daphnia magna 210
III.3.3.3. Evaluation du cuivre biodisponible par la mesure de bioaccumulation 212
III.3.3.4. Rôle de l'ion libre dans la bioaccumulation et la toxicité du cuivre 214

III.4. CONCLUSION 217

III.5. BIBLIOGRAPHIE 218

CONCLUSION GENERALE……...225

ANNEXES……...……...…….……....231

LISTE DES ABBREVIATIONS

A1 : échantillon prélevé dans les effluents de la station d'épuration Seine-Aval le 06/04/06

A2 : échantillon prélevé dans les effluents de la station d'épuration Seine-Aval le 15/12/06

AAS : atomic Emission spectroscopy

AF : Acide Fulvique

AGNES : Absence of Gradient and Nernstian Equilibrium Stripping

AH : Acide Humique

AN : échantillon prélevé à Andrésy

BLM : Biotic Ligand Model

COD : Carbone Organique Dissous

DBO: Demande Biologique en Oxygène

DCE : Directive Cadre Européenne

DCO: Demande Chimique en Oxygène

DDP : Differential Pulse Polarography

DGT : Diffusive Gradient in Thin film

EC50 : concentration toxique immobilisant 50 % de la population

EC50lab : EC50 exprimée en cuivre labile par DGT

EC50tot : EC50 exprimée en cuivre total

EIQ : Ecart InterQuartile

FIAM : Free Ion Activity Model

GPES : General Purpose Electrochemical System

GSIM : Gill Surface Interaction Model

HAP : Hydrocarbures Aromatique Polycyclique

HPI : Hydrophile

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HPO : Hydrophobe

HPSEC : High Performance Size Exclusion Chromatography

ICP-AES : Inductive Coupled Plasma – Atomic Emission spectroscopy

ICP-MS : Inductive Coupled Plasma – Mass Spectrometry

IHSS : International Substances Society

IR : InfraRouge

IRTF : InfraRouge à Transformées de Fourier (IRTF)

ISE : Ionic Selective Electrode

LDQ : Limite De Quantification

M1 : échantillon prélevé à Méry sur Marne en hiver

M2 : échantillon prélevé à Méry sur Marne en été

MES : Matières En Suspension

MO : Matière Organique

MOD : Matière Organique Dissoute

MOP : Matière Organique Particulaire

MT : échantillon prélevé à Méricourt

NICA : Non Ideal Competitive Adsorption

OI : Osmose Inverse

PFA : PerFluorAlkoxyéthylène

PP : PolyPropylène

PTFE : PolyTetraFluoroEthylène

Pyrolyse-CG-SM: Pyrolyse associée à la Chromatographie en phase Gazeuse et à la Spectrométrie de masse

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAAEt : Spectrométrie d'Absorption Atomique ElectroThermique

SEC : Size Exclusion Chromatography

SH : Substances Humiques

SIAAP : Syndicat d'Assainissement de l'Agglomération Parisienne

SMDE : Static Mercury Drop Electrode

SNH : Substances Non Humiques

SRFA : Suwannee River Fulvic Acid

SRHA : Suwannee River Humic Acid

STEP : STation d'EPuration

SUVA : Specific Ultra-Violet Absorbance

TPI : Transphilique

UV : Ultra-Violet

INTRODUCTION GENERALE

La Directive Cadre Européenne (DCE) sur l'Eau du 23 octobre 2000 impose aux pays membres d'améliorer l'état écologique des cours d'eau. La première étape de ce travail a consisté à faire le bilan de l'état des eaux et à définir l'objectif de bon état écologique en termes de variables physiques, chimiques et biologiques. L'amélioration de l'état des cours d'eau fixée dans la Directive passe par l'élaboration de programmes de réduction des rejets, qui nécessitent de définir des normes de concentrations et/ou de flux de polluants rejetés adaptées à la sensibilité du milieu aquatique récepteur. Dans ce but, il est fondamental de connaître l'impact des rejets à court et long termes sur le milieu. Les efforts se sont beaucoup axés sur l'étude de la contamination de l'écosystème aquatique par la charge organique et les composés majeurs (phosphates, nitrates). Le devenir et l'impact de ces substances dans le milieu aquatique sont aujourd'hui relativement bien compris, et les efforts de limitation des apports au milieu par la réduction des sources et le traitement des effluents bien avancés. En revanche, la contamination des milieux par les micro-contaminants (ou micropolluants) reste moins bien appréhendée. Les micropolluants sont des molécules présentes à l'état de trace (de l'ordre du $\mu g.l^{-1}$ dans le milieu) mais qui sont susceptibles d'avoir une action toxique forte pour les organismes. On distingue deux types de micropolluants :

- les éléments métalliques, certains étant considérés comme essentiels à l'organisme en faibles doses et toxiques en plus grande quantité (Zn, Fe, Cu, etc.), et d'autres n'étant pas utilisés par les organismes (Pb, Hg, etc.) et sont considérés comme toxique à toute concentration.

- les micropolluants organiques. Cet ensemble est constitué de molécules très diverses et est en constante évolution, puisque l'on dénombre une nouvelle molécule organique toutes les 30 secondes. Ces molécules sont produites pour l'activité industrielle (hydrocarbures, solvants, teintures, PCBs, dioxines, etc.), agricole (pesticides), humaine (médicaments) et sont générées indirectement par ces activités (résidus de combustion, intermédiaires de synthèse), ou encore peuvent exister naturellement dans l'environnement.

Dans le cadre de la Directive Cadre Européenne sur l'eau, une liste de trente-trois substances prioritaires « présentant un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique » a été établie. Cette liste illustre la prise de conscience du danger pour l'écosystème et l'enjeu environnemental que représentent les micropolluants. Pour l'ensemble de ces molécules, des objectifs de réduction et d'élimination des rejets et des concentrations environnementales doivent être prises. Ce travail passe par l'acquisition de connaissances concernant leur devenir et leur potentiel toxique dans l'environnement. La toxicité aiguë des micropolluants est souvent connue depuis longtemps grâce à des essais de laboratoire normalisés et aujourd'hui rendus obligatoires pour la mise sur le marché de nouvelles substances. L'impact sur le milieu de ces produits dispersés dans l'écosystème est en revanche beaucoup plus difficile à appréhender. D'une part, les très faibles teneurs les rendent difficiles à détecter et ne conduisent pas à des effets toxiques aigus « spectaculaires » (au contraire d'une désoxygénation, d'une eutrophisation ou d'une pollution accidentelle par exemple). D'autre part, les organismes du milieu subissent une exposition prolongée à de faibles doses qui est susceptible d'engendrer des effets chroniques irrémédiables, difficilement observables rapidement, et surtout plus difficiles à relier aux concentrations en polluants dans le milieu. La biodisponibilité désigne « la fraction de produit chimique présent

dans le milieu environnemental qui est disponible pour être accumulée par les organismes. Dans le milieu récepteur, des mécanismes physiques, chimiques et biologiques interagissent et transforment les contaminants en des formes plus ou moins biodisponibles pour les organismes de l'écosystème. Les concentrations totales dans le milieu ne reflètent donc que partiellement le risque lié à un contaminant, la biodisponibilité étant très étroitement liée aux caractéristiques de l'environnement (Tessier et Turner, 1995). L'évaluation de l'impact d'un contaminant sur le milieu nécessite l'estimation des concentrations biodisponibles et des facteurs environnementaux qui les affectent. Parmi les différents paramètres physico-chimiques susceptibles d'influencer la biodisponibilité des métaux, la concentration et la nature de la matière organique dissoute sont sans aucun doute parmi les paramètres les plus importants.

Les milieux aquatiques, qu'ils soient urbanisées ou naturels, contiennent par ailleurs des matières organiques (MO) d'origines très variées. L'expression de Matière Organique (MO) est utilisée pour désigner l'ensemble des composés hydrocarbonés d'origine naturelle (autres que les organismes vivants) et anthropique d'un écosystème. La MO Dissoute (MOD) est opérationnellement distinguée de la MO Particulaire (MOP) par une filtration à 0,45 µm. La MOD dans les systèmes aquatiques est constituée d'un mélange extrêmement complexe de molécules dont la majorité ne sont pas structurellement identifiées à l'heure actuelle (Filella, 2008). En considérant la diversité des processus de synthèse et de dégradation, le nombre de constituants de la MOD peut être considéré comme excessivement grand voire infini. Il en résulte une telle variété de propriétés de la MO qu'il est impossible de les prédire (Filella, 2008). La MOD naturelle présente dans les systèmes aquatiques possède deux sources principales : l'une terrestre et l'autre aquatique. La MOD d'origine terrestre : pédogénique (ou allochtone) a pour principales origines les plantes supérieures et les microorganismes contribuant à leur dégradation (Kracht, 2001 ; Labanowski, 2004). Au contraire, la MOD naturelle d'origine aquatique : aquagénique (ou autochtone) résulte principalement de la dégradation et des excrétions microbiennes et phyto-planctoniques, la proportion apportée par les plantes aquatiques supérieures et les animaux aquatiques étant faible (Buffle, 1988 ; Kracht, 2001). La MOD d'origine anthropique observée dans les systèmes aquatiques provient principalement des eaux de ruissellements (lixiviats de décharges, ruissellement de chaussée, etc.) et des rejets urbains (domestiques et industriels) et agricoles, traités ou non traités (Labanowski, 2004 ; Meybeck *et al.*, 1998). L'impact direct de la MO sur la qualité du milieu et sur le développement des chaînes trophiques est aujourd'hui bien connu (désoxygénation, eutrophisation, etc.). Son impact indirect, comme facteur d'influence de la biodisponibilité des polluants est aussi fondamental mais reste beaucoup moins connu. En effet, la MOD a généralement une grande capacité d'interaction avec les micropolluants métalliques ou organiques (Buffle, 1988), ce qui peut modifier leur biodisponibilité (Campbell, 1995). La matière organique est donc un des facteurs du milieu déterminants pour la définition de la fraction biodisponible des contaminants.

Durant les trente dernières années, de nombreuses études ont montré le pouvoir complexant de la MOD vis-à-vis des métaux et en particulier du cuivre. La spéciation et donc la complexation des métaux traces dans les eaux de surfaces ont fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques (Batley, 1989. ; Batley *et al.*, 2004 ; Bernhard *et al.*, 1986 ; Brockaert *et al.*, 1990 ; Buffle, 1988 ; Florence, 1986 ; Florence et Batley, 1980 ; Landner, 1987 ; Leppard, 1983 ; Millward, 1995 ; Salbu et Steinnes, 1995 ; Tessier et Turner, 1995 ; Town et Filella, 2000 ; Ure et Davidson, 1995 ; Wong *et al.*, 1983) démontrant ainsi le nombre important d'études publiées dans ce domaine. Beaucoup d'entre elles ont trouvé des capacités et des constantes de complexation variant significativement pour le cuivre, le plomb, le zinc et le cadmium de 3 à 12 ordres de grandeurs pour les constantes de

complexation et jusqu'à 6 ordres pour la concentration en sites complexants. Cette grande dispersion peut être due à la variabilité expérimentale aux fenêtres analytiques employées (limites de détection, de quantification), aux choix des ratios métal-ligand, ainsi qu'aux conditions expérimentales (pH, force ionique, température) qui ne permettent de détecter qu'une partie des complexes formés ainsi qu'aux modèles utilisés pour déterminer ces paramètres (Town et Filella, 2000). Mais cette dispersion des données peut également être imputée à la nature et l'origine des matériaux isolés (Mantoura *et al.*, 1978). Pour autant, il est intéressant de noter que les données publiées concernent généralement les dites substances humiques (SH) composées de macromolécules polyélectroniques hétérogènes isolées des eaux naturelles par un procédé basé sur l'adsorption à pH acide sur des résines XAD-8. Les SH, fraction la plus hydrophobe de la MOD, dérivent principalement de la dégradation des plantes supérieures et représentent très souvent une part majoritaire du carbone organique dissous en milieu naturel. Cependant en milieu fortement anthropisé, la proportion de la fraction hydrophobe de la MOD décroit et n'est plus systématiquement majoritaire suite aux différents rejets urbains de MOD hydrophile ainsi qu'à la forte productivité primaire induite par ces rejets (Imai *et al.*, 2002). Des études menées sur ce type d'effluents, ont souligné une complexation particulière des métaux par les eaux urbaines comparées aux eaux naturelles (Buzier, 2005 ; Sarathy et Allen, 2005) notamment en raison de la présence de substances hydrophiles. Toutefois, du fait de la difficile extraction et purification de la fraction la plus hydrophile de la MOD, il n'existe, à notre connaissance, que très peu d'informations dans la littérature sur la fraction hydrophile de la MOD que ce soit en milieu naturel ou urbanisé et aucune ne traite de l'influence de cette MOD d'origine urbaine sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux.

L'objectif de ce travail est de contribuer d'une part à la compréhension de la composition de la MOD issue des rejets urbains de temps sec, c'est-à-dire principalement issue des rejets de stations d'épuration. D'autre part il s'agit d'évaluer l'influence de ces MOD d'origine urbaine (en particulier la fraction hydrophile) sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux dans les cours d'eau urbanisés. Pour cela la MOD a été prélevée dans le bassin de la Seine en amont et en aval de l'agglomération ainsi que dans les rejets de la plus grande station d'épuration parisienne traitant 75 % des eaux usées de l'agglomération. Pour chaque échantillon, la MOD a ensuite été extraite et fractionnée selon des critères de polarité croissante, permettant d'obtenir les fractions hydrophobe, transphilique et hydrophile. L'influence de chaque fraction sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux a été étudiée en combinant des approches chimiques et l'utilisation de biotests. Chaque fraction de MOD a également été caractérisée par diverses techniques analytiques afin de tenter d'expliquer les résultats obtenus concernant l'affinité de la MOD avec les métaux.

Les métaux étudiés dans le cadre de ce travail sont : le plomb pour son appartenance aux métaux non-essentiels (c'est-à-dire systématiquement toxiques) ainsi qu'à la liste des trente-trois substances prioritaires définie par la DCE ; et le cuivre, métal essentiel mais également toxique à fortes concentrations, à cause de l'étendue de son utilisation industrielle (refroidisseur par échangeur à plaques en laiton par exemple). De plus les interactions de ce métal avec la MOD (humique prélevée en milieu naturel) sont très étudiées, ce qui permettra de comparer aisément nos résultats à ceux de la littérature obtenus en présence de MOD de natures radicalement différentes. Notons que le cuivre et le plomb sont deux métaux présentant une très forte affinité avec la MOD.

Ce mémoire comporte trois chapitres distincts pouvant être lus de manière indépendante puisqu'ils sont tous trois composés d'une synthèse bibliographique, d'une partie matériel et méthode, et d'une partie résultats et discussions.

Le premier chapitre est consacré à l'extraction et la caractérisation physico-chimique de la MOD prélevée en amont et en aval de l'agglomération parisienne ainsi qu'en sortie de station d'épuration.

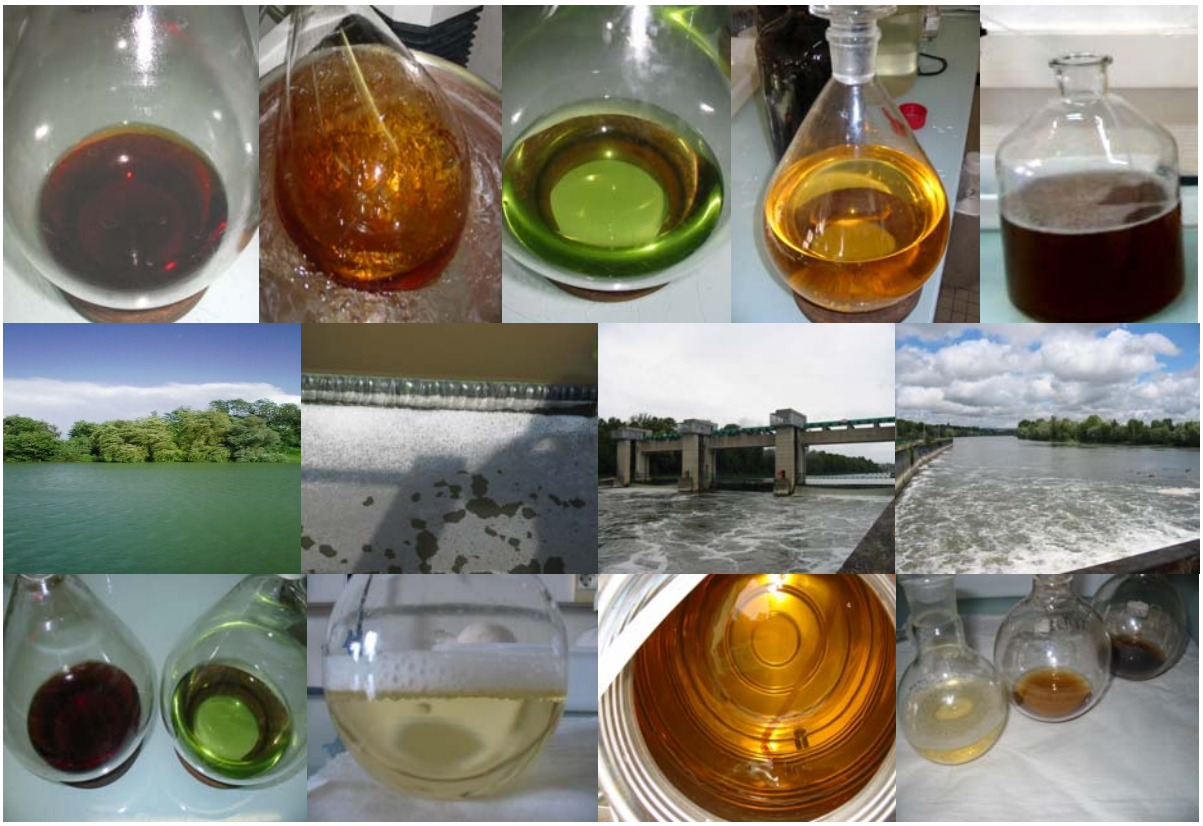
Le deuxième chapitre s'attache à l'étude de l'influence des différentes fractions de MOD précédemment obtenues sur la spéciation du cuivre et du plomb.

Enfin le dernier chapitre est relatif à l'influence de ces fractions de MOD sur la biodisponibilité du cuivre et en particulier sa bioaccumulation et sa toxicité.

L'ensemble de ces objectifs n'a pu être atteint que par la mise en œuvre de techniques analytiques diverses, étant donné la complexité du milieu étudié. Les équipements nécessaires pour mener une telle démarche sont nombreux, souvent onéreux et parfois très spécifiques. La collaboration avec d'autres équipes scientifiques (listées ci-dessous par ordre alphabétique) a donc été recherchée à ce niveau, afin de conduire au mieux cette approche :

- Département de chimie - Université de Lleida (Lleida - Espagne)
- Laboratoire de Chimie Analytique UMR-CNRS 6521 – Université de Bretagne Occidentale (Brest)
- Laboratoire de Chimie Analytique et Biophysicochimie de l'Environnement (CABE) Université de Genève (Genève - Suisse)
- Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau (LCME) - Université de Poitiers, École Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers (Poitiers)
- Laboratoire de Géochimie des Eaux (LGE) – Université Denis Diderot Paris 7 - (Paris)
- Laboratoire National d'Hydraulique et Environnement (LNHE) – Division Recherche et Développement - Electricité de France (Chatou)
- Unité de recherche de BIOlogie et d'Ecologie des Milieux COntinentaux (BIOEMCO) (Thiverval-Grignon)
- Unité de recherche des Hydrosystèmes et Bioprocédés du groupement d'ANtony

CHAPITRE I : CARACTERISATION DES MATIERES ORGANIQUES DISSOUTES D'ORIGINE URBAINE ET NATURELLE



« Le rôle de la vie est d'insérer de l'indétermination dans la matière »

Henri Bergson (1859 – 1941)

TABLE DES MATIERES

I.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 11

I.1.1. INTRODUCTION 11
I.1.2. ORIGINE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE 11
I.1.3. CONCENTRATION EN MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE 12
I.1.4. COMPOSITION DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE 12
I.1.5. ETUDE DES PROPRIETES DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE 13
I.1.5.1. Analyse globale de la matière organique dissoute 13
I.1.5.2. Extraction et fractionnement de la matière organique dissoute 14
I.1.5.2.1. Séparation selon la taille 14
I.1.5.2.2. Séparation selon la charge 15
I.1.5.2.3. Séparation selon l'hydrophobicité 15
I.1.5.3. Concentration de la MOD 16
I.1.6. CARACTERISATION CHIMIQUE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE 17
I.1.6.1. Analyses élémentaires 17
I.1.6.1.1. Analyses élémentaires C, H, O, N, S 17
I.1.6.1.2. Analyses isotopiques ^{13}C et ^{15}N 17
I.1.6.2. Analyses moléculaires 18
I.1.6.2.1. Pyrolyse - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse 19
I.1.6.3. Analyses fonctionnelles 20
I.1.6.3.1. Spectroscopie UV-visible 20
I.1.6.3.2. Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourrier (IRTF) 20
I.1.6.3.3. Spectroscopie de fluorescence 21
I.1.6.3.4. Analyse des substances humiques dites réfractaires 23
I.1.6.3.5. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire 23
I.1.6.3.6. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance 24
I.1.6.3.7. Titration acido-basique 25
I.1.7. CONCLUSIONS BIBLIOGRAPHIQUES 26

I.2. MATERIEL ET METHODES 27

I.2.1. PROTOCOLE D'EXTRACTION DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE 27
I.2.1.1. Phase I : prétraitement de l'eau brute 27
I.2.1.2. Phase II : concentration des MOD par osmose inverse 28
I.2.1.3. Phase III : protocole d'extraction sur résines macroporeuses non ioniques 29
I.2.1.4. Phase IV : Purification et extraction des substances hydrophiles 31
I.2.1.5. Conclusion : nature des fractions obtenues 32
I.2.2. LES SITES D'ETUDE 32
I.2.3. OUTILS ANALYTIQUES DE CARACTERISATION 37
I.2.3.1. Dosage du carbone organique dissous (COD) 37
I.2.3.2. Analyses élémentaires 37
I.2.3.3. Spectroscopie d'absorption UV-visible 37
I.2.3.4. Spectroscopie de fluorescence moléculaire 38
I.2.3.5. Spectroscopie InfraRouge (IR) à transformée de Fourrier (IRTF) 38
I.2.3.6. Dosage des fonctions acido-basiques 39
I.2.3.7. Dosage des substances humiques dites substances réfractaires 40
I.2.3.8. Détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote 41
I.2.3.9. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance 41
I.2.3.10. Pyrolyse - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse 41

I.3. RESULTATS 42

I.3.1. EXTRACTION DE LA MOD 42

I.3.1.1. Concentration de la MOD par osmose inverse 42

I.3.1.2. Fractionnement et extraction de la MOD par adsorption sur les résines DAX-8 et XAD-4 44

I.3.1.2.1. Adsorption de la MOD sur les résines DAX-8 et XAD-4 44

I.3.1.2.2. Elution des MOD adsorbées sur les résines : bilan d'extraction 45

I.3.1.3. Extraction de la MOD hydrophile 45

I.3.1.4. Bilan global d'extraction de la MOD issue des sites d'étude 46

I.3.2. CARACTERISATION DES FRACTIONS DE MOD 47

I.3.2.1. Analyse élémentaire 47

I.3.2.2. Spectroscopie d'absorption UV-visible 49

I.3.2.3. Spectroscopie de fluorescence moléculaire 52

I.3.2.4. Spectroscopie InfraRouge (IR) à transformée de Fourrier (FTIR) 58

I.3.2.5. Dosage des fonctions acido-basiques 62

I.3.2.6. Dosage des substances humiques dites réfractaires 65

I.3.2.7. Détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote 67

I.3.2.8. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance 69

I.3.2.9. Pyrolyse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse 74

I.4. DISCUSSIONS 79

I.4.1. CONCENTRATION EN COD ET CARACTERISTIQUES DES EAUX ETUDIEES 79

I.4.2. EXTRACTION DE LA MOD : UNE SUCCESSION D'OPERATIONS 80

I.4.2.1. Osmose inverse : une approche efficace pour la concentration des MOD 80

I.4.2.2. Efficacité des résines DAX-8 et XAD-4 82

I.4.2.3. Extraction des MOD hydrophiles : recherche d'une approche quantitative 84

I.4.3. COMPARAISON DES PROPRIETES STRUCTURALES DES DIFFERENTES CLASSES DE MOD EXTRAITES 84

I.4.4. COMPARAISON DES PROPRIETES STRUCTURALES DES DIFFERENTS ECHANTILLONS 89

I.5. CONCLUSION 93

I.6. BIBLIOGRAPHIE 95

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Type de molécules observées dans des fractions de MOD 13
Tableau 2: Nombres d'onde des bandes IR des structures présentes dans la MOD..... 21
Tableau 3: Composants fluorescents majeurs de la MOD 22
Tableau 4: Bandes structurales observées sur les spectres RMN ^{13}C de MOD 24
Tableau 5 : Caractéristiques des eaux étudiées..... 36
Tableau 6 : COD et volume des fractions obtenues après filtration sur membrane d'OI..... 42
Tableau 7 : Efficacité de l'osmose inverse pour l'extraction des MOD..... 43
Tableau 8 : Distribution du COD des eaux étudiées 44
Tableau 9 : Rendements d'extractions des fractions HPO et TPI et rendements globaux..... 45
Tableau 10 : Efficacité du protocole d'extraction des MOD HPI..... 46
Tableau 11 : Bilan global de l'extraction de la MOD des eaux étudiées..... 46
Tableau 12 : Analyse élémentaire des fractions de MOD précédemment isolées 48
Tableau 13 : Rapport molaires C/H, C/O, C/N et C/S des fractions précédemment isolées... 49
Tableau 14 : SUVA à 254 nm des fractions de MOD extraites..... 51
Tableau 15 : Groupements fonctionnels observés par infrarouge dans les fractions isolée... 61
Tableau 16 : Nombre de sites carboxyliques et phénoliques dans les fractions extraites..... 63
Tableau 17 : Paramètres d'affinité des sites faibles et forts pour le proton..... 65
Tableau 18 : Pourcentage de substances humiques dites réfractaires..... 67
Tableau 19 : Composition isotopique en ^{13}C et ^{15}N des fractions de MOD extraites..... 68
Tableau 20 : Masses moléculaires et coefficient de polydispersité des fractions de MOD..... 71
Tableau 21 : Résultats de l'intégration semi-quantitative des produits de pyrolyse..... 76
Tableau 22 : Pourcentage des aires des produits de pyrolyse regroupés en familles..... 78
Tableau 23 : Différences structurales et tendances entre les différents types de MOD..... 85

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général du protocole d'extraction des MOD 27
Figure 2 : Schéma du principe de la concentration membranaire 28
Figure 3: Chaîne de concentration de la MOD sur le terrain 29
Figure 4 : Protocole de fractionnement sur résines DAX-8 et XAD-4 30
Figure 5 : Protocole d'extraction de la MOD hydrophile 32
Figure 6 : Carte des sites d'échantillonnage 33
Figure 7 : Site de l'écluse de Méry sur Marne 33
Figure 8 : STEP Seine-Aval à Achères, décanteur secondaire 34
Figure 9 : Variations mensuelles de quelques paramètres globaux des effluents 34
Figure 10 : Site du barrage d'Andrésy (vue amont juin 2007) 35
Figure 11 : Site du barrage de Méricourt (vue amont juillet 2007) 35
Figure 12 : Absorbance spécifique UV-visible des fractions isolées de la STEP 50
Figure 13 : SUVA à 254 nm des fractions de MOD extraites tout échantillons confondus 52
Figure 14 : Spectres de fluorescence d'émission simple (λ_{ex}=280 nm) des fractions isolées .. 53
Figure 15 : Spectres de fluorescence synchrone des fractions HPIA1, HPOA1 et HPOM1 ... 54
Figure 16 : Spectres de fluorescence synchrone des fractions étudiées ($\Delta\lambda$ = 40 nm) 55
Figure 17 : Spectres de fluorescence trois dimensions des fractions de MOD 58
Figure 18 : Spectres d'absorbance infrarouge de quelques fractions de MOD 60
Figure 19 : Courbe de titration acido-basique de la fraction de référence HPOA1 62
Figure 20 : Nombre de sites « carboxyliques » et « phénoliques » selon le type de fraction .. 63
Figure 21 : Distribution des constantes et capacités de complexation vis-à-vis du proton 64
Figure 22 : Dosage des substances humiques dites réfractaires (Filella et al., 2008) 66
Figure 23 : Distribution des teneurs en substances réfractaires au sein des MOD isolées 67
Figure 24 : Chromatogrammes d'exclusion de taille des fractions de MOD issues de STEP 69
Figure 25 : Distribution (en %) des classes de différentes masses moléculaires 73
Figure 26 : Pyrogramme de la fraction HPOA1 issue des effluents de la STEP Seine-Aval .. 75
Figure 27 : Corrélation entre le COD et la conductivité des eaux étudiées 79
Figure 28 : Relation entre le taux de récupération du COD par OI et le taux de MOD HPI . 81
Figure 29 : Relation entre COD et absorbance UV lors de l'étape d'osmose inverse 82
Figure 30 : Pourcentage de COD retenu sur les résines DAX-8 et XAD-4 83
Figure 31 : Distribution du COD des eaux étudiées 83
Figure 32 : Corrélation entre le pourcentage d'azote et le nombre de sites acido-basiques .. 87
Figure 33 : Corrélation entre les ratios molaires C/N et C/H 88
Figure 34 : Corrélation entre le SUVA et le ratio molaire C/H 89
Figure 35 : Corrélation entre le SUVA et le pourcentage de substances humiques 89
Figure 36 : Corrélation entre le ratio molaire C/H et le pourcentage de MO réfractaires 89
Figure 37 : SUVA des MOD de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne 90
Figure 38 : Comportement de l'échantillon M1 via les paramètres SUVA, C/H et C/N 90
Figure 39 : ACP de l'origine des produits de pyrolyse issus des fractions de MOD 91
Figure 40 : Ratio N/S des fractions extraites et de 12 substances humiques 92

I.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1.1. Introduction

L'expression de Matière Organique (MO) est utilisée pour désigner l'ensemble des composés hydrocarbonés d'origine naturelle (autres que les organismes vivants) et anthropique d'un écosystème. La MO Dissoute (MOD) est communément distinguée de la MO Particulaire (MOP) par une filtration à 0,45 µm. La MOD dans les systèmes aquatiques est constituée d'un mélange extrêmement complexe de composés dont la majorité ne sont pas structurellement identifiés à l'heure actuelle (Filella, 2008 ; Kracht, 2001). En considérant la diversité des processus de synthèse et de dégradation, le nombre de constituants de la MOD peut être considéré comme excessivement grand. Il en résulte une telle variété de propriétés de la MO qu'il est impossible de les prédire (Filella, 2008). Suite à cette multitude de constituants, il semble également difficile voire impossible de correctement les séparer (Buffle, 1988). En conséquence, une majorité d'études de la MOD repose non pas sur une caractérisation exacte par des composés définis mais sur une caractérisation par des groupes de constituants de propriétés voisines. Une telle approche qu'on qualifiera de fonctionnelle permet d'accéder directement aux propriétés d'importance environnementale des matières organiques.

I.1.2. Origine de la matière organique dissoute

Les propriétés de la MOD sont étroitement liées à l'origine des molécules organiques la constituant et aux processus l'affectant (dégradations, agglomérations, etc.). Ainsi, une MOD d'origine anthropique présentera des propriétés relativement différentes de celles d'une MOD d'origine naturelle. De même une MOD naturelle d'origine terrestre sera différente d'une MOD naturelle d'origine aquatique. En effet, les sources de ces MOD sont nettement différentes.

La MOD naturelle présente dans les systèmes aquatiques possède deux sources principales : l'une terrestre et l'autre aquatique. La MOD d'origine terrestre : pédogénique (ou allochtone) a pour principales origines les plantes supérieures et les microorganismes contribuant à leur dégradation (Kracht, 2001 ; Labanowski, 2004). Au contraire, la MOD naturelle d'origine aquatique : aquagénique (ou autochtone) résulte principalement de la dégradation et des excrétions microbiennes et phyto-planctoniques, la proportion apportée par les plantes aquatiques supérieures et les animaux aquatiques étant faible (Buffle, 1988 ; Labanowski, 2004).

La MOD d'origine anthropique observée dans les systèmes aquatiques provient principalement des eaux de ruissellement (lixiviats de décharges, ruissellement de chaussée, etc.) et des rejets urbains (domestiques et industriels) et agricoles, traités ou non traités (Labanowski, 2004 ; Meybeck *et al.*, 1998).

Les origines de la MOD sont donc très variables d'un système aquatique à l'autre, par exemple, elles sont majoritairement d'origine pédogénique dans les fleuves Yangtse et Mississipi, la rivière Atchafalaya (USA) et dans l'estuaire Winyah Bay (USA) (Goni *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2007). Dans les océans Atlantique et Pacifique Nord, le détroit de Georgie (USA) ainsi que de nombreux lacs alpins, une forte contribution

aquagénique a été observée comme source de MOD (Hood *et al.*, 2005 ; Johannessen *et al.*, 2003 ; Kaiser et Benner, 2008). Cependant il a aussi été montré que, localement, les activités anthropiques (station d'épuration, industrie du papier) pouvaient fortement participer à l'apport de MOD (Hood *et al.*, 2005 ; Johannessen *et al.*, 2003), ainsi plus de la moitié de la MOD en Seine à l'aval de Paris provient des rejets de stations d'épuration (Meybeck *et al.*, 1998).

I.1.3. Concentration en matière organique dissoute

La quantification de la MO totale dans le milieu aquatique est réalisée généralement par la mesure de la concentration en carbone organique. Une estimation alternative des concentrations en MO est la mesure de la Demande Chimique en Oxygène (DCO) (norme NF T 90-101, Agence Française de Normalisation, 2001), qui correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder l'ensemble des composés oxydables (matières organiques et inorganiques et organismes vivants). La DCO peut fournir de bonnes corrélations avec la concentration en MO mais dépend des conditions physicochimiques du milieu. Cette estimation indirecte de la concentration en MO est largement utilisée par les industriels, traiteurs d'eau et gestionnaires du milieu aquatique.

Les concentrations en C_{org} dissous sont très variables d'un milieu à l'autre, elles varient par exemple entre 0,1 $mgC.L^{-1}$ dans les eaux souterraines les moins concentrées (Sun *et al.*, 1995) et plusieurs centaines de $mgC.L^{-1}$ dans les eaux usées brutes (Servais *et al.*, 1999), ou encore 50-100 $mgC.L^{-1}$ dans les tourbières (Hejzlar *et al.*, 1994). Dans les eaux de surface, le COD se situe généralement entre 1 et 10 $mgC.L^{-1}$, pouvant aller jusque 20 $mgC.L^{-1}$ dans les lacs forestiers (Peuravuori et Pihlaja, 1997a). De plus, la saison et les conditions hydrologiques du milieu peuvent affecter fortement les concentrations en COD (Aoki *et al.*, 2004 ; Biber *et al.*, 1996 ; Clair *et al.*, 1996 ; Gueguen *et al.*, 2006 ; Kaiser *et al.*, 2002 ; Minor *et al.*, 2006).

I.1.4. Composition de la matière organique dissoute

La composition de la MOD est donc a priori très hétérogène, du fait de la diversité de ses sources et des différents processus l'affectant (dégradations, coagulation, etc.). Cependant, on distingue systématiquement des composés identifiables en générale facilement dégradables (acides aminés, protéines, lipides, sucres, etc.) et des composés réfractaires difficilement identifiables (acides humiques, acides fulviques, humines, etc.) (Dignac, 1998 ; McDonald *et al.*, 2004). Les proportions en composés identifiables et réfractaires de ces fractions sont dépendantes du milieu étudié et du protocole d'extraction ou d'analyse utilisé.

Les substances humifiées (SH) sont des macromolécules complexes relativement réfractaires aux divers processus de dégradation (Buffle, 1988 ; Kracht, 2001). Elles ont été définies initialement par un protocole d'extraction de la MO pédogénique. Elles sont opérationnellement divisées en fonctions de leur solubilité à différents pH : les acides fulviques solubles quelque soit le pH, les acides humiques insolubles pour des pH inférieurs à 2 et les humines insolubles quelque soit le pH. Depuis plusieurs années les SH sont couramment isolées des eaux grâce aux résines macroporeuses non ioniques (XAD-8). Cette méthode est reconnue par l'IHSS (International Humic Substances Society) (description de la méthode § I.1.5.2.3).

Les principaux groupes fonctionnels présents sur les SH sont : acides carboxyliques, alcools, phénols, groupes aminés, quinones, carbonyles et méthoxyles. D'autres fonctions sont également présentes mais en des proportions plus faibles.

Les substances non humifiées (SNH) sont définies opérationnellement par l'ensemble des molécules non retenues sur les résines XAD-8. Elles sont composées de molécules de structures assez simples (Tableau 1) Elles peuvent être rapidement dégradées (Ishiwatari *et al.*, 1995) mais aussi entrer dans des réactions de polymérisation et de condensation pour se transformer en des macromolécules nettement plus complexes (les substances humiques) (Cheshire *et al.*, 1992 ; Stevenson, 1994). De par la difficulté pour les analyser et les extraire du milieu afin de mieux les caractériser, ces SNH sont peu étudiées (Labanowski, 2004 ; Violleau, 1999) (confère § I.2.5.2.3).

Tableau 1 : Type de molécules observées dans des fractions de MOD (Barber *et al.*, 2001 ; Imai *et al.*, 2001)

Fractions		Types de composés observés
Substances humifiées	Acides hydrophobes	acide fulviques (solubles à tout pH) acides humiques (précipitent à pH < 2)
Substances non humifiées	Neutres hydrophobes	hydrocarbures, détergents, pigments (dont chlorophylle
	Bases hydrophobes	Surfactant, protéines
	Acides hydrophiles	sucres, acides aminés
	Neutres hydrophiles	oligosaccharides, polysaccharides,
	Bases hydrophiles	Protéines, acides aminés

I.1.5. Etude des propriétés de la matière organique dissoute

De par sa composition, la MOD observée dans les systèmes aquatiques possède une structure chimique hautement hétérogène, donc un nombre important, voire infini, de groupements fonctionnels de propriétés différentes. Deux voies différentes peuvent être suivies pour étudier les propriétés de la MOD : l'analyse globale et l'analyse après fractionnements préalables selon des critères physico-chimiques.

Pour obtenir des informations qui ne soient pas limitées au seul cas d'étude, les paramètres utilisés pour décrire et caractériser la MOD doivent être, autant que faire se peut, indépendants des conditions chimiques du milieu d'origine de la MOD étudiée (Buffle, 1988).

I.1.5.1. Analyse globale de la matière organique dissoute

La première approche consiste en une étude globale de la MOD, non fractionnée, éventuellement isolée globalement du milieu d'origine, par exemple par ultrafiltration. La MOD ainsi analysée est ensuite subdivisée théoriquement en groupes fonctionnels de propriétés voisines (par exemple la complexation vis-à-vis du plomb) qui sont utilisées pour

représenter la MOD (Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Tipping, 1993). Ces groupes n'ont pas forcément une réalité chimique, i.e. ils ne correspondent pas forcément à une structure chimique ou à des groupements fonctionnels caractérisés (Sposito, 1981). Ils sont seulement caractérisés par un certain nombre de propriétés, par exemple une constante d'acidité ou un rendement quantique de fluorescence. Ce type d'étude a l'avantage de ne pas modifier la MOD. Cependant elle nécessite des techniques analytiques d'une part précises pour s'affranchir des perturbations provoquées par le milieu (par exemple la compétition des ions chlorures vis-à-vis de la complexation du Cu par les groupements fonctionnels de la MOD) et d'autres part sensibles pour travailler aux concentrations naturelles, surtout quand la MOD n'a pas été extraite et donc que la concentration en carbone organique dissous est faible.

I.1.5.2. Extraction et fractionnement de la matière organique dissoute

La deuxième voie repose sur l'extraction et un ou plusieurs fractionnements préalables de la MOD en groupes de composés chimiques de propriétés voisines, suivant des protocoles chimiques et/ou physiques. En effet, quel que soit le protocole choisi, l'extraction conduira systématiquement à un fractionnement de la MOD. Les groupes ainsi séparés sont donc constitués de composés chimiques "réels", possédant au moins une propriété en commun, par exemple la taille ou la charge. Le fractionnement de la MOD, constitue une première étape de sa caractérisation, étape qui peut être considérée comme une fin en soi. Pour appréhender son comportement dans un milieu donné, notamment vis-à-vis des métaux, chaque groupe peut ensuite être analysé pour caractériser les propriétés qui lui sont associées. Les analyses sont de plus facilitées par le fractionnement de la MOD isolée. En effet ces séparations d'une part limitent a priori les interactions générées par les autres espèces chimiques présentes (par exemple les ions majeurs) et d'autre part permettent de travailler à des concentrations plus élevées en matières organiques lorsqu'il est nécessaire. Le regroupement de l'ensemble des propriétés analysées pour chaque groupe conduit à une estimation des caractéristiques globales de la MON étudiée (Buffle, 1988). S'il est aisé de définir théoriquement différentes fractions de MOD il n'en est pas de même dans la pratique. Du fait de la haute complexité de la MOD, tout type de fractionnement (et d'analyses par la suite) ne pourra fournir qu'une description approximative de l'intégralité de la MOD. En effet le fractionnement, qui ne sépare la MOD que par des critères relatifs à la méthode employée, peut engendrer une disparition et/ou des transformations partielles de la MOD et ainsi produire divers artefacts (Shuman, 1990 ; Zsolnay, 2003). Ainsi même si des études précises de chaque fraction peuvent fournir une quantité importante et précise d'informations, celles-ci sont à considérer avec prudence. Il existe plusieurs techniques de fractionnement reposant sur différents critères physico-chimiques : la taille, la charge, l'hydrophobicité.

I.1.5.2.1. Séparation selon la taille

Les techniques les plus couramment utilisées pour la séparation par classes de taille sont l'ultrafiltration (UF) et la chromatographie par exclusion de taille (SEC : Size Exclusion Chromatography).

L'ultrafiltration permet d'obtenir une répartition discrète de la taille des molécules (Buffle *et al.*, 1992). Elle est utilisée pour extraire et caractériser la taille des particules de nombreux milieux aquatiques naturels : par exemple de lacs (Peuravuori et Pihlaja, 1997a), de rivières (Guo *et al.*, 2003) ou encore d'eaux interstitielles de sédiments (Burdige et Gardner, 1998). Elle est aussi applicable sur des eaux plus chargées, comme les eaux usées (Imai *et al.*, 2002 ; Vaillant *et al.*, 1999). Cependant, il a été montré que des phénomènes

d'agglomérations se produisaient lors d'ultrafiltration, conduisant à une surestimation des composés à haut poids moléculaires (Aiken et Malcolm, 1987 ; Peuravuori, 2005).

La chromatographie par exclusion de taille permet d'obtenir une répartition « continue » des molécules dans l'échantillon selon leur taille (exprimée en poids moléculaire rapporté à une molécule modèle). De cette répartition, il est possible d'extraire le poids moléculaire moyen en nombre de molécules (M_n), le poids moléculaire moyen en taille (M_w) et la « polydispersité » (M_w/M_n) qui fournit une idée de l'hétérogénéité de taille du pool de MO considéré (Chin *et al.*, 1994). Cette technique de séparation/caractérisation, est peu adaptée à la récupération des différentes fractions (en vue d'études ultérieures) et ne permet pas la séparation d'échantillons en quantités importantes (Her *et al.*, 2003).

I.1.5.2.2. Séparation selon la charge

La séparation des composés selon leur charge est obtenue grâce aux méthodes électrophorétiques. Ces techniques reposent sur la migration des composés électriquement chargés, en solution dans un gel ou un papier, suite à l'application d'un champ électrique entre deux électrodes. Les composés séparés sont généralement détectés photométriquement. Ces techniques sont relativement sensibles puisque des acides fulviques de même origine ont pu être différenciés (Dunkelog *et al.*, 1997). Cependant ces techniques de séparations/détections, comme la chromatographie par exclusion de taille, sont peu adaptées à la récupération des différentes fractions (en vue d'études ultérieures).

I.1.5.2.3. Séparation selon l'hydrophobicité

Le fractionnement selon des caractéristiques d'hydrophobicité est basé sur le passage de MOD sur des résines retenant de façon sélective certains composants organiques. Différents types de résines existent : XAD, DEAE et PVP. Elles sont détaillées ci-dessous.

De par leur reconnaissance par l'IHSS (International Humic Substances Society) comme méthode standard pour l'isolement et le fractionnement des SH (Janos, 2003), les résines XAD sont les plus utilisées parmi toutes les méthodes de fractionnement. Les résines XAD sont composées de substrat macroporeux non ionique (styrène – divinylbenzène ou polymères de méthacrylate de méthyle) avec différents types de groupements greffés. En effet plusieurs types de résines XAD existent telles que XAD-1, XAD-2, XAD-4, XAD-7, XAD-8. Cependant seule la résine XAD-8, grâce à des rendements d'extraction satisfaisants et une meilleure séparation des fractions, est fréquemment utilisée (Aiken *et al.*, 1979 ; Thurman et Malcolm, 1981). Récemment de nouvelles résines nommées DAX-8, composées de méthacrylate de polyméthyle, ont été développées. Possédant des propriétés de sorption et désorption hydrophile - hydrophobe plus précises (Labanowski, 2004 ; Peuravuori *et al.*, 2001 ; Peuravuori *et al.*, 2002b), ces résines DAX-8 remplacent désormais les résines XAD-8. Elles permettent ainsi une séparation plus fine des SH et SNH. De façon opérationnelle, la fraction hydrophobe retenue sur les résines DAX-8 est définie comme SH. Il existe différents protocoles variant en fonction de la nature et du nombre de colonnes utilisées ainsi que des types d'élution (Aiken et Leenheer, 1993 ; Imai *et al.*, 2001 ; Leenheer, 1981 ; Ma *et al.*, 2001 ; Namour et Muller, 1998 ; Peuravuori *et al.*, 2005). Le Tableau 1 issu des données de Barber *et al.* et Imai *et al.*(2001), indique les principaux types de composés observés dans les fractions de MO séparées selon leur protocole.

Le protocole envisagé ici consiste à séparer la MOD en trois fractions à l'aide de deux résines DAX-8 et XAD-4 (Aiken et Leenheer, 1993 ; Croué, 2004 ; Leenheer et Croué, 2003 ; Malcolm et MacCarthy, 1992 ; Violleau, 1999). La première fraction retenue sur la résine

DAX-8 concerne la partie la plus hydrophobe (HPO) de la MOD. La deuxième fraction, retenue sur la résine XAD-4 est dite transphilique (TPI) dont le caractère hydrophobe est moins marqué. La troisième fraction, non retenue sur les résines, est constituée de la partie hydrophile de la MOD. En raison de la matrice minérale restant dans l'eau, cette fraction est difficile à isoler et donc reste peu étudiée. Cependant une technique de distillation permet de l'isoler (Aiken et Leenheer, 1993 ; Croué, 2004 ; Leenheer *et al.*, 1987). Si l'acidification de l'échantillon lors de cette séparation a souvent été considérée comme un désavantage (Shuman, 1990), il a été montré que cette technique ne semble pas destructive et que les changements de structures engendrés sont faibles (Peuravuori *et al.*, 2005). En effet il a été montré que la masse moléculaire des molécules isolées sur les résines DAX-8 est très proche de celle observée dans l'eau brute (Peuravuori *et al.*, 2005). Il a également été montré que ces SH issues de l'extraction à l'aide des résines DAX-8 ne résultent pas accidentellement du processus d'isolation mais font bien partie de la matrice organique des eaux (Peuravuori *et al.*, 2005 ; Peuravuori et Pihlaja, 1998a, 1998b).

Les résines DEAE (cellulose de DiEthylAminoEthyle) présentent l'avantage par rapport aux résines XAD, de ne pas soumettre la MOD à des conditions de pH acides (Miles *et al.*, 1983 ; Peuravuori *et al.*, 1997). Cependant une élution complète de la MOD adsorbée semble difficile à obtenir (Peuravuori *et al.*, 2005).

Les résines PVP (PolyVinylPyrrolidone) donnent des résultats comparables aux résines XAD pour l'isolement des SH. En revanche une disparition des composés de grandes tailles (Peuravuori *et al.*, 2005), suite à des réarrangements lors du fractionnement, rend cette méthode inadéquate.

I.1.5.3. Concentration de la MOD

Les teneurs en MOD observées en général dans les eaux de surface et en particulier en Seine sont faibles : de l'ordre de quelques $mg.L^{-1}$ (Afcharian *et al.*, 1997 ; Meybeck *et al.*, 1998). La nécessité d'obtenir une quantité relativement importante de MOD pour les diverses caractérisations complique le prélèvement (plusieurs centaines de litres) ainsi que le fractionnement (allongement considérable du temps de fractionnement). Il est donc nécessaire de concentrer la MOD afin de faciliter les opérations précédentes. L'évaporation sous vide réduit et la lyophilisation permettent de concentrer la MOD mais sont peu adaptées au grand volume d'eau et la durée des opérations reste longue. En revanche les techniques membranaires offrent la possibilité de filtrer rapidement un large volume d'eau ce qui permet d'isoler une quantité importante de MOD en un temps très court. Grâce à de hauts rendements ($r \geq 95\%$) et la préservation des propriétés de la MOD, l'osmose inverse est la méthode de concentration la plus utilisée (De Schamphelaere *et al.*, 2005 ; Hu *et al.*, 2003 ; Kilduff *et al.*, 2004 ; Sun *et al.*, 1995). Cependant plusieurs inconvénients inhérents à la technologie membranaire se posent lors des procédures d'isolement des MOD. En effet il a été montré qu'une partie de la MOD était perdue dans le perméat d'osmose inverse et d'ultrafiltration, ces pertes étant comprises respectivement entre 2 et 9 % et 4 et 23 % (Croué *et al.*, 1999). Un colmatage à la surface des membranes a également été mis en évidence (Ødegaard et Koottatep, 1982). Cependant l'utilisation de membranes en polysulfone ou polyamide plutôt qu'en acétate de cellulose permet de limiter ce phénomène de colmatage (Clair *et al.*, 1991). Enfin ces techniques présentent l'inconvénient majeur de concentrer également les espèces inorganiques interférant lors des analyses de caractérisation et coprécipitant avec la MOD lors de la concentration. Néanmoins l'utilisation d'une résine échangeuse d'ion avant séparation membranaire, afin d'éliminer les ions calcium et magnésium (Serkiz et Perdue, 1990) permet d'éviter le phénomène de coprécipitation. Les autres ions sont, par la suite, éliminés au cours des étapes de fractionnement et de purification.

I.1.6. Caractérisation chimique de la matière organique dissoute

La caractérisation chimique de la MOD peut être abordée selon différents aspects : selon sa composition élémentaire, moléculaire, ou par les structures et fonctions chimiques des molécules constituant la MOD. De par la nature différente des informations fournies par ces techniques, celles-ci sont généralement combinées pour caractériser la MOD (McDonald *et al.*, 2004).

I.1.6.1. Analyses élémentaires

I.1.6.1.1. Analyses élémentaires C, H, O, N, S

L'analyse élémentaire de la matière organique permet d'obtenir sa composition relative en C, H, O, N, S et résidus (Huffman et Stuber, 1985). Cette mesure fournit des informations sur la nature saturée et polaire des composés de la MOD. La polarité des composés peut être évaluée par le rapport (N+O)/C ou encore H/O et la saturation des chaînes de carbone (qui traduit un caractère aromatique) s'estime via les rapports O/C et H/C. Ainsi, Ma *et al.* (2001) observent que le ratio H/C est de l'ordre de 1 pour les acides humiques hydrophobes et de 1,5 pour les acides hydrophiles. De même, le rapport O/C est deux fois plus élevé pour les molécules hydrophiles que pour les substances humiques, traduisant le caractère aromatique insaturé de celles-ci. Enfin le pourcentage de résidu obtenu dépend de la nature de l'échantillon et de la procédure d'extraction utilisée. Il ne doit pas excéder 5 % afin de ne pas fausser l'analyse élémentaire totale par une sous-estimation des différents éléments. Selon (Thurman, 1985), il a été montré que malgré les précautions d'extraction, les SH peuvent contenir entre 2 et 5 % de résidu sec, probablement composés d'éléments liés de façon covalente aux SH.

I.1.6.1.2. Analyses isotopiques ^{13}C et ^{15}N

Pendant les réactions biochimiques et chimiques, les isotopes stables d'un élément peuvent être fractionnés selon leur masse mais aussi selon la nature de la réaction. L'analyse isotopique du carbone (rapport $^{13}C/^{12}C$ exprimé en $\delta^{13}C$) et de l'azote (rapport $^{15}N/^{14}N$ exprimé en $\delta^{15}N$) fournit donc des informations sur l'origine des MOD et sur les réactions biogéochimiques dont elles résultent (Buffle, 1988). Les résultats sont exprimés par un ratio δ, exprimé en ‰ par rapport à une référence internationale (PDB Pee Dee Belemnite rostre de bélemnite pour le carbone et pour l'azote CDT Cañon Diablo Troilite). Exemple du carbone:

$$\delta^{13}C = \left[\frac{\left({}^{13}R_{\text{échantillon}} - {}^{13}R_{\text{standard}} \right)}{{}^{13}R_{\text{standard}}} \right] \times 1000$$

avec $^{13}R = \frac{^{13}C}{^{12}C}$

Ce ratio est obtenu par la combustion complète des échantillons et l'analyse des gaz de combustion par spectrométrie de masse isotopique.

<u>Isotope 13 du carbone</u>

L'abondance de l'isotope 13 du carbone par rapport à l'isotope majoritaire ^{12}C est de 1,1 %. Les valeurs du $\delta^{13}C$ sont très variables d'un milieu à l'autre (environ -10 à -35 ‰) (Buffle, 1988 ; Kracht, 2001). D'après les revues bibliographiques de (Deines, 1980) et

Kracht (2001), plusieurs paramètres affectent la composition chimique du carbone organique d'un milieu considéré. Il s'agit principalement :

- du mécanisme de photosynthèse (donc du type de végétation) mis en jeu. La fixation du carbone par la photosynthèse peut en effet s'effectuer par deux voies qui diffèrent par le nombre de carbone du premier intermédiaire de réaction formé. On distingue alors le cycle de CALVIN-BENSON (photosynthèse en C3 des plantes vertes et des arbres) du cycle de HATCH-SLACK (photosynthèse en C4 rencontrée dans les zones de savanes en particulier) qui conduisent à des valeurs de $\delta^{13}C$ de -26 et -13 ‰ en moyenne.
- de la source de carbone utilisée lors de la photosynthèse qui peut par exemple être le dioxyde de carbone atmosphérique ($\delta^{13}C$ = - 7.8‰) ou les bicarbonates ($\delta^{13}C$ proche de 0 ‰).
- de la composition structurale des végétaux présents dans le milieu. De nombreuses études ont constaté des différences importantes entre les valeurs de $\delta^{13}C$ des différentes structures constitutives de la matrice végétale. Par exemple, les sucres et les acides aminés (particulièrement leurs groupes carboxyliques) présentent un enrichissement de ^{13}C par rapport aux structures de type lignine et lipide.
- de l'effet de la chaîne trophique. Les dégradations des composés dans les étapes nutritives en chaîne, c'est-à-dire dans la chaîne alimentaire, résultent en un enrichissement en isotope lourd dans les organismes. Ceci est dû à la perte préférentielle d'isotope léger lors des processus métaboliques comme par exemple la perte de l'isotope 12 du carbone lors de la formation de CO_2.
- de la localisation du site étudié et en particulier les conditions d'ensoleillement, de pH et de température.

Isotope 15 de l'azote

L'abondance de l'isotope 15 de l'azote par rapport à l'isotope majoritaire ^{14}N est de 0,366 %. Comme pour le carbone, les valeurs du $\delta^{15}N$ sont variables d'un milieu à l'autre (-10 à 15 ‰) (Buffle, 1988 ; Kracht, 2001). Il est généralement admis que le cycle biogéochimique de l'azote est plus dynamique que celui du carbone dans les milieux aquatiques. Autrement dit, les transferts trophiques et les processus microbiens sont les facteurs les plus importants conduisant à des fractionnements isotopiques de l'azote (Macko et Estep, 1984 ; Schell *et al.*, 1998).

I.1.6.2. Analyses moléculaires

Plusieurs composés ou groupes de composés sont identifiables parmi l'ensemble de la MOD. Par exemple, les protéines, les polysaccharides, les lipides, sont quantifiables par des dosages colorimétriques, des hydrolyses, ou des dosages par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Les techniques de caractérisation moléculaire sont encore aujourd'hui en phase de développement telles que les méthodes de pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (pyrolyse-CG-SM) (Dignac, 1998 ; Hatcher *et al.*, 2001 ; Labanowski, 2004) et les méthodes de chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CPL/SM, CPL/SM/SM) (Reemtsma, 2001) Ces techniques précises et sensibles, mais aussi très lourdes à mettre en œuvre, permettent d'étudier la composition moléculaire de la MOD pour des composés à haut poids moléculaire (Dignac, 1998). Cependant Reemtsma (2001) souligne que pour les CPL/SM, CPL/SM/SM, une étape de développement de méthode tant dans la séparation que l'analyse spectrométrique massive

est exigé avant de pouvoir évaluer le potentiel de ces techniques pour analyser la matière organique. La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse reste pour l'instant la plus utilisée (McDonald *et al.*, 2004). Malgré cela, de par la grande complexité de la MOD et selon les protocoles employés, l'ensemble des analyses moléculaires ne permet pas de caractériser la MOD dans sa totalité. Ainsi une grande proportion de la MOD reste donc « irrésolue » par ce type d'analyse chimique et cette proportion varie selon l'origine de la MOD, son âge et donc son degré de biodégradation et de transformation (Hedges *et al.*, 2000).

I.1.6.2.1. Pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (pyrolyse-CG-SM)

La pyrolyse-CG-SM est un puissant outil analytique pour la caractérisation des macromolécules organiques et notamment pour pouvoir identifier simultanément l'ensemble des molécules analysables. En effet cette technique combine les avantages d'une séparation à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse et de la haute résolution de la spectrométrie de masse. La pyrolyse analytique consiste en une dégradation thermique (650 à 750 °C) des matières organiques en absence d'oxygène. Cette technique ne nécessite pas de traitement chimique préalable à l'analyse et les risques de contamination de l'échantillon sont limités (Dignac, 1998). Les fragments provenant de la pyrolyse initiale, de faibles poids moléculaires, sont séparés par chromatographie gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse. Chaque fragment peut être attribué à une classe de polymères organiques, un même fragment pouvant avoir plusieurs origines. L'origine des fragments est déterminée à partir de la bibliographie ou par comparaison avec la pyrolyse d'étalons. L'interprétation des pyrochromatogrammes (encore appelés pyrogrammes) de molécules complexes nécessite donc la connaissance des fragments caractéristiques des différentes familles organiques. Il a été montré par exemple que 322 composés pouvaient être identifiés dans les pyrolysats des substances humiques de sols (Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1986a). En plus des coupures de liaisons, la pyrolyse peut entraîner des déshydratations des réarrangements ou des formations de liaisons (Saiz-Jimenez, 1994). Ainsi même si les pyrolyses de MOD peuvent fournir une quantité importante et précise d'informations celles-ci sont à considérer avec prudence et à confronter à d'autres méthodes. Il existe différents modes de pyrolyse : la pyrolyse directe (par les techniques flash ou point de curie) qui reste encore la plus utilisée et la thermochemolyse, qui consiste en une méthylation à haute température (pyrolyse-méthylation, THM : « thermally assisted hydrolysis and methylation ») permettant en particulier de mieux détecter les acides gras souvent peu volatils et d'éviter une décarboxylation des acides aromatiques (Hatcher *et al.*, 2001).

La pyrolyse-CG-SM peut être interprétée qualitativement, mais elle permet aussi une estimation des parts des sucres, protéines, sucres-aminés et composés aromatiques polyhydroxylés dans l'échantillon grâce au calcul semi-quantitatif défini par (Bruchet *et al.*, 1990). Cette méthode est basée sur l'intégration des aires des pics des fragments principaux. Par exemple, pour quantifier la quantité de sucres observés en pyrolyse on calculera le rapport entre la somme des aires des pics des fragments ayant été identifiés comme appartenant aux sucres et la somme totale des aires des pics principaux intégrés. Cette méthode semi-quantitative ne donne en aucun cas la composition exacte de la matière organique puisque d'une part toutes les molécules ne sont pas détectables par pyrolyse-CG-SM, d'autre part car l'identification de tous les fragments est impossible, que certains ont différentes origines et que d'autres peuvent provenir de recombinaison lors de la pyrolyse. De plus la réponse des différents produits de pyrolyse en spectrométrie de masse n'est pas la même et une utilisation quantitative de la pyrolyse nécessiterait une calibration externe de chacun des composés

quantifiés. Cependant cette méthode peut être utile en tant qu'outil de comparaison entre différents échantillons, si elle est alliée à une étude qualitative des pyrogrammes.

I.1.6.3. Analyses fonctionnelles

L'analyse fonctionnelle regroupe plusieurs techniques qui permettent d'identifier, non pas des éléments chimiques ou des molécules constituants la MOD, mais des types de structures et de fonctions chimiques.

I.1.6.3.1. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie d'absorption UV est la mesure d'absorption la plus courante pour la caractérisation de la MOD. L'absorption dans l'UV est liée à l'existence des transitions π-π^* dans les cycles benzéniques et des fonctions alcènes et est donc reliée à l'aromaticité de la MOD (Traina *et al.*, 1990). Cependant dans la gamme de longueurs d'onde étudiée (200 à 800 nm), certaines espèces inorganiques telles que les ions nitrates peuvent fortement contribuer à l'absorption de la lumière (jusqu'à 230 nm). Cet outil peu spécifique ne permet pas d'identifier distinctement les classes de chromophores présentes. Pour cette raison, seul le caractère aromatique de la MOD est estimé par le SUVA (Specific UV Absorbance), c'est-à-dire la mesure de l'absorbance spécifique à une longueur d'onde (souvent à 254 nm mais aussi parfois à une longueur d'onde dans la gamme 254-280 nm) relative à la concentration en COD. L'absorption des solutions de MOD dans le visible est aussi parfois étudiée. Il a notamment été montré que le degré d'humification de la MOD pouvait être estimé par le rapport des absorbances E_{465}/E_{665} (Chen *et al.*, 1977). Cependant, cet indicateur est surtout valide pour les matières organiques des sols et plusieurs études récentes montrent le manque de relation claire entre ce rapport d'absorbance et le degré « d'humification », de maturation de la MOD aquatique (Chen *et al.*, 2002 ; Peuravuori et Pihlaja, 1997b). Aujourd'hui la mesure de SUVA est utilisée en routine comme indicateur simple et rapide de l'aromaticité de la MOD (Leenheer et Croué, 2003).

I.1.6.3.2. Spectroscopie InfraRouge à Transformée de Fourrier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge (IR) est largement répandue pour la caractérisation des SH (Davis *et al.*, 1999 ; Tanaka *et al.*, 2001) et plus particulièrement la spectroscopie IR à transformée de Fourier (IRTF). L'IRTF possède notamment une plus grande sensibilité grâce à un rapport signal sur bruit plus élevé. La facilité d'obtenir des spectres, la grande quantité d'information fournie par ces spectres et la faible quantité d'échantillon exigée, font de l'IRTF une technique attrayante pour la caractérisation de la MOD (Davis *et al.*, 1999). L'IRTF met en évidence la nature des liaisons (C-C, C-O, C-H, C-N, O-H, etc.) et donc les groupes fonctionnels par la vibration et la rotation de ces liaisons suite à l'absorption d'énergie (Tableau 2). Cette technique demeure néanmoins uniquement qualitative suite à l'impossibilité de réaliser des pastilles solides parfaitement homogène.

Tableau 2: Nombres d'onde des bandes IR des structures organiques et inorganiques présentes dans les extraits de MOD (Croué et al., 2000 ; Dignac et al., 2001 ; Field et al., 1992 ; Leenheer et Rostad, 2004 ; Smidt et Meissl, 2007 ; Thurman, 1985)

Groupements fonctionnels	Nombres d'ondes (cm^{-1})
O-H	3400-3300
N-H	3200
C-H	2960 et 1380 (CH_3), 2940 et 1460 (CH_2)
COOH	2700-2500, 1730-1720, 1220-1180
COOR	1760
C=O aromatique	1660-1630
C-O	1100-1000 (sucres), 1150-1280 (phénols, acides)
N-C=O	1660 (amide 1), 1550 (amide 2)
SOOH	1040
Acide borique	3212, 2260, 1450, 1194, 548
Bicarbonate de sodium	2541, 1920, 1695, 1618, 1307, 1000, 837, 696
Carbonate de sodium	1440, 880
Nitrate de sodium	1385, 838
Acide phosphorique	1007, 490
Acide silicique	1093, 964, 798, 468
Acide sulfurique	1288, 1176, 1071, 1012, 889, 617, 577, 455
Sulfate de sodium	1122, 640, 608

La détection d'un grand nombre d'espèces inorganiques permet également de contrôler la pureté de l'échantillon (Croué *et al.*, 2000). La plupart des études entreprises utilisent du bromure de potassium (KBr) en poudre (pour préparer des pastilles contenant l'échantillon étudié) qui, en raison de ses propriétés hygroscopiques, rend difficile l'élimination des interférences liées à l'eau dans les spectres (Tanaka *et al.*, 2001). En outre, dans certaines conditions, il a été rapporté que du KBr catalyse la décarboxylation des groupes fonctionnels acides, altérant de ce fait les substances humiques (Davis *et al.*, 1999). Ces problèmes peuvent potentiellement être surmontés par la préparation de l'échantillon sous forme de film, la mesure restant identique (Davis *et al.*, 1999). Ce protocole d'analyse reste néanmoins marginal.

I.1.6.3.3. Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence a été également appliquée à l'étude des SH et largement passée en revue (Senesi, 1990). Bien que les molécules fluorescentes ne constituent qu'une partie de la MOD (Miano et Senesi, 1992), celles-ci se caractérisent par des cycles

aromatiques condensés, et/ou des chaînes aliphatiques fortement insaturées (Miano et Senesi, 1992 ; Senesi, 1990). En effet, pour fluorescer les molécules doivent absorber dans le domaine UV-Visible ce qui est possible pour les systèmes d'électron π conjugués tels que les molécules polyinsaturées et aromatiques. D'autre part, un fluorophore doit présenter un système carboné relativement rigide, pour que l'énergie absorbée soit réémise et non pas dissipée sous formes de rotations ou de mouvements divers. Pour des solutions faiblement concentrées, les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation sont caractéristiques des molécules, mais celles qui contiennent des noyaux aromatiques produisent l'émission la plus intense. La spectroscopie de fluorescence, par rapport à la spectroscopie UV, a l'avantage d'offrir une meilleure résolution des spectres. Ceci permet une discrimination plus aisée des échantillons de MOD (Kalbitz *et al.*, 1999 ; Peuravuori *et al.*, 2002a). Elle offre également une bonne sensibilité pouvant expliquer qu'elle ait été appliquée à l'origine à la MOD marine (Coble, 1996), dont les concentrations sont faibles. Cependant l'interprétation des spectres obtenus reste difficile pour identifier des fonctions puisque seuls 5 fluorophores sont actuellement « identifiés » dont 3 sont liés aux SH (molécules difficilement identifiables) (Hudson *et al.*, 2007) (Tableau 3).

Tableau 3: Composants fluorescents majeurs de la MOD (Coble, 1996 ; Hudson *et al.*, 2007 ; Parlanti *et al.*, 2000)

Nomenclature (Coble 1996)	Nomenclature (Parlanti *et al.*, 2000)	λ_{ex} (nm) excitation	λ_{em} (nm) émission	Type de fluorophores
A	α'	230-260	380-480	Substances humiques
C	α	330-370	420-480	Substances humiques
M	β	310-320	380-420	Substances humiques marines
B	γ	225-250	300-320	Protéine type tyrosine
T	δ	225-275	320-380	Protéine type tryptophane

Les spectres peuvent être obtenus par différents modes spectroscopiques selon qu'on enregistre l'émission seule ou l'émission et l'excitation. D'autres méthodes ont été développées tels que la spectroscopie de fluorescence synchrone qui enregistre le spectre d'émission en gardant entre les longueurs d'ondes d'émission et d'excitation un écart constant. Cette technique permet d'obtenir une meilleure résolution des pics et donc de différencier les spectres de fluorescence d'échantillons d'origines variées (Galapate *et al.*, 1998 ; Sierra *et al.*, 1994). La fluorescence à 3 dimensions, aujourd'hui la plus utilisée (Hudson *et al.*, 2007), permet l'analyse globale de la MOD en enregistrant l'intensité et la position des maxima. Par cette technique il est possible de différencier les échantillons car la position des maxima varie avec la nature et la structure des fluorophores et l'intensité est liée à la concentration du fluorophore. Ainsi des différences entre des acides fulviques de différentes origines ont été détectées (Senesi, 1990). Il a également été montré que la forte intensité de fluorescence des composés de types protéiques peut être utilisée comme marqueur de la MOD d'origine anthropique (rejets de stations d'épuration et effluents urbains) (Baker *et al.*, 2003 ; Baker et Spencer, 2004 ; Galapate *et al.*, 1998 ; Reynolds, 2003 ; Reynolds et Ahmad, 1997).

I.1.6.3.4. Analyse des substances humiques dites réfractaires

La quantification des matières organiques humiques, souvent dites réfractaires, a été longtemps réalisée à l'aide des techniques d'absorbance UV-visible et de fluorescence (détaillées § I.1.6.3.1 et I.1.6.3.3). Cependant la quantification des substances réfractaires à l'aide de ces techniques demeure douteuse puisqu'elles n'en détectent qu'une partie (Weishaar *et al.*, 2003). Une méthode électrochimique a récemment été développée pour quantifier les substances humiques ou substances réfractaires (Chanudet *et al.*, 2006). Cette méthode est basée sur la redissolution cathodique des complexes du molybdène (VI) par les acides humiques ou fulviques précédemment adsorbés sur la goutte de mercure à pH acide. En effet le molybdène n'est pas électroactif dans le domaine de potentiel autorisé par la goutte de mercure (-1 V / + 0,1 V). L'utilisation d'un ligand pour mesurer sa redissolution est donc nécessaire, les substances réfractaires jouant ici le rôle de ligand. Le signal mesuré en présence d'un excès de molybdène est donc directement relié à la quantité de substances humiques dans le milieu (Chanudet *et al.*, 2006), le signal ne dépendant que de la quantité de ligand adsorbé à la surface de la goutte de mercure et non pas de la force ou de la capacité de complexation des MOD vis-à-vis du Mo(VI) (Quentel et Filella, 2008). La grande sensibilité de cette méthode en présence d'acides fulviques et humiques et un signal négligeable en présence de protéines ou de polysaccharides a montré l'utilité de cette méthode pour doser les substances humiques dites réfractaires (Chanudet *et al.*, 2006). Cette méthode a été appliquée jusqu'à présent à des eaux de rivières et de lacs (Chanudet et Filella, 2007). Cependant la difficulté de cette méthode réside dans le choix d'un standard (acide humique ou fulvique) proche des substances réfractaires présentes dans l'échantillon étudié (Quentel et Filella, 2008).

I.1.6.3.5. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est également beaucoup utilisée pour l'étude des SH (Cook, 2004 ; Hatcher *et al.*, 2001). La RMN consiste à modifier le moment magnétique nucléaire lorsque celui-ci n'est pas nul. Autrement dit, il s'agit de faire passer le noyau d'un atome d'un niveau d'énergie à un autre par absorption d'un photon : lorsque l'énergie du photon et donc la fréquence de l'onde électromagnétique permet cette transition, il y a résonance. L'identification de composés spécifiques n'est pas possible avec cette technique pour l'analyse des MOD suite à la multitude de molécules présentes. L'information est alors fournie par la distribution de divers groupes fonctionnels présents. Cependant, pour des composés complexes, qui de plus sont mélangés, des recoupements entre différentes zones de résonance peuvent se produire. Un signal bien défini est donc observé seulement quand un type de structure semblable prédomine. En dépit de ceci, les techniques de RMN ont contribué à une meilleure compréhension des substances humiques. Par exemple, la RMN du ^{13}C a permis de montrer que les SH possèdent une forte structure aliphatique et non exclusivement aromatique, comme il a pu être pensé par le passé (Malcolm, 1990). Bien que les RMN ^{1}H, ^{15}N et ^{13}C ont été employées pour étudier les substances humiques, seules les RMN ^{13}C et ^{15}N ont été intensivement utilisées (Hatcher *et al.*, 2001). La RMN du proton est limitée la plupart du temps aux solutions car elle souffre d'une faible résolution à l'état solide (Hatcher *et al.*, 1981). La RMN ^{13}C a plusieurs avantages par rapport à la RMN du proton en termes de puissance : elle permet de fournir des informations sur le squelette carboné des structures organiques plutôt que la périphérie comme la RMN ^{1}H (Tableau **4**). En outre, les déplacements chimiques du carbone sont plus espacés que ceux du proton, par conséquent les chevauchements des différents signaux sont moins nombreux. En RMN du carbone, l'état solide est privilégié car les fractions humiques (molécules complexes) se dissolvent mal dans les solvants pour la RMN liquide (Hatcher *et al.*, 2001). Cette mauvaise

dissolution engendre de ce fait une importante surestimation des carbones aliphatiques et une sous-estimation des carbones aromatiques (Peuravuori *et al.*, 2003). Il est possible d'obtenir une réelle quantification en RMN du carbone à l'état solide grâce à un ajustement minutieux de paramètre analytique. Cependant les analyses sont très rarement utilisées dans ces conditions, les temps d'acquisition devenant excessivement long (de plusieurs jours à une semaine) (Dudley et Fyfe, 1982 ; Gonzalez-Vila *et al.*, 2001 ; Poirier *et al.*, 2000). Néanmoins l'utilisation de cette méthode peut être utile en tant qu'outil de comparaison entre différents échantillons, si elle est alliée à une étude qualitative.

La RMN ^{15}N est principalement utilisée pour caractériser les formes d'azote des SH dans les sols (McDonald *et al.*, 2004). Bien que la RMN de ^{15}N permette d'obtenir des informations sur les fonctions azotées, les spectres sont moins bien résolus qu'en RMN du ^{13}C à cause du fort moment quadripolaire de l'azote mais aussi du faible pourcentage d'azote et de la plus faible proportion d'azote 15 en abondance naturelle (0.366% contre 1.1% de ^{13}C) (McDonald *et al.*, 2004).

Tableau 4: Bandes structurales observées sur les spectres RMN ^{13}C de MOD (Croué *et al.*, 2000)

Groupements chimiques	Types de composés	Bandes (ppm)
C-H	Carbone aliphatique	0 - 55
C-N	Amine, amide, protéine	40 - 55
O-CH_3	Groupe méthoxy lignine et tannin	55 -60
C-O	Alcool aliphatique, éther ester	60 -90
O-C-O	Carbone anomérique sucre lactol	90 - 100
ϕ	Carbone aromatique	95 -165
ϕ-O	Ester aromatique, éther, amide	135 - 165
O=C-O ; O=C-N	Acide carboxylique, ester, amide	160 - 190
O=C-C=C	Flavone, quinone	170 - 200
O=C-C	Cétone aliphatique et aromatique	190 - 220

I.1.6.3.6. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance

La chromatographie par exclusion de taille à haute performance (HPSEC) permet d'obtenir une répartition « continue » des molécules dans l'échantillon selon leur taille (exprimée en poids moléculaire rapporté à une molécule modèle). De cette répartition, il est

possible d'extraire le poids moléculaire moyen en nombre de molécules (M_n), le poids moléculaire moyen en taille (M_w) et la « polydispersité » (M_w/M_n) qui fournit une idée de l'hétérogénéité de taille du pool de MO considéré (Chin *et al.*, 1994). La HPSEC consiste à séparer les composés de la MOD en fonction de leur taille sur un gel ou une résine macroporeuse de silice. L'étape critique de cette méthode est plus le choix de la phase mobile que celui de la colonne ou du gel (Peuravuori et Pihlaja, 1997b). Différentes méthodes sont utilisées pour détecter les composés précédemment séparés tels que l'absorbance UV, la fluorescence, l'indice de réfraction, l'analyseur de carbone organique, la spectrométrie de masse à plasma induit (McDonald *et al.*, 2004). Cependant le détecteur d'absorbance UV reste le plus couramment utilisé dans une gamme de longueurs d'onde variant entre 230 et 280 nm (McDonald *et al.*, 2004). L'utilisation de différents détecteurs conduit à des distributions de masses moléculaires variables. Il a été montré par exemple que le poids moléculaire moyen d'acides humiques et fulviques changeait selon qu'on utilisait un détecteur d'absorbance UV, d'indice de réfraction ou de fluorescence (Zhou *et al.*, 2000). Néanmoins cette technique peut s'avérer utile comme outil de comparaison entre différents échantillons.

I.1.6.3.7. Titration acido-basique

Les propriétés acido-basiques d'une MOD font partie des facteurs primordiaux influençant son pouvoir complexant vis-à-vis des métaux traces (Buffle, 1988 ; Christensen et Christensen, 2000 ; Perdue et Lytle, 1983). Elles sont donc l'objet de nombreuses études. L'ensemble des modélisations appliquées à la MOD, vise à définir la densité en sites de types carboxylique et phénolique (Christensen *et al.*, 1998 ; Lu et Allen, 2002 ; Masini *et al.*, 1998 ; Milne *et al.*, 2001 ; Ritchie et Perdue, 2003). En effet, le suivi des modifications du rapport carboxylique/phénolique peut ainsi permettre de suivre la variabilité des propriétés de la MOD, ainsi que de déterminer son origine. Il a ainsi été montré que la MOD d'origine anthropique ou terrigène (terrestre) avait un caractère phénolique plus marqué que la MOD aquagénique (Davì et Gnudi, 1999). De même, les extractions et/ou séparations de MOD en acides fulviques (AF) et humiques (AH) ont montré des différences récurrentes entre ces deux types de MO extraites, aussi bien en termes de densité de sites que de ratios carboxylique/phénolique (De Souza Sierra *et al.*, 2001 ; Milne *et al.*, 2001 ; Ritchie et Perdue, 2003). La densité totale en sites acides d'une matière organique naturelle et la fraction en groupements de type carboxylique, i.e. possédant des propriétés d'acidités voisines de celles de sites carboxyliques, peuvent être déterminées à l'aide de techniques simples telles que les dosages par de l'hydroxyde de baryum (acidité totale) ou de l'acétate de calcium (sites carboxyliques) (Masini *et al.*, 1998 ; Stevenson, 1994). Cependant, ces mesures ne suffisent pas à caractériser les interactions entre la MOD étudiée et le proton, de manière à obtenir des propriétés permettant de les modéliser. La technique la plus courante pour analyser, puis caractériser, les sites acides d'une molécule organique, de structure simple ou complexe, repose sur une mesure potentiométrique de la concentration en proton libre, c'est-à-dire le pH, au cours d'une titration acido-basique (Christensen *et al.*, 1998 ; De Souza Sierra *et al.*, 2001 ; Masini *et al.*, 1998 ; Ritchie et Perdue, 2003 ; Smith et Kramer, 1999). Un traitement mathématique (linéarisation de Gran, méthodes des dérivées première et seconde, fitting non-linéaire, etc.) des points expérimentaux ainsi obtenus conduit ensuite à la définition de paramètres d'acidité pouvant être ensuite utilisés pour représenter le comportement de cette molécule vis-à-vis du proton. Cette combinaison "technique d'analyse - traitement mathématique" a été initialement appliquée à la caractérisation de molécules organiques de structures simples (EDTA, acides phénolique, acétique, salicylique, etc.), présentant des fonctions d'acidité distinctes, visibles par des inflexions marquées de la courbe de titration.

I.1.7. Conclusions bibliographiques

De par sa composition complexe l'étude de la MOD n'est pas aisée. Les études globales ont l'avantage de ne pas altérer la MOD lors de l'analyse. Cependant la faible quantité d'information obtenue et la difficulté de caractériser et d'expliquer les interactions métaux – MOD (Buffle, 1988) nous ont conduit à choisir une analyse fractionnée de la MOD. Plusieurs méthodes d'extraction et donc de fractionnement existent selon différents critères physico-chimiques. Toutes peuvent modifier de façon plus ou moins importante la MOD. Le fractionnement à l'aide des résines DAX-8 et XAD-4 est envisagé. Il a l'avantage d'être reconnu par l'IHSS et est fréquemment utilisé ce qui permet une comparaison aisée des résultats. Les analyses élémentaires (C, H, O, N, S, ^{13}C, ^{15}N), moléculaire (pyrolyse-CG-SM) et fonctionnelles (UV-vis, IRTF, fluorescence, HPSEC, titration acido-basique, dosage des substances humiques dites réfractaires) permettront par une approche multidimensionnelle de caractériser chimiquement les différentes fractions obtenues. Comme il a été mentionné précédemment, certaines techniques peuvent fournir une quantité importante et précise d'information mais sont à considérer avec prudence suite à la présence d'éventuels artefacts. Cependant le choix d'utiliser un large panel de techniques analytiques pour caractériser la MOD permettra de confronter les résultats et les techniques et d'obtenir une certaine garantie de leur justesse. De plus il est important de souligner que la plupart des travaux précédemment cités à l'exception de quelques récentes études (Drewes et Croue, 2002 ; Imai *et al.*, 2001 ; Imai *et al.*, 2002 ; Jarusutthirak et Amy, 2006, 2007 ; Jarusutthirak *et al.*, 2002 ; Leenheer et Rostad, 2004 ; Ma *et al.*, 2001 ; Nam et Amy, 2008 ; Sarathy et Allen, 2005 ; Sirivedhin et Gray, 2005 ; Wang *et al.*, 2007), tous sont focalisés sur la MOD d'origine naturelle et plus particulièrement sur la fraction la plus hydrophobe : les SH. Cette étude s'attachera donc à caractériser la MOD dans son ensemble (hydrophobe-hydrophile) en milieu urbain provenant en particulier des rejets de stations d'épuration et à suivre son évolution dans le milieu récepteur.

I.2. MATERIEL ET METHODES

I.2.1. Protocole d'extraction de la matière organique dissoute

Le schéma d'extraction de la MOD utilisé au cours de cette étude peut être divisé en quatre phases (Figure 1). Ce protocole a été appliqué en totalité aux échantillons présentés dans le paragraphe suivant.

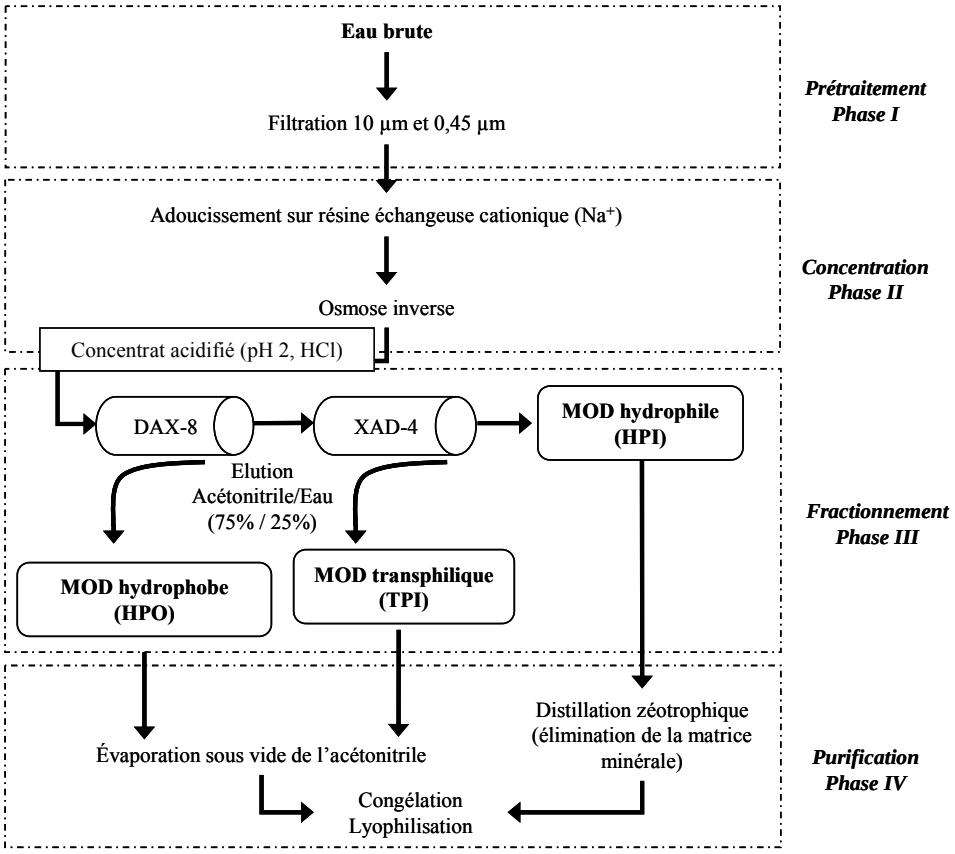


Figure 1 : Schéma général du protocole d'extraction des MOD

I.2.1.1. Phase I : prétraitement de l'eau brute

Selon le site, de 250 à 1100 litres d'eau ont été prélevés à l'aide d'une pompe à double membranes (Ingersoll-Rand/ARO®, copolymère polypropylène (PP) - éthylène propylène diène monomère) puis filtrés successivement sur une cartouche (PP) de seuil de coupure 10 µm afin d'éliminer les grosses particules en suspension, puis sur une cartouche Pred'Pure (Predel®, PP) de seuil de coupure 0,45 µm. Cette étape a pour but de séparer la MOP de la MOD.

Les cartouches ont été préalablement rincées avec de l'eau déionisée ultrapure (Elga®) pour éviter tout risque de contamination. L'ensemble du montage est raccordé par des tuyaux en Polytetrafluoroéthylène (PTFE).

I.2.1.2. Phase II : concentration des MOD par osmose inverse

L'eau prétraitée (phase I) a été filtrée sur une résine échangeuse de cations (saturée en ion sodium) afin d'éviter lors des processus de concentration la précipitation des sels (carbonates) de calcium et de magnésium pouvant coprécipiter avec la MOD et ainsi colmater les membranes d'osmose inverse (OI).

La filtration membranaire a été conduite avec un module d'OI équipé d'une membrane Filmtec TW 30 (diamètre : 2,5 pouces ; longueur : 40 pouces) en polyamide présentant l'avantage d'être moins sensible à l'adsorption des MOD (Clair *et al.*, 1991 ; Violleau *et al.*, 2005),. Le module d'OI avec un débit de production de perméat de 80 $l.h^{-1}$ est alimenté par une cuve en acier inoxydable d'une capacité de 100 l. Le montage expérimental est présenté sur la Figure 2.

L'unité d'OI a fonctionné à une pression de 14 bars, avec un ratio de débit concentrat/perméat de 90%/10% soit un taux de conversion de 10 %.

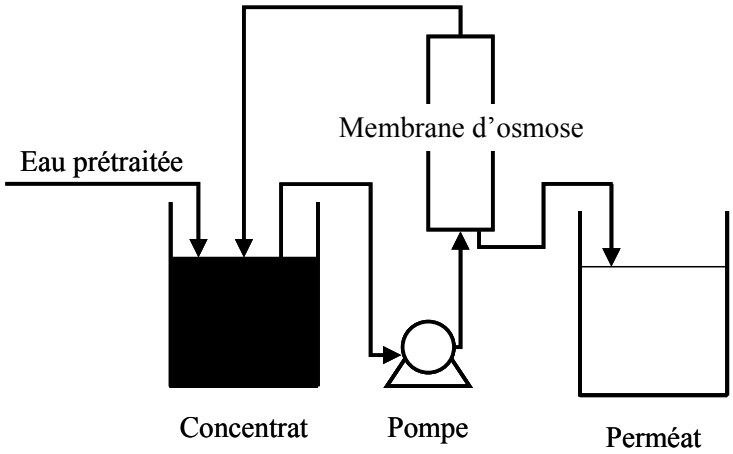


Figure 2 : Schéma du principe de la concentration membranaire

Au cours de la filtration, le concentrat est recyclé dans une cuve d'alimentation jusqu'à l'obtention d'un volume final de 25 à 45 litres. Les mesures régulières de la conductivité, de la température, des débits et pressions dans le perméat et/ou le concentrat ont permis d'indiquer la présence ou non de fuites de MOD sur le terrain. La fin de l'étape de concentration a été réalisée à chaque fois au laboratoire afin de réduire au maximum le volume d'échantillon. Pour cela des mesures d'absorbance UV sur le perméat ont permis de pousser la concentration jusqu'à l'observation des premières fuites de MOD. Le prélèvement régulier d'échantillon pour l'analyse du COD durant tout l'étape de concentration a permis d'évaluer l'adsorption de la MOD sur la membrane d'osmose inverse d'estimer la perte de MOD au cours de la concentration par OI.

Une fois le concentrat recueilli, la MOD adsorbée à la surface des membranes est récupérée par des lavages successifs à la soude 0,05 $mol.l^{-1}$ puis mélangées au concentrat. Le mélange obtenu (concentrat+éluats sodiques) est alors acidifié (HCl, 0,01 $mol.l^{-1}$) et stocké à l'obscurité à 5 °C pendant un jour maximum lorsque la phase III n'a pu être réalisée immédiatement.

Les phases I et II à savoir la filtration, l'adoucissement et la concentration ont été réalisées sur le terrain afin de réduire le temps d'opération et le volume d'échantillons transporté ainsi que de limiter les éventuelles modifications des MOD (dégradation par les

microorganismes) (Figure 3). L'ensemble de la chaîne prélèvement, filtration adoucissement et concentration s'est révélée non contaminante après mesure du COD (inférieur à la limite de détection 0,5 mgC.l^{-1}) sur de l'eau déionisée ultrapure ayant traversée l'ensemble de la chaîne.

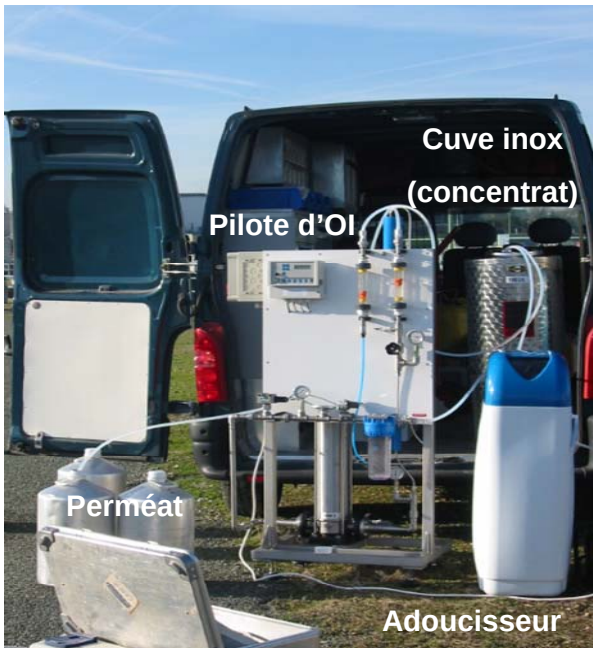


Figure 3: Chaîne de concentration de la MOD sur le terrain

Enfin avant et après chaque utilisation, le pilote d'OI est nettoyé selon la procédure suivante :

- rinçage abondant à l'eau du robinet
- rinçage en circuit fermé à l'acide chlorhydrique 0,01 mol.l^{-1} (30 minutes)
- rinçage à l'eau déionisée ultrapure
- rinçage en circuit fermé à la soude 0,05 mol.l^{-1} (30 minutes)
- rinçage à l'eau déionisée ultrapure

L'ensemble des membranes et de la tuyauterie du pilote est stocké sous une solution de bisulfite de sodium (0,015 mol.l^{-1}) afin d'éviter tout développement bactérien.

I.2.1.3. Phase III : protocole d'extraction sur résines macroporeuses non ioniques

La procédure de lavage des résines DAX-8 et XAD-4 (détaillée par Aiken *et al.*, 1992) consiste à un premier lavage à la soude (0,1 mol.l^{-1}) pendant une semaine puis à un second lavage dans un extracteur solide liquide (soxhlet) avec du dichlorométhane pendant 24 h puis de l'acétonitrile pendant 48 h afin de les débarrasser des impuretés qu'elles peuvent contenir (monomères de constitution, agents conservateurs). Une série de rinçages des résines par des solutions d'acide chlorhydrique, de soude (0,1 mol.l^{-1}) et d'eau déionisée ultrapure jusqu'à l'obtention d'une concentration en COD inférieure à 0,5 mgC.l^{-1} dans l'effluent, parfait leur préparation.

Le fractionnement sur les résines Supelite® DAX-8 (résine macroporeuse non ionique de type ester acrylique) et Amberlite® XAD-4 (résine macroporeuse non ionique de type

divinylbenzène) est une technique de chromatographie, contrôlée par les propriétés physico-chimiques de la surface des billes poreuses constituant les résines. Le phénomène d'adsorption est principalement de type physique (forces de Van der Waals) et se fait par l'intermédiaire de groupes hydrophobes. Les forces régissant l'adsorption étant relativement faibles (20 à 40 $kJ.mol^{-1}$) comparées aux liaisons covalentes, un changement de pH de la solution suffit à initier la désorption.

La fixation d'un composé (soluté S) à l'intérieur des pores d'un matériau solide (adsorbant, A) peut être schématisée de la manière suivante :

$$A + S \overset{K}{\Leftrightarrow} AS$$

Avec K coefficient de partage. Le facteur de capacité (k') est obtenu en multipliant K par la porosité de la résine utilisée. Pour Leenheer (1981), les substances humiques sont définies par la rétention à 50% d'un composé présentant un k' de 50 sur résine XAD 8. Cette définition opérationnelle des substances humiques, validée par l'IHSS, est utilisée dans de nombreuses études (Aiken *et al.*, 1992 ; Croué, 2004 ; Leenheer, 1981 ; Violleau, 1999). Il a été montré que l'utilisation d'un facteur de capacité k' compris entre 50 et 100 n'affectait que très faiblement la répartition du COD (Labanowski, 2004). Lors de cette étude l'ancienne résine XAD-8 a été remplacée par la nouvelle résine DAX-8, ayant des propriétés de sorption et de désorption plus précises (Peuravuori *et al.*, 2002b). La filtration successive sur deux colonnes de résines macroporeuses non ioniques DAX-8 et XAD-4 de un litre chacune, placées en série (Figure 4) a été effectuée directement sur le concentrat d'OI complété des éluats sodiques en appliquant un facteur de capacité k' voisin de 50 pour tous les échantillons étudiés. L'échantillon, acidifié à pH=2 avec de l'acide chlorhydrique (non oxydant) est percolé successivement sur chacune des résines à un débit égal de 10 $V_{échantillon}.V_{résines}^{-1}.h^{-1}$ à l'aide d'une pompe inox à piston rotatif (FMI Lab Pump model QD).

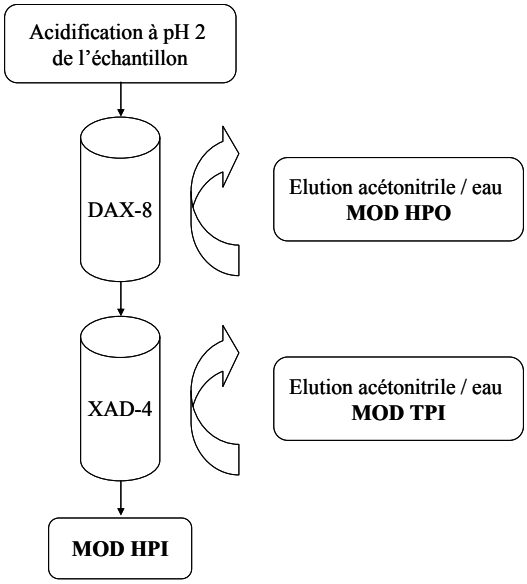


Figure 4 : Protocole de fractionnement sur résines DAX-8 et XAD-4

Avant l'élution de la MOD retenue par les résines, un rinçage à l'acide formique pH=2 (force éluante plus faible que l'eau déionisée ultrapure) est effectué afin d'éliminer les ions chlorures ajoutés lors de l'acidification. Le rinçage est stoppé au moment où la conductivité en sortie de la résine est égale à celle de la solution d'entrée. Les substances organiques

adsorbées sur les résines sont ensuite éluées avec un mélange acétonitrile/eau (75%/25%). Les fractions obtenues à partir de l'élution des résines DAX-8 et XAD-4 sont respectivement nommées fraction hydrophobe (HPO) et fraction transphilique (TPI). Les fractions HPO et TPI ont ensuite été évaporées sous vide pour éliminer l'excès d'acide formique et d'acétonitrile (précédemment utilisés) puis lyophilisées avant d'être conservées au sec (dessiccateur) et à l'obscurité.

I.2.1.4. Phase IV : Purification et extraction des substances hydrophiles

L'extraction des MOD les plus hydrophiles (Figure 5) se heurte aux difficultés liées à la présence en quantité importante des composés minéraux contenus dans l'effluent de la résine XAD-4. Une partie des sels est éliminée par simple concentration réalisée par évaporation sous vide qui engendre par sursaturation leur précipitation. L'évaporation est réalisée à une température d'environ 30 °C afin d'éviter toute dénaturation et le pH est maintenu à 4 (par des ajouts de soude 0,5 $mol.l^{-1}$) afin d'éviter l'hydrolyse des protéines (Leenheer *et al.*, 1987) Les sels résiduels sont ensuite séparés de la fraction organique par plusieurs opérations successives :

- la distillation zéotrophique (Aiken et Leenheer, 1993) qui consiste à ajouter à l'effluent de la résine XAD-4 (concentré par évaporation) un volume équivalent d'acide acétique cristallisable pur (99-100%) puis à évaporer ce mélange sous vide. Les sels peu solubles dans l'acide acétique sont alors séparés des MOD hydrophiles par centrifugation. Plusieurs évaporations successives sont nécessaires afin d'éliminer environ 50 % des sels présents,
- la deuxième distillation zéotrophique consiste tout d'abord à évaporer l'acide acétique sous vide. La MOD est alors reprise dans du méthanol auquel on ajoute un volume équivalent d'acétonitrile puis ce mélange est évaporé sous vide. Les sels peu solubles dans l'acétonitrile sont alors séparés des MOD hydrophiles par centrifugation. Cette étape, non présente dans les protocoles publiés (Aiken et Leenheer, 1993 ; Violleau, 1999) a été rajoutée car la distillation zéotrophique dans l'acide acétique n'était pas suffisamment efficace pour éliminer les sels présents. En effet suite à son caractère facilement dissociable, l'acide acétique, bien que moins polaire que l'eau, permet à une partie des sels de rester en solution. Cette même étape avec pour solvant l'acétonitrile, moins polaire que l'acide acétique et non dissociable, permet, suite à plusieurs évaporations successives, de faire précipiter la majeure partie des sels restants,
- la centrifugation de l'échantillon permet l'élimination des ions sulfates résiduels, précipités sous forme de sulfate de baryum après ajout goutte à goutte à pH acide d'acétate de baryum,
- l'élimination des cations (dont le baryum résiduel) sur résine échangeuse cationique régénérée sous forme H^+. Cette étape engendre un fractionnement des substances hydrophiles suite à une adsorption de la MOD HPI basique. Une élution avec une solution d'hydroxyde d'ammonium (3 $mol.l^{-1}$) permet de récupérer cette MOD HPI basique,
- l'ensemble de la MOD HPI regroupée est alors successivement évaporé sous vide en présence d'acétonitrile (élimination d'ammoniac et des acides chlorhydriques, boriques et partiellement nitriques), d'acide formique (élimination du reste des nitrates sous forme de dioxyde d'azote) et enfin de méthanol (pour éliminer l'acide formique résiduel) avant l'étape finale de lyophilisation.

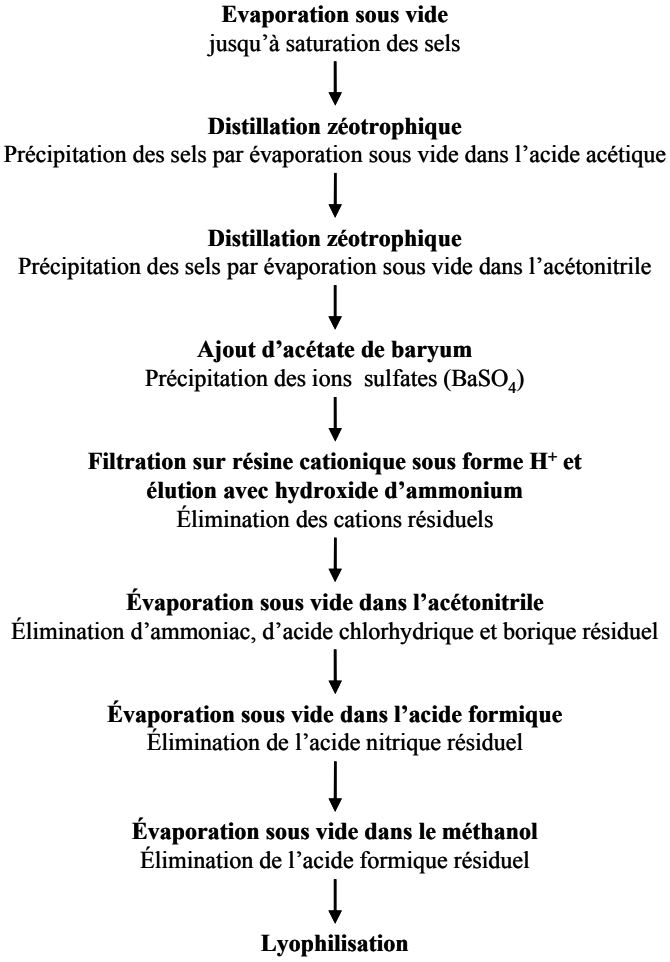


Figure 5 : Protocole d'extraction de la MOD hydrophile

I.2.1.5. Conclusion : nature des fractions obtenues

Le schéma global d'extraction a permis d'isoler :

- la fraction HPO retenue sur la résine DAX-8
- la fraction TPI retenue sur la résine XAD-4
- la fraction HPI purifiée à partir de l'effluent de la résine XAD-4.

I.2.2. Les sites d'étude

Au cours de ces travaux, six prélèvements ont été effectués dans le bassin de la Seine sur quatre sites situés en amont et en aval de l'agglomération parisienne (Figure 6). Le bassin de la Seine, représentant 12 % du territoire national, supporte le quart de sa population dont les dix millions d'habitants de l'agglomération parisienne, un tiers de sa production agricole et industrielle, et plus de 50 % du trafic fluvial (Meybeck *et al.*, 1998). Si des efforts considérables ont été consentis depuis les trente dernières années pour améliorer la qualité du milieu, ce fleuve reste parmi les plus anthropisés du monde. Tous les échantillons ont été prélevés de la même manière (décrite dans le paragraphe précédent) et intégralement en période de temps sec. Les principales caractéristiques des eaux échantillonnées sont résumées dans le Tableau 5.

Dans la littérature, la majeure partie des études sur la MOD étant focalisée sur les SH, deux substances humiques standards : l'acide humique (SRHA 2S101H) et l'acide fulvique (SRFA 2S101F) ont été obtenues auprès de l'IHSS à fins de comparaisons. Ces SH proviennent du fleuve Suwannee prenant sa source dans le marais d'Okefenokee (Georgie, USA) qui est la plus grande tourbière d'Amérique du nord. Ces substances humiques ont été isolées selon le protocole de l'IHSS c'est-à-dire par osmose inverse et adsorption sur la résine DAX-8, puis séparées selon leur solubilité en fonction du pH.

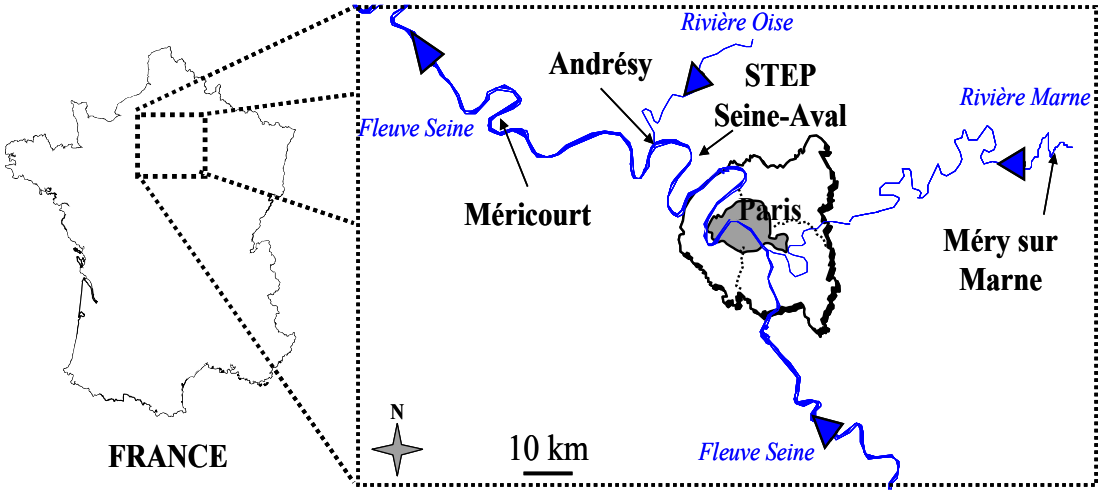


Figure 6 : Carte des sites d'échantillonnage

Les eaux échantillonnées sur les sites de Méry sur Marne, Andrésy et Méricourt ont été prélevées en amont des écluses ou des barrages au milieu des cours d'eau afin de s'affranchir des interférences liées aux berges (resuspension, exsudation des végétaux proches, etc.).

Description des sites d'études :

Méry sur Marne : deux prélèvements ont été effectués sur la Marne en amont de l'écluse en janvier (M1) et juillet (M2) 2007. Ce site a été choisi dans cette étude comme site peu impacté de par la faible urbanisation de son bassin versant (Figure 7).

Figure 7 : Site de l'écluse de Méry sur Marne
(Bord de Marne : à gauche janvier 2007 et à droite juin 2007)

Station d'épuration (STEP) Seine-Aval à Achères : deux prélèvements ont également été effectués en sortie de la station d'épuration Seine-Aval au niveau de la sortie des décanteurs secondaires de la tranche 3 et 4 respectivement en avril (A1) et décembre (A2) 2006. Traitant chaque jour plus de 70 % des eaux usées de l'agglomération parisienne par temps sec, soit l'équivalent d'environ 6 millions d'habitants, cette station d'épuration est la deuxième plus importante du monde en termes de charge. Le traitement des eaux usées est composé d'une décantation primaire, d'une épuration biologique par boues activées et d'une décantation secondaire.

Figure 8 : STEP Seine-Aval à Achères, décanteur secondaire (à gauche tranche 3 le 6 avril 2006 et à droite tranche 4 le 15 décembre 2006)

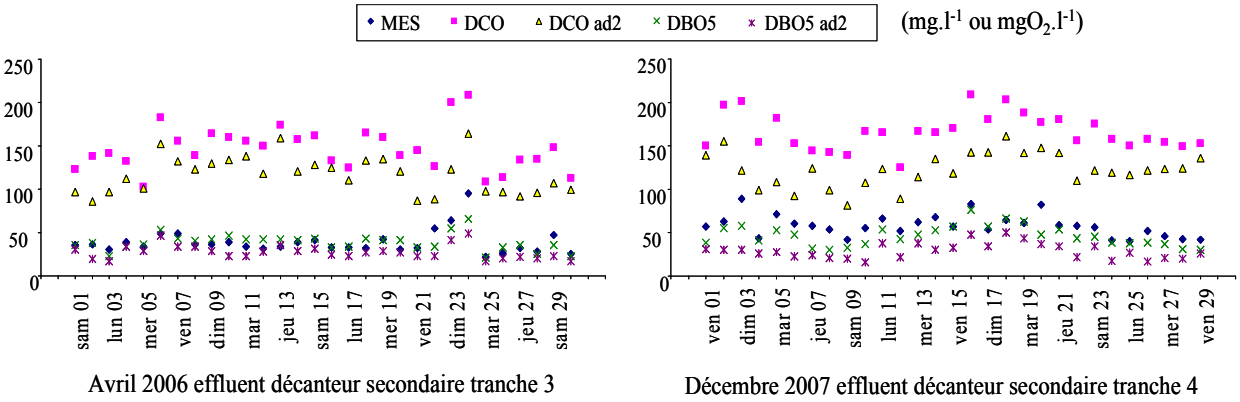


Figure 9 : Variations mensuelles de quelques paramètres globaux des effluents échantillonnés (source SIAAP) (MES : Matières en suspension, DCO : Demande Chimique en Oxygène, DBO : Demande Biologique en Oxygène , ad2 : après décantation 2 heures)

La Figure 9 ainsi que des données non présentées sur l'ensemble des paramètres globaux mesurés par le SIAAP montrent que même si les deux échantillons ont été prélevés à deux périodes différentes et sur deux ouvrages différents (tranche 3 et tranche 4) leur similarité n'est pas remise en question, la station fonctionnant dans une configuration normale et identique ces deux jours.

Andrésy : un prélèvement a été effectué sur la Seine en amont du barrage d'Andrésy en juin 2007 (AN). Ce site se trouve à en aval de l'agglomération parisienne, à environ 9 kilomètres de la STEP Seine-Aval, ce qui garanti un bon mélange des effluents de la STEP avec l'eau de la Seine. Il se trouve également à quelques centaines de mètres en aval de la confluence Seine-Oise. Néanmoins, en raison de la présence de l'île Nancy, les eaux de la Seine et de l'Oise ne peuvent se mélanger immédiatement : l'eau s'écoulant du côté du barrage d'Andrésy provient donc essentiellement de la Seine et de la STEP Seine-Aval, l'eau de l'Oise s'écoulant de l'autre côté de l'île. Ce site a donc été choisi afin d'évaluer l'impact des rejets de la STEP sur la qualité de la MOD présente en Seine.

Figure 10 : Site du barrage d'Andrésy (vue amont juin 2007)

Méricourt : un prélèvement a été effectué sur la Seine en amont du barrage de Méricourt en juillet 2007 (MT). Ce site, le deuxième en aval de l'agglomération parisienne, est situé à environ 50 km du barrage d'Andrésy et a été choisi pour évaluer la ou les éventuelles modifications des MOD présentent en Seine après l'impact de l'agglomération parisienne.

Figure 11 : Site du barrage de Méricourt (vue amont juillet 2007)

Tableau 5 : Caractéristiques des eaux étudiées

Site	Symbole	Date	Débit ($m^3.s^{-1}$)	Température (°C)	pH	Conductivité ($\mu S.cm^{-1}$)	Oxygène ($mg.l^{-1}$) (% saturation)	Chlorophylle a ($\mu g.l^{-1}$)	Phaeophytine ($\mu g.l^{-1}$)	COD ($mgC.l^{-1}$)	Volume prélevé (l)
Méry sur Marne	M1	30/01/07	Méry: 80 Austerlitz: 380	7	8,5	560	11,8 98 %	< LDQ	< LDQ	2,0	1200
	M2	27/06/07	Méry: 35 Austerlitz: 120	19	8,3	517	10,0 95 %	171	478	2,0	1000
STEP Seine-Aval Achères	A1	06/04/06	20	17	7,8	1580	-	nd	nd	38,7	228
	A2	15/12/06	20	14	8,1	1261	-	nd	nd	17,4	540
Andrésy	AN	29/06/07	Austerlitz: 120	18	7,7	606	6,6 70 %	197	500	4,1	800
Méricourt	MT	03/07/07	Austerlitz: 120	20	7,6	625	5,1 58 %	529	806	4,0	700

- : problème de sonde oxygène
nd : non mesuré
LDQ : limite de quantification (50 $\mu g.l^{-1}$)

I.2.3. Outils analytiques de caractérisation

Plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour caractériser les fractions de matières organiques extraites.

I.2.3.1. Dosage du carbone organique dissous (COD)

Ce dosage est effectué avec un analyseur de carbone de type OI-ANALYTICAL modèle 1010, piloté par ordinateur à l'aide du logiciel WINTOC. Le principe repose sur la détection en infrarouge du CO_2 produit par oxydation de la matière organique par du persulfate de sodium. Avant l'analyse, afin de s'affranchir du carbone minéral (carbonates), l'échantillon est acidifié avec de l'acide orthophosphorique (H_3PO_4, 0,7 mol.l^{-1}) et soumis à un barbotage d'azote pendant 10 minutes. Dans le cas où l'analyse n'a pu être effectuée immédiatement après le prélèvement des échantillons, ceux-ci sont acidifiés à 2 % (H_3PO_4) et stockés à l'obscurité à 4 °C pendant 2 jours maximum.

La limite de quantification est de 0,5 mgC.l^{-1} avec une incertitude de 0,3 mgC.l^{-1} dans la gamme de concentration analysée. Chaque échantillon est analysé en triplicat, le résultat correspondant à la moyenne de ces valeurs.

I.2.3.2. Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été réalisées par le Service Central d'Analyses du CNRS de Solaize (69). Les analyses de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote, de souffre et cendres (résidus) ont été réalisées d'après le "protocole de microanalyse élémentaire". La technique est fondée sur la méthode de Dumas et Pregl :

- Carbone et Hydrogène : l'échantillon est pyrolisé à 1050 °C sous courant d'hélium et d'oxygène. Le dioxyde de carbone et l'eau formés sont quantifiés par catharométrie (conductibilité thermique)
- Oxygène : l'échantillon est pyrolisé à 1050 °C sous courant d'azote. L'oxygène des composés de pyrolyse obtenu est transformé en monoxyde de carbone par passage sur du charbon actif à 1120 °C. Le monoxyde de carbone obtenu est quantifié par un détecteur spécifique infrarouge.
- Azote : l'échantillon est pyrolisé à 1050 °C sous courant d'hélium et d'oxygène. Les différents oxydes d'azotes produits sont réduits en azote moléculaire sur du cuivre actif avant d'être quantifiés par catharométrie.
- Soufre : l'échantillon est pyrolisé à 1350 °C sous courant d'oxygène. Le dioxyde de soufre formé est quantifié à l'aide d'un détecteur spécifique infrarouge.
- La détermination du taux de cendres (résidus) est déterminée par gravimétrie après combustion totale de l'échantillon à 900 °C sous courant d'oxygène pur.

L'incertitude de la méthode est de 0,3 % de la valeur nominative et la limite de détection est variable selon la matrice des échantillons (généralement 0,3 %).

I.2.3.3. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les mesures de l'absorbance UV ou visible ont été réalisées dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm avec un spectrophotomètre UV-visible PERKIN-ELMER LAMBDA 11, piloté par un ordinateur à l'aide du logiciel UV WINLAB LAMBDA 11. Les solutions ont été préparées un jour avant les analyses par dissolution de 10 mgC.l^{-1} de MOD dans de l'eau

déionisée ultrapure et tamponnée à pH 7,9 par ajout de tampon hydrogénocarbonate ([$NaHCO_3$]=0,05M, HCl 30 % Suprapur). Le spectre des échantillons (COD= 10 $mgC.l^{-1}$) a été enregistré de 200 à 800 nm. Les résultats sont présentés soit sous forme de spectres continus soit sous la forme de SUVA ("Specific UV Absorbance") qui correspond au rapport de l'absorbance UV à une longueur d'onde donnée sur la concentration en COD (selon la norme 415.3 recommandée par l'U.S. EPA : United State Environmental Protection Agency, 2005). Les SUVA sont exprimés en $m^{-1}.l.mgC^{-1}$. Chaque mesure a été effectuée en triplicat. Un coefficient de variation sur la moyenne variant de 0,1 % à 6 %, a été mesuré pour l'absorbance des différentes fractions. Il peut s'expliquer par la difficulté d'obtenir des valeurs de blancs exactement identiques. Cet écart est d'autant plus grand pour les longueurs d'excitation fortes (visible 500 – 800 nm) c'est-à-dire pour les valeurs d'absorbance faibles. Les valeurs de SUVA à 254 nm, ne sont donc que très faiblement affectées (0,1 %) par cette variation.

I.2.3.4. Spectroscopie de fluorescence moléculaire

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à partir des solutions utilisées pour l'absorbance UV dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm avec un spectrofluorimètre JASCO FP-750 piloté par un ordinateur à l'aide du logiciel SPECTRA MANAGER. La répétabilité des mesures de fluorescence a été testée avec 10 enregistrements de spectres d'émission (λ_{ex} = 370 nm) sur le même échantillon (HPOA1). L'intensité maximum (I_{max}) a été mesurée pour le pic des substances dites « humiques » à λ_{em} = 470 nm. L'appareil donne des résultats similaires, avec un coefficient de variation sur la moyenne inférieur à 2 % (CV calculé avec un écart-type suivant la méthode dite avec biais ou « n-1 »).

Plusieurs méthodes de mesures de fluorescence ont été appliquées avec différents paramètres :

- *fluorescence d'émission simple* : longueur d'onde d'excitation (couramment utilisée dans la littérature) étudiée = 280, 313 et 380 nm, domaine étudié 300 – 600 nm, vitesse 500 nm/min, pas de 1 nm.

- *fluorescence synchrone* : écart fixe entre longueur d'onde d'émission et d'excitation = 20, 40, 60 nm domaine étudié 220 – 600 nm, vitesse 500 nm/min, pas de 1 nm.

- *fluorescence trois dimensions* : domaine d'émission étudiée 250 à 600 nm, domaine d'excitation étudié 220 – 500 nm, pas de 10 nm en émission, vitesse 500 nm/min.

Des phénomènes de diffusion du solvant observés sur nos spectres peuvent être corrigés par soustraction du spectre du solvant seul. Mais cette soustraction seule, ne permet pas toujours d'éliminer complètement les pics de diffusion de l'eau (Rayleigh et Raman). Ils nécessitent différents facteurs de correction. En effet, ces pics prennent différentes intensités selon les mesures, du fait de légères variations de pH, de température et de concentration des solutions. Il a été choisi de présenter les spectres d'émissions simples et synchrones corrigés du solvant et les spectres 3D sans cette correction. Les spectres présentés ne sont pas corriger électroniquement des caractéristiques techniques de l'appareil par absence de ces données. S'il est difficile de comparer les résultats avec la littérature en revanche nos spectres peuvent être comparés entre eux.

I.2.3.5. Spectroscopie InfraRouge (IR) à transformée de Fourrier (IRTF)

Des pastilles de 10 mm ont été confectionnées à l'aide d'une presse hydraulique en mélangeant 2 mg d'échantillon de MOD lyophilisée à du bromure de potassium anhydre (KBr). Les spectres sont enregistrés à température ambiante dans la gamme 400-3800 cm^{-1} avec une résolution de 4 cm^{-1} à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN ELMER SPECTRUM BX à transformée de Fourier piloté par un ordinateur grâce au logiciel SPECTRUM (version

2.0). Dans un but comparatif, tous les spectres ont été normalisés après acquisition avec une absorbance maximale de 1.

I.2.3.6. Dosage des fonctions acido-basiques

Le stand de titration utilisé pour réaliser ces dosages acido-basiques est constitué des éléments suivants:

- deux titrateurs TITRINO 785 DMP (METROHM) associant chacun un potentiomètre (une entrée électrode de référence, deux indicatrices) à une burette automatique d'ajout (1 µl à 10 ml)
- un système d'agitation (METROHM 728)
- une cellule thermostatée à 25 ± 0,1°C en verre (volume d'échantillon: 20 à 200mL)
- électrodes de pH (METROHM) et de référence $Ag_{(s)}/AgCl_{(s)}/KCl$ (3 $mol.l^{-1}$) (METROHM)
- contrôle de ces appareils par le logiciel TIAMO 1.2 (METROHM)

Les titrations des fractions de MOD ont été effectuées sous flux d'azote de qualité scientifique (Linde, pureté 6.0) et sous agitation respectivement afin d'éliminer les carbonates et d'assurer un équilibre rapide. Les valeurs du pH sont obtenues par calcul à partir des potentiels mesurés (mV). Les électrodes de pH utilisées sont calibrées régulièrement par une titration jusqu'à pH 12 de 50 ml d'une solution standard d'acide nitrique 0,01 $mol.l^{-1}$ avec les conditions limites suivantes pour chaque mesure de pH: variation de potentiel < 0,5 $mV.min^{-1}$ ou à défaut un temps de mesure = 300 s (suivant la zone de pH). Une régression linéaire du potentiel en fonction du pH calculée à partir de l'activité du proton permet d'obtenir les paramètres de conversion potentiel-pH. Avant chaque titration les ponts salins $NaNO_3$ (même concentration que la force ionique étudiée 0,1 $mol.l^{-1}$) des électrodes sont changés. Avant chaque calibration les ponts salins de chlorure de potassium des électrodes sont changés. Pour réaliser la titration, une vingtaine de milligrammes de MOD sont dissous dans 50 ml de nitrate de sodium 0,1 $mol.l^{-1}$ (Suprapur). Le pH est stabilisé à une valeur de 10 pendant 3 heures à l'aide d'une solution standard d'hydroxyde de sodium 0,1 $mol.l^{-1}$ (Titrisol) afin de s'assurer de la dissolution complète de MOD. Le pH est ensuite redescendu à 3 à l'aide d'une solution standard d'acide nitrique 0,1 $mol.l^{-1}$ (Titrisol) et maintenu pendant 1 heure. Ensuite, par des incréments variables (10 µl à 100 µl), le pH est porté à 11,5 avec les mêmes conditions limites de mesures que lors de la calibration (0,5 $mV.min^{-1}$ ou 300 s suivant la zone de pH). Le temps total maximal d'une titration est de 9 heures pour des échantillons présentant des densités élevées en sites acides.

Deux méthodes de traitement des résultats ont été appliquée au même jeu de données afin de déterminée la teneur en site acido-basiques de chacune des fractions.

La détermination des concentrations en sites acido-basiques à partir du volume de soude versé est effectuée à partir des hypothèses suivantes :

- les fonctions carboxyliques sont considérées comme totalement neutralisées à pH 8,
- la moitié des fonctions phénoliques est supposée être dosée entre pH 8 et pH 10 (Bowles *et al.*, 1989 ; Thurman, 1985). Cette approximation est nécessaire pour tenir compte des groupements phénoliques présentant des pKa plus élevés (jusqu'à 13), domaine dans lequel les incertitudes dues à la calibration de l'électrode sont très importantes. Un inconvénient de cette méthode est la prise en compte des esters qui s'hydrolysent à pH basique.

Les résultats sont exprimés en milli-équivalent de groupes fonctionnels acido-basiques par gramme de matière organique (ou par gramme de carbone). Compte tenu des hypothèses retenues, la méthode est bien adaptée pour le dosage des fonctions carboxyliques, en revanche pour les fonctions phénoliques, les résultats obtenus doivent être utilisés comme des données semi-quantitative ou avec prudence (Bowles *et al.*, 1989).

Le fait de décrire les propriétés acido-basiques des MOD par les groupements carboxyliques et phénoliques néglige totalement les autres sites acido-basiques tels que les amines. De plus l'application d'un facteur 2 dans l'estimation de la concentration en sites phénoliques semble complètement arbitraire.

C'est pourquoi, une autre méthode de traitements des résultats a été appliquée afin de décrire chaque fraction de MOD par un continuum de deux sites acido-basiques avec des forces, des concentrations en sites et des paramètres d'hétérogénéité différents. Pour cela la charge des MOD a été calculée à chaque mesure du pH en tenant compte des différents ajouts d'acide et de soude initialement ajoutés pour faciliter la solubilisation des extraits :

$$Q = Q^0 + \left[\frac{(V_{OH} + V_{sOH} - V_{sH}) \times C_{OH}}{V_{tot}} - \frac{V_{stot} \times (C_{iH} - C_{iOH})}{V_{tot}} - C_H + C_{OH} \right] \times \frac{V_{tot}}{m}$$

$$\text{Avec } Q^0 = \frac{10^{-pHi} - \frac{10^{-14}}{10^{-pHi}}}{a} \times \frac{V_{tot}}{m},$$

où *Q* représente la charge en mol.kg^{-1} de MOD, *m* pour la masse de MOD utilisée en g, *a* étant le coefficient d'activité obtenu à partir de l'équation de Davies, l'indice *i* référant aux paramètres à l'instant où seule la MOD est ajoutée à l'électrolyte support, l'indice *s* référant à la situation après ajout d'acide et de base pour la solubilisation.

Cette charge a été ensuite modélisée en fonction du pH avec l'isotherme Langmuir-Freundlich, premier bloc constitutif du modèle NICA-Donnan (décrit dans le chapitre II) à l'aide du logiciel FIT afin de déterminer des teneurs en site acido-basique ainsi que leur pKa.

I.2.3.7. Dosage des substances humiques dites substances réfractaires

Les analyses des substances réfractaires ont été réalisées dans l'ancien laboratoire CABE (CABE) à Genève (Suisse) et au Laboratoire de Chimie Analytique UMR-CNRS 6521 à Brest (29). Cette méthode est basée sur la redissolution cathodique des complexes du molybdène (VI) par les acides humiques ou fulviques précédemment adsorbés sur la goutte de mercure à pH acide.

Toutes les solutions ont été préparées dans de l'eau déionisée ultrapure. La vaisselle a été lavée avec des solutions d'acide nitrique 10 % (v/v) et d'hydroxyde de sodium 0,5 mol.l^{-1} puis rincée avec de l'eau déionisée ultrapure. Les échantillons sont pipetés (10 ml), introduits dans une cellule voltammétrique thermostatée et le pH est ajusté à 2 par ajout de 10 µl d'acide chlorhydrique (10 mol l^{-1}). Afin de garantir la formation et l'absorption des complexes du molybdène, un ajout de Mo(VI) dont la concentration finale de 10 µg.l^{-1} est effectué. La solution est dégazée avec du diazote pendant 10 min. Le potentiel est ensuite fixé à -0.2 V pendant que la solution est agitée. Après l'étape de déposition, l'agitation est arrêtée pendant un temps d'équilibre de 20 s. Le balayage en mode square-wave voltammetry (SWV) est initié dans la direction des potentiels négatifs avec les conditions suivantes : fréquence 50 Hz,

saut de potentiel 1 mV et une amplitude de 50 mV et une amplitude de pulsation de 50 mV. La méthode des ajouts standards est utilisée pour la calibration.

I.2.3.8. Détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote

La détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote a été effectuée au laboratoire de Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux (BIOEMCO) à Thiverval-Grignon (78). Les rapports isotopiques exprimés en $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ ont été déterminés sur une même analyse par quantification de la teneur respectivement en ^{13}C et ^{15}N du CO_2 et des oxydes d'azote réduits en N_2, provenant d'un analyseur élémentaire CHN (CHN NA 1500, Carlo Erba) couplé avec un spectromètre de masse isotopique (VG Sira 10). L'erreur sur la mesure est de 0,1 ‰.

I.2.3.9. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance

Les analyses de chromatographie d'exclusion de taille à haute performance (HPSEC) ont été réalisées au laboratoire de chimie de l'eau et de l'environnement (LCEE) à Poitiers (86). Ces expériences ont été menées sur les échantillons simplement dissous dans de l'eau déionisée ultrapure afin d'apprécier la distribution de taille des MOD qui absorbent en UV. La phase stationnaire est une colonne d'exclusion stérique AIT SEP-SEC 2000S 5 µm de dimensions internes 300 mm × 8 mm. La phase mobile est une solution d'acétate de sodium à 0,82 $g.l^{-1}$ ajustée à pH 7 avec de l'acide acétique. Le débit d'analyse est de 1 $ml.min^{-1}$, le volume d'injection de 500 µL et le temps d'analyse par échantillon de 20 minutes. La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur UV-VIS (Waters™ 486 Tunable Absorbance Detector, λ=254 nm) La colonne a été calibré l'aide de carmin d'indigo (420,36 Da) et d'étalons PSS (PolyStyrène Sulfonate : 4300, 6800 et 13000 Da).

I.2.3.10. Pyrolyse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les analyses de pyrolyse-CG-SM ont été menées au laboratoire de Biogéochimie et Ecologie des Milieux Continentaux (BIOEMCO) à Thiverval-Grignon (78). Une nacelle ferromagnétique contenant environ 1 mg d'échantillon sec est placée dans un pyrolyseur GSG 1040 PSC dont la sortie est reliée à un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard 5890), couplé à un spectromètre de masse à quadrupole (Hewlett-Packard- HP 5889). L'enceinte de pyrolyse est chauffée à 300 °C. La nacelle est portée à sa température de Curie, 650 °C en 0,15 s pyrolysant l'échantillon pendant 10 s. Les produits de pyrolyse ont été séparés sur une colonne capillaire de silice SolGelWax (SGE 0,32 mm, épaisseur de film de 0,5 µm) de 60 m, avec comme gaz vecteur de l'hélium. Une colonne capillaire polaire a été choisie pour la séparation chromatographique des produits de pyrolyse, afin d'obtenir une meilleure séparation des composés polaires provenant des sucres, des protéines et des lignines. Les composés moins polaires comme les alcanes/alcènes sont plus difficilement observés sur cette colonne. La température du four du CG a été programmée avec une augmentation de la température de 30 à 280°C avec un gradient de 2°$C.min^{-1}$ et maintenu à 280°C pendant 15 min. Les ions de masse comprise entre un rapport m/z = 20 et 450 (avec m : masse de l'ion et z : la charge de l'ion) sont détectés à 1 $acquisition.s^{-1}$. Les composés ont été identifiés par leur spectre de masse en mode impact électronique (70 eV), leur temps de rétention en CG et la comparaison avec des spectres de masse de la bibliothèque (Wiley). Un certain nombre de produits de pyrolyse a été identifié pour chaque échantillon, certains d'entre eux étant spécifiques d'une source macromoléculaire. L'aire des pics a été intégrée avec le logiciel Chemstation (Version C.01.05) sur la trace du courant ionique total. Les

chromatogrammes ont ainsi été interprétés qualitativement, mais aussi semi-quantitativement par une estimation des parts des sucres, protéines, sucres aminés et composés aromatiques polyhydroxylés dans l'échantillon grâce au calcul semi-quantitatif. Cette méthode est basée sur l'intégration des aires des pics des fragments principaux. Par exemple, pour comparer la part relative de sucres observés en pyrolyse dans différents échantillons on calculera le rapport entre la somme des aires des pics des fragments ayant été identifiés comme appartenant aux sucres et la somme totale des aires des pics principaux intégrés.

I.3. RESULTATS

Ce paragraphe présente tout d'abord les résultats quantitatifs des campagnes d'extraction de la MOD qui ont été effectuées dans notre laboratoire. La suite regroupe l'ensemble des résultats obtenus lors de la caractérisation de toutes ces fractions.

I.3.1. Extraction de la MOD

I.3.1.1. Concentration de la MOD par osmose inverse

Le Tableau 6 présente les teneurs en COD ainsi que les volumes des différents compartiments isolés après filtration sur membrane d'osmose inverse. L'éluat sodique contient la MOD retenue au niveau des membranes lors du processus de concentration et libérée après rinçage des cartouches à la soude 0,05 mol.l^{-1}. Des mesures du COD effectuées sur les eaux brutes et les eaux adoucies en amont du pilote d'osmose inverse dans la chaîne de concentration n'ont révélé aucun effet de l'adoucisseur sur la concentration en COD.

Tableau 6 : COD et volume des fractions obtenues après filtration sur membrane d'osmose inverse

Source	Eau brute		Perméat		Concentrat		Eluat sodique	
	COD (mgC.l^{-1})	Volume (l)	COD (mgC.l^{-1})	Volume (l)	COD (mgC.l^{-1})	Volume (l)	COD (mgC.l^{-1})	Volume (l)
Méry sur Marne hiver	2,0	1200	< LDQ	1150	43,5	50	7,1	20
Méry sur Marne été	2,0	1000	< LDQ	960	40,1	40	16,2	20
STEP Seine-Aval 1	38,7	228	< LDQ	211	383,6	17	176,4	9
STEP Seine-Aval 2	17,4	540	< LDQ	507	172,8*	33	172,8*	20
Andrésy	4,1	800	< LDQ	759	60,6	41	30,4	18
Méricourt	4,0	700	< LDQ	660	47,9	40	81,0	10

* : concentrat et éluat sodique mélangés avant mesure de COD

LDQ : Limite de quantification soit 0,5 mgC.l^{-1}

Pour toutes ces expériences, les fuites en COD dans le perméat se trouvent systématiquement en dessous de la limite de quantification du CODmètre (0,5 $mgC.l^{-1}$), ce qui montre la très bonne efficacité des membranes d'osmose inverse à retenir la MOD. Le Tableau 7 présente le bilan massique du COD et le rendement de l'osmose inverse. Ce rendement est égal à la somme des masses de carbone des compartiments récupérés c'est-à-dire du concentrat et de l'éluat sodique divisée par la concentration en COD dans l'échantillon brut. Etant donné que les valeurs des concentrations en COD dans le perméat sont inférieures à la limite de quantification, la masse de COD perdue dans le perméat a été estimée comme la différence entre la masse totale de COD et la somme des masses de carbone calculées pour les autres compartiments (concentrat, éluat sodique et pertes sur membranes après rinçage). Les pertes sur les membranes ont été calculées à partir des COD mesurés sur les eaux de rinçage (solutions acides et basiques cf. § I.2.1.2) utilisées pour le lavage après utilisation du pilote d'osmose inverse. La perte par adsorption sur les membranes reste la plus importante.

Tableau 7 : Efficacité de l'osmose inverse pour l'extraction des MOD

Site	Taux de récupération du COD (%)					
	Perméat (% estimé)	Concentrat	Eluat sodique	Perte sur membrane	Total*** (quantifié)	Rendement*
Méry sur Marne hiver	2	91 ± 6	6 ± 3	1 ± 2	98 ± 11	97 ± 9
Méry sur Marne été	1	80 ± 4	16 ± 3	3 ± 2	99 ± 9	96 ± 7
STEP Seine-Aval 1	1	74 ± 8	18 ± 4	7 ± 2	99 ± 14	92 ± 12
STEP Seine-Aval 2	0	97 ± 3**		3 ± 1	100 ± 4	97 ± 3
Andrésy	2	76 ± 2	17 ± 4	5 ± 4	98 ± 10	93 ± 6
Méricourt	3	68 ± 2	29 ± 7	2 ± 2	97 ± 11	97 ± 9

* rendement calculé en prenant en compte les compartiments récupérés : le concentrat et l'éluat sodique
** concentrat et éluat sodique mélangés avant mesure du COD
*** Total (quantifié) = somme (concentrat + éluat sodique + perte sur membrane)

La quantité de MOD isolée dans le concentrat (de 68 à 91%) est inférieure à la valeur attendue, les pertes estimées dans le perméat variant approximativement entre 1 et 3 %. Le rinçage de la membrane à la soude permet de récupérer une fraction non négligeable de la MOD retenue par des phénomènes d'adsorption et de précipitation, de l'ordre de 6 à 29 % suivant les échantillons. Les pertes sur la membrane, c'est-à-dire la MOD encore retenue sur la membrane après rinçage sodique constituent une faible part du bilan massique entre 1 et 7 %. En prenant en compte les teneurs en COD contenues dans l'ensemble des compartiments quantifiés, le bilan massique établi pour chaque eau est proche de 100 %. Les rendements des opérations de concentration par filtration sur des membranes d'osmose inverse pour chaque échantillon étudié varient entre 92 et 97 %, démontrant l'efficacité de cette technique pour récupérer la quasi-totalité du COD dans un volume restreint en accord avec la littérature (Clair *et al.*, 1991 ; Serkiz et Perdue, 1990 ; Violleau, 1999).

I.3.1.2. Fractionnement et extraction de la MOD par adsorption sur les résines DAX-8 et XAD-4

Tous les rendements présentés dans ce paragraphe ont été calculés à partir du COD de l'échantillon en entrée des résines (et non pas du COD de l'eau brute). Les bilans proposés sont donc spécifiques de cette étape.

I.3.1.2.1. Adsorption de la MOD sur les résines DAX-8 et XAD-4

Le fractionnement de la MOD en trois classes de composés, selon des critères de polarité basés sur les propriétés adsorbantes des résines est d'ordre purement opérationnel. On distingue les fractions hydrophobes (HPO) et transphiliques (TPI) retenues respectivement sur les résines DAX-8 et XAD-4 à pH acide et les MOD hydrophiles (HPI) non retenues sur ces deux résines dans les mêmes conditions expérimentales.

Le Tableau 8 présente la répartition relative (distribution du COD) de ces différentes fractions pour les échantillons étudiés. Celle-ci est établie en calculant le rendement d'adsorption qui correspond à la quantité de COD retenue par chaque résine par rapport à la quantité initiale de carbone contenue dans l'échantillon avant le fractionnement. Ce rendement donne la proportion relative des fractions HPO et TPI alors que la fraction HPI correspond au pourcentage de COD contenu dans l'effluent de la résine XAD-4.

D'une manière générale lorsque la fraction HPO est la plus importante la fraction HPI est minoritaire et inversement, variant chacune respectivement de 35 % à 69% et de 10 % à 45 %. La fraction TPI varie proportionnellement beaucoup moins en fonction de la nature des échantillons : de 18 % à 23 % du COD.

Tableau 8 : Distribution du COD des eaux étudiées

Site	Fraction HPO (%)	Fraction TPI (%)	Fraction HPI (%)
Méry sur Marne hiver	69	21	10
Méry sur Marne été	62	15	23
STEP Seine-Aval 1	35	20	45
STEP Seine-Aval 2	37	21	42
Andrésy	42	23	35
Méricourt	51	18	31

Les distributions du COD des effluents de STEP concordent avec la littérature (Imai *et al.*, 2002 ; Ma *et al.*, 2001) révélant une forte présence (> 60%) de substances non humiques (non hydrophobes). Les distributions du COD des eaux de rivières de Méry sur Marne, Andrésy et Méricourt concordent également avec la littérature pour des eaux de rivières (Croué, 2004 ; Violleau, 1999) avec toutefois une forte proportion de composés hydrophiles pour les échantillons d'Andrésy et de Méricourt. Cette forte proportion avait également été montrée par Violleau (1999) dans un échantillon d'eau de Seine prélevé à Vigneux (site en amont de Paris mais déjà fortement urbanisé).

I.3.1.2.2. Elution des MOD adsorbées sur les résines : bilan d'extraction

Le Tableau 9 présente l'efficacité de la procédure d'extraction des fractions HPO et TPI retenues respectivement sur les résines DAX-8 et XAD-4. Dans ce tableau ont été calculés :

- les rendements d'extraction des fractions HPO et TPI qui correspondent à la quantité de COD récupéré (calculée à partir de la masse d'extrait lyophilisé et de la teneur en carbone déterminée par analyse élémentaire) sur la quantité de COD adsorbé multiplié par 100.
- le rendement global d'extraction du COD égal à la somme des rendements d'extraction de chaque fraction multipliés respectivement par le pourcentage de distribution du COD de chaque fraction.

Tableau 9 : Rendements d'extractions des fractions HPO et TPI et rendements globaux d'extraction du COD par les résines DAX-8 et XAD-4

Site	Rendement d'extraction de la fraction HPO (%)	Rendement d'extraction de la fraction TPI (%)	Efficacité globale d'extraction du COD par les résines (%)
Méry sur Marne hiver	90 ± 4	88 ± 5	81
Méry sur Marne été	90 ± 6	95 ± 6	70
STEP Seine-Aval 1	97 ± 4	97 ± 5	53
STEP Seine-Aval 2	95 ± 4	98 ± 5	56
Andrésy	88 ± 6	86 ± 5	57
Méricourt	90 ± 6	92 ± 6	62

Les rendements d'extraction des fractions HPO et TPI sont satisfaisants variant entre 86 % et 97 % comme il a été montré par Violleau (1999). L'efficacité de l'utilisation des résines DAX-8 et XAD-4 en série pour extraire le COD varient entre 53 % et 81 % qui quoique un peu faible pour les eaux de la STEP Seine-Aval sont des valeurs classiquement retrouvées dans la littérature (Martin-Mousset *et al.*, 1997 ; Violleau, 1999). Les eaux de la STEP et de la Seine en aval de Paris, présentent une forte proportion de MOD hydrophile non retenue par les résines DAX-8 et XAD-4 montrant la nécessité d'extraire cette fraction non négligeable dans notre cas d'étude.

I.3.1.3. Extraction de la MOD hydrophile

Le principe de la procédure d'extraction des MOD HPI a été présenté sur la Figure 5. Etant donnée la complexité des étapes de purification à mettre en œuvre, très peu d'auteurs se sont intéressés à l'extraction de ce type de MOD. La principale difficulté de l'extraction de la MOD HPI consiste à séparer les composés organiques des espèces minérales.

Dans le cadre de cette étude, ce protocole a été appliqué pour extraire les fractions HPI des effluents de la station d'épuration Seine-Aval et des eaux de la Seine prélevées à Andrésy et Méricourt. Les fractions HPI n'ont pas été extraites des eaux de la Marne prélevées à Méry sur Marne en raison de leur faible quantité.

Tableau 10 : Efficacité du protocole d'extraction des MOD HPI

Site	Rappel proportion en MOD HPI (% du COD)	Rendement d'extraction (%)*
STEP Seine-Aval 1	45	62 ± 6
STEP Seine-Aval 2	42	20 ± 5
Andrésy	35	25 ± 4
Méricourt	31	30 ± 4

* : calculé à partir de la masse et de la teneur en carbone de l'extrait lyophilisé et de la concentration en COD dans l'effluent de la résine XAD-4.

Les résultats du Tableau 10 montrent que les procédures de purifications des MOD HPI entraînent des pertes de MOD non négligeables. Cependant, un rendement de récupération du COD de 62% a été observé pour l'effluent de la STEP Seine-Aval. Pour les autres échantillons, de 20 à 30 % de la MOD contenue dans l'effluent de la résine XAD-4 a pu être récupérée confirmant la difficulté de cette phase de la procédure d'extraction. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues par Violleau (1999). Néanmoins comme il sera montré par ailleurs, la qualité c'est-à-dire la pureté des fractions HPI extraites lors de cette étude s'avèrent supérieures à celles obtenues par Violleau (1999).

I.3.1.4. Bilan global d'extraction de la MOD issue des sites d'étude

Le Tableau 11 dresse un bilan de matière par rapport au COD des eaux brutes permettant ainsi d'obtenir une information globale sur l'efficacité du protocole d'extraction des MOD (pour rappel, les bilans présentés dans les paragraphes précédents ont été établis en considérant les différentes phases comme indépendantes les unes des autres).

Tableau 11 : Bilan global de l'extraction de la MOD des eaux étudiées

Site	Rendement d'osmose inverse	Fraction HPO (%)	Fraction TPI (%)	Fractions HPI récupérées (%)	Rendement global (%)
Méry sur Marne hiver	97 ± 9	90 ± 4	88 ± 5	n.e.	78
Méry sur Marne été	96 ± 7	90 ± 6	95 ± 6	n.e.	67
STEP Seine-Aval 1	92 ± 10	97 ± 4	97 ± 5	62 ± 6	75
STEP Seine-Aval 2	97 ± 3	95 ± 4	98 ± 5	20 ± 5	62
Andrésy	93 ± 6	88 ± 6	86 ± 5	25 ± 4	61
Méricourt	97 ± 9	90 ± 6	92 ± 6	30 ± 4	70

n.e. : fraction non extraite

Les rendements globaux d'extraction comprenant la concentration par osmose inverse, l'extraction des MOD HPO et TPI sur résines DAX-8 et XAD-4 et l'extraction des MOD HPI varient entre 61 et 78 %. Ces résultats montrent l'efficacité de ce protocole pour extraire la majorité du COD des eaux peu et fortement urbanisées, quelque soit la nature des eaux ou la concentration du COD des eaux brutes.

Pour les eaux de Marne, le rendement d'extraction globale est satisfaisant alors que la fraction HPI n'a pas été extraite. Ceci s'explique par le caractère très hydrophobe des MOD de ces eaux et de la facilité à extraire cette fraction avec un bon rendement. Concernant les eaux de la STEP Seine-Aval, le protocole d'extraction des MOD HPI bien que lourd et peu aisé, s'avère nécessaire puisque les résines DAX-8 et XAD-4 ne permettent d'isoler qu'une cinquantaine de pourcent du COD initial.

Les pertes majeures occasionnées par ce type de protocole concernent la fraction HPI où la coprécipitation avec les sels et la multitude d'étapes peut entraîner jusqu'à 80 % de perte de la fraction HPI représentant 34 % du COD de l'eau brute. Les pertes liées à l'extraction sur résines et la concentration par osmose inverse n'excèdent pas 10 % du COD de l'eau brute.

I.3.2. Caractérisation des fractions de MOD

L'objectif de cette partie de notre étude a été de comparer les caractéristiques structurales et fonctionnelles des MOD extraites à l'aide d'outils analytiques divers en vue de fournir des informations concernant l'interaction des MOD avec les métaux.

I.3.2.1. Analyse élémentaire

Les Tableau 12 et Tableau 13 rassemblent respectivement les résultats d'analyse élémentaires exprimés en pourcentage massique et les rapports molaires C/H, C/O, C/N et C/S des différentes fractions de MOD isolées au cours de notre étude et des deux substances humiques de référence obtenues dans un but comparatif.

Dans l'ensemble, les fractions HPO et TPI présentent un bilan global de l'analyse élémentaire proche de 100 % (en tout cas supérieur à 92 % excepté TPIMT) avec un taux de résidus en général inférieur à 5 % ce qui souligne l'efficacité du protocole de fractionnement sur résines DAX/XAD à séparer les espèces organiques des espèces inorganiques. Le carbone, l'hydrogène, l'oxygène, l'azote sont, comme attendu, les éléments essentiels. Les fractions HPOM1, HPOM2, TPIAN et TPIMT présentent cependant des valeurs de résidus plus élevées variant de 7,8 % à 14,6 %. Le bilan global pour les fractions HPI est proche de 100 % et supérieur à 93% pour HPIMT. Les valeurs en résidus de ces fractions oscillant entre 5 % et 13 % sont dans l'ensemble quelque peu supérieures à celles des fractions HPO et TPI soulignant la difficulté d'isoler les molécules organiques hydrophiles des sels minéraux. Ces valeurs de résidus restent néanmoins plus faibles que celles de Violleau (1999). En effet dans le cadre de son étude excepté pour une fraction, les valeurs des résidus des fractions HPI varient entre 10 et 46 %. Ceci peut être expliqué par la nature différente de nos échantillons (plus hydrophiles) mais montre également les efforts portés à la purification des fractions HPI dans cette étude notamment par l'amélioration du protocole de purification grâce à l'ajout d'une étape de distillation zéotrophique dans l'acétonitrile.

Tableau 12 : Analyse élémentaire des fractions de MOD précédemment isolées et des deux substances humiques de références

Fraction	C %	H %	O %	N %	S %	Résidus %	Total
SRHA	52,6	4,3	42,0	1,2	0,5	1,0	100,7
SRFA	52,3	4,4	43,0	0,7	0,5	0,6	101,4
HPOM1	45,0	5,5	35,7	3,0	1,0	9,1	99,3
TPIM1	46,0	5,3	36,7	4,8	1,8	2,2	96,8
HPOM2	40,4	4,5	29,7	2,8	1,6	12,5	91,5
TPIM2	47,3	5,6	37,0	4,9	1,5	4,0	100,3
HPOA1	53,6	6,5	27,9	5,7	2,6	2,9	99,1
TPIA1	48,4	6,4	28,8	8,4	2,1	4,7	98,7
HPIA1	43,8	7,1	29,4	12,3	2,1	5,0	99,8
HPOA2	54,1	6,4	29,2	4,4	2,7	4,5	101,2
TPIA2	47,3	6,1	34,1	6,9	2,2	2,5	99,0
HPIA2	40,1	5,9	34,0	10,6	2,7	10,4	103,7
HPOAN	50,2	5,1	32,9	3,4	1,9	5,0	98,3
TPIAN	41,4	4,6	35,9	4,9	0,8	14,6	102,4
HPIAN	34,1	6,9	35,2	10,2	1,7	10,1	98,3
HPOMT	46,5	5,0	31,0	3,1	2,3	4,7	92,5
TPIMT	35,4	5,0	29,0	5,5	0,8	7,8	83,5
HPIMT	34,2	5,9	29,5	9,9	0,8	13,5	93,3

On observe :

- des ratios C/H, C/O et C/N qui diminuent selon le caractère hydrophobe-hydrophile, c'est-à-dire un enrichissement en azote et en oxygène inversement proportionnelle à l'hydrophobicité,
- des ratios C/H toujours inférieurs à 1 et donc aux ratios des substances humiques de référence,
- des ratios C/S, compris entre 53 et 131 pour les fractions précédemment isolées, qui varient sans tendance significative en fonction de la polarité et restent inférieurs à ceux des substances humiques de référence (260 et 304). Les fractions issues des effluents de STEP présentent les valeurs C/S les plus faibles comprises entre 39 et 63 %.
- des ratios C/O systématiquement plus élevés pour les fractions issues des effluents de STEP comparés aux autres sites de prélèvements.

Ces résultats obtenus pour les fractions HPO, TPI et HPI concordent avec les données de la littérature (Abbt-Braun et Jahnel, 2001 ; Aiken, 1992 ; Croué, 2004 ; Croué *et al.*, 2003 ; Huo *et al.*, 2008 ; Maurice *et al.*, 2002 ; Violleau, 1999)

Le fort taux d'azote (10 %) des fractions HPI a été précédemment observé une fois dans une fraction TPI de la rivière South Plate (Croué *et al.*, 2003) et a été expliqué par une forte présence de structures protéiniques comme il le sera démontré par la suite pour nos fractions.

Tableau 13 : Rapport molaires C/H, C/O, C/N et C/S des fractions précédemment isolées et des deux substances humiques de références

Fraction	C/H	C/O	C/N	C/S
SRHA	1,0	1,7	52,5	260,2
SRFA	1,0	1,6	91,1	303,8
HPOM1	0,7	1,7	17,6	122,6
TPIM1	0,7	1,7	11,1	67,8
HPOM2	0,8	1,8	17,0	67,0
TPIM2	0,7	1,7	11,3	84,8
HPOA1	0,7	2,6	11,1	55,9
TPIA1	0,6	2,2	6,7	62,7
HPIA1	0,5	2,0	4,2	54,7
HPOA2	0,7	2,5	14,3	53,7
TPIA2	0,7	1,8	8,0	57,6
HPIA2	0,6	1,6	4,4	39,1
HPOAN	0,8	2,0	17,3	72,4
TPIAN	0,7	1,5	9,9	131,7
HPIAN	0,4	1,3	3,9	53,0
HPOMT	0,8	2,0	17,5	53,5
TPIMT	0,6	1,6	7,5	112,4
HPIMT	0,5	1,5	4,0	117,1

I.3.2.2. Spectroscopie d'absorption UV-visible

La Figure 12 présente à titre d'exemple les spectres d'absorbance spécifique UV-visible (absorbance normalisée par rapport à la concentration en COD) enregistrés dans un domaine de longueurs d'onde compris entre 200 et 800 nm des fractions de MOD extraites des effluents de la STEP Seine-Aval et des deux substances humiques de références Le domaine compris entre 500-800 nm n'a pas été présenté en raison de l'absorbance très faible des fractions dans ce domaine. Les spectres présentent une allure classique communément rencontrée dans la littérature (Violleau, 1999).

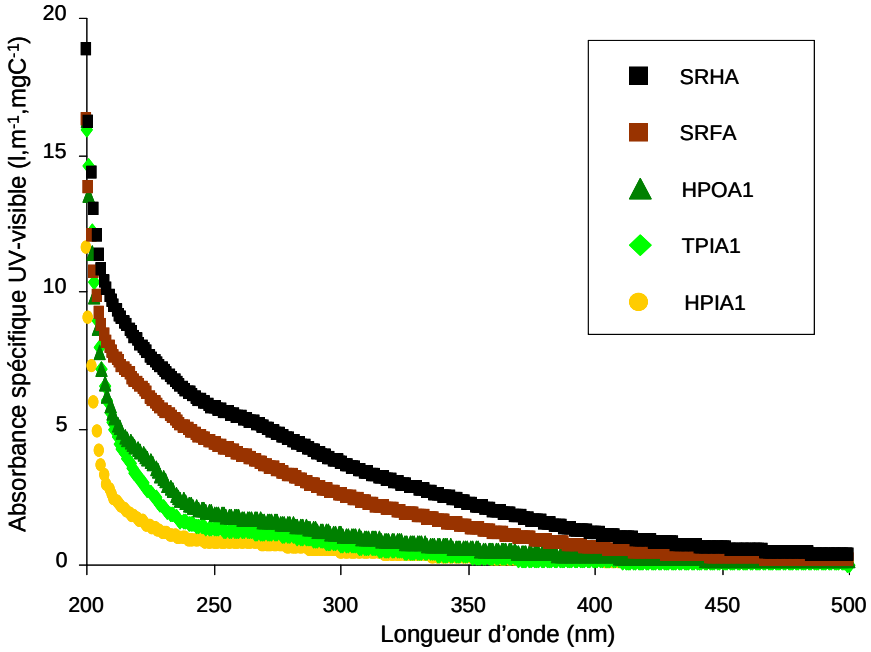


Figure 12 : Absorbance spécifique UV-visible des fractions isolées de la STEP Seine-Aval et des 2 substances humiques de références

L'absorbance dans le domaine de longueur d'onde étudié est principalement attribuée aux chromophores aromatiques contenus au sein de la matrice organique, même si certaines espèces inorganiques tels que les nitrates (Violleau, 1999) peuvent absorber de la lumière jusqu'à environ 230 nm. Dans notre étude la pureté des fractions (même si certaines fractions observent des résidus élevés de 10 %) permet de négliger l'absorbance résultant des éventuelles espèces inorganiques. Etant donnée la complexité de la structure de la MOD et de la diversité des molécules qui la compose, les spectres UV-visible révèlent une large bande d'absorption sans pics caractéristiques globalement comprise 200 nm et 300 nm. Cependant les spectres montrent de légères inflexions dont les maxima sont aux alentours de : 225 nm pour les fractions HPOA1 et TPIA1 et 260 nm pour toutes les fractions, ce qui pourrait indiquer la présence de chromophores spécifiques aux fractions.

Quelle que soit la longueur d'onde considérée, on observe que l'absorbance de la fraction HPOA1 est supérieure à celle de la fraction TPIA1, elle-même supérieure à l'absorbance de la fraction HPIA1. Le Tableau 14 rassemble les valeurs de SUVA à 254 nm (absorbance à 254 nm normalisée par rapport à la concentration en COD) déduite des spectres pour l'ensemble des MOD étudiées. Le paramètre SUVA est considéré comme un bon indicateur de la présence de structures aromatiques (§ I.1.6.3.1) pour les fractions HPO, par contre peu de données bibliographiques sont relatives aux autres fractions.

Pour l'ensemble des échantillons étudiés, le SUVA des fractions diminue dans l'ordre suivant et ce, quelque soit la longueur d'onde choisie :

SUVA HPO > SUVA TPI > SUVA HPI

Des variations importantes de ce paramètre sont observées entre les différentes fractions HPO (de 1,8 à 2,8 $l.m^{-1}.mgC^{-1}$) et TPI (de 1,3 à 2,1 $l.m^{-1}.mgC^{-1}$). Pour les fractions HPI, les valeurs sont plus faibles et comprises entre 0,7 et 1,1 $l.m^{-1}.mgC^{-1}$ (Figure 13).

Ces valeurs de SUVA à 254 nm restent néanmoins beaucoup plus faibles que celle observées pour SRHA et SRFA et plus généralement pour celles des eaux de surface (Violleau, 1999).

Tableau 14 : SUVA à 254 nm des fractions de MOD extraites

Sites	Fraction	SUVA à 254 nm ($l.m^{-1}.mgC^{-1}$)
Substances humiques de références, Suwannee River	SRHA	5,6
	SRFA	4,3
Méry sur Marne hiver	HPOM1	2,7
	TPIM1	2,1
Méry sur Marne été	HPOM2	2,3
	TPIM2	1,8
STEP Seine-Aval 1	HPOA1	2,1
	TPIA1	1,4
	HPIA1	0,8
STEP Seine-Aval 2	HPOA2	1,8
	TPIA2	1,3
	HPIA2	0,7
Andrésy	HPOAN	2,8
	TPIAN	1,5
	HPIAN	0,7
Méricourt	HPOMT	2,2
	TPIMT	1,5
	HPIMT	1,1

Afin de visualiser la dispersion des données, la représentation des données sous forme de boîtes à moustaches est utilisée (Turkey, 1977). Cette représentation illustre quatre valeurs de la distribution: le 1er quartile Q1 (25% des valeurs sont inférieures ou égales à Q1), la médiane Q2, la moyenne et le 3ème quartile Q3 (75% des valeurs sont inférieures ou égales à Q3). Q1 et Q3 correspondent respectivement aux traits inférieur et supérieur de la boîte, tandis que la médiane et la moyenne sont représentées par les traits horizontaux à l'intérieur de la boîte. Les deux moustaches inférieure et supérieure, illustrées par les traits verticaux de part et d'autre de la boîte, délimitent les valeurs dites adjacentes. Dans le cas d'une distribution normale, la zone délimitée par la boîte et les moustaches contient 99% des valeurs (Turkey, 1977). Au delà des valeurs adjacentes, les valeurs sont qualifiées d'extrêmes et sont symbolisées par « ». L'écart interquartile (EIQ), illustré par la longueur de la boîte, délivre une indication de la dispersion des valeurs. Cette variabilité est estimée selon l'EIQ relatif (EIQr = [(Q3-Q1)/médiane] x 100).

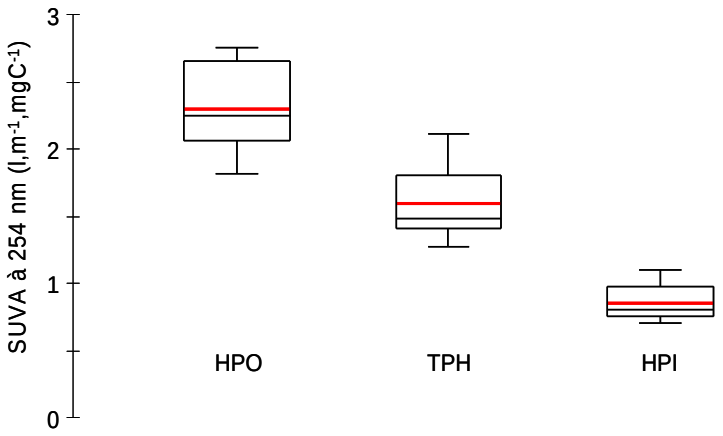


Figure 13 : SUVA à 254 nm des fractions de MOD extraites tout échantillons confondus

I.3.2.3. Spectroscopie de fluorescence moléculaire

Spectroscopie de fluorescence d'émission simple :

Les spectres aux longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} = 313 et 340 nm (non présentés ici) ne permettent pas d'observer de différences significatives entre les différentes fractions. En revanche à 280 nm d'excitation, il est possible d'observer comme il a déjà été noté, les pics d'émission des substances de type humiques (420 et 480 nm) et protéiques (350 nm) (Figure 14). Les pics caractéristiques des protéines sont visibles seulement sur les spectres des fractions isolées des effluents de la STEP Seine-Aval. Le pic représentatif des substances humiques à 480 nm est identifiable sur toutes les fractions HPO, TPI et SH de référence. L'autre pic identifié comme appartenant aux substances humiques à 420 nm est mesurable sur toutes les fractions étudiées. En effet quoique bien plus faible par rapport aux fractions HPO et TPI, il est visible sur les spectres des fractions HPI ce qui démontre le problème d'appellation des pics observés par fluorescence, la fraction HPI étant par définition, exempte de ce « type » de molécules. L'ordre par intensité des pics attribués aux SH est variable : pour SRFA et SRHA le pic le plus intense étant celui situé à 480 nm alors que pour toutes les fractions isolées précédemment le pic le plus intense est celui situé à 420 nm.

Sans pouvoir fournir d'élément d'explication, on observe également une alternance des pics de fluorescence à 420 et 480 nm entre les fractions humiques de références et l'ensemble de nos fractions extraites.

Aux plus faibles longueurs d'ondes (300-350 nm), l'intensité des fractions HPIAN et HPIMT est faible mais néanmoins plus forte que celles des fractions HPO et TPI respectives des mêmes sites. Ceci ne peut être interprété comme une différence en raison de sa faible intensité et de l'erreur possible due à la soustraction de l'interférence liée à la diffusion de l'eau.

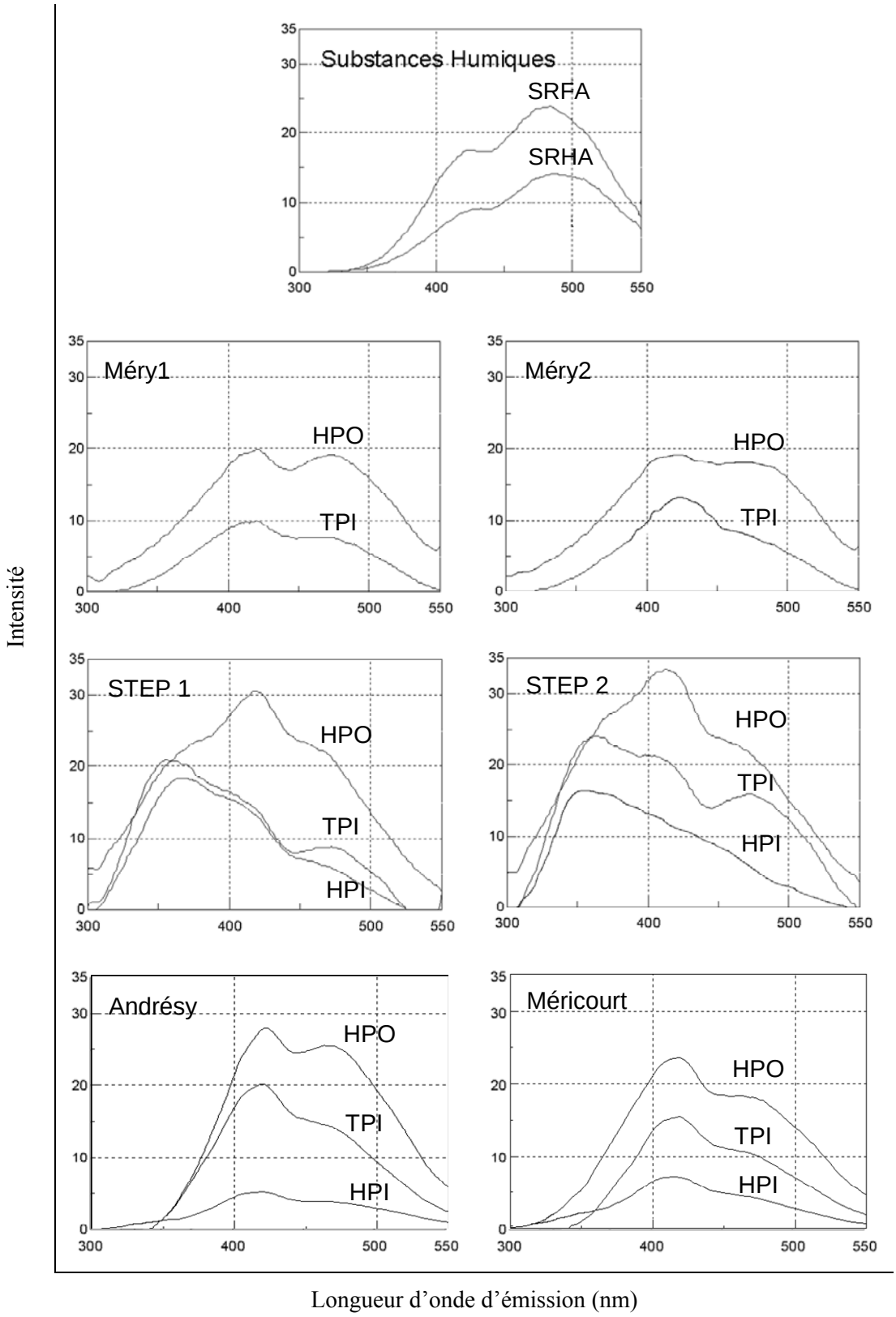


Figure 14 : Spectres de fluorescence d'émission simple (λ_{ex}=280 nm) des fractions isolées (spectres corrigés par soustraction du spectre du solvant, ici l'eau déionisée ultrapure)

Spectroscopie de fluorescence synchrone :

Les spectres de fluorescence synchrone permettent d'observer davantage de pics représentatifs des différentes fractions étudiées et permettent donc une meilleure identification de leurs origines. Des spectres synchrones des différentes fractions ont été enregistrés à différents écarts entre la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission : $\Delta\lambda$ = 20, 40 et 60 nm. La Figure 15 présente ces spectres pour les fractions HPIA1, HPOA1 et HPOM1.

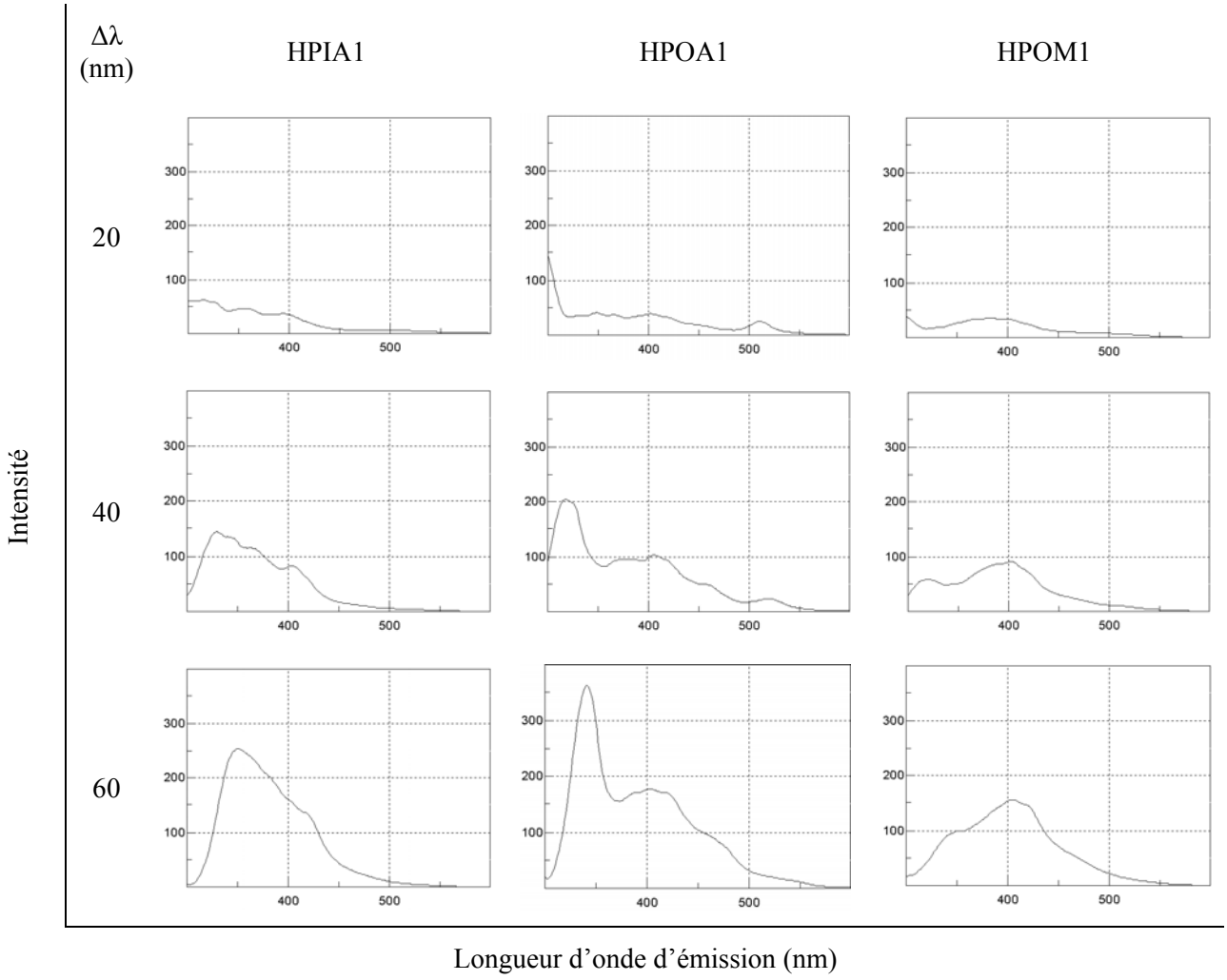


Figure 15 : Spectres de fluorescence synchrone des fractions HPIA1, HPOA1 et HPOM1 enregistrés à différents écarts entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission : $\Delta\lambda$ = 20, 40 et 60 nm

En comparant ces résultats, un écart $\Delta\lambda$ de 40 nm a été choisi comme le meilleur compromis entre la résolution et l'intensité. En effet un écart de 20 nm entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission permet d'obtenir une bonne résolution mais une faible intensité, un écart de 60 nm une forte intensité mais une moins bonne séparation des pics de fluorescence.

La Figure 16 montre les spectres de fluorescence synchrone enregistrés avec un écart de longueur d'onde de 40 nm.

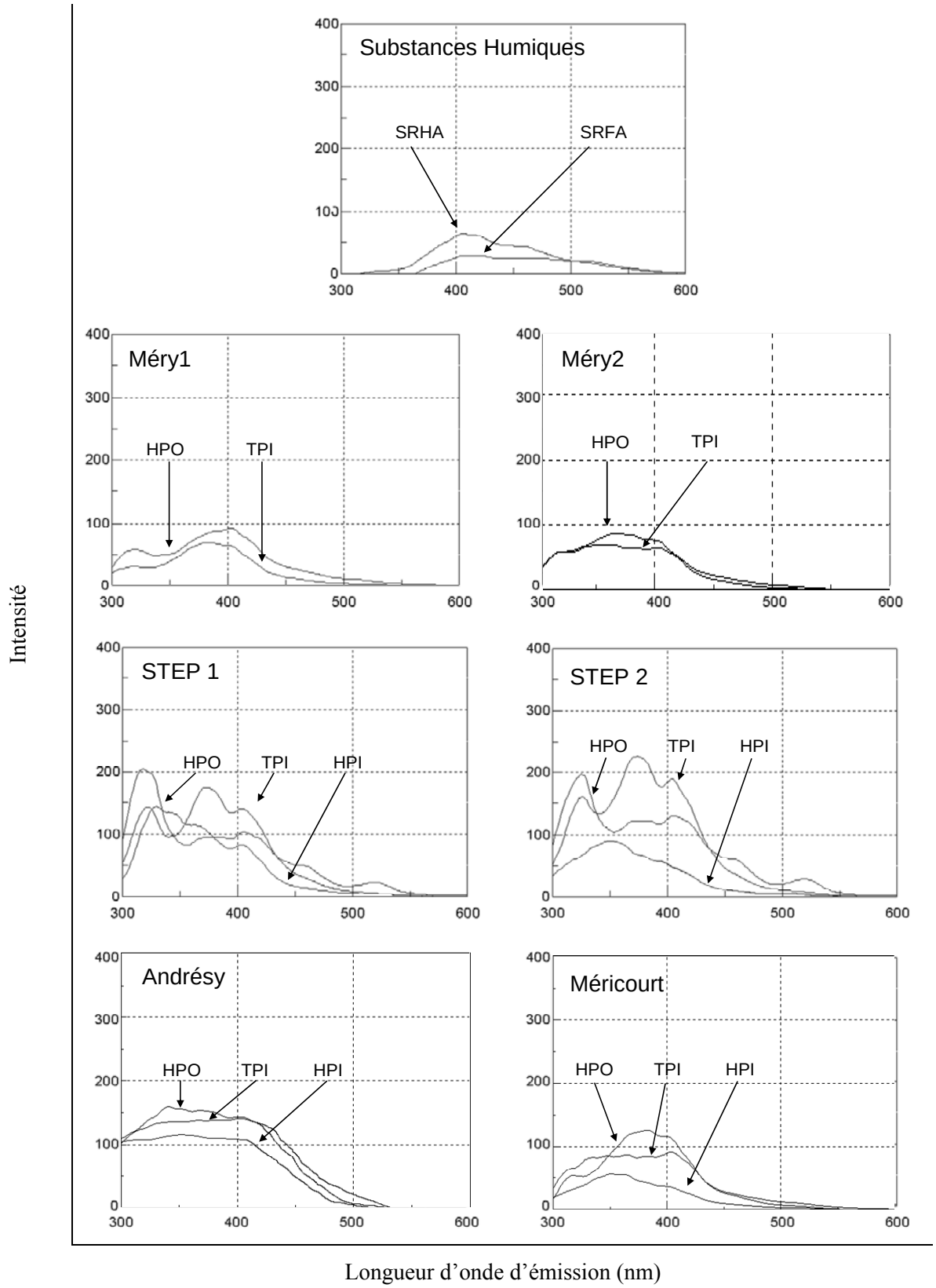


Figure 16 : Spectres de fluorescence synchrone des fractions étudiées ($\Delta\lambda$ = 40 nm)

Les profils des fractions de la STEP Seine-Aval sont différents de ceux des autres fractions. Les substances humiques de référence présentent des pics caractéristiques respectivement: SRHA λ_{Em} : 415, 470 et 520 nm, SRFA λ_{Em} : 415 et 470 nm. Le pic à environ

415 nm, comme en fluorescence simple, est retrouvé de nouveau dans toutes les fractions. Les pics situés à 470 nm et 520 nm en émission sont uniquement retrouvés dans les fractions HPO issues des effluents de STEP.

Les fractions issues des effluents de STEP présentent un pic important à λ_{em} = 320 nm qui témoigne de la présence de composés de type protéiques (Hudson *et al.*, 2007). Ce pic d'émission est également observé mais plus faiblement dans toutes les autres fractions.

Spectroscopie de fluorescence trois dimensions :

La fluorescence trois dimensions permet de mesurer l'ensemble des paramètres de fluorescence : intensité, longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des maxima dans un champs spectral déterminé. Les différences entre les spectres trois dimensions permettent d'observer les modifications du matériel organique à travers la variation de ces paramètres. Pour cela, l'évolution des cinq principales bandes de fluorescence 1, 2, 3, 4 et 5 (Tableau 3) a été plus particulièrement suivie. Les spectres présentés Figure 17 ont été enregistrés à la vitesse de balayage de 500 $nm.min^{-1}$ plutôt qu'à 8000 $nm.min^{-1}$ qui offre une moins bonne résolution. Ils sont présentés en projection dans le plan et sans soustraction du blanc, ni corrections électroniques.

Sur tous les spectres, il est possible d'observer des inscriptions linéaires qui sont les bandes d'interférence Rayleigh-Tindale liées à la diffusion de l'eau. L'interférence de Raman est également visible aux longueurs d'onde suivantes : Ex/Em : 275/300 nm.

Les fractions hydrophobes de références : SRHA et SRFA ont le même profil avec deux pics d'intensité maximum 1 et 2 qui ont un large contour résultant de la fluorescence de multiples composés ou de transfert d'énergie intermoléculaire.

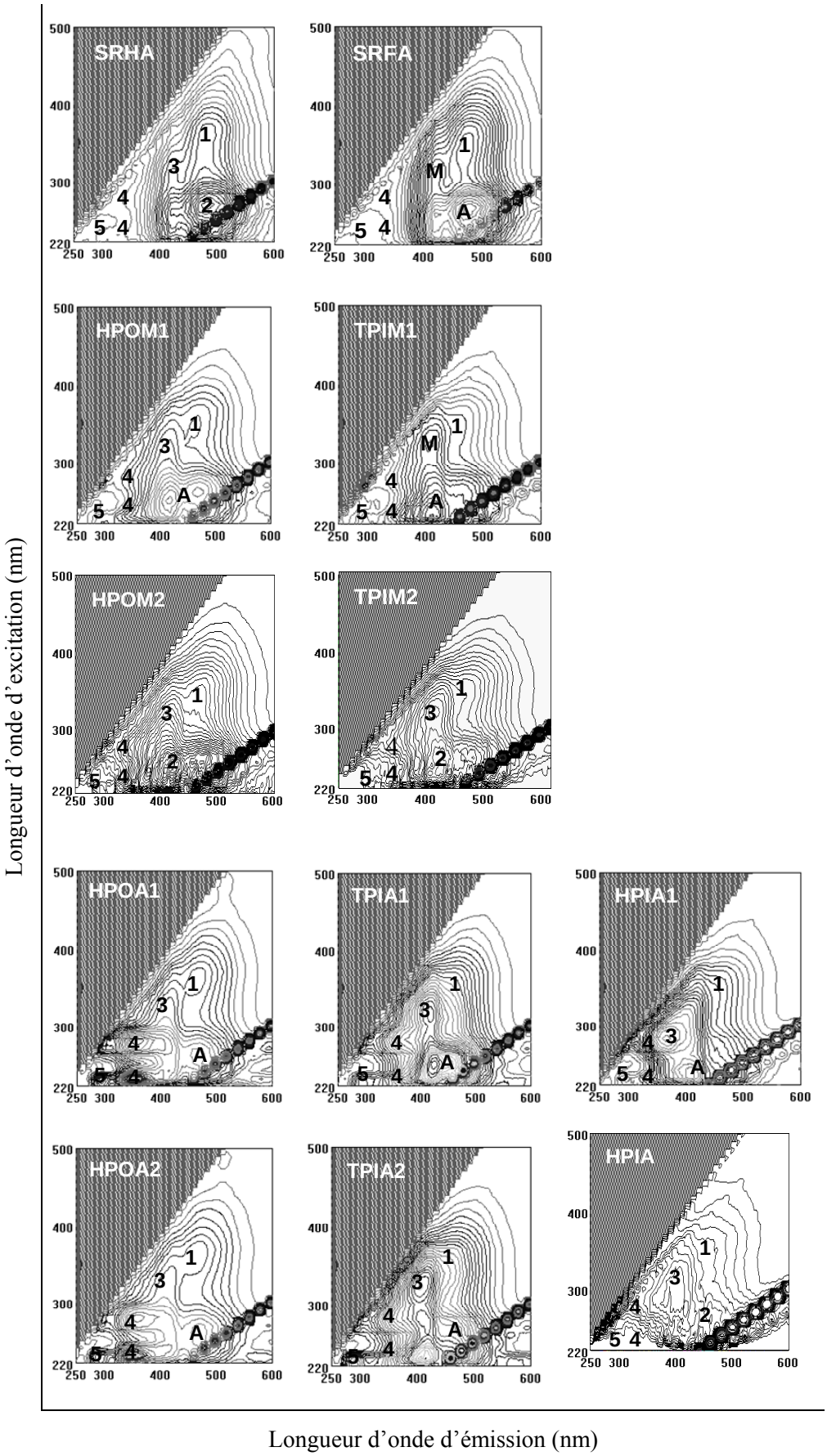
Les pics généralement attribués aux substances humiques (1, 2 et 3) sont visibles sur toutes les fractions mais avec en général un décalage vers des longueurs d'ondes plus faibles qui suit l'hydrophobicité (HPO > TPI > HPI). Ce décalage vers les longueurs d'ondes plus faibles est parfois lié à la présence de structure moléculaire plus petite comme il a été montré par Violleau *et al.* (1999). Néanmoins la présence des ces pics dans toutes les fractions démontrent à nouveau le problème d'attribution des pics de fluorescence aux substances humiques puisque par définition les fractions TPI et HPI sont exemptes de ces substances. Ces pics 1, 2 et 3 représentent très probablement des structures aromatiques similaires aux différentes fractions.

Les fractions issues des effluents de STEP présentent avec une forte intensité des pics attribués aux composés protéiques aromatiques de type tryptophane (4) aux longueurs d'onde suivantes : Ex/Em : 220 nm/350 nm et Ex/Em : 280 nm/350 nm; et de type tyrosine (5) Ex/Em : 220 nm/300 nm. Sur les fractions TPI issues des effluents de STEP, les fluorophores T et B sont aussi présents mais avec une intensité moins prononcée et pour les fractions HPI ces intensités liées à la présence de substances protéiques aromatiques sont encore plus faibles.

Les fractions de Méry sur Marne ont un profil de fluorescence plus proche de celui des substances dites humiques. Néanmoins, un décalage vers le bleu des pics 1, 2 et 3 est détectable.

Les fractions prélevées à Andrésy et Méricourt possèdent aussi des profils de fluorescence plus proche des SH. Cependant, ici aussi, un décalage vers le bleu des pics 1, 2 et 3 ainsi qu'une faible présence de composés protéiques sont visibles.

Dans l'ensemble les fractions HPI montrent une intensité de fluorescence plus faible par rapport aux autres fractions.


SRHA
SRFA
HPOM1
TPIM1
HPOM2
TPIM2
HPOA1
TPIA1
HPIA1
HPOA2
TPIA2
HPIA
Longueur d'onde d'excitation (nm)
Longueur d'onde d'émission (nm)

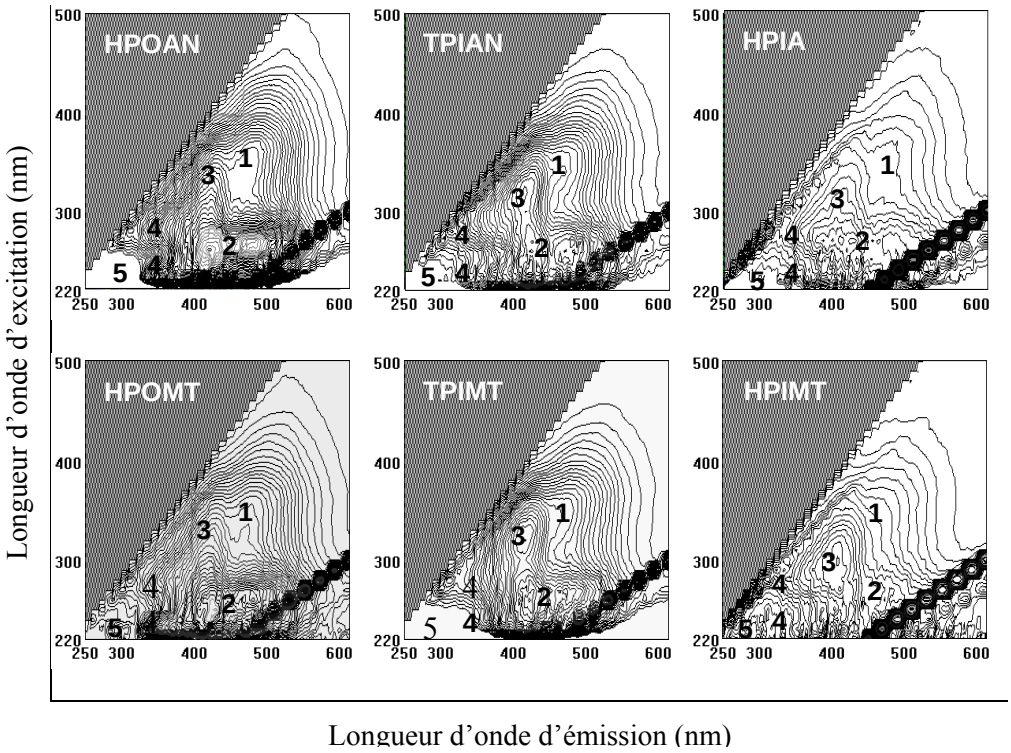


Figure 17 : Spectres de fluorescence trois dimensions des fractions de MOD

I.3.2.4. Spectroscopie InfraRouge (IR) à transformée de Fourrier (FTIR)

Cette technique permet d'identifier les bandes de vibrations caractéristiques des liaisons chimiques des molécules composant les fractions de MOD. Les Figure 18 montrent à titre d'exemple les spectres infrarouges obtenus pour quelques fractions étudiées (l'ensemble des spectres est présenté en Annexe 1). Le Tableau 15 résume les groupements fonctionnels identifiés pour chaque fraction. Plusieurs groupements fonctionnels peuvent être distingués sur les spectres infrarouges des fractions étudiées :

- les liaisons O-H (3600-3400 cm^{-1}) des alcools et acides carboxyliques. Cette bande large peut également englober la liaison O-H de l'eau, normalement non présente dans nos fractions suite à l'étape de lyophilisation,

- les groupements amines et amides mis en évidence par 3 bandes de vibrations : une liée à la vibration de la liaison N-H (3300 cm^{-1}) en épaulement de la zone de vibration des liaisons O-H et deux autres liées aux groupements amides N-C=O (1660 cm^{-1} pour les amides primaires et 1550 cm^{-1}pour les amides secondaires),

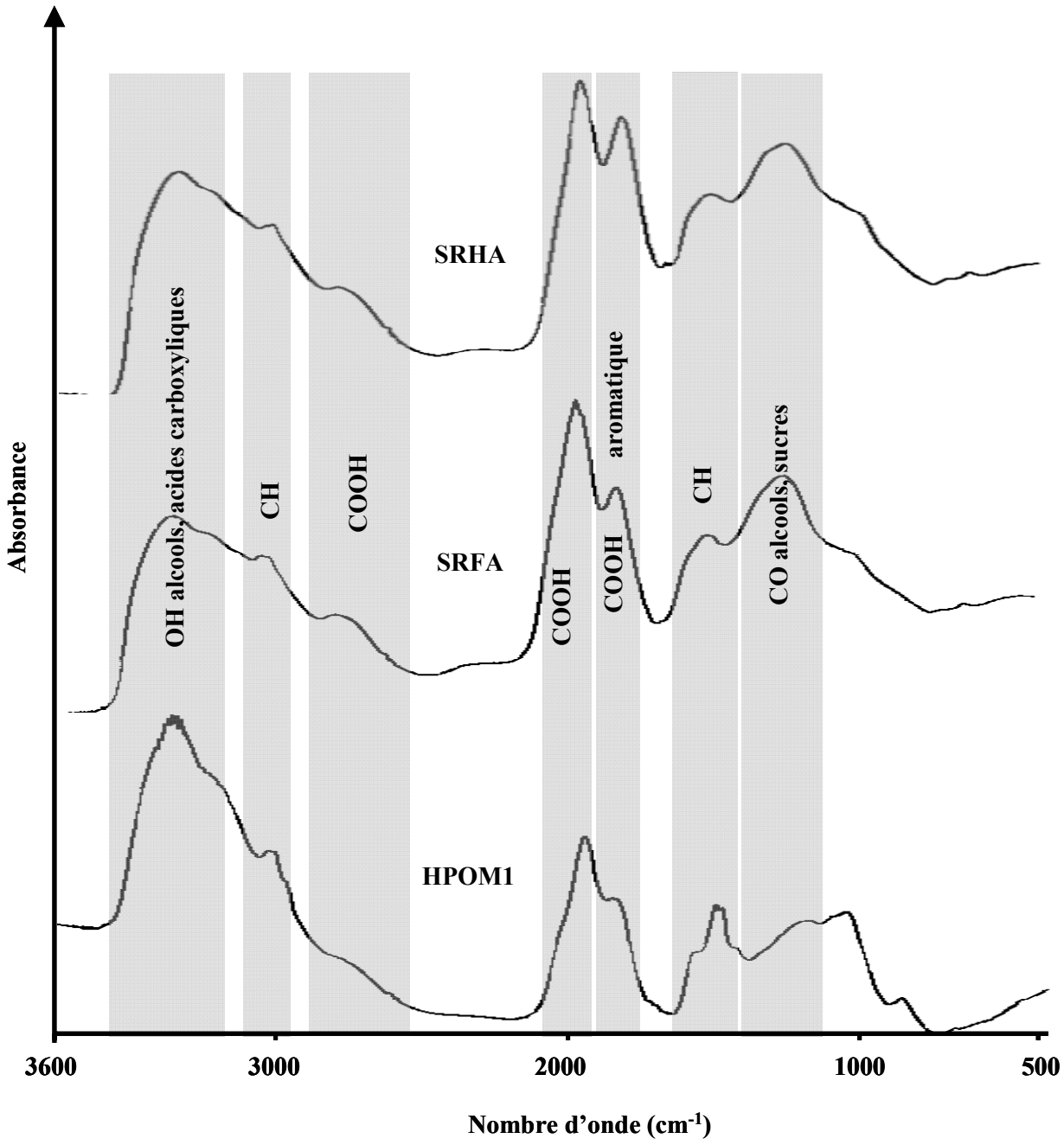
- les chaines aliphatiques révélées par 4 zones caractéristiques des liaisons C-H : 2960 et 1380 cm^{-1} pour les carbones asymétriques et 2940 et 1460 cm^{-1} pour les carbones symétriques,

- les groupements carboxyliques à environ 2700 et 1730 cm^{-1},

- les liaisons C=O positionnées sur des cycles aromatiques, situées à 1630 cm^{-1},

- les liaisons C-O des acides et phénols situés vers 1200 cm^{-1} et des alcools situées aux environs de 1000 cm^{-1},

- les groupements sulfoniques positionnés sur des cycles aromatiques : Ar-SOOH situé à 1040 cm^{-1} en épaulement des liaisons C-O,


Absorbance
OH alcools, acides carboxyliques
CH
COOH
SRHA
SRFA
HPOM1
COOH
COOH
aromatique
CH
CO alcools, sucres
3600
3000
2000
1000
500
Nombre d'onde (cm-1)

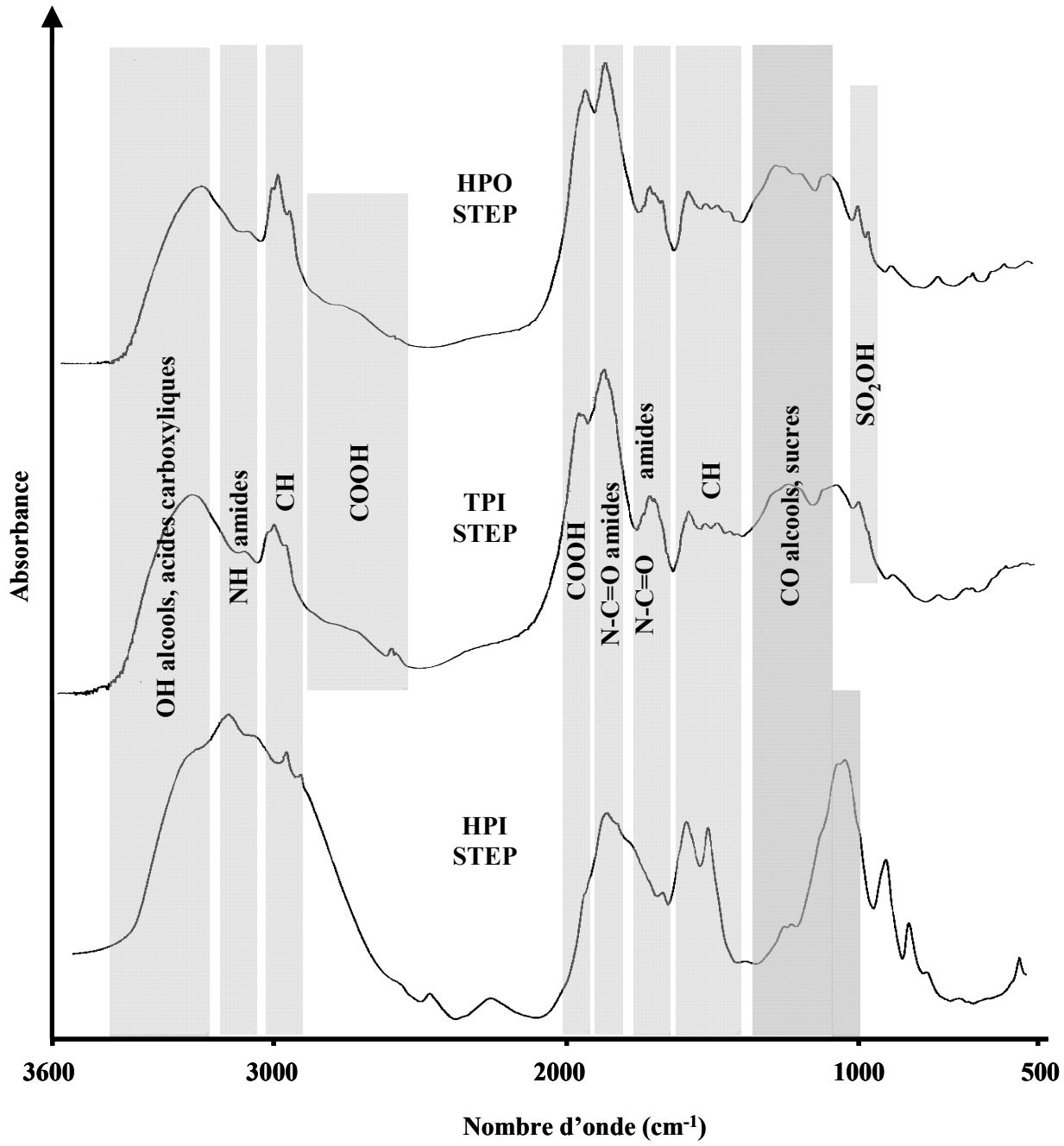


Figure 18 : Spectres d'absorbance infrarouge de quelques fractions de MOD

(fractions : SRFA, SRHA, HPOM1 et fractions de MOD issues des effluents de STEP)

Tableau 15 : Groupements fonctionnels observés par infrarouge dans les fractions de MOD

Fractions	O-H alcools, acides	N-H amides, amines	C-H chaînes aliphatiques		COOH		COOH aromatique	amides		C-O		SOOH
			2960 cm^{-1} 2940 cm^{-1}	1460 cm^{-1} 1380 cm^{-1}	2700 cm^{-1}	1730 cm^{-1}		1660 cm^{-1}	1550 cm^{-1}	phénols, acides	sucres	
SRHA	X	-	X	X	X	X	X	-	-	X	X	-
SRFA	X	-	X	X	X	X	X	-	-	X	X	-
HPOM1	X	X	X	X	X	X	X	X	-	X	X	-
TPIM1	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
HPOM2	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	-
TPIM2	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X
HPOA1	X	X	X	X	X	X		X	X	X	-	X
TPIA1	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X
HPIA1	X	X	X	X	-	X	-	X	X	-	X	
HPOA2	X	X	X	X	X	X		X	X	X	-	X
TPIA2	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X
HPIA2	X	X	X	X	-	X	-	X	X	-	X	
HPOAN	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X
TPIAN	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	X	X
HPIAN	X	X	X	-	-	X	-	X	X	X	X	-
HPOMT	X	-	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X
TPIMT	X	X	X	X	X	X	-	X	X	X	-	X
HPIMT	X	X	-	X	-	X	-	X	X	-	X	X

X : fonction observée

- : fonction non observée

I.3.2.5. Dosage des fonctions acido-basiques

La Figure 19 donne la courbe de titration acido-basique par la soude 0,1 mol.l^{-1} de la fraction de référence SRFA.

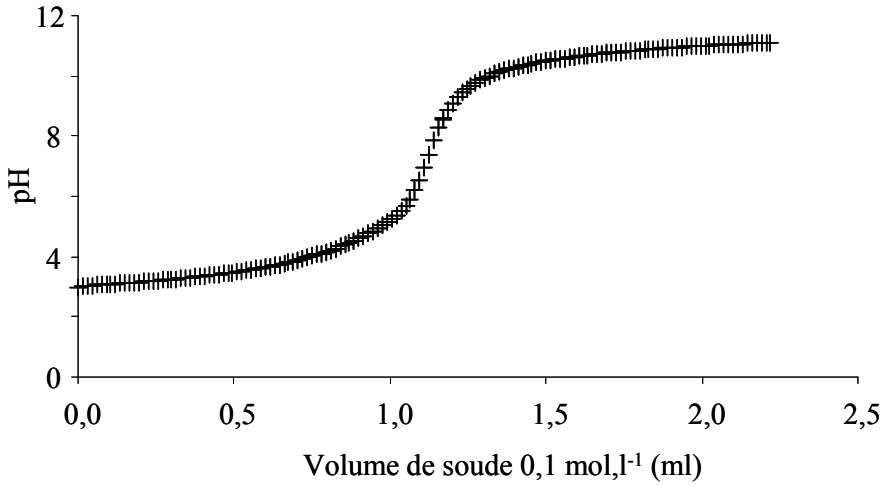


Figure 19 : Courbe de titration acido-basique de la fraction de référence HPOA1

<u>Première méthode basée sur la quantité de soude ajoutée :</u>

- Les concentrations en sites obtenues par la méthode (basée sur la quantité de soude ajoutée jusqu'à pH 8 et entre pH 8 et 10) pour toutes les fractions de MOD extraites figurent dans le
- Tableau 16. Les résultats sont exprimés en milli-équivalents par gramme de carbone pour tenir compte des variations du pourcentage en carbone des différentes fractions.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

- la teneur en fonctions phénoliques est toujours inférieure à celles des groupes carboxyliques excepté pour les fractions HPIA2, HPIAN et HPIMT (voir ci dessous),
- les teneurs en sites carboxyliques et phénoliques obtenues dans cette étude sont en accord avec celle trouvées dans la littérature respectivement entre 3 et 20 meq.gC^{-1} et 2 et 12 meq.gC^{-1} (Garnier, 2004 ; Violleau, 1999),
- les fractions HPO sont moins riches en termes de nombre de sites acido-basiques total que les fractions plus hydrophiles de même origine excepté pour les échantillons provenant de Méry sur Marne (M1 et M2) où la tendance est inversée,
- les fractions HPIA2, HPIAN et HPIMT présentent des concentrations en sites phénoliques très importantes. Comme il a été discuté préalablement (§ I.2.3.6) la quantification des sites phénoliques est sujette à un potentiel biais lié à l'hydrolyse des esters, de plus l'application d'un facteur deux pour leur estimation est complètement arbitraire. Cependant l'importante teneur en azote pourrait expliquer

cette forte teneur en site d'affinité forte par la présence de groupements amine observée par IRTF.

Tableau 16 : Nombre de sites carboxyliques et phénoliques dans les fractions extraites

Fraction	Nombre de sites carboxyliques (meq.gC^{-1})	Nombre de sites phénoliques (meq.gC^{-1})	Nombre de site total (meq.gC^{-1})
SRFA	16.2	5.6	21.8
HPOM1	12.4	5.7	18.1
TPIM1	12.3	3.9	16.2
HPOM2	12.1	4.1	16.2
TPIM2	11.3	3.6	14.9
HPOA1	9.1	3.8	13.0
TPIA1	8.7	4.3	13.0
HPIA1	12.8	4.8	17.6
HPOA2	9.4	3.4	12.8
TPIA2	10.2	4.2	14.5
HPIA2	15.8	17.8	33.6
HPOAN	11.6	3.9	15.5
TPIAN	12.5	5.1	17.7
HPIAN	11.2	53.2	64.4
HPOMT	11.0	4.2	15.2
TPIMT	13.7	6.7	20.4
HPIMT	13.1	13.0	26.1

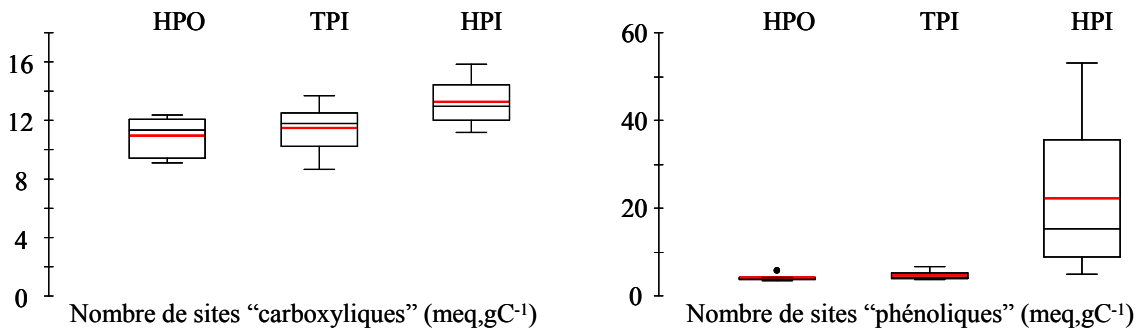


Figure 20 : Nombre de sites « carboxyliques » et « phénoliques » selon le type de fraction

Deuxième méthode basée sur l'ajustement de la charge par l'isotherme Langmuir-Freundlich

Le Tableau 17 présente les paramètres d'affinité du proton obtenus par modélisation de la charge à l'aide de l'isotherme Langmuir-Freundlich. Le nombre de sites (Q_{max}) est exprimé ici en méq.g^{-1} de MOD puisque la totalité des sites acido-basique n'est pas carbonée. La Figure 21 permet ainsi d'observer :

- une valeur de constante similaire d'une fraction à l'autre bien que les constantes d'affinité faible présente une forte variabilité pour la fraction HPI
- un nombre de sites d'affinité faible équivalent d'une fraction à l'autre
- un nombre de sites d'affinité forte beaucoup plus important pour les factions HPI

Ce nombre important de sites d'affinité forte dans la fraction HPI ne peut être attribué aux groupements phénoliques suite à la très faible aromaticité (ratio C/H, SUVA) de cette fraction. En revanche le fort taux d'azote (environ 10 %), et les analyses en IRTF et fluorescence suggèrent que ces sites d'affinité forte pourraient être des fonctions amines qui généralement présentent des pKa d'environ 9 ce qui est le cas ici. Comme observé précédemment avec un traitement des données plus simpliste, la teneur en sites d'affinité forte (comparable aux fonctions « phénoliques ») est inférieure à celle des sites d'affinité faible (groupes « carboxyliques ») pour les fractions HPO et TPI, les fractions HPI révélant un nombre de sites d'affinité forte très important précédemment expliqué par des fonctions amines.

Il est important de noter que quelque soit le type d'affinité (faible, forte ; « carboxyliques », « phénoliques ») le nombre de sites évalué par modélisation reste dans l'ensemble similaire à celui déterminé par l'autre méthode plus simpliste si l'on tient compte du pourcentage de carbone dans les fractions (environ 50 %). Les différences existantes sont principalement attribuées aux appellations sites d'affinité faible et forte qui ne correspondent pas exactement aux groupes dit « carboxyliques » et « phénoliques ». En effet les groupes carboxyliques (déterminés avant pH 8) correspondent probablement aux sites d'affinité faible plus une part des sites d'affinité forte. Les groupes phénoliques étant probablement surestimés notamment par l'application d'un facteur 2 complètement arbitraire.

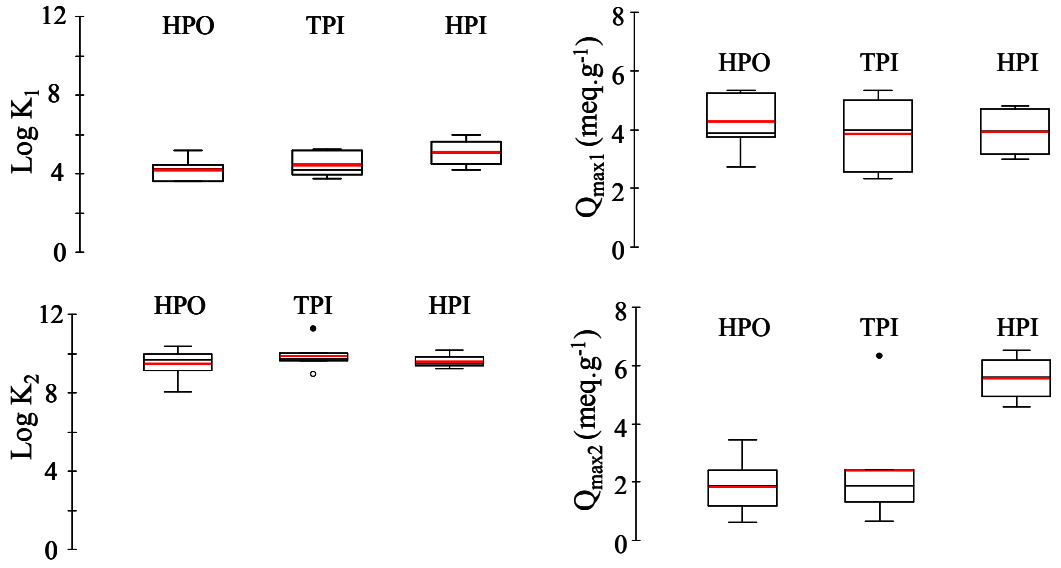


Figure 21 : Distribution des constantes et capacités de complexation des fractions vis-à-vis du proton

Tableau 17 : Paramètres d'affinité des sites faibles et forts pour le proton des fractions extraites

Fraction	Log K_1	Q_{max1} (meq.g^{-1})	n_1	Log K_2	Q_{max2} (meq.g^{-1})	n_2	R^2
SRFA	3,56	5,19	0,33	9,22	1,88	0,91	0,9998
HPOM1	3,59	5,24	0,33	9,99	2,42	1*	0,9986
TPIM1	3,75	5,35	0,50	9,67	1,31	0,53	0,9999
HPOM2	4,19	3,74	0,53	9,15	0,62	1*	0,9995
TPIM2	4,35	4,49	0,54	8,91	0,66	1*	0,9993
HPOA1	4,46	2,73	0,61	10,38	1,89	0,30	0,9996
TPIA1	5,25	2,33	1*	9,82	2,33	0,27	0,9955
HPIA1	6,40	3,29	1*	9,25	5,89	1*	0,9929
HPOA2	5,20	3,90	0,60	9,96	1,48	0,46	0,9982
TPIA2	3,93	3,47	0,73	10,01	2,45	0,25	0,9985
HPIA2	4,82	4,62	0,60	9,47	4,58	0,95	0,9999
HPOAN	4,28	3,79	0,77	8,06	3,44	0,14	0,9985
TPIAN	4,07	4,99	0,49	9,63	1,39	0,57	0,9999
HPIAN	4,21	3,01	0,53	9,47	6.51	0,98	0,9999
HPOMT	3,60	5,35	0,47	9,66	1,20	0,65	0,9998
TPIMT	5,19	2,56	0,92	11,26	6,32	0,25	0,9966
HPIMT	5,96	4,79	0,36	10,19	5,32	0,48	0,9995
Erreur Min. - Max	0,00 – 0,10	0,01 – 0,48	0,0 – 0,09	0,01 – 0,76	0,04 – 0,96	0,01 – 0,30	-
Moyenne	0,03	0,11	0,02	0,30	0,40	0,13	-

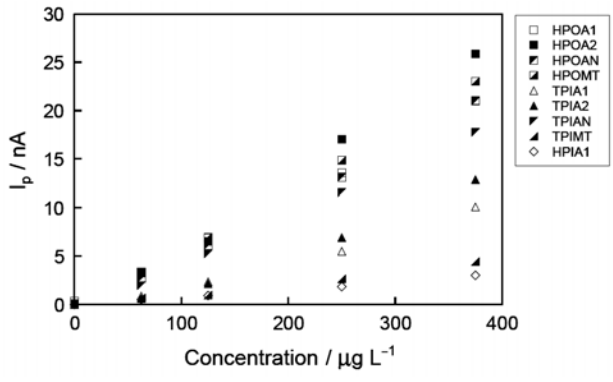
* : paramètre d'hétérogénéité fixé à 1 afin d'obtenir un ajustement correct

Ces résultats sont dans l'ensemble en accord avec la littérature (Violleau, 1999) qui montrent généralement une augmentation du nombre de sites complexants en fonction du caractère hydrophile.

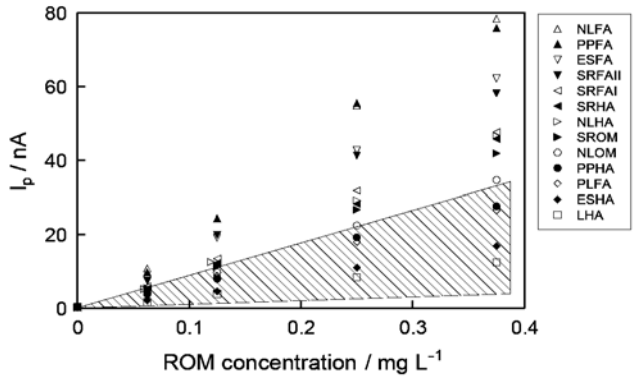
I.3.2.6. Dosage des substances humiques dites réfractaires

Cette méthode récente a été appliquée pour la première fois à des MOD non naturelles. Comme mentionné précédemment, cette méthode est basée sur la redissolution cathodique précédée par une étape d'adsorption des complexes Mo(VI)-substances humiques. Il a été montré que seuls les acides humiques et fulviques donnent un signal par cette technique, un large panel de protéines et de polysaccharides ayant été testé et donnant un signal négligeable (Chanudet *et al.*, 2006).

La Figure 22 présente à titre d'exemple le dosage des substances humiques ou réfractaires de quelques fractions, le Tableau 18 résumant l'ensemble des résultats obtenus. Les pourcentages de substances réfractaires ont été calculés via l'intensité mesurée de la fraction étudiée rapporté à celle de la fraction de référence SRFA obtenue à la même concentration.



Dosage des substances réfractaires dans quelques fractions de MOD précédemment extraites



Comparaison des teneurs en substances réfractaires dans nos fractions de MOD (zone hachurée) et dans 13 substances de référence (IHSS)

Figure 22 : Dosage des substances humiques dites réfractaires (Filella *et al.*, 2008)

(NLFA Nordic Lake FA (1R105F), PPFA Pahokee peat FA (2S103F), ESFA Elliott soil FA (2S102F), SRFAII Suwannee River FA II (2S101F), SRFAI Suwannee River FA I (1S101F), SRHA Suwannee River HA (2S101H), NLHA Nordic Lake HA (1R105H), SROM Suwanneee River NOM (1R101N), NLOM Nordic Lake NOM (1R108N), PPHA Pahokee peat HA (1R103H), PLFA Pony Lake FA (1R109F), ESHA Elliott soil HA (1S102H), LHA Leonardite HA (1S104H))

A partir des considérations précédentes, des Figure 22 et Figure 23 et du Tableau 18, plusieurs remarques peuvent être faites :

- les fractions HPO donnent un signal plus élevé que les fractions TPI elles-mêmes donnant une réponse plus forte que les fractions HPI, la fraction HPO de STEP présente une teneur plus importante que celle des autres sites,

- les fractions TPI répondent plus fortement que ce qu'il pourrait être attendu. Ceci n'est cependant pas surprenant étant donné la multitude de molécules présentes dans les MOD, c'est-à-dire qu'un continuum de propriétés peut exister sans grande difficulté,

- les fractions HPI donnent un signal très faible avec une variabilité faible,

- l'ensemble de nos fractions présente des teneurs en substances humiques ou réfractaires relativement faibles comparées à 13 substances de références provenant de l'IHSS. En effet le signal des MOD de cette étude est intermédiaire entre NLOM (MOD isolée simplement par OI contenant à priori l'ensemble de nos 3 fractions), des SH de marais (PPHA), de sols (ESHA) et de léonardite (LHA).

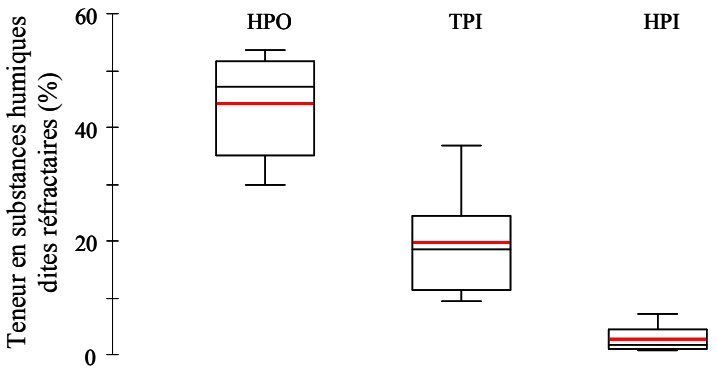


Figure 23 : Distribution des teneurs en substances réfractaires au sein des MOD isolées

Tableau 18 : Pourcentage de substances humiques dites réfractaires dans les MOD étudiées (référence utilisée : SRFA)

Sites	Fraction	Substances humiques dites réfractaires (%)
Méry sur Marne hiver	HPOM1	35,0
	TPIM1	11,5
Méry sur Marne été	HPOM2	29,8
	TPIM2	24,4
STEP Seine-Aval 1	HPOA1	49,8
	TPIA1	17,9
	HPIA1	7,1
STEP Seine-Aval 2	HPOA2	53,6
	TPIA2	18,9
	HPIA2	0,7
Andrésy	HPOAN	44,7
	TPIAN	36,9
	HPIAN	1,5
Méricourt	HPOMT	51,7
	TPIMT	9,4
	HPIMT	1,7

I.3.2.7. Détermination de la composition isotopique du carbone et de l'azote

Le Tableau 19 présente pour l'ensemble des fractions extraites les valeurs de $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$. Pour la totalité des extraits, les paramètres $\delta^{13}C$ et $\delta^{15}N$ varient de manière importante et sont respectivement compris entre -38 et -24 ‰ et 1 et 6 ‰. Ces écarts observés sont significatifs puisque l'erreur sur la mesure est de 0,1 ‰.

Isotopie du carbone :

Selon les sites d'étude considérés, différentes observations peuvent être faites :

- Méry sur Marne : les fractions HPO présentent un appauvrissement en ^{13}C atteignant jusqu'à 1,3 ‰ par rapport aux fractions TPI. Ces résultats en accord avec la littérature (Kracht, 2001 ; Malcolm, 1990 ; Violleau, 1999), suggèrent que les fractions TPI seraient plutôt d'origine autochtone, les fractions HPO étant à priori d'origine terrestre (lignine). Aucune différence n'est mise en évidence par l'étude isotopique du carbone concernant l'influence de la saison.
- STEP, Andrésy, Méricourt : contrairement au site de Méry sur Marne, les fractions HPO sont enrichies en ^{13}C (environ 1 ‰) par rapport aux fractions TPI, elles-mêmes plus riches de 1 à 10 ‰ comparativement aux fractions HPI. Ceci montre que les fractions HPO seraient entrées dans plusieurs processus de dégradation bactérienne alors que les fractions HPI seraient peu dégradées, peu maturées donc plus « fraîches ». En effet la dégradation des composés dans des étapes nutritives résulte en un enrichissement en isotope lourd dans les organismes dû à la perte d'isotope léger lors des processus métaboliques comme par exemple la perte de l'isotope 12 du carbone lors de la formation de CO_2 (DeNiro et Epstein, 1978).
- STEP : la différence de 11 ‰ entre les fractions HPI d'avril et de décembre pourrait s'expliquer par la présence de composés d'origine synthétique dans les HPI de décembre, ou par une altération (perte sélective) lors du processus d'extraction. En décembre, les fractions TPI sont aussi fortement appauvries par rapport aux fractions HPO, ce qui n'était pas le cas en avril. Dans le cadre de cette étude, la composition isotopique de la matrice organique des eaux en sortie de STEP varie beaucoup plus que l'eau de Marne à Méry sur Marne.

Tableau 19 : Composition isotopique en ^{13}C et ^{15}N des fractions de MOD extraites

Site	Fraction	$\delta^{13}C$ (‰)	$\delta^{15}N$ (‰)
Substances humiques de références	SRHA	-28,3	0,5
	SRFA	-28,1	0,7
Méry sur Marne hiver	HPOM1	-28,6	1,9
	TPIM1	-27,3	2,6
Méry sur Marne été	HPOM2	-28,4	3,2
	TPIM2	-27,9	3,6
STEP avril	HPOA1	-24,1	2,5
	TPIA1	-24,8	2,8
	HPIA1	-26,7	-
STEP décembre	HPOA2	-24,9	2,1
	TPIA2	-28,6	2,2
	HPIA2	-38,1	-
Andrésy	HPOAN	-27,0	1,9
	TPIAN	-27,0	2,5
	HPIAN	-28,3	-
Méricourt	HPOMT	-26,3	1,9
	TPIMT	-28,3	5,9
	HPIMT	-31,8	-

- : saturation de l'appareil

Isotopie de l'azote :

Les fractions HPO sont appauvries en ^{15}N de 0,1 à 5 ‰ par rapport aux fractions TPI, elles-mêmes moins riches comparativement aux fractions HPI. Concernant les fractions HPI, si aucunes données ne sont présentées dans le Tableau 19 en raison d'une saturation du détecteur de l'appareil, il est néanmoins possible de conclure que pour une même masse de MOD analysée, ces valeurs sont supérieures aux autres fractions. Ces résultats montrent la récente origine biologique des fractions HPI. En effet les processus de dégradation biologique entraînent un appauvrissement en ^{15}N lors de l'assimilation des acides aminés et leur transfert dans les protéines des organismes impliqués (Macko et Estep, 1984). Les fractions TPI et HPO auraient donc subi plus de processus de dégradation de maturation que les fractions HPI. Les SH de références présentent des valeurs de $\delta^{15}N$ faibles comparativement à nos fractions HPO montrant un degré de maturation plus élevé. Ces résultats concernant l'isotopie de l'azote sont en accord avec ceux du carbone.

I.3.2.8. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance

La Figure 24 présente les chromatogrammes obtenus pour les fractions de MOD issues du premier échantillon de STEP (A1) (les autres sont présentés en Annexe 2). La taille est inversement proportionnelle au temps de rétention autrement dit plus un composé sort rapidement de la colonne plus sa masse moléculaire est élevée.

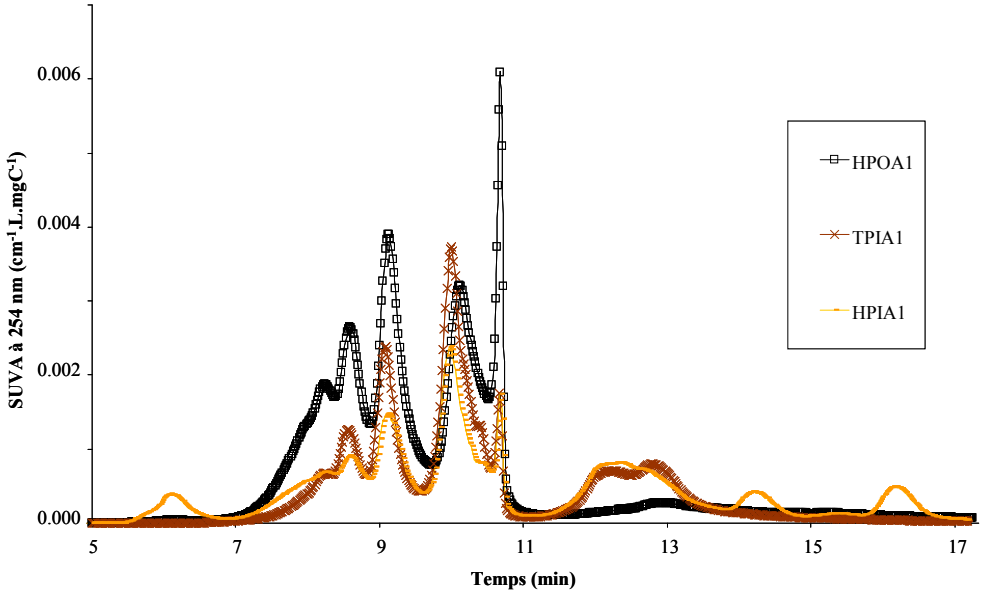


Figure 24 : Chromatogrammes d'exclusion de taille des fractions de MOD issues de STEP (A1)

Il est ainsi possible d'observer à partir de la figure précédente :

- un nombre important de pics correspondant à des composés de masses moléculaires différentes

- la présence de composés de faibles masses moléculaires (temps de rétention supérieurs à 11 min) dans les fractions TPI et HPI qui n'apparaissent pas pour la fraction HPO

- un pic aux environs de 6 min correspondant à des composés de masses moléculaires importantes pour la fraction HPI. Ce pic corresponds à la présence de colloïdes, molécules de fortes tailles qui ne s'adsorbent pas sur les résines DAX-8 et XAD-4 et sont récupérées dans l'effluent mais ne présentent pas nécessaire de caractère hydrophile. Notons que ces colloïdes peuvent être isolés par dialyse (Violleau, 1999).

Il n'est pas possible de comparer l'intensité d'un pic entre différentes fractions puisque le type de détection utilisée est l'absorbance UV. Or comme il a été montré précédemment cette absorbance varie selon les fractions. Pour résoudre cette difficulté, les chromatogrammes ont été déconvolués (via le logiciel Origine) en plusieurs gaussiennes qui ont par la suite été intégrées. L'aire de chaque gaussienne est alors comparée à l'aire totale des pics puis elles sont rassemblées en cinq familles de masses moléculaires croissantes : 0-500; 500-1000; 1000-2000; 2000-3000 et supérieure à 3000 Da. Rappelons que la masse moléculaire est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée à l'aide de polystyrène sulfonate de masses moléculaires connues permettant ainsi d'obtenir une relation entre la masse moléculaire et le temps de rétention. La Figure 25 présente la distribution des classes de masses moléculaires différentes. A partir de cette figure, les observations suivantes peuvent être faites :

- les fractions SRFA et SRHA présentent une classe majoritaire de composés de très hautes masses moléculaires (2000 - supérieures à 3000 Da),

- les fractions HPO présentent toutes le même profil de distribution à savoir une classe majoritaire (≈ 50 %) de masses moléculaires de 0 à 500, une classe de 1000 – 2000 Da d'environ 30 % et une dernière classe de composé de poids moléculaire de 500 – 1000, les très composés de hauts poids moléculaires (>2000 Da) sont absents

- les fractions TPI et HPI présentent dans l'ensemble une forte présence de petites masses moléculaires (75 %), l'abondance des autres classes est minoritaire sauf pour l'échantillon d'Andrésy.

- certaines fractions HPI (HPIA1 et HPIAN) présentent des composés de masses moléculaires importantes (1000 – 2000 voire supérieurs à 2000 Da) qui correspondent à des colloïdes (Violleau, 1999).

A partir des poids moléculaires de chaque classe et de leur distribution, il est possible par un traitement mathématique de calculer des poids moléculaires moyens :

$$M_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} \qquad \text{et} \qquad M_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$$

Où n_i et M_i représentent respectivement le nombre et la masse moléculaire correspondants aux molécules incrémentées par *i*. M_n représente la masse moléculaire pondérée par le nombre de molécules présentes en solution alors que M_w est pondéré par la masse de chaque type de molécule. Le rapport M_w/M_n (toujours supérieur à 1) est communément appelé coefficient de polydispersité (I_p) et traduit la diversité des masses moléculaires rencontrées au sein de la matrice organique. Le Tableau 20 présente ces résultats et permettant d'effectuer les observations suivantes :

- les fractions SRFA et SRHA présentent des masses moléculaires très élevées (≈ 3000 Da) comparée à nos fractions (entre 200 et 2000 Da),

- les fractions HPO révèlent systématiquement des masses moléculaires supérieures aux fractions TPI elles-mêmes supérieures aux fractions HPI, exceptées pour les fractions HPIA1 et HPIAN où la présence de colloïdes a été détectée. Pour la fraction HPIA1 un calcul a été effectué ne tenant pas compte du pic au temps de rétention de 6 min attribué à la présence de colloïde. Il en résulte une masse moléculaire inférieure à celle de la fraction HPOA1 confirmant la tendance précédemment observée.

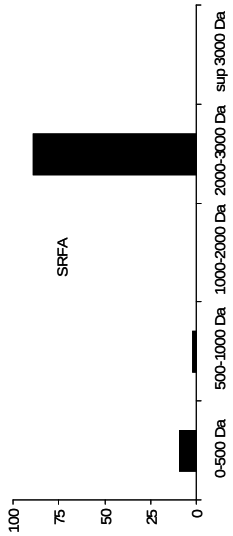
- les fractions SRFA et SRHA observent les coefficients de polydispersité les plus faibles. Ceci s'expliquent de par le faite que ces fractions sont déjà fractionnées de la matrice organique par adsorption sur résines DAX-8 puis de nouveau fractionnée selon leur solubilité en fonction du pH.

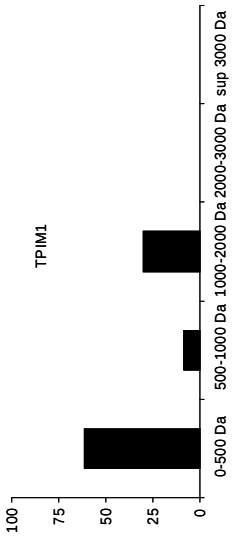
- le coefficient de polydispersité varie de manière contraire à la masse moléculaire c'est-à-dire que plus la masse est grande, plus le coefficient de polydispersité est petit correspondant aux fractions HPO et lorsque la masse est petite le coefficient de polydispersité est grand révélant une diversité des masses plus importantes pour les fractions TPI et HPI.

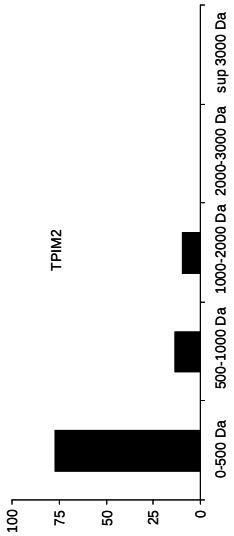
Les masses moléculaires des fractions SRFA et SRHA obtenues dans cette étude (≈ 3000 Da) s'avèrent comparables à celles trouvées dans la littérature qui observent néanmoins une certaine variabilité (2000 < M_w < 3000 Da) pour les mêmes substances humiques et le même type de détecteur (UV) (Her *et al.*, 2004 ; Hur *et al.*, 2006).

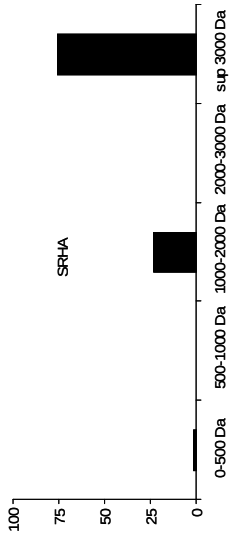
Tableau 20 : Masses moléculaires et coefficient de polydispersité des fractions de MOD

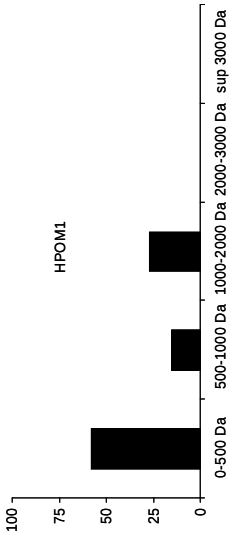
Site	Fractions	M_n (Da)	M_w (Da)	I_p
Substances humiques de références	SRHA	2971	4046	1.4
	SRFA	2278	3308	1.5
Méry sur Marne hiver	HPOM1	705	1265	1.8
	TPIM1	685	1237	2.1
Méry sur Marne été	HPOM2	781	1463	1.9
	TPIM2	461	915	2.0
STEP avril	HPOA1	678	1838	2.7
	TPIA1	400	1454	3.6
	HPIA1 avec colloïdes	1738	18707	10.8
	HPIA1 sans colloïdes	529	2132	4.0
STEP décembre	HPOA2	700	1789	2.6
	TPIA2	424	1212	2.9
	HPIA2	420	1478	3.5
Andrésy	HPOAN	813	1512	1.9
	TPIAN	799	1582	2.0
	HPIAN	1081	2811	2.6
Méricourt	HPOMT	1125	2033	1.81
	TPIMT	427	929	2.2
	HPIMT	218	664	3.0

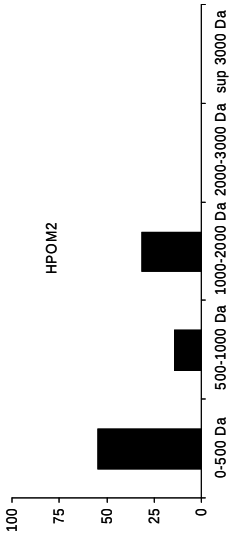

SRFA
100
75
50
25
0
0-500 Da
500-1000 Da
1000-2000 Da
2000-3000 Da
sup 3000 Da


TPIM1
100
75
50
25
0
0-500 Da
500-1000 Da
1000-2000 Da
2000-3000 Da
sup 3000 Da


TPIM2
100
75
50
25
0
0-500 Da
500-1000 Da
1000-2000 Da
2000-3000 Da
sup 3000 Da


SRHA
100
75
50
25
0
0-500 Da
500-1000 Da
1000-2000 Da
2000-3000 Da
sup 3000 Da


HPOM1
100
75
50
25
0
0-500 Da
500-1000 Da
1000-2000 Da
2000-3000 Da
sup 3000 Da


HPOM2
100
75
50
25
0
0-500 Da
500-1000 Da
1000-2000 Da
2000-3000 Da
sup 3000 Da

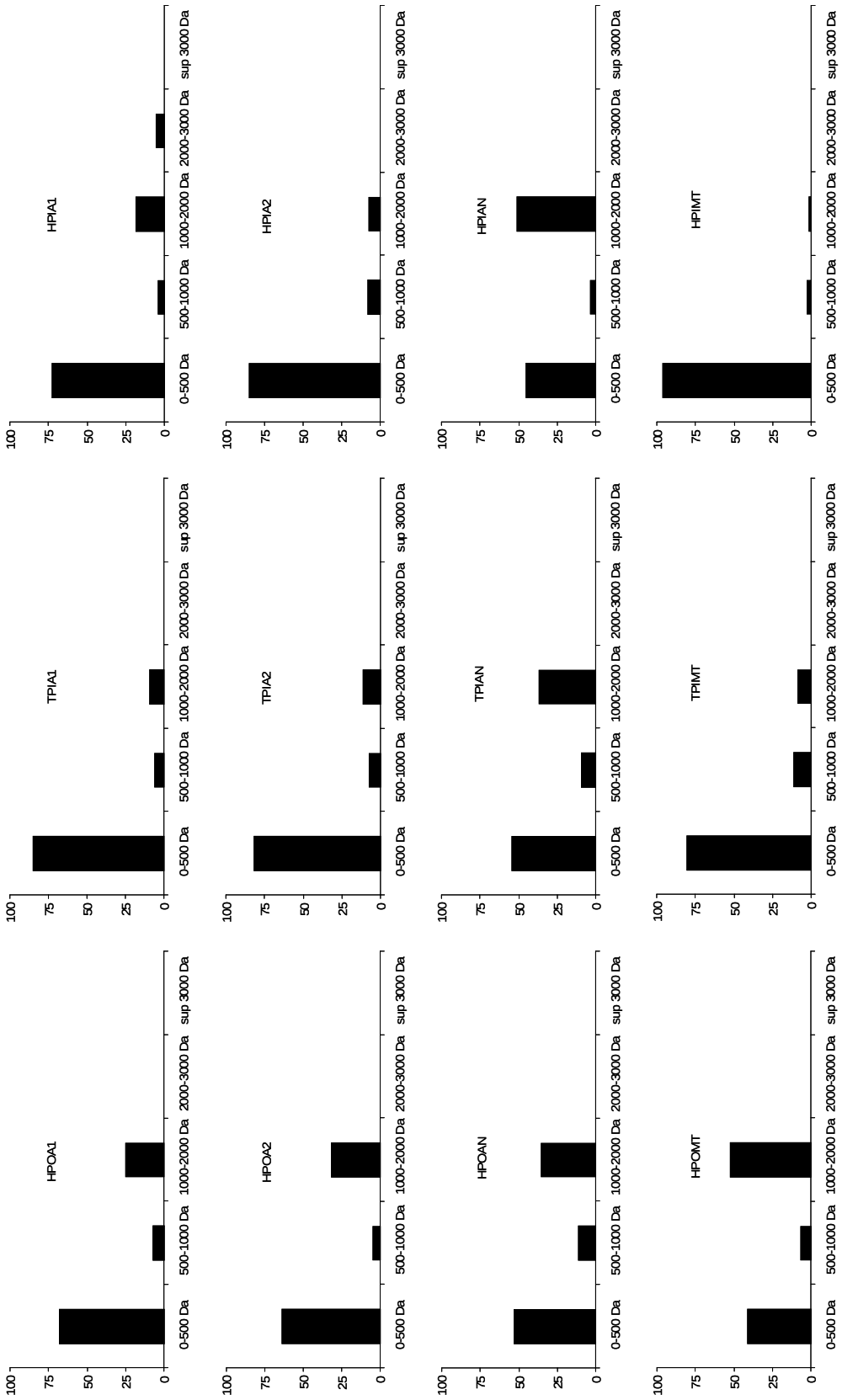


Figure 25 : Distribution (en %) des classes de différentes masses moléculaires au sein de chaque fraction de MOD

(l'axe des ordonnées représente le pourcentage dechaque classe de masses moléculaires)

I.3.2.9. Pyrolyse et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les pyrogrammes ont été exploités qualitativement dans une première étape. Pour rappel, les composés ont été identifiés par leur spectre de masse, leur temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse et la comparaison avec des spectres de masse de bibliothèque (Wiley). Un certain nombre de produits de pyrolyse ont été identifiés pour chaque échantillon, certains d'entre eux étant spécifiques d'une source macromoléculaire. La Figure 26 montre le pyrogramme obtenu pour la fraction HPOA1. Les pyrogrammes des autres fractions (exceptées les fractions HPIA2, HPIAN et HPIMT qui n'ont pas été analysées) sont donnés en Annexe 3.

Un calcul semi-quantitatif a également été appliqué aux pics principaux des pyrogrammes. Les résultats sont présentés dans le Tableau 21. Rappelons que cette méthode semi-quantitative ne donne en aucun cas la composition exacte de la MO puisque toutes les MO ne sont pas pyrolysables, que toutes les molécules produites par pyrolyse ne sont pas détectables par pyrolyse-CG-SM, que toutes les molécules détectées n'ont pas la même réponse en spectrométrie de masse, qu'il est aussi impossible d'identifier tous les fragments, que certains ont plusieurs origines possibles et d'autres peuvent provenir de recombinaison lors de la pyrolyse. Cependant cette méthode peut être utile en tant qu'outil de comparaison entre différents échantillons, si elle est alliée à une étude qualitative des pyrogrammes.

Ainsi des produits de pyrolyse ont été attribués aux origines suivantes selon la littérature :

- *diverses* (Bracewell et Robertson, 1984 ; Fabbri, 2001 ; Galletti et Reeves, 1992 ; Pouwels *et al.*, 1987 ; Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1986b ; Saiz-Jimenez *et al.*, 1996 ; Tsuge et Matsubara, 1985 ; Van Bergen *et al.*, 1997 ; Van Smeerdijk et Boon, 1987). Les produits de pyrolyse d'origine diverse ont : soit plusieurs origines connues, ce qui ne permet pas de les attribuer à une famille organique spécifique, soit une origine inconnue.

- *lignines* (Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1986b)

- *protéines* (Bracewell et Robertson, 1984 ; Chiavari et Galletti, 1992 ; Schnitzer *et al.*, 2007 ; Stankiewicz *et al.*, 1996 ; Tsuge et Matsubara, 1985)

- *polysaccharides* (Helleur *et al.*, 1985a ; Helleur *et al.*, 1985b ; Pouwels *et al.*, 1987)

- *lipides* (Saiz-Jimenez *et al.*, 1996)

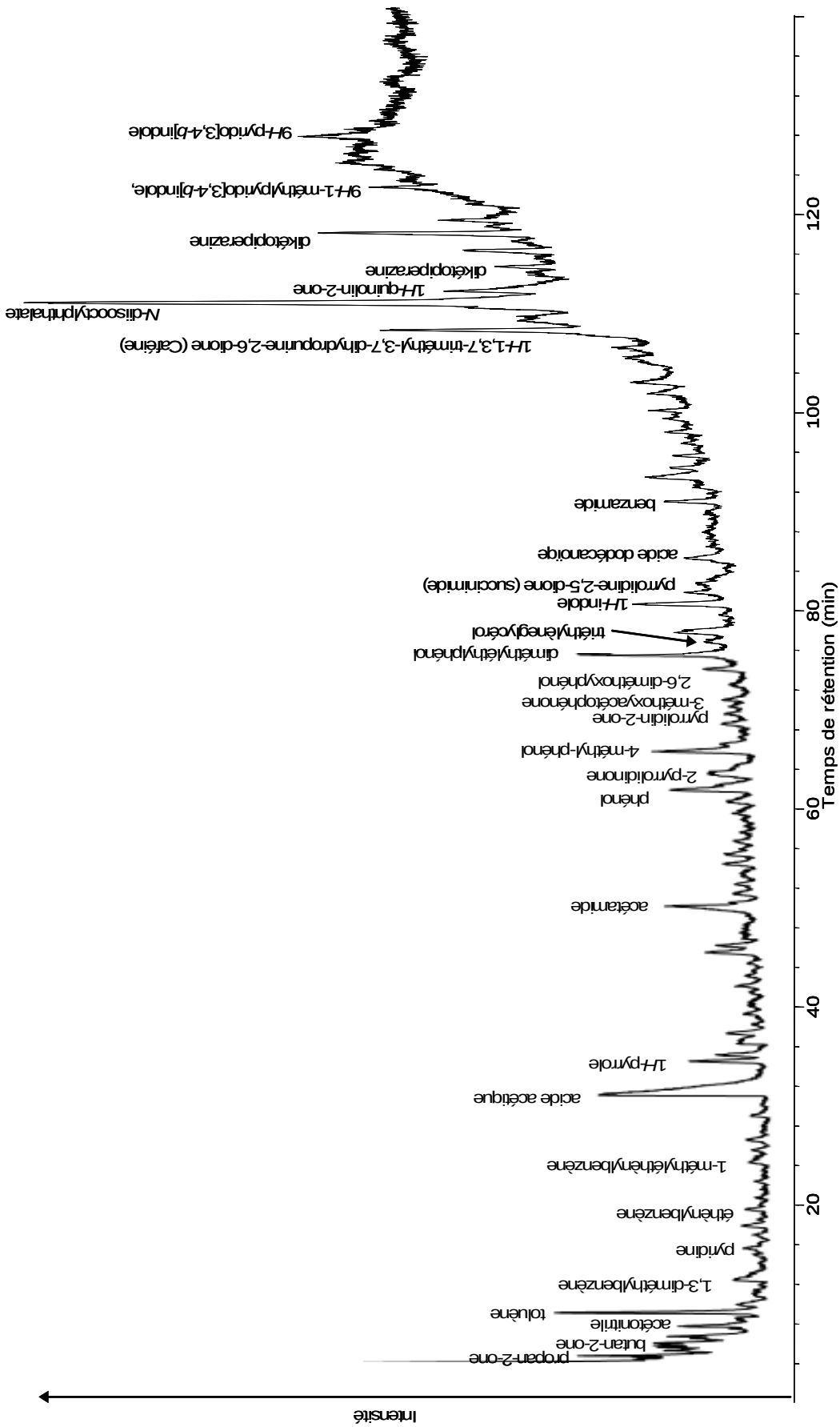


Figure 26 : Pyrogramme de la fraction HPOA1 issue des effluents de la STEP Seine-Aval

Tableau 21 : Résultats de l'intégration semi-quantitative des principaux produits de pyrolyse séparés et identifiés par CG-SM (en %)

Composition	Références	SRFA	HPOM1	TPIM1	HPOM2	TPIM2	HPOA1	TPIA1	HPIA1	HPOA2	TPIA2	HPOAN	TPIAN	HPOMT	TPIMT
Origine anthropique															
naphtalène	HAP											1,4			
naphtalène, dérivé	HAP											1,7	0,7	1,5	
benzènesulfonamide	tensioactif		2,6		2,5					2,2		0,3		3,3	
1*H*-1,3,7-triméthyl-3,7-dihydropurine-2,6-dione	caféine					2,8	6,5	16,9			2,1		0,5		
N-diisooctylphthalate	DEHP (plastique)		27,0	1,2	3,3	7,2	19,2		3,5	18,0	2,3			1,3	
acide 1-phénanthrènoïque, dérivé	HAP dérivé									1,8					
1H-3,7-diméthyl-3,7-dihydropurine-2,6-dione	Dérivé caféine							4,3	2,7						
oxide de triphénylphosphine	synthèse organique		6,5		4,5	3,7									1,6
1*H*-quinolin-2-one	antibactérien						3,9	3,85	2,1						
Origine diverse															
benzène	[1, 2, 3, 4, 5]											2,9	1,4		
toluène	[2, 3, 4, 5]	0,9		1,3	1,4	0,6	2,8	0,8		1,6	1,2	6,7	1,3	2,6	2,3
éthylbenzène	[1, 2, 3, 4, 5]									0,2		1,5	2,2	0,4	0,9
diméthylbenzène	[1, 2, 3, 4, 5]	1,9		1,3						0,9		1,5	1,9	3,4	0,9
diéthylbenzène	[1, 2, 3, 4, 5]												9,9		
éthènylbenzène	[5, 6, 7, 8]											0,7		0,9	
triméthylbenzène	[1, 2, 3, 4, 5]	1,7										0,9		1,9	
1-phényléthanone														1,3	
acide acétique	[2, 6]	2,9	8,0	13,6	6,6	4,6	7,8	0,7	6,2	6,3	8,1	1,9	3,8	11,2	3,5
méthyléthènylbenzène	[5, 6, 7, 8]											1,0	3,0		
phénol	[2, 3, 4, 5]	6,5	0,9	1,3	3,4	1,1	2,0	0,6		1,9	0,5	5,1	1,3	5,4	1,3
4-méthylphénol	[2, 3, 4, 5]	4,9		1,2	1,4	1,6	1,5	1,0		1,5	0,9	2,8	1,2	2,9	1,4
acide benzoïque					3,8	3,7				0,9	1,7	0,3	1,2	1,6	1,9
acide benzoïque, dérivé	[9]	6,9	3,2												
ester d'acide propènoïque, dérivé												2,0	1,2		
acide crotonique		7,3											3,9		
acide formique			2,7	18,5	7,9	6,2				1,2	3,2	1,4	6,8	2,1	1,3
1-(2-méthoxypropoxy)propan-2-ol											9,4				
acide propènoïque		3,4										2,4		2,2	0,8
Origine lignine															
Origine lignine															
2-methoxyphénol	[4]											0,6			
diméthylphénol	[4]	1,5													
diméthyléthylphénol	[4]						4,3								
4-éthylphénol	[4]											1,7		1,6	
acétophénone, dérivé		0,9													
Origine lipidique															
dipropylèneglycérol								1,2			27,1				
diéthylèneglycérol								0,8	3,6				0,6		0,9
acide propanoïque										0,8		0,8		1,7	

triéthylèneglycérol						1,5		2,7		0,8	1,1		1,6		5,8
acide dodécanoïque	[9]		1,9		1,4		1,2								
acide hexanoïque	[9]	3,2	2,1	2,8	2,5	2,0			4,7	1,8	0,8	0,6	0,7	3,3	2,8
acide hexanoïque, dérivé	[9]		18,9		1,7				3,5	9,7				5,8	
acide octanoïque	[9]	7,5	4,9	1,8	11,9	3,3		2,0	2,7	3,2	1,9	0,7	0,9	3,7	5,2
acide octanoïque, dérivé	[9]				2,5			1,6	9,6	2,2					
acide décandioïque, dérivé	[9]						1,5			2,8					
acide tétradécanoïque	[9]													2,4	
Origine polysaccharidique															
propan-2-one	[2, 10]	2,5	2,5		3,3	3,4	2,6	1,6	8,6	2,9	3,3	4,4	5,2	11,5	2,7
butan-2-one	[2, 10]	1,9				6,9	1,4	1,9	4,2	1,3	1,8			3,8	1,5
cyclopent-2-èn-1-one	[2, 10, 11]	1,9										4,7	2,1	3,3	
5-méthylfuran-2-carboxaldéhyde	[2, 10, 11]	4,2		2,5		1,4				0,6	2,6		1,3		
3-méthylcyclopent-2-èn-1-one	[2, 10, 11]	0,8										2,6	0,8	2,9	
2-méthanolfurane	[2, 10, 11]	4,5													
Origine protéique															
pyrrolidin-2-one	[5]			0,9				0,8			1,4				
acétonitrile	[5]	0,8	1,6	6,7	1,9	0,8	1,5	1,3	6,8	1,2	1,6	3,2	1,2	3,3	4,4
pyridine	[1, 12]			1,7						0,6	0,9	0,2	1,2		
méthylpyridine	[1, 12]										0,6	4,5	0,5		1,2
méthylpyrazine	[13]										0,8	1,0	0,6		
1*H*-pyrrole	[5]					1,4	1,3	1,5		0,7	2,3	0,4	1,3		2,4
1*H*-2-méthylpyrrole	[5]							0,5				0,2			
acétamide	[5]			4,1	2,3	3,5	1,5	1,0	1,5	3,2	4,3	1,6	6,6	2,2	1,4
propanamide	[5]											0,4	0,6		
1*H*-3-éthyl-4-méthyl pyrrole-2,5-dione	[5]				0,9					2,0		1,3	0,5	1,8	
1*H*-pyridin-2-one	[1, 12]								1,8				0,4		
piperidin-2-one	[5]							0,6							
3-méthylpyrrolidine-2,5-dione	[5]			1,3		3,3					0,7	0,5	0,9	1,5	1,3
pyrrolidine-2,5-dione	[5]			2,8		3,7		0,5			1,2		0,8		0,9
1*H*-indole	[5]						1,9			0,6		0,6			
benzamide							1,5								
2-méthyl-5,5-di(cyanoéthyl) tétrahydropyrane	[13]					5,0									
dikétodipyrrole	[5]							1,3							
piperazine	[13]								2,9						
pyrrolidine, dérivé	[5]					2,6									
dikétopiperazine	[12, 14]				2,4	4,3	5,0	23,8	13,4	7,1	2,0				4,4
1-nitropyrazole	[13]														4,3
2-méthyl-4-amino-pyrimidine	[13]										1,2				
9*H*-1-méthylpyrido[3,4-b]indole	[5]						4,2								
thymine	base azoté de l'ADN								2,1						
1*H*,3*H*-pyrimidine-2,4-dione	[13]								1,0						
1*H*,3*H*-pyrimidine-2,4-dione, dérivé									4,8						

[1] (Bracewell et Robertson, 1984) [2] (Pouwels *et al.*, 1987) [3] (Galletti et Reeves, 1992) [4] (Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1986b) [5] (Tsuge et Matsubara, 1985) [6] (Fabbri, 2001) [7] (Van Smeerdijk et Boon, 1987) [8] (Van Bergen *et al.*, 1997) [9] (Saiz-Jimenez *et al.*, 1996) [10] (Helleur *et al.*, 1985b) [11] (Helleur *et al.*, 1985a) [12] (Chiavari et Galletti, 1992) [13] (Schnitzer *et al.*, 2007) [14] (Stankiewicz *et al.*, 1996)

Environ 80 produits de pyrolyse ont ainsi été identifiés et intégrés par pyrolyse-CG-SM et leurs pics correspondants ont été intégrés. Ils ont ainsi pu être classés en accord avec la littérature (voir tableau) selon leur provenance : anthropiques (9), diverses (19), de la lignine (5), lipidiques (11), polysaccharidiques (6) et protéiques (27). Les pourcentages des aires de chacune de ces familles par rapport à l'aire totale des pics intégrés sont reportés dans le Tableau 22,

Tableau 22 : Pourcentage représenté par la somme des aires des produits de pyrolyse séparés et identifiés en CG-SM et regroupés en fonction des familles dont ils proviennent.

Origines	SRFA	HPOM1	TPIM1	HPOM2	TPIM2	HPOA1	TPA1	HPIA1	HPOA2	TPIA2	HPOAN	TPIAN	HPOMT	TPIMT
anthropiques	0	36	1	10	14	30	21	8	22	4	3	1	6	2
divers	36	15	37	24	18	14	3	6	15	25	31	39	36	14
lignines	2	0	0	0	0	4	0	0	0	0	2	0	2	0
lipides	11	28	5	20	7	3	8	24	21	31	2	4	17	15
polysaccharides	16	3	3	3	12	4	4	13	5	8	12	10	21	4
protéines	1	2	18	8	22	17	31	34	15	17	14	15	9	20
total	66	83	63	66	72	71	67	86	78	85	64	68	91	55

A partir du précédent tableau, plusieurs remarques peuvent être faites :

- la somme des principaux pics intégrés et identifiés à une molécule varie entre 55 et 91 % de l'aire totale intégrée montrant ainsi la difficulté d'identifier la composition des MOD malgré le fractionnement préalable mais aussi la performance de résolution de la pyrolyse-CG-SM face à la multitude de molécules présentes dans la MOD,

- les produits de pyrolyse ne sont pas tous caractéristiques d'une origine spécifique puisque la somme des molécules d'origines diverses atteint jusqu'à 39 % des pics principaux,

- les produits de pyrolyse provenant des lignines sont absents ou très minoritaires dans nos fractions (< 4%),

- les produits de pyrolyse provenant des polysaccharides restent, de manière générale, assez minoritaires puisqu'ils dépassent rarement 13 % (excepté HPOMT),

- les familles majoritaires sont : les lipides, les protéines et les molécules d'origine anthropiques. Cependant le pourcentage des aires des familles varie d'une fraction à l'autre de manière importante : d'un facteur 15 pour les lipides et 17 pour les protéines et les molécules anthropiques.

I.4. DISCUSSIONS

I.4.1. Concentration en COD et caractéristiques des eaux étudiées

Les eaux de surface étudiées, toutes prélevées en période de temps sec montrent des concentrations en COD variables de 2 $mgC.l^{-1}$ en amont à 4 $mgC.l^{-1}$ en aval de l'agglomération parisienne principalement dues aux rejets de la STEP Seine-Aval atteignant jusqu'à 38,7 $mgC.l^{-1}$ ce qui est conforme avec la littérature (Meybeck *et al.*, 1998). On constate également que les deux échantillons issus des effluents de la STEP (sortie des décanteurs secondaires) présentent un COD variable (17,4 et 38,7 $mgC.l^{-1}$) bien que la STEP fonctionne dans la même configuration lors de ces deux prélèvements.

Les pH mesurés dans l'ensemble des eaux sont voisins de 8 et typiques d'un bassin sédimentaire carbonaté. La conductivité varie entre 517 et 625 $\mu S.cm^{-1}$ pour les eaux de Marne et de Seine et est voisine de 1500 $\mu S.cm^{-1}$ pour les effluents de la STEP ce qui est en accord avec des valeurs déjà observées (Meybeck *et al.*, 1998). Il est généralement admis que les eaux de surface riche en COD sont des eaux « douces », alors qu'à l'opposé les eaux fortement minéralisées présentent le plus souvent des concentrations en COD faibles. La Figure 27 illustre et étend ces commentaires aux effluents de STEP à travers la corrélation entre la conductivité et le COD des eaux étudiées dont le coefficient de corrélation est considéré comme significatif (α=0,01).

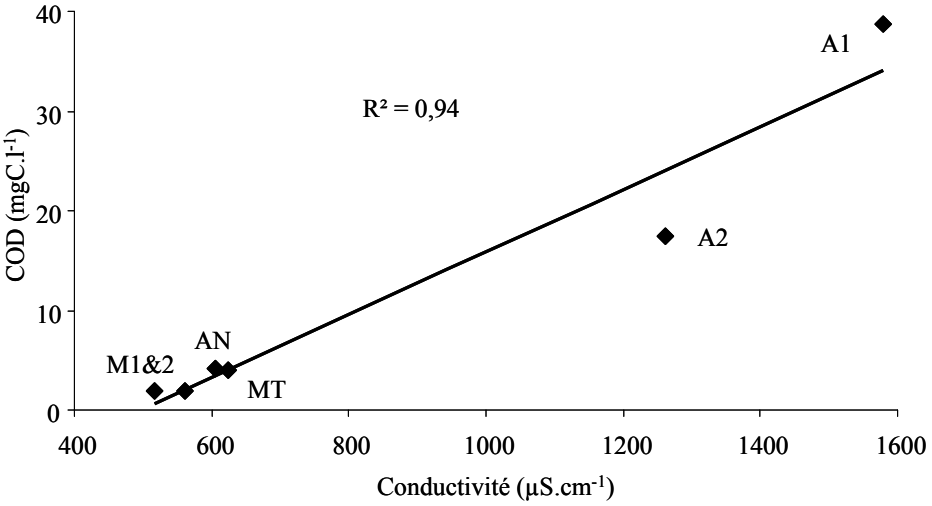


Figure 27 : Corrélation entre le COD et la conductivité des eaux étudiées

Si les valeurs d'oxygène dissous à Méry sur Marne sont correctes (proche de 100 % de saturation), en revanche celles-ci s'avèrent faibles en aval de la STEP à Andrésy et Méricourt atteignant 60 % de saturation. Pourtant lors de la campagne estivale (27 et 29/06/07 et 03/07/07), les concentrations en chlorophylle a et phaeophytine restent très élevées confirmant la présence d'un bloom phytoplanctonique en Seine. Ces faibles concentrations en oxygène ne peuvent alors s'expliquer que par une activité bactérienne intense due à l'augmentation de MOD en aval de l'agglomération parisienne.

I.4.2. Extraction de la MOD : une succession d'opérations

Il n'existe pas de méthode simple permettant l'extraction quantitative des MOD, cet objectif ne pouvant être aujourd'hui qu'approché (la procédure expérimentale induit toujours quelques pertes) grâce à la combinaison de plusieurs opérations (adsorption, précipitation, distillation, etc.). Cette succession inévitable d'étapes conduit de ce fait à un fractionnement de la MOD. Ce fractionnement permet tout d'abord de caractériser la MOD par la distribution des fractions de MOD engendrées. Il « simplifie » également l'analyse structurale des MOD grâce à l'étude de fractions dont les propriétés essentielles sont le reflet des opérations d'extraction utilisées (solubilité, taille, polarité, etc.) et offre par ailleurs la possibilité d'une étude plus sélective des groupements fonctionnels de ces fractions.

Les nombreuses modifications et évolutions que ce protocole a reçues permettent aujourd'hui de disposer d'un outil intéressant dans la mesure où l'objectif d'une extraction quantitative peut être pratiquement atteint. Grâce à la diversité des propriétés physico-chimiques des ressources étudiées, l'expérience acquise nous permet également de prédire les performances de chacune des opérations développées.

L'objectif de cette partie de la discussion est de commenter étape par étape les résultats obtenus au cours de notre étude, en mettant en évidence l'influence de la nature de la MOD.

I.4.2.1. Osmose inverse : une approche efficace pour la concentration des MOD

Si la mise en œuvre de l'osmose inverse comme opération unitaire pour extraire les MOD (la phase de lyophilisation devant être considérée comme une étape indispensable quelle que soit la procédure utilisée) peut s'avérer une approche simple et rapide dans le cas particulier d'eaux de surface très riches en COD et très peu minéralisées comme par exemple le cas de la rivière Suwannee - Géorgie (Serkiz et Perdue, 1990), cette méthode est à proscrire dans le cadre de travaux à mener sur des eaux de composition plus classique (quelques $mgC.l^{-1}$ de COD contre quelques centaines de $mg.l^{-1}$ de résidus secs) rencontrées dans des climats tempérés. En effet, la grande capacité de l'osmose inverse à retenir les sels (application industrielle pour le dessalement) en plus de la MOD conduit à l'obtention d'extraits sans aucun intérêt pour l'étude structurale des MOD.

Cependant, l'osmose inverse reste une étape de préconcentration très intéressante de par sa simplicité, sa rapidité et surtout son efficacité, rappelons que l'eau préfiltrée à 0,45 µm est adoucie en amont de l'osmoseur, cette opération n'engendrant pas de perte observable en COD dans notre étude.

Néanmoins, nos travaux montrent que ces performances dépendent des caractéristiques de la MOD. En effet, les résultats obtenus mettent en évidence d'une part que le taux de récupération du COD dans le concentrat augmente avec le caractère hydrophobe des MOD (Figure 28a). D'autre part le rinçage des membranes avec de la soude s'avère une opération indispensable pour optimiser la procédure (Figure 28b). A l'inverse du compartiment concentrat, le taux de récupération du COD par rinçage sodique semble d'autant plus élevé que le pourcentage de MOD hydrophile augmente, comme il a déjà été montré (Jarusutthirak *et al.*, 2002 ; Violleau, 1999).

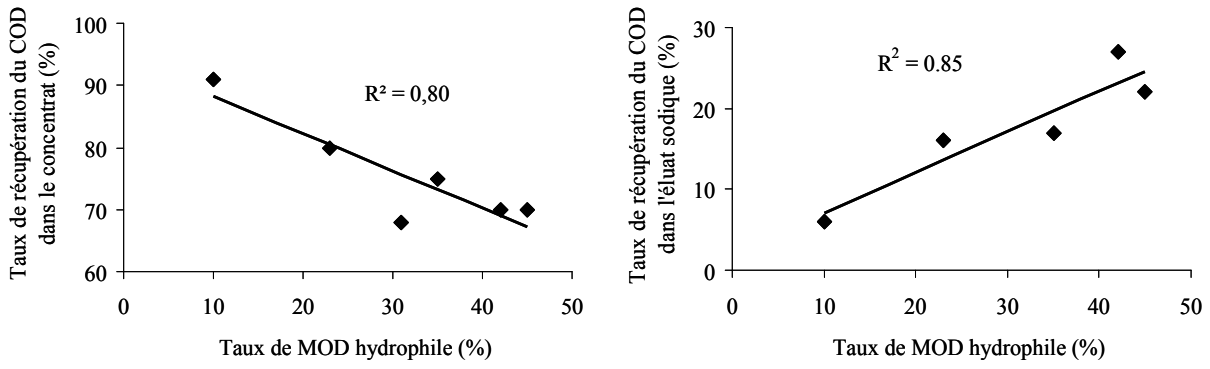


Figure 28 : Relation entre le taux de récupération du COD par osmose inverse et le taux de MOD hydrophile

a : Taux de récupération dans le concentrat **b : Taux de récupération dans l'éluat sodique**

Ces deux corrélations et l'absence de relation entre les pertes observées (perméat et rinçage sodique) lors de l'opération d'osmose inverse et la salinité des échantillons (conductivité) montrent que dans le cadre de nos travaux la phase minérale joue un rôle mineur lors de l'étape de concentration alors que la nature, le caractère hydrophobe/hydrophile de la MOD semble bien plus important. Considérant les précédents résultats ainsi que différentes études (Ang et Elimelech, 2007 ; Her *et al.*, 2004 ; Jarusutthirak et Amy, 2006 ; Jarusutthirak *et al.*, 2002 ; Ouellet *et al.*, 2008 ; Violleau, 1999) la matière organique hydrophile semblerait s'adsorber sur la membrane en polyamide en raison d'interactions entre la surface du polyamide et des polysaccharides et protéines dont la présence dans la fraction HPI a été clairement démontrée par la suite. Concernant le rinçage des membranes à la soude, s'il a été montré qu'il pouvait engendrer une saponification des acides gras (Ouellet *et al.*, 2008), en revanche il a été montré que cette étape de rinçage et plus généralement la concentration par osmose inverse, n'affectait pas : la composition isotopique du carbone (Ouellet *et al.*, 2008), l'adsorption sur charbon actif, la distribution des poids moléculaires mesurés par chromatographie d'exclusion de taille (Kilduff *et al.*, 2004) et la réactivité vis-à-vis du cuivre et du zinc dans le cadre de tests écotoxicologiques (De Schamphelaere *et al.*, 2005).

Lors de l'étape d'osmose inverse l'absorbance UV a également été mesurée dans tous les compartiments de l'OI. Malgré la variabilité du SUVA entre les compartiments, il apparaît pour tous les échantillons une forte corrélation entre l'absorbance UV et le COD lors de la phase de concentration et ce malgré le fort caractère hydrophile de certains échantillons comme par exemple l'effluent de STEP présenté sur la Figure 29. Des résultats non présentés ici ont montré une corrélation similaire entre la conductivité et le COD dans le perméat. Ces excellentes corrélations font de l'absorbance UV et de la conductivité, des outils idéaux pour le suivi de la concentration en COD pendant l'étape de concentration par osmose inverse. En effet, les fuites de COD à travers la membrane d'OI pouvant arriver à n'importe quel moment, il est important d'avoir des outils sensibles, rapides et peu encombrants pour suivre l'étape de concentration du COD.

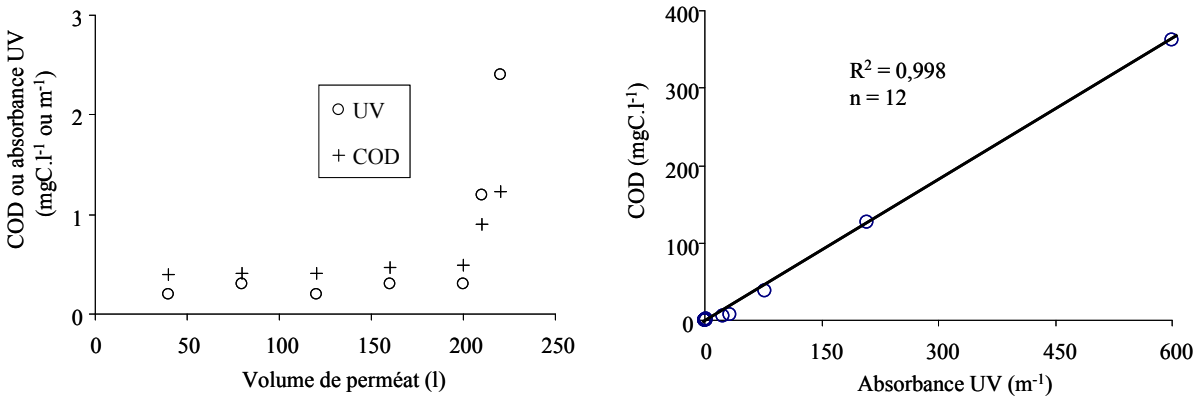


Figure 29 : Relation entre COD et absorbance UV lors de l'étape d'osmose inverse de l'échantillon A1

a : Suivi du COD et de l'absorbance UV dans le perméat d'OI

b : Corrélation entre COD et absorbance UV dans tous les compartiments de l'OI

I.4.2.2. Efficacité des résines DAX-8 et XAD-4

Outre l'intérêt que peut présenter l'utilisation des résines DAX-8 et XAD-4 en série pour son fractionnement des MOD (ayant permis notamment la mise en évidence du caractère hydrophile de la MOD en milieu anthropique) le choix d'une telle procédure est aussi motivé par son pouvoir de séparation des espèces organiques et inorganiques. Ces résines peuvent être utilisées soit à partir d'un échantillon d'eau naturelle soit à partir d'un concentrat d'OI. L'intérêt principal d'une préconcentration par OI est un gain de temps considérable, les résines devant être utilisées sous certaines conditions (débits de filtration = 10 $V_{échantillon}.V_{résine}^{-1}.h^{-1}$) qui rendent la filtration longue et fastidieuse. Dans notre étude, la filtration sur résines DAX et XAD a été conduite uniquement sur des concentrats d'OI (additionnés des éluats sodiques).

Lors de chaque fractionnement, le COD a été suivi en sortie de résines. Ainsi le pourcentage représentatif de chaque fraction retenue ou non sur les résines a pu être déterminé. Mais surtout aucune fuite de COD suite à une saturation des résines n'a pu être mise en évidence pour chaque échantillon. La Figure 30 présente, à titre d'exemple pour l'échantillon M2, les courbes de rétention du COD pour chaque résine. Ces courbes possèdent les mêmes caractéristiques quel que soit l'échantillon considéré, à savoir : l'atteinte rapide d'un palier lors de la filtration des 5 premiers litres de concentrat d'osmose inverse et une bonne stabilité de ce palier sur le reste de concentrat permettant ainsi une détermination précise du pourcentage représentatif de chaque fraction.

Par ailleurs, une partie des fractions HPO et TPI de l'échantillon M2 a été remise en solution et réadsorbée sur les résines afin de tester la reproductibilité du fractionnement et de l'élution. Les résultats ont révélé la même distribution et des rendements d'élution de 98 % montrant ainsi la reproductibilité du protocole pour fractionner et extraire les MOD hydrophobe et transphilique.

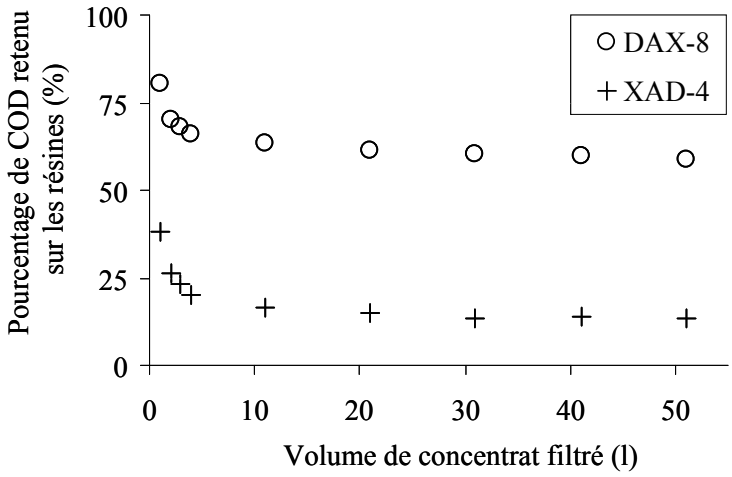


Figure 30 : Pourcentage de COD retenu sur les résines DAX-8 et XAD-4 lors du fractionnement du concentrat de l'échantillon M2

La filtration sur résines DAX-8 et XAD-4 constitue aussi un outil intéressant pour caractériser la matrice organique des eaux, comme l'illustre la Figure 31 qui présente les distributions du COD obtenues pour chacune des eaux étudiées.

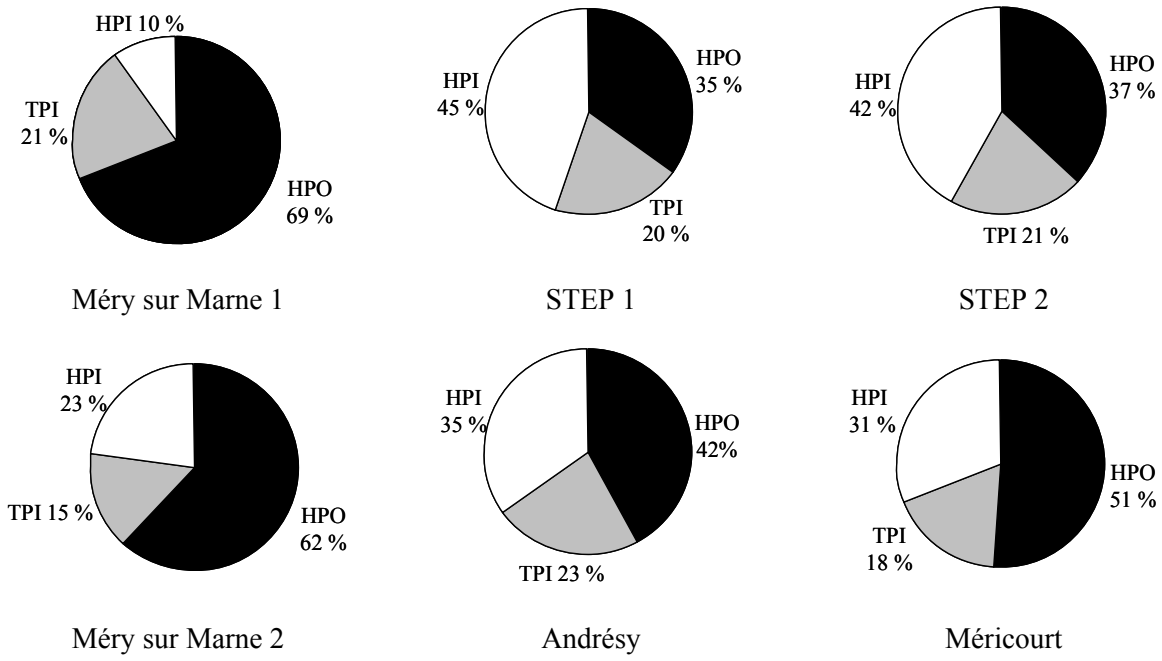


Figure 31 : Distribution du COD des eaux étudiées

Pour les eaux dont la composante organique a un caractère fortement hydrophobe (dans notre cas Méry sur Marne), l'utilisation des résines DAX-8 et XAD-4 en série permet d'isoler la majorité du COD (entre 77 et 90 %). En revanche dans le cas de MOD à caractère plus hydrophile (STEP), seuls environ 56 % du COD sont isolés par les résines mettant en évidence la nécessité de l'extraction des MOD HPI.

I.4.2.3. Extraction des MOD hydrophiles : recherche d'une approche quantitative

Actuellement très peu d'études ont eu lieu sur cette fraction hydrophile (Aiken et Leenheer, 1993 ; Croué, 2004 ; Leenheer *et al.*, 1987 ; Violleau, 1999) et ces rares études se sont souvent arrêtées en raison d'une purification incomplète à l'extraction de ces substances voire à quelques analyses de caractérisation. La recherche d'une approche plus quantitative de l'extraction des MOD repose sur la séparation des molécules organiques non retenues sur les résines et des sels entrant dans la composition de l'eau (les ions carbonatés ont été largement éliminés lors de l'acidification avant fractionnement, cette opération apportant en contre partie des ions chlorures). La purification de cette faction HPI basée sur une distillation zéotrophique a subi de nombreuses modifications avec plus ou moins de succès (Aiken et Leenheer, 1993 ; Leenheer *et al.*, 1987 ; Violleau, 1999).

Le soin porté à la purification de cette fraction fortement présente dans nos échantillons et l'ajout d'une seconde distillation zéotrophique dans l'acétonitrile a permis d'isoler ces fractions avec une pureté supérieure (somme des teneurs en éléments C, H, O, N, S > 90 %) à ce qui avait été précédemment obtenu et ce, sans fractionnement supplémentaire. Cette amélioration du protocole a ainsi permis de caractériser ces fractions sans interférences inorganiques visibles (SUVA, IRTF, etc.) et permettra d'étudier l'influence de ces MOD sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux traces.

Cependant des rendements d'extraction relativement faibles (< 30 %) ont été obtenus pour cette fraction dans les échantillons A2, AN et MT. Seule la fraction HPI du premier échantillon issu de la STEP a été isolée avec un rendement correct de 62 %. Ceci s'explique par une précipitation des MOD avec les sels plus faible due à un ratio initial MOD/sels minéraux élevé. En effet cet échantillon possède la teneur en MOD la plus élevée (38,7 $mgC.l^{-1}$). La faiblesse des rendements s'explique aussi par l'importante succession d'étapes de cette purification.

Les modifications apportées au protocole d'extraction des MOD HPI permettent désormais d'accéder à des fractions avec une pureté raisonnable pour pouvoir être caractérisées ultérieurement. En revanche des efforts sont nécessaires pour augmenter le rendement d'extraction de la fraction HPI, car les phénomènes de coprécipitation avec les sels sont trop importants et peuvent altérer la représentativité de la fraction extraite. L'utilisation d'électrodialyse ou la combinaison de colonnes échangeuses de cations et d'anions pourrait être une solution dans la séparation des MOD HPI vis-à-vis de la phase inorganique.

I.4.3. Comparaison des propriétés structurales des différentes classes de MOD extraites

Le Tableau 23 rassemble de façon synthétique les principaux résultats apportés par les outils analytiques développés au cours de notre étude. L'ensemble de ces données nous a permis de dégager des différences significatives entre les trois types de fractions isolées HPO, TPI et HPI.

Tableau 23 : Différences structurales et tendances entre les différents types de MOD

Paramètre analytique		SRFA	HPO min. – max.	Tendance HPO→TPI→HPI	HPI min. – max.
C/H (molaire)		1,0	0,7 – 0,8	↘	0,4 – 0,6
C/ O		1,6	1,7 - 2,6	↘	1,3 – 2,0
C/ N		91,1	11,1 - 17,6	↘	3,9 - 4,4
SUVA ($m^{-1}.l.mgC^{-1}$)		4,3	1,8 - 2,8	↘	0,7 – 1,1
Fluorescence : monoexcitation : λ_{em}= 420 et 480 nm, synchrone : λ_{em}= 415, 480 et 520 nm et 3 dimensions pics A et C				↘	
IRTF	C-O phénol			↘	
	C-O sucres			↗	
	CH_2 , CH_3			↘	
Sites acido-basiques (Q_{max}) ($mol.kg^{-1}$, méthode NICA)		7,1	4,4 – 7,7	↗	9,2 - 10,1
Substances humiques dites réfractaires (méthode Chanudet et al., 2006)		100 (Réf)	29,8 - 53,6	↘	0,7 – 7,1
$\delta^{13}C$ (‰)		-28,1	-28,6 -24,1	↘	- 38,1- - 26,7
$\delta^{15}N$ (‰)		0,7	1,9 – 3,2	↗	(> 5,9)
Poids moléculaire M_n (Da)		2278	678 -1125	↘	218 - 1081
Pyrolyse (%)	anthropiques	0	3 - 36	↘	8
	lignines	2	0 - 4	↘	0
	protéines	1	2 - 17	↗	34

Ces trois fractions présentent un caractère relativement acide confirmé par les analyses infrarouge (bande des groupements carboxyliques à 1720 cm^{-1}) et les dosages acido-basiques (de 4,4 à 10,1 $mol.kg^{-1}$). Le protocole d'extraction utilisé est basé sur des propriétés de polarité. Ce protocole permettait d'entrevoir certaines différences significatives au niveau du caractère hydrophobe (ou hydrophile) des extraits isolés, d'où les appellations retenues pour les distinguer. L'analyse structurale des fractions de MOD est dans l'ensemble en adéquation avec ce qui pouvait être attendu. Pour un même milieu, la fraction HPO présente des propriétés plus hydrophobes que la fraction HPI. La fraction transphilique, possédant une configuration intermédiaire, met en évidence un continuum de propriétés au sein de la matrice organique des eaux.

La principale caractéristique de la fraction HPO est son caractère aromatique, spécificité traduite par :

- une valeur de SUVA élevée,
- une bande C-O bien définie à 1260 cm^{-1} en infrarouge correspondant à la liaison C-O des phénols détectés par pyrolyse-CG-SM,
- une fluorescence des pics C et A intense,
- un rapport C/H élevé indicateur d'un fort degré d'insaturation,

La fraction HPO est également appauvrie en groupements fonctionnels (comparativement aux autres fractions) puisqu'elle possède les ratios molaires C/O et C/N les plus élevés et le nombre de sites acido-basiques le plus faible. Son caractère hydrophobe est de plus confirmé par l'abondance des bandes CH_2 et CH_3 bien résolues en infrarouge et sa masse moléculaire importante (la plus élevée des trois fractions si l'on ne tient pas compte de la fraction colloïdale parfois présente dans la fraction HPI).

L'ensemble de ces caractéristiques conduit la communauté scientifique à attribuer généralement une origine majoritairement allochtone à la fraction HPO en milieu naturel, l'essentiel des cycles aromatiques trouvant vraisemblablement leur origine au niveau des structures ligneuses. Dans le cas de système aquatiques sous fortes pressions humaines, cette attribution ne peut être faite pour une raison évidente : le carbone présent dans ces systèmes provient en grande partie des effluents de STEP donc de la dégradation des fèces humaines et des microorganismes contribuant à cette dégradation et non comme en milieu naturel de la dégradation des plantes supérieures. La présence de cette fraction de manière relativement importante conduit donc à penser qu'elle est initialement présente dans les fèces humaines et/ou les microorganismes qui les dégradent et/ou qu'elle résulte d'étapes de dégradations et de condensations de molécules plus simples Il est important de noter que les fractions HPO isolées dans cette étude révèlent néanmoins une aromaticité beaucoup plus faible que celle des fractions issues de milieu naturel.

Dans l'ensemble, les fractions TPI possèdent des caractéristiques intermédiaires à celles des fractions HPO et HPI comme le montre le Tableau 23. Les fractions TPI se différencient des fractions HPO principalement au niveau de leur teneur en azote qui est toujours beaucoup plus élevée (environ 2 fois supérieure). L'étude semi-quantitative par pyrolyse-CG-SM a également montré que le taux de molécules d'origine protéique est nettement supérieur (de 2 à 16 %) dans les fractions TPI par rapport aux fractions HPO.

Parmi les différentes théories du processus « d'humification », c'est-à-dire de maturation de la matière organique, plusieurs font appel à des processus de condensation dans lesquels seraient impliqués les acides aminés (Cheshire *et al.*, 1992 ; Hedges, 1978 ; Stevenson, 1994). Cette proportion de matériel d'origine protéique et ces théories amènent à

penser que la fraction TPI pourrait être un intermédiaire dans le processus de maturation des MOD conduisant aux substances les plus hydrophobes, aux substances dites « humiques » (rappelons que ces SH font partie de la fraction HPO dans cette étude). A ce propos, notons que nos fractions HPO issues des effluents de STEP possèdent également un fort pourcentage d'azote et de structures protéiques et parallèlement montrent une aromaticité plus faible que les SH de référence. Elles possèdent également un faible taux de substances humiques ou réfractaires (selon la méthode développée par Chanudet et al., 2006) comparé à un grand nombre de SH de références. Toutes ces différences structurales permettraient de penser que les fractions HPO, issues des effluents de STEP et plus généralement des systèmes aquatiques sous pressions urbaines, sont, elles-aussi, en cours de transformation, de maturation probablement à un stade plus avancé que les fractions TPI mais moins que les SH de référence issues de milieu naturel.

Les fractions HPI regroupent les structures les plus petites (si l'on ne tiens pas compte de la fraction colloïdale parfois présente) et les moins aromatiques, indiquant leur caractère fortement hydrophile. Ces fractions présentent une teneur importante en azote (de l'ordre de 10 %). Le traitement biologique des effluents en STEP pourrait conférer une origine microbienne aux fractions HPI puisque les résidus cellulaires bactériens sont particulièrement riche en azote (Macko et Estep, 1984 ; Plette *et al.*, 1995). Le ratio C/N des fractions HPI est également proche du rapport de Redfield (C/N/P = 106/16/1, C/N≈ 7) qui, bien que décrivant la composition du phytoplancton marin, peut indiquer une origine aquagénique pour les MOD HPI issues de Seine en aval de la STEP (AN et MT) où un bloom phytoplanctonique a été observé indiquant potentiellement une origine algale pour cette fraction HPI. Ces fortes teneurs en azote s'accompagnent à nouveau d'un fort pourcentage de substances d'origine protéique observées par pyrolyse (34 %), de bandes très visibles en infrarouge caractéristiques des liaisons N-H et N-C=O. Cette teneur élevée en azote est corrélée (R^2 significatif pour α=0,05 soit pour intervalle de confiance de 95 %) à la forte proportion de sites acido-basiques d'affinité forte indiquant ainsi un caractère amine plutôt que phénolique comme l'atteste les analyses élémentaires (fort taux d'azote et faible aromaticité : faible ratio C/H), SUVA (faible aromaticité), IRTF (fonction amines et amides), fluorescence (faible aromaticité et présence de structures protéiques), pyrolyse-CG-SM (présence importante de structures protéiques).

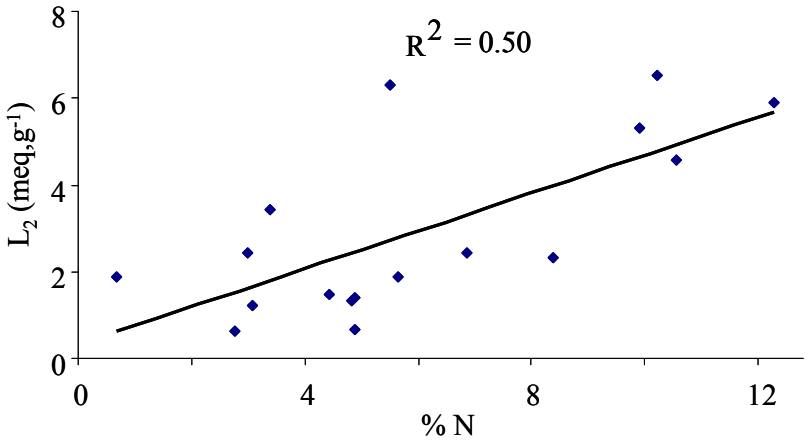


Figure 32 : Corrélation entre le pourcentage d'azote et le nombre de sites acido-basiques d'affinité forte pour l'ensemble des fractions de MOD

Avec un ratio C/O plus faible que pour les autres fractions, cette fraction HPI semble se distinguer également par une proportion en sucres plus importante (détectés en pyrolyse-CG-SM et bande de la liaison C-O des sucres en spectroscopie IR). Sa structure aliphatique de type « polyacide » correspond bien à l'empreinte chromatographique qu'elle donne lors de

l'analyse par chromatographie d'exclusion de taille. La présence des colloïdes n'étant pas systématique dans les fractions HPI, il est possible que ces composés soient perdus lors de l'extraction de la fraction HPI dont les rendements restent faibles. Les valeurs en ^{15}N et en ^{13}C qui accompagnent les caractéristiques structurales de la fraction HPI (plus forte proportion d'acides aminés, de sucres) accordent à nouveau une origine autochtone prédominante et récente (production algale et bactérienne) à l'opposé de la fraction HPO ayant déjà subi un certain nombre de processus d'altération. Ce caractère peu dégradé des MOD HPI est à nouveau mis en évidence par les corrélations significatives suivantes :

- C/N versus C/H (Figure 33, coefficient de corrélation significatif pour α=0,001) puisque dans les processus de biodégradation la MOD perd prioritairement les groupes fonctionnels azotés (Kiikkilä *et al.*, 2006 ; Ogawa *et al.*, 2001 ; Wiegner et Seitzinger, 2001), et les SH dites réfractaires ont un ratio C/H qui tend vers 1 (Ma *et al.*, 2001),

- SUVA versus C/H (Figure 34, coefficient de corrélation significatif pour α=0,001), puisque le SUVA caractérise l'aromaticité, le processus de maturation, d'« humification » étant composé d'étape de condensation de cycles aromatiques (Cheshire *et al.*, 1992 ; Hedges, 1978 ; Stevenson, 1994)

- SUVA versus substances humiques dites réfractaires (Figure 35, coefficient de corrélation significatif pour α=0,001) montrant une corrélation correcte (bien que plus faible que précédemment) de ces deux critères utilisés pour décrire le caractère réfractaire de la MOD,

- C/H versus substances humiques dites réfractaires (Figure 36, coefficient de corrélation significatif pour α=0,05) indiquant que la méthode électrochimique développée par Chanudet et al. (2006) semble correcte pour déterminer les substances humiques dites réfractaires.

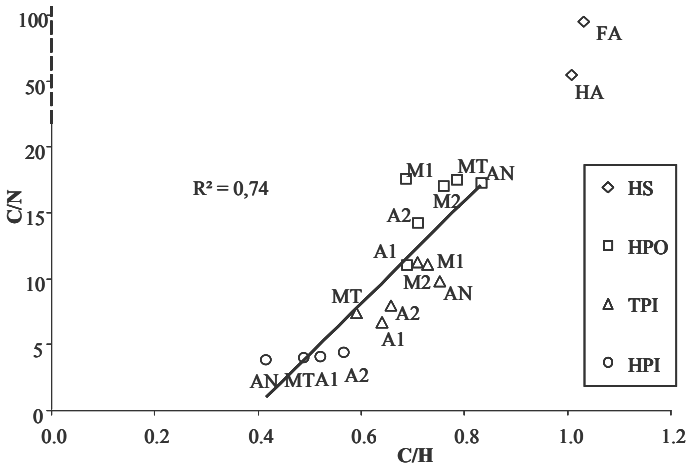


Figure 33 : Corrélation entre les ratios molaires C/N et C/H

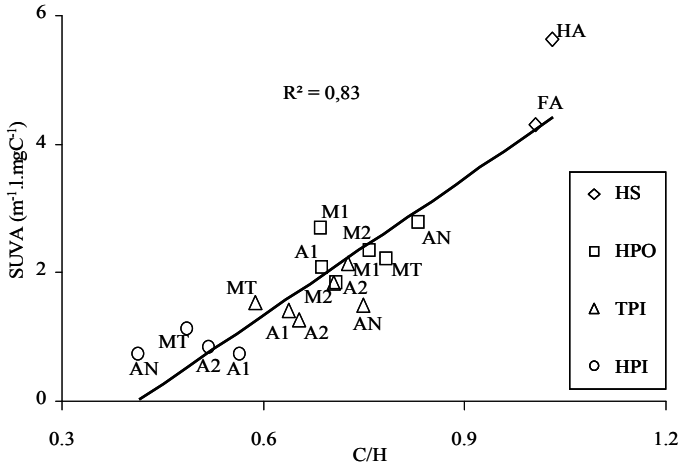


Figure 34 : Corrélation entre le SUVA et le ratio molaire C/H

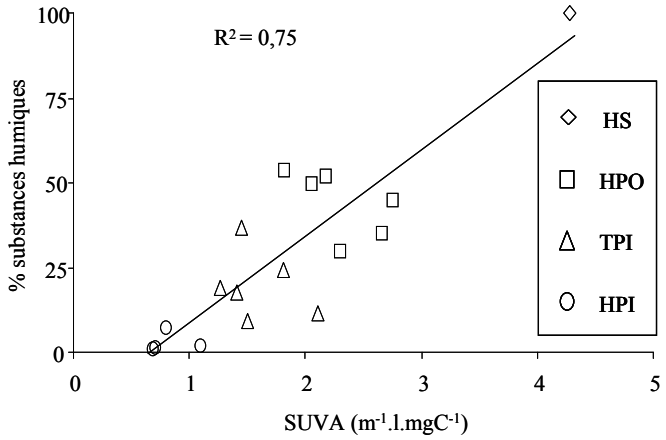


Figure 35 : Corrélation entre le SUVA et le pourcentage de substances humiques dites réfractaires

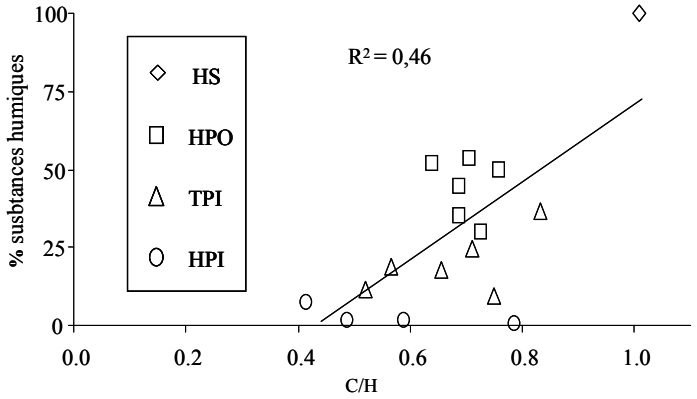


Figure 36 : Corrélation entre le ratio molaire C/H et le pourcentage de matières organiques réfractaires

I.4.4. Comparaison des propriétés structurales des différents échantillons

La MOD de Méry sur Marne, prélevée en amont de l'agglomération parisienne, présente dans l'ensemble un fort caractère hydrophobe avec une fraction HPO plus abondante en hiver qu'en été. Les valeurs de SUVA (Figure 37) des fractions HPO et TPI sont plus

élevées en hiver qu'en été, indiquant un degré d'insaturation, de condensation plus important en hiver qu'en été. Cette tendance est confirmée par pyrolyse-CG-SM avec un taux de lipides plus faibles et des taux de protéines et de polysaccharides plus forts en été qu'en hiver. Les résultats des analyses isotopiques en ^{15}N, l'apport potentiel de matières organiques d'origine terrestre en hiver par les eaux de ruissellement (débits plus importants) et la production algale observée en été (bloom phtyoplanctonique) justifient ces différences comme il a déjà été observé dans d'autres études (Aoki *et al.*, 2004 ; Fukushima *et al.*, 2001 ; Violleau, 1999).

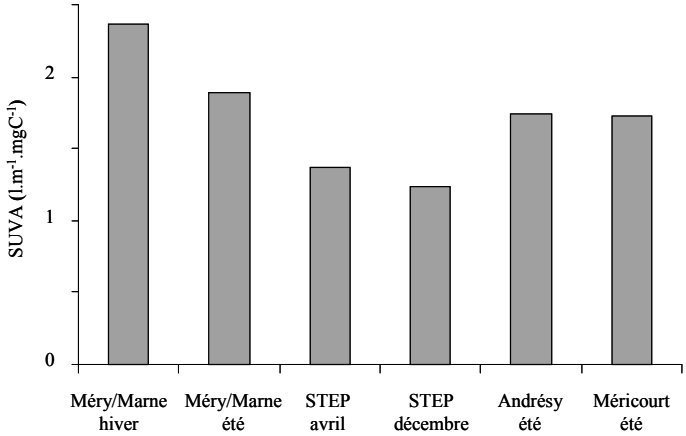


Figure 37 : SUVA des MOD de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne

La fraction HPOM1 présente certaines particularités : un taux de molécules d'origines anthropiques particulièrement élevé (36 % des pics principaux analysés en pyrolyse) pour un site faiblement urbanisé. Ces mêmes molécules ont, par ailleurs, toutes été retrouvées dans une moindre mesure dans la même fraction HPO du même site en été renforçant l'idée d'une contamination anthropique du site. La Figure 38 est issue des Figure 33 et Figure 34 montrant la corrélation des différents paramètres : SUVA et ratio C/H, ratio C/N et ratio C/H. Cette figure présente ici le comportement différent de l'échantillon M1 via ces paramètres. En effet tous les échantillons sauf M1 montrent des tendances similaires : des valeurs de SUVA et de ratio C/N qui augmentent lorsque le ratio C/H augmente. Or pour les MOD de Méry sur Marne hiver, ces tendances sont inversées pour les fractions HPO et TPI, les fractions HPI de Méry sur Marne n'ayant pas été extraites et caractérisées.

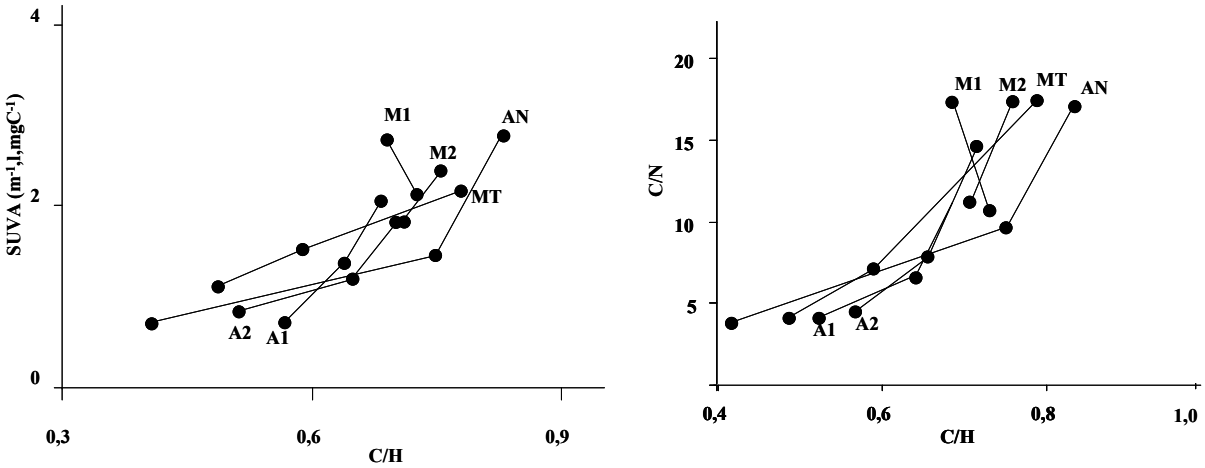


Figure 38 : Comportement de l'échantillon M1 via les paramètres SUVA, ratios C/H et C/N

(Les échantillons sont représentés par des ●, ceux d'un même site sont reliés par une ligne)

L'analyse en composantes principales des résultats d'intégration des pyrogrammes (Figure 39) montre également une description singulière de la fraction HPOM1 avec pour composantes principales les lipides et des molécules d'origines anthropiques, les autres fractions étant décrites par différentes composantes exceptées les fractions HPOMT et SRFA d'origine diverse et deux fractions de STEP « très protéiques ». La fraction HPOM2 arbore également ces composantes mais dans des proportions plus faibles indiquant à nouveau une contamination de ce site. Si l'urbanisation est faible en revanche l'activité agricole est forte sur l'ensemble du bassin de la Marne pouvant expliquer la présence de MOD d'origine non naturelle.

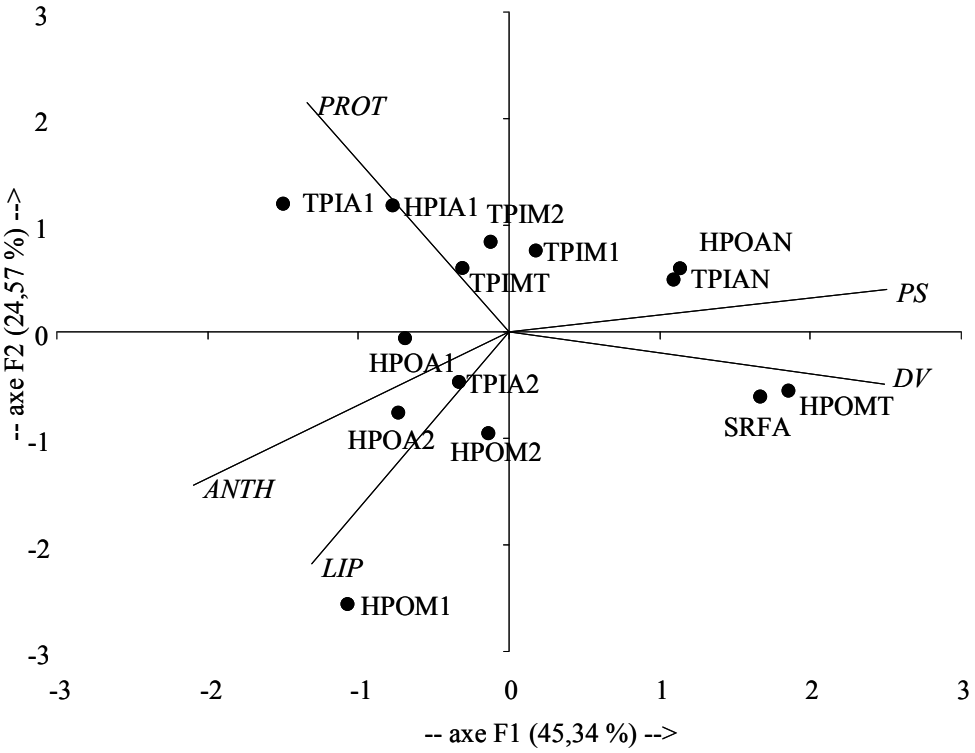


Figure 39 : Analyse en composantes principales de l'origine des produits de pyrolyse issus des fractions de MOD (PROT : protéine, PS : polysaccharide, DV : divers, LIP : lipide et ANTH : anthropique)

Les deux échantillons issus des effluents de STEP prélevés à deux périodes distinctes (avril et décembre 2007) montrent une distribution du COD très similaire avec une forte proportion de MOD hydrophile résultant probablement de l'importante activité bactérienne au cours du traitement des effluents (Imai *et al.*, 2001 ; Imai *et al.*, 2002 ; Leenheer et Rostad, 2004). La fraction HPO n'est pour autant pas négligeable puisqu'elle constitue environ 35 % du COD. Comme il a été montré par ailleurs (Leenheer et Rostad, 2004 ; Ma *et al.*, 2001 ; Manka et Rebhun, 1982), cette fraction hydrophobe est la fraction réfractaire au traitement biologique expliquant ainsi sa présence. L'ensemble des analyses de caractérisation montre une grande similarité des deux échantillons. Ceci reste en adéquation avec la distribution du COD et plus généralement avec les paramètres physico-chimiques globaux mesurés par le SIAAP. L'absence de temps de pluie (pouvant modifier la nature des eaux usées brutes dans le réseau unitaire parisien), la non variabilité des sources des effluents en période de temps secs (Gasperi, 2006) et la configuration identique de la STEP lors des prélèvements expliquent cette similarité. Cependant, une plus faible teneur en azote renforcée aussi par un plus faible taux de structures protéiques, ont été observés dans l'échantillon prélevé en décembre. Les faibles valeurs de SUVA et de ratio C/H, l'enrichissement en ^{15}N, le fort taux

d'azote, la forte bande de fluorescence associée aux tryptophanes et tyrosines, les bandes N-H et N-C=O observées en infrarouge et le fort taux de substances d'origine protéique observées par pyrolyse dans ces fractions montrent que ces MOD sont principalement composées de protéines résultant d'une activité biologique intense. Cette forte présence de protéines indique que les processus de dégradation condensation subis restent faibles par rapport à des MOD naturelles puisque les protéines font partie des composés de la MOD les plus rapidement biodégradables (Kiikkilä *et al.*, 2006 ; Ogawa *et al.*, 2001 ; Wiegner et Seitzinger, 2001). Une durée de traitement d'épuration faible (de l'ordre d'une journée, source SIAAP) par rapport au temps de dégradation que peuvent subir des MOD issues de la décomposition de plantes supérieures avant d'arriver dans le système aquatique, ainsi qu'une forte proportion de résidus bactériens (Dignac, 1998 ; Jarusutthirak et Amy, 2007) peuvent expliquer l'origine biologique et la faible « maturation » de ces MOD issues des effluents de STEP.

Pour les échantillons d'Andrésy et de Méricourt (même masse d'eau) prélevés à quelques jours d'intervalle de celui de Méry sur Marne en juin, il est possible d'observer une augmentation de la proportion en composés hydrophiles par rapport à Méry sur Marne. Ceci s'explique par le rejet des effluents de la STEP située quelques kilomètres en amont d'Andrésy et riche en cette fraction HPI. Les échantillons d'Andrésy et de Méricourt présentant des concentrations en COD similaires (4 $mgC.l^{-1}$) montrent des différences se résumant à une diminution des fractions HPI et TPI au profit de la fraction HPO. Cette observation pourrait éventuellement être expliquée par une « dégradation », condensation de ces fractions HPI et TPI en HPO mais la rivière Oise se jetant dans la Seine entre Andrésy et Méricourt ainsi que la très forte production algale observée à Méricourt ne permettent pas de conclure. Les valeurs plus fortes de SUVA des fractions d'Andrésy et de Méricourt (par rapport à celle de STEP) montrent bien que les eaux à l'aval de la station résultent d'un mélange entre les effluents de STEP et de l'eau de Seine en amont. Les valeurs faibles de SUVA ainsi que les résultats d'analyse isotopique ^{13}C et ^{15}N des fractions TPI et HPI indiquent ici le faible degré de maturation de ces MOD résultant de la STEP et du bloom phytoplanctonique observé. Ces fractions non hydrophobes (TPI et HPI) présentent des ratios N/S particulièrement élevés relativement proches de 11 (excepté HPIMT) (Figure 40) indiquant également une origine biogénique (Schlegel, 1969). Les substances HPO et humiques présentent à l'inverse des ratios N/S faibles tel qu'il a été déjà montré (Abbt-Braun et Jahnel, 2001). Il est possible de remarquer que ce ratio N/S augmente lorsque le caractère hydrophile croît, excepté pour le site M1 où là encore le comportement est inversé soulignant le caractère singulier de ce site.

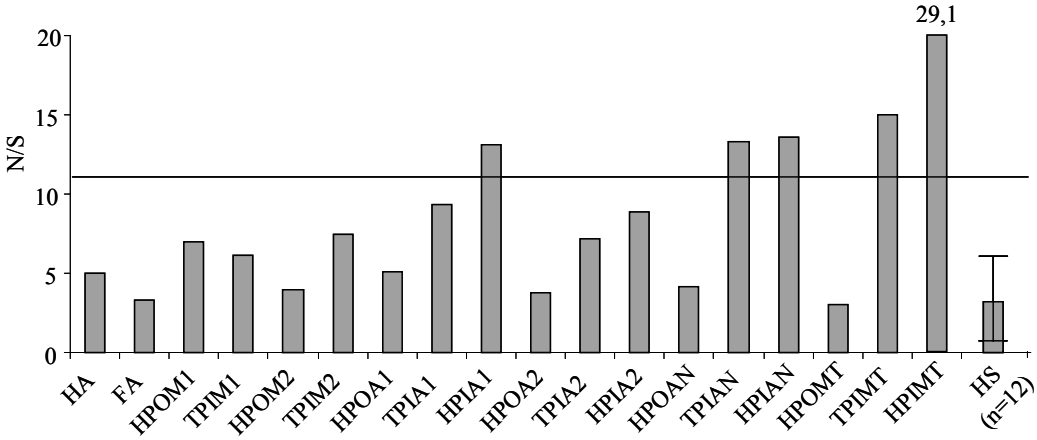


Figure 40 : Ratio N/S des fractions extraites et de 12 substances humiques (issues de Abbt-Braun et Jahnel, 2001)

I.5. CONCLUSION

La complexité, la spécificité mais aussi l'instabilité des eaux de surface, tant par la diversité des constituants de leurs matrices organiques et minérales que par les interactions qui les associent, en font des milieux particulièrement délicats à étudier et à comprendre dans leur ensemble. Si l'étude directe des eaux peut s'avérer préférables dans le cadre de projets à vocation très appliquée, l'extraction préalable des MOD trouve un intérêt indéniable pour des travaux à caractère plus fondamental nécessitant un contrôle rigoureux des conditions expérimentales. L'extraction qui sous-entend la séparation de la phase organique de la phase minérale devient indispensable lorsque l'étude structurale des MOD s'impose, la présence de sels engendrant des interférences importantes au niveau de nombreux outils de caractérisation (i.e. analyses élémentaires, infrarouge, SUVA, RMN ^{13}C, etc.). Il n'existe pas de méthode simple permettant l'extraction quantitative des MOD, ce résultat ne pouvant être aujourd'hui qu'approché (la procédure expérimentale induisant toujours des pertes) grâce à la combinaison de plusieurs opérations (adsorption, précipitation, distillation, etc.). Cette succession inévitable d'étapes conduits de ce fait à un fractionnement des MOD qui doit être considéré comme une conséquence du protocole d'extraction mis en place et non comme un objectif à atteindre. Toutefois ce fractionnement permet de « simplifier » l'analyse structurale des MOD grâce à l'étude de fragments dont les propriétés essentielles sont le reflet des opérations d'extraction utilisées (solubilité, taille, polarité, etc.). Il offre par ailleurs la possibilité d'une étude plus sélective des sites réactionnels de ces fractions. Les nombreuses modifications et évolutions que ce protocole a reçues permettent aujourd'hui de disposer d'un outil intéressant dans la mesure où l'objectif d'une extraction quantitative peut être pratiquement atteint. Grâce à la diversité des propriétés physico-chimiques des ressources étudiées, l'expérience acquise nous permet également de prédire les performances de chacune des opérations développées.

Les modifications apportées ici au protocole d'extraction des MOD permettent désormais d'accéder à des fractions hydrophiles avec une pureté raisonnable pour pouvoir être caractérisées ultérieurement. En revanche des efforts sont nécessaires pour augmenter le rendement d'extraction de cette fraction HPI, car les phénomènes de coprécipitation avec les sels sont encore trop importants et peuvent altérer la représentativité de la fraction extraite. L'utilisation de l'électrodialyse ou la combinaison de colonnes échangeuses de cations et d'anions pourrait être une solution dans la séparation des MOD HPI vis-à-vis de la phase inorganique.

La caractérisation des fractions de MOD a été réalisée de manière originale par une approche multidimensionnelle à l'aide d'un véritable panel de techniques analytiques (*analyses élémentaires* : C, H, O, N, S ; *isotopiques* : ^{13}C, ^{15}N ; *fonctionnelles* : UV-vis, IRTF, fluorescence, HPSEC, titration acido-basique, redissolution cathodique des complexes MOD-Mo(VI) ; et *moléculaire* : pyrolyse-CG-SM) afin de mieux comprendre de quoi est composée la MOD particulièrement en milieu urbain. Ces différents outils analytiques ont ainsi permis de montrer que la fraction HPO possède un fort caractère aromatique (SUVA, fluorescence, analyse élémentaire, IRTF), une masse moléculaire importante et est également appauvrie en groupements fonctionnels (comparativement aux autres fractions). Les fractions HPI regroupent les structures les plus petites et les moins aromatiques, indiquant leur caractère fortement hydrophile. Ces fractions présentent une teneur importante en azote (de l'ordre de 10 %). Ces fortes teneurs en azote s'accompagnent d'un fort pourcentage de substances d'origine protéique observées par pyrolyse, fluorescence et IRTF. L'ensemble des résultats de caractérisation a également mis en évidence une origine fortement autochtone (microbienne ou algale) pour cette fraction HPI. Dans l'ensemble, les fractions TPI possèdent

des caractéristiques intermédiaires à celles des fractions HPO et HPI mettant en évidence un continuum de propriétés au sein de la matrice organique des eaux.

Les résultats ont donc montré que la MOD issue des effluents de STEP et rejetées dans le milieu récepteur présente des caractéristiques originales à savoir un fort pourcentage de MOD hydrophile, c'est-à-dire une faible hydrophobicité, et un degré d'aromaticité peu marqué soulignant le caractère peu réfractaire de cette MOD. En revanche une plus grande diversité fonctionnelle de la MOD d'origine anthropique par rapport à la MOD naturelle a été mise en évidence notamment par un taux de structures protéiques très important. Cette présence élevée d'azote est corrélée à la forte proportion de sites acido-basiques d'affinité forte leur conférant ainsi un caractère amine plutôt que phénolique comme l'atteste les analyses élémentaires (fort taux d'azote et faible aromaticité : faible ratio C/H), SUVA (faible aromaticité), IRTF (fonction amines et amides), fluorescence (faible aromaticité et présence de structures protéiques), pyrolyse-CG-SM (présence importante de structures protéiques). Ces caractéristiques permettent donc de penser que ces MOD d'origine anthropique possèdent une réactivité particulière vis à vis des micropolluants tels que les métaux, ceci étant le sujet du chapitre II de cette étude.

I.6. BIBLIOGRAPHIE

Abbt-Braun G. and Jahnel J. B. (2001). "Organically bound sulfur in refractory organic substances". *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **371** (5), 682-687.

Afcharian A., Levi Y., Kiene L. and Scribe P. (1997). "Fractionation of dissolved organic matter from surface waters using macroporous resins". *Water Research* **31** (12), 2989-2996.

Aiken G. and Leenheer J. (1993). "Isolation and chemical characterization of dissolved and colloidal organic matter". *Chemistry and Ecology* **8** (3), 135 - 151.

Aiken G. R. (1992). "Chloride interference in the analysis of dissolved organic carbon by the wet oxidation method". *Environmental Science and Technology* **26** (12), 2435-2439.

Aiken G. R. and Malcolm R. L. (1987). "Molecular weight of aquatic fulvic acids by vapor pressure osmometry". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **51** (8), 2177-2184.

Aiken G. R., McKnight D. M., Thorn K. A. and Thurman E. M. (1992). "Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins". *Organic Geochemistry* **18** (4), 567-573.

Aiken G. R., Thurman E. M., Malcolm R. L. and Walton H. F. (1979). "Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution". *Analytical Chemistry* **51** (11), 1799-1803.

Ang W. S. and Elimelech M. (2007). "Protein (BSA) fouling of reverse osmosis membranes: Implications for wastewater reclamation". *Journal of Membrane Science* **296** (1-2), 83-92.

Aoki S., Fuse Y. and Yamada E. (2004). "Determinations of humic substances and other dissolved organic matter and their effects on the increase of COD in Lake Biwa". *Analytical Sciences* **20** (1), 159-164.

Baker A., Inverarity R., Charlton M. and Richmond S. (2003). "Detecting river pollution using fluorescence spectrophotometry: case studies from the Ouseburn, NE England". *Environmental Pollution* **124** (1), 57-70.

Baker A. and Spencer R. G. M. (2004). "Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy". *The Science of the Total Environment* **333** (1-3), 217-232.

Barber L. B., Leenheer J. A., Noyes T. I. and Stiles E. A. (2001). "Nature and transformation of dissolved organic matter in treatment wetlands". *Environmental Science and Technology* **35**, 4805-4816.

Batley G. E. (1989.). "Trace element speciation: analytical methods and problems". *CRC Press,*, Boca Raton,

Batley G. E., Apte S. C. and Stauber J. L. (2004). "Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982". *Australian Journal of Chemistry* **57** (10), 903-919.

Bernhard M., Brinckman F. E. and Sadler P. J. (1986). "The importance of chemical "speciation" in environmental processes". *Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG*, Berlin, 762p.

Biber M. V., Gulacar F. O. and Buffle J. (1996). "Seasonal variations in principal groups of organic matter in a eutrophic lake using pyrolysis/GC/MS". *Environmental Science and Technology* **30** (12), 3501-3507.

Bowles E. C., Antweiler R. C. and MacCarthy P. (1989). "Acid-base titration and hydrolysis of fulvic acid from the Suwannee River". Humic Substances in the Suwannee River, Georgia: interactions, properties and proposed structures. *US Geological Survey*, 207–229.

Bracewell J. M. and Robertson G. W. (1984). "Quantitative comparison of the nitrogen-containing pyrolysis products and amino acid composition of soil humic acids". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **6** (1), 19-29.

Brockaert J. A. C., Gucer S. and Adams F. (1990). "Metal speciation in the environment". *Springer-Verlag*, Berlin,

Bruchet A., Rousseau C. and Mallevialle J. (1990). "Pyrolysis-GC-MS for investigating high-molecular-weight THM precursors and other refractory organics". *Journal of American Water Works Association* **82** (9), 66-74.

Buffle J. (1988). "Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach". Masson M. andTyson J. F., *Ellis Horwood*, New York, 692p.

Buffle J., Perret D. and Newman (1992). "The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids and macromolecules". in *Environmental particles*, Buffle J. andVan Leeuwen H. P., Lewis, Boca Raton, 171-230.

Burdige D. J. and Gardner K. G. (1998). "Molecular weight distribution of dissolved organic carbon in marine sediment pore waters". *Marine Chemistry* **62** (1-2), 45-64.

Buzier R. (2005)."Evolution de la speciation des métaux dans les eaux résiduaires urbaines lors du traitement par boues activées" Cemagref, *Université Paris XII - Val de Marne*, 210p.

Campbell P. G. C. (1995). " Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critic of the free ion model." in *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Buffle J. andVan Leeuwen H. P., John Wiley & sons, Chichester, 45-102.

Chanudet V. and Filella M. (2007). "Submicron organic matter in a peri-alpine, ultra-oligotrophic lake". *Organic Geochemistry* **38** (7), 1146-1160.

Chanudet V., Filella M. and Quentel F. (2006). "Application of a simple voltammetric method to the determination of refractory organic substances in freshwaters". *Analytica Chimica Acta* **569** (1-2), 244-249.

Chen J., Gu B., LeBoeuf E. J., Pan H. and Dai S. (2002). "Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions". *Chemosphere* **48** (1), 59-68.

Chen Y., Senesi N. and Schnitzer M. (1977). "Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios". *Soil Science* **41**, 352.

Cheshire M. V., Russell J. D., Fraser A. R., Bracewell J. M., Robertson G. W., Benzingpurdie L. M., Ratcliffe C. I., Ripmeester J. A. and Goodman B. A. (1992). "Nature of soil carbohydrate and its association with soil humic substances". *Journal of Soil Science* **43** (2), 359-373.

Chiavari G. and Galletti G. C. (1992). "Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry of amino acids". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **24** (2), 123-137.

Chin Y.-P., Alken G. and O'Loughlin E. (1994). "Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances". *Environmental Science and Technology* **28** (11), 1853-1858.

Christensen J. B. and Christensen T. H. (2000). "The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted groundwater". *Water Research* **34** (15), 3743-3754.

Christensen J. B., Tipping E., Kinniburgh D. G., Gron C. and Christensen T. H. (1998). "Proton binding by groundwater fulvic acids of different age, origins, and structure modeled with the model V and NICA-Donnan model". *Environmental Science and Technology* **32** (21), 3346-3355.

Clair T. A., Kramer J. R., Sydor M. and Eaton D. (1991). "Concentration of aquatic dissolved organic matter by reverse osmosis". *Water Research* **25** (9), 1033-1037.

Clair T. A., Sayer B. G., Kramer J. R. and Eaton D. R. (1996). "Seasonal variation in the composition of aquatic organic matter in some Nova Scotian brownwaters: A nuclear magnetic resonance approach". *Hydrobiologia* **317** (2), 141-150.

Coble P. G. (1996). "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy". *Marine Chemistry* **51** (4), 325-346.

Cook R. L. (2004). "Coupling NMR to NOM". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378** (6), 1484-1503.

Croué J. F. (2004). "Isolation of humic and non-humic nom fractions: structural characterization". *Environmental Monitoring and Assessment* **92**, 193-207.

Croué J. P., Benedetti M. F., Violleau D. and Leenheer J. A. (2003). "Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site". *Environmental Science and Technology* **37** (2), 328-336.

Croué J. P., Debroux J. F., Aiken G. R., Leenheer J. A. and Amy G. L. (1999). "Natural organic matter : structural characteristics and reactive properties". in *Formation and control of disinfection by-products in drinking water*, Singer P. C., The American Water Works Association, Denver, 65-89.

Croué J.-P., Korshin G. V., Leenheer J. A. and Benjamin M. M. (2000). "Isolation, fractionation and characterization of natural organic matter in drinking Water". *The American Water Works Association*, Denver,

Davì M. L. and Gnudi F. (1999). "Phenolic compounds in surface water". *Water Research* **33** (14), 3213-3219.

Davis W. M., Erickson C. L., Johnston C. T., Delfino J. J. and Porter J. E. (1999). "Quantitative Fourier Transform Infrared spectroscopic investigation of humic substance functional group composition". *Chemosphere* **38** (12), 2913-2928.

De Schamphelaere K. A. C., Unamuno V. I. R., Tack F. M. G., Vanderdeelen J. and Janssen C. R. (2005). "Reverse osmosis sampling does not affect the protective effect of dissolved organic matter on copper and zinc toxicity to freshwater organisms". *Chemosphere* **58** (5), 653-658.

De Souza Sierra M. M., Arend K., Fernandes A. N., Giovanela M. and Szpoganicz B. (2001). "Application of potentiometry to characterize acid and basic sites in humic substances: Testing the BEST7 program with a weak-acid mixture". *Analytica Chimica Acta* **445** (1), 89-98.

Deines P. (1980). "The isotopic composition of reduced organic carbon". in *Handbook of environmental isotope geochemistry*, Fritz P. andFontes J. C., Elsevier, Amsterdam, 329-406.

DeNiro M. J. and Epstein S. (1978). "Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42** (5), 495-506.

Dignac M.-F. (1998)."Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues activées" Centre International de recherche sur l'eau et l'environnement, *Université de Paris VI*, 303p.

Dignac M. F., Ginestet P., Bruchet A., Audic J. M., Derenne S. and Largeau C. (2001). "Changes in the organic composition of wastewater during biological treatment as studied by NMR and IR spectroscopies". *Water Science and Technology* **43** (2), 51-58.

Drewes J. E. and Croue J. P. (2002). "New approaches for structural characterization of organic matter in drinking water and wastewater effluents". in *2nd World Water Congress: Drinking Water Treatment*, *Water Science and Technology: Water Supply*, 1-10

Dudley R. L. and Fyfe C. A. (1982). "Evaluation of the quantitative reliability of the 13C CP/MAS technique for the analysis of coals and related materials". *Fuel* **61** (7), 651-657.

Dunkelog R., Ruttinger H.-H. and Peisker K. (1997). "Comparative study for the separation of aquatic humic substances by electrophoresis". *Journal of Chromatography A* **777** (2), 355-362.

Fabbri D. (2001). "Use of pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry to study environmental pollution caused by synthetic polymers: a case study: the Ravenna Lagoon". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **58-59**, 361-370.

Field J. A., Leenheer J. A., Thorn K. A., Barber L. B., Rostad C., Macalady D. L. and Daniel S. R. (1992). "Identification of persistent anionic surfactant-derived chemicals in sewage effluent and groundwater". *Journal of Contaminant Hydrology* **9** (1-2), 55-78.

Filella M. (2008). "Freshwaters: which NOM matters?" *Environmental Chemistry Letters* **10.1007/s10311-008-0158-x**,

Filella M., Quentel F., Pernet-Coudrier B. and Varrault G. (2009). "Application of a refractory organic matter quantification method to wastewater effluents". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* accepted January 2009,

Florence T. M. (1986). "Electrochemical approaches to trace element speciation in waters. A review." *Analyst* **111**, 489–505.

Florence T. M. and Batley G. E. (1980). "Chemical speciation in natural waters." *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **9**, 219–296.

Fukushima T., Ishibashi T. and Imai A. (2001). "Chemical characterization of dissolved organic matter in Hiroshima Bay, Japan". *Estuarine Coastal and Shelf Science* **53** (1), 51-62.

Galapate R. P., Baes A. U., Ito K., Mukai T., Shoto E. and Okada M. (1998). "Detection of domestic wastes in kurose river using synchronous fluorescence spectroscopy". *Water Research* **32** (7), 2232-2239.

Galletti G. C. and Reeves J. B. (1992). "Pyrolysis/gas chromatography/ion-trap detection of polyphenols (vegetable tannins): Preliminary results". *Organic Mass Spectrometry* **27** (3), 226-230.

Garnier C. (2004)."Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Applications aux eaux naturelles" *Université du Sud Toulon Var*, 202p.

Gasperi J. (2006)."Introduction et transferts des hydrocarbures à différentes échelles spatiales dans le réseau d'assainissement parisien" CEREVE, *Ecole des Ponts et Chaussées*, 272p.

Goni M. A., Teixeira M. J. and Perkey D. W. (2003). "Sources and distribution of organic matter in a river-dominated estuary (Winyah Bay, SC, USA)". *Estuarine Coastal and Shelf Science* **57** (5-6), 1023-1048.

Gonzalez-Vila F. J., Lankes U. and Ludemann H.-D. (2001). "Comparison of the information gained by pyrolytic techniques and NMR spectroscopy on the structural features of aquatic humic substances". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **58-59**, 349-359.

Gueguen C., Guo L. D., Wang D., Tanaka N. and Hung C. C. (2006). "Chemical characteristics and origin of dissolved organic matter in the Yukon River". *Biogeochemistry* **77** (2), 139-155.

Guo L., Lehner J. K., White D. M. and Garland D. S. (2003). "Heterogeneity of natural organic matter from the Chena River, Alaska". *Water Research* **37** (5), 1015-1022.

Hatcher P. G., Dria K. J., Kim S. and Frazier S. W. (2001). "Modern analytical studies of humic substances". *Soil Science* **166** (11), 770-794.

Hatcher P. G., Maciel G. E. and Dennis L. W. (1981). "Aliphatic structure of humic acids; a clue to their origin". *Organic Geochemistry* **3** (1-2), 43-48.

Hedges J. I. (1978). "The formation and clay mineral reactions of melanoidins". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **42** (1), 69-76.

Hedges J. I., Eglinton G., Hatcher P. G., Kirchman D. L., Arnosti C., Derenne S., Evershed R. P., Kogel-Knabner I., de Leeuw J. W. and Littke R. (2000). "The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments". *Organic Geochemistry* **31** (10), 945-958.

Hejzlar J., Szpakowska B. and Wershaw R. L. (1994). "Comparison of humic substances isolated from peatbog water by sorption on DEAE-cellulose and amberlite XAD-2". *Water Research* **28** (9), 1961-1970.

Helleur R. J., Hayes E. R., Craigie J. S. and McLachlan J. L. (1985a). "Characterization of polysaccharides of red algae by pyrolysis-capillary gas chromatography". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **8**, 349-357.

Helleur R. J., Hayes E. R., Jamieson W. D. and Craigie J. S. (1985b). "Analysis of polysaccharide pyrolysate of red algae by capillary gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **8**, 333-347.

Her N., Amy G., McKnight D., Sohn J. and Yoon Y. (2003). "Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection". *Water Research* **37** (17), 4295-4303.

Her N., Amy G., Park H.-R. and Song M. (2004). "Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling". *Water Research* **38** (6), 1427-1438.

Hood E., Williams M. W. and McKnight D. M. (2005). "Sources of dissolved organic matter (DOM) in a Rocky Mountain stream using chemical fractionation and stable isotopes". *Biogeochemistry* **74** (2), 231-255.

Hu J. Y., Ong S. L., Shan J. H., Kang J. B. and Ng W. J. (2003). "Treatability of organic fractions derived from secondary effluent by reverse osmosis membrane". *Water Research* **37** (19), 4801-4809.

Hudson N., Baker A. and Reynolds D. (2007). "Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters - A review". *River Research and Applications* **23** (6), 631-649.

Huffman J. E. W. D. and Stuber H. A. (1985). "Analytical methodology for elemental analysis of humic substances". in *Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Geochemistry, Isolation, and Characterization*, Aiken G. R., McKnight D. M., Wershaw R. L., MacCarthy P. andKounaves S., Wiley, New York, 433-455.

Huo S. L., Xi B. D., Yu H. C., He L. S., Fan S. L. and Liu H. L. (2008). "Characteristics of dissolved organic matter (DOM) in leachate with different landfill ages". *Journal of Environmental Sciences-China* **20** (4), 492-498.

Hur J., Williams M. A. and Schlautman M. A. (2006). "Evaluating spectroscopic and chromatographic techniques to resolve dissolved organic matter via end member mixing analysis". *Chemosphere* **63** (3), 387-402.

Imai A., Fukushima T., Matsushige K. and Hwan Kim Y. (2001). "Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers, and other organic matter sources". *Water Research* **35** (17), 4019-4028.

Imai A., Fukushima T., Matsushige K., Kim Y.-H. and Choi K. (2002). "Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants". *Water Research* **36** (4), 859-870.

Ishiwatari R., Yamamoto S. and Handa N. (1995). "Characterization of sinking particles in the ocean by pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **32**, 75-89.

Janos P. (2003). "Separation methods in the chemistry of humic substances". *Journal of Chromatography A* **983** (1-2), 1-18.

Jarusutthirak C. and Amy G. (2006). "Role of Soluble Microbial Products (SMP) in membrane fouling and flux decline". *Environmental Science and Technology* **40** (3), 969-974.

Jarusutthirak C. and Amy G. (2007). "Understanding soluble microbial products (SMP) as a component of effluent organic matter (EfOM)". *Water Research* **41** (12), 2787-2793.

Jarusutthirak C., Amy G. and Croue J.-P. (2002). "Fouling characteristics of wastewater effluent organic matter (EfOM) isolates on NF and UF membranes". *Desalination* **145** (1-3), 247-255.

Johannessen S. C., Macdonald R. W. and Paton D. W. (2003). "A sediment and organic carbon budget for the greater Strait of Georgia". *Estuarine Coastal and Shelf Science* **56** (3-4), 845-860.

Kaiser K. and Benner R. (2008). "Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen". *Limnology and Oceanography* **53** (1), 99-112.

Kaiser K., Guggenberger G., Haumaier L. and Zech W. (2002). "The composition of dissolved organic matter in forest soil solutions: changes induced by seasons and passage through the mineral soil". *Organic Geochemistry* **33** (3), 307-318.

Kalbitz K., Geyer W. and Geyer S. (1999). "Spectroscopic properties of dissolved humic substances - a reflection of land use history in a fen area". *Biogeochemistry* **47** (2), 219-238.

Kiikkilä O., Kitunen V. and Smolander A. (2006). "Dissolved soil organic matter from surface organic horizons under birch and conifers: Degradation in relation to chemical characteristics". *Soil Biology and Biochemistry* **38** (4), 737-746.

Kilduff J. E., Mattaraj S., Wigton A., Kitis M. and Karanfil T. (2004). "Effects of reverse osmosis isolation on reactivity of naturally occurring dissolved organic matter in physicochemical processes". *Water Research* **38** (4), 1026-1036.

Kinniburgh D. G., Van Riemsdijk W. H., Koopal L. K., Borkovec M., Benedetti M. F. and Avena M. J. (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151** (1-2), 147-166.

Kracht O. (2001)."Origin and genesis of dissolved organic matter" Max Planck Institut für biogeochemie, 146p.

Labanowski J. (2004)."Matière organique naturelle et anthropique: vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation" Faculté des Sciences et Techniques - Ecole Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Limoges - Laboratoire de Sciences de l'Eau et de l'Environnement, *Université de Limoges*, 199p.

Landner L. (1987). "Speciation of metals in water, sediment and soil systems". Landner L., *Springer-Verlag,*, Berlin, 190p.

Leenheer J. A. (1981). "Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters". *Environmental Science and Technology* **15** (5), 578-587.

Leenheer J. A., Brown P. A. and Stiles E. A. (1987). "Isolation of nonvolatile, organic solutes from natural waters by zeotrophic distillation of water from N,N-dimethylformamide". *Analytical Chemistry* **59** (9), 1313-1319.

Leenheer J. A. and Croué J.-P. (2003). "Characterized aquatic dissolved organic matter". *Environmental Science and Technology* **37** (1), 19-26.

Leenheer J. A. and Rostad C. E. (2004). "Fractionation and characterization of organic matter in wastewater from a Swine waste-retention basin". Scientific Investigations Report 2004-5217. *U. S. Departement of the Interior and U. S. Geological Survey*, 21.

Leppard G. G. (1983). "Trace element speciation in surface waters". Leppard G. G., *Plenum*, New York, 320p.

Lu Y. and Allen H. E. (2002). "Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)--link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg". *Water Research* **36** (20), 5083-5101.

Ma H., Allen H. E. and Yin Y. (2001). "Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent". *Water Research* **35** (4), 985-996.

Macko S. A. and Estep M. L. F. (1984). "Microbial alteration of stable nitrogen and carbon isotopic compositions of organic matter". *Organic Geochemistry* **6**, 787-790.

Malcolm R. L. (1990). "The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments". *Analytica Chimica Acta* **232** (1), 19-30.

Malcolm R. L. and MacCarthy P. (1992). "Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water". *Environment International* **18** (6), 597-607.

Manka J. and Rebhun M. (1982). "Organic groups and molecular weight distribution in tertiary effluents and renovated waters". *Water Research* **16** (4), 399-403.

Mantoura R. F. C., Dickson A. and Riley J. P. (1978). "The complexation of metals with humic materials in natural waters". *Estuarine and Coastal Marine Science* **6** (4), 387-408.

Martin-Mousset B., Croué J. P., Lefebvre E. and Legube B. (1997). "Distribution et caractérisation de la matière organique dissoute d'eaux naturelles de surface". *Water Research* **31** (3), 541-553.

Masini J. C., Abate G., Lima E. C., Hahn L. C., Nakamura M. S., Lichtig J. and Nagatomy H. R. (1998). "Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids". *Analytica Chimica Acta* **364** (1-3), 223-233.

Maurice P. A., Pullin M. J., Cabaniss S. E., Zhou Q., Namjesnik-Dejanovic K. and Aiken G. R. (2002). "A comparison of surface water natural organic matter in raw filtered water samples, XAD, and reverse osmosis isolates". *Water Research* **36** (9), 2357-2371.

McDonald S., Bishop A. G., Prenzler P. D. and Robards K. (2004). "Analytical chemistry of freshwater humic substances". *Analytica Chimica Acta* **527** (2), 105-124.

Meybeck M., De Marsily G. and Fustec E. (1998). "La Seine en son bassin. Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé". Meybeck M., *Elsevier*, Paris, 749p.

Miano T. M. and Senesi N. (1992). "Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry". *The Science of The Total Environment* **117-118**, 41-51.

Miles C. J., Tuschall J. R. and Brezonik P. L. (1983). "Isolation of aquatic humus with diethylaminoethylcellulose". *Analytical Chemistry* **55**, 410-411.

Millward G. E. (1995). "Processes Affecting Trace-Element Speciation in Estuaries - a Review". *Analyst* **120** (3), 609-614.

Milne C. J., Kinniburgh D. G. and Tipping E. (2001). "Generic NICA-Donnan model parameters for proton binding by humic substances". *Environmental Science and Technology* **35** (10), 2049-2059.

Minor E. C., Simjouw J.-P. and Mulholland M. R. (2006). "Seasonal variations in dissolved organic carbon concentrations and characteristics in a shallow coastal bay". *Marine Chemistry* **101** (3-4), 166-179.

Nam S. N. and Amy G. (2008). "Differentiation of wastewater effluent organic matter (EfOM) from natural organic matter (NOM) using multiple analytical techniques". *Water Science and Technology* **57** (7), 1009-1015.

Namour P. and Muller M. C. (1998). "Fractionation of organic matter from wastewater treatment plants before and after a 21-day biodegradability test: a physical-chemical method for measurement of the refractory part of effluents". *Water Research* **32** (7), 2224-2231.

Ødegaard H. and Koottatep S. (1982). "Removal of humic substances from natural waters by reverse osmosis". *Water Research* **16** (5), 613-620.

Ogawa H., Amagai Y., Koike I., Kaiser K. and Benner R. (2001). "Production of refractory dissolved organic matter by bacteria". *Science* **292** (5518), 917-920.

Ouellet A., Catana D., Plouhinec J.-B., Lucotte M. and linas Y. (2008). "Elemental, Isotopic, and Spectroscopic Assessment of Chemical Fractionation of Dissolved Organic Matter Sampled with a Portable Reverse Osmosis System". *Environmental Science and Technology* **42** (7), 2490-2495.

Parlanti E., Worz K., Geoffroy L. and Lamotte M. (2000). "Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs". *Organic Geochemistry* **31** (12), 1765-1781.

Perdue E. M. and Lytle C. R. (1983). "A distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances". *Environmental Science and Technology* **17** (11), 654-660.

Peuravuori J. (2005). "NMR spectroscopy study of freshwater humic material in light of supramolecular assembly". *Environmental Science and Technology* **39**, 5541-5549.

Peuravuori J., Ingman P. and Pihlaja K. (2003). "Critical comments on accuracy of quantitative determination of natural humic matter by solid state ^{13}C NMR spectroscopy". *Talanta* **59** (1), 177-189.

Peuravuori J., Ingman P., Pihlaja K. and Koivikko R. (2001). "Comparisons of sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins from solid-state ^{13}C NMR spectroscopy's point of view". *Talanta* **55** (4), 733-742.

Peuravuori J., Koivikko R. and Pihlaja K. (2002a). "Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy". *Water Research* **36** (18), 4552-4562.

Peuravuori J., Lehtonen T. and Pihlaja K. (2002b). "Sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins: Comparative study using pyrolysis gas chromatography". *Analytica Chimica Acta* **471** (2), 219-226.

Peuravuori J., Monteiro A., Eglite L. and Pihlaja K. (2005). "Comparative study for separation of aquatic humic-type organic constituents by DAX-8, PVP and DEAE sorbing solids and tangential ultrafiltration: elemental composition, size-exclusion chromatography, UV-vis and FT-IR". *Talanta* **65** (2), 408-422.

Peuravuori J. and Pihlaja K. (1997a). "Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: Comparison of isolation with solid adsorption and tangential membrane filtration". *Environment International* **23** (4), 441-451.

Peuravuori J. and Pihlaja K. (1997b). "Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances". *Analytica Chimica Acta* **337** (2), 133-149.

Peuravuori J. and Pihlaja K. (1998a). "Multimethod characterization of lake aquatic humic matter isolated with sorbing solid and tangential membrane filtration". *Analytica Chimica Acta* **364** (1-3), 203-221.

Peuravuori J. and Pihlaja K. (1998b). "Multi-method characterization of lake aquatic humic matter isolated with two different sorbing solids". *Analytica Chimica Acta* **363** (2-3), 235-247.

Peuravuori J., Pihlaja K. and Valimaki N. (1997). "Isolation and characterization of natural organic matter from lake water: Two different adsorption chromatographic methods". *Environment International* **23** (4), 453-464.

Plette A. C. C., van Riemsdijk W. H., Benedetti M. F. and van der Wal A. (1995). "pH Dependent Charging Behavior of Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium". *Journal of Colloid and Interface Science* **173** (2), 354-363.

Poirier N., Derenne S., Rouzaud J.-N., Largeau C., Mariotti A., Balesdent J. and Maquet J. (2000). "Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France)". *Organic Geochemistry* **31** (9), 813-827.

Pouwels A. D., Tom A., Eijkel G. B. and Boon J. J. (1987). "Characterisation of beech wood and its holocellulose and xylan fractions by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **11**, 417-436.

Quentel F. and Filella M. (2008). "Quatificationof refractory organic substances in freshwaters: further insight into the response of the voltammetric method". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **DOI 10.1007/s00216-008-2366-4**,

Reemtsma T. (2001). "The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part I: Achievements". *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **20** (9), 500-517.

Reynolds D. M. (2003). "Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy". *Water Research* **37** (13), 3055-3060.

Reynolds D. M. and Ahmad S. R. (1997). "Rapid and direct determination of wastewater BOD values using a fluorescence technique". *Water Research* **31** (8), 2012-2018.

Ritchie J. D. and Perdue E. M. (2003). "Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67** (1), 85-96.

Saiz-Jimenez C. (1994). "Analytical Pyrolysis of Humic Substances: Pitfalls, Limitations, and Possible Solutions". *Environmental Science and Technology* **28** (11), 1773-1780.

Saiz-Jimenez C. and De Leeuw J. W. (1986a). "Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **9** (2), 99-119.

Saiz-Jimenez C. and De Leeuw J. W. (1986b). "Lignin pyrolysis products: Their structures and their significance as biomarkers". *Organic Geochemistry* **10** (4-6), 869-876.

Saiz-Jimenez C., Hermosin B., Guggenberger G. and Zech W. (1996). "Land use effects on the composition of organic matter in soil particle size separates. III. Analytical pyrolysis". *European Journal of Soil Science* **47** (1), 61-69.

Salbu B. and Steinnes E. (1995). "Trace elements in natural waters". *CRC Press*, Boca Raton, 314p.

Sarathy V. and Allen H. E. (2005). "Copper complexation by dissolved organic matter from surface water and wastewater effluent". *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**, 337-344.

Schell D. M., Barnett B. A. and Vinette K. A. (1998). "Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas". *Marine Ecology Progress Series* **162**, 11-23.

Schlegel H. G. (1969). "Allgemeine Mikrobiologie". Verlag G., Stuttgart, 432p.

Schnitzer M. I., Monreal C. M., Jandl G., Leinweber P. and Fransham P. B. (2007). "The conversion of chicken manure to biooil by fast pyrolysis II. Analysis of chicken manure, biooils, and char by curie-point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Cp Py-GC/MS)". *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **42** (1), 79-95.

Senesi N. (1990). "Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals : Part II. The fluorescence spectroscopy approach". *Analytica Chimica Acta* **232**, 77-106.

Serkiz S. M. and Perdue E. M. (1990). "Isolation of dissolved organic matter from the suwannee river using reverse osmosis". *Water Research* **24** (7), 911-916.

Servais P., Garnier J., Demarteau N., Brion N. and Billen G. (1999). "Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents". *Water Research* **33** (16), 3521-3531.

Shuman M. S. (1990). "Carboxyl acidity of aquatic organic matter : possible systematic errors introduced by XAD extraction". in *Organic Acids in Aquatic Ecosystems*, Ltd J. W. a. s., Perdue, E. M. and Gjessing, E. T., Chapel Hill, 97-109.

Sierra M. M. D., Donard O. F. X., Lamotte M., Belin C. and Ewald M. (1994). "Fluorescence Spectroscopy of Coastal and Marine Waters". *Marine Chemistry* **47** (2), 127-144.

Sirivedhin T. and Gray K. A. (2005). "Part I. Identifying anthropogenic markers in surface waters influenced by treated effluents: a tool in potable water reuse". *Water Research* **39** (6), 1154-1164.

Smidt E. and Meissl K. (2007). "The applicability of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in waste management". *Waste Management* **27** (2), 268-276.

Smith D. S. and Kramer J. R. (1999). "Multi-site proton interactions with natural organic matter". *Environment International* **25** (2-3), 307-314.

Sposito G. (1981). "Trace metals in contaminated waters". *Environmental Science and Technology* **15** (4), 396-403.

Stankiewicz B. A., Van Bergen P. F., Duncan I. J., Carter J. F., Briggs D. E. G. and Evershed R. P. (1996). "Recognition of chitin and proteins in invertebrate cuticles using analytical pyrolysis/gas chromatography and pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10** (14), 1747-1757.

Stevenson F. J. (1994). "Humus chemistry: genesis, composition, reactions". *John Wiley and Sons*, 496p.

Sun L., Perdue E. M. and McCarthy J. F. (1995). "Using reverse osmosis to obtain organic matter from surface and ground waters". *Water Research* **29** (6), 1471-1477.

Tanaka T., Nagao S. and Ogawa H. (2001). "Attenuated total reflectionfourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy of functional groups of humic acid dissolving in aqueous solution". *Analytical Sciences* **17** (9), 1081-1084.

Tessier A. and Turner D. R. (1995). "Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". Buffle J. andVan Leeuwen H. P., *John Wiley & sons*, Chichester, 679p.

Thurman E. M. (1985). "Developments in biochemistry: Organic geochemistry of natural waters". *Nijhoff, M. and Junk, W.*, Dordrecht, 469p.

Thurman E. M. and Malcolm R. L. (1981). "Preparative isolation of aquatic humic substances". *Environmental Science and Technology* **15** (4), 463-466.

Tipping E. (1993). "Modelling ion binding by humic acids". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **73**, 117-131.

Town R. M. and Filella M. (2000). "A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters". *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **62** (3), 252-295.

Traina S. J., Novak J. and Smeck N. E. (1990). "An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids". *Journal of Environmental Quality* **19** (1), 151-153.

Tsuge S. and Matsubara H. (1985). "High-resolution pyrolysis-gas chromatography of proteins and related materials". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **8**, 49-64.

Turkey J. W. (1977). "Exploratory data analysis". *Adsison-Wesley*, New York, 506p.

Ure A. M. and Davidson C. M. (1995). "Chemical speciation in the environment". *Blackie*, Glasgow,

Vaillant S., Pouet M. and Thomas O. (1999). "Methodology for the characterisation of heterogeneous fractions in wastewater". *Talanta* **50** (4), 729-736.

Van Bergen P. F., Bull I. D., Poulton P. R. and Evershed R. P. (1997). "Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted Classical Experiments--I. Total lipid extracts, solvent insoluble residues and humic acids from Broadbalk Wilderness". *Organic Geochemistry* **26** (1-2), 117-135.

Van Smeerdijk D. G. and Boon J. J. (1987). "Characterisation of subfossil Sphagnum leaves, rootlets of ericaceae and their peat by pyrolysis-high-resolution gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **11**, 377-402.

Violleau D. (1999)."Intérêt du fractionnement et de l'extraction des matières organiques naturelles d'eaux de surface pour l'étude de leur propriétés structurales et de leur pouvoir complexant vis-à-vis du cuivre" Laboratoire de chimie de l'eau et de l'environnement, *Université de Poitiers*, 159p.

Violleau D., Essis-Tome H., Habarou H., Croue J. P. and Pontie M. (2005). "Fouling studies of a polyamide nanofiltration membrane by selected natural organic matter: an analytical approach". *Desalination* **173** (3), 223-238.

Wang L.-S., Hu H.-Y. and Wang C. (2007). "Effect of Ammonia Nitrogen and Dissolved Organic Matter Fractions on the Genotoxicity of Wastewater Effluent during Chlorine Disinfection". *Environmental Science and Technology* **41** (1), 160-165.

Wang X. C., Chen R. F. and Gardner G. B. (2004). "Sources and transport of dissolved and particulate organic carbon in the Mississippi River estuary and adjacent coastal waters of the northern Gulf of Mexico". *Marine Chemistry* **89** (1-4), 241-256.

Weishaar J. L., Aiken G. R., Bergamaschi B. A., Fram M. S., Fujii R. and Mopper K. (2003). "Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon". *Environmental Science and Technology* **37** (20), 4702-4708.

Wiegner T. N. and Seitzinger S. P. (2001). "Photochemical and microbial degradation of external dissolved organic matter inputs to rivers". *Aquatic Microbial Ecology* **24** (1), 27-40.

Wong C. S., Boyle E., Bruland K. W., Burton J. D. and Goldberg E. D. (1983). "Trace metals in seawater". *Plenum*, New York, 920p.

Wu Y., Zhang J., Liu S. M., Zhang Z. F., Yao Q. Z., Hong G. H. and Cooper L. (2007). "Sources and distribution of carbon within the Yangtze River system". *Estuarine Coastal and Shelf Science* **71** (1-2), 13-25.

Zhou Q. H., Cabaniss S. E. and Maurice P. A. (2000). "Considerations in the use of high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances". *Water Research* **34** (14), 3505-3514.

Zsolnay A. (2003). "Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions". *Geoderma* **113** (3-4), 187-209.

CHAPITRE II :
INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE SUR LA SPECIATION DES METAUX

« Malgré une eau de bonne qualité, avec un pH situé entre 7 et 8 comme c'est le cas pour 80 % de l'eau distribuée en France, un foyer sur deux utilise encore une eau dont la teneur en plomb est supérieure à 10 microgrammes par litre, limite supérieure fixée par l'organisation mondiale de la santé. »

http://www.developpement-durable.gouv.fr/

TABLE DES MATIERES

II.1. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE 115

II.1.1. METAUX TRACES DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES 115
II.1.1.1. Généralités 115
II.1.1.2. Sources des métaux traces 115
II.1.1.2.1. Sources naturelles 115
II.1.1.2.2. Sources anthropiques 116
II.1.1.3. Spéciation des métaux traces 117
II.1.2. ROLE DE LA MOD VIS-A-VIS DES METAUX TRACES 119
II.1.3. ANALYSE ET MODELISATION DES PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOD .. 120
II.1.3.1. Analyse globale de la MOD 121
II.1.3.2. Fractionnement de la MOD et concentration 121
II.1.4. ANALYSE DES INTERACTIONS MATIERES ORGANIQUES – METAUX TRACES 122
II.1.4.1. Techniques séparatives 122
II.1.4.1.1. DGT (Diffusive Gradient in Thin film) 122
II.1.4.1.2. Autres techniques séparatives 123
II.1.4.2. Techniques non séparatives 124
II.1.4.2.1. Spectroscopie de fluorescence 124
II.1.4.2.2. Techniques électrochimiques 124
II.1.5. MODELISATION DES PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOD 133
II.1.5.1. Problématique 133
II.1.5.2. Représentation des propriétés de la MOD 135
II.1.5.3. Approche discrète 135
II.1.5.4. Approche continue 136
II.1.5.5. Modèle continu : modèle NICA-Donnan 138
II.1.5.5.1. Modèle NICA 138
II.1.5.5.2. Modèle Donnan 141
II.1.6. CONCLUSIONS BIBLIOGRAPHIQUES 143

II.2. MATERIEL ET METHODES 145

II.2.1. INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE – PROTON 145
II.2.2. INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE – CUIVRE 145
II.2.3. INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE – PLOMB 147

II.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS 153

II.3.1. INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE – CUIVRE 153
II.3.1.1. Teneurs en sites complexants 156
II.3.1.2. Constantes de complexation vis-à-vis du cuivre 158
II.3.1.3. Pouvoir complexant des MOD extraites : affinité et capacité 160
II.3.1.4. Influence de la force ionique sur la complexation non spécifique 162
II.3.2. INTERACTIONS MATIERE ORGANIQUE – PLOMB 163
II.3.2.1. Problème lié à la cinétique de complexation 163
II.3.2.2. Altération de la MOD 164
II.3.2.3. Teneur en sites complexants 165
II.3.2.4. Titrations par le plomb de la MOD 165

II.4. CONCLUSION 168

II.5. BIBLIOGRAPHIE 169

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fonds géochimique en métaux particulaires (µg.g^{-1}) pour la Seine 116
Tableau 2 : Flux de métaux (kg.an^{-1}) rejetés dans l'eau en France (2002) par l'industrie... 116
Tableau 3 : Concentration en métaux particulaires dans la Seine à l'aval de Paris..... 117
Tableau 4 : Paramètres conditionnels de complexation des eaux douces..... 120
Tableau 5 : Paramètres utilisés pour AGNES et la DPP..... 152
Tableau 6 : Paramètres d'affinité des sites faibles pour le proton et le cuivre de la MOD .. 154
Tableau 7 : Paramètres d'affinité des sites forts pour le proton et le cuivre de la MOD 155
Tableau 8 : Comparaison des paramètres de complexations de l'acide fulvique SRFA 156
Tableau 9 : Paramètres de complexation des MOD étudiées avec le plomb..... 167

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réactions d'échanges du métal M avec les constituants du milieu 117
Figure 2 : Schéma du principe de la mesure par DGT (Lehto et al., 2006) 123
Figure 3 : schéma de l'appareillage 127
Figure 4 : Principe des mesures chronopotentiométriques (Jagner et Sweden, 1983) 128
Figure 5 : Principe de la SWASV 129
Figure 6 : Schéma du programme simple de potentiels d'AGNES 130
Figure 7 : Schéma des profils des concentrations à la fin de l'étape de concentration 131
Figure 8 : Schéma des profils des concentrationsl au moment de la mesure du courant..... 132
Figure 9 : Principe de la détermination de la capacité complexante : méthode de Chau..... 134
Figure 10 : Distributions discrète (6 sites) et continue (bimodales) 137
Figure 11 : Distribution d'affinité correspondant aux isothermes NICA 139
Figure 12: Coefficients osmotiques, de contre-ions dans une solution de polyélectrolytes .. 143
Figure 13 : Photographie du système de titration utilisé pour la complexation du cuivre ... 145
Figure 14 : Exemple de courbe obtenue pour la calibration de l'ISE 146
Figure 15 : Schéma du programme simple de potentiels d'AGNES 148
Figure 16 : Représentation d'une DPP réalisée avec une solution de Zn^{2+} 149
Figure 17 : Profil du programme optimisé pour appliquer la technique AGNES 150
Figure 18 : Exemple de courbe de calibration de la technique AGNES..... 151
Figure 19 : Représentation de la charge mesurée et modélisée pour la fraction HPOA1 153
Figure 20 : Représentation du cuivre complexé en fonction du cuivre libre 153
Figure 21 : Distribution des capacités de complexations des fractions isolées 157
Figure 22 : Capacités complexantes d'affinités faible et forte selon le site de prélèvement. 157
Figure 23 : Distribution des constantes de complexation vis-à-vis du proton et du cuivre .. 158
Figure 24 : Constantes de complexation vis-à-vis du proton selon le site de prélèvement ... 159
Figure 25 : Constantes de complexation vis-à-vis du cuivre selon le site de prélèvement.... 159
Figure 26 : Distribution du nombre de sites complexants en fonction de Log (K)..... 160
Figure 27 : Distribution de Log [concentration des sites complexants] versus Log [K] 161
Figure 28 : Log [concentration des sites] versus Log [K] selon le site de prélèvement 161
Figure 29 : Spéciation du cuivre dans différentes fractions de MOD (Croué et al., 2003)... 162
Figure 30 : Evolution de la concentration en plomb libre (Pb^{2+}) dans le temps..... 163
Figure 31 : Répliquats des titrations de la fraction HPOAN (20 $mgC.l^{-1}$) à différents pH ... 164
Figure 32 : Altération de la MOD en fonction du temps 165
Figure 33 : Titrations par le plomb de la fraction HPOMT à 4 pH différents 166
Figure 34 : Ajustement des données des titrations de la fraction HPOMT par NICA 166

II.1. RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1.1. Métaux traces dans les écosystèmes aquatiques

II.1.1.1. Généralités

Dans un milieu naturel, les éléments métalliques peuvent être distingués en deux catégories. La première catégorie rassemble les éléments qui, présents à l'état de trace, sont essentiels à la croissance, au développement voire à la reproduction des organismes vivants, aussi bien microscopiques que macroscopiques (Buffle, 1988 ; Tessier et Turner, 1995). Les métaux suivants en font partie : Cu, Zn, Co, Fe, Mn, Ni, Cr, V, Mo, Se, Sn. Lorsque la concentration de ces éléments est trop faible, un phénomène de carence peut survenir chez ces organismes. Ainsi, il a par exemple été montré qu'un manque de fer pouvait être à l'origine d'une diminution du développement phytoplanctonique (Martin et Fitzwater, 1988 ; Martin *et al.*, 1991). Pour autant, une augmentation forte de la concentration en ces éléments métalliques peut aboutir à des phénomènes de toxicité. C'est entre autres le cas du cuivre. La deuxième catégorie est quant à elle constituée des éléments métalliques toxiques, non nécessaires à la croissance des organismes vivants, tels que le cadmium, le plomb et le mercure. L'ensemble des ces éléments peut être d'origine naturelle mais les activités anthropiques générant d'importantes pollutions peuvent augmenter leurs concentrations dans les écosystèmes aquatiques. La quantification et la spéciation (les formes chimiques) de ces éléments traces sont donc des données indispensables à l'estimation de leur impact dans un environnement donné.

II.1.1.2. Sources des métaux traces

II.1.1.2.1. Sources naturelles

Les métaux traces sont naturellement présents dans les sols. Certains sont inclus dans la structure cristalline des minéraux présents dans les roches, tels que les oxydes (ex : Magnétite Fe_3O_4), les hydroxydes (ex : Gibbsite $Al(OH)_3$), les carbonates (ex : Malachite $Cu_2CO_3(OH)_2$) ou les sulfures (ex : Marcassite FeS_2). D'autres métaux sont simplement adsorbés à la surface des minéraux. Les phénomènes d'érosion et d'altération des roches expliquent en partie la présence d'éléments métalliques dans les eaux souterraines et de surface. L'érosion mécanique enrichit les milieux aquatiques en métaux particulaires alors que l'altération chimique est une source de métaux dissous. Le volcanisme constitue également une source naturelle. A titre d'exemple, lors de l'éruption du 14 juin 1991, le Mont Pinatubo a relargué 600 000 t de cuivre, 800 000 t de zinc et 100 000 t de plomb (Garrett, 2000). Une partie significative des émissions a été projetée jusqu'à la stratosphère puis disséminée sur la totalité de la Terre (Garrett, 2000). L'ensemble des métaux traces présents dans les systèmes aquatiques et provenant de sources naturelles constitue le fonds géochimique. Le Tableau 1 donne une estimation de fonds géochimique exprimé en métaux particulaires et mesuré en Seine.

Tableau 1 : Fonds géochimique en métaux particulaires (µg.g^{-1}) pour la Seine (Thévenot *et al.*, 2007)

Métal	Al	Co	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Fonds particulaire géochimique (µg.g^{-1})	33 000	0,22	9	40	15	0,03	16	20	60

II.1.1.2.2. Sources anthropiques

Les activités humaines rejettent directement ou indirectement des métaux traces dans les milieux aquatiques. Par exemple, le trafic automobile et les activités industrielles émettent de fines particules métalliques dans l'atmosphère qui peuvent ensuite être acheminées jusqu'au compartiment aquatique. Ces sources sont dites diffuses car leur répartition spatiale est importante. En raison de la grande surface d'échange atmosphérique des lacs, des mers et des océans, l'apport en métaux traces peut être direct (Ridame *et al.*, 1999). En revanche, les cours d'eau de faible surface d'échange sont principalement contaminés par le ruissellement des espèces métalliques déposées sur les sols (Fuchs *et al.*, 1997 ; Miller *et al.*, 2003). Ces eaux de ruissellement sont chargées en métaux provenant de dépôts atmosphériques mais aussi de la corrosion des surfaces de ruissellement, telles que les toitures (Gromaire *et al.*, 2001). Les sources anthropiques peuvent également être ponctuelles c'est-à-dire avec une origine bien identifiée. La principale source ponctuelle correspond aux rejets industriels (Tableau 2).

Tableau 2 : Flux de métaux (kg.an^{-1}) rejetés dans l'eau en France (2002) par les principaux secteurs industriels[1]

Secteurs	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Sidérurgie	25.10^6	2409	727847	15169	107.10^6	17161	23554	65109
Chimie	1.10^6	75	39887	27927	$1,5.10^6$	12706	1857	52741
Traitement de surface	69354	214	894	5360	18404	6669	6093	9434
Industries extractives	-	70	7562	2793	2.10^6	4213	2129	6681

Les rejets domestiques constituent une autre source ponctuelle. Leur composition chimique est dépendante de la corrosion des canalisations et du type d'activité. La charge métallique de ces rejets est diminuée lors du traitement en station d'épuration des eaux usées (STEP). En effet, à l'exception du Ni total, dont l'abattement est inférieur à 50 %, il a été montré que les autres métaux totaux (Al, Cr, Cu, Fe et Pb) sont éliminés à plus de 70 % (Buzier *et al.*, 2006). Cependant, dans le cas de la ville de Paris qui possède un réseau d'assainissement unitaire (mélange des eaux pluviales et des eaux domestiques), en cas de fortes pluies, la capacité de traitement des stations d'épuration peut être dépassée entraînant donc le rejet direct des effluents dans les milieux aquatiques sans traitement préalable. Enfin, les rejets miniers peuvent être une source importante de métaux traces. Une des conséquences de l'activité anthropique est la perturbation des fonds géochimiques des milieux aquatiques. A l'aval de Paris, ces activités enrichissent la Seine en métaux particulaires (Tableau 3) avec un

[1]http://www.eaufrance.fr/docs/syntheses/industrie/rejets_industriels/edition2004/dppr2004/eau/eau_par_secteurs.htm

facteur d'enrichissement, représentant le rapport entre la concentration à l'aval de Paris et le fonds géochimique, qui varie selon l'espèce métallique.

Tableau 3 : Concentration en métaux particulaires dans la Seine à l'aval de Paris (Thévenot *et al.*, 2002)

Métal	Cd	Cu	Pb	Zn
Particulaire ($\mu g.g^{-1}$)	4,85	230	285	720
Facteur d'enrichissement	14	15	11	9

II.1.1.3. Spéciation des métaux traces

La spéciation chimique d'un élément est définie comme étant l'ensemble des formes/espèces chimiques de cet élément dans un milieu naturel donné. Un certain nombre de ligands, inorganiques ou organiques, vont conditionner la spéciation de cet élément par la formation de complexes plus ou moins stables.

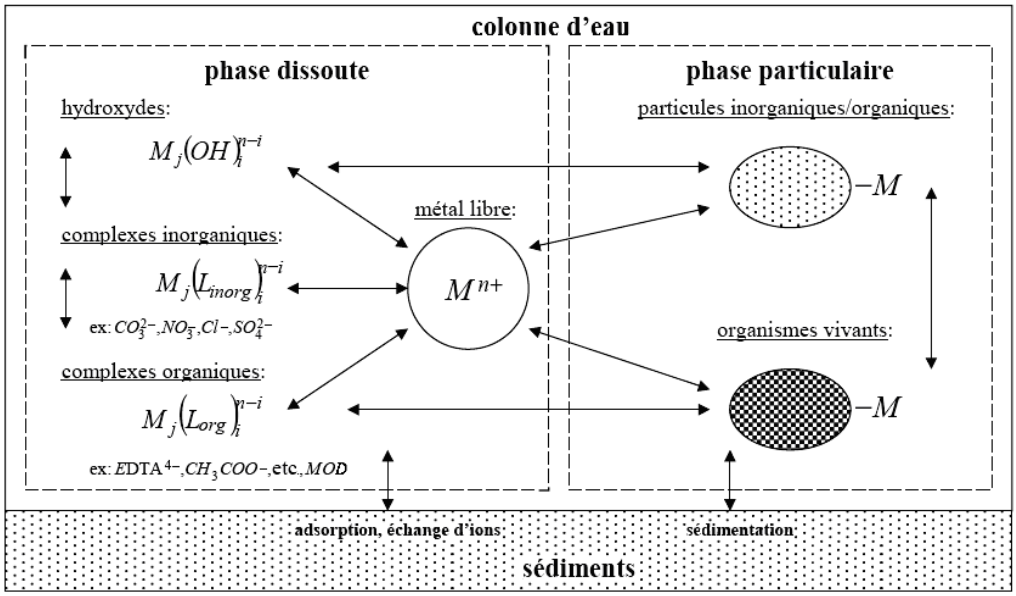


Figure 1 : Réactions d'échanges du métal *M* avec les constituants organiques et inorganiques du milieu (Buffle, 1988)

Il a été montré que la toxicité d'un métal trace est dépendante de cette spéciation et que le métal ionique libre (Cu^{2+}, Pb^{2+}, Cd^{2+}, etc.) est une des formes les plus réactives, avec les espèces neutres, puisque plus facilement assimilables par les organismes vivants (Anderson et Morel, 1978 ; Morel, 1983 ; Rollemberg et Simoes Goncalves, 2000 ; Vasconcelos et Leal, 2001a). La quantification de la concentration dissoute totale en un ou plusieurs de ces métaux traces ne peut donc pas suffire à l'estimation de l'indice de pollution d'un système donné. Une détermination correcte de la spéciation d'un métal est indispensable à l'estimation de son rôle et de son devenir. La Figure 1 schématise les réactions d'association, de complexation et d'adsorption d'un métal vis-à-vis des constituants dissous et particulaires présents dans la

colonne d'eau ainsi que les réactions d'échanges avec les sédiments. Les formes chimiques d'un métal dissous peuvent être séparées en quatre catégories suivant la nature de l'agent complexant considéré :

(i) métal ionique libre hydraté : M^{n+},

(ii) métal sous forme d'hydroxydes : $M_j(OH)_i^{n-i}$,

(iii) métal complexé à des ligands inorganiques : $M_j(L_{inorg})_i^{n-i}$,

(iv) métal complexé à des ligands organiques : $M_j(L_{org})_i^{n-i}$,

L'équation de conservation de la masse, pour le métal M dissous, est donc de la forme :

$$M_T = M^{n+} + \sum_i M_j(OH)_i^{n-i} + \sum_i M_j(L_{inorg})_i^{n-i} + \sum_i M_j(L_{org})_i^{n-i} \qquad \textbf{Équation 1}$$

Pour chaque ligand, la complexation entre un métal M et un ligand L peut être décrite par la réaction d'équilibre suivante :

$$iM + jL \underset{kd}{\overset{ka}{\Leftrightarrow}} M_iL_j$$

Cette réaction est caractérisée par une constante thermodynamique de complexation/stabilité, notée K, reliée aux constantes d'association et de dissociation respectivement K_a et K_d, et exprimée par l'équation :

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[M_iL_j]}{[M]^i[L]^j} \qquad \textbf{Équation 2}$$

Dans cette équation, les concentrations en *M* et *L* se réfèrent au métal et ligand libre, i.e. non complexés par d'autres espèces chimiques, seulement solvatés par l'eau.

La catégorie (ii), rassemblant l'ensemble des complexes hydroxydes, n'est dépendante que de la valeur du pH. Il convient donc de mesurer cette variable pour toute estimation de la spéciation d'un métal.

La catégorie (iii) regroupe les complexes inorganiques, c'est à dire les complexes du métal avec les anions du milieu comme les chlorures, sulfates, nitrates, carbonates, etc. Ces complexes ont été caractérisés et donc les constantes de complexations thermodynamiques associées aux équilibres considérés sont a priori disponibles. Elles sont d'ailleurs généralement intégrées aux tables thermodynamiques utilisées par les logiciels de calcul de spéciation (MINEQL, CHESS, PHREEQC, VisualMINTEQ, etc.). Pour autant, les valeurs de concentrations totales en ligands inorganiques, facilement mesurables par les techniques analytiques actuelles (chromatographie ionique, AAS, etc.), ne peuvent pas être utilisées pour le calcul de la spéciation chimique du métal, sans prendre en compte les complexations éventuelles de ces ligands avec d'autres cations. Par exemple, dans le cas des chlorures, il faut principalement tenir compte des équilibres avec le calcium et le magnésium pour pouvoir estimer la concentration en chlorure sous forme libre.

Enfin, la catégorie (iv), réunit les complexes formés avec des ligands de nature organique. Ces ligands peuvent être différenciés en deux sous-catégories principales :

(iv-a) des molécules de structures simples et de réactivités connues comme l'EDTA, l'acide acétique, la cystéine, etc., éventuellement présentes dans le milieu naturel,

(iv-b) des macromolécules d'origine diverses, de structures hautement hétérogènes et de réactivité souvent difficilement quantifiables, constitutives de la Matière Organique Dissoute (MOD). Cette sous-catégorie peut être sous divisée en deux parties :

(iv-b-1) des agents complexants polyfonctionnels (groupes de complexants relativement petits, possédant un nombre faible de sites, de caractéristiques communes),

(iv-b-2) des macromolécules polyélectrolytes (groupes de macromolécules, dans lesquels chaque molécule possède un grand nombre de sites, de propriétés très diverses) (Buffle, 1988).

Des trois catégories (ii, iii et iv) de ligands précédemment définies, celle qui regroupe les ligands organiques est la plus difficile à caractériser. La sous-catégorie (iv-a) est cependant assez facile à intégrer dans un calcul de spéciation, si tant est que l'on puisse déterminer la concentration de l'ensemble de ces molécules simples, ce qui est rarement le cas. Une mauvaise estimation des propriétés de ces ligands (iv) entraînerait donc systématiquement des imprécisions sur le calcul de la spéciation. La spéciation des métaux traces dissous est donc influencée par un grand nombre de facteurs physico-chimiques qui peuvent être soumis à des variations importantes, par exemple en milieu estuarien où les variations de salinité sont fortes. Il convient donc de prendre en compte l'ensemble des équilibres entre le métal et les ligands présents dans le milieu pour pouvoir estimer correctement la répartition du métal entre ses différentes formes chimiques (Rozan et Gaboury, 1999). Le système mathématique ainsi défini est complexe et ne peut généralement pas être résolu analytiquement (Morel, 1983). L'utilisation d'un programme spécifique de spéciation est donc indispensable pour correctement interpréter des données issues de mesures analytiques, en vue de l'étude des formes chimiques d'un métal à l'état de traces.

II.1.2. Rôle de la MOD vis-à-vis des métaux traces

Compte tenu de la grande hétérogénéité structurelle d'une MOD, due principalement aux différentes sources de matières organiques ainsi qu'aux différents processus de dégradation modifiant ses caractéristiques d'origine, les valeurs trouvées pour les différentes propriétés de la MOD sont très variées (Town et Filella, 2000a). Il ne semble donc pas possible de représenter l'ensemble des MOD, observables en milieux aquatiques, par un nombre restreint de propriétés. Cependant, la prise en compte du rôle de la MOD est nécessaire pour correctement interpréter et prévoir le comportement d'un polluant tel qu'un métal à l'état de trace dans un environnement donné (Gustafsson *et al.*, 2003 ; Koukal *et al.*, 2003 ; Lamelas *et al.*, 2005 ; Lorenzo *et al.*, 2002 ; Slaveykova *et al.*, 2003). De plus, les sites de la MOD possédant des propriétés de complexation vis-à-vis des métaux, ont généralement aussi des affinités pour le proton et les autres cations, notamment le calcium ou le magnésium. Ces éléments vont donc rentrer en compétition avec le métal considéré (Christensen et Christensen, 2000 ; Lu et Allen, 2002 ; Van den Hoop *et al.*, 1995). Par exemple, lorsque le pH diminue, on observe généralement une décomplexation des métaux traces, caractérisée par une augmentation de la concentration en métaux non-organiques (i.e. libre et complexé avec les hydroxydes et les ligands inorganiques du milieu) (Cao *et al.*, 2004). Le même phénomène est observable lorsque la concentration en cations divalents alcalino-terreux augmente. Pour correctement estimer l'influence d'une MOD sur la spéciation d'un métal, il faut donc aussi connaître ses affinités vis-à-vis des autres éléments, afin de pouvoir caractériser la MOD par des paramètres qui ne soient pas conditionnels (i.e. dépendants des conditions analytiques, et donc non-transposables) mais "quasi-

thermodynamiques". Ceci complique le processus de caractérisation de la MOD, puisqu'il faut avoir recours à d'autres techniques analytiques spécifiques aux cations majeurs (utilisation d'électrodes sélectives) et à la détermination des propriétés d'acidité (titrations acido-basiques).

La spéciation et donc la complexation des métaux traces dans les eaux naturelles ont fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques (Batley, 1989. ; Batley *et al.*, 2004 ; Bernhard *et al.*, 1986 ; Brockaert *et al.*, 1990 ; Buffle, 1988 ; Florence, 1986 ; Florence et Batley, 1980 ; Landner, 1987 ; Leppard, 1983 ; Millward, 1995 ; Salbu et Steinnes, 1995 ; Tessier et Turner, 1995 ; Town et Filella, 2000a ; Ure et Davidson, 1995 ; Wong *et al.*, 1983) démontrant ainsi le nombre important d'études publiées dans ce domaine. Les paramètres de complexation (pour la phase dissoute) des eaux douces vis-à-vis du Cu (≈50 systèmes aquatiques, 150 mesures), du Pb (≈12 systèmes aquatiques, 65 mesures), du Cd (≈15 systèmes aquatiques, 65 mesures) et Zn (≈16 systèmes aquatiques, 75 mesures) sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Paramètres conditionnels de complexation des eaux douces pour le Cu, le Pb, le Cd et le Zn (Town et Filella, 2000a)

	Cu	Pb	Cd	Zn
Log K (l^{-1}.mol)	3,7 - 15,5	3,95 – 12,83	3,67 – 10,99	7,4 – 10,7
L (nmol.l^{-1})	6,8 - 126000	0,05 - 19000	0,023 - 5400	0,92 - 2000

Les paramètres de complexations sont pour l'ensemble de ces métaux Cu, Pb, Cd et Zn très fortement corrélés à la quantité de carbone organique dissous, c'est-à-dire à la matière organique (Town et Filella, 2000a, 2000b). De plus il a été montré que des paramètres similaires ont été obtenus à partir de MOD isolées du milieu (Town et Filella, 2000b). Ces paramètres de complexation montrent la dispersion et l'hétérogénéité des données publiées de 3 à 12 ordres de grandeurs pour les constantes de complexation et de 5 à 6 ordres pour la concentration des sites complexants. Cette grande dispersion peut être due non seulement à la variabilité d'un système aquatique à un autre mais aussi à la variabilité expérimentale :

- aux fenêtres analytiques employées (limites de détection, de quantification),
- aux choix des ratios métal-ligand,
- ainsi qu'aux conditions expérimentales (pH, force ionique, température)

qui ne permettent de détecter qu'une partie des complexes formés ainsi qu'aux modèles utilisés pour déterminer ces paramètres (Town et Filella, 2000a, 2000b).

II.1.3. Analyse et modélisation des propriétés de complexation de la MOD

De par sa composition, la MOD observée dans les systèmes aquatiques possède une structure chimique hautement hétérogène, donc un nombre important, voire infini, de groupements fonctionnels de propriétés différentes. De ce fait, l'étude expérimentale des propriétés de la MOD n'est possible qu'en la subdivisant en différents groupes de composés

possédant des caractéristiques plus ou moins similaires. De plus, pour obtenir des informations qui ne soient pas limitées au seul cas d'étude, les paramètres utilisés pour représenter ces groupes doivent être, autant que faire se peut, indépendants des conditions chimiques du milieu d'origine de la MOD étudiée (Buffle, 1988). Deux voies différentes peuvent être suivies pour étudier les propriétés de la MOD : l'analyse globale et l'analyse après fractionnements selon des critères physico-chimiques.

II.1.3.1. Analyse globale de la MOD

La première approche consiste en une étude globale de la MOD, non fractionnée, éventuellement isolée globalement du milieu d'origine, par exemple par ultrafiltration. La MOD ainsi analysée est ensuite subdivisée *a priori* mathématiquement en groupes « modèles » de propriétés voisines (par exemple la complexation vis-à-vis du plomb) qui sont utilisées pour représenter la MOD (Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Tipping, 1993). Ces groupes n'ont pas forcément une réalité chimique, i.e. ils ne correspondent pas forcément à une structure chimique ou à des groupements fonctionnels caractérisés (Sposito, 1981). Ils sont seulement caractérisés par un certain nombre de propriétés, par exemple une constante d'acidité ou un rendement quantique de fluorescence qui seront estimés à partir des mesures réalisées. Ce type d'étude à l'avantage de ne pas modifier la MO. Mais elle nécessite des techniques analytiques suffisamment précises pour travailler aux concentrations naturelles et s'affranchir des perturbations provoquées par le milieu (comme par exemple la compétition des ions chlorures vis-à-vis de la complexation du Cu par les groupements fonctionnels de la MOD), surtout quand la MOD n'a pas été extraite et donc que la concentration en carbone organique dissous (COD) est faible.

II.1.3.2. Fractionnement de la MOD et concentration

La deuxième voie repose sur l'extraction et un ou plusieurs fractionnements préalables de la MOD en groupes de composés chimiques ayant certaines propriétés voisines, suivant des protocoles chimiques et/ou physiques. En effet, quelque soit le protocole choisi, l'extraction conduira systématiquement à un fractionnement de la MOD. Les groupes ainsi séparés sont donc constitués de composés chimiques "réels", possédant au moins une propriété en commun, par exemple la taille ou la charge. Le fractionnement d'une MON, constitue une première étape de sa caractérisation, étape qui peut être considérée comme une fin en soi. Pour appréhender son comportement dans un milieu donné, notamment vis-à-vis des métaux, chaque groupe peut ensuite être analysé pour caractériser les propriétés qui lui sont associées. Les analyses sont facilitées par le fractionnement de la MOD. En effet ces séparations permettent de minimiser les phénomènes d'interactions entre les groupements fonctionnels (inévitables lorsqu'ils sont mélangés dans l'échantillon "brut"), annulent a priori les interactions générées par les autres espèces chimiques présentes (par exemple les ions majeurs) et permettent de travailler à des concentrations en composés chimiques accrues. Le regroupement de l'ensemble des propriétés analysées pour chaque groupe permet une estimation des caractéristiques globales de la MON étudiée (Buffle, 1988). S'il est aisé de définir théoriquement différentes fractions de MOD il n'en est pas de même dans la pratique. Du fait de la haute complexité de la MOD, tout type de fractionnement (et d'analyses par la suite) ne pourra fournir qu'une description approximative de l'intégralité de la MOD. En effet le fractionnement, qui ne sépare la MOD que par des critères relatifs à la méthode employée, peut engendrer une disparition et/ou des transformations partielles de la MOD et ainsi produire divers artefacts (Shuman, 1990 ; Zsolnay, 2003). Ainsi même si des études précises de chaque fraction peuvent fournir une quantité importante et précise d'informations celles-ci sont à considérer avec prudence.

Dans le cadre du premier chapitre, 3 fractions de MOD ont été isolées de 6 prélèvements d'eaux en amont et en aval de l'agglomération parisienne à l'aide : d'une étape de concentration par osmose inverse, suivie d'une filtration sur résines XAD-8 et XAD-4 pour les fractions hydrophobe (HPO) et transphilique (TPI) et d'une distillation zéotrophique pour la fraction la plus hydrophile (HPI). Un panel d'analyses (élémentaires, isotopiques, dosages des substances humiques dites réfractaires, spectroscopie UV, IR et fluorescence, chromatographie d'exclusion de taille, pyrolyse-CG-SM) a permis de caractériser et de différencier ces fractions en fonction de leur nature et de leur origine.

II.1.4. Analyse des interactions matières organiques – métaux traces

Différentes techniques analytiques ont été développées afin d'étudier les propriétés de complexation de la MOD. Elles reposent principalement sur la mesure de la concentration en métal libre ou complexé en équilibre avec la MOD mais peuvent également être basées sur des mesures de la concentration en ligand libre ou complexé. Certaines de ces techniques utilisent des protocoles d'extraction (dites techniques séparatives du métal ou de la MOD alors que d'autres peuvent s'appliquer directement à un échantillon (non séparatives).

II.1.4.1. Techniques séparatives

Les techniques séparatives utilisent des procédés permettant de séparer le métal (ou la MOD) libre du métal (ou de la MOD) complexé(e) par coprécipitation, dialyse, chromatographie, etc. Ces techniques ont été récemment reprises et modernisées, souvent par couplage à des techniques d'analyse spectroscopique des métaux (GFAAS, ICP-MS, …).

II.1.4.1.1. DGT (Diffusive Gradient in Thin film)

La technique des DGT est relativement récente. Elle est basée sur la mesure *in situ* d'un flux de métal dissous, et a été utilisée aussi bien dans la colonne d'eau que dans les sédiments ou les sols. Contrairement aux autres techniques, le système n'est pas à l'équilibre mais fonctionne en état de flux stationnaire au travers de la membrane durant le temps d'exposition. En effet, le métal est complexé par une résine spécifique, possédant un grand nombre de sites de complexation, l'étape de diffusion dans un gel ne laissant *a priori* passer que le métal libre ou complexé par des petits ligands (Davison et Zhang, 1994). Pendant la diffusion dans le gel, ces complexes peuvent se dissocier puis le métal libre est complexé par la résine (Figure 2).

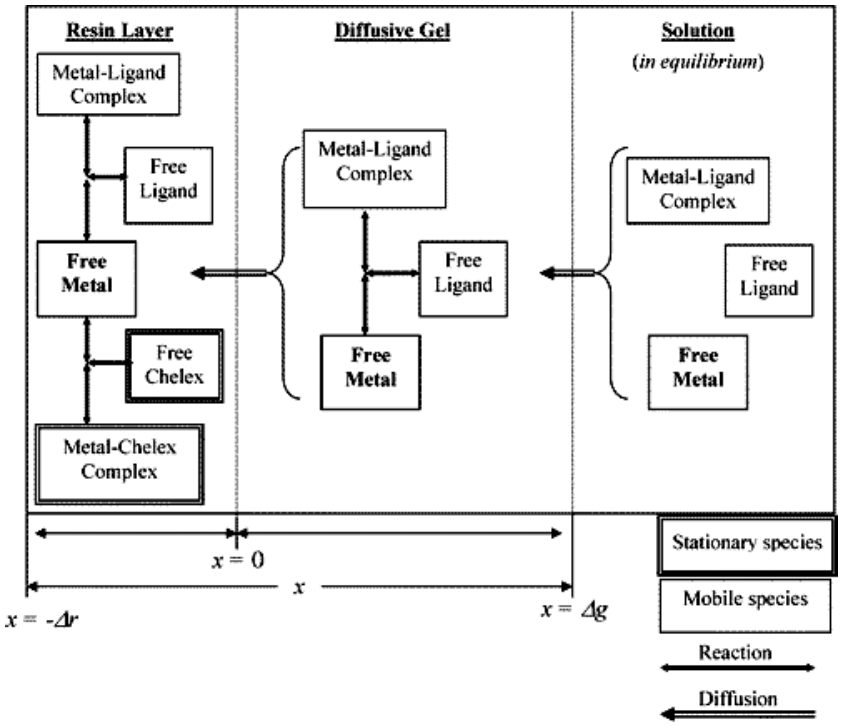


Figure 2 : Schéma du principe de la mesure par DGT (Lehto *et al.*, 2006)

Après un temps d'exposition, le système est retiré et le métal fixé sur la résine est élué (acide fort) puis mesuré par spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS), spectrométrie d'émission atomique à plasma induit (ICP-AES) ou spectrométrie d'absorption atomique (AAS). Ces techniques faciles à mettre en œuvres et permettant une mesure directe sont cependant sensibles à de nombreux paramètres (spéciation du métal dans le milieu, propriétés des ligands organiques, caractéristiques du substrat, temps d'exposition, etc.). Une comparaison des résultats obtenus par DGT avec des mesures classiques de métal labile (métal libre et faiblement complexés) par voltamétrie a montré qu'ils étaient semblables, attestant *a priori* de l'efficacité de la technique (Meylan *et al.*, 2004). Cependant la signification de la mesure de métal par la technique des DGT reste difficile a interpréter dans des solutions complexes telles que le milieu naturel ou des solutions artificielles en présence de ligands mal connu tels que la MOD (Warnken *et al.*, 2007). En effet la diffusion et la dissociation mal connues de certains complexes au sein du gel (Scally *et al.*, 2003 ; Scally *et al.*, 2006 ; Warnken *et al.*, 2007) empêchent l'accès à une mesure du métal libre, rendant délicates et imprécises l'interprétation des propriétés complexantes des MOD. Actuellement, cette technique permet uniquement de donner une indication sur la labilité du métal dans un milieu et des conditions d'analyse données. Une étude a permis de déterminer la spéciation du plomb en présence d'acides humiques par DGT et semblent être en accord avec les paramètres génériques utilisés par le code de spéciation VisualMINTEQ (Scally *et al.*, 2004). Si la diffusion et la dissociation de certains complexes peuvent parfois être prises en compte, les temps d'exposition supérieurs à 24 heures rendent néanmoins les mesures longues (Lehto *et al.*, 2006).

II.1.4.1.2. Autres techniques séparatives

Comme la DGT, ces techniques sont basées sur l'extraction du métal ou de la MOD, puis leur caractérisation. Par exemple, la chromatographie liquide couplée à des mesures par GFAAS ou ICP-MS, permet de mesurer la concentration en métal dans chacune des fractions

organiques éluées, ces fractions pouvant ensuite être caractérisées par exemple par spectrométrie de masse. L'ultrafiltration (Wrobel *et al.*, 2003), la chromatographie par exclusion de taille (Morelli *et al.*, 2002 ; Scarano et Morelli, 2002), la dialyse (Takacs *et al.*, 1999) ou les résines échangeuses (Ndung'u *et al.*, 2003) peuvent également être utilisées pour séparer plusieurs fractions complexantes et le métal associé. Ces techniques, si elles sont utilisées pour caractériser la structure des fractions de MOD complexantes, sont souvent onéreuses, relativement difficiles à mettre en œuvre et ne permettent pas de retrouver les propriétés de complexation initiales de la MOD étudiée vis-à-vis des métaux, ceci étant principalement dû à une séparation incomplète du métal libre et des molécules de petites tailles (Buffle, 1988 ; Mackey *et al.*, 1997).

II.1.4.2. Techniques non séparatives

Pratiquement, l'analyse des propriétés de complexation d'une MOD consiste à ajouter à l'échantillon des aliquotes d'une ou plusieurs solutions standards de métal, et à suivre l'évolution de la concentration en métal labile ou libre en fonction de la concentration en métal total (Bruland, 1992 ; Bruland *et al.*, 2000 ; Erk et Raspor, 2001 ; Kozelka et Bruland, 1998 ; Muller, 1996 ; Muller *et al.*, 2001 ; Rozan *et al.*, 1999).

II.1.4.2.1. Spectroscopie de fluorescence

Contrairement aux techniques précédemment mentionnées, la spectroscopie de fluorescence UV-visible est basée sur l'analyse directe des propriétés de la MOD. En effet, parmi les groupements fonctionnels de la MOD, certains d'entre eux ont des propriétés de fluorescence. Si ces groupements possèdent également des propriétés de complexation ou d'acidité, un phénomène d'exaltation ou d'atténuation de la fluorescence est observé lors d'ajouts de métaux. Cette propriété, nommée quenching de fluorescence, permet de mettre en évidence les propriétés de complexation de la MOD (Cao *et al.*, 2004 ; Esteves da Silva et Oliveira, 2002 ; Patel-Sorrentino *et al.*, 2002). Cependant, tous les sites fluorescents ne sont pas complexants, et réciproquement (Violleau, 1999), ce qui peut entraîner un biais dans l'analyse complète des propriétés de complexation de la MOD. Ceci s'avère d'autant plus gênant lorsque l'on souhaite déterminer des paramètres de complexation de MOD hydrophiles, dont le caractère aromatique, et donc fluorescent, est peu marqué. De plus, compte tenu de la grande hétérogénéité des MOD, ces propriétés de fluorescence sont complexes et il est difficile de trouver les conditions expérimentales permettant d'obtenir une sensibilité suffisante pour l'analyse d'un échantillon peu concentré en MOD en métaux traces proche du milieu naturel.

II.1.4.2.2. Techniques électrochimiques

- **Méthodes potentiométriques**

La plupart des applications de potentiométrie pour la spéciation se limite à l'usage d'électrodes ioniques spécifiques (Ionic Specific Electrode - ISE) (Buffle, 1988 ; Monbet et Coquery, 2003). Les électrodes indicatrices des ions tels que Cu^{2+} et Pb^{2+} sont principalement construites par les mélanges de Ag_2S et d'un autre sulfure MS tel que CuS ou PbS. Le sulfure d'argent apparaît comme un matériau constitutif intéressant en raison de sa solubilité extrêmement faible en solution aqueuse et de sa bonne conductivité ionique à la température ordinaire (Collinson, 1999). Les membranes MS/Ag_2S sont préparées en pressant, sous forme de disque, les poudres polycristallines obtenues en précipitant des sulfures par addition de sulfure de sodium à une solution contenant les nitrates d'argent et d'un autre métal M tel que

Cu(II) ou Pb(II) (Durst, 1969) Lorsque cette électrode à membrane MS/Ag_2S est en contact avec une solution contenant les ions M^{2+}, deux réactions d'équilibre s'établissent :

$$MS_{(s)} \Leftrightarrow MS_{(aq)} \overset{K_{sp(MS)}}{\Leftrightarrow} M^{2+} + S^{2-} \qquad \textbf{Équation 3}$$

où $K_{sp(MS)}$ est le produit de solubilité de MS donné par l'expression :

$$K_{sp(MS)} = a_{M^{2+}} a_{S^{2-}} \qquad \textbf{Équation 4}$$

(aq) désignant l'état aqueux d'une molécule en équilibre avec son état solide symbolisé par (s).

$$Ag_2S_{(s)} \Leftrightarrow Ag_2S_{(aq)} \overset{K_{sp(Ag_2S)}}{\Leftrightarrow} 2Ag^{+} + S^{2-} \qquad \textbf{Équation 5}$$

avec $K_{sp(Ag2S)}$: produit de solubilité de Ag_2S donné par l'expression :

$$K_{sp(Ag_2S)} = a^2_{Ag^+} a_{S^{2-}} \qquad \textbf{Équation 6}$$

avec *a* représentant l'activité des ions.

L'activité des ions Ag^+ et S^{2-} dépendra de la quantité de membrane qui sera dissoute tandis que l'activité des ions M^{2+} proviendra de la solution. L'équation 2-4 réarrangée conduit à :

$$a_{S^{2-}} = K_{sp(MS)} / a_{M^{2+}} \qquad \textbf{Équation 7}$$

et en substituant l'activité d'ions sulfures dans l'équation 2-6, on aboutit à :

$$K_{sp(Ag_2S)} = \frac{a^2_{Ag^+} K_{sp(MS)}}{a_{M^{2+}}} \qquad \textbf{Équation 8}$$

et après réarrangement

$$a_{Ag^+} = \left(\frac{a_{M^{2+}} K_{sp(Ag_2S)}}{K_{sp(MS)}} \right)^{1/2} \qquad \textbf{Équation 9}$$

En solution ne contenant pas d'autres ions interférents, le potentiel d'électrode indicatrice aux ions Ag^+ est donné par l'équation de Nernst :

$$E_{(cell)} = E_0 + \frac{RT}{z_{Ag^+} F} \ln a_{Ag^+} \qquad \textbf{Équation 10}$$

avec E le potentiel, E0 le potentiel thermodynamique du couple rédox, R la constante des gaz parfait, T la température (en Kelvin), z la charge et F la constante de Farraday.

La substitution de a_{Ag+} à partir de 2-9 conduit à :

$$E_{(cell)} = E_0 + \frac{RT}{z_{Ag^+} F} \ln \left(\frac{K_{sp(Ag_2S)}}{K_{sp(MS)}} \right)^{1/2} + \frac{RT}{z_{Ag^+} F} \ln \left(a^{1/2}_{M^{2+}} \right) \qquad \textbf{Équation 11}$$

Comme les produits de solubilité sont constants à une température donnée, le terme $\frac{RT}{z_{Ag^+}F}\ln\left(\frac{K_{sp(Ag_2S)}}{K_{sp(MS)}}\right)^{1/2}$ est constant et peut être incorporé dans E_0 pour donner une nouvelle constante, notée E^0 et l'équation 2-11 devient alors

$$E_{(cell)} = E^0 + \frac{2{,}3RT}{2F}\log a_{M^{2+}} = E^0 + S\log a_{M^{2+}} \qquad \textbf{Équation 12}$$

est S est un coefficient de Nernst dont la valeur théorique est d'environ 29.6 mV à 25 °C pour une électrode indicatrice aux ions M^{2+} (z=2).

De cette façon, l'électrode est indicatrice aux ions M^{2+} en solution, étant donné que le produit de solubilité de l'ion M^{2+} avec l'ion sulfure est considérablement plus important que celui de Ag_2S. Parallèlement, la solubilité de MS doit être suffisamment plus faible que la concentration de l'ion M^{2+} à déterminer dans la solution. En outre, la réaction d'échange entre MS et Ag_2S doit être assez rapide, condition seulement respectée par certains sulfures dont CuS et PbS.

Les électrodes sélectives offrent donc une réponse directement liée à l'activité (ou à la concentration) des ions libres présents en solutions sans perturber la spéciation. Ces électrodes représentent donc une solution attractive pour l'étude de la spéciation de certaines espèces métalliques (Ag, Cu, Pb, Cd). Néanmoins, le domaine d'application des électrodes spécifiques reste limité pour plusieurs raisons. Le problème de contamination, d'adsorption et de solubilisation de la membrane de l'électrode (Mota et Correira Dos Santos, 1995 ; Ziniro *et al.*, 1998), perturbent la reproductibilité de la réponse pour des concentrations en métal total généralement inférieures à 10^{-7} mol.l^{-1} rendant cette technique peu attractive pour les études en milieu naturel. De plus d'importants problèmes d'interférences liés à la présence d'autres ions (Cl^-, Hg^{2+}, Ag^+, Fe^{3+}, etc.) (Roman et Rivera, 1992). En effet en milieu acide, la sensibilité aux ions divalents diminue à cause de la formation de H_2S (Hirata et Higashiyama, 1971). Le mercure(II) et l'argent(I) interfèrent avec une électrode à base de CuS ; le mercure(II), l'argent(I) et le cuivre(II) interfèrent avec des électrodes à base de PbS et à base de CdS. L'électrode à base de CuS peut donner des résultats erronés lorsque les ions Cl^- et Cu^{2+} sont simultanément présents dans la solution. La réaction correspondant à cette interférence est

$$Ag_2S + Cu^{2+} + 2Cl^- \Leftrightarrow 2\ AgCl + CuS$$

En outre la corrosion de la surface de l'électrode liée à la présence de dioxygène dissous (Tani *et al.*, 1999 ; Ziniro *et al.*, 1998) affecte les mesures. Tous ces problèmes empêchent strictement l'utilisation de ce type d'électrode dans le milieu. En revanche il est possible de les utiliser en laboratoire dans des conditions contrôlées : solutions artificielles dépourvues d'interférant, dégazage des solutions afin d'éliminer le dioxygène. Leur utilisation est relativement aisée à partir du moment où les conditions de mesures sont strictement contrôlées.

- **Méthodes par redissolution**

Les méthodes électrochimiques par redissolution sont parmi les plus sensibles (10^{-6} – 10^{-14} mol.l^{-1}) (Buffle et Tercier-Waeber, 2005). Elles sont rapides (pas d'étape de travail de l'échantillon), relativement peu coûteuses et aisément transportables donc les plus adaptées pour étudier la spéciation des métaux et pour effectuer des mesures *in situ* (Buffle et Tercier-Waeber, 2005). De par leur grande sensibilité, elles ont également été souvent

utilisées pour l'étude de complexation des métaux par les eaux naturelles (Buffle, 1988 ; Garnier, 2004 ; Wang, 1985).

Principe

Les mesures sont réalisées dans une cellule en polytétrafluoroéthylène (PTFE) afin de limiter les phénomènes d'adsorption sur les parois (Pei *et al.*, 2000) Un système à trois électrodes est utilisé pour les mesures : une électrode de travail (ET) où ont lieu les réactions d'oxydoréduction, une électrode de référence (ER) permettant la mesure des potentiels avec l'ET et une électrode auxiliaire ou contre électrode (EC) permettant le passage du courant (Figure 1). L'ER est généralement une électrode $Ag_{(s)}/AgCl_{(s)}/KCl_{(aq)}$ (3 mol.l^{-1}). L'EC est une électrode de platine ou de carbone isolée parfois par un pont salin (par exemple HNO_3 0,1 mol.l^{-1}) afin d'éviter toute contamination de l'échantillon. Ces électrodes sont reliées à un potentiostat piloté par un ordinateur à l'aide d'un logiciel.

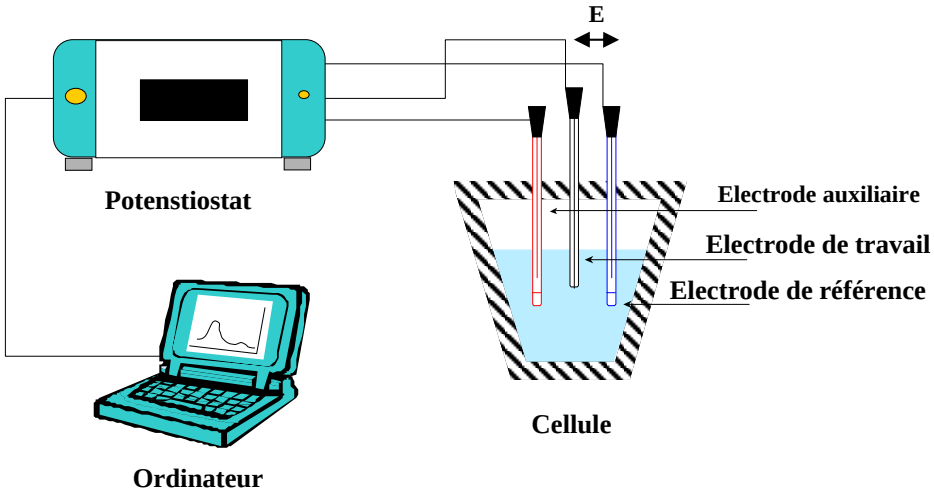


Figure 3 : schéma de l'appareillage

Il existe deux grands types de techniques électrochimiques par redissolution : les méthodes voltampérométriques et les méthodes chronopotentiométriques. Elles sont composées de deux étapes : une étape de dépôt ou étape de préconcentration et une étape de redissolution.

Lors de l'étape de dépôt, le métal en solution est réduit à la surface de l'électrode de travail grâce à l'application d'un potentiel judicieusement choisi pendant un temps donné.

L'étape de redissolution varie en fonction de la méthode utilisée. Mais de manière générale pendant cette étape, le métal, précédemment adsorbé à la surface de l'ET, est ré-oxydé et repasse en solution suite à un balayage en potentiel (voltampérométrie) ou à un courant imposé (chronopotentiométrie). La mesure du courant en fonction du potentiel (voltampérométrie) ou du potentiel en fonction du temps (chronopotentiométrie) permet d'accéder à la concentration du métal labile en solution. Ces techniques sont habituellement affectées par la présence de dioxygène dissous. En effet le dioxygène peut être réduit en peroxyde d'hydrogène ($E \approx -0,1$ V vs Ag/AgCl/KCl saturé) et le peroxyde d'hydrogène en eau ($E \approx -0,9$ vs Ag/AgCl/KCl saturé). Ces réductions produisent deux types d'interférences : un courant d'importance non négligeable par rapport à ceux des métaux traces et une augmentation du pH suite à la consommation d'ion H^+.

Chronopotentiométrie

La chronopotentiométrie se caractérise par l'application d'un courant constant lors de l'étape de redissolution. Le temps est alors mesuré en fonction du potentiel. La redissolution des métaux, précédemment déposés à la surface de l'électrode, se traduit par la présence de plateaux dans les courbes E = f(t) (Figure 3a). Le temps nécessaire à la redissolution est directement proportionnel à la concentration du métal préalablement adsorbé. A partir de cette courbe, l'unité d'analyse établit une courbe dérivée : dt/dE = f(E) (Figure 4). Celle-ci présente alors des pics dont la hauteur ou la surface est proportionnelle à la concentration.

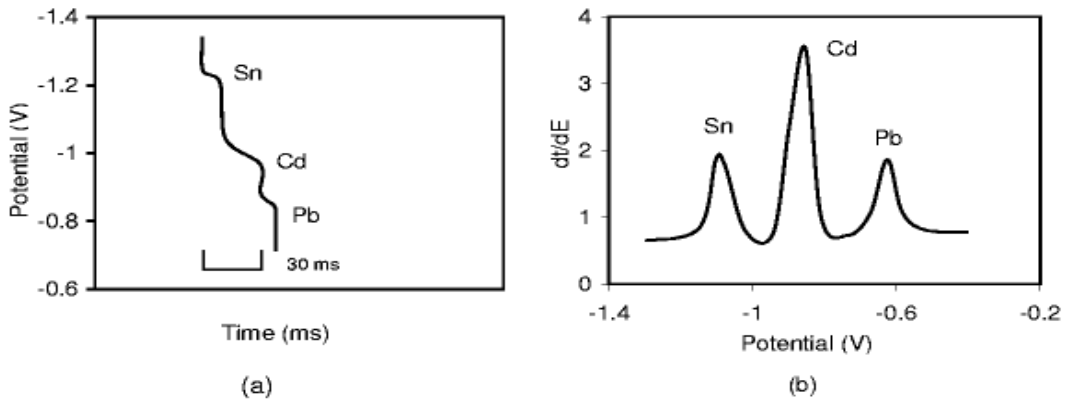
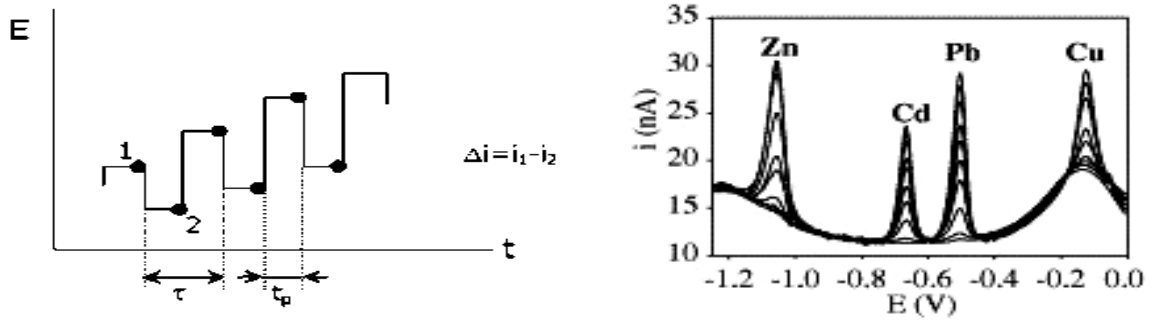


Figure 4 : Principe des mesures chronopotentiométriques (Jagner et Sweden, 1983)

En raison de l'application d'un courant lors de l'étape de redissolution, la chronopotentiométrie a l'avantage d'être beaucoup moins affectée par la présence de matière organique que les méthodes voltampérométriques (Soares et Vasconcelos, 1995 ; Town et Van Leeuwen, 2002a ; Town et Van Leeuwen, 2004 ; Town et Van Leeuwen, 2004 ; Van Leeuwen et Town, 2002). En effet le courant appliqué lors de l'étape de redissolution permet de « décrasser » le film de mercure de la matière organique adsorbée sans que celle-ci n'interfère sur le signal des métaux (pics interférents, dédoublement de pics, pics non gaussiens, etc.). Des concentrations subnanomolaires de cuivre, plomb et cadmium ont ainsi été déterminées dans des eaux naturelles (Riso *et al.*, 1997 ; Riso *et al.*, 2007). Town et Van Leeuwen ont également étudié des interactions SH – métaux avec cette méthode (Town et Van Leeuwen, 2002b ; Town et Van Leeuwen, 2004 ; Van Leeuwen et Town, 2003).

Voltampérométrie

Contrairement aux méthodes chronopotentiométriques, les méthodes voltampérométriques nécessitent le contrôle du courant (ou du potentiel) lors de l'étape de redissolution. Celle-ci est effectuée par un balayage en potentiel. La SWASV (Square Wave Anodic Stripping Voltammetry) est une méthode dite impulsionnelle : le balayage en potentiel n'est pas linéaire mais modulé par des impulsions en fonction du temps (Figure 4a). La mesure du courant en fonction du potentiel se présente sous forme de pic dont la hauteur ou la surface est proportionnelle à la concentration (Figure 4b).



(t : fréquence d'impulsion;
t_p : temps d'impulsion; • mesure de courant)

(a) **(b)**

Figure 5 : Principe de la SWASV
((a) (Monbet et Coquery, 2003) ;(b) (Buffle et Tercier-Waeber, 2005))

L'intérêt majeur de cette méthode est sa sensibilité souvent supérieure aux autres techniques électrochimiques (Buffle et Tercier-Waeber, 2005). Une limite de détection de 100 pmol.l^{-1} pour le cuivre et de 50 pmol.L^{-1} pour le plomb et le cadmium ont été ainsi obtenues pour des temps de dépôt de 10 min. (Pei *et al.*, 2000). La caractérisation d'interaction MOD–métaux a également été effectuée avec cette méthode (Cheng et Allen, 2006 ; Cheng *et al.*, 2005 ; Lam *et al.*, 2001). En effet, elle permet de mesurer les concentrations labiles (métaux libres et faiblement complexés) et totales (après minéralisation) en métaux à l'état de traces dans un milieu naturel, et ainsi de déterminer la fraction de métal complexé par des ligands organiques, complexes qui sont le plus souvent électrochimiquement "inertes" donc non-détectés à la mesure.

La voltampérométrie et la chronopotentiométrie permettent donc de mesurer, grâce à la formation d'un amalgame sur une goutte ou un film de mercure lors d'une étape de préconcentration, une intensité de courant proportionnelle à la concentration en métal labile (Cu, Pb, Cd, etc.) (Bard et Faulkner, 1983). Ces techniques permettent de déterminer simultanément les concentrations en Cd, Pb et Cu labiles, elles peuvent donc être a priori utilisées pour étudier des phénomènes de compétition entre ces métaux traces. Par contre, le nombre de métaux analysables est relativement limité. On rassemble généralement sous le terme de métal labile, le métal libre et l'ensemble des complexes métalliques électrochimiquement labiles à la goutte, i.e. par approximation l'ensemble des hydroxydes et des complexes inorganiques: $CdCl_2$, $CdCO_3$, etc. (Pizeta et Branica, 1997 ; Wang, 1985) mais aussi de certains complexes organiques (Town, 1998 ; Town et Van Leeuwen, 2004 ; Van Leeuwen, 2001). La difficulté d'interpréter cette labilité (tout comme la technique DGT) rend alors difficile et imprécis toutes interprétations des interactions MOD-métaux en termes de constante de stabilité.

AGNES : Absence of Gradient and Nernstian Equilibrium Stripping

AGNES est une nouvelle technique électroanalytique par redissolution spécifiquement destinée pour la détermination de la concentration en métal libre présent dans une solution (Companys *et al.*, 2005 ; Companys *et al.*, 2007b ; Domingos *et al.*, 2008 ; Galceran *et al.*, 2004 ; Galceran *et al.*, 2007 ; Huidobro *et al.*, 2007). Le fait qu'elle permet de déterminer

l'ion libre présent en solution et non plus le métal labile en fait une méthode particulièrement attractive pour l'étude de la complexation des métaux. Comme les techniques de redissolution, elle est réalisée au moyen de 2 étapes (Figure 6):

- une étape de préconcentration : un potentiel E_1 plus négatif que le potentiel rédox du couple du métal étudié est appliqué pendant un temps t_1 terminé par une période sans agitation t_w. Cette étape diffère des autres techniques par l'atteinte d'un équilibre Nernstien (Companys *et al.*, 2005)
- une étape de redissolution : un potentiel beaucoup plus positif que le potentiel rédox du couple du métal étudié est appliqué pendant un temps t_2 où la mesure du courant est réalisée.

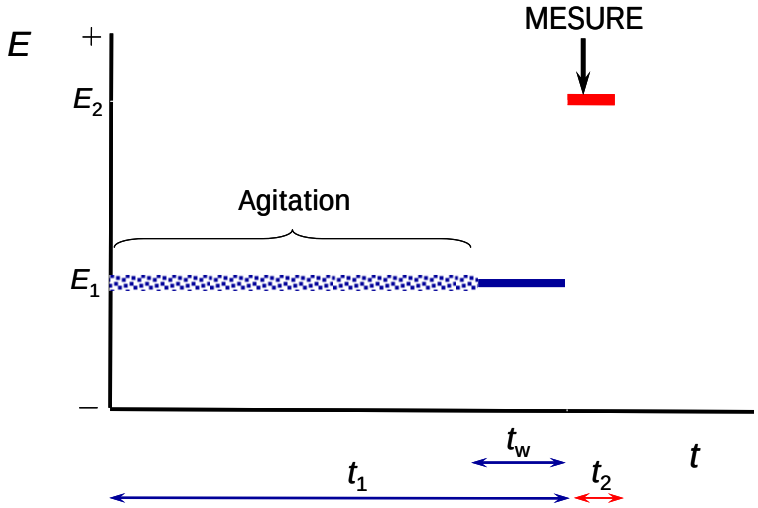


Figure 6 : Schéma du programme simple de potentiels d'AGNES

Cette nouvelle technique a été appliquée pour l'analyse du zinc libre en mer méditerranée (Galceran *et al.*, 2007) ainsi qu'à l'étude de la complexation du zinc et du cadmium par des acides humiques (Companys *et al.*, 2007b). Elle a ainsi permis de déterminer des constantes et capacité de complexation pour le zinc et cadmium similaires à celles obtenus par électrode sélective.

AGNES: principe

Première étape : Absence of gradient and Nernstian equilibrium

Atteinte de l'équilibre

Cet équilibre est réalisé entre la solution étudiée, qui contient un métal dont la forme réduite forme un amalgame avec le mercure, et une électrode de mercure dont le volume est très faible en comparaison de la solution. Un potentiel est appliqué de sorte que la réduction du métal présent dans la solution ait lieu.

$$\mathrm{M} + n\mathrm{e}^- \rightarrow \mathrm{M}^0(\mathrm{Hg}) \qquad \textbf{Équation 13}$$

Si le potentiel appliqué, E_1, est plus négatif de quelques millivolts que le potentiel rédox standard du métal considéré et qu'il est maintenu durant un temps suffisamment long, t_1, en agitant durant t_1-t_w et sans agitation durant le temps de repos, t_w, une situation d'équilibre sera

atteinte où le flux de métal sera nul. Les concentrations en métal de chaque côté de la surface de l'électrode sont alors reliées par un équilibre Nernstien :

$$Y = \frac{c^*_{M^0}}{c^*_M} = \exp\left[-\frac{nF}{RT}\left(E_1 - E^{0'}\right)\right] \qquad \textbf{Équation 14}$$

où $E°'$ est le potentiel formel standard du couple rédox, $c^*_{M^0}$ la concentration finale en métal réduit à l'intérieur de l'électrode dont l'accumulation dépend uniquement de la concentration au sein de la solution qui est notée c^*_M, n est le nombre d'électrons échangés par le couple rédox, F la constante de Faraday, R la constante des gaz parfaits, T la température du système et Y est le facteur de préconcentration. Cette équation montre ainsi qu'on peut contrôler, au moyen de la différence de potentiel, le facteur de préconcentration, tout en étant indépendant des caractéristiques du milieu comme la complexation ou l'adsorption à la surface de l'électrode.

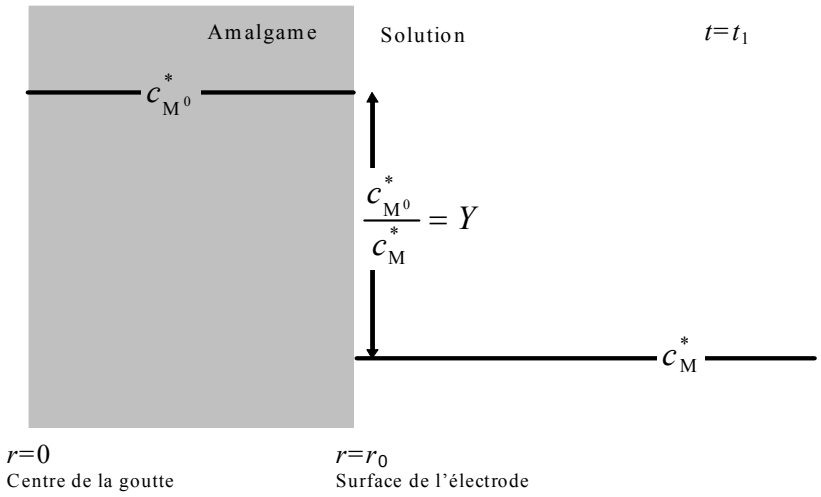


Figure 7 : Schéma des profils des concentrations métalliques dans l'électrode et la solution à la fin de première étape de concentration (absence de gradient et relation des concentrations, *Y*, à l'interface)

Deuxième étape : Stripping

La deuxième étape d'AGNES est la quantification du métal préconcentré $M°$ dans l'électrode de mercure. Dans l'implémentation la plus simple un potentiel de réoxydation est appliqué, E_2, dans des conditions limites de diffusion pour la réoxydation. C'est pourquoi, le schéma des profils des concentrations (Figure 8) est inversé entre l'électrode et la solution au moment de la mesure du courant.

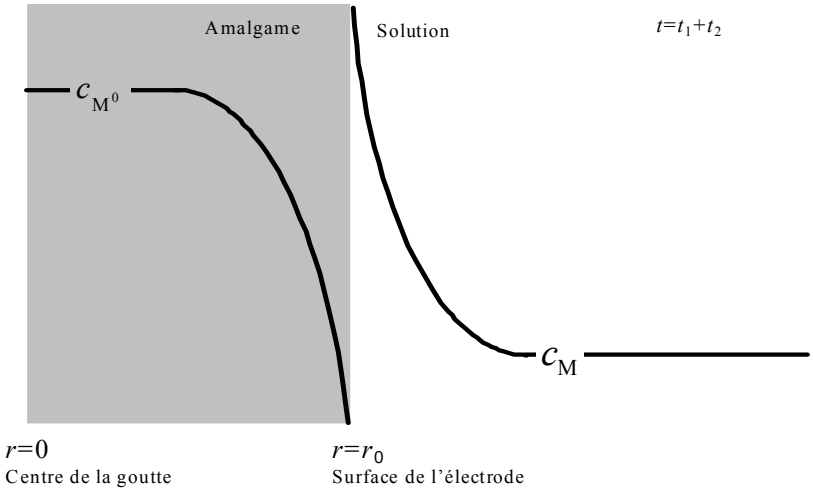


Figure 8 : Schéma des profils des concentrations de métal dans l'électrode et la solution au moment de la mesure du courant (t_2) dans l'étape 2 d'AGNES

Le potentiel appliqué dans cette deuxième étape doit être suffisamment positif pour qu'existent des conditions de limites de diffusion, de telle manière que : $c^0_{M^0} = 0$, et que le courant faradique ne se trouve pas affecté par les phénomènes qui peuvent arriver dans la solution comme la complexation, l'adsorption ou la convection. Le courant faradique final est la résultante de la soustraction du courant mesuré dans la solution étudiée et du courant mesuré dans un blanc (solution identique sans ajout de métal. Le courant faradique est finalement indépendant des caractéristiques de la dissolution.

$$I_f = I - I_b \qquad \textbf{Équation 15}$$

Cette intensité faradique est directement rattachée à la concentration en métal réduit $c^*_{M^0}$ à la fin de la première étape, grâce à la nature linéaire de l'équation de diffusion du métal c_{M^0} à l'intérieur de l'électrode de mercure. La relation entre l'intensité faradique et la concentration en métal réduit de l'amalgame existe seulement lorsque l'état de flux stationnaire, noté η, est atteint, et dépend seulement des propriétés de diffusion du métal M^o dans l'amalgame (i.e. de la forme et de la taille de l'électrode, du coefficient de diffusion D_{M^0} et du temps de mesure t_2).

$$I_f = \eta c^*_{M^0} \qquad \textbf{Équation 16}$$

Au final, le processus unique à tenir en compte est la diffusion de l'espèce réduite M° conformément à l'équation suivante :

$$\frac{\partial c_{M^0}}{\partial t} = D_{M^0}\left(\frac{\partial^2 c_{M^0}}{\partial r^2} + \frac{2}{r}\frac{\partial c_{M^0}}{\partial r}\right) \qquad \textbf{Équation 17}$$

Le temps auquel la mesure est réalisée dans l'étape de réoxydation doit répondre à deux intérêts opposés :

- des valeurs courtes de t_2 donnent lieu à de plus grands courants, permettant d'accéder ainsi à des concentrations en métal libre plus faibles

- au contraire, des valeurs courtes de t_2 se trouvent plus affectées par le courant capacitif (courant interférant lié aux conditions expérimentales, i. e. la présence d'oxygène, etc.)

Galceran *et al.*, (2004) ont montré que l'utilisation d'un temps t_2 = 0,2 s était le meilleur compromis entre une bonne sensibilité et un courant capacitif le plus faible possible.

II.1.5. Modélisation des propriétés de complexation de la MOD

L'interprétation des résultats obtenus par l'analyse des interactions entre la MOD et les métaux traces (et les cations majeurs ou le proton), repose généralement sur l'élaboration d'un modèle théorique de la MOD. Ce dernier est indispensable par la suite pour correctement représenter le rôle de la MOD vis-à-vis notamment des métaux traces, en vue d'une prévision de l'impact de ces éléments dans un milieu donné. L'amélioration des techniques analytiques utilisées a permis d'accroître considérablement la gamme d'interactions observables. Ceci a nettement complexifié la mise au point d'un modèle unique de MOD permettant de reproduire l'ensemble de ces propriétés. Différentes approches ont été et sont encore développées afin d'appréhender les caractéristiques de la MOD. Ces modèles de MOD peuvent être rassemblés en deux catégories distinctes:

- approche discrète, i.e. représentation de la MOD par des groupes de sites, chacun caractérisé par des propriétés d'affinité avec le proton et les métaux différentes (Garnier *et al.*, 2004b ; Lu et Allen, 2002 ; Masini *et al.*, 1998 ; Sposito, 1981 ; Tipping, 1993 ; Tipping et Hurley, 1992),

- approche continue, i.e. représentation de la MOD par un continuum de propriétés à l'aide d'une ou plusieurs fonctions de type $\log(L_T) = f(\log(K))$ (L_T : densité de sites, K: constante de complexation ou d'acidité) (Altmann et Buffle, 1988 ; Benedetti *et al.*, 1996b ; Buffle *et al.*, 1990 ; Christensen et Christensen, 2000 ; De Wit *et al.*, 1991 ; De Wit *et al.*, 1990 ; Gamble, 1970 ; Gamble *et al.*, 1980. ; Kinniburgh *et al.*, 1996 ; Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Koopal *et al.*, 2005 ; Nederlof *et al.*, 1990 ; Perdue et Lytle, 1983 ; Shuman *et al.*, 1983 ; Thakur *et al.*, 1980).

II.1.5.1. Problématique

Dans les systèmes aquatiques naturels, la spéciation dissoute des métaux traces (Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn, etc.) est dépendante d'un grand nombre de paramètres physiques (température, pression, etc.) et chimiques (pH, force ionique, concentrations en éléments majeurs, ligands complexants, etc.). Parmi tous ces facteurs, les groupements complexants (ou sites) présents sur une MOD ont un rôle prépondérant puisqu'ils peuvent complexer fortement les métaux et donc modifier leurs formes chimiques dominantes, donc leur réactivité vis-à-vis de l'écosystème. L'origine, la structure, la composition et les propriétés physiques et chimiques de la MOD sont très hétérogènes et souvent évolutives. Les MOD complexantes regroupent donc aussi bien des molécules de structures et de réactivités simples, présentant peu de groupements fonctionnels, que des macromolécules de grande taille, possédant une densité forte en sites potentiellement complexants, de propriétés très variées. La caractérisation des MOD n'est donc a priori pas aisée. Pour autant, elle est indispensable afin de correctement quantifier l'impact des métaux traces et de bien d'autres contaminants (hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides, etc.), souvent toxiques pour le milieu. Ainsi, il a été montré que le cuivre est complexé à hauteur d'au moins 95% par la MOD dans les eaux naturelles, aussi bien marines que douces (Antelo *et al.*, 1998 ; Cabaniss et Shuman, 1988 ; Cao *et al.*, 2004 ; Croué *et al.*, 2003 ; Rozan et Gaboury, 1999 ; Rozan *et al.*, 1999 ; Sarathy et Allen, 2005 ; Scarano *et al.*, 1992 ; Shank *et al.*, 2004 ; Town et Filella, 2000a). Le cadmium quand à lui est également complexé par la MOD dans une proportion importante en milieu de faible salinité (Lam *et al.*, 2001 ; Xue et Sigg, 1998). Mais il se décomplexe en

milieu marin au profit de complexes chlorés ($CdCl_i^{(n-1)+}$) par compétition des ions chlorures (Muller, 1996 ; Ndung'u *et al.*, 2003). De même, une variation de pH peut entraîner une complexation ou une décomplexation des métaux par la MOD (cf. §II.1.2). Il convient donc, non seulement de caractériser les propriétés de complexation de ces ligands très hétérogènes, mais aussi de prendre en compte l'influence des éléments compétiteurs. En effet, si ces derniers sont des anions (Cl^-, NO_3^-, etc.), ils peuvent complexer le métal considéré. S'ils sont des cations (H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, autres métaux, etc.) ils peuvent complexer la MOD.

Historiquement, les premières quantifications des propriétés de complexations des eaux naturelles ont été effectuées par la technique de Chau (Chau et Lum-Shue-Chan, 1974). La méthode consistait à estimer la *capacité complexante* (C_L) des échantillons. Cette dernière représente la quantité de métal masqué à l'analyse par complexation du milieu. La technique reposait donc sur l'estimation de la fraction de métal lié à la matière organique pour des ajouts croissants de métal, à l'aide d'une technique analytique adéquate, souvent par polarographie ou potentiométrie. La *capacité complexante,* déterminée par extrapolation de la partie linéaire de la courbe $[M_{mesuré}] = f([M_{ajouté}])$, représentait donc une estimation globale de concentration en ligands dans le milieu (Figure 9). Les valeurs ainsi obtenues ne peuvent donc pas être directement utilisées pour représenter la MOD, puisque elles sont dépendantes des conditions d'analyse (pH, force ionique, présences de cations et d'anions majeurs, etc.), autrement dit les constantes obtenues ne sont pas thermodynamiques mais conditionnelles.

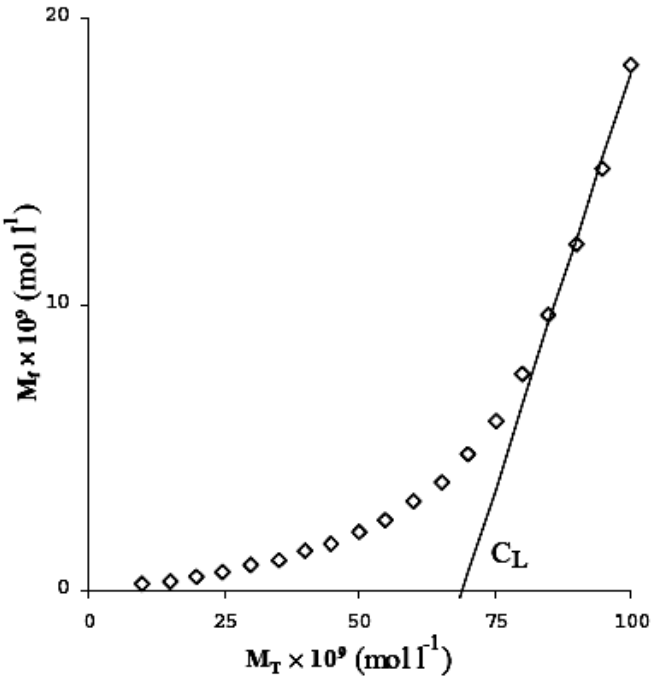


Figure 9 : Principe de la détermination de la *capacité complexante* par la méthode de Chau

Elles ont cependant été utiles pour comparer les caractéristiques d'échantillons pourvu qu'ils aient été analysés dans les mêmes conditions. Cette méthode ne permet cependant pas d'estimer la constante de complexation associée aux sites analysés.

Pour ce faire, d'autres techniques dites de linéarisation ont ensuite été développées (Buffle, 1981 ; Ruzic, 1982 ; Scatchard, 1949 ; Van den Berg, 1982, 1984). Elles sont basées sur une étude théorique des équilibres de complexation (1:1) mis en jeu et permettent une transformation mathématique des courbes expérimentales suivie de leur linéarisation. Leur utilisation a conduit à la détermination des paramètres de complexation (concentration en

sites, constante de complexation) de 1 ou 2 ligand(s) à partir de la linéarisation des données expérimentales transformées mathématiquement. A l'heure actuelle ces techniques sont encore utilisées dans de nombreuses études (Abate et Masini, 2002 ; Muller, 1996, 1999 ; Plavsic *et al.*, 2007 ; Plavsic *et al.*, 2008 ; Qiu *et al.*, 2007 ; Rozan *et al.*, 1999 ; Xue et Sigg, 1998). En effet, leur principal avantage est qu'elles sont simples d'utilisation et qu'elles ne nécessitent pas d'outil informatique très élaboré. Toutefois, elles sont moins efficaces que des approches plus récentes de fitting non-linéaire des données expérimentales, sans transformation mathématique, comme cela sera démontré ultérieurement. Elles ne permettent pas de déterminer plus de deux classes de ligands, ce qui peut parfois être insuffisant pour représenter la MOD. De plus elles prennent difficilement en compte l'influence des autres éléments chimiques du milieu (principalement par compétition), puisqu'elles ne sont pas basées sur un calcul rigoureux de la spéciation des espèces considérées.

Concernant les propriétés d'acidité de ligands, il existe aussi plusieurs techniques "simples". Celles-ci sont basées soit sur une linéarisation des données expérimentales, méthode de Gran (Gran, 1988), soit sur leur analyse graphique (dérivée première, dérivée seconde, méthode des tangentes). Ces techniques sont assez adaptées aux cas simples comme par exemple l'analyse d'une titration acido-basique d'un mélange de mono-acides. Par contre, elles sont inutilisables dans le cas de MOD, pour laquelle la courbe de titration ne présente pas de points d'inflexion suffisamment marqués.

De ce fait, les études actuelles visant à caractériser les interactions de matières organiques naturelles vis-à-vis des métaux traces, du proton et/ou de cations majeurs, sont basées sur l'utilisation de programmes spécifiques d'optimisation. Certains d'entre eux prennent en compte les conditions chimiques du milieu à l'aide d'un calcul de spéciation. Ce dernier permet, en théorie, de rendre "quasi-thermodynamiques" les paramètres de complexation déterminés, i.e. utilisables pour simuler la MOD étudiée dans d'autres programmes de spéciation des métaux. Les approches sont toutefois différentes s'il s'agit d'une modélisation discrète ou continue des propriétés de la MOD.

II.1.5.2. Représentation des propriétés de la MOD

De par l'hétérogénéité des macromolécules constituant la MOD, les propriétés de complexations ou d'acidité sont très variées et variables suivant les conditions physicochimiques du milieu. De ce fait, réduire ces propriétés à seulement une ou deux classe(s) de ligands (comme c'est le cas pour les techniques de linéarisation) peut sembler hasardeux ou tout au moins trop restrictif pour correctement simuler le comportement de la MOD. Il a donc été nécessaire de développer différents modèles de MOD visant à simuler ces propriétés. Comme la structure exacte des constituants chimiques de la MOD est inconnue à hauteur d'au moins 80 %, il est presque impossible de la représenter par des molécules organiques simples, de caractéristiques connues. La plupart des simulations de la MOD la représente donc par un ensemble de classes ou groupes de ligands "virtuels", donc de structure chimique non définie, caractérisés par une ou plusieurs propriétés. Ces modèles peuvent être regroupés en deux catégories principales : l'approche continue et l'approche discrète.

II.1.5.3. Approche discrète

L'approche discrète de la complexation d'une MOD repose sur la modélisation de ses propriétés par une distribution discrète de ligands. Cette approche peut donc être utilisée pour caractériser la complexation d'un mélange de molécules simples (EDTA, cystéine, phénol, etc.), alors qu'un modèle continu aura plus de mal à bien caractériser un tel mélange. Elle permet en plus de prendre en compte des ligands mono- ou poly-dentates, i.e. la formation de

complexes métaux - ligands (1:1) et (1:i). La probabilité qu'il y ait sur la MOD des groupements fonctionnels capables de telles complexations n'est en effet pas nulle. Mais il conviendra cependant d'étudier la possibilité de distinguer ces différentes formes de complexation à partir d'un nombre nécessairement restreint de points expérimentaux. Ces ligands sont caractérisés à l'aide de paramètres de complexation : concentration, constante de stabilité et/ou d'acidité. Plus les propriétés de complexation (ou d'acidité) d'une MOD seront complexes, plus le nombre de ligands nécessaires à une modélisation correcte des données sera élevé. Cependant, ce grand nombre de constantes peut difficilement être estimé à partir d'un jeu de données nécessairement limité par la précision et le nombre des données expérimentales, par la fenêtre analytique balayée, par les capacités d'optimisation du programme utilisé (souvent limitées à un nombre restreint de paramètres), ainsi que les interactions à modéliser (métaux traces, proton, cations majeurs, etc.). En général, le nombre de ligands utilisé est donc assez limité: 2 à 4 pour les propriétés de complexation vis-à-vis des métaux traces (Lu et Allen, 2002 ; Muller, 1996 ; Vasconcelos et Leal, 2001b), et jusqu'à 6 pour la modélisation des sites acides (Garnier, 2004 ; Masini *et al.*, 1998). La Figure 10 présente par exemple une distribution discrète de 6 ligands acides, de constantes réparties entre 4,5 et 10, donc proche des distributions discrètes utilisées pour simuler les propriétés d'acidité des MOD. Différentes techniques de traitements mathématiques sont utilisées pour calculer les valeurs des paramètres de complexations de ces ligands, à partir de l'ajustement (fitting) des données expérimentales. Ces techniques peuvent être : relativement simples comme les linéarisations (Ruzic, 1982 ; Scatchard, 1949) et sont alors limitées à 1 ou 2 ligands, ou plus complexes, utilisant alors des programmes de fitting non-linéaires tels que FITEQL (Westall, 1982). S'ils tiennent compte des interactions avec les autres éléments chimiques, ces programmes nécessitent un sous-programme de calcul de spéciation.

Bien que les ligands déterminés ne correspondent pas à une structure chimique précise, leurs caractéristiques peuvent être facilement intégrés dans les bases de données des programmes de spéciation tels que MINEQL (Westall *et al.*, 1976), MINTEQA2 (Eary et Jenne, 1992 ; Felmy *et al.*, 1984), CHESS, PHREEQC (Parkhurst *et al.*, 1980). Cette compatibilité entre le modèle discret et ces programmes de spéciation est en partie responsable de sa popularité. Néanmoins le programme VisualMINTEQ, anciennement MINTEQA2, comprend à l'heure actuelle une version du modèle continue NICA-Donnan

Quelques études ont utilisé un jeu de molécules réelles (phénol, acides salicylique, phtalique, benzoïque, etc.) pour simuler les propriétés de la MOD. Applicables à certains échantillons (Cathalifaud *et al.*, 1997), cette modélisation ne semble toutefois pas assez flexible pour représenter un grand nombre de propriétés, par rapport à des sites virtuels ne possédant pas une contrainte entre le pK_H et les valeurs de pK_M. Ainsi, une étude (Garnier *et al.*, 2004a) a montré que même si un mélange d'EDTA, d'acide acétique, de phénol et d'acide salicylique peut à peu près simuler les interactions de l'Acide Fulvique Suwannee River (SRFA) vis-à-vis du proton, il n'en est rien concernant les interactions SRFA - cadmium par exemple.

II.1.5.4. Approche continue

Ce modèle de MOD repose sur une représentation continue de ses propriétés de complexation. En effet, ces dernières étant variables presque à l'infini, il semble légitime de les représenter par un continuum. L'approche la plus rigoureuse est donc de définir pour chaque MOD, vis-à-vis de chaque élément (métal, cation majeur, proton, etc.), une courbe d'affinité, représentant les interactions analysées, de la forme :

$$\theta = f(\log(K)) \qquad \textbf{Équation 18}$$

Avec : θ : un taux d'occupation des sites de complexation ou d'acidité et K constante thermodynamique de complexation.

La modélisation de la MOD vise alors à déterminer une fonction mathématique reproduisant les variations de cette courbe, donc simulant la distribution de ligands de la MOD. Théoriquement, il n'y a pas de raison pour que cette fonction soit simple, i.e. représentable par exemple par une fonction de type gaussienne ou inverse. Dans la pratique, les données expérimentales issues d'une ou plusieurs techniques d'analyse sont rarement assez précises pour atteindre ce but. Il a été montré qu'une distribution normale de ligands pouvait être utilisée pour représenter les affinités d'une MOD (Dzombak *et al.*, 1986 ; Fish *et al.*, 1986 ; Perdue et Lytle, 1983). Cette dernière est assimilée à une surface (par exemple dans le cas d'une étude à différents pH), les interactions vis-à-vis d'un élément étant alors définies par une isotherme de type Langmuir. Pour cela, une fonction gaussienne ou deux sont utilisées. L'équation mathématique de cette distribution ne repose que sur un nombre assez limité de paramètres à optimiser (3 par fonction normale) pour simuler les données expérimentales et donc les interactions analysées. L'utilisation de ce type de modèle, au niveau où il est développé ici, est assez simple et ne requiert donc pas de logiciel très élaboré. Ainsi, ces paramètres peuvent être optimisés par exemple par le solveur présent sur les tableurs tels qu'Excel.

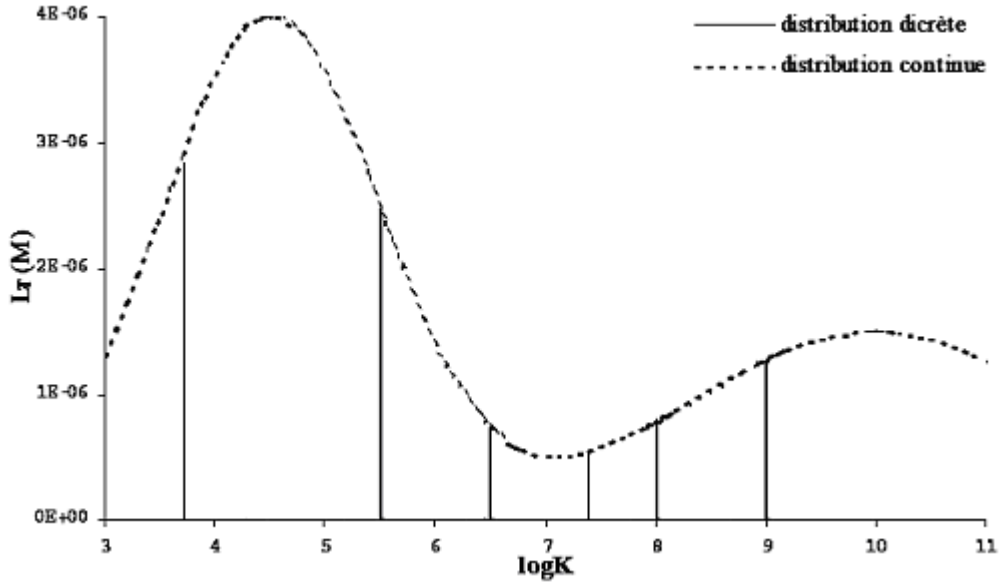


Figure 10 : Distributions discrète (6 sites) et continue (bimodales)

Une MOD sera donc représentée par plusieurs fonctions, chacune étant spécifique à un élément (Benedetti *et al.*, 1995 ; Benedetti *et al.*, 1996b ; Kinniburgh *et al.*, 1996 ; Milne *et al.*, 2001 ; Milne *et al.*, 2003 ; Ritchie et Perdue, 2003). La Figure 10 présente une distribution continue simulant les interactions entre un métal et une MOD hypothétique. Les deux fonctions gaussiennes sont respectivement centrées sur les sites de type « fort » (anciennement type « phénolique ») et de type « faible » (« carboxylique »), comme cela est souvent observé sur des MOD. La fonction bimodale de distribution utilisée est alors de la forme :

$$L_T(K) = L_{T,1}^{max} \times \exp\left(\frac{(\log K_1 - \log K)^2}{\sigma_1}\right) + L_{T,2}^{max} \times \exp\left(\frac{(\log K_2 - \log K)^2}{\sigma_2}\right)$$ **Équation 19**

Avec L_T : densité totale en sites, K: constante de complexation ou d'acidité, et σ comme paramètre d'hétérogénéité.

II.1.5.5. Modèle continu : modèle NICA-Donnan

Le modèle NICA (Non Ideal Competitive Adsorption)-Donnan a été intensément appliqué à des phénomènes de complexation hétérogènes, fournissant des résultats satisfaisants tant au niveau de la modélisation de la complexation que de la prédiction des effets de force ionique et de compétition entre différents ions présents en solution, étudiés largement par potentiométrie (Christl et Kretzschmar, 2001 ; Christl *et al.*, 2005 ; Kinniburgh *et al.*, 1999 ; Pinheiro *et al.*, 1999, 2000) mais aussi par voltampérométrie (Benner et Opsahl, 2001 ; Berbel *et al.*, 1998 ; Pinheiro *et al.*, 1999).

La complexation des cations par des systèmes macromoléculaires est régie par des interactions spécifiques entre les cations et les groupements fonctionnels en surface chargés négativement ainsi que l'interaction électrostatique non spécifique avec les charges négatives résiduelles. Le modèle NICA-Donnan est donc la combinaison de deux modèles : la complexation avec des sites spécifiques étant décrite par le modèle NICA et l'interaction avec des sites non spécifiques (de type électrostatique) par le modèle Donnan.

II.1.5.5.1. Modèle NICA

L'obtention des isothermes NICA est souvent réalisée en supposant une complexation monodentate, c'est-à-dire un cation par site. L'isotherme locale considérée est celle d'Henderson-Hasselbalch :

$$\theta_i = \frac{\left(\tilde{K}_i c_i\right)^{n_i}}{1 + \sum_j \left(\tilde{K}_j c_j\right)^{n_j}}$$ **Équation 20**

où θ est le taux d'occupation des sites, c la concentration et n_i et n_j sont les paramètres qui caractérisent l'hétérogénéité des macromolécules. Il en résulte l'adsorption non idéale compétitive (NICA) (Koopal *et al.*, 1994) :

$$\theta_i = \frac{\left(\tilde{K}_i c_i\right)^{n_i}}{\sum_j \left(\tilde{K}_j c_j\right)^{n_j}} \frac{\left(\sum_j \left(\tilde{K}_j c_j\right)^{n_j}\right)^p}{1 + \left(\sum_j \left(\tilde{K}_j c_j\right)^{n_j}\right)^p}$$ **Équation 21**

où p est le paramètre de largeur de la distribution (dit aussi paramètre de Sips). Les exposants n_i et n_j ($0 < n \leq 1$) sont spécifiques à l'ion étudié et tiennent compte de l'environnement non idéal. p ($0 < p \leq 1$) représente l'hétérogénéité intrinsèque et est commun à tous les cations. La distribution d'affinité, c'est-à-dire la distribution des constantes de complexation correspondant à l'isotherme NICA (avec n = 1/2 et p = 1/2) est représentée Figure 11, par des lignes de contour. L'élongation autour de la diagonale est due à une corrélation large de cette isotherme.

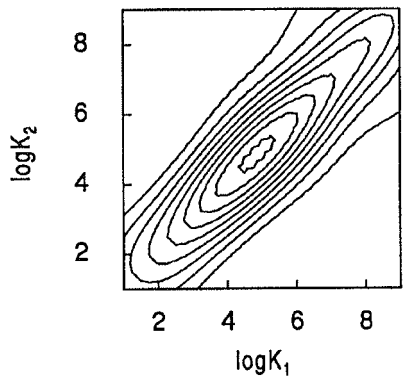


Figure 11 : Distribution d'affinité correspondant aux isothermes NICA (Rusch *et al.*, 1997) avec pour paramètres n1 = n2 = 1/2, p = 1/2 et $\tilde{K}_1 = \tilde{K}_2 = 10^5$ (équation 2-23)

Les données de complexations du proton avec les substances humiques (acides fulviques et humiques) sont consistantes avec une distribution bimodale de l'affinité du proton (Milne *et al.*, 1995). Ces deux distributions ont été initialement attribuées aux sites phénoliques et carboxyliques et désormais dénommés sites forts et sites faibles principalement dû à la présence possible d'autres groupements non négligeables de types alcools, éthers, amines, amides, etc. (Companys, 2003 ; Croué *et al.*, 2003). Pour éviter une incohérence thermodynamique (Kinniburgh *et al.*, 1999) et inclure le caractère bimodal, l'équation NICA développée pour les substances humiques peut être écrite de la manière suivante :

$$Q_i = Q_{\max 1} \frac{n_{i,1}}{n_{\mathrm{H},1}} \frac{\left(\tilde{K}_{i,1} c_{\mathrm{D},i}\right)^{n_{i,1}}}{\sum_j \left(\tilde{K}_{j,1} c_{\mathrm{D},j}\right)^{n_{j,1}}} \frac{\left(\sum_j \left(\tilde{K}_{j,1} c_{\mathrm{D},j}\right)^{n_{j,1}}\right)^{p_1}}{1+\left(\sum_j \left(\tilde{K}_{j,1} c_{\mathrm{D},j}\right)^{n_{j,1}}\right)^{p_1}} + Q_{\max 2} \frac{n_{i,2}}{n_{\mathrm{H},2}} \frac{\left(\tilde{K}_{i,2} c_{\mathrm{D},i}\right)^{n_{i,2}}}{\sum_j \left(\tilde{K}_{j,2} c_{\mathrm{D},j}\right)^{n_{j,2}}} \frac{\left(\sum_j \left(\tilde{K}_{j,2} c_{\mathrm{D},j}\right)^{n_{j,2}}\right)^{p_2}}{1+\left(\sum_j \left(\tilde{K}_{j,2} c_{\mathrm{D},j}\right)^{n_{j,2}}\right)^{p_2}}$$

Équation 22

où les indices 1 et 2 réfèrent respectivement aux sites forts et sites faibles. Q_i est le nombre total de composants *i* lié aux macromolécules en mol.kg^{-1}, Q_{max} le nombre de sites en mol.kg^{-1}, $\tilde{K}_j$ est la constante d'affinité médiane pour chaque composant *j*, et c_{Dj} est la concentration locale de *j* à proximité des sites de complexation en mol.l^{-1}. Les différentes sommes sont réalisées sur tous les composants *j* (incluant *i*). Ceci inclut le proton et tous les métaux présents. L'effet électrostatique est incorporé dans le modèle NICA en utilisant la concentration des ions à proximité des sites de complexation (pris en compte à travers le modèle Donnan cf. §II.1.5.5.2) plutôt que les concentrations dans la solution, i.e. le « bulk ».

Le paramètre le plus fréquemment mesuré expérimentalement est la quantité totale d'ion métallique lié aux macromolécules $Q_{\mathrm{M}_i\mathrm{T}}$ (en mol.kg^{-1}), qui est égale à la somme des quantités de métal complexé spécifiquement et lié à la phase Donnan :

$$Q_{\mathrm{M}_i\mathrm{T}} = Q_{\mathrm{M}_i} + V_{\mathrm{D}}\left(c_{\mathrm{D},i} - c_i\right) \qquad \textbf{Équation 23}$$

Si, seuls, des protons sont présents en solution avec un électrolyte indifférent, le modèle NICA est réduit au double modèle Langmuir-Freundlich (Koopal *et al.*, 1994 ; Milne *et al.*, 1995).

$$Q_{\mathrm{H}} = Q_{\max 1}\frac{\left(\tilde{K}_{\mathrm{H,1}}c_{\mathrm{D,H}}\right)^{m_{\mathrm{H,1}}}}{1+\left(\tilde{K}_{\mathrm{H,1}}c_{\mathrm{D,H}}\right)^{m_{\mathrm{H,1}}}} + Q_{\max 2}\frac{\left(\tilde{K}_{\mathrm{H,2}}c_{\mathrm{D,H}}\right)^{m_{\mathrm{H,2}}}}{1+\left(\tilde{K}_{\mathrm{H,2}}c_{\mathrm{D,H}}\right)^{m_{\mathrm{H,2}}}} \qquad \textbf{Équation 24}$$

Dans l'équation 24, le paramètre d'hétérogénéité m_H décrit l'effet combiné de n_H et p ($m_H = n_H.p$).

Le schéma général pour obtenir les différents paramètres du modèle NICA pour un jeu de données multicomposantes telles que l'adsorption du proton et des ions métalliques, est décrit par Benedetti *et al.*, (1995). Brièvement la procédure est la suivante : les courbes principales (obtenue après corrections électrostatiques avec les titrations protons réalisées à différentes forces ioniques) sont utilisées pour obtenir les valeurs des paramètres de l'équation 2-26 : Q_{max1}, Q_{max2}, $\tilde{K}_{\mathrm{H,1}}$, $\tilde{K}_{\mathrm{H,2}}$, $m_{\mathrm{H,1}}$, $m_{\mathrm{H,2}}$. Ces valeurs sont aussi supposées applicables en présence d'autres cations. Le caractère compétitif du modèle NICA requiert la supposition que $Q_{maxH} = Q_{max,i}$ où i est l'ion métallique. Les valeurs des 6 paramètres additionnels pour l'ion métallique (p_1, p_2, $\tilde{K}_{\mathrm{M,1}}$, $\tilde{K}_{\mathrm{M,2}}$, $n_{\mathrm{M,1}}$, $n_{\mathrm{M,2}}$) sont alors obtenues des isothermes d'adsorption de l'ion métallique à différentes valeurs de pH. Il est supposé que le volume Donnan (décrit ci dessous §II.1.5.5.2) n'est pas affecté par l'adsorption des ions métalliques. Si, et seulement si cette condition est remplie, il est possible d'utiliser le volume Donnan mesuré pour modéliser la complexation des ions métalliques.

II.1.5.5.2. Modèle Donnan

Dans l'approche Donnan, les macromolécules polyélectrolytes sont considérées comme un gel électriquement neutre occupant un certain volume au sein duquel existe un potentiel moyen uniforme nommé potentiel Donnan, ψ_{D} , par rapport à la solution. Certes, un tel concept est sans aucun doute idéaliste, mais il n'est cependant pas entièrement inexact (Companys, 2003).

Pour un modèle Donnan simple, on peut supposer que pour chaque charge, l'électroneutralité de toute la phase gel est entièrement préservée par pénétration de sels dans cette phase gel.

L'électroneutralité de la phase gel s'écrit alors :

$$Q/V_{\mathrm{D}} + \sum z_j\left(c_{\mathrm{D},j} - c_j\right) = 0 \qquad \textbf{Équation 25}$$

où Q est la charge nette de la macromolécule, V_D est le volume Donan du gel, $c_{D,j}$ est la concentration des composants j ayant une charge z_j (incluant le signe de la charge) dans le volume Donnan et c_j leur concentration dans la solution, lesquelles sont reliées par le facteur de Boltzmann (χ) :

$$c_{\mathrm{D},j} = c_j\chi^{z_j} = c_j\left(\exp(-e\psi_{\mathrm{D}}/k_{\mathrm{B}}T)\right)^{z_j} \qquad \textbf{Équation 26}$$

En présence d'un électrolyte 1:1 (AB, dont la concentration est c_S), les conditions d'électroneutralité sont :

$$\frac{Q}{V_{\mathrm{D}}} = c_{\mathrm{DA^+}} - c_{\mathrm{DB^-}} + c_{\mathrm{DH^+}} - c_{\mathrm{DOH^-}} \qquad \textbf{Équation 27}$$

Si les pH n'atteignent pas des valeurs trop hautes ni trop basses, alors $c_{\mathrm{DH^+}}$ et $c_{\mathrm{DOH^-}}$ peuvent être négligées et la combinaison des équations précédentes peut se réduire à :

$$\frac{Q}{V_D} = c_s\left(\chi - \frac{1}{\chi}\right) \qquad \textbf{Équation 28}$$

ou alors:

$$\chi^2 + \left(-Q/V_D c_s\right)\chi - 1 = 0 \qquad \textbf{Équation 29}$$

Cette dernière équation possède seulement une solution physiquement réelle puisque χ doit être positif.

L'approche Donnan, comme présentée ci-dessus, requiert que V_D soit connu dans un très grand nombre de conditions pour obtenirχ. Différentes procédures ont été utilisées pour estimer ce volume Donnan.

Des techniques expérimentales telles que la viscosimétrie et la dispersion de lumière de diffusion (diffusion light scattering) (Avena *et al.*, 1999 ; Benedetti *et al.*, 1996a ; Vermeer, 1996) ont été appliquées pour mesurer des volumes spécifiques de gels. Cependant ces techniques ne permettent pas toujours d'obtenir des résultats cohérents d'une technique à l'autre (Avena *et al.*, 1999).

Des volumes Donnan opérationnels sont aussi largement utilisés pour caractériser la complexation du proton aux macromolécules (spécialement pour les substances humiques). De cette façon, une expression pour V_D est supposée : les paramètres de cette expression sont déterminés en utilisant comme critère la fusion des courbes Q versus pH aux différentes forces ioniques en une unique courbe (« master curve »), Q versus pH_D (pH dans la phase Donnan). L'aspect critique de cette procédure est résumé par la question suivante : Comment varie le volume Donnan lors des modifications de la solution ? Pour les substances humiques, Benedetti *et al.*, (1996) concluent que le volume Donnan est très sensible aux variations de forces ioniques, V_D n'apparaissant pas varier de façon importante aux changement de pH. Bien qu'il n'y ait pas suffisamment de données pour dire comment V_D varie avec la concentration d'un métal spécifiquement lié tel que Cu^{2+}, un article (Kinniburgh *et al.*, 1996) a supposé qu'il ne variait pas significativement. Cette supposition est probablement raisonnable pour des concentrations métalliques à l'état de traces; lorsque la surface couverte par le métal est faible. En revanche elle est très probablement fausse pour de fortes teneurs en métaux lorsque des réductions de charge significatives prennent place et que des changements macroscopiques telle que la floculation peuvent être observés. La variation du volume Donnan avec la force ionique, I, pour des substances humiques variées, est supposée suivre la relation empirique suivante :

$$\log V_D = b(1 - \log I) - 1 \qquad \textbf{Équation 30}$$

où le coefficient b varie avec le type de substances humiques.

Récemment une équipe (Companys *et al.*, 2007a) a proposé une nouvelle expression pour le volume Donnan, basée sur la combinaison du formalisme du modèle Donnan avec les résultats de l'équation non linéaire de Poisson Boltzmann (NLPB). De cette manière, l'expression très générale du volume Donnan est supposée reproduire les résultats obtenus avec NLPB pour un large panel de substances polyélectrolytiques, homogènes ou hétérogènes, linéaires ou ramifiés (planes, cylindrique ou sphérique) et probablement de géométrie et de densité de charge intermédiaire à ces trois géométries. Le point de départ est la combinaison de l'équation d'électroneutralité (équation 27) avec celle de Boltzmann (équation 26).

$$V_D = \frac{zQ}{2I\sinh(z\tilde{\psi}_D)} \qquad \textbf{Équation 31}$$

où z est la valence du couple électrolyte support. Dans le but d'étudier la complexation spécifique il est nécessaire de connaître la concentration locale qui est donnée pour le modèle Donnan par l'équation 2-17 et pour le modèle Boltzmann :

$$c_{H_S} = c_H \exp(-\tilde{\psi}_S) \qquad \textbf{Équation 32}$$

où c_{H_S} indique la concentration du proton à la surface de la macromolécule. Pour obtenir les résultats obtenus avec NLPB avec le formalisme Donnan, il est alors nécessaire d'identifier le potentiel Donnan recherché $\tilde{\psi}_D$ dans l'équation 31 avec le potentiel de surface sans dimension donné par l'équation NLPB, $\tilde{\psi}_S$. Comme la force électrostatique s'écrit $z\tilde{\psi}$, avec $\tilde{\psi} = \tilde{\psi}_S$ dans NLPB et $\tilde{\psi} = \tilde{\psi}_D$ dans le modèle Donnan, avec cette identification il est possible de trouver le potentiel Donnan qui mène à la même liaison électrostatique correspondant à la description NLPB. Une fois cette identification réalisée, la relation entre la charge de surface et le potentiel de surface est disponible dans la littérature pour différentes géométries parmi lesquelles l'approche NLPB peut être utilisée dans l'équation 31 afin d'obtenir une expression du volume Donnan fonction uniquement de la charge macromoléculaire et de la force ionique.

Historiquement, une autre approche a été développée pour appliquer le concept Donnan (Marinsky, 1992 ; Marinsky et Reddy, 1991 ; Miyajima, 1995) pour des polyélectrolytes linéaires :

$$\Delta \mathrm{p}K \equiv \mathrm{p}K_{\mathrm{app}} - \mathrm{p}K_{\mathrm{c}}^{-1} = -\log\left(\frac{c_{\mathrm{H_D}}}{c_{\mathrm{H_b}}}\right) \qquad \textbf{Équation 33}$$

où pK_{app} indique la constante de dissociation apparente, $\Delta \mathrm{p}K$ tient compte de la correction polyélectrolytique et utilise la constante de dissociation d'acidité intrinsèque, $\mathrm{p}K_{\mathrm{c}}^{-1}$ pour obtenir la concentration de proton dans la phase Donnan, $c_{\mathrm{H_D}}$. Avec la valeur $\mathrm{p}K_{\mathrm{c}}^{-1}$ obtenue par extrapolation de la courbe expérimentale pK_{app} pour $\alpha_{\mathrm{d}} = 0$, il est possible de calculer $c_{\mathrm{H_D}}$ pour chaque pK_{app} expérimental. Le potentiel Donnan peut alors être calculé d'après l'équation 24. Une nouvelle étape dans cette théorie permet d'estimer le volume Donnan par une extension du modèle dans des systèmes exempts de sels. (Miyajima, 1995) :

$$\frac{V_{\mathrm{D}}}{\alpha_{\mathrm{d}} n_{\mathrm{p}}} = \left(1 - \phi_{\mathrm{p,M}}\right)\left(10^{\Delta \mathrm{p}K} - 10^{-\Delta \mathrm{p}K}\right)^{-1} c_{\mathrm{s}}^{-1} \qquad \textbf{Équation 34}$$

où c_s est la concentration des contre-ions M^{z+} dans la solution, $\phi_{\mathrm{p,M}}$ est le coefficient osmotique pratique des contre-ions dans la phase Donnan, α_D le degré de dissociation d'une molécule et n_p est le nombre total de groupes ionisables dans la macromolécule. L'équation 32 étend le formalisme de Katchalsky *et al.*, (1966) qui montre que pour plusieurs sortes de polyélectrolytes monofonctionnels (polycarboxylates et polyvinyles) le coefficient osmotique, $\phi_{\mathrm{p,M}}$ dépend seulement de la distance entre les charges (α_{d}/b) du polyélectrolyte exempt de sels, pour chaque force ionique. Le tracé de $\phi_{\mathrm{p,M}}$ en fonction de (α_{d}/b) pour différents polyélectrolytes est reporté Figure 12. Connaissant les coefficients osmotiques expérimentaux, l'équation 34 permet d'obtenir le volume Donnan pour une force ionique fixée et un degré de dissociation du polyélectrolyte également fixé. De cette manière Marinsky (1991 et 1992) a caractérisé l'effet polyélectrolytique (sur la complexation du proton avec une substance humique PAA) à travers le modèle Donnan. Ces résultats sont en accord avec une modélisation réalisée avec NLPB (Nagasawa *et al.*, 1965). Cependant,

l'extension de cette procédure à des ligands hétérogènes n'est pas simple puisque $\mathrm{p}K_c^{-1}$ est une fonction de α_d qui fait obstacle à la détermination de $\Delta \mathrm{p}K$.

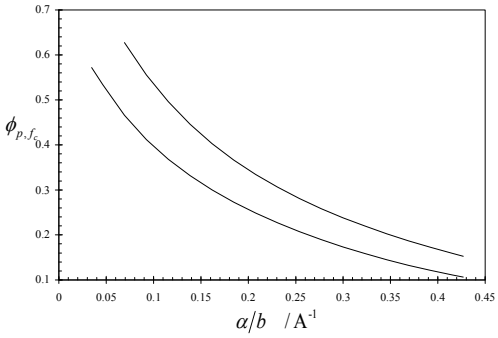


Figure 12: Coefficients osmotiques, $\phi_{p,M}$, de contre-ions dans une solution de polyélectrolytes exempte de sels en fonction de la distance réciproque entre les charges $(b/\alpha)^{-1}$ (Katchalsky *et al.*, 1966)

La courbe du haut est basée sur des données obtenues pour des dérivés de cellulose (méthylcarboxylate de cellulose de sodium, sulfate de cellulose de sodium, et alginate de sodium); la courbe du bas est basée sur des résultats obtenus pour polyacrylate de sodium, polyméthacrylate de sodium, polyvinylsulfate de sodium, et phosphate de sodium.

II.1.6. Conclusions bibliographiques

De nombreux modèles ont été développés afin de simuler les propriétés de complexation des matières organiques naturelles vis-à-vis des métaux traces et/ou du proton. Leur complexité est dépendante du nombre d'interactions qu'ils sont susceptibles de modéliser. Elle se traduit par un nombre plus ou moins important de paramètres de complexations et/ou d'acidité, une des principales limitations étant la qualité et la quantité de données expérimentales, mais aussi les capacités d'optimisation du programme d'ajustement (« fitting ») utilisé. Un des problèmes principaux de l'étude des propriétés complexantes et/ou d'acidité de matières organiques naturelles est l'obtention de paramètres quasi-thermodynamiques, i.e. indépendants entre autres de la force ionique, des effets de compétition des cations et anions du milieu, du proton (aussi bien en terme de formation d'hydroxydes que de protonation des sites de complexation de la MOD), de la compétition des autres métaux traces. En effet, ces paramètres doivent être, autant que faire se peut, indépendants des conditions d'analyses s'ils sont destinés à être utilisés dans des bases de données comme celles des principaux programmes de spéciation, ou plus simplement comparés à ceux obtenus par d'autres techniques, dans d'autres conditions ou sur d'autres MOD. D'un point de vue analytique, ceci nécessite l'utilisation d'un grand nombre de techniques, spécifiques au proton, métaux traces, cations, etc. permettant l'analyse de l'ensemble de ces interactions avec une certaine sensibilité. En effet la plupart des études concernant les propriétés complexantes de MOD ont été réalisées à des concentrations en ligands nettement supérieures au milieu (2 ou 3 ordre de grandeurs). Les expériences doivent de plus être menées dans des conditions physico-chimiques connues et stables: cellules de mesure thermostatées, force ionique constante, concentrations en ions majeurs connues, pH mesuré, etc.. Puis, d'un point de vue modélisation, un calcul de spéciation est requis pour correctement tenir compte des formes chimiques (inorganiques et organiques) des métaux analysés. Idéalement, le modèle de complexation choisi pour simuler la MOD doit pouvoir prendre en compte simultanément l'ensemble de ces interactions.

A la suite de cette étude bibliographique, les complexations du cuivre et du plomb par les fractions de MOD précédemment extraites et caractérisées (cf. Chapitre I) seront étudiées

respectivement à l'aide des techniques analytiques suivantes : électrode ionique sélective et AGNES qui présentent l'avantage de donner une information simple et robuste : la mesure de l'ion libre. Un effort sera particulièrement porté à la concentration en ligand afin de se rapprocher au mieux des conditions environnementales. La modélisation des propriétés de complexation sera réalisée à l'aide du modèle NICA-Donnan tenant compte de l'adsorption spécifique mais aussi non spécifique. Ce modèle présente l'avantage de ne pas restreindre le nombre de type de sites complexants mais de les représenter par un continuum de propriétés tel qu'il est sans doute le cas.

II.2. MATERIEL ET METHODES

II.2.1. Interactions matière organique – proton

L'étude des interactions matières organiques – protons étant aussi une méthode de caractérisation des MOD, le protocole opératoire des titrations acido-basiques des MOD est détaillé dans le Chapitre I. Initialement les titrations ont été réalisées à deux forces ioniques différentes (0,01 et 0,1 mol.l^{-1}) afin d'étudier l'influence de la force ionique sur l'interaction non spécifique. Néanmoins ces titrations furent insuffisantes pour étudier l'interaction non spécifique. En conséquence, pour les interactions avec le cuivre, seule la complexation par les sites spécifiques a été prise en compte à la force ionique 0,1 M. Seul la deuxième méthode de traitement des données (ajustement de la charge en fonction du pH à l'aide de l'isotherme Langmuir-Freundlich) est retenue pour cette partie en raison de sa plus grande précision.

II.2.2. Interactions matière organique – cuivre

Le stand de titration utilisé pour réaliser ces dosages de cuivre est constitué des éléments suivants (Figure 13):

- deux titrateurs TITRINO 785 DMP (METROHM) associant chacun un potentiomètre (une entrée électrode de référence, deux indicatrices) à une burette automatique d'ajout (1 µl à 10 ml)
- un système d'agitation (METROHM 728)
- une cellule thermostatée à 25 ± 0,1°C en PFA (Perfluoroalkoxyéthylène, volume d'échantillon: 20 à 200mL)
- électrode de pH (METROHM)
- électrode ionique sélective cuivre (METROHM)
- électrode de référence double ponts salins $Ag_{(s)}/AgCl_{(s)}/KCl$ (3 mol.l^{-1}) (METROHM)
- contrôle de ces appareils par le logiciel TIAMO 1.2 (METROHM)

Figure 13 : Photographie du système de titration utilisé pour l'étude de la complexation du cuivre

L'eau utilisée est une eau déionisée ultrapure (ρ = 18,2MΩ). Les titrations des fractions de MOD ont été effectuées sous flux d'azote de qualité scientifique (Linde, pureté 6.0) et sous agitation respectivement afin d'éliminer les carbonates initialement présents et d'assurer un équilibre rapide. L'électrode de pH est régulièrement calibrée par trois solutions tampons commerciales (pH 4 ; 7 et 9, METROHM). L'électrode ionique sélective cuivre a été préalablement polie manuellement à l'aide d'une poudre d'aluminium afin de minimiser les défauts de surface pouvant perturber la mesure. Cette électrode est également calibrée régulièrement par des ajouts croissants de cuivre de type « monétaire » (1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 20 ; etc.) de 10^{-7} mol.l^{-1} à 10^{-3} mol.l^{-1} (solution standard 1000 ppm Certipur®) dans 50 ml d'une solution d'acide nitrique 0,01 mol.l^{-1}.

Chaque mesure du potentiel n'est effectuée que si la variation de potentiel est inférieure à 0,05 mV.min^{-1} ou à défaut au bout de 300 s d'attente. Ces conditions limites ont permis de s'assurer que chaque mesure est réalisée une fois l'équilibre atteint. Ces conditions limites de mesures ont été utilisées pour toutes les titrations protons et cuivre.

Une régression linéaire du potentiel en fonction du logarithme de la concentration en cuivre libre (pCu^{2+}) calculée à partir du logiciel VisualMINTEQ (afin de tenir compte des complexes connus formés tels que nitrates et hydroxydes) permet d'obtenir les paramètres de conversion potentiel - pCu^{2+} (Figure 14).

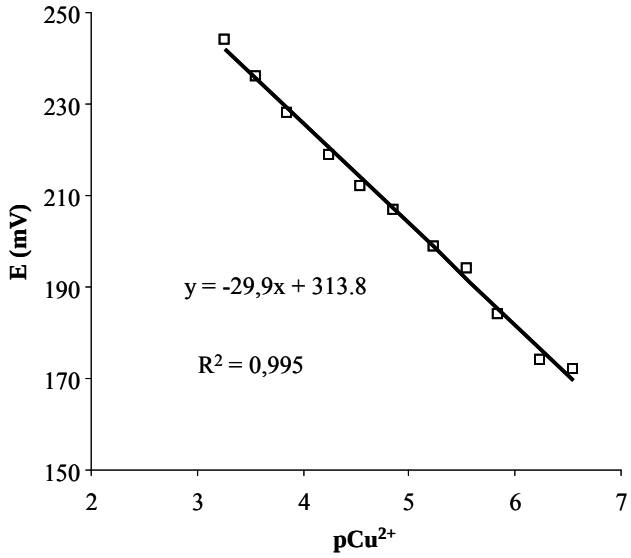


Figure 14 : Exemple de courbe obtenue pour la calibration de l'électrode ionique sélective cuivre

Avant chaque titration les ponts salins de nitrate de sodium (0,1 M) des électrodes sont changés. Les titrations sont réalisées à deux pH différents (5 et 7) dans une cellule en téflon (perfluoralkoxyéthylène, PFA) sur 50 ml d'une solution de nitrate de sodium (Suprapur) 0,1 mol.l^{-1} dopée d'une trentaine de milligrammes de MOD par litre (soit environ 15 mgC.l^{-1}) préalablement solubilisée à pH 9 pendant 12 h minimum afin d'assurer une solubilisation complète. Cette solubilisation a été initialement vérifiée par l'absence de matière en suspension visible ainsi que par une stabilisation progressive du pH. Avant le premier ajout de cuivre, la solution est ajustée et maintenue au pH désiré pendant 20 min à l'aide d'une des deux burettes automatiques par ajout de soude (0,1 mol.l^{-1}, Titrisol), ceci afin d'assurer l'équilibre de la MOD dans les conditions de pH et de force ionique étudiés. Les ajouts de cuivre sont réalisés automatiquement de la même manière que pour la calibration. Après chaque ajout de cuivre, le pH est stabilisé pendant 15 minutes. Le pH et le potentiel sont ensuite mesurés respectivement l'un après l'autre avec les conditions limites de mesures déjà

énoncées. De nombreuses études ont montré que ce temps d'attente était suffisant pour assurer l'atteinte d'un équilibre de complexation entre le cuivre et la MOD (Bruland, 1992 ; Christl *et al.*, 2005 ; Companys, 2003 ; Croué *et al.*, 2003 ; Garnier, 2004 ; Milne *et al.*, 2001 ; Pinheiro *et al.*, 2000 ; Violleau, 1999). De plus l'observation des mesures du pH et du potentiel après l'ajout de cuivre et la stabilisation du pH n'a pas mis en évidence une dérive significative de ces paramètres pouvant indiquer une évolution de la complexation.

Comme expliqué précédemment (§II.2.1) l'ensemble des fractions n'ayant pu être analysé à plus de trois forces ioniques différentes pour le proton, l'interaction non spécifique n'a donc pas été prise en compte ici. Les titrations par le cuivre ayant été réalisées à une force ionique de 0,1 M, seul la titration acido-basique réalisée à la même force ionique a été utilisée pour la modélisation. Néanmoins l'interaction non spécifique sera discutée à l'appui d'exemples bibliographiques.

La modélisation des données de la titration acido-basique (à 0,1 M) à l'aide de la double isotherme de Langmuir-Freundlich a permis de déterminer les paramètres d'affinité du proton pour chaque fraction. Les données issues des titrations avec le cuivre à pH 5 et 7 et à la force ionique de 0,1 M ont été traitées avec le code de spéciation VisualMINTEQ afin de soustraire la complexation due aux nitrates (sels de fonds) et aux hydroxydes. Une fois traitées, les données sont directement utilisées par le modèle NICA (logiciel FIT) avec les paramètres précédemment obtenus pour le proton afin de déterminer les paramètres d'affinité du cuivre pour chaque fraction.

II.2.3. Interactions matière organique – plomb

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration et d'un séjour d'environ 3 mois au département de chimie de l'Université de Lleida. Initialement, les interactions entre le zinc et la MOD ont été étudiées. Cependant, suite à des problèmes de reproductibilité, probablement dû à l'irréversibilité du couple Zn^{2+}/Zn dans notre système (MOD d'origine anthropique), cette étude sur le zinc a été abandonnée après un mois et demi de travaux. L'étude sur le plomb a donc ensuite été initiée pendant le reste du séjour et la suite des travaux a été reprise par deux stagiaires de l'Université de Lleida. Le choix de vouloir étudier ces interactions à des concentrations en ligands dites « environnementales » (10 – 20 $mgC.l^{-1}$) a nécessité du temps afin d'adapter ces techniques. Pour des raisons de temps, l'ensemble des fractions de MOD n'a pu être étudié dans le cadre des interactions avec le plomb. Il a donc été fait le choix de travailler sur toutes les fractions hydrophobes prélevées sur l'ensemble du bassin de la Seine ainsi que sur l'ensemble des fractions (HPO, TPI, HPI) du premier prélèvement des effluents de la station d'épuration Seine-Aval.

Le stand de titration utilisé pour réaliser ces dosages de plomb est constitué des éléments suivants:

- d'un système METROHM VA 663 constitué d'une électrode de référence double pont ($Ag_{(s)}/AgCl_{(s)}/KCl$ 3 $mol.l^{-1}/KNO_3$ 0,1 $mol.l^{-1}$) d'une électrode auxiliaire (graphite) et d'une électrode à goutte de mercure pendante (SMDE) de la plus petite taille possible, correspondant à un rayon d'environ 1,41 10^{-4} m en accord avec les données techniques du constructeur,
- l'agitation est assurée par une tige en téflon (PTFE) et la purge par de l'azote ultrapur de qualité scientifique,
- une cellule thermostatée à 25 ± 0,1°C en PFA (volume d'échantillon: 20 à 100mL)

- d'un potentiostat PGSTAT12 (limite de détection 30 fA) (METROHM)
- d'une électrode combinée (Orion 9103) reliée à un système Orion 720A pour contrôler le pH.

Rappel du principe de la technique AGNES :

Cette technique électrochimique dite par redissolution est réalisée au moyen de 2 étapes (Figure 15):

- une étape de préconcentration : un potentiel E_1 plus négatif que le potentiel rédox du couple du métal étudié est appliqué pendant un temps t_1 terminé par une période sans agitation t_w. Cette étape diffère des autres techniques électrochimiques par l'atteinte d'un équilibre Nernstien (Companys *et al.*, 2005)
- une étape de redissolution : un potentiel beaucoup plus positif que le potentiel rédox du couple du métal étudié est appliqué pendant un temps t_2 où la mesure du courant est réalisée.

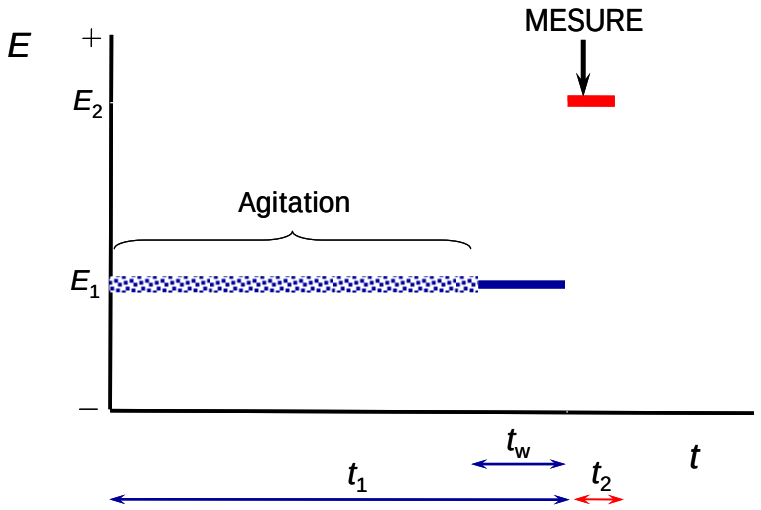


Figure 15 : Schéma du programme simple de potentiels d'AGNES

Pour atteindre l'état d'équilibre Nernstien dans un temps raisonnable (t_1), il est nécessaire de travailler avec une goutte de mercure la plus petite possible afin d'être dans les conditions de volumes finis (Anderson *et al.*, 1987 ; Galceran *et al.*, 1998 ; Myland *et al.*, 1985). En effet l'utilisation d'un petit volume de mercure en comparaison de celui de la solution permet de considérer que l'échantillon dans la cellule n'est pas modifié par le processus de préconcentration dans l'électrode.

Potentiel de dépôt :

Comme le montre l'équation 14 (§ II.1.4.2.2 AGNES), le potentiel de déposition affecte le facteur de préconcentration. Le choix de ce potentiel de déposition influera sur le temps de déposition : la forme et le rayon de l'électrode étant fixes, le choix par exemple d'une faible différence de potentiel impliquera une diminution du temps nécessaire pour atteindre l'équilibre. La sélection du potentiel de déposition est un compromis entre :

- d'un côté, le potentiel E_1 doit être le moins négatif possible par rapport au potentiel rédox du couple $E°$, afin d'atteindre dans un temps raisonnable l'équilibre,

- de l'autre, il est intéressant de travailler avec un facteur de préconcentration très important (E_1 très négatif par rapport à $E°$) afin de pouvoir mesurer des courants importants pour des teneurs en métaux libres les plus basses possibles.

Il est aussi important de considérer que cette valeur du facteur de préconcentration Y aura une limite supérieure marquée par la solubilité du métal réduit à l'intérieur de l'amalgame. Si cette valeur d'Y est très grande, la concentration déposée dans l'électrode peut dépasser cette solubilité et la mesure réalisée dans la deuxième étape se verra erronée par cet excès. La stratégie pour réduire le temps de déposition sera expliquée ci-dessous pour permettre de satisfaire d'une manière efficace les deux conditions que le facteur Y de préconcentration doit accomplir : diminuer le temps de déposition sans nécessairement diminuer la valeur du courant.

Par ailleurs, la valeur expérimentale du facteur de préconcentration peut être obtenue en réalisant une expérience de polarographie : une DDP (differential pulse polarography) dans une solution avec une concentration en métal plus élevée et une goutte plus large pour ainsi pouvoir appliquer les expressions d'électrode plane. La Figure 16 montre un signal obtenu par DPP. La valeur E_{peak}, est nécessaire pour calculer la valeur du facteur de préconcentration. Pour cela il faut partir de l'expression du potentiel de pic d'une DPP dans le cas d'une diffusion planaire (Bard et Faulkner, 1983) :

$$E_{\text{peak}} = E_0^{'} + \frac{RT}{nF} \ln \sqrt{\frac{D_{\text{M}^0}}{D_{\text{M}}}} + \frac{\Delta E}{2} \qquad \textbf{Équation 35}$$

où ΔE est l'amplitude de la modulation de la DPP, c'est-à-dire la différence entre les potentiels qui s'appliquent au commencement et à la fin de la vie de la goutte de mercure. Cette équation se combine avec l'équation 35 pour donner :

$$Y = \sqrt{\frac{D_{\text{M}}}{D_{\text{M}^0}}} \exp\left[-\frac{nF}{RT} \left(E_1 - E_{\text{peak}} - \frac{\Delta E}{2} \right) \right] \qquad \textbf{Équation 36}$$

A partir de cette équation 36 on peut obtenir la valeur du potentiel de déposition, E_1, avec lequel il faudra travailler, puisque la valeur du facteur de préconcentration est fixée au préalable, les autres paramètres étant connus.

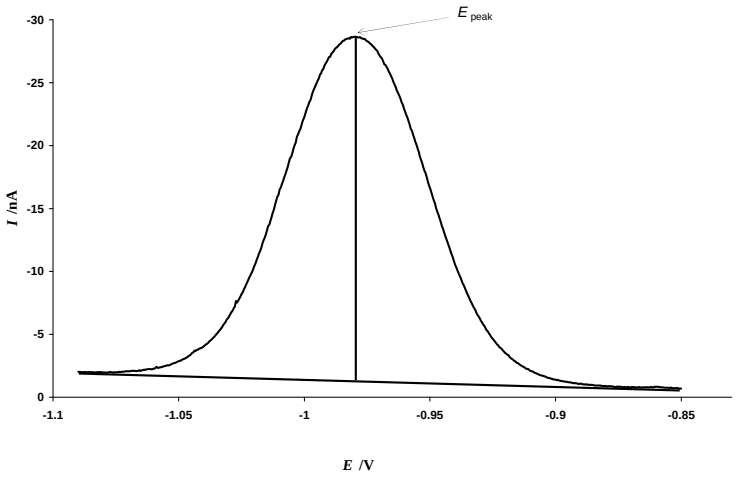


Figure 16 : Représentation d'une DPP réalisée avec une solution de Zn^{2+}

([Zn^{2+}] = 6 10^{-6} mol.l^{-1}; temps de modulation : 0,05 s; intervalle de temps : 1 s; saut de potentiel : 0,00045 V; amplitude de la modulation : 0,05 V)

Stratégie de réduction du temps de dépôts

La Figure 17 montre le programme de potentiels optimisés pour appliquer AGNES. La réduction du temps de déposition consiste à améliorer le programme simple de potentiels en divisant la première étape en 2 sous-parties :

(i) la première est réalisée en appliquant un potentiel E_1 très négatif, (ce qui revient à un facteur de préconcentration Y_{1a} très grand pour lequel existe des conditions limites de diffusion) durant un temps $t_{1,a}$ approprié pour préconcentrer à l'intérieur de la goutte un nombre de moles proche de celui désiré pour atteindre l'équilibre *b*,

(ii) dans la deuxième sous-partie le potentiel de déposition E_{1b} est appliqué pour atteindre l'équilibre final désiré, durant un temps $t_{1,b}$ suffisant pour compenser l'excès ou le défaut de métal qui est précédemment entré dans la goutte durant la première sous-partie.

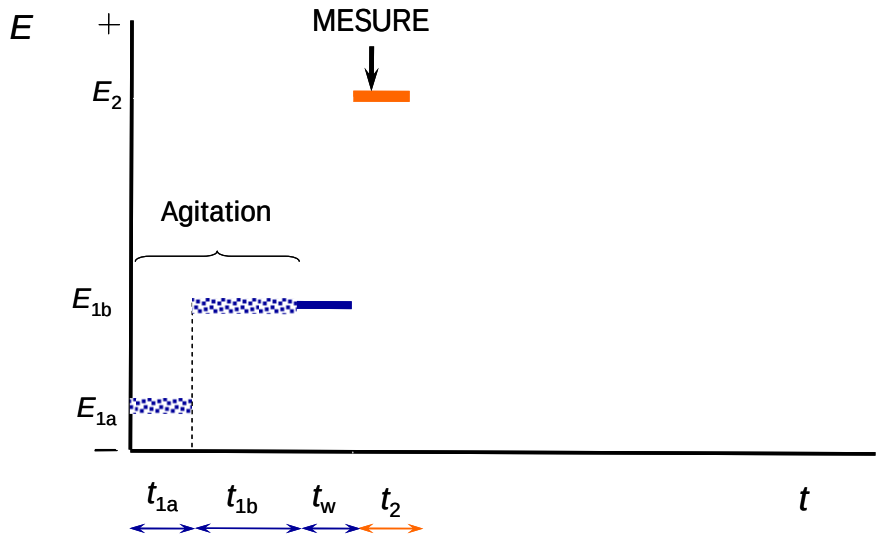


Figure 17 : Profil du programme de potentiels optimisé pour appliquer la technique AGNES

Si le potentiel de la première sous-partie est appliqué durant un temps trop long, un excès de métal est accumulé dans l'électrode de mercure ce qui provoque un « overshoot » (ou un superexcès), qui doit être compensé par un temps suffisamment long de la deuxième sous-partie (t_{1b}). À travers une analyse mathématique, Companys *et al.*, (2005) ont déduit que la relation parfaite est : $t_{1b} = 2{,}6\ t_{1a}$. Cette relation du temps peut être prise comme correcte chaque fois que :

- les coefficients de diffusion (globaux ou équivalents, en incluant les transports et les cinétiques de complexation) de la première et la deuxième sous-partie sont similaires à la vitesse d'entrée dans l'électrode durant la première sous-partie ainsi que celle de sortie dans la deuxième sous-partie,
- et qu'il existe un excès de ligand dans la solution.

Les solutions mères de chaque fraction de MOD sont préparées 12 h en avance à un pH d'environ 9. Les solutions de plomb sont préparées à partir d'une solution standard 1000 ppm (Certipur®). L'électrolyte support utilisé est du nitrate de potassium préparé à partir d'un solide (Suprapur). Les solutions de KOH et HNO_3 (0,1mol.l^{-1}) utilisées pour ajuster le pH sont de qualité Titrisol. De l'eau déionisée ultrapure (ρ = 18,2MΩ) est utilisée pour toutes les expériences. L'électrode de pH est régulièrement calibrée par trois solutions tampons commerciales (pH 4 ; 7 et 9).

Les fractions de MOD ont été titrées à 4 valeurs de pH différents (environ 5, 6, 7 et 9). Dans chaque cas, la procédure suivante a été appliquée :

- un volume de 50 ml de KNO_3 0,1 mol.l^{-1} dopé par 20 mgC.l^{-1} de MOD est placé dans la cellule et dégazé,
- le pH est ajusté manuellement à la valeur désirée par de petits ajouts d'acide ou de base et la procédure d'AGNES est appliquée,
- le courant du blanc, I_b, est mesurée dans la solution contenant l'électrolyte support et la fraction de DOM. Excepté pour les premières additions de métal, ce courant du blanc est négligeable devant les mesures de redissolution du métal,
- un certain nombre d'additions de solution étalon de métal de type « monétaire » sont successivement ajoutées dans la cellule de 10^{-9} à 10^{-4} mol.l^{-1}. Après celles-ci le pH est mesuré et corrigé si nécessaire et la procédure AGNES appliquée (c'est-à-dire que le courant I est mesuré pour chaque concentration de métal total)
- en tenant compte que le courant final I_f résultant de l'oxydation du métal est égale à $I_f = I\text{-}I_b$, la valeur de h ($I_f = h\ c_M$) permet la détermination de la concentration en métal libre à chaque addition.

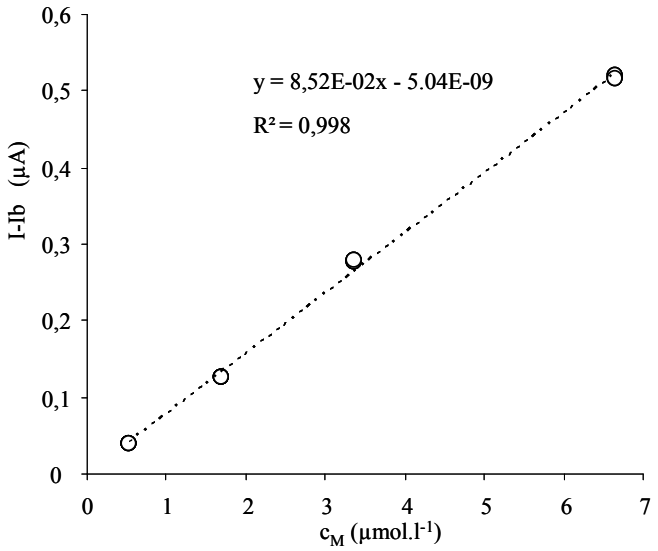


Figure 18 : Exemple de courbe de calibration de la technique AGNES pour le dosage du plomb

La valeur de h est déterminée préalablement par une calibration expérimentale à la même concentration de KNO_3 mais sans MOD :

- différents volumes de métal sont ajoutés à 50 ml de KNO_3 et la mesure d'AGNES est réalisée,

- le programme VisualMINTEQ est utilisé pour déterminer la concentration en ion libre à chaque addition afin de prendre en compte les complexes connus formés tels que nitrates et hydroxydes,
- la valeur moyenne de h est déduite de la courbe $I_f = f(c_M)$ et utilisée pour tous les calculs de concentrations de la titration avec MOD.

Les expérimentations de DPP ont été menées à la fin de la calibration sur les solutions les plus concentrées avec les gouttes de mercure les plus larges (afin d'être dans des conditions de diffusions planes) pour déterminer le potentiel E_1 appliqué pendant la procédure AGNES pour un facteur de concentration Y désiré.

Les paramètres des mesures AGNES et DPP sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Paramètres utilisés pour AGNES et la DPP

	Première étape		Deuxième étape	
	(Exemple de $Y_{1,b}$ utilisés)			
AGNES	$Y_{1,a} = 10^8$	$Y_{1,b} = 100$	$Y_{1,b} = 100$	$Y_2 = 10^{-8}$
	$t_{1,a} = 70$ s	$t_{1,a} = 70$ s	$t_{1,a} = 70$ s	$t_{1,a} = 70$ s
	agitation	agitation	repos	agitation
DPP	Temps de modulation : 0,05 V ; Intervalle de temps 1 s ; Potentiel de départ : -0 ,21 V ; Potentiel de fin : -0,46 V ; saut de potentiel : 0,00045 V ; amplitude de modulation : 0,05 V			

Pour toutes les procédures AGNES (calibration et titration) ainsi que DPP, toutes les mesures ont été réalisées en duplicata. Dans le cas de la procédure AGNES, les duplicata ont été réalisés avec une combinaison sécuritaire des temps $t_{1,b}$: c'est-à-dire que le premier temps $t_{1,b}$ a été réalisé avec le temps classique conformément à l'équation $t_{1b} = 2,6\ t_{1a}$, le deuxième avec un temps $t_{1,b}$ plus long afin de vérifier que l'état d'équilibre est bien atteint. C'est-à-dire qu'aucun phénomène d'« over »ou d'« undershoot » suite à la présence de complexe respectivement trop labile ou trop inerte, n'empêche d'atteindre l'équilibre.

La modélisation des données de la titration acido-basique (à 0,1 M) à l'aide de la double isotherme de Langmuir-Freundlich a permis précédemment de déterminer les paramètres d'affinité du proton. Les données issues des titrations avec le plomb aux différents pH et à la force ionique de 0,1 M ont été traitées avec le code de spéciation VisualMINTEQ afin de soustraire la complexation due aux nitrates (sels de fonds) et aux hydroxydes. Une fois traitées, les données sont directement utilisées par le modèle NICA (logiciel TableCurve3Dimensions TC3D) avec les paramètres précédemment obtenus pour le proton afin de déterminer les paramètres d'affinité du plomb pour chaque fraction.

II.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.3.1. Interactions matière organique – cuivre

Les Figure 19 et Figure 20 illustrent les résultats des titrations obtenus pour le proton et le cuivre d'une fraction de MOD ainsi que leur description par le modèle NICA. Pour l'ensemble des résultats obtenus, le modèle ajuste correctement les données. Ceci peut s'expliquer d'une part par la qualité des données obtenues mais aussi par l'utilisation d'un nombre important de paramètres par le modèle et valables pour chaque site (affinités faible et forte) : Q_{max} étant le nombre maximal de site, p étant l'hétérogénéité intrinsèque à la MOD, K la constante de complexation, et n le paramètre de non-idéalité du cation considéré.

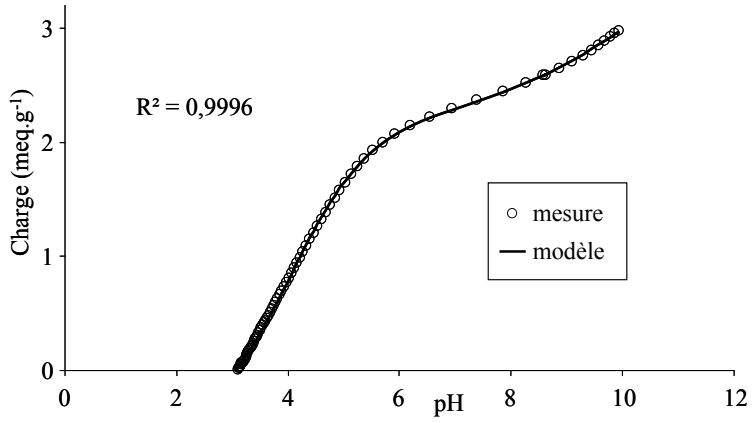


Figure 19 : Représentation de la charge mesurée et modélisée pour la fraction HPOA1

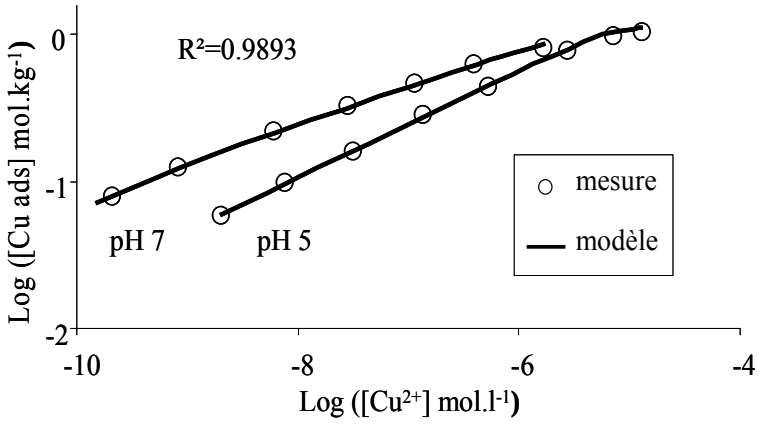


Figure 20 : Représentation du cuivre complexé à la fraction TPIM2 en fonction du cuivre libre aux pH 5 et 7 : comparaison entre les données expérimentales et la description du modèle NICA

Les Tableau 6 et Tableau 7 présentent l'ensemble des paramètres d'affinité des fractions de MOD pour le cuivre et le proton obtenus par modélisation NICA (et leur incertitude calculées par le logiciel FIT). Rappelons que dans cette partie seule la complexation spécifique du Cu a été prise en compte. En effet, les titrations par le cuivre ont été mesurées à deux pH différents, les titrations ont toutes été réalisées à une seule force ionique (0,1 M). En conséquence, les paramètres d'affinité présentés sont conditionnels (ici, à la force ionique de 0,1 M).

Tableau 6 : Paramètres d'affinité des sites faibles pour le proton et le cuivre des fractions extraites

Fraction	Q_{max1} (mol.kg^{-1})	p_1	Log K_{1H}	n_{1H}	Log K_{1Cu}	n_{1Cu}
SRFA	5,19 ± 0,47	0,74 ± 0,36	3,56 ± 0,10	0,33± 0,01	1,84 ± 0,65	0,68 ± 0,15
HPOM1	5,24 ± 0,02	0,39 ± 0,09	3,59 ± 0,01	0,33 ± 0,00	3,17 ± 0,18	0,67 ± 0,12
TPIM1	5,35 ± 0,10	0,23 ± 0,05	3,75 ± 0,03	0,50 ± 0,01	3,56 ± 0,33	0,89 ± 0,17
HPOM2	3,74 ± 0,01	0,65 ± 0,55	4,19 ± 0,01	0,53 ± 0,01	3,92 ± 0,87	0,29 ± 0,02
TPIM2	4,49 ± 0,02	0,27 ± 0,04	4,35 ± 0,01	0,54 ± 0,01	3,73 ± 0,41	1*
HPOA1	2,73 ± 0,02	0,20 ± 0,05	4,46 ± 0,01	0,61 ± 0,01	4,04 ± 0,63	1*
TPIA1	2,33 ± 0,1	1*	5,25 ± 0,01	1*	3,98 ± 0,24	1*
HPIA1	3,29 ± 0,08	0,52 ± 0,22	6,40 ± 0,05	1*	5,31 ± 0,44	0,68 ± 0,18
HPOA2	3,90 ± 0,06	0,28 ± 0,05	5,20 ± 0,03	0,60 ± 0,02	4,19 ± 0,27	1*
TPIA2	3,47 ± 0,02	0,02 ± 0,42	3,93 ± 0,48	0,73 ± 0,08	3,94 ± 0,37	0,94 ± 0,17
HPIA2	4,62 ± 0,08	0,50 ± 0,05	4,82 ± 0,02	0,60 ± 0,60	4,13 ± 0,10	0,70 ± 0,08
HPOAN	3,79 ± 0,11	1*	4,28 ± 0,05	0,77 ±	3,97 ± 0,09	1*
TPIAN	4,99 ± 0,01	0,72 ± 0,11	4,07 ± 0,00	0,49 ± 0,00	3,54 ± 0,00	0,41 ± 0,07
HPIAN	3,01 ± 0,01	0,45 ± 0,11	4,21 ± 0,04	0,53 ± 0,02	2,33 ± 0,60	0,59 ± 0,10
HPOMT	5,35 ± 0,02	0,22 ± 0,02	3,60 ± 0,01	0,47 ± 0,00	3,76 ± 0,32	1*
TPIMT	2,56 ± 0,24	0,73 ± 0,68	5,19 ± 0,02	0,92 ± 0,09	3,89 ± 0,77	0,29 ± 0,44
HPIMT	4,79 ± 0,06	1*	5,96 ± 0,02	0,36 ± 0,01	2,63 ± 0,92	0,65 ± 0,40

* : paramètre d'hétérogénéité fixé à 1 afin d'obtenir un ajustement correct

Tableau 7 : Paramètres d'affinité des sites forts pour le proton et le cuivre des fractions extraites

Fraction	Q_{max2} (mol.kg^{-1})	p_2	Log K_{2H}	n_{2H}	Log K_{2Cu}	n_{2Cu}
SRFA	1,88 ± 0,27	1*	9,22 ± 0,24	0,91 ± 0,26	8,02 ± 0,59	1*
HPOM1	2,42 ± 0,96	1*	9,99 ± 0,37	1*	7,35 ± 0,94	1*
TPIM1	1,31 ± 0,21	1*	9,67 ± 0,23	0,53 ± 0,06	7,10 ± 0,18	1*
HPOM2	0,62 ± 0,04	1*	9,15 ± 0,08	1*	8,57 ± 0,80	1*
TPIM2	0,66 ± 0,04	1*	8,91 ± 0,09	1*	9,04 ± 0,98	1*
HPOA1	1,89 ± 0,20	1*	10,38 ± 0,30	0,30 ± 0,1	6,38 ± 0,17	1*
TPIA1	2,33 ± 0,86	0,18 ± 0,02	9,82 ± 0,74	0,27 ± 0,10	5,78 ± 0,27	0.82 ± 0,12
HPIA1	5,89 ± 0,13	1*	9,25 ± 0,04	1*	8,24 ± 0,49	1*
HPOA2	1,48 ± 0,04	1*	9,96 ± 0,31	0,46 ± 0,30	6,64 ± 0,39	1*
TPIA2	2,45 ± 0,91	1*	10,01 ± 0,60	0,25 ± 0,30	5,73 ± 0,59	0.80 ± 0,22
HPIA2	4,58 ± 0,32	1*	9,47 ± 0,06	0,95 ± 0,05	7,28 ± 0,14	1*
HPOAN	3,44 ± 0,79	0,42 ± 0,05	8,06 ± 0,76	0,14 ± 0,03	6,33 ± 0,32	0.32 ± 0,03
TPIAN	1,39 ± 0,14	1*	9,63 ± 0,14	0,57 ± 0,04	6,14 ± 0,39	1*
HPIAN	6.51 ± 0,14	1*	9,47 ± 0,01	0,98 ± 0,01	8,35 ± 0,10	1*
HPOMT	1,20 ± 0,36	1*	9,66 ± 0,37	0,65 ± 0,12	7,47 ± 0,37	1*
TPIMT	6,32 ± 0,56	1*	11,26 ± 0,34	0,25 ± 0,22	5,54 ± 0,24	0.88 ± 0,12
HPIMT	5,32 ± 0,89	1*	10,19 ± 0,32	0,48 ± 0,05	9,38 ± 1,41	0.58 ± 0,18

* : paramètre d'hétérogénéité fixé à 1 afin d'obtenir un ajustement correct

Afin d'obtenir ces paramètres de complexation, il a parfois été nécessaire de fixer un ou plusieurs (*n* et *p*) paramètres d'hétérogénéité à 1, imposant alors l'absence d'hétérogénéité de la MOD vis-à-vis du cation considéré. En effet le nombre de données (uniquement 2 pH différents et environ 8 points pour chaque titration) était souvent insuffisant pour correctement contraindre le modèle, conduisant ainsi à l'obtention de valeurs aberrantes.

Si aucune tendance ne semble se dégager concernant les paramètres (constante et capacité de complexation) d'affinité faible, en revanche il est possible d'observer pour les paramètres d'affinité forte : des constantes et capacités de complexation plus importantes pour les fractions HPI comparativement aux fractions HPO.

Rappelons également que les constantes et capacités de complexation trouvées dans la littérature ont été déterminées parmi un très large panel de conditions expérimentales telles que : le pH, la force ionique, la concentration en ligand, la température, la méthode analytique employée et la méthode de détermination. Toutes ces différences rendent la comparaison des données difficile comme il a déjà été précisé dans plusieurs articles (Brown *et al.*, 1999 ; Town et Filella, 2000a, 2000b). Néanmoins les paramètres conditionnels (I=0,1M) de complexation de la substance de référence SRFA obtenus dans le cadre de cette étude sont relativement cohérents avec ceux de la littérature (Benedetti *et al.*, 1996b ; Milne *et al.*, 2003) dans les mêmes conditions : indépendants du pH, même modèle (Tableau 8).

Tableau 8 : Comparaison des paramètres de complexations de l'acide fulvique SRFA

Etude	Cation	Q_{max1} (mol.kg^{-1})	$\log K_1$	n_1	p_1	Q_{max2} (mol.kg^{-1})	$\log K_2$	n_2	p_2
Benedetti et al., 1996b	H	5,55	2,56	0,68	0,65	2,05	7,5	0,81	0,49
	Cu		1,10	0,65			6,2	0,32	
Milne et al., 2003	H	5,88	2,34	0,66	0,59	1,86	8,60	0,76	0,70
	Cu		0,26	0,53			8,26	0,36	
Cette étude	H	5,19	3,56	0,33	0,74	1,88	9,22	0,91	1*
	Cu		1,84	0,68			8,02	1*	

* : paramètre d'hétérogénéité fixé à 1 afin d'obtenir un ajustement correct

II.3.1.1. Teneurs en sites complexants

La Figure 21 présente la distribution du nombre de sites au sein de chaque fraction (HPO, TPI, HPI). Il est ainsi possible d'observer :

- un nombre de sites d'affinité faible (Q_{max1}) ne présentant pas de différence significative d'un type de fraction à l'autre et dans l'ensemble un plus grand nombre de sites pour SRFA,

- un nombre de sites d'affinité forte (Q_{max2}) similaire pour les fractions SRFA, HPO et TPI, et beaucoup plus important pour les fractions HPI,

- un nombre de sites d'affinité faible (Q_{max1}) plus important que le nombre de sites d'affinité fortes pour les fractions SRFA, HPO et TPI,

- un nombre de sites d'affinité forte (Q_{max2}) plus important que ceux d'affinité faible pour la fraction HPI.

Ces résultats sont dans l'ensemble en accord avec la littérature (Violleau, 1999) qui montrent généralement une augmentation du nombre de sites complexants en fonction du caractère hydrophile. L'important nombre de sites d'affinité forte déterminé dans les fractions HPI peut être expliqué par la forte présence d'azote (≈10 %) et par la présence de groupements amines précédemment mis en évidence par différentes techniques analytiques (IRTF, fluorescence, pyrolyse-CG-SM) (Chapitre I).

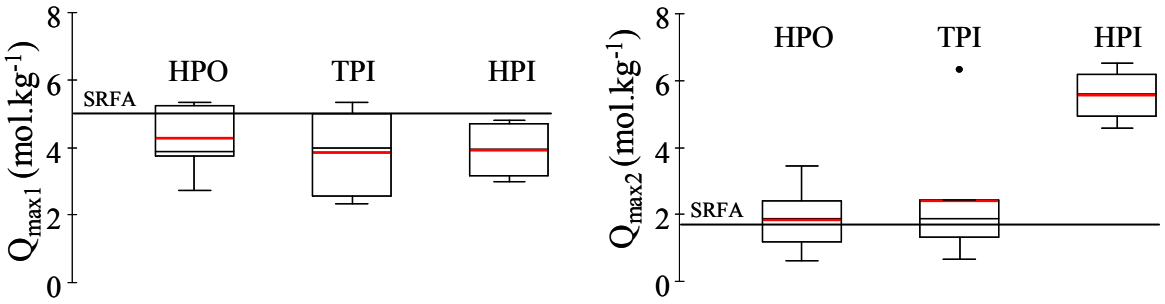


Figure 21 : Distribution des capacités de complexations des fractions isolées

Pour rappel, afin de visualiser la dispersion des données, la représentation des données sous forme de boîtes à moustaches a été utilisée (Tukey, 1977). Le détail de cette représentation est présenté dans le chapitre I (§ I.3.2.2).

La Figure 22 présente les capacités complexantes d'affinité faible et forte de la MOD en fonction du site de prélèvement (calculées à partir des capacités complexantes de chaque fraction et de la distribution des fractions). Il est important de noter que pour les fractions de Méry sur Marne (M1 et M2) la fraction HPI n'ayant pas été extraite et donc analysée (car très minoritaire) n'a pu être prise en compte. Le COD des sites de Méry/Marne a donc été considéré comme étant uniquement composé des fractions HPO et TPI. On peut néanmoins observer :

- une relative forte teneur en site d'affinité faible pour les échantillons de Méry/Marne,

- une plus faible teneur de sites d'affinité forte pour les échantillons de Méry sur Marne,

- une augmentation du nombre de sites de complexation pour les sites en aval de l'agglomération parisienne.

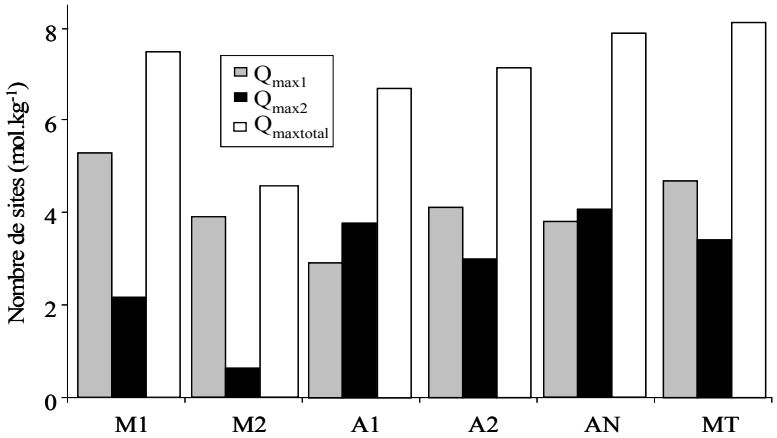


Figure 22 : Capacités complexantes d'affinités faible et forte de la MOD selon le site de prélèvement

II.3.1.2. Constantes de complexation vis-à-vis du cuivre

La Figure 23 montrant la distribution des constantes de complexation pour le proton et le cuivre, permet de mettre en évidence :

- des constantes de complexation pour le proton systématiquement un peu plus importantes que pour le cuivre,
- pour le proton : des constantes de complexation faibles et fortes qui semblent ne pas varier d'un type de fraction à l'autre (HPO, TPI, HPI)
- pour le cuivre : la constante d'affinité faible ne varie pas en fonction du type de fraction bien que pour la fraction HPI, on observe une variabilité nettement plus importante. Les fractions HPO, TPI et HPI présentent des constantes d'affinité faible nettement supérieures à celle de SRFA,
- des constantes d'affinité forte pour les fractions HPI et SRFA plus importantes que celles des fractions HPO et TPI.

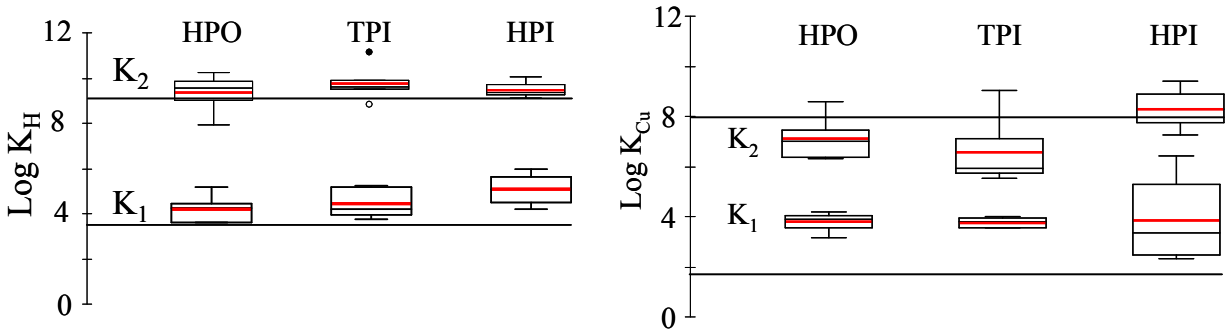


Figure 23 : Distribution des constantes de complexation des fractions isolées vis-à-vis du proton et du cuivre (le trait continu symbolise les valeurs obtenues pour SRFA)

Si, prises dans leur ensemble (tous sites confondus Figure 23), les constantes semblent similaires d'une fraction de MOD à l'autre en revanche pour chaque site on observe systématiquement (excepté M2 pour K_2) une diminution des constantes selon l'ordre SRFA>HPO>TPI (Tableau 6 et Tableau 7). Ces résultats sont en accord avec la littérature (Ma *et al.*, 2001 ; Violleau, 1999) qui montrent généralement une augmentation des forces des constantes de complexation avec le caractère hydrophobe due principalement à l'augmentation de groupements aromatiques tels que les groupements phénoliques. La constante d'affinité forte plus élevée pour SRFA comparée aux fractions HPO et TPI peut découler d'une forte présence de groupements phénoliques, révélés précédemment par une aromaticité et une teneur en oxygène élevées. La fraction SRFA présente une plus petite constante d'affinité faible. Ceci peut s'expliquer par la forte aromaticité observée. En effet, la présence de groupes phényles, responsables en partie de l'aromaticité observée et considérés comme électro-accepteur, diminue le pKa du groupement carboxylique, c'est-à-dire sa constante de complexation par stabilisation de la charge négative sur l'oxygène (conjugaison).

Concernant la fraction HPI, le pourcentage d'azote très important (environ 10 %) et fortement corrélé (IRTF, fluorescence, pyrolyse-CG-SM) à des groupements amines et amides, peut aisément expliquer les fortes constantes d'affinité comme il a été montré pour une fraction TPI de la rivière South Plate (Croué *et al.*, 2003). De plus il a aussi été montré que les structures protéiques et plus particulièrement les groupements amines, jouaient un rôle important vis-à-vis des métaux (Ahearn *et al.*, 2004 ; Croué *et al.*, 2003 ; Fukushi *et al.*, 2001)

comme par exemple les protéines issues de résidus de parois cellulaires bactériennes (Plette *et al.*, 1995), de boues d'épuration traitées ou non (Esteves da Silva *et al.*, 1998 ; Esteves da Silva et Oliveira, 2002). Bien que généralement présent en faible quantité dans les substances humiques, le rôle complexant de l'azote a également pu être mis en évidence par spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) (Korshin *et al.*, 1998).

Les Figure 24 et Figure 25 montrent les constantes de complexations moyennes de la MOD pour le proton et le cuivre selon leur provenance (calculées à partir des constantes de complexation de chaque fraction et de la distribution des fractions). Rappelons ici encore que le COD de Méry sur Marne a été considéré comme étant uniquement constitué des fractions HPO et TPI. Il est possible de noter :

- l'absence de variation significative des constantes d'affinité forte,

- une augmentation systématique des constantes d'affinité faible pour les rejets de STEP, pouvant être expliquée par une faible aromaticité précédemment observée. En effet, comme expliqué précédemment, la présence de groupements aromatiques peut diminuer la valeur des constantes d'affinité par une stabilisation de la charge négative sur l'oxygène par conjugaison.

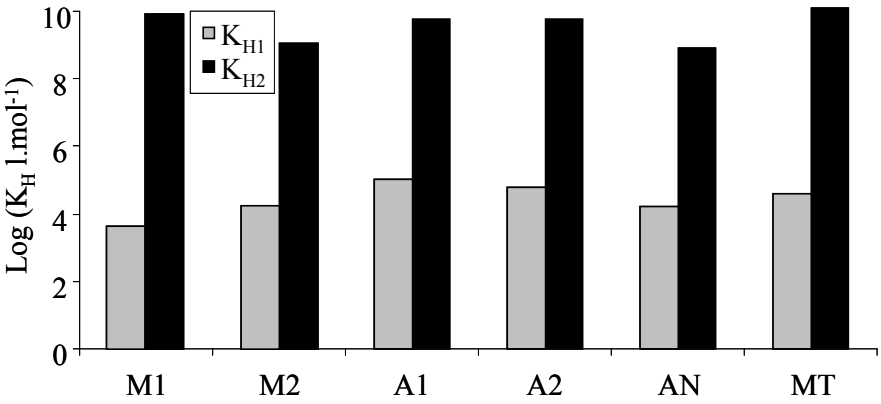


Figure 24 : Constantes de complexation de la MOD vis-à-vis du proton selon le site de prélèvement

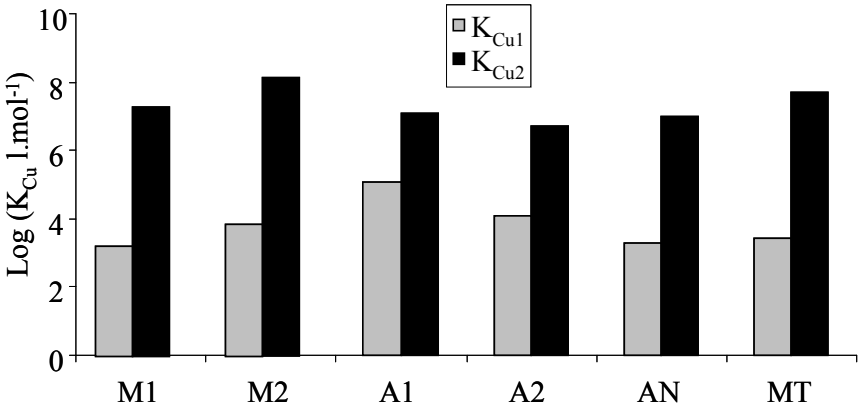


Figure 25 : Constantes de complexation de la MOD vis-à-vis du cuivre selon le site de prélèvement

II.3.1.3. Pouvoir complexant des MOD extraites : affinité et capacité

La distribution du nombre de sites complexants au sein des MOD en fonction de leur force de complexation pour le cuivre (Figure 26) montre :

- une distribution linéaire des sites faibles et forts quelque soit le type de fraction,
- une diminution de la capacité de complexation lorsque la force de la constante augmente pour les fractions HPO et TPI comme cela a par ailleurs été montré pour des eaux de surfaces naturelles de différentes origines (Town et Filella, 2000b),
- un inversement de tendance pour les fractions HPI à savoir une augmentation du nombre de sites complexants lorsque la force de la complexation augmente.

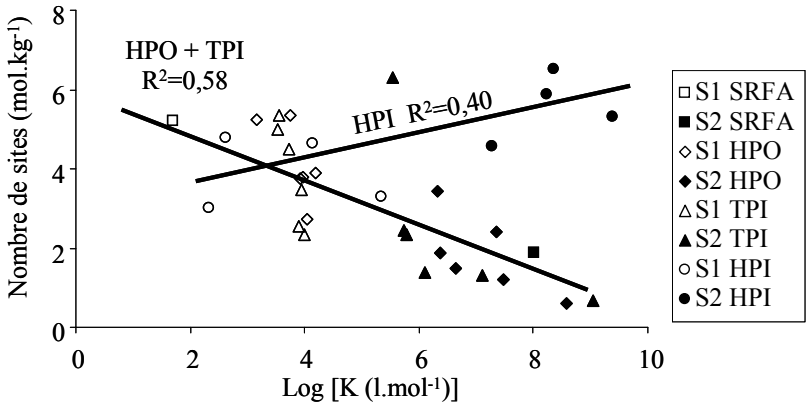


Figure 26 : Distribution du nombre de sites complexants pour le cuivre en fonction de Log (K) (S1 sites d'affinité faible, S2 sites d'affinité forte)

Ceci montre par ailleurs que l'utilisation d'une distribution bimodale n'est pas nécessaire pour expliquer la complexation du cuivre avec les MOD HPO et TPI. En effet tel qu'il a été montré pour une grande variété d'eaux de surface par Town et Filella (2000b), il n'est pas nécessaire d'invoquer la présence de différentes classes de ligands pour expliquer le degré de complexation du métal puisque les sites forts (S2) seront prioritairement complexé à des teneurs en métal faible puis progressivement les sites faibles (S1) contribueront à la complexation. Pour la MOD HPI cette tendance s'inverse suite à la présence probable de nombreux groupements amines précédemment observés.

La Figure 27 présente la concentration en sites complexants dans le milieu d'origine (calculée en $mol.l^{-1}$ dans le milieu grâce aux pourcentages de carbone de chaque fraction et de la concentration en COD des eaux échantillonnées) en fonction de la constante d'affinité pour le cuivre. La dispersion des points ne permet pas ici de conclure quant à la diminution de la concentration en sites complexants lorsque leur constante d'affinité augmente comme cela a déjà été montré (Town et Filella, 2000b).

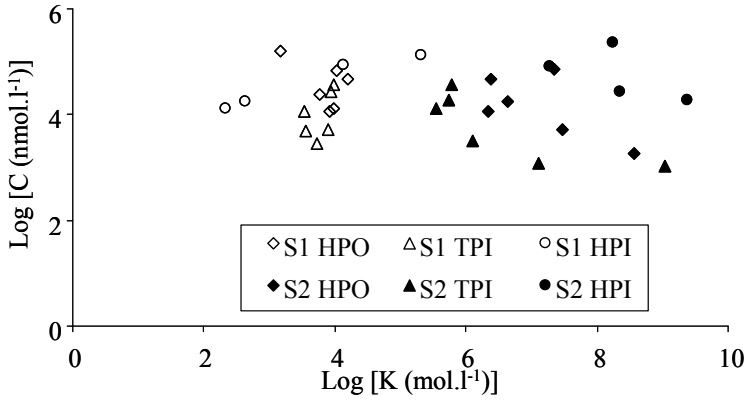


Figure 27 : Distribution de Log [concentration des sites complexants] versus Log [K]

Enfin la Figure 28 souligne la faible variabilité du pouvoir complexant (capacité et constante) des eaux prélevées en amont et en aval de l'agglomération parisienne. Il est toutefois possible de noter que :

- dans l'ensemble les valeurs de constantes et de capacités complexantes sont en accord avec la littérature (Town et Filella, 2000b). Les constantes peuvent sembler faibles comparées aux nombreuses valeurs des eaux de surfaces synthétisées par Town et Filella (2000b) variant entre 4 et 16 pour les eaux douces. Il est cependant important de noter qu'ici seul la matrice organique est prise en compte,

- la MOD issue des effluents de STEP présente de plus fortes capacités de complexation pour le cuivre dues d'une part à la plus forte concentration en COD dans les rejets et d'autre part à une à plus grande richesse fonctionnelle précédemment mis en évidence,

- la MOD issue de la Seine en Aval de Paris à Andrésy et Méricourt semblerait présenter des constantes et capacités d'affinité forte plus importantes que la MOD de Méry sur Marne, probablement dues aux rejets de la STEP Seine-Aval, puisque le COD double entre l'amont et l'aval de Paris.

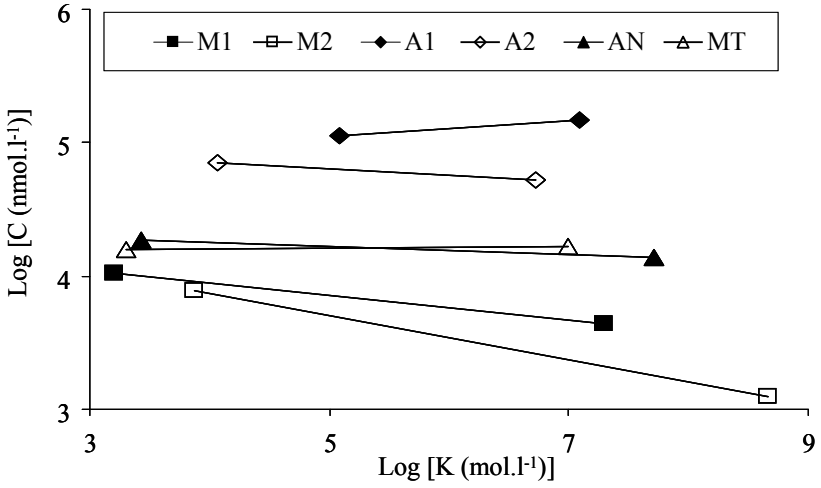


Figure 28 : Log [concentration des sites complexants] versus Log [K] selon le site de prélèvement

Ces résultats indiquent le rôle important dans la complexation du cuivre et du plomb de la MOD HPI, très présente dans les rejets de STEP et sans doute plus facilement dégradable (faible aromaticité et forte présence de protéines). Ils soulèvent donc la question suivante :

Si d'une part la MOD issue des effluents de STEP révèle un pouvoir complexant plus important que la MOD en amont de Paris, et d'autre part cette MOD de STEP présente un faible degré de maturité, comment la biodégradation affecte t'elle la spéciation des métaux en aval de la Seine.

II.3.1.4. Influence de la force ionique sur la complexation non spécifique

Il a été montré jusqu'à présent que quelque soit le type de MOD étudiée, l'adsorption non spécifique (Donnan) est négligeable devant la complexation des sites d'affinité forte et faible pour des concentrations en cuivre dissous inférieures à 10^{-6} mol.l^{-1} c'est-à-dire pour l'ensemble des concentrations observées dans les eaux de surfaces (Croué *et al.*, 2003 ; Kinniburgh *et al.*, 1996). La Figure 29 issue de Croué *et al.* (2003) illustre ces propos. En conclusion, bien que l'effet de complexation non spécifique n'ait pas été pris en compte et qu'il peut faiblement modifier les valeurs des paramètres de complexation obtenus, il reste néanmoins très largement négligeable dans la description de la complexation des métaux par la MOD à des concentrations dites « environnementales »

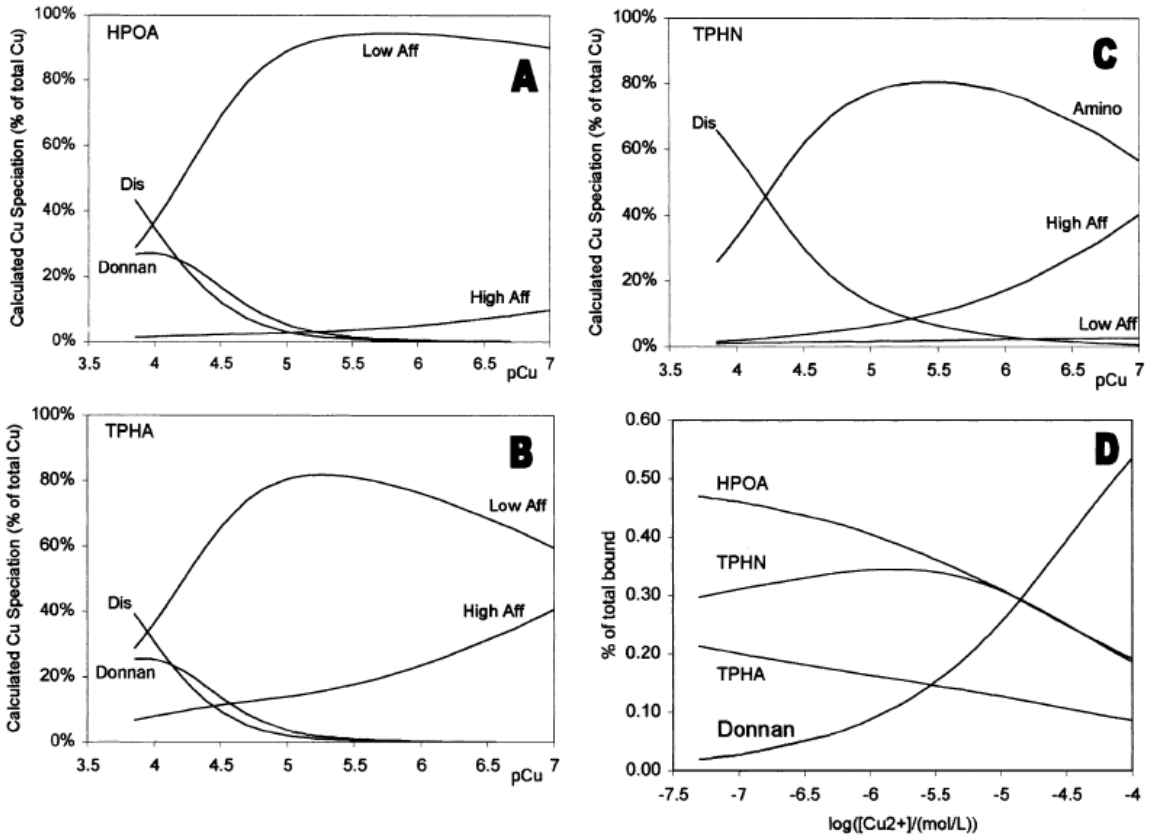


Figure 29 : Spéciation du cuivre dans différentes fractions de MOD (Croué *et al.*, 2003)

(Low Aff et High Aff correspondent à faible et forte affinité, respectivement. Donnan et Dis correspondent respectivement au cuivre complexé non spécifiquement et libre en solution (tel que : Cu^{2+}, $CuOH^{+}$, etc.), Amino correspond aux sites amines trouvés dans les résidus de parois cellulaire bactérienne. Les figures A, B, et C correspondent aux différentes fractions HPO et TPI, respectivement. La figure D montre les contributions des trios fractions à pH 6,2 et I = 0,001 M).

II.3.2. Interactions matière organique – plomb

II.3.2.1. Problème lié à la cinétique de complexation

Les premières expériences menées avec la fraction HPOA1 à pH 6 ont soulevé des problèmes de reproductibilité. En effet les répétitions des titrations de la fraction HPOA1 à pH 6 ont mis en évidence des différences significatives. Face à ce problème, l'ensemble des résultats a été analysé de nouveau ainsi que les paramètres de la procédure AGNES (potentiel, temps, échelle de mesure, etc.), le matériel (taille de la goutte de mercure, capillaire, agitation, électrode de référence, etc.) et la méthode opératoire. Aucun de ces paramètres n'a révélé de variation significative pouvant expliquer ces résultats. L'hypothèse d'un problème lié à la cinétique de complexation du plomb avec la MOD a donc été formulée. Des tests de cinétiques de complexation consistant en la répétition de mesures dans le temps d'une solution à concentration constante en MOD et en plomb ont donc été réalisés. La Figure 30 présente les résultats de cette expérience.

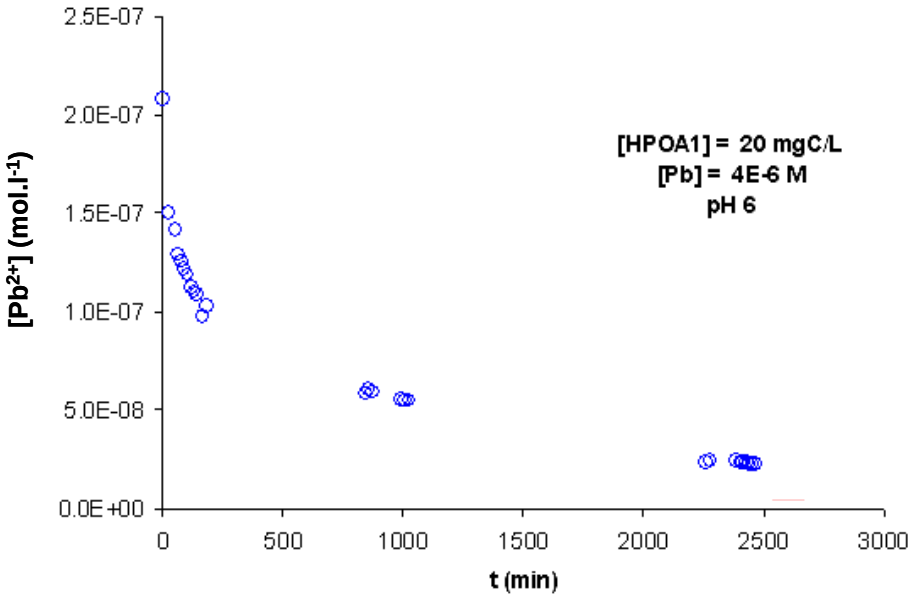


Figure 30 : Evolution de la concentration en plomb libre (Pb^{2+}) dans le temps

Il est ainsi possible d'observer sur la figure précédente une diminution de la concentration en métal libre en fonction du temps mettant en évidence l'attente nécessaire d'un laps de temps pour atteindre l'équilibre de complexation. Il est important de noter qu'il est difficile de réaliser de tels tests. En effet la complexation évoluant, le maintien du pH à la même valeur n'est pas aisé. Ce temps nécessaire à la complexation pose donc un problème opératoire puisque l'équilibre n'est atteint qu'après une quarantaine d'heure. Par conséquent, pour réaliser la titration de cette fraction HPOA1 des solutions ont été élaborées séparément avec, pour toutes, la même concentration de ligand et d'électrolyte support (KNO_3) et le même pH, tandis que la concentration totale de plomb varie d'une solution à une autre. Les solutions sont alors maintenues deux jours jusqu'à l'atteinte de l'équilibre avant d'être analysées.

Cette procédure fastidieuse mais nécessaire a été appliquée uniquement pour les titrations à pH 4,5 et 6 car à pH 7,5 et 9 aucun problème de cinétique n'a été observé. Ce

phénomène de cinétique lente n'est donc observé que pour les sites d'affinité faible, c'est-à-dire à pH acide puisque les sites forts sont encore protonés et n'interviennent donc pas ou très peu dans la complexation.

Pour les autres fractions de MOD analysées, des tests ont été réalisés mais n'ont jamais mis en évidence cet effet cinétique. Les titrations ont donc été menées « normalement » par ajout successif de plomb sur une même solution de MOD. Rappelons que pour le cuivre cette cinétique de complexation particulièrement lente n'a pas été observée.

II.3.2.2. Altération de la MOD

Les titrations des fractions de MOD par le plomb ont été répétées deux fois. Lors de la répétition de titration de la fraction HPOAN des différences significatives ont pu être observées entre les répliquats. La Figure 31 présente les répliquats des titrations de la fraction HPOAN à différents pH.

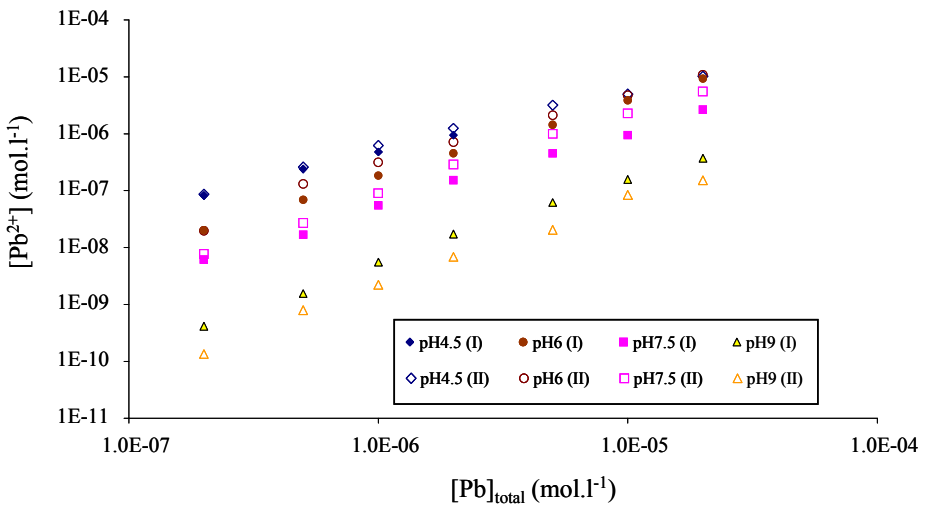
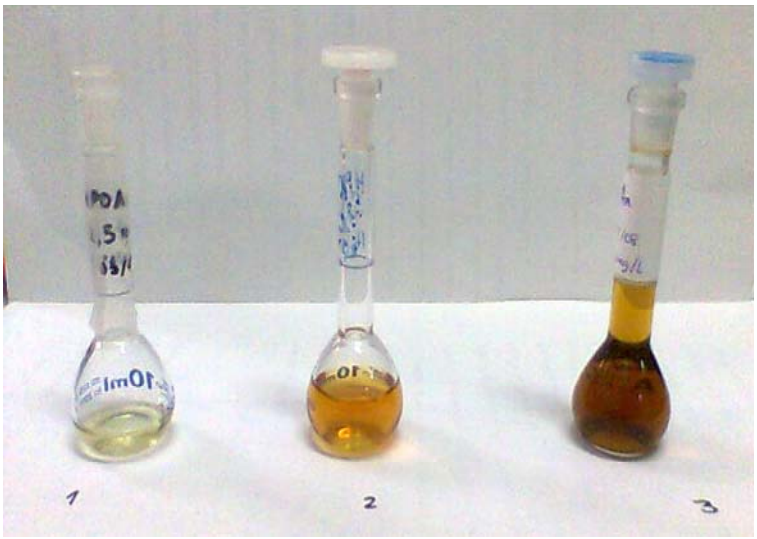


Figure 31 : Répliquats des titrations de la fraction HPOAN (20 mgC.l^{-1}) à différents pH : 4,5, 6, 7,5 et 9

(I correspond aux titrations réalisées en juillet 2008 et II à celles en août 2008)

Comme il peut être observé sur la figure précédente, les répétitions ne sont pas en accord. Aux plus faibles pH (4,5, 6 et 7,5), les valeurs de plomb libre mesuré coïncident entre elles pour les faibles concentrations en plomb total. En revanche pour les fortes concentrations en plomb total, les répétitions (II) sont systématiquement supérieures aux premières titrations (I). A l'inverse à pH 9 le répliquat (II) est supérieur à la première mesure quelle que soit la concentration en plomb total. De nouveau l'ensemble des paramètres utilisés, le matériel et le protocole opératoire ont été examinés. Seul, l'hypothèse d'une modification des caractéristiques chimique de la MOD a pu été formulée suite à l'observation d'un changement de la couleur de MOD. La Figure 32 présente l'altération de la couleur d'une solution de MOD en fonction du temps.



Préparée depuis 1 mois et demi | **Préparée depuis 15 jours** | **Fraîchement préparée**

Figure 32 : Altération de la MOD en fonction du temps

(Fraction HPOAN, 25 mg de MOD dans 10 mL de KOH, pH final 9)

Les répliquats des titrations présentés précédemment ont été réalisés à partir de la solution 2 au centre de la Figure 32 : la première titration (I) a été réalisée immédiatement après préparation de la solution qui avait à ce moment la même apparence que celle fraîchement préparée positionnée à droite de cette figure. La deuxième titration (II) fut réalisée avec la même solution alors âgée de 15 jours, déjà plus translucide, plus claire et plus brillante. Il est ainsi possible d'émettre l'hypothèse qu'une altération chimique (oxydation ?) ou biologique (biodégradation ?) de la MOD a donc lieu avec le temps. Pour éviter ces modifications biaisant les mesures, il a donc été décidé de travailler uniquement avec des solutions fraîchement préparées. Rappelons que pour toutes les analyses de caractérisations menées sur des solutions (UV, fluorescence, dosages humiques et acido-basiques) ainsi que pour les titrations avec le cuivre, les solutions de MOD ont été systématiquement préparées le jour ou la veille de l'analyse.

II.3.2.3. Teneur en sites complexants

Les résultats des teneurs en sites complexants des fractions de MOD sont situés paragraphe II.3.1.1. Etant également discutés dans ce paragraphe, il a été choisi de ne pas les présenter de nouveau.

II.3.2.4. Titrations par le plomb de la MOD

Les Figure 33 et Figure 34 présentent à titre d'exemple les résultats obtenus pour la titration par le plomb de la fraction HPOMT ainsi que l'ajustement de ces données par le modèle NICA. Cette dernière figure en trois dimensions présente pour chaque dimension : la teneur en plomb adsorbé sur la MOD en fonction du pH et de la concentration en plomb libre en solution. Rappelons que les titrations n'ont été effectuées qu'à la force ionique 0,1 M et qu'en conséquence, les paramètres d'affinité présentés sont conditionnels.

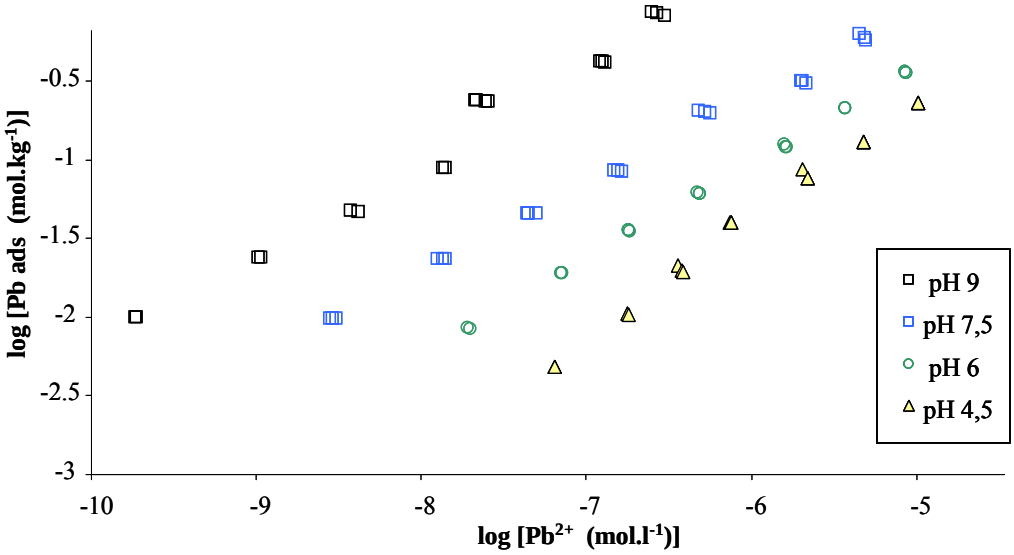


Figure 33 : Titrations par le plomb de la fraction HPOMT à 4 pH différents

(Chaque titration a fait l'œuvre de deux répliquats comportant chacun deux mesures, [HPOMT]=20mgC.l^{-1})

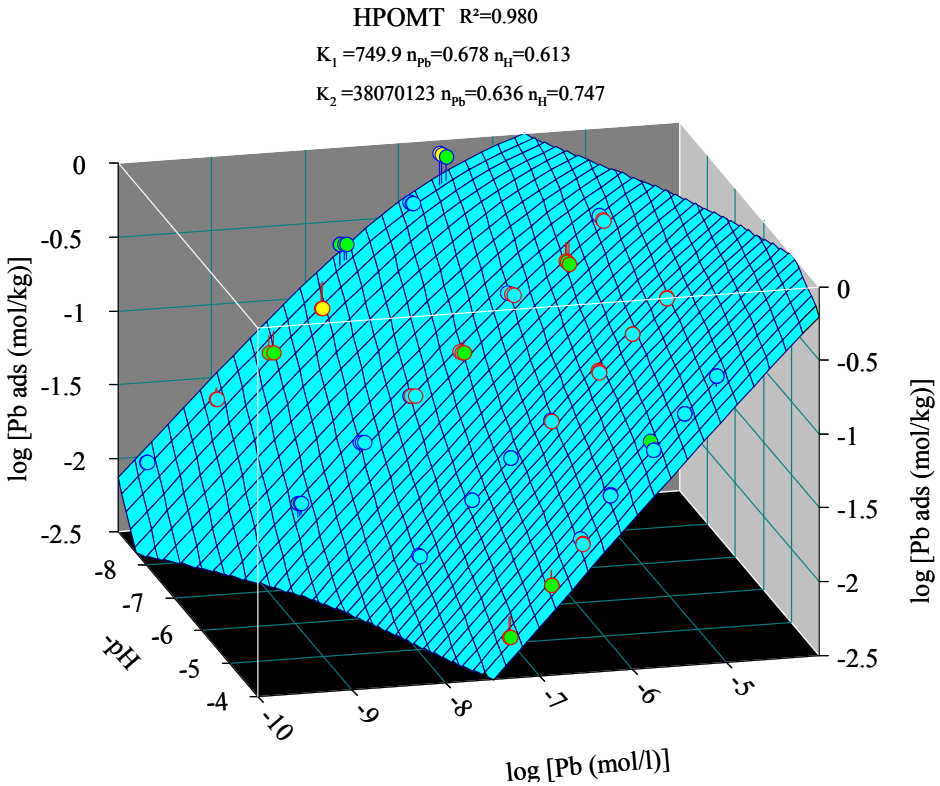


Figure 34 : Ajustement des données des titrations de la fraction HPOMT par le modèle NICA

A partir de ces figures il est possible d'observer :

- une répétition correcte des mesures,

- pour la même concentration en plomb total, une augmentation du plomb complexé lorsque le pH augmente. Ceci s'explique par une déprotonation d'un plus grand nombre de sites à pH basique,

- un ajustement raisonnable du modèle sur les données expérimentales malgré l'utilisation de 4 pH différents.

Le Tableau 9 résume l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de l'étude des interactions MOD – Pb.

Tableau 9 : Paramètres de complexation des MOD étudiées avec le plomb et condition d'obtention

	S_1			S_2			r^2	pH
Fractions	log K_1	n_M	n_H	log K_2	n_M	n_H		
HPOA1	-1,24 ± 3,73	0,82 ± 0,30	0,00 ± 1,62	7,43 ± 0,15	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,950	4,5 - 6 7,5 - 9
TPIA1	-1,17 ± 8,01	0,22 ± 0,23	1,00 ± 0,45	6,57 ± 0,23	0,40 0,02	0,46 ± 0,06	0,981	4,- 6 7,5 - 9
HPIA1	3,52 ± 1,	1,00 ± 0,29	0,17 ± 0,32	5,30 ± 0,31	0,49 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,911	4 - 5 6 - 7
HPOAN	3,14 ± 0,30	0,83 ± 0,16	1,00 ± 0,21	5,41 ± 0,08	0,62 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,926	4,5 – 6 7,5 - 9
HPOMT	2,88 ± 0,08	0,68 ± 0,02	0,61 ± 0,04	7,58 ± 0,15	0,64 ± 0,02	0,75 ± 0,06	0,984	4,5 - 6 7,5 - 9

A partir de ce tableau, différentes observations peuvent être faites :

- un coefficient de corrélation (r^2) supérieur à 0,91 montrant un ajustement correct du modèle NICA vis-à-vis des données.

- l'incertitude des constantes de complexation (données par le modèle) s'avère importante quelque soit la fraction considérée.

L'importance de ces incertitudes peut être attribuée à la qualité des données obtenues. La qualité des données reste difficile à évaluer telles qu'elles sont présentées car d'une part les échelles logarithmiques « lissent » ces détails et d'autre part le nombre important de paramètres (6 pour le proton et 6 pour le métal) permet très souvent au modèle d'ajuster les données correctement (degré de liberté trop important pour les jeux de données acquis). Ces incertitudes particulièrement élevées ne nous permettent donc pas de tirer des conclusions quant à l'influence de la nature et/ou de l'origine de la MOD vis-à-vis de la complexation du plomb. Néanmoins les constantes conditionnelles de complexation obtenues ici pour le plomb sont, malgré les incertitudes, de l'ordre de grandeur de celles publiées dans la littérature variant généralement entre 1 et 9 (log K) (Town et Filella, 2002). S'il avait été soulevé dans cette synthèse bibliographique de Town et Filella (2002) que les paramètres étaient en général mal estimés en raison d'expérience menées à des pH trop faibles ($4 < pH < 6$) et des teneurs en MOD trop élevées (jusqu'à $1 gC.l^{-1}$) il n'en est pas de même pour notre étude où le pH varie de 4 à 9 et la concentration de MOD est d'environ 20 $mgC.l^{-1}$.

II.4. CONCLUSION

De nombreux modèles et techniques analytiques ont été développés afin de décrire les propriétés de complexation des matières organiques naturelles vis-à-vis des métaux traces et du proton. Leur complexité est dépendante du nombre d'interactions qu'ils sont susceptibles d'expliquer. Elle se traduit par un nombre plus ou moins important de paramètres de complexations et d'acidité, une des principales limitations étant la qualité et la quantité de données expérimentales, mais aussi les capacités d'optimisation du modèle utilisé. Un des problèmes principaux de l'étude des propriétés complexantes et d'acidité de matières organiques est l'obtention de paramètres quasi-thermodynamiques, i.e. indépendants entre autres de la force ionique, des effets de compétition des cations et anions du milieu, du proton (aussi bien en terme de formation d'hydroxydes que de protonation des sites de complexation de la MOD), de la compétition des autres métaux traces. En effet, ces paramètres doivent être, autant que faire se peut, indépendants des conditions d'analyses s'ils sont destinés à être utilisés dans des bases de données comme celles des principaux programmes de spéciation, ou plus simplement comparés à ceux obtenus par d'autres techniques, dans d'autres conditions ou sur d'autres MOD. D'un point de vue analytique, ceci nécessite l'utilisation d'un grand nombre de techniques, sensibles spécifiques au proton, aux métaux traces, aux cations, etc. permettant l'analyse de l'ensemble de ces interactions. En effet la plupart des études publiées concernant les propriétés complexantes de MOD ont été réalisées à des concentrations en ligands et en métaux nettement supérieures à celles rencontrées dans le milieu (2 ou 3 ordre de grandeurs) suite aux problèmes de sensibilité.

Les résultats obtenus ici pour la première fois vis-à-vis des MOD hydrophiles d'origine anthropiques ont montré une réactivité particulière vis-à-vis du cuivre à des teneurs en MOD relativement faible (de l'ordre de 20 $mgC.l^{-1}$) et des teneurs en métal raisonnablement faibles pour les débuts de titrations (de l'ordre de la $nmol.l^{-1}$). En effet l'ensemble des MOD extraites et caractérisées précédemment, en particulier les fractions issues des effluents de STEP ont montré une teneur en sites complexants plus élevée que ce qu'il avait été déjà observé pour des matières organiques naturelles. Ceci s'explique par la richesse fonctionnelle précédemment mis en évidence en particulier la forte présence d'azote dans l'ensemble de nos échantillons (en particulier pour les fractions HPI) notamment les groupements amines caractérisés par différentes techniques analytiques (IRTF, fluorescence, pyrolyse-CG-SM) (Chapitre I). Concernant l'étude sur le plomb, nos travaux ne permettent pas de conclure quant à l'influence exacte de la nature et/ou de l'origine de la MOD vis-à-vis de la complexation du plomb suite à des incertitudes trop grandes. Néanmoins, les expériences qui ont été menées nous permettent aujourd'hui de disposer d'un outil et d'une méthodologie pour déterminer les paramètres de complexation de la MOD dans des conditions dites « environnementales » (faibles concentrations en métaux et en MOD, large gamme de pH).

L'ensemble des résultats précédemment exposés soulèvent deux questions :

Si d'une part la MOD issue des effluents de STEP révèle un pouvoir complexant plus important que la MOD en amont de Paris, et d'autre part que cette MOD semble peu altérée, comment la biodégradation affecte t'elle la spéciation des métaux en aval de la Seine ?

Si la MOD d'origine anthropique possède un fort pouvoir complexant vis-à-vis du cuivre et du plomb, qu'en est-il de son pouvoir protecteur vis-à-vis de la toxicité des métaux pour les organismes vivants dans le milieu aquatique ?

Cette deuxième question fera l'objet du troisième et dernier chapitre de cette étude.

II.5. BIBLIOGRAPHIE

Abate G. and Masini J. C. (2002). "Complexation of Cd(II) and Pb(II) with humic acids studied by anodic stripping voltammetry using differential equilibrium functions and discrete site models". *Organic Geochemistry* **33** (10), 1171-1182.

Ahearn G. A., Mandal P. K. and Mandal A. (2004). "Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review". *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **174** (6), 439-452.

Altmann R. S. and Buffle J. (1988). "The use of differential equilibrium functions for interpretation of metal binding in complex ligand systems: Its relation to site occupation and site affinity distributions". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **52** (6), 1505-1519.

Anderson D. M. and Morel F. M. M. (1978). "Copper sensitivity of *"Gonyaulax tamarensis"*". *Limnology and Oceanography* **23** (2), 283-290.

Anderson J. E., Myland J. C. and Oldham K. B. (1987). "Amalgam concentration at the surface of a spherical mercury electrode following a potential step". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **218** (1-2), 41-52.

Antelo J. M., Arce F. and Penedo F. J. (1998). "Effect of seasonal changes on the complexing of Cu(II) by dissolved organic matter in river water". *Water Research* **32** (9), 2714-2720.

Avena M. J., Vermeer A. W. P. and Koopal L. K. (1999). "Volume and structure of humic acids studied by viscometry pH and electrolyte concentration effects". *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **151** (1-2), 213-224.

Bard A. J. and Faulkner L. R. (1983). "Electrochimie, principes, méthodes et applications". *Masson*, Paris, 791p.

Batley G. E. (1989.). "Trace element speciation: analytical methods and problems". *CRC Press,*, Boca Raton,

Batley G. E., Apte S. C. and Stauber J. L. (2004). "Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982". *Australian Journal of Chemistry* **57** (10), 903-919.

Benedetti M. F., Milne C. J., Kinniburgh D. G., Vanriemsdijk W. H. and Koopal L. K. (1995). "Metal ion binding to humic substances - application of the Non Ideal Competitive Adsorption model". *Environmental Science and Technology* **29** (2), 446-457.

Benedetti M. F., Van Riemsdijk W. H. and Koopal L. K. (1996a). "Humic substances considered as a heterogeneous Donnan gel phase". *Environmental Science and Technology* **30** (6), 1805-1813.

Benedetti M. F., Van Riemsdijk W. H., Koopal L. K., Kinniburgh D. G., Gooddy D. C. and Milne C. J. (1996b). "Metal ion binding by natural organic matter: From the model to the field". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **60** (14), 2503-2513.

Benner R. and Opsahl S. (2001). "Molecular indicators of the sources and transformations of dissolved organic matter in the Mississippi river plume". *Organic Geochemistry* **32** (4), 597-611.

Berbel F., Cortés J., Díaz-Cruz J. M., Ariño C. and Esteban M. (1998). "Anodic stripping voltammetry of metal ions in mixtures of ligands". *Electroanalysis* **10** (6), 417-422.

Bernhard M., Brinckman F. E. and Sadler P. J. (1986). "The importance of chemical "speciation" in environmental processes". *Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG*, Berlin, 762p.

Brockaert J. A. C., Gucer S. and Adams F. (1990). "Metal speciation in the environment". *Springer-Verlag*, Berlin,

Brown G. K., Cabaniss S. E., MacCarthy P. and Leenheer J. A. (1999). "Cu(II) binding by a pH-fractionated fulvic acid". *Analytica Chimica Acta* **402** (1-2), 183-193.

Bruland K. W. (1992). "Complexation of Cadmium by Natural Organic-Ligands in the Central North Pacific". *Limnology and Oceanography* **37** (5), 1008-1017.

Bruland K. W., Rue E. L., Donat J. R., Skrabal S. A. and Moffett J. W. (2000). "Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample". *Analytica Chimica Acta* **405** (1-2), 99-113.

Buffle J. (1981). "Calculation of the surface concentration of the oxidized metal during the stripping step. in the anodic stripping techniques and its influence on speciation measurements in natural waters". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **125** (2), 273-294.

Buffle J. (1988). "Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach". Masson M. andTyson J. F., *Ellis Horwood*, New York, 692p.

Buffle J., Altmann R. S., Filella M. and Tessier A. (1990). "Complexation by natural heterogeneous compounds: Site occupation distribution functions, a normalized description of metal complexation". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **54** (6), 1535-1553.

Buffle J. and Tercier-Waeber M.-L. (2005). "Voltametric environmental trace-metal analysis and speciation: from laboratory to in situ measurements". *Trends in Analytical Chemistry* **24** (3), 172-191.

Buzier R., Tusseau-Vuillemin M. H., Meriadec C. M. D., Rousselot O. and Mouchel J. M. (2006). "Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: Impact of the successive treatments stages". *Chemosphere* **65** (11), 2419-2426.

Cabaniss S. E. and Shuman M. S. (1988). "Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee River fulvic acid equilibria". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **52** (1), 185-193.

Cao J., Lam K. C., Dawson R. W., Liu W. X. and Tao S. (2004). "The effect of pH, ion strength and reactant content on the complexation of Cu^{2+} by various natural organic ligands from water and soil in Hong Kong". *Chemosphere* **54** (4), 507-514.

Cathalifaud G., Ayele J. and Mazet M. (1997). "Etude de la complexation des ions aluminium par des molecules organiques: Constantes et stoechiometrie des

complexes. Application au traitement de potabilisation des eaux: Aluminium ions/organic molecules complexation: Formation constants and stoichiometry. Application to drinking water production". *Water Research* **31** (4), 689-698.

Chau Y. K. and Lum-Shue-Chan K. (1974). "Determination of labile and strongly bound metals in lake water". *Water Research* **8** (6), 383-388.

Cheng T. and Allen H. E. (2006). "Comparison of zinc complexation properties of dissolved natural organic matter from different surface waters". *Journal of Environmental Management* **80** (3), 222-229.

Cheng T., De Schamphelaere K., Lofts S., Janssen C. and Allen H. E. (2005). "Measurement and computation of zinc binding to natural dissolved organic matter in European surface waters". *Analytica Chimica Acta* **542** (2), 230-239.

Christensen J. B. and Christensen T. H. (2000). "The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted groundwater". *Water Research* **34** (15), 3743-3754.

Christl I. and Kretzschmar R. (2001). "Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular sze. 1. proton binding". *Environmental Science and Technology* **35** (12), 2505-2511.

Christl I., Metzger A., Heidmann I. and Kretzschmar R. (2005). "Effect of humic and fulvic acid concentrations and ionic strength on copper and lead binding". *Environmental Science and Technology* **39** (14), 5319-5326.

Collinson M. M. (1999). "Sol-gel strategies for the preparation of selective materials for chemicals analysis". in *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, CRC press, Boca Raton, 289-312.

Companys E. (2003)."Speciation of heavy metals in macromolecular systems by electroanalytical techniques" Departament de Química, *Universitat de Lleida, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària*, 200p.

Companys E., Cecilia J., Codina G., Puy J. and Galceran J. (2005). "Determination of Zn^{2+} concentration with AGNES using different strategies to reduce the deposition time". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **576** (1), 21-32.

Companys E., Garces J. L., Salvador J., Galceran J., Puy J. and Mas F. (2007a). "Electrostatic and specific binding to macromolecular ligands - A general analytical expression for the Donnan volume". *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **306** (1-3), 2-13.

Companys E., Puy J. and Galceran J. (2007b). "Humic acid complexation to Zn and Cd determined with the new electroanalytical technique AGNES". *Environmental Chemistry* **4** (5), 347-354.

Croué J. P., Benedetti M. F., Violleau D. and Leenheer J. A. (2003). "Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site". *Environmental Science and Technology* **37** (2), 328-336.

Davison W. and Zhang H. (1994). "In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels". *Nature* **367** (6463), 546-548.

De Wit J. C. M., Nederlof M. N., van Riemsdijk W. H. and Koopal L. K. (1991). "Determination of proton and metal ion affinity distributions for humic substances." *Wat. Air Soil Poll.* **57–58**, 339–349.

De Wit J. C. M., Van Riemsdijk W. H., Nederlof M. M., Kinniburgh D. G. and Koopal L. K. (1990). "Analysis of ion binding on humic substances and the determination of intrinsic affinity distributions". *Analytica Chimica Acta* **232**, 189-207.

Domingos R. F., Huidobro C., Companys E., Galceran J., Puy J. and Pinheiro J. P. (2008). "Comparison of AGNES (absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping) and SSCP (scanned stripping chronopotentiometry) for trace metal speciation analysis". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **617** (2), 141-148.

Durst R. A. (1969). " Ion Selective Electrodes". *U.S. Government Printing Office*, Washington D.C., 452p.

Dzombak D., Fish W. and Morel F. L. L. (1986). "Metal-Humate interactions: 1 Discrete ligand and continuous distribution models". *Environmental Science and Technology* **20**, 669-675.

Eary L. E. and Jenne E. A. (1992). "Version 4.00 of the MINTEQ Geochemical Code.Paci.c". Northwest National Laboratory Report PNL-8190. 155.

Erk M. and Raspor B. (2001). "Anodic stripping voltammetry in the complexation study of the peptide Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala [56-61] MT I and cadmium: application in determination of the complexing capacity and stability constant". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **502** (1-2), 174-179.

Esteves da Silva J. C. G., Machado A. A. S. C. and Silva M. A. B. A. (1998). "Acid–base properties of fulvic acids extracted from an untreated sewage sludge and from compost sludge." *Water Research* **32**, 441–449.

Esteves da Silva J. C. G. and Oliveira C. J. S. (2002). "Metal ion complexation properties of fulvic acids extracted from composted sewage sludge as compared to a soil fulvic acid". *Water Research* **36** (13), 3404-3409.

Felmy A. R., Girvin D. and Jenne E. A. (1984). "MINTEQ: A computer program for calculating aqueous geochemical equilibria". *US Environmental Protection Agency*, 98.

Fish W., Dzombak D. A. and Morel F. M. M. (1986). "Metal-Humate interactions: 2 Application and comparison of models". *Environmental Science and Technology* **20**, 676-683.

Florence T. M. (1986). "Electrochemical approaches to trace element speciation in waters. A review." *Analyst* **111**, 489–505.

Florence T. M. and Batley G. E. (1980). "Chemical speciation in natural waters." *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **9**, 219–296.

Fuchs S., Haritopoulou T., Schafer M. and Wilhelmi M. (1997). "Heavy metals in freshwater ecosystems introduced by urban rainwater runoff - Monitoring of suspended solids, river sediments and biofilms". *Water Science and Technology* **36** (8-9), 277-282.

Fukushi K., Kato S., Antsuki T. and Omura T. (2001). "Isolation of copper-binding proteins from activated sludge culture". *Water Science and Technology* **44** (2-3), 453-459.

Galceran J., Companys E., Puy J., Cecilia J. and Garces J. L. (2004). "AGNES: a new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **566** (1), 95-109.

Galceran J., Huidobro C., Companys E. and Alberti G. (2007). "AGNES: A technique for determining the concentration of free metal ions. The case of Zn(II) in coastal Mediterranean seawater". *Talanta* **71** (4), 1795-1803.

Galceran J., Salvador J., Puy J., Mas F., Giménez D. and Esteban M. (1998). "Amalgamation effects in reverse pulse polarography at spherical electrodes. Influence on speciation measurements". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **442** (1-2), 151-167.

Gamble D. S. (1970). "Titration curves of fulvic acid: the analytical chemistry of a weak acid polyelectrolyte." *Canadian Journal of Chemistry* **48**, 2662–2669.

Gamble D. S., Underdown A. W. and Langford C. H. (1980.). "Copper(II) titration of fulvic acid ligand sites with theoretical, potentiometric, and spectrophotometric analysis". *Analytical Chemistry* **52**, 1901–1908.

Garnier C. (2004)."Modélisation et évaluation des équilibres de complexation entre la matière organique naturelle, les métaux traces et le proton. Applications aux eaux naturelles" *Université du Sud Toulon Var*, 202p.

Garnier C., Mounier S. and Benaim J. Y. (2004a). "Metal logarithmic scale titration as a tool for complexing ligand distribution determination: An application by DPASV". *Environmental Technology* **25** (5), 589-599.

Garnier C., Pizeta I., Mounier S., Benaim J. and Branica M. (2004b). "Influence of the type of titration and of data treatment methods on metal complexing parameters determination of single and multi-ligand systems measured by stripping voltammetry". *Analytica Chimica Acta* **505** (2), 263-275.

Garrett R. G. (2000). "Natural sources of metals to the environment". *Human and Ecological Risk Assessment* **6** (6), 945-963.

Gran G. (1988). "Equivalence volumes in potentiometric titrations". *Analytica Chimica Acta* **206**, 111-123.

Gromaire M. C., Garnaud S., Saad M. and Chebbo G. (2001). "Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers". *Water Research* **35** (2), 521-533.

Gustafsson J. P., Pechova P. and Berggren D. (2003). "Modeling metal binding to soils: the role of natural organic matter". *Environmental Science and Technology* **37** (12), 2767-2774.

Hirata H. and Higashiyama K. A. C., De Schamphelaere (1971). "A new type of lead (II) ion-selective ceramic membrane electrode". *Analytica Chimica Acta* **54** (3), 415-422.

Huidobro C., Companys E., Puy J., Galceran J. and Pinheiro J. P. (2007). "The use of microelectrodes with AGNES". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **606** (2), 134-140.

Katchalsky A., Alexandrowicz Z. and Kedem O. (1966). "Chemical physics of ionic solutions". Conway B. E. andBarradas R. G., *John Wiley & Sons*, New York,

Kinniburgh D. G., Milne C. J., Benedetti M. F., Pinheiro J. P., Filius J., Koopal L. K. and Van Riemsdijk W. H. (1996). "Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan model". *Environmental Science and Technology* **30** (5), 1687-1698.

Kinniburgh D. G., Van Riemsdijk W. H., Koopal L. K., Borkovec M., Benedetti M. F. and Avena M. J. (1999). "Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **151** (1-2), 147-166.

Koopal L. K., Saito T., Pinheiro J. P. and Riemsdijk W. H. v. (2005). "Ion binding to natural organic matter: general considerations and the NICA-Donnan model". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **265** (1-3), 40-54.

Koopal L. K., Vanriemsdijk W. H., Dewit J. C. M. and Benedetti M. F. (1994). "Analytical Isotherm Equations for Multicomponent Adsorption to Heterogeneous Surfaces". *Journal of Colloid and Interface Science* **166** (1), 51-60.

Korshin G. V., Frenkel A. I. and Stern E. A. (1998). "EXAFS Study of the Inner Shell Structure in Copper(II) Complexes with Humic Substances". *Environmental Science & Technology* **32** (18), 2699-2705.

Koukal B., Gueguen C., Pardos M. and Dominik J. (2003). "Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *"Pseudokirchneriella subcapitata"*". *Chemosphere* **53** (8), 953-961.

Kozelka P. B. and Bruland K. W. (1998). "Chemical speciation of dissolved Cu, Zn, Cd, Pb in Narragansett Bay, Rhode Island". *Marine Chemistry* **60** (3-4), 267-282.

Lam M. T., Murimboh J., Hassan N. M. and Chakrabarti C. L. (2001). "Kinetic speciation of lead and cadmium in freshwaters using square-wave anodic stripping voltammetry with a thin mercury film rotating disk electrode". *Electroanalysis* **13** (2), 94-99.

Lamelas C., Wilkinson K. J. and Slaveykova V. I. (2005). "Influence of the composition of Natural Organic Matter on Pb bioavailability to microalgae". *Environmental Science and Technology* **39** (16), 6109-6116.

Landner L. (1987). "Speciation of metals in water, sediment and soil systems". Landner L., *Springer-Verlag,*, Berlin, 190p.

Lehto N. J., Davison W., Zhang H. and Tych W. (2006). "An evaluation of DGT performance using a dynamic numerical model". *Environmental Science and Technology* **40** (20), 6368-6376.

Leppard G. G. (1983). "Trace element speciation in surface waters". Leppard G. G., *Plenum*, New York, 320p.

Lorenzo J. I., Nieto O. and Beiras R. (2002). "Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *"Paracentrotus lividus"* larvae in seawater". *Aquatic Toxicology* **58** (1-2), 27-41.

Lu Y. and Allen H. E. (2002). "Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)--link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg". *Water Research* **36** (20), 5083-5101.

Ma H., Allen H. E. and Yin Y. (2001). "Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent". *Water Research* **35** (4), 985-996.

Mackey D. J., O'Sullivan J. E., Watson R. J. and Pont G. D. (1997). "Interference effects in the extraction of trace metals from estuarine waters". *Marine Chemistry* **59** (1-2), 113-126.

Marinsky J. A. (1992). "A Gibbs-Donnan-Based Interpretation of the Sensitivity of the Measurable Acid Dissociation Properties of Poly(Acrylic Acid) to Concentration Levels of Salt and Polyelectrolyte". *Journal of Physical Chemistry* **96** (15), 6484-6487.

Marinsky J. A. and Reddy M. M. (1991). "Employment of Gibbs-Donnan-Based Concepts for Interpretation of the Properties of Linear Polyelectrolyte Solutions". *Journal of Physical Chemistry* **95** (24), 10208-10214.

Martin J. H. and Fitzwater S. E. (1988). "Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic". *Nature* **331** (6154), 341-343.

Martin J. H., Gordon R. M. and Fitzwater S. E. (1991). "The case for iron". *Limnology and Oceanography* **36** (8), 1793-1802.

Masini J. C., Abate G., Lima E. C., Hahn L. C., Nakamura M. S., Lichtig J. and Nagatomy H. R. (1998). "Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids". *Analytica Chimica Acta* **364** (1-3), 223-233.

Meylan S., Odzak N., Behra R. and Sigg L. (2004). "Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models". *Analytica Chimica Acta* **510** (1), 91-100.

Miller C. V., Foster G. D. and Majedi B. F. (2003). "Baseflow and stormflow metal fluxes from two small agricultural catchments in the Coastal Plain of the Chesapeake Bay Basin, United States". *Applied Geochemistry* **18** (4), 483-501.

Millward G. E. (1995). "Processes Affecting Trace-Element Speciation in Estuaries - a Review". *Analyst* **120** (3), 609-614.

Milne C. J., Kinniburgh D. G., de Wit J. C. M., van Riemsdijk W. H. and Koopal L. K. (1995). "Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59** (6), 1101-1112.

Milne C. J., Kinniburgh D. G. and Tipping E. (2001). "Generic NICA-Donnan model parameters for proton binding by humic substances". *Environmental Science and Technology* **35** (10), 2049-2059.

Milne C. J., Kinniburgh D. G., van Riemsdijk W. H. and Tipping E. (2003). "Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances". *Environmental Science and Technology* **37** (5), 958-971.

Miyajima T. (1995). " Evaluation of the electrostatic effect on metal Ion-binding equilibria in negatively charged polyion systems". in *Ion exchange and solvent extraction*, Marinsky J. A. andMarcus Y., Marcel Dekker, New York,, 456.

Monbet P. and Coquery M. (2003). "Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques". Paris. *INERIS*, 87.

Morel M. L. L. (1983). "Principles of aquatic chemistry". *John Wiley & sons*, New York, 446p.

Morelli E., Cruz B. H., Somovigo S. and Scarano G. (2002). "Speciation of cadmium-[gamma]-glutamyl peptides complexes in cells of the marine microalga *"Phaeodactylum tricornutum"*". *Plant Science* **163** (4), 807-813.

Mota A. M. and Correira Dos Santos M. M. (1995). "Trace metal speciation of labile chemical species in natural waters : electrochemical methods". in *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Tessier A. andTurner D. R., 205-257.

Muller F. L. L. (1996). "Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters". *Marine Chemistry* **52** (3-4), 245-268.

Muller F. L. L. (1999). "Evaluation of the effects of natural dissolved and colloidal organic ligands on the electrochemical lability of Cu, Pb and Cd in the Arran Deep, Scotland". *Marine Chemistry* **67** (1-2), 43-60.

Muller F. L. L., Gulin S. B. and Kalvoy A. (2001). "Chemical speciation of copper and zinc in surface waters of the western Black Sea". *Marine Chemistry* **76** (4), 233-251.

Myland J. C., Oldham K. B. and Zoski C. G. (1985). "Electroactive concentrations at the surface of a spherical electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **193** (1-2), 3-22.

Nagasawa M., Murase T. and Kondo K. (1965). "Potentiometric Titration of Stereoregular Polyelectrolytes". *J. Phys. Chem.* **69** (11), 4005-4012.

Ndung'u K., Franks R. P., Bruland K. W. and Flegal A. R. (2003). "Organic complexation and total dissolved trace metal analysis in estuarine waters: comparison of solvent-extraction graphite furnace atomic absorption spectrometric and chelating resin flow injection inductively coupled plasma-mass spectrometric analysis". *Analytica Chimica Acta* **481** (1), 127-138.

Nederlof M. M., van Riemsdijk W. H. and Koopal L. K. (1990). "Determination of adsorption affinity distributions: A general framework for methods related to local isotherm approximations". *Journal of Colloid and Interface Science* **135** (2), 410-426.

Parkhurst D. L., Thorstenson D. C. and Plummer L. N. (1980). "PHREEQE-a computer program for geochemical calculations". US Geological Survey Report, USGS/WRI-80-96. 193.

Patel-Sorrentino N., Mounier S. and Benaim J. Y. (2002). "Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers". *Water Research* **36** (10), 2571-2581.

Pei J., Tercier-Waeber M.-L. and Buffle J. (2000). "Simultaneous determination and speciation of zinc, cadmium, lead, and copper in natural water with minimum

handling and artifacts, by voltammetry on a gel-integrated microelectrode array". *Analytical Chemistry* **72**, 161-171.

Perdue E. M. and Lytle C. R. (1983). "A distribution model for binding of protons and metal ions by humic substances". *Environmental Science and Technology* **17** (11), 654-660.

Pinheiro J. P., Mota A. M. and Benedetti M. F. (1999). "Lead and calcium binding to fulvic acids: salt effect and competition". *Environmental Science and Technology* **33** (19), 3398-3404.

Pinheiro J. P., Mota A. M. and Benedetti M. F. (2000). "Effect of aluminum competition on lead and cadmium binding to humic acids at variable ionic strength". *Environmental Science and Technology* **34** (24), 5137-5143.

Pizeta I. and Branica M. (1997). "Simulation and fitting of anodic stripping voltammetry data for determination of the metal complexing capacity". *Analytica Chimica Acta* **351** (1-3), 73-82.

Plavsic M., Gasparovic B. and Cosovic B. (2007). "Copper complexation and surfactant activity of organic matter in coastal seawater and surface microlayer samples from north Norwegian fjords and NW Mediterranean region". *Fresenius Environmental Bulletin* **16** (4), 372-378.

Plavsic M., Orlovic-Leko P., Kozarac Z., Bura-Nakic E., Strmecki S. and Cosovic B. (2008). "Complexation of copper ions in atmospheric precipitation in Croatia". *Atmospheric Research* **87** (1), 80-87.

Plette A. C. C., van Riemsdijk W. H., Benedetti M. F. and van der Wal A. (1995). "pH Dependent Charging Behavior of Isolated Cell Walls of a Gram-Positive Soil Bacterium". *Journal of Colloid and Interface Science* **173** (2), 354-363.

Qiu J.-W., Tang X., Zheng C., Li Y. and Huang Y. (2007). "Copper complexation by fulvic acid affects copper toxicity to the larvae of the polychaete Hydroides elegans". *Marine Environmental Research* **64** (5), 563-573.

Ridame C., Guieu C. and Loye-Pilot M. D. (1999). "Trend in total atmospheric deposition fluxes of aluminium, iron, and trace metals in the northwestern Mediterranean over the past decade (1985-1997)". *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **104** (D23), 30127-30138.

Riso R., Le Corre P. and Chaumery C. J. (1997). "Rapid and simultaneous analysis of trace metals (Cu, Pb and Cd) in seawater by potentiometric stripping analysis". *Analytica Chimica Acta* **351**, 83-89.

Riso R. D., Pernet-Coudrier B., Waeles M. and Le Corre P. (2007). "Dissolved iron analysis in estuarine and coastal waters by using a modified adsorptive stripping chronopotentiometric (SCP) method". *Analytica Chimica Acta* **598**, 235-241.

Ritchie J. D. and Perdue E. M. (2003). "Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67** (1), 85-96.

Rollemberg M. C. and Simoes Goncalves M. S. L. (2000). "Kinetics of uptake of cadmium by *"Chlorella marina"* in different media". *Bioelectrochemistry* **52** (1), 57-62.

Roman D. A. and Rivera L. (1992). "The behaviour of a Cu(II) ion selective electrode in seawater; copper consumption capacity and copper determinations". *Marine chemistry* **38** (3-4), 165-184.

Rozan T. F. and Gaboury B. (1999). "Geochemical factors controlling free Cu ion concentrations in river water". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **63** (19-20), 3311-3319.

Rozan T. F., Gaboury B., Marsh H. and Chin Y.-P. (1999). "Intercomparison of DPASV and ISE for the measurement of Cu complexation characteristics of NOM in freshwater". *Environmental Science and Technology* **33** (10), 1766-1770.

Rusch U., Borkovec M., Daicic J. and Van Riemsdijk W. H. (1997). "Interpretation of competitive adsorption isotherms in terms of affinity distributions". *Journal of Colloid and Interface Science* **191** (1), 247-255.

Ruzic I. (1982). "Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation". *Analytica Chimica Acta* **140** (1), 99-113.

Salbu B. and Steinnes E. (1995). "Trace elements in natural waters". *CRC Press*, Boca Raton, 314p.

Sarathy V. and Allen H. E. (2005). "Copper complexation by dissolved organic matter from surface water and wastewater effluent". *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**, 337-344.

Scally S., Davison W. and Zhang H. (2003). "In Situ Measurements of Dissociation Kinetics and Labilities of Metal Complexes in Solution Using DGT". *Environmental Science and Technology* **37** (7), 1379-1384.

Scally S., Davison W. and Zhang H. (2006). "Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films". *Analytica Chimica Acta* **558** (1-2), 222-229.

Scally S., Zhang H. and Davison W. (2004). "Measurements of lead complexation with organic ligands using DGT". *Australian Journal of Chemistry* **57** (10), 925-930.

Scarano G., Bramanti E. and Zirino A. (1992). "Determination of copper complexation in sea water by a ligand competition technique with voltammetric measurement of the labile metal fraction". *Analytica Chimica Acta* **264** (1), 153-162.

Scarano G. and Morelli E. (2002). "Characterization of cadmium- and lead-phytochelatin complexes formed in a marine microalga in response to metal exposure". *BioMetals* **15** (2), 145-151.

Scatchard G. (1949). "The attraction of proteins for small molecules and ions". *Annals of New York, Academy of Sciences* **57**, 660-672.

Shank G. C., Skrabal S. A., Whitehead R. F. and Kieber R. (2004). "Strong copper complexation in an organic-rich estuary: the importance of allochthonous dissolved organic matter". *Marine Chemistry* **88** (1-2), 21-39.

Shuman M. S. (1990). "Carboxyl acidity of aquatic organic matter : possible systematic errors introduced by XAD extraction". in *Organic Acids in Aquatic Ecosystems*, Ltd J. W. a. s., Perdue, E. M. and Gjessing, E. T., Chapel Hill, 97-109.

Shuman M. S., Collins B. J., P.J. F. and Olson D. L. (1983). "Distribution of stability constants and dissociation rate constants among binding sites on estuarine copper-organic complexes: rotated disk electrode studies and an affinity spectrum analysis of ion-selective electrode and photometric data." in *Aquatic and Terrestrial Humic Materials,*, Christman R. F. andGjessing E. T., Ann Arbor Science, Ann Arbor, 349–370.

Slaveykova V. I., Wilkinson K. J., Ceresa A. and Pretsch E. (2003). "Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *"Chlorella Kesslerii""*. *Environmental Science and Technology* **37**, 1114-1121.

Soares H. M. V. M. and Vasconcelos M. T. S. D. (1995). "Potentiometric stripping analysis vs. Differential pulse anodic stripping voltammetry for copper (II) analysis at relatively positive deposition potential". *Analytica Chimica Acta* **303**, 255-263.

Sposito G. (1981). "Trace metals in contaminated waters". *Environmental Science and Technology* **15** (4), 396-403.

Takacs M., Alberts J. J. and Egeberg P. K. (1999). "Characterization of natural organic matter from eight Norwegian surface waters: Proton and copper binding". *Environment International* **25** (2-3), 315-323.

Tani Y., Soma M., Harsanyi E. G. and Umezawa Y. (1999). "Effect of dissolved oxygen on the respons of Cu(II) ion selective electrodes in metal buffer solutions". *Analytica Chimica Acta* **395** (1-2), 53-63.

Tessier A. and Turner D. R. (1995). "Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". Buffle J. andVan Leeuwen H. P., *John Wiley & sons*, Chichester, 679p.

Thakur A. K., Munson P. J., Hunston D. L. and Rodbard D. (1980). "Characterization of ligand-binding systems by continuous affinity distributions of arbitrary shape". *Analytical Biochemistry* **103** (1), 240-254.

Thévenot D., Meybeck M. and Lestel L. (2002). "Métaux lourds: des bilans en mutation". Rapport de synthèse PIREN-Seine 1998–2001. 76.

Thévenot D. R., Moilleron R., Lestel L., Gromaire M.-C., Rocher V., Cambier P., Bonté P., Colin J.-L., de Pontevès C. and Meybeck M. (2007). "Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn". *Science of The Total Environment Human activity and material fluxes in a regional river basin: the Seine River watershed - Seine Special Issue* **375** (1-3), 180-203.

Tipping E. (1993). "Modelling ion binding by humic acids". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **73**, 117-131.

Tipping E. and Hurley M. A. (1992). "A unifying model of cation binding by humic substances". *Geochimica et Cosmochimica Acta* **56** (10), 3627-3641.

Town R. M. (1998). "Chronopotentiometric stripping analysis as a probe for copper (II) and lead (II) complexation by fulvic acid: limitations and potentialities". *Analytica Chimica Acta* **363**, 31-43.

Town R. M. and Filella M. (2000a). "A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters". *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **62** (3), 252-295.

Town R. M. and Filella M. (2000b). "Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters?" *Limnology and Oceanography* **45** (6), 1341-1357.

Town R. M. and Filella M. (2002). "Implications of natural organic matter binding heterogeneity on understanding lead(II) complexation in aquatic systems". *The Science of The Total Environment* **300** (1-3), 143-154.

Town R. M. and Van Leeuwen H. P. (2002a). "Effects of adsorption in stripping chronopotentiometric metal speciation analysis". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **523**, 1-15.

Town R. M. and Van Leeuwen H. P. (2002b). "Significance of wave form parameters in stripping chronopotentiometric metal speciation analysis". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **535** (1-2), 11-25.

Town R. M. and Van Leeuwen H. P. (2004). "Dynamic Speciation Analysis of Heterogeneous Metal Complexes with Natural Ligands by Stripping Chronopotentiometry at Scanned Deposition Potential (SSCP)". *Australian Journal of Chemistry* **57** (10), 983-992.

Town R. M. and Van Leeuwen H. P. (2004). "Depletive stripping chronopotentiometry: A major step forward in electrochemical stripping techniques for metal ion speciation analysis". *Electroanalysis* **16** (6), 458-471.

Tukey J. W. (1977). "Exploratory data analysis". *Adsison-Wesley*, New York, 506p.

Ure A. M. and Davidson C. M. (1995). "Chemical speciation in the environment". *Blackie*, Glasgow,

Van den Berg C. M. G. (1982). "Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO_2 I. Theory". *Marine Chemistry* **11** (4), 307-322.

Van den Berg C. M. G. (1984). "Determination of the complexing capacity and conditional stability constants of complexes of copper(II) with natural organic ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complex ions". *Marine Chemistry* **15** (1), 1-18.

Van den Hoop M. A. G. T., Van Leeuwen H. P., Pinheiro J. P., Mota A. M. and Simoes Gonçalves M. L. (1995). "Voltammetric analysis of the competition between calcium and heavy metals for complexation by humic material". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **95** (2-3), 305-313.

Van Leeuwen H. P. (2001). "Revisited: the conception of lability of metal complexes". *Electroanalysis* **13** (10), 826-830.

Van Leeuwen H. P. and Town R. M. (2002). "Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 1. Fundamental features". *Journal of Electroanalytical Chemistry* **536**, 129-140.

Van Leeuwen H. P. and Town R. M. (2003). "Electrochemical metal speciation analysis of chemically heterogeneous samples: The outstanding features of stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential". *Environmental Science and Technology* **37** (17), 3945-3952.

Vasconcelos M. T. S. D. and Leal M. F. C. (2001a). "Antagonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae *"Emiliania huxleyi'"*". *Marine Chemistry* **75** (1-2), 123-139.

Vasconcelos M. T. S. D. and Leal M. F. C. (2001b). "Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae". *Marine Chemistry* **74** (1), 65-85.

Vermeer A. W. P. (1996)."Interactions between humic acid and hematite and their effects on metal ion speciation" Agricultural University, *Wageningen*, 199p.

Violleau D. (1999)."Intérêt du fractionnement et de l'extraction des matières organiques naturelles d'eaux de surface pour l'étude de leur propriétés structurales et de leur pouvoir complexant vis-à-vis du cuivre" Laboratoire de chimie de l'eau et de l'environnement, *Université de Poitiers*, 159p.

Wang J. (1985). "Stripping analysis, principles, instrumentation and applications". *VCH Publishers*, 160p.

Warnken K. W., Davison W., Zhang H., Galceran J. and Puy J. (2007). "In Situ Measurements of Metal Complex Exchange Kinetics in Freshwater". *Environmental Science and Pollution Research* **41** (9), 3179-3185.

Westall J. C. (1982). "FITEQL : a program for the determination of chemical equilibrium constants from experimental data". Technical Report. *Department of chemistry, Oregon state university*,

Westall J. C., Zachary J. L. and Morel F. (1976). "MINEQL : a program for the calculation of chemical equilibrium composition of aqueous systems". R.M. parsons laboratory technical note. *Massachusetts insitute of technology*, 18.

Wong C. S., Boyle E., Bruland K. W., Burton J. D. and Goldberg E. D. (1983). "Trace metals in seawater". *Plenum*, New York, 920p.

Wrobel K., Sadi B. B. M., Castillo J. R. and Caruso J. A. (2003). "Effect of metal ions on the molecular weight distribution of humic substances derived from municipal compost: ultrafiltration and size exclusion chromatography with spectrophotometric and Inductively Coupled Plasma-MS detection". *Analytical Chemistry* **75** (4), 761-767.

Xue H. and Sigg L. (1998). "Cadmium speciation and complexation by natural organic ligands in fresh water". *Analytica Chimica Acta* **363** (2-3), 249-259.

Ziniro A., Belli S. L. and Van Der Lee D. A. (1998). "Copper concentration and Cu(II) activity an San Diego Bay". *Electroanalysis* **10** (6), 423-427.

Zsolnay A. (2003). "Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions". *Geoderma* **113** (3-4), 187-209.

CHAPITRE III : INFLUENCE DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE SUR LA BIODISPONIBILITE DU CUIVRE

« Toute chose est un poison et il n'existe rien qui n'en soit pas un, seule la dose fait le poison »

Theophrastus Phillipus Auroleus Bombastus von Hohenheim (1493 - 1541)

TABLE DES MATIERES

III.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 189

III.1.1. CADRE CONCEPTUEL 189
III.1.1.1. Modèle de l'ion libre 189
III.1.1.2. Modèle du ligand biotique 191
III.1.2. ECHECS DU FIAM ET DU BLM DANS L'EXPLICATION DE LA BIODISPONIBILITE .. 191
III.1.2.1. Interaction métal - organisme 192
III.1.2.2. Etablissement d'un état stationnaire 193
III.1.2.3. Modification de la surface biologique 193
III.1.3. ACCUMULATION ET EFFET TOXIQUE 194
III.1.4. MESURES DE LA BIODISPONIBILITE 195
III.1.5. DETERMINATION DE LA BIODISPONIBILITE A L'AIDE DE BIOTESTS 196
III.1.5.1. Daphnie : un organisme très utilisé pour les études de toxicité 196
III.1.5.2. Bryophyte : d'excellents bioaccumulateurs 197
III.1.6. CONCLUSIONS BIBLIOGRAPHIQUES 198

III.2. MATERIEL ET METHODES 199

III.2.1. BIOTESTS DE TOXICITE 199
III.2.1.1. Préparation du matériel biologique 199
III.2.1.2. Protocole du biotest 199
III.2.2. BIOTESTS DE BIOACCUMULATION 201
III.2.2.1. Préparation du matériel biologique 201
III.2.2.2. Protocole du biotest 201

III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS 204

III.3.1. BIOTESTS DE TOXICITE 204
III.3.2. BIOTESTS DE BIOACCUMULATION 207
III.3.3. EVALUATION DU CUIVRE BIODISPONIBLE EN PRESENCE DE MOD : 3 APPROCHES 209
III.3.3.1. Evaluation du cuivre biodisponible par l'étude de la spéciation 210
III.3.3.2. Evaluation du cuivre biodisponible par l'effet toxique induit chez Daphnia 210
III.3.3.3. Evaluation du cuivre biodisponible par la mesure de bioaccumulation 212
III.3.3.4. Rôle de l'ion libre dans la bioaccumulation et la toxicité du cuivre 214

III.4. CONCLUSION 217

III.5. BIBLIOGRAPHIE 218

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Matrices des tests écotoxicologiques et concentrations en cuivre total testées . 200
Tableau 2 : Temps des prélèvements effectués pour la cinétique de bioaccumulation..... 202
Tableau 3 : Concentrations en cuivre libre calculées dans les conditions des biotests 210
Tableau 4 : Concentration en cuivre responsable de la toxicité observée chez Daphnia 211
Tableau 5 : Concentrations en cuivre initialement biodisponible pour chaque MOD..... 213
Tableau 6 : Confrontation des approches utilisées pour évaluer la biodisponibilité du Cu . 214

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Modèle de l'ion libre (Campbell, 1995)..... 190
Figure 2 : Représentation schématique du concept du BLM (Paquin et al., 2002)..... 191
Figure 3 : Relation entre biodisponibilité, accumulation, toxicité et spéciation d'un métal. 196
Figure 4 : Daphnia magna (Strauss) 199
Figure 5 : Fontinalis antipyretica (Hedw.)..... 201
Figure 6 : Bilan de masse du cuivre (MOD issues de STEP, échantillon A1)..... 203
Figure 7 : Courbes doses-réponses du cuivre labile (DGT) et total..... 204
Figure 8 : EC50 exprimées en cuivre total et labile (DGT) pour chaque fraction..... 205
Figure 9 : EC50 selon le type de fraction et le site de prélèvement 206
Figure 10 : Cinétique de disparition du cuivre total en solution..... 207
Figure 11 : Régression linéaire des concentrations mesurées 207
Figure 12 : Vitesse de bioaccumulation du Cu sur Fontinalis antipyretica..... 208
Figure 13 : Vitesse de bioaccumulation du Cu selon le type de fraction et l'origine..... 209
Figure 14 : Détermination de constante d'assimilation à partir des cinétiques 212
Figure 15 : Corrélation entre le cuivre toxique (EC50) et le cuivre bioaccumulable..... 214

III.1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Selon (Anderson *et al.*, 1999), la biodisponibilité est une mesure du potentiel d'un composé chimique à réagir avec des récepteurs biologiques. Elle est spécifique au récepteur, à l'itinéraire parcouru, au temps d'exposition et à la matrice (minérale ou organique) contenant le contaminant. La biodisponibilité des métaux sur les organismes aquatiques a été étudiée depuis de nombreuses années au travers de tests (notamment de toxicité) menés en laboratoire sur une grande variété d'espèces (Janssen *et al.*, 2000). Les organismes aquatiques sont exposés aux métaux, par leur milieu environnant. Cette exposition peut avoir lieu par différentes voies telles que par exemple l'interface eau-branchies pour les organismes supérieurs, et le régime alimentaire, i.e. la voie trophique. Bien que cette dernière voie puisse être responsable de la toxicité des métaux pour certaines espèces (Clearwater *et al.*, 2002) son importance n'est pas encore clairement élucidée, notamment pour les organismes pélagiques (De Schamphelaere et Janssen, 2004c). Dans cette étude focalisée sur la matière organique dissoute et son influence sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux dissous, seul le milieu aqueux sera considéré comme voie d'exposition.

III.1.1. Cadre conceptuel

III.1.1.1. Modèle de l'ion libre

Mis en évidence pour la première fois en 1978 (Anderson et Morel, 1978) dans le cadre d'une étude de la sensibilité d'un dinoflagellé vis-à-vis du cuivre, le rôle du métal libre pour l'expression de la toxicité, a démontré le lien entre la spéciation des métaux et leur effet toxique. Ce lien a été conceptualisé pour aboutir au modèle de l'ion libre (FIAM : Free Ion Activity Model) (Morel, 1983). L'hypothèse de ce modèle est l'existence de sites spécifiques de fixation des métaux (situés à la surface de l'organisme exposé au milieu), au travers desquels l'effet biologique s'exprime. L'interaction entre le métal et l'organisme se déroule alors en trois étapes (Campbell, 1995) (Figure 1) :

(i) la diffusion des espèces de la solution vers la surface de l'organisme,

(ii) la complexation du métal sur les sites spécifiques,

(iii) le transport éventuel du métal à travers la membrane, c'est-à-dire l'internalisation.

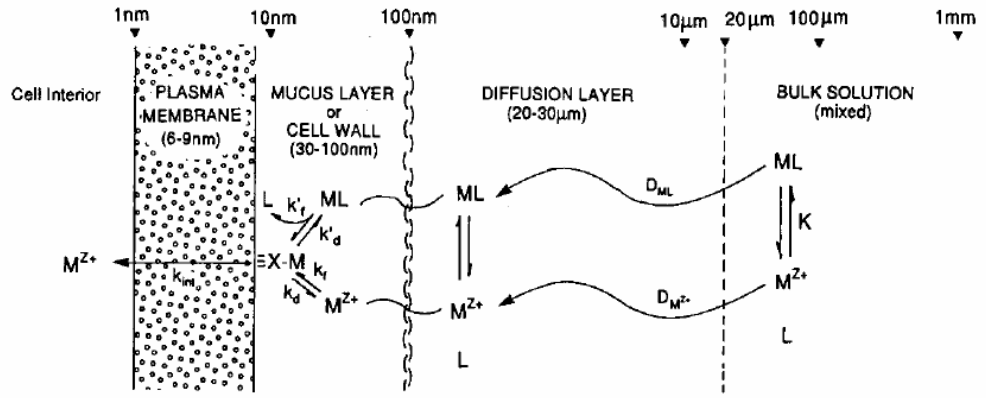


Figure 1. Conceptual model of metal–organism interactions. M^{z+} = free-metal ion; ML = metal complex in solution; M-X-membrane = surface metal complex; k_f, k'_f = rate constants for formation of the surface complex; k_d, k'_d = rate constants for dissociation of the surface complex; k_{int} = rate constant for 'internalization' or transport of the metal across the biological membrane. Charges on ligand not shown for simplicity. [Modified from Tessier, A. *et al.*, in *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems* (Boca Raton: Lewis, 1994) Chap. 6]

Figure 1 : Modèle de l'ion libre (Campbell, 1995)

De ces trois étapes, l'étape supposée limitante est celle d'internalisation du métal par l'organisme. Ceci implique que les complexes des sites membranaires spécifiques sont à l'état d'équilibre avec les espèces en solution. La quantité de métal fixé sur les sites spécifiques (*≡X-M*) est alors directement proportionnelle à l'activité du métal libre en solution quelle que soit la forme initiale du métal fixé, c'est-à-dire une espèce libre, ou une espèce complexée se dissociant à la surface membranaire. L'effet biologique sur l'organisme est alors directement proportionnel à l'activité du métal libre en solution sous l'hypothèse d'une proportionnalité directe entre l'effet biologique et la quantité de sites membranaires occupés par le métal. Les mécanismes intervenant entre l'accumulation d'un métal dans un organisme et l'expression de sa toxicité sont cependant plus complexes (cf. § III.1.3). C'est dans ce contexte que de nombreuses études se sont focalisées sur la bioaccumulation du métal (étape préalable à l'expression de la toxicité), plutôt que d'étudier directement l'effet toxique (Ah-Peng et De Traubenberg, 2004 ; Goodyear et McNeill, 1999). La biodisponibilité d'un métal est alors définie comme étant sa capacité à atteindre une cible biologique : comme par exemple traverser ou s'adsorber sur une membrane biologique. En conséquence, le FIAM est souvent formulé comme une proportionnalité directe entre métal libre en solution et quantité de métal bioaccumulé. Cette relation directe a pu être vérifiée expérimentalement (Vigneault et Campbell, 2005).

Le FIAM a ainsi permis de comprendre que l'effet protecteur vis-à-vis de l'accumulation (ou de la toxicité) des métaux, de la matière organique dissoute (Alberts *et al.*, 2001 ; Lorenzo *et al.*, 2002 ; Penttinen *et al.*, 1998 ; Van Ginneken *et al.*, 2001) et des matières particulaires (Ma *et al.*, 2002), provenait de la diminution de la quantité de métal libre en solution suite à leur complexation ou adsorption. Ainsi, depuis les années 80, la spéciation des métaux c'est-à-dire la répartition de leurs formes chimiques, est prise en compte pour étudier les mécanismes de la biodisponibilité et ainsi mieux prévoir leur toxicité. Il est important de préciser que cette thématique de recherche n'aurait pu être développée sans les nombreux progrès analytiques réalisés au cours des trente dernières années (Batley *et al.*, 2004).

III.1.1.2. Modèle du ligand biotique

Le modèle de l'ion libre a été validé pour différents organismes aquatiques allant du phytoplancton (Vigneault et Campbell, 2005) aux poissons (Van Ginneken *et al.*, 2001) Cependant, une modification de l'effet biologique par certains paramètres de la qualité de l'eau tel que le pH ou la dureté, a également été observée (Playle *et al.*, 1992). La grande variabilité de ces paramètres, d'un système aquatique à un autre, pose donc problème à l'application du FIAM pour l'évaluation d'un risque de toxicité. La première interprétation de cet effet, a été conceptualisée pour les poissons, par le modèle d'interactions à la surface des branchies (GSIM : Gill Surface Interaction Model) (Pagenkopf, 1983). De manière similaire au FIAM, l'effet biologique d'un métal est attribué à la formation d'un complexe de surface. La modification de l'effet biologique est alors exprimée par le pH et la dureté en considérant les cations présents dans le milieu (par exemple : H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) comme des compétiteurs du métal pour la formation de ce complexe.

C'est dans ce contexte que le modèle du ligand biotique (BLM : Biotic ligand Model) a été développé (Di Toro *et al.*, 2001) en reprenant le formalisme et les principales hypothèses du FIAM et du GSIM (Figure 2) (Paquin *et al.*, 2002).

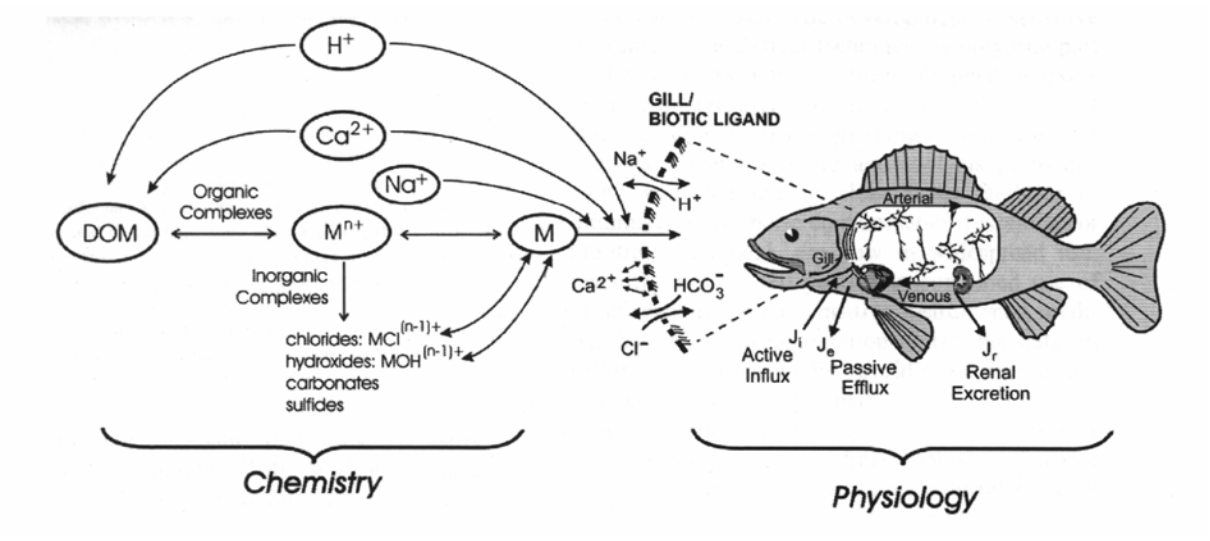


Figure 2 : Représentation schématique du concept du BLM (Paquin *et al.*, 2002)

L'effet biologique est ainsi proportionnel à la quantité de sites spécifiques occupés par le métal et dépend directement de la concentration du métal libre en solution et des cations compétiteurs en supposant que toutes les espèces soient en équilibre. Ce modèle montre donc que l'effet biologique dépend de la spéciation du métal et des cations majeurs présents dans le milieu.

III.1.2. Echecs du FIAM et du BLM dans l'explication de la biodisponibilité des métaux

Les modèles du FIAM et du BLM sont basés sur plusieurs hypothèses (interaction sur des sites spécifiques, espèces à l'équilibre, ion libre, etc.) ayant été vérifiées à de nombreuses occasions. Cependant, ces validations ont eu lieu principalement en laboratoire, sur un nombre limité d'espèces et dans des conditions expérimentales particulières (concentrations élevées en métaux, ligands synthétiques ou uniquement de nature humique, etc.). Depuis

quelques années, de nombreuses études ont montré des cas où ces modèles ne pouvaient être appliqués, mettant en défaut leurs hypothèses de base (Apte *et al.*, 2005 ; Errecalde *et al.*, 1998 ; Hassler *et al.*, 2004 ; Hassler et Wilkinson, 2003 ; Lamelas et Slaveykova, 2007 ; Lamelas *et al.*, 2005 ; Meylan *et al.*, 2004 ; Slaveykova *et al.*, 2003). Une évaluation de ces hypothèses de base du FIAM (et donc du BLM par extension) a été entreprise par Campbell (1995).

III.1.2.1. Interaction métal - organisme

La principale hypothèse de ces modèles est que l'effet toxique résulte de la formation d'un complexe métallique avec des sites spécifiques situés à l'interface eau-organisme. Cependant pour certains métaux (Hg, Sn, etc.) ou pour d'autres (Cu, Pb, Zn, Ag, etc.) en présence de certains ligands (chlorures, oxines, carbamates, xanthates, etc.) une toxicité plus importante que celle prédite par leur seule concentration en ion libre a été observée. Cette augmentation de toxicité est expliquée par la présence de complexes hydrophobes capables de traverser la membrane biologique de manière passive. L'hydrophobicité du composé, donc sa facilité à traverser la membrane, détermine alors sa biodisponibilité comme par exemple le méthyle mercure (CH_3Hg) (Westcott et Kalff, 1996), le chlorure d'argent (AgCl) (Bury et Hogstrand, 2002) et le cuivre qui forme des complexes lipophiles avec les oxines (Croot *et al.*, 1999) ou le dithiocarbamate (Phinney et Bruland, 1997).

Les métaux peuvent être également transportés dans l'organisme par des mécanismes actifs. En effet la membrane de l'organisme inclut des transporteurs permettant l'incorporation des éléments indispensables à son développement. Dans certains cas, un complexe métallique peut se substituer à l'espèce concernée par le transporteur et ainsi rendre ce complexe biodisponible comme par exemple pour des complexes inorganiques Ag/thiosulfate ($AgS_2O_3^-$) (Fortin et Campbell, 2001) ou organiques comme les citrates de zinc ou de cadmium (Errecalde *et al.*, 1998 ; Jansen *et al.*, 2002) ou des complexes acides aminés - zinc (Glover *et al.*, 2003 ; Jansen *et al.*, 2002). Une étude a également mis en évidence un autre mécanisme actif d'internalisation du zinc chez une algue verte faisant exception au FIAM (Hassler et Wilkinson, 2003). Alors que dans les exemples précédents, le transport des métaux était fortuit, le transport du zinc chez cette algue ne semble pas accidentel mais correspond plus à une stratégie de développement pour l'organisme.

La formation de complexes ternaires sur les sites spécifiques de l'organisme est actuellement le dernier mécanisme identifié, divergeant du FIAM. Comme formulé par le FIAM, l'effet toxique prend bien naissance par la formation d'un complexe métallique avec les sites membranaires. Cependant le ligand participe également à la formation de ce complexe augmentant ainsi la toxicité du métal qui sera alors proportionnelle non seulement à la forme libre mais aussi à la concentration du ligand en solution. C'est le cas de complexes inorganiques comme $CuOH^+$ pour la daphnie (Meador, 1991), $CdCl^+$ pour des bactéries (Villaescusa *et al.*, 1996) ou encore $PbOH^+$ et $PbCO_3$ pour des algues (Slaveykova et Wilkinson, 2003) bien que dans ce cas cette complexation ternaire n'ait pas été démontrée expérimentalement. Ces exceptions du FIAM, pourraient cependant être prises en compte par le modèle BLM, qui considère les complexes des métaux sur les sites spécifiques plutôt que leurs formes en solution. Ainsi, un modèle BLM a été adapté pour la daphnie (De Schamphelaere et Janssen, 2002 ; Santore *et al.*, 2001) intégrant une constante de complexation pour la fixation de $CuOH^+$ sur les sites spécifiques. Cette formation de complexes ternaires est également suspectée pour des complexes organiques du Cd avec l'alanine (Campbell *et al.*, 2002) et du Pb avec des ligands plus complexes (acides fulviques) (Slaveykova *et al.*, 2003).

Il est important de souligner que la plupart des études précédemment citées font référence à des observations faites sur du phytoplancton, car étant à la base de la chaîne trophique, et facile à cultiver sans apports de matière organique, il est très fréquemment étudié. Cependant des exemples concernant l'ensemble des niveaux trophiques existent (Gilbin, 2001). Si ces exceptions dans les mécanismes de biodisponibilité des métaux sont probablement spécifiques de la combinaison entre l'organisme, le métal et le ligand étudié, elles existent néanmoins à tous les niveaux de la chaîne trophique aquatique (Gilbin, 2002).

III.1.2.2. Etablissement d'un état stationnaire

Selon le modèle considéré, les relations de proportionnalité entre :

- le métal libre en solution et l'effet toxique (FIAM)
- le métal sur les sites spécifiques et l'effet toxique (BLM)

ne sont valables que si et seulement si toutes les espèces sont à l'équilibre. Autrement dit que l'étape d'internalisation du métal est limitante devant celle de diffusion des espèces de la solution vers les sites spécifiques. Dans ce cas la vitesse de diffusion est suffisante pour maintenir l'équilibre entre les espèces et pour atteindre un état stationnaire. Une étude a montré que les complexes inertes (ne se dissociant pas à l'échelle de temps considérée, hors complexes directement biodisponibles précédemment vus) ne peuvent contribuer à l'internalisation du métal, en revanche, dans certaines conditions, les complexes labiles (pouvant se dissocier plusieurs fois à l'échelle de temps considérée) peuvent contribuer à cette internalisation (Pinheiro *et al.*, 2004 ; Van Leeuwen, 1999). En effet lorsque que le métal libre consommé à l'interface organisme/solution (par l'étape d'internalisation) ne peut être suffisamment « renouvelé » par le phénomène de diffusion de la solution vers l'interface il y a rupture de l'état d'équilibre. L'équilibre est alors de nouveau atteint par la dissociation des complexes labiles dans la couche de diffusion, pouvant par la suite contribuer à l'internalisation. Des données expérimentales laissent supposer que cette contribution apparaît pour une concentration « seuil » de métal libre en solution : par exemple inférieure à 10^{-7} mol.l^{-1} pour du Zn^{2+} chez des moules (Jansen *et al.*, 2002) ; entre $10^{-16,5}$ et $10^{-14,5}$ mol.l^{-1} pour du Cu^{2+} chez du périphyton (biofilm algal) (Meylan *et al.*, 2004) ; 2.10^{-11} mol.l^{-1} de Zn^{2+} chez des algues (Hassler et Wilkinson, 2003). Cependant Meylan *et al.* (2004) soulignent qu'aucune toxicité due aux métaux n'est observée dans ce domaine de concentrations.

La nécessité de prendre en compte ces phénomènes dans les concepts du FIAM ou du BLM n'est donc pas résolue.

III.1.2.3. Modification de la surface biologique

Enfin, la dernière hypothèse importante des modèles FIAM et BLM est la constance des propriétés de la surface biologique durant l'exposition au métal. Cette hypothèse est généralement moins remise en cause que les précédentes (Niyogi et Wood, 2004), bien que les organismes s'adaptent en permanence aux perturbations du milieu environnant (Paquin *et al.*, 2002). Cependant ce phénomène de modification de la surface biologique a été observé pour les métaux essentiels comme par exemple le zinc dont l'affinité pour les sites spécifiques de la membrane d'algue et la vitesse d'internalisation varient pour des concentrations en Zn^{2+} comprises entre 2.10^{-9} et 5.10^{-6} mol.$^{-1}$ (Hassler *et al.*, 2004).

Au-delà du simple effet thermodynamique, la température a également expliqué des variations de bioaccumulation du Pb et du Zn dans de moindres proportions du fait de son caractère essentiel (Hassler *et al.*, 2004).

De plus, divers composés peuvent potentiellement changer la perméabilité de la membrane biologique aux métaux. Il a ainsi été supposé que l'augmentation de la dureté calcique (Ca^{2+}) diminue la perméabilité de la membrane (donc sa biodisponibilité) à l'ion Cd^{2+} chez la daphnie (Penttinen *et al.*, 1998). Ce phénomène a par la suite été vérifié expérimentalement par Hassler *et al.* (2004) pour le Pb et le Zn chez des algues. Une autre étude a également montré que la présence d'acides fulviques naturels en solution augmente le potentiel de surface d'algues (Slaveykova *et al.*, 2003), entraînant ainsi une biodisponibilité accrue de l'ion Pb^{2+}. De manière générale, il semble que la variation de la perméabilité de la membrane entraîne un changement de la vitesse d'internalisation du métal et donc modifie la relation entre le métal libre en solution et l'effet biologique.

A ce stade, il est important de préciser que : si peu de données ont permis d'évaluer l'importance de ces exceptions (précédemment citées) dans l'environnement, en revanche de nombreuses études ont validé les modèles FIAM et BLM. Campbell *et al.* (2002) écrivent d'ailleurs :

« La véritable mesure du succès d'un modèle est sa capacité à expliquer une large collection de données empiriques mieux qu'aucun autre modèle. Vingt ans après l'initiation du développement du BLM, il semble clair que ce modèle a réussi ce test. Un des challenges sera maintenant de démontrer son applicabilité en présence de ligands naturels comme les humiques ou fulviques et les sulfures réduits.»

III.1.3. Accumulation et effet toxique

L'hypothèse d'une relation directe entre le métal en interaction avec les sites spécifiques et l'effet toxique a une réalité physique dans le cas des poissons où certains métaux peuvent interagir avec les transporteurs d'ions (Na^{+}, Ca^{2+}, etc.) présents sur les branchies, perturbant ainsi l'osmorégulation c'est-à-dire la régulation de la pression osmotique de l'organisme par le contrôle de sa concentration interne en ions (Cl^{-}, Na^{+}, etc.) (Paquin *et al.*, 2002). Si il a été montré que le Ni perturbe la régulation de l'homéostasie (c'est-à-dire l'équilibre interne des cellules) du Mg chez la daphnie (Pane *et al.*, 2003), en revanche rien n'indique que les métaux exercent leur effet toxique directement au niveau de la membrane pour les autres organismes. En outre, il a été montré que les métaux, indépendamment du type d'organisme, ont généralement un effet intracellulaire (Rainbow, 2002) faisant intervenir différents mécanismes complexes entre l'internalisation d'un métal et l'expression de sa toxicité.

Les métaux peuvent être distingués en deux catégories. La première catégorie rassemble les éléments qui sont essentiels à la croissance, au développement voire à la reproduction des organismes vivants (par exemple : Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Se et Zn). Mais à fortes concentrations tous deviennent toxiques. Ils interviennent notamment dans la structure des protéines (ex. hémoglobine, cytochromes) ou comme co-facteur enzymatique (chaîne respiratoire) (Alberts *et al.*, 1998 ; Cavet *et al.*, 2003). En revanche le plomb, le mercure et le cadmium sont considérés comme toxiques quelque soit leur concentration puisqu'aucune fonction biologique n'a été mise en évidence à ce jour. La concentration des métaux est régulée par les organismes au niveau cellulaire (Rainbow, 2002).

Au niveau cellulaire, une partie du métal est considérée comme « métabolique » (négligeable dans le cas de métaux non essentiels), la deuxième partie étant en excès par rapport à la première, aboutira à l'expression d'un effet toxique lorsqu'elle dépassera un certain seuil. La part métabolique est régulée par des mécanismes d'accumulation, d'élimination mais également de stockage sous formes inertes. Ces trois mécanismes font

l'objet de processus divers suivant le métal et l'organisme considérés. Généralement, le stockage des métaux se fait au moyen (Vijver *et al.*, 2004) :

(1) de protéines ayant une très forte affinité pour les métaux (ex : métallothionéines),

(2) d'inclusions granulaires piégeant les métaux.

La relation directe entre métal accumulé et effet toxique n'est donc pas évidente et obligatoire. Dans ce contexte, beaucoup de travaux actuels étudient préférentiellement le flux d'internalisation du métal (i.e. biodisponibilité) plutôt qu'un effet toxique (Fernandez *et al.*, 2006 ; Kola et Wilkinson, 2005 ; Lamelas et Slaveykova, 2007 ; Lamelas *et al.*, 2005 ; Slaveykova et Wilkinson, 2003 ; Vigneault et Campbell, 2005).

III.1.4. Mesures de la biodisponibilité

Comme il a été discuté précédemment, la notion de biodisponibilité, se situe à l'interface entre le milieu et l'organisme, dépendant à la fois du métal, de son devenir dans l'environnement et de la physiologie de l'organisme exposé (Figure 3). La biodisponibilité peut être estimée de trois manières différentes et complémentaires :

(i) chimiquement en estimant la spéciation du métal puis en faisant une hypothèse de biodisponibilité sur chacune des formes chimiques prise par le métal,

(ii) biologiquement en mesurant la concentration en métal accumulé dans un organisme au cours de l'exposition. La bioaccumulation mesurée reflétant alors la biodisponibilité,

(iii) biologiquement en mesurant la réponse toxique d'un organisme à une exposition. Cette réponse biologique est alors le reflet de la concentration biodisponible du métal. Il existe deux types de toxicité selon le mode d'action et la quantité de métal dans le milieu :

- la toxicité aigüe conduisant à la mort de l'organisme et donc mesurée en pourcentage d'individus tués ou immobilisés,

- la toxicité chronique menant à des effets à plus long terme et évaluée par différentes mesures selon l'organisme étudié telles que la reproduction, les déformations, le retard de croissance, etc.

Selon la mesure effectuée, l'estimation de la biodisponibilité intègre plus ou moins de facteurs de variabilité. Ainsi, la mesure chimique de spéciation peut être plus précise car elle ne tient pas compte de la variabilité liée à l'organisme. Elle reste cependant difficile à évaluer dans l'environnement. A l'inverse, le biotest permet d'avoir une meilleure estimation du risque réel lié au polluant car il intègre tous les facteurs environnementaux et biologiques (physiologie et réponse interne), mais est aussi beaucoup plus variable et difficile à interpréter. En outre, selon le mode d'action toxique du métal, les effets aigus peuvent être visibles ou non aux concentrations environnementales observées (Rand *et al.*, 1995). Ainsi, à titre d'exemple , s'il est possible d'observer une toxicité aigüe en cuivre chez *Daphnia magna* à des concentrations environnementales (10^{-8} mol.l^{-1}) (De Schamphelaere *et al.*, 2002), en revanche la toxicité aigüe du Zn chez le même organisme (Daphnia magna) n'est observable qu'à des niveaux élevés (10^{-5} mol.l^{-1}) (De Schamphelaere *et al.*, 2004a).

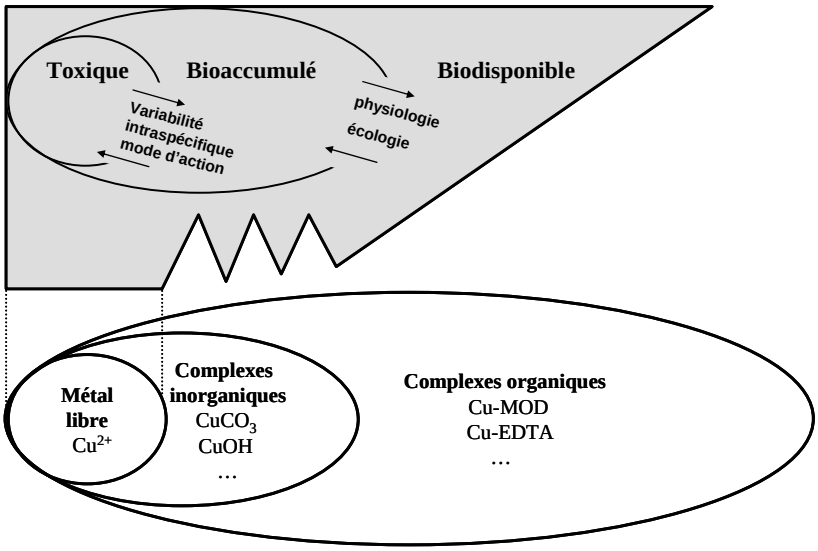


Figure 3 : Relation schématique entre la biodisponibilité, l'accumulation, la toxicité et la spéciation d'un métal dissous dans l'environnement

III.1.5. Détermination de la biodisponibilité à l'aide de biotests

III.1.5.1. Daphnie : un organisme très utilisé pour les études de toxicité

Daphnia magna (Strauss) est certainement l'un des organismes les plus étudiés et les plus utilisés pour les tests écotoxicologiques en raison de :

- sa grande sensibilité aux polluants,
- l'omniprésence du genre *Daphnia* dans les lacs
- son mode particulier de reproduction par parthénogénèse.

Ainsi les Daphnies ont été largement utilisée pour étudier la toxicité du cuivre et l'influence des divers paramètres (comme par exemple la matière organique) (Andrew *et al.*, 1977 ; Apte *et al.*, 2005 ; Bernard et Soumia, 2004 ; Bossuyt et Janssen, 2003 ; De Schamphelaere *et al.*, 2002, 2004a ; De Schamphelaere et Janssen, 2002 ; De Schamphelaere et Janssen, 2004a ; De Schamphelaere et Janssen, 2004b ; De Schamphelaere et Janssen, 2004c ; De Schamphelaere *et al.*, 2005 ; De Schamphelaere *et al.*, 2004b ; Kramer *et al.*, 2004 ; Meador, 1991 ; Santore *et al.*, 2001 ; Tsui *et al.*, 2006 ; Villavicencio *et al.*, 2005). Cet organisme a également servi pour l'étude de la toxicité d'autres métaux tels que le zinc, le cadmium, le nickel et le mercure (De Schamphelaere *et al.*, 2005 ; Guan et Wang, 2004, 2006 ; Hyne *et al.*, 2005 ; Oikari *et al.*, 1992 ; Pane *et al.*, 2003 ; Penttinen *et al.*, 1998 ; Penttinen *et al.*, 1995 ; Tsui *et al.*, 2006).

Daphnia magna est un crustacé du sous-ordre des cladocères. Sa taille varie entre environ 1 et 3 mm entre la naissance et l'âge adulte. Une introduction plus complète à la biologie des daphnies est donnée par exemple dans (Ebert, 2005). Elle possède notamment deux imposantes antennes, qui lui permettent de se déplacer et de faire refluer l'eau et les nutriments vers son appareil de filtration. Sa nourriture est généralement composée d'algues et de bactéries, mais aussi de sédiment fin brouté ou resuspendu (Gillis *et al.*, 2005). Le cycle de vie de la daphnie dans la nature se caractérise par un double mode de reproduction :

- un mode asexué appelé parthénogenèse lorsque les conditions du milieu sont favorables ; les nouveau-nés sont alors génétiquement identiques à leur mère,

- un mode sexué lorsque la nourriture ou la température sont défavorables. Il y a alors évolution de certaines daphnies nouvellement nées en mâles. Après fécondation, la femelle pond des œufs « longue durée » appelés éphipies. Ces éphipies peuvent survivre à l'hiver, et par exemple éclorent au printemps, lorsque les conditions sont plus propices.

Pour les tests écotoxicologiques, la parthénogenèse a l'avantage de conserver le patrimoine génétique d'une génération à l'autre, réduisant par conséquent les variations de sensibilité entre les individus d'une même génération et entre les différentes générations.

III.1.5.2. Bryophyte : d'excellents bioaccumulateurs

Pris au sens large, le terme bryophyte correspond aux trois embranchements de plantes terrestres qui ne possèdent pas de vrai système vasculaire alors que l'embranchement des Bryophyta ne concerne que les mousses au sens botanique strict.

Fontinalis antipyretica (Hedw.) est une des mousses aquatiques submergées et est distribuée partout dans les régions tempérées d'Europe. Suite à ses exigences sur la qualité de l'eau, l'espèce *Fontinalis* est principalement présente dans les eaux oligotrophes (non polluées en éléments nutritifs) à fort courant, bien qu'elle tolère aussi de fortes concentrations en substances nutritives et polluants. En réponse aux conditions du milieu, elle développe des formes de croissance différentes. La mousse grandit sous forme de touffes denses dont les pousses peuvent atteindre une longueur de 50 cm. La mousse est accrochée au substrat via un rhizome qui sert uniquement de point d'ancrage. La dispersion par le courant de morceaux de mousse permet la dissémination de l'espèce, la dispersion par des spores étant rare dans des conditions naturelles (Siebert *et al.*, 1996). *Fontinalis antipyretica* est décrit dans des études diverses comme un bon accumulateur de polluant métallique mais aussi organique. En effet, le premier avantage à utiliser des bryophytes en tant que bioaccumulateurs, est qu'elles réagissent vite aux changements de qualité de l'eau et sont donc capables d'accumuler des polluants très rapidement et pendant une longue durée (Mouvet, 1984). En revanche, elles ne peuvent pas être utilisées comme des bioindicateurs car elles sont très résistantes aux polluants (López et Carballeira, 1993 ; Siebert *et al.*, 1996). L'absence d'épiderme facilite la pénétration des ions métalliques à travers la membrane cellulaire, ce qui confère aux bryophytes une bonne capacité de rétention des métaux (Gerdol *et al.*, 2000). En outre leur feuillage persistant démontre une activité métabolique vigoureuse particulièrement en automne et en hiver (Frost, 1990). De plus, elles accumulent facilement les métaux (ou autres cations comme par exemple Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) grâce à une forte proportion de sites d'échanges cationiques situés sur leurs parois cellulaires (Gerdol *et al.*, 2000). En outre, elles possèdent un rapport surface/volume élevé ce qui favorise l'adsorption d'une grande quantité de métal (Fernandez *et al.*, 2002). Enfin, leur utilisation est simplifiée car elles forment des populations homogènes, stables, sédentaires et facilement identifiables (Siebert *et al.*, 1996).

Pour toutes ses raisons les bryophytes ont été utilisées pour l'études de la bioaccumulation de nombreux métaux tels que le cuivre, le chrome, le cadmium, le plomb, le zinc, le fer, l'aluminium, le nickel (Ah-Peng et De Traubenberg, 2004 ; Cenci, 2000 ; Fernandez *et al.*, 2006 ; Ferreira *et al.*, 2008 ; Figueira et Ribeiro, 2005 ; Gonçalves et Boaventura, 1998 ; López et Carballeira, 1993 ; Mouvet, 1984 ; Siebert *et al.*, 1996).

III.1.6. Conclusions bibliographiques

L'ensemble de cette partie montre que si l'on s'intéresse à l'effet des métaux sur les écosystèmes il faut prendre en compte leurs diverses formes en solution, c'est-à-dire déterminer leur spéciation. En dépit de certaines exceptions, le FIAM et désormais le BLM, ont montré que la forme libre du métal est celle à l'origine d'un effet biologique en prenant en compte les facteurs pouvant modifier cet effet tel que la composition cationique et anionique, la présence de certains ligands organiques, etc.. L'objectif est maintenant d'évaluer l'influence des MOD selon leur nature : hydrophobe versus hydrophile et selon leur origine : naturelle versus anthropique sur la biodisponibilité du cuivre. Pour cela différentes approches ont été menées :

- une approche chimique par l'étude de la complexation des MOD vis-à-vis du cuivre (objet du précédent chapitre)
- deux approches biologiques avec :
    - un biotest de toxicité aigüe sur *Daphnia magna (Strauss)*
    - un biotest de bioaccumulation sur *Fontinalis antipyretica (Hedw.).*

III.2. MATERIEL ET METHODES

III.2.1. Biotests de toxicité

Les biotests de toxicité aigüe ont été effectués au sein de l'équipe EXPER de l'unité de recherche « hydrosystèmes et bioprocédés » du Cemagref d'Antony. Le principe de ce biotest consiste à exposer des organismes vivants pendant 24 h à différentes concentrations de cuivre et en présence des différentes fractions de matière organique précédemment isolées (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2004). L'espèce utilisée est *Daphnia magna* (crustacé) (Figure 4). Le résultat est exprimé par une EC50, c'est-à-dire la concentration en cuivre qui provoque l'immobilisation de 50 % de la population. Parallèlement à ce biotest, le cuivre labile initialement présent dans la solution d'exposition est mesuré par la technique du gradient de diffusion en couche mince (DGT).

Figure 4 : *Daphnia magna (Strauss)*

III.2.1.1. Préparation du matériel biologique

En laboratoire, les daphnies sont conservées à 22 °C dans de l'eau minérale Mont-Dore (composition chimique en Annexe 4) sous éclairage contrôlé (100 lux, période jour-nuit : 16-8 h) et sont quotidiennement nourries en algues (*Selanastrum capricornutum*). Dans ces conditions dites optimales, leur reproduction est asexuée, c'est-à-dire que les femelles se reproduisent par parthénogenèse en donnant naissance à des organismes-filles génétiquement identiques. Le matériel biologique utilisé est donc une population de clones.

III.2.1.2. Protocole du biotest

Les milieux expérimentaux testés sont un milieu inorganique (eau Mont-Dore) et des milieux organiques, correspondant aux différentes fractions de MOD précédemment isolées puis dissoutes dans de l'eau Mont-Dore de telle sorte que la concentration en COD soit de 2 $mgC.l^{-1}$. L'eau de source Mont-Dore a été choisie pour sa faible minéralisation influençant donc peu l'effet d'un métal sur un organisme. Pour chaque milieu, cinq solutions de cuivre et un contrôle (Tableau 1) sont préparés dans des fioles jaugées de 500 ml puis transvasés dans des béchers en polyéthylène haute densité, destinés à recevoir par la suite les dispositifs de DGT.

Tableau 1 : Matrices des tests écotoxicologiques et concentrations en cuivre total testées

Matrices	Concentrations en cuivre total ($\mu g.l^{-1}$)					
Inorganique : Eau minérale Mont-Dore	0	0,75	1,5	2,5	4	10
Organique : Eau minérale Mont-Dore + MOD (2 $mgC.l^{-1}$)	0	7,5	15	30	50	80

Les milieux expérimentaux contaminés en cuivre sont utilisés pour remplir 3 tubes de 15 ml, destinés à recevoir les daphnies, les triplicats permettant de tenir compte de la variabilité biologique associée à chacune des concentrations. L'ensemble des béchers et des tubes est mis à équilibrer pendant une nuit à 22 °C. Afin d'éviter une éventuelle adsorption du cuivre durant le biotest, les tubes sont ensuite vidés dans les béchers des DGT puis remplis à nouveau avec le même milieu. Cinq daphnies âgées de moins de 24 h sont alors ajoutées dans chacun des tubes placés dans une enceinte thermostatée à 21°C et le nombre d'organismes immobilisés est comptabilisé 24 h après le début du biotest. Des mesures en début et fin de biotest, du pH et de la concentration en cuivre total dissous, ne révèlent aucune évolution du milieu (pH 7 et concentration en cuivre constante), ce qui met en évidence une homogénéité des conditions d'exposition des daphnies. Les courbes doses-réponses et la concentration toxique pour 50 % de la population (EC50) sont obtenues par un ajustement non linéaire des données expérimentales à l'aide du modèle logistique REGTOX (basé sur des simulations de Monte-Carlo, E. Vindimian, disponible à l'adresse http://eric.vindimian.9online.fr) avec un intervalle de confiance à 95 % (Isnard *et al.*, 2001). Les contrôles (milieu sans ajout de cuivre) n'ont montré aucune toxicité des fractions de MOD envers les daphnies.

Parallèlement aux biotests, deux dispositifs de DGT sont placés dans chaque bécher de 500 ml contenant le milieu expérimental contaminé en cuivre. Les dispositifs de DGT sont préalablement montés sous une hotte à flux laminaire. A la fin de l'exposition, les DGT sont démontés et le cuivre labile accumulé sur les résines est élué dans 5 ml d'acide nitrique (Suprapur) à 10 % (24 h minimum). La mesure du cuivre est réalisée en Spectrométrie d'Absorption Atomique ElectroThermique (SAAEt), avec un spectromètre Varian SpectrAA 220Z. Aux temps initial et final de l'exposition, la température et le pH sont mesurés et la concentration en cuivre total dissous est déterminée par SAAEt à partir de 5 ml d'échantillon acidifié à 10 %. La limite de quantification de la SAAEt est de 0,5 $\mu g.l^{-1}$ pour le cuivre. La masse de métal séquestrée dans la résine est évaluée en considérant un rendement d'élution de 80 % (Zhang et Davison, 1995) La concentration en cuivre labile (C_{DGT}, en $g.ml^{-1}$) est quant à elle calculée à partir de la formule suivante (Davison et Zhang, 1994):

$$C_{DGT} = \frac{M \times \Delta g}{D \times t \times A}$$

Où *M* représente la masse de cuivre accumulée sur la résine après un temps *t*, *Δg* est l'épaisseur de la couche de diffusion (ici 0,8 mm épaisseur de l'hydrogel plus 0,13 mm dû à la membrane) *A* est l'aire d'exposition et *D* le coefficient de diffusion du cuivre dans le gel ($4{,}76\ 10^{-6}\ cm^2.s^{-1}$ à 22 °C dans les gels restrictifs, données issues de DGT Research, disponible sur http://www.dgtresearch.com).

Afin d'éviter toute contamination en cuivre, l'ensemble des contenants est lavé dans de l'acide nitrique 5 % (minimum 24 h), puis rincé abondamment à l'eau déionisée ultrapure.

III.2.2. Biotests de bioaccumulation

Les biotests de bioaccumulation ont été effectués au laboratoire du Cereve. Le principe de ce biotest consiste à mesurer la cinétique de bioaccumulation d'un élément chimique au sein d'un organisme vivant durant une exposition de 72 h. La démarche expérimentale est de suivre l'évolution de la concentration en cuivre total dissous dans le milieu, tout en sachant que la diminution du cuivre est due à deux phénomènes différents, l'adsorption sur le matériel biologique puis son internalisation. L'espèce utilisée est une mousse aquatique : *Fontinalis antipyretica* (Bryophyte) (Figure 5).

Figure 5 : *Fontinalis antipyretica (Hedw.)*

III.2.2.1. Préparation du matériel biologique

Le site de prélèvement des bryophytes a été choisi pour son éloignement vis-à-vis des sources de pollution, notamment urbaine et agricole. Il est situé en Sologne sur un affluent du cher : la Sauldre, cours d'eau de catégorie 3 selon la classification de Strahler. Les bryophytes constituent des niches écologiques, leur présence et la diversité des organismes vivant à l'intérieur de ces niches, sont significatives d'un bon état écologique du cours d'eau. Afin de permettre la recolonisation des bryophytes et donc le bon fonctionnement de l'écosystème, seul au maximum un tiers de la population présente sur un support donné est prélevé. Le prélèvement est réalisé avec des gants et les bryophytes sont soigneusement lavées avec l'eau de la Sauldre afin d'éliminer les corps étrangers (sédiments, invertébrés, brindilles, etc.), puis transportées dans une glacière remplie d'eau de la Sauldre. En laboratoire, les bryophytes sont de nouveau lavées rapidement à l'eau déionisée ultrapure. Dans un souci d'homogénéisation du matériel biologique, seule l'apex (l'extrémité des pousses, encore de couleur verte claire), est sélectionné. Les bryophytes peuvent être conservées dans cet état à 4 °C à l'obscurité pendant un ou deux mois dans de l'eau minérale Mont Calm sans qu'il n'y ait de détérioration.

III.2.2.2. Protocole du biotest

Les biotests sont réalisés dans des bacs de 5 l en polypropylène, contaminés avec 5 $\mu g.l^{-1}$ de cuivre et contenant environ 3,3 g de bryophytes (poids frais), la masse sèche étant déterminée à la fin du biotest. Les milieux organiques testés correspondent aux différentes fractions de MOD dissoutes dans de l'eau minérale Mont Calm (composition chimique en Annexe 4), tel que la concentration en COD soit de 2 $mgC.l^{-1}$. Dans un premier temps, les bryophytes sont conditionnées pendant 48h dans des flacons de 1 l contenant les solutions de

MOD non contaminées en cuivre afin d'acclimater les organismes aux conditions des tests (25°C, cycle jour-nuit) après leur séjour en chambre froide. Afin de limiter l'adsorption du cuivre sur les parois durant les biotest, les bacs sont préconditionnés pendant 48 h avec 5 l d'une solution minérale (eau Mont Calm) contaminée en cuivre ([Cu] = 5 $\mu g.l^{-1}$). Les bacs sont ensuite vidés, remplis avec 5 l de milieu organique contaminé en cuivre et mis à équilibrer pendant 12 h avant l'introduction des bryophytes. Avant l'introduction des bryophytes, un prélèvement de la solution est effectué afin de déterminer la concentration exacte en cuivre à t=0. Les bryophytes, préalablement conditionnées, sont lavées à l'eau MontCalm puis ajoutées au temps t_0 dans les 5 l de milieu organique contaminé en cuivre (5 $\mu g.l^{-1}$). Pendant les 72 h d'exposition, des prélèvements de 10 ml, filtrés à 0,45 µm et acidifiés à 2 %, sont effectués en triplicat à différent pas de temps. (Tableau 2). En raison de la disparition rapide du cuivre en solution, les prélèvements sont plus rapprochés durant la première phase de la cinétique et plus espacés par la suite.

Tableau 2 : Temps des prélèvements effectués pour l'estimation de la cinétique de bioaccumulation du cuivre chez les bryophytes

Numéro de prélèvement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Temps	0 min	5 min	10 min	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h	24 h

Les concentrations en cuivre sont mesurées et déterminées par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique à plasma induit) dont la limite de quantification est de 0,5 $\mu g.l^{-1}$. La détermination des vitesses de bioaccumulation est réalisée par une régression linéaire des concentrations obtenues durant les quinze premières minutes. Seules les quinze premières minutes ont été prises en compte car la disparition du cuivre en solution (ou bioaccumulation du cuivre chez les bryophytes) est encore linéaire pendant cette durée, de plus seule l'adsorption est le processus régissant l'accumulation du cuivre, l'internalisation étant plus lente et donc encore négligeable. L'incertitude est donnée par l'erreur sur la pente calculée à l'aide la fonction *droitereg* sur Excel.

Afin d'éviter toute contamination en cuivre, l'ensemble des contenants est lavé dans de l'acide nitrique 5 % (pour analyses) (minimum 24 h), puis rincé abondamment à l'eau déionisée ultrapure.

L'ensemble des tests de bioaccumulation a été réalisé en deux séries la première au printemps 2007 et la deuxième au printemps 2008. Dans un souci d'homogénéité, des tests similaires ont été réalisés lors des deux séries à savoir : deux tests en milieu inorganique pour chaque début et fin de série et un test organique avec la fraction SRFA. Ces répétitions n'ont révélé aucune variation significative au sein d'une série et d'une série à l'autre.

La cinétique de disparition du cuivre en solution est associée à la cinétique de bioaccumulation des bryophytes. L'adsorption du cuivre sur les parois des bacs pouvant expliquer la disparition du cuivre en solution, cette hypothèse a été vérifiée par un bilan final de la masse de cuivre disparu en solution et bioaccumulé par les bryophytes. En effet une minéralisation par attaque acide (acide nitrique supra pur 65 %), des bryophytes après exposition, dans un four à micro-ondes (Milestone, MLS 1200) (paramètres de la minéralisation en Annexe 5) a permis de vérifier que la masse de cuivre disparue en solution était identique à la masse de cuivre bioaccumulé (Figure 6).

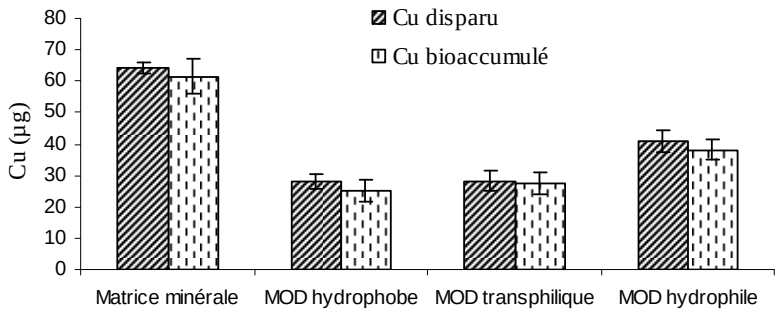


Figure 6 : Bilan de masse du cuivre (MOD issues de STEP, échantillon A1)

III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.3.1. Biotests de toxicité

La Figure 7 illustre à titre d'exemple les courbes doses-réponses du cuivre labile et total en matrice organique (HPOA2) et inorganique. Ces courbes montrent l'effet protecteur de la MOD HPOA2 vis-à-vis de la toxicité du cuivre pour *Daphnia magna*. En effet, en présence de HPOA2 (2mgC.l^{-1}), l'EC50 exprimée en cuivre total est plus élevée (environ 18 µg.l^{-1}) qu'en milieu inorganique (environ 3 µg.l^{-1}). Cette figure montre aussi l'efficacité de l'outil DGT pour prédire la toxicité du cuivre en présence de MOD puisque l'EC50 exprimé en cuivre labile en présence de MOD est similaire à celle en milieu inorganique (le cuivre étant, en matrice inorganique, totalement labile par DGT).

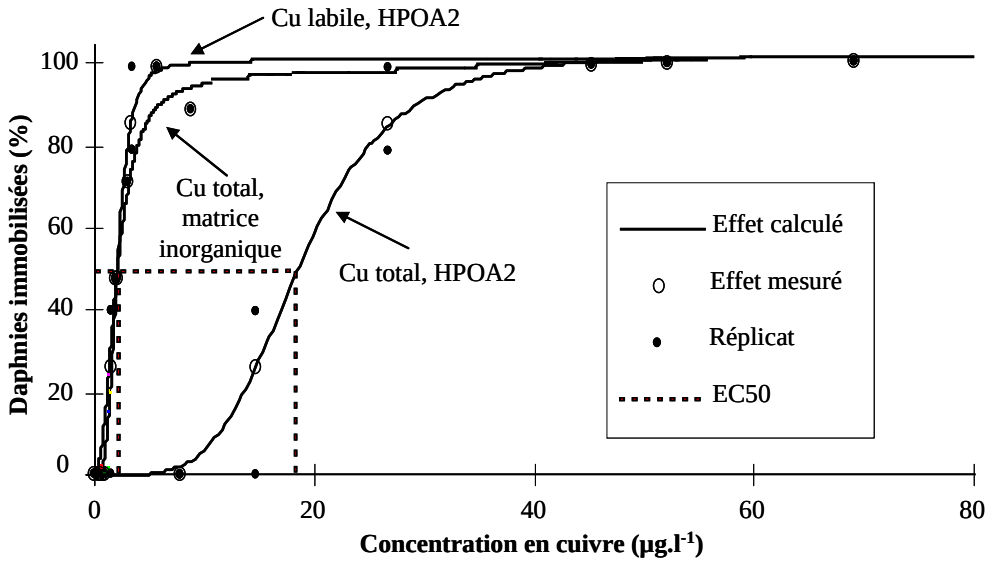


Figure 7 : Courbes doses-réponses du cuivre exprimées en cuivre labile (DGT) et en cuivre total en matrice inorganique et organique (HPOA2)

La Figure 8 présente l'ensemble des EC50 (concentration en cuivre immobilisant 50 % de la population) obtenues pour chaque fraction et exprimées en cuivre total et labile par DGT. Les résultats mettent en évidence :

- une EC50tot (exprimée en cuivre total) systématiquement supérieure en présence de MOD comparativement aux tests réalisés en matrice inorganique (eau minérale). Ceci montre l'effet protecteur de la MOD vis-à-vis de la toxicité du cuivre pour *Daphnia magna*,

- de fortes différences (du simple au double) des EC50tot selon les fractions avec une incertitude parfois importante (jusqu'à 60 % de la valeur de l'EC50tot), imputée en partie à la variabilité du vivant,

- en présence de MOD, des EC50lab (exprimée en cuivre labile par DGT) toujours très inférieures aux EC50tot. En présence de substances humiques, les $EC50_{lab}$ sont systématiquement inférieures aux autres fractions de MOD excepté pour la fraction HPOM1,

- la faible variabilité des 7 tests effectués en matrice minérale montre la répétabilité du biotest et la non-évolution de l'élevage de clone de daphnies,

- les fractions issues des échantillons M2, A1, et A2 ne présentent pas de différences significatives,

- concernant les sites M1, AN et MT certaines différences peuvent être observées :

  - la fraction HPOM1 présente un effet protecteur significativement plus faible que la fraction TPIM1,

  - les fractions HPOAN et HPOMT présentent un effet protecteur plus élevé que les fractions TPIAN et TPIMT. La fraction HPIAN révèle un effet protecteur significativement plus faible alors que la fraction HPIMT possède un effet protecteur plus élevé que les fractions HPOMT et TPIMT.

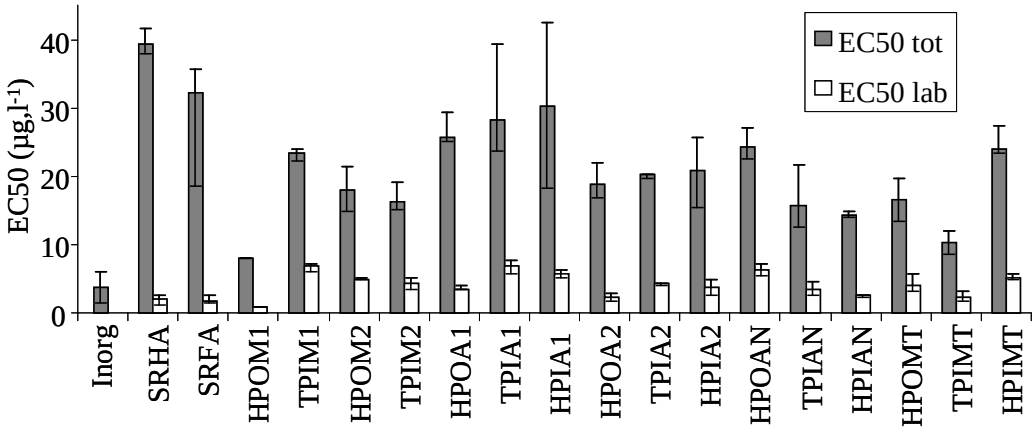


Figure 8 : EC50 exprimées en cuivre total et en cuivre labile (DGT) pour chacune des fractions de MOD

(La valeur présentée sous le nom « inorg », matrice sans MOD, résulte de la moyenne des valeurs obtenues pour 7 tests échelonnés entre le 01/04/2006 et le 18/04/2008)

La Figure 9 illustre les EC50 exprimées en cuivre total et labile selon le type de fraction et le site de prélèvement (calculées à partir des EC50 de chaque fraction de MOD et de la distribution des fractions de MOD). Notons que les EC50 des sites de Méry sur Marne sont approximées puisque l'échantillon est considéré comme composé uniquement de MOD HPO et TPI (la fraction HPI minoritaire n'ayant pas été extraite). Il est ainsi possible d'observer :

- aucune différence significative des EC50 (tot et lab) quelque soit le type de fraction (tous sites confondus) bien que ces EC50 présentent pour chaque fraction une incertitude importante,

- l'$EC50_{lab}$ en milieu organique est peu différente de l'$EC50_{tot}$ réalisée en milieu inorganique (le cuivre total dans ce milieu inorganique étant totalement labile par DGT). Dans le cadre de cette étude, il s'avère que la technique par DGT est un bon outil pour l'évaluation du cuivre toxique en présence de MOD comme cela a déjà été montré (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2004),

- un effet protecteur de la MOD issue du premier prélèvement des effluents de STEP supérieur à l'effet protecteur des MOD provenant des autres sites,

- la MOD des sites de Méry sur Marne semble présenter un effet protecteur plus faible, notons qu'ici encore le COD a été considéré comme composé uniquement des fractions HPO et TPI.

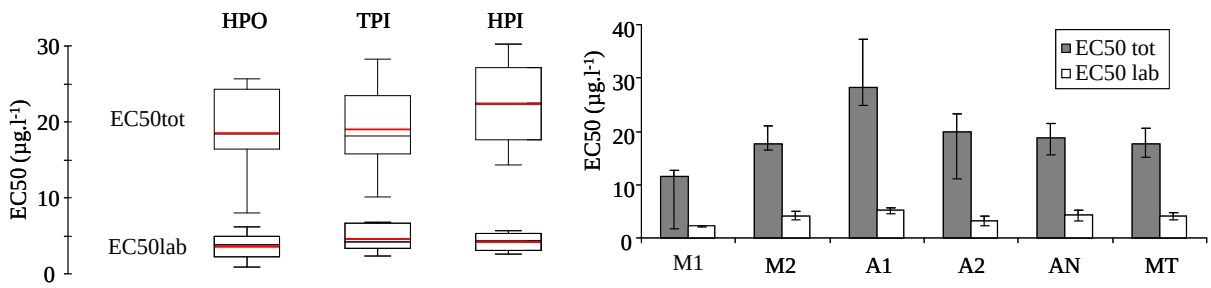


Figure 9 : EC50 exprimée en cuivre total et labile (DGT) selon le type de fraction et le site de prélèvement

Pour rappel, afin de visualiser la dispersion des données, la représentation des données sous forme de boîtes à moustaches a été utilisée (Turkey, 1977) (Chapitre I, § I.3.2.2).

Les valeurs des EC50 obtenues dans cette étude sont en accord avec la littérature. En effet, bien que les tests dans la littérature n'aient pas été toujours réalisés dans les mêmes conditions, en particulier au niveau de la concentration en COD, il a été mis en évidence plusieurs fois que la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Daphnia magna* était linéairement dépendante de la concentration en COD (Apte *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 1999 ; Kramer *et al.*, 2004 ; Meador, 1991 ; Oikari *et al.*, 1992). Ceci s'explique de par le fait que le COD et plus généralement la MOD complexe le cuivre et que *Daphnia magna* répond bien au modèle du FIAM. Ainsi il est possible de comparer relativement aisément les données de la littérature qui présentent généralement une EC50 de l'ordre de 20 $\mu g.l^{-1}$ pour une concentration en COD ramenée à 2 $mg.l^{-1}$ (Apte *et al.*, 2005 ; De Schamphelaere *et al.*, 2005). De plus les valeurs obtenues ici pour la MOD issue des effluents de la STEP Seine-Aval sont similaires avec celles obtenues pour les effluents traités (MOD non extraite) de la même STEP dans le cas d'une autre étude (Buzier *et al.*, 2006). Ceci permet de souligner que l'ensemble du protocole d'extraction utilisé ne semble pas affecter le pouvoir protecteur de la MOD comme il avait été montré dans le cas de l'osmose inverse seule (De Schamphelaere *et al.*, 2005). L'extraction possède l'avantage de séparer la MOD des sels inorganiques et des autres polluants minéraux pouvant influencer la complexation du cuivre avec la MOD et aussi la toxicité du cuivre vis-à-vis de l'organisme. Alors qu'il a été montré précédemment dans le chapitre I l'importance de la fraction hydrophile en milieu urbain, et dans le deuxième chapitre sa forte teneur en sites complexants, pour la première fois il a été mis en évidence son pouvoir protecteur vis-à-vis de la toxicité du cuivre. Il semble donc possible de dire que la MOD issue de STEP possède un pouvoir complexant et protecteur au moins aussi important vis-à-vis de la toxicité du cuivre que la MOD en amont de l'agglomération parisienne issue d'un site peu urbanisé.

Le SUVA : un outil prédictif de l'effet protecteur de la MOD ?

De Schamphelaere *et al.* (2004)and Kramer *et al.* (2004) ont démontré que le SUVA à 254 nm était un bon indicateur de l'effet protecteur de la MOD vis-à-vis de la toxicité de cuivre pour *Daphnia magna.* Dans notre étude, quelque soit la longueur d'onde considéré, le SUVA ne peut pas être utilisé pour expliquer la toxicité du cuivre chez Daphnia magna en présence de MOD. En effet, à concentration égale en COD, l'effet protecteur des fractions de MOD est dans l'ensemble similaire alors que le SUVA varie fortement (de 2 à 5 fois) selon que la matière organique soit d'origine naturel ou urbaine et selon son caractère polaire ou non (HPO, TPI, HPI) (Chapitre I). En accord avec les résultats des chapitres précédents, les protéines et polysaccharides, bien qu'absorbant faiblement dans le domaine UV, sont fortement suspectés d'avoir des propriétés complexantes vis-à-vis des métaux. Par exemple, Lamelas *et al.* (2005) ont montré que les polysaccharides et plus particulièrement les alginates présentent vis-à-vis de la toxicité du plomb un rôle protecteur comparable aux acides

fulviques à des concentrations en COD similaires. Dans ce contexte, le développement de critères pour évaluer la qualité des eaux doit tenir compte non seulement de la présence d'acides humiques et fulviques mais aussi de celle d'autres substances telles que par exemple les polysaccharides et les protéines qui présentent une faible absorbance en UV mais semble jouer un rôle important dans la complexation des métaux. En conséquence, l'introduction de facteurs de corrections basés sur l'aromaticité de la MOD peut être éventuellement appropriée si la composition de la MOD est dominée par les SH, ce qui n'est pas le cas entre autres, des systèmes aquatiques en milieu urbain (Pernet-coudrier *et al.*, 2008).

III.3.2. Biotests de bioaccumulation

Les Figure 10 et Figure 11 présentent à titre d'exemple, les cinétiques de disparition du cuivre et la régression linéaire permettant d'obtenir la valeur de la vitesse de bioaccumulation du cuivre chez *Fontinalis antipyretica* en présence de MOD A2 et en matrice inorganique (les autres cinétiques sont présentées en Annexe 6).

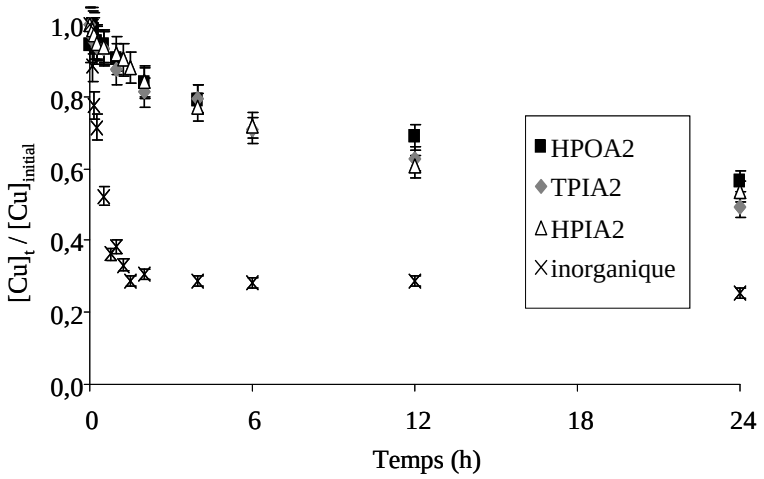


Figure 10 : Cinétique de disparition du cuivre total en solution en matrice inorganique et organique : fractions issues de l'effluent de STEP A2

(Pour des raisons de clarté, les concentrations ont été normalisées par rapport à la concentration initiale)

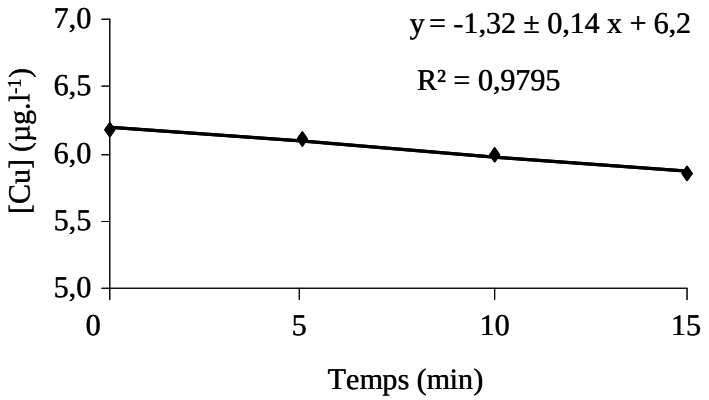


Figure 11 : Régression linéaire des concentrations mesurées durant les 15 premières minutes du biotest en présence de HPIA2 (Pour des raisons de clarté, l'axe des abscisses a été reconverti en minute)

A partir de ces figures, il est ainsi possible d'observer :

- une disparition du cuivre total en solution significativement plus rapide en matrice inorganique par rapport aux matrices organiques (ici fractions d'effluent de STEP) montrant ainsi leur rôle protecteur,

- dans l'ensemble ces cinétiques tendent vers un équilibre final ce qui est normal puisqu'aucun changement n'est effectué tant au niveau des organismes que de la solution,

- près de 75 % du cuivre initialement présent en matrice inorganique est accumulé en l'espace de 2 heures (équilibre atteint) alors que pour le même temps, seul 20 % du cuivre initialement présent est accumulé en matrice organique. L'équilibre ne semble atteint qu'au-delà de 24 heures avec seulement 50 % du cuivre (initialement présent) bioaccumulé.

La Figure 12 montre l'ensemble des résultats c'est-à-dire les vitesses de bioaccumulation du cuivre pour *Fontinalis antipyretica* en présence de toutes les fractions préalablement isolées.

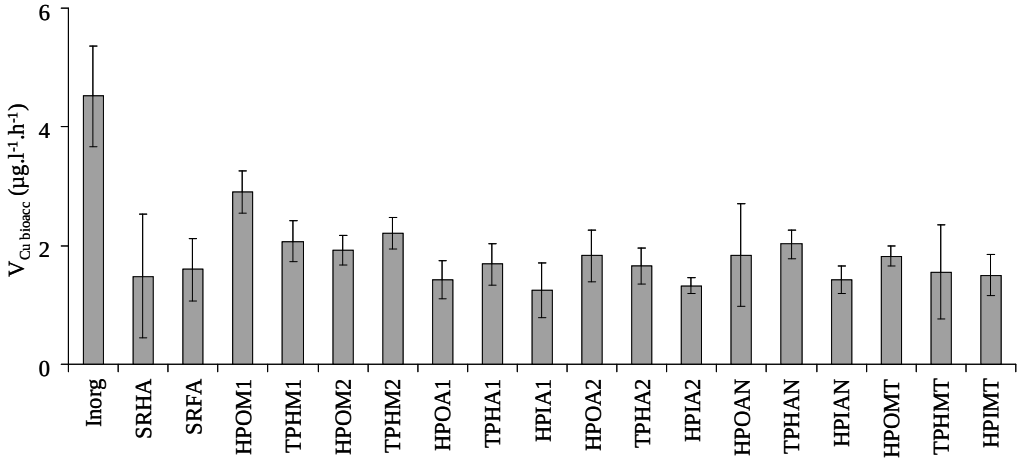


Figure 12 : Vitesse de bioaccumulation du cuivre sur *Fontinalis antipyretica* en présence des différentes fractions

(La valeur présentée sous le nom « inorg », matrice sans MOD, résulte de la moyenne des valeurs obtenues pour 4 tests échelonnés entre le 01/04/2006 et le 18/04/2008

La Figure 13 illustre les vitesses de bioaccumulation du cuivre selon le type de fraction de MOD et son origine. On peut ainsi noter :

- une vitesse de bioaccumulation qui semble plus faible en présence des MOD HPI comparée à celles des fractions HPO et TPI qui sont similaires. Ceci pourrait révéler un pouvoir protecteur plus important des MOD HPI vis à vis de la bioaccumulation du cuivre chez les bryophytes et pouvant être expliqué par une complexation plus importante comme il a été montré dans le chapitre précédent,

- une cinétique de bioaccumulation du cuivre plus importante pour le site M1. Rappelons que les échantillons M1 et M2 ont été considérés comme uniquement composé de MOD HPO et TPI. Ce faible rôle protecteur de la MOD de l'échantillon M1, également observé pour la daphnie, s'explique par une fraction HPO très peu protectrice mais prédominante (69 % du COD),

- dans l'ensemble, les MOD issues des effluents de STEP (donc d'origine urbaine) révèlent un rôle protecteur similaire à celui de SRFA et plus important que celui des MOD de Méry sur Marne (site peu urbanisée).

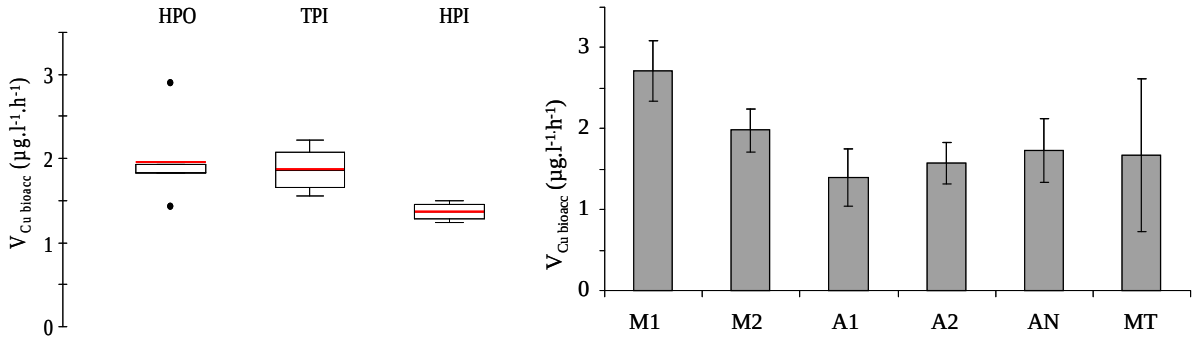


Figure 13 : Vitesse de bioaccumulation du cuivre pour les bryophytes selon le type de fraction et le site de prélèvement

Contrairement aux daphnies, les bryophytes sont des organismes relativement peu utilisés dans l'étude de la biodisponibilité des métaux, rendant difficile la comparaison des résultats avec la littérature. Néanmoins les résultats obtenus ici, sont en accord avec une récente étude (Ferreira *et al.*, 2008) montrant le rôle protecteur de fraction HPO et TPI issues de Seine ainsi que d'un acide humique pour des concentrations en COD similaires (2mgC.l^{-1}). Ces résultats montrent donc à nouveau pour la première fois le rôle protecteur de la MOD hydrophile vis-à-vis de la bioaccumulation du cuivre chez *Fontinalis antipyretica*.

III.3.3. Evaluation du cuivre biodisponible en présence de MOD d'origine anthropique : trois approches différentes

Comme il a été montré dans la partie III.1.4, la biodisponibilité d'un métal peut être évaluée de trois manières différentes et complémentaires :

(i) chimiquement en estimant la spéciation du métal dans l'environnement et en faisant une hypothèse de biodisponibilité sur chacune des formes chimiques prise par le métal,

(ii) biologiquement en mesurant la concentration en métal accumulé dans un organisme au cours de l'exposition. La bioaccumulation mesurée reflétant alors la biodisponibilité,

(iii) biologiquement en mesurant la réponse toxique d'un organisme à une exposition. Cette réponse biologique est alors le reflet de la concentration biodisponible du métal (mais peut dépendre d'un certain nombre de processus à l'intérieur de la cellule). Il existe deux types de toxicité selon le mode d'action et la quantité de métal dans le milieu :

- la toxicité aigüe conduisant à la mortalité de l'organisme et donc mesurée en pourcentage d'individus tués ou immobilisés,

- la toxicité chronique menant à des effets à plus long terme et évaluée par différentes mesures selon l'organisme étudié telles que la reproduction, les déformations, le retard de croissance, etc.

Dans le cadre de cette étude, ces trois approches ont été menées. En effet l'étude de la spéciation du cuivre est désormais possible grâce aux paramètres de complexation déterminés dans le Chapitre II, la bioaccumulation du cuivre a été évaluée par les biotests sur *Fontinalis antipyretica* et l'effet toxique aiguë a été mesuré par le crustacée *Daphnia magna*. Les

paragraphes suivants traitent donc de l'évaluation du cuivre biodisponible selon chaque approche. L'ensemble des approches étant discuté après dans le paragraphe III.3.3.4.

III.3.3.1. Evaluation du cuivre biodisponible par l'étude de la spéciation

En accord avec les modèles FIAM et BLM, la concentration en métal libre, c'est à dire non complexé, est considérée comme étant celle responsable de l'effet observé. La concentration en cuivre libre pour chaque biotest et chaque fraction de MOD a donc été calculée à partir :

- de la concentration en cuivre total pour 50 % d'immobilisation (EC50),
- de la concentration en MOD utilisée pour chaque biotest à savoir 2 $mgC.l^{-1}$,
- des paramètres de complexation obtenus pour chaque fraction de MOD à l'aide du modèle NICA,
- de la composition des eaux minérales (Mont-Dore et MontCalm) utilisées pour chaque biotest (composition en Annexe).

Les concentrations en cuivre libre calculées dans les conditions de chaque biotest sont ainsi présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Concentrations en cuivre libre calculées dans les conditions physico-chimiques de chaque biotest à l'EC50

Organismes	$[Cu]_{total}$ ($nmol.l^{-1}$) Min. – Max Moyenne.	$[Cu^{2+}]_{libre}$ ($nmol.l^{-1}$) Min. – Max Moyenne.	Ratio $[Cu^{2+}]_{libre}/[Cu]_{total}$ Min. – Max Moyenne.
Daphnia magna	130 – 620 340	$2,1\ 10^{-5} – 2,8\ 10^{-1}$ $5,0\ 10^{-2}$	$1,6\ 10^{-7} – 4,5\ 10^{-4}$ $1,5\ 10^{-4}$
Fontinalis antipyretica	61 – 117 90	$5,4\ 10^{-3} – 1,1\ 10^{-1}$ $4,5\ 10^{-2}$	$8,9\ 10^{-5} – 9,4\ 10^{-4}$ $5,0\ 10^{-4}$

Ce tableau montre que dans les conditions de chaque biotest, moins de 0,1 % du cuivre total est libre c'est-à-dire non complexé par la MOD.

III.3.3.2. Evaluation du cuivre biodisponible par l'effet toxique induit chez *Daphnia magna*

Plusieurs études, ont montré que *Daphnia magna* répondait bien au modèle de l'ion libre vis à vis du cuivre (De Schamphelaere *et al.*, 2002, 2004a ; De Schamphelaere et Janssen, 2002 ; De Schamphelaere et Janssen, 2004a ; De Schamphelaere *et al.*, 2004b ; Kramer *et al.*, 2004 ; Santore *et al.*, 2001). Certes il a aussi été montré et conceptualisé dans le

cadre du modèle du ligand biotique que la présence de cations majeurs (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, etc.) diminuaient la toxicité du cuivre vis à vis des daphnies (De Schamphelaere *et al.*, 2002 ; De Schamphelaere et Janssen, 2002 ; De Schamphelaere et Janssen, 2004a, 2004c). Cependant dans notre cas d'étude, l'utilisation d'eau minérale très peu riche en cations (composition présentée en Annexe 2) permet de négliger ces effets qui n'apparaissent qu'à des concentrations plus élevées ((De Schamphelaere *et al.*, 2002). Suivant le modèle de l'ion libre on peut considérer que pour un même effet toxique, la concentration en métal libre est toujours la même. Il est alors possible de calculer cette concentration de cuivre libre à partir des biotests réalisés en matrice inorganique. Si le modèle de l'ion libre est respecté, la concentration en ion libre dans les biotests en matrice minérale et organique est identique lorsque l'on se place à des niveaux de toxicité similaires (l'EC50 par exemple). La concentration en cuivre libre peut également être calculée via les paramètres de complexation déterminés au chapitre précédent. Néanmoins ce calcul étant plus complexe et pouvant être affecté d'un biais supplémentaire (erreur sur les paramètres de complexation), seul les répliquats en matrice inorganiques seront utilisés. Le logiciel VisualMINTEQ a donc été utilisé afin de déterminer la concentration en cuivre libre responsable de l'immobilisation de 50 % de la population de daphnies en matrice minérale à partir de la composition de l'eau minérale Mont Dore et des EC50 mesurées sur les sept répliquats réalisées en matrice inorganique. Le Tableau 4 présente ces résultats.

Tableau 4 : Concentration en cuivre responsable de la toxicité observée chez *Daphnia magna*

Min. – Max. Moyenne	Matrice inorganique		Matrice organique
	$EC50_{tot}$	$[Cu^{2+}]_{libre}$ à l'EC50	$EC50_{lab}$
($\mu g.l^{-1}$)	2,05 - 8,69 3,75	1,59 – 6,73 2,91	0,8 – 6,75 3,87
($nmol.l^{-1}$)	32 - 137 59	25 – 106 46	13 – 106 61

Ces résultats montrent que la majeure partie du cuivre en matrice inorganique est sous forme libre due à la faible concentration des ligands inorganiques. En effet seuls les carbonates sont responsables de la faible complexation observée, les nitrates (0,8 $mg.l^{-1}$) et les hydroxydes (très peu présents au pH des tests de toxicité aiguë c'est à dire 7) étant minoritaires.

En matrice organique, les $EC50_{lab}$ calculées grâce aux mesures par DGT sont similaires au cuivre libre ou total en matrice inorganique, soulignant de nouveau l'efficacité de l'outil DGT comme indicateur du cuivre toxique chez *Daphnia magna*.

III.3.3.3. Evaluation du cuivre biodisponible par la mesure de bioaccumulation chez *Fontinalis antipyretica*

Une récente étude a montré que la vitesse de bioaccumulation du cuivre était fortement corrélée à la quantité de cuivre initialement biodisponible pour *Fontinalis antipyretica* (Ferreira *et al.*, 2008).

$$V_{Cu\ bioaccumulé} = k[Cu]_{biodisponible} \qquad \textbf{Équation 1}$$

avec *k* la constante d'assimilation exprimée en h^{-1}.

Ferreira et al. (2008) ont également montré qu'il était possible de calculer cette constante *k* à partir des valeurs des cinétiques de bioaccumulation obtenues en matrice inorganique. En effet la vitesse de bioaccumulation du cuivre étant une fonction linéaire de la concentration en cuivre testée, la pente de la droite représente alors la valeur de la constante d'assimilation *k*.

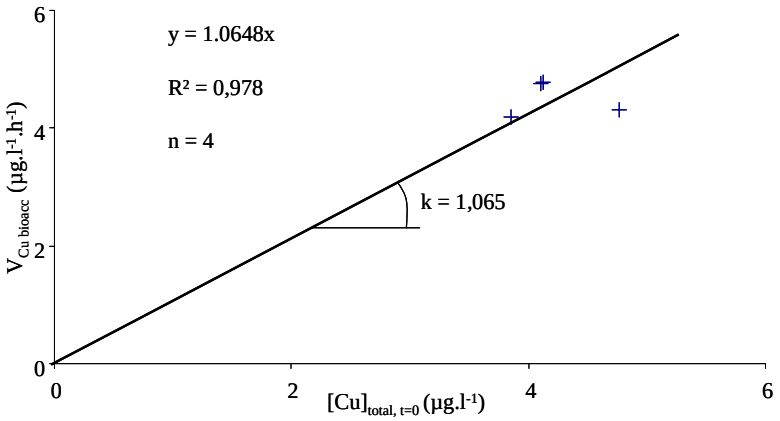


Figure 14 : Détermination de constante d'assimilation à partir des cinétiques de bioaccumulation réalisées en matrice inorganique

Bien qu'une seule concentration en cuivre n'ait été testée dans cette étude (5 $\mu g.l^{-1}$), en revanche le fait d'avoir quatre répliquats à cette concentration et l'obligation de la droite de passer par l'origine, permet d'avoir une certaine confiance dans l'estimation de la pente.

A partir de l'équation 1 et de la valeur de *k* précédemment déterminée, les concentrations en cuivre initialement biodisponible ont été déterminées pour chaque biotest et sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Concentrations en cuivre initialement biodisponible pour chaque fraction de MOD

Fractions	$V_{Cu\ bioacc}$	$[Cu]_{biodisp}$(µg,l^{-1})	$[Cu]_{biodisp}$(nmol,l^{-1})
SRHA	1,48	1,39	22
SRFA	1,60	1,50	24
HPOM1	2,90	2,73	43
TPIM1	2,07	1,95	31
HPOM2	1,93	1,81	28
TPIM2	2,21	2,08	33
HPOA1	1,43	1,34	21
TPIA1	1,68	1,58	25
HPIA1	1,24	1,17	18
HPOA2	1,83	1,72	27
TPIA2	1,65	1,55	24
HPIA2	1,32	1,24	20
HPOAN	1,84	1,72	27
TPIAN	2,02	1,90	30
HPIAN	1,42	1,33	21
HPOMT	1,82	1,71	27
TPIMT	1,55	1,46	23
HPIMT	1,50	1,41	22
Min. – Max.	1,24 – 2,90	1,17 – 2,73	18 – 43
Moyenne	1,75	1,64	26

III.3.3.4. Rôle de l'ion libre dans la bioaccumulation et la toxicité du cuivre respectivement chez *Daphnia magna* et *Fontinalis antipyretica*

Ce paragraphe confronte donc l'ensemble des approches discutées précédemment pour évaluer la biodisponibilité du cuivre en présence des MOD extraites et caractérisées dans le chapitre I de cette étude.

La Figure 15 présente à titre d'exemple une première corrélation des résultats obtenus pour chaque biotest en présence de chaque MOD testées. Le point en haut à gauche de cette figure représente les résultats en milieu inorganique. Cette figure montre que dans l'ensemble, l'effet protecteur des fractions de MOD vis-à-vis de la toxicité du cuivre pour *Daphnia magna* est similaire l'effet protecteur vis-à-vis de la bioaccumulation du cuivre chez *Fontinalis antipyretica*. Ceci prouve la cohérence des deux biotests utilisés.

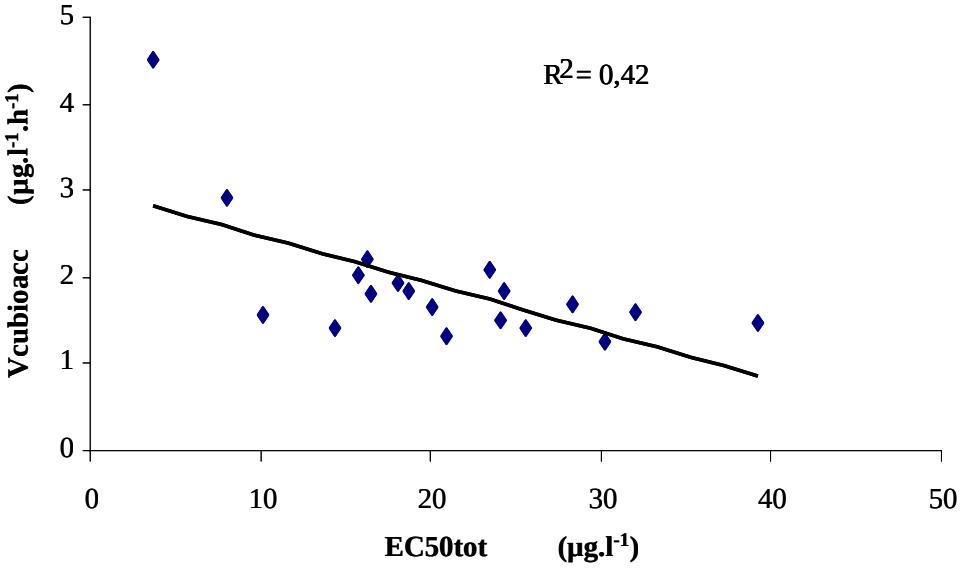


Figure 15 : Corrélation entre le cuivre toxique (EC50) pour *Daphnia magna* et le cuivre bioaccumulable pour *Fontinalis antipyretica*

Le Tableau 6 présente les résultats obtenus pour l'évaluation du cuivre biodisponible à travers l'étude de la spéciation, de la bioaccumulation via *Fontinalis antipyretica* et de la toxicité via *Daphnia magna*.

Tableau 6 : Confrontation des approches utilisées pour évaluer la biodisponibilité du cuivre

(n.mol.l^{-1})	$[Cu]_{total}$	$[Cu]_{labile}$ (DGT)	Mesure par ISE	Approche spéciation	Approche bioaccumulation	Approche toxicité
	Min. – Max Moyenne	Min. – Max Moyenne	LDQ = 10 nmol.l^{-1}	Min. – Max Moyenne	Min. – Max Moyenne	Min. – Max Moyenne
Daphnia magna	130 – 620 340	13 – 106 61	< LDQ	2,1 10^{-4} – 2,8 10^{-1} 5,0 10^{-2}	-	25 – 106 46
Fontinalis antipyretica	61 – 117 90	-	< LDQ	5,4 10^{-3} – 1,1 10^{-1} 4,5 10-2	18 – 43 26	-

On peut ainsi observer que quelque soit l'organisme testé, la concentration en cuivre libre déterminée par l'étude de la spéciation (via les paramètres de complexation obtenus dans le Chapitre II, les conditions expérimentales des tests et le code de spéciation VisualMINTEQ) se trouve systématiquement inférieure au cuivre biodisponible estimé via les deux organismes *Daphnia magna* et *Fontinalis antipyretica*. Si l'existence d'un biais dans l'évaluation des paramètres de complexation est possible, la mesure de cuivre libre par électrode spécifique (ISE, utilisée dans le chapitre II) dans les conditions des biotests conforte les précédentes observations par une mesure inférieure à la limite de détection (10^{-8} mol.l^{-1}), valeur très inférieure au cuivre biodisponible pour les organismes (10^{-7}-10^{-8} mol.l^{-1}).

Les concentrations en cuivre total et en cuivre libre expliquent donc mal la fraction biodisponible du cuivre respectivement soit par surestimation (non prise en compte des complexes inertes) soit par sous-évaluation (non prise en compte des complexes faibles). En effet des complexes non biodisponibles et non DGT-labiles se sont formés empêchant d'utiliser la concentration en cuivre total comme cuivre biodisponible. Mais il est possible que des complexes biodisponibles et DGT-labiles soient formés aussi et compensent la plus faible concentration en métal libre mesurée et calculée. L'outil DGT s'avère donc être un très bon indicateur de la fraction biodisponible du cuivre chez *Daphnia magna* comme il avait été montré en présence de ligands synthétiques (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2004) ainsi que dans le cas d'effluents de STEP traités ou non (Buzier *et al.*, 2006). La récente étude publiée par Ferreira *et al*. (2008) a également montré, particulièrement en présence de MOD (fraction HPO et TPI issues de Seine), que l'outil DGT permettait d'estimer correctement le cuivre biodisponible chez *Fontinalis antipyretica*. L'observation d'une concentration de cuivre labile par DGT systématiquement plus élevée en présence de nos MOD par rapport à celles déterminées en présence de substances humiques ne peut être expliquée par les constantes et capacités de complexation précédemment déterminée (du même ordre de grandeur). Le poids moléculaire des MOD pourrait être une explication. En effet les substances humiques présentent généralement de fortes masses moléculaires ne contribuent probablement pas à la mesure DGT en présence de gels restrictifs comme cela a été montré (Scally *et al.*, 2006). En revanche, les MOD extraites ici présentent des masses moléculaires nettement plus faibles que les SH (chapitre I) et peuvent donc diffuser dans le gel, se dissocier et contribuer à la mesure du cuivre labile.

En conséquence le cuivre libre explique difficilement la bioaccumulation et la toxicité observée chez *Fontinalis antipyretica* et *Daphnia magna* mettant ainsi en difficulté les modèles FIAM et BLM. S'il est surprenant d'obtenir ces résultats pour *Daphnia magna*, en revanche pour *Fontinalis antipyretica* ces résultats sont en accord avec l'étude de Ferreira et al (2008). En effet, il a été montré qu'en présence de ligands organiques (acide humique, fraction HPO et TPI de Seine) une part du cuivre complexé organiquement est disponible pour Fontinalis antipyretica. Ferreira *et al.* (2008) explique cela par une complexation du cuivre par les bryophytes suffisamment forte pour déplacer l'équilibre chimique initial menant à la dissociation progressive des complexes Cu-DOM les plus faibles. Dans ce contexte il ne semble pas anormal que les bryophytes ne respectent pas les modèles du FIAM et du BLM puisque la condition de base de ces modèles suppose que l'ensemble des espèces métal, ligands biotiques et abiotiques soient à l'équilibre. Concernant *Daphnia magna,* il reste difficile d'expliquer ces résultats sans informations supplémentaires. Néanmoins les hypothèses suivantes peuvent être faites :

- une part du cuivre complexé peut être biodisponible en raison de son caractère lipophile c'est-à-dire sa facilité à traverser la membrane cellulaire comme il a été montré pour le cuivre avec les oxines ou le dithiocarbamate (Croot *et al.*, 1999 ; Phinney et Bruland, 1997),

- le métal complexé peut être également transporté dans l'organisme par des mécanismes actifs. En effet la membrane de l'organisme inclut des transporteurs permettant l'incorporation des éléments indispensables à son développement. Dans certains cas, un complexe métallique peut se substituer à l'espèce concernée par le transporteur et ainsi rendre ce complexe biodisponible comme par exemple pour des complexes organiques comme les citrates de zinc ou de cadmium (Errecalde *et al.*, 1998 ; Jansen *et al.*, 2002) ou des complexes acides aminés - zinc (Glover *et al.*, 2003 ; Jansen *et al.*, 2002).
- la formation de complexe ternaire à la surface de l'organisme peut favoriser l'assimilation du métal comme il a été montré pour les complexes Cu-alanine et Pb-acide fulvique (Campbell *et al.*, 2002 ; Slaveykova *et al.*, 2003).

Ces hypothèses peuvent être confortées par les résultats du premier chapitre montrant un taux de structures d'origines protéiques importants dans ces MOD car les protéines jouent un rôle important dans les mécanismes de transports de métaux au sein des organismes (Ahearn *et al.*, 2004) et un certain nombre d'exceptions au FIAM et au BLM, précédemment citées, sont dues à différents processus impliquant des acides aminés.

III.4. CONCLUSION

L'effet des métaux sur les écosystèmes dépend principalement de leurs diverses formes en solution, c'est-à-dire leur spéciation. En dépit de certaines exceptions, les modèles FIAM et désormais le BLM, ont montré que la forme libre du métal est celle à l'origine d'un effet biologique en prenant en compte les facteurs pouvant modifier cet effet tel que la composition cationique et anionique, la présence de certains ligands organiques, etc.. La biodisponibilité d'un métal peut être évalué de trois manières différentes et complémentaires : chimiquement en estimant la spéciation du métal dans l'environnement et en faisant une hypothèse de biodisponibilité sur chacune des formes chimiques prise par le métal, biologiquement en mesurant soit la concentration en métal accumulé dans un organisme au cours de l'exposition (la bioaccumulation mesurée reflétant alors la biodisponibilité), soit la réponse toxique d'un organisme à une exposition (cette réponse biologique reflétant alors la concentration biodisponible du métal).

L'influence des MOD (extraites et caractérisées tout au long de ce travail) sur la biodisponibilité du cuivre a été étudiée par ces trois approches grâce : aux paramètres de complexation obtenus dans le chapitre précédent, et à deux biotests l'un de bioaccumulation sur une mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* et l'autre de toxicité sur le crustacé *Daphnia magna*. Ces trois approches ont révélé pour l'ensemble les fractions de MOD un effet protecteur vis-à-vis du cuivre sur les organismes vivants. Ainsi pour la première fois l'effet protecteur de la MOD HPI a été mis en évidence et est loin d'être négligeable face à celui des autres fractions. Prise dans son ensemble, la MOD d'origine urbaine (par exemple issue de STEP) joue un rôle autant voire plus important que celle dans des systèmes aquatiques sous faible pression urbaine (comme par exemple à Méry sur Marne en amont de l'agglomération parisienne). Par ailleurs, conformément à d'autres travaux, la technique par DGT s'avère être un bon outil pour l'évaluation du cuivre toxique en présence de MOD.

Néanmoins, l'effet protecteur de l'ensemble des fractions n'est pas aussi important que celui pouvant être prédit par les modèles FIAM et BLM. En effet le cuivre libre, déterminé à partir des paramètres de complexation obtenus dans le chapitre précédent, n'explique qu'une faible partie du cuivre toxique et du cuivre bioaccumulable. Une partie du cuivre complexé se trouve donc accessible pour les organismes en présence de ces MOD. Ceci est également montré par la mesure du cuivre labile par DGT qui se révèle être un bon indicateur du cuivre biodisponible. Cette exception aux modèles FIAM et BLM pourrait être due à l'existence de complexes biodisponibles : capable de traverser les cellules ou à la formation de complexes ternaires à la surface des cellules et facilitant l'entrée du métal. Ces hypothèses peuvent être confortées par les résultats du premier chapitre montrant un taux de structures d'origines protéiques important dans ces MOD, les protéines jouant un rôle important dans les mécanismes de transports des métaux au sein des organismes et étant déjà impliquées dans un certain nombre d'exceptions aux modèles FIAM et BLM.

III.5. BIBLIOGRAPHIE

Ahearn G. A., Mandal P. K. and Mandal A. (2004). "Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review". *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **174** (6), 439-452.

Ah-Peng C. and De Traubenberg C. R. (2004). "Aquatic bryophytes as pollutant accumulators and ecophysiological bioindicators of stress : bibliographic synthesis". *Cryptogamie Bryologie* **25** (3), 205-248.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (1998). "Essential cell biology - An introduction to the molecular biology of the cell." *Garland Publishing*, New York, 630p.

Alberts J. J., Takács M. and Pattanayek M. (2001). "Influence of IHSS standard and reference materials on copper and mercury toxicity to "*Vibrio fischeri*"". *Acta hydrochimica et hydrobiologica* **28** (7), 428-435.

Anderson D. M. and Morel F. M. M. (1978). "Copper sensitivity of *"Gonyaulax tamarensis"*". *Limnology and Oceanography* **23** (2), 283-290.

Anderson W. C., Loehr R. C. and Smith B. P. (1999). "Environmental availability of chlorinated organics, explosives, and metals in soils". *American Academy of Environmental Engineers*, Annapolis, 210p.

Andrew R. W., Biesinger K. E. and Glass G. E. (1977). "Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to Daphnia magna". *Water Research* **11** (3), 309-315.

Apte S. C., Batley G. E., Bowles K. C., Brown P. L., Creighton N., Hales L. T., Hyne R. V., Julli M., Markich S. I., Pablo F., Rogers N. J., Stauber J. L. and Wilde K. (2005). "A comparison of copper speciation measurements with the toxic responses of three sensitive freshwater organisms". *Environmental Chemistry* **2** (4), 320-330.

Batley G. E., Apte S. C. and Stauber J. L. (2004). "Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982". *Australian Journal of Chemistry* **57** (10), 903-919.

Bernard C. and Soumia Z. (2004). "A new protocol to measure the effects of toxicants on daphnid-algae interactions". *Chemosphere* **55** (10), 1429-1438.

Bossuyt B. T. A. and Janssen C. R. (2003). "Acclimation of *"Daphnia magna"* to environmentally realistic copper concentrations". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **136** (3), 253-264.

Bury N. R. and Hogstrand C. (2002). "Influence of chloride and metals on silver bioavailability to Atlantic salmon (Salmo salar) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) yolk-sac fry". *Environmental Science and Technology* **36** (13), 2884-2888.

Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.-H. and Mouchel J.-M. (2006). "Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater". *The Science of The Total Environment* **358** (1-3), 277-285.

Campbell P. G. C. (1995). " Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critic of the free ion model." in *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Buffle J. andVan Leeuwen H. P., John Wiley & sons, Chichester, 45-102.

Campbell P. G. C., Errecalde O., Fortin C., Hiriart-Baer V. P. and Vigneault B. (2002). "Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **133** (1-2), 189-206.

Cavet J. S., Borrelly G. P. M. and Robinson N. J. (2003). "Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability". *Fems Microbiology Reviews* **27** (2-3), 165-181.

Cenci R. M. (2000). "The use of aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) as monitor of contamination in standing and running waters: limits and advantages". *Journal of Limnology* **60** (1), 53-61.

Clearwater S. J., Farag A. M. and Meyer J. S. (2002). "Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish". *Comparative Biochemistry and Physiology C: Toxicology & Pharmacology* **132** (3), 269-313.

Croot P. L., Karlson B., Van Elteren J. T. and Kroon J. J. (1999). "Uptake of Cu-64-oxine by marine phytoplankton". *Environmental Science and Technology* **33** (20), 3615-3621.

Davison W. and Zhang H. (1994). "In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels". *Nature* **367** (6463), 546-548.

De Schamphelaere K. A. C., Heijerick D. G. and Janssen C. R. (2002). "Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to Daphnia magna". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **133** (1-2), 243-258.

De Schamphelaere K. A. C., Heijerick D. G. and Janssen C. R. (2004a). "Comparison of the effect of different pH buffering techniques on the toxicity of copper and zinc to *"Daphnia Magna"* and *"Pseudokirchneriella Subcapitata"*". *Ecotoxicology* **13** (7), 697-705.

De Schamphelaere K. A. C. and Janssen C. R. (2002). "A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *"Daphnia magna"*: the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH". *Environmental Science and Technology* **36**, 48-54.

De Schamphelaere K. A. C. and Janssen C. R. (2004a). "Development and field validation of a biotic ligand model predicting chronic copper toxicity to *Daphnia magna*". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1365-1375.

De Schamphelaere K. A. C. and Janssen C. R. (2004b). "Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of Daphnia magna". *Environmental Toxicology and Chemistry* **23** (8), 2038-2047.

De Schamphelaere K. A. C. and Janssen C. R. (2004c). "Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH and water hardness on chronic toxicity to *Daphnia magna*". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1115-1122.

De Schamphelaere K. A. C., Unamuno V. I. R., Tack F. M. G., Vanderdeelen J. and Janssen C. R. (2005). "Reverse osmosis sampling does not affect the protective effect of dissolved organic matter on copper and zinc toxicity to freshwater organisms". *Chemosphere* **58** (5), 653-658.

De Schamphelaere K. A. C., Vasconcelos F. M., Tack F. M. G., Allen H. E. and Janssen C. R. (2004b). "Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *"Daphnia magna"*". *Environmental Toxicology and Chemistry* **23** (5), 1248-1255.

Di Toro D. M., Allen H. E., Bergman H. L., Meyer J. S., Paquin P. R. and Santore R. C. (2001). "Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis". *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (10), 2383-2396.

Ebert D. (2005). "Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia". *National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information*, Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books, 110p.

Errecalde O., Seidl M. and Campbell P. G. C. (1998). "Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga Selenastrum capricornutum: An exception to the free-ion model". *Water Research* **32** (2), 419-429.

Fernandez J. A., Ederra A., Nunez E., Martinez-Abaigar J., Infante M., Heras P., Elias M. J., Mazimpaka V. and Carballeira A. (2002). "Biomonitoring of metal deposition in northern Spain by moss analysis". *The Science of The Total Environment* **300** (1-3), 115-127.

Fernandez J. A., Vazquez M. D., Lopez J. and Carballeira A. (2006). "Modelling the extra and intracellular uptake and discharge of heavy metals in Fontinalis antipyretica transplanted along a heavy metal and pH contamination gradient". *Environmental Pollution* **139** (1), 21-31.

Ferreira D., Tousset N., Ridame C. and Tusseau-Vuillemin M.-H. (2008). "More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations". *Environmental Toxicology and Chemistry* **27** (10), 2108-2116.

Figueira R. and Ribeiro T. (2005). "Transplants of aquatic mosses as biomonitors of metals released by a mine effluent". *Environmental Pollution* **136** (2), 293-301.

Fortin C. and Campbell P. G. C. (2001). "Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporters in metal uptake". *Environmental Science and Technology* **35** (11), 2214-2218.

Frost U. (1990). "Transplantationsversuche mit Wassermoosen zur Indikation der Gewässergüte am Niederrhein". *Cryptogamie Bryol Lichénol* **11**, 339–352.

Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Alber R., Bonetti L., Lorenzoni G., Achilli M., Buffoni A., De Marco N., Franchi M., Pison S., Giaquinta S., Palmieri F. and Spezzano P. (2000). "Monitoring of heavy metal deposition in Northern Italy by moss analysis". *Environmental Pollution* **108** (2), 201-208.

Gilbin R. (2001)."Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité" Institut F.-M. Morel, section des sciences de la terre, *Université de Genève*, 192p.

Gillis P. L., Chow-Fraser P., Ranville J. F., Ross P. E. and Wood C. M. (2005). "Daphnia need to be gut-cleared too: the effect of exposure to and ingestion of metal-contaminated sediment on the gut-clearance patterns of D-magna". *Aquatic Toxicology* **71** (2), 143-154.

Glover C. N., Bury N. R. and Hogstrand C. (2003). "Zinc uptake across the apical membrane of freshwater rainbow trout intestine is mediated by high affinity, low affinity, and histidine-facilitated pathways". *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1614** (2), 211-219.

Gonçalves E. P. and Boaventura R. A. R. (1998). "Uptake and release kinetics of copper by the aquatic moss fontinalis antipyretica". *Water Research* **32** (4), 1305-1313.

Goodyear K. L. and McNeill S. (1999). "Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review". *The Science of The Total Environment* **229** (1-2), 1-19.

Guan R. and Wang W.-X. (2004). "Cd and Zn uptake kinetics in *"Daphnia magna"* in relation to Cd exposure history". *Environmental Science and Technology* **38** (22), 6051-6058.

Guan R. and Wang W.-X. (2006). "Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in Daphnia magna". *Environmental Pollution* **141** (2), 343-352.

Hassler C. S., Slaveykova V. I. and Wilkinson K. J. (2004). "Some fundamental (andoften overlocked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models". *Environmental Toxicology and Chemistry* **23** (2), 283-291.

Hassler C. S. and Wilkinson K. J. (2003). "Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *"Chlorella Kesslerii"*". *Environmental Toxicology and Chemistry* **22** (3), 620-626.

Hyne R. V., Pablo F., Julli M. and Markich S. J. (2005). "Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran Ceriodaphnia cf dubia". *Environmental Toxicology and Chemistry* **24** (7), 1667-1675.

Isnard P., Flammarion P., Roman G., Babut M., Bastien P., Bintein S., Essermeant L., Ferard J. F., Gallotti-Schmitt S. and Saouter E. (2001). "Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests". *Chemosphere* **45** (4-5), 659-669.

Jansen S., Blust R. and Van Leeuwen H. P. (2002). "Metal speciation dynamics and bioavailability: Zn(II) and Cd(II) uptake by mussel "*Mytilus edulis"* and Carp *"Cyprinus carpio"*". *Environmental Science and Technology* **36** (10), 2164-2170.

Janssen C. R., Vangheluwe M. and P. V. S. (2000). "A brief review and critical evaluation of status of microbiotests." in *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*, Persoons G., Janssen C. andDe Coen W., Kluwer Academic/Plenum publisher, New York, 27-37.

Kim S. D., Ma H. Z., Allen H. E. and Cha D. K. (1999). "Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *"Ceriodaphnia dubia"*: Effect of complexation kinetics". *Environmental Toxicology and Chemistry* **18** (11), 2433-2437.

Kola H. and Wilkinson K. J. (2005). "Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling". *Environmental Science and Technology* **39** (9), 3040-3047.

Kramer K. J. M., Jak R. G., van Hattum B., Hooftman R. N. and Zwolsman J. J. G. (2004). "Copper toxicity in relation to surface water-dissolved organic matter: Biological effects to Daphnia magna". *Environmental Toxicology and Chemistry* **23** (12), 2971-2980.

Lamelas C. and Slaveykova V. I. (2007). "Comparison of Cd(II), Cu(II), and Pb(II) Biouptake by Green Algae in the Presence of Humic Acid". *Environmental Science and Technology* **41** (11), 4172-4178.

Lamelas C., Wilkinson K. J. and Slaveykova V. I. (2005). "Influence of the composition of Natural Organic Matter on Pb bioavailability to microalgae". *Environmental Science and Technology* **39** (16), 6109-6116.

López J. and Carballeira A. (1993). "Interspecific differences in metal bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes". *Hydrobiologia* **263** (2), 95-107.

Lorenzo J. I., Nieto O. and Beiras R. (2002). "Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *"Paracentrotus lividus"* larvae in seawater". *Aquatic Toxicology* **58** (1-2), 27-41.

Ma H. Z., Kim S. D., Allen H. E. and Cha D. K. (2002). "Effect of copper binding by suspended particulate matter on toxicity". *Environmental Toxicology and Chemistry* **21** (4), 710-714.

Meador J. P. (1991). "The interaction of pH, dissolved organic carbon, and total copper in the determination of ionic copper and toxicity". *Aquatic Toxicology* **19** (1), 13-32.

Meylan S., Behra R. and Sigg L. (2004). "Influence of metal speciation in natural freshwater on bioaccumulation of copper and zinc in periphyton: A microcosm study". *Environmental Science and Technology* **38** (11), 3104-3111.

Morel M. L. L. (1983). "Principles of aquatic chemistry". *John Wiley & sons*, New York, 446p.

Mouvet C. (1984). "Accumulation of chromium and copper by the aquatic moss Fontinalis antipyretica L. ex Hedw. transplanted in a metal-contaminated, river". *Environmental Technology Letters.* **5**, 541-548.

Niyogi S. and Wood C. M. (2004). "Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals". *Environmental Science and Technology* **38** (23), 6177-6192.

Oikari A., Kukkonen J. and Virtanen V. (1992). "Acute toxicity of chemicals to daphnia-magna in humic waters". *The Science of The Total Environment* **118**, 367-377.

Pagenkopf G. K. (1983). "Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness". *Environmental Science and Technology* **17** (6), 342-347.

Pane E. F., Smith C., McGeer J. C. and Wood C. M. (2003). "Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia magna*". *Environmental Science and Technology* **37** (19), 4382-4389.

Paquin P. R., Gorsuch J. W., Apte S., Batley G. E., Bowles K. C., Campbell P. G. C., Delos C. G., Di Toro D. M., Dwyer R. L., Galvez F., Gensemer R. W., Goss G. G., Hogstrand C., Janssen C. R., McGeer J. C., Naddy R. B., Playle R. C., Santore R. C., Schneider U., Stubblefield W. A., Wood C. M. and Wu K. B. (2002). "The biotic ligand model: a historical overview". *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **133** (1-2), 3-35.

Penttinen S., Kostamo A. and Kukkonen J. V. K. (1998). "Combined effects of dissolved organic material and water hardness on toxicity of cadmium to Daphnia magna". *Environmental Toxicology and Chemistry* **17** (12), 2498-2503.

Penttinen S., Kukkonen J. and Oikari A. (1995). "The kinetics of cadmium in daphnia magna as affected by humic substances and water hardness". *Ecotoxicology and Environmental Safety* **30** (1), 72-76.

Pernet-coudrier B., Clouzot L., Varrault G., Tusseau-vuillemin M.-H., Verger A. and Mouchel J.-M. (2008). "Dissolved organic matter from treated effluent of a major wastewater treatment plant: Characterization and influence on copper toxicity". *Chemosphere* **73** (4), 593-599.

Phinney J. T. and Bruland K. W. (1997). "Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells". *Environmental Toxicology and Chemistry* **16** (10), 2046-2053.

Pinheiro J. P., Galceran J. and VanLeeuwen H. P. (2004). "Metal Speciation Dynamics and Bioavailability: Bulk Depletion Effects". *Environmental Science and Technology* **38** (8), 2397-2405.

Playle R. C., Gensemer R. W. and Dixon D. G. (1992). "Copper Accumulation on Gills of Fathead Minnows - Influence of Water Hardness, Complexation and Ph of the Gill Microenvironment". *Environmental Toxicology and Chemistry* **11** (3), 381-391.

Rainbow P. S. (2002). "Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?" *Environmental Pollution* **120** (3), 497-507.

Rand G. M., Wells P. G. and McCarty L. S. (1995). " Introduction to Aquatic Toxicology". in *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, Rand G. M., Taylor & Francis, USA, 3-67.

Santore R. C., Di Toro D. M., Paquin P. R., Allen H. E. and Meyer J. S. (2001). "Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2.application to acute copper toxicity in freswaterfish and daphnia". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2397-2402.

Scally S., Davison W. and Zhang H. (2006). "Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films". *Analytica Chimica Acta* **558** (1-2), 222-229.

Siebert A., Bruns I., Krauss G.-J., Miersch J. and Markert B. (1996). "The use of the aquatic moss Fontinalis antipyretica L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals : 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in Fontinalis antipyretica L. ex Hedw." *Science of The Total Environment* **177** (1-3), 137-144.

Slaveykova V. I. and Wilkinson K. J. (2003). "Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga Chlorella kesslerii". *Environmental Chemistry Letters* **1** (3), 185-189.

Slaveykova V. I., Wilkinson K. J., Ceresa A. and Pretsch E. (2003). "Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *"Chlorella Kesslerii"*". *Environmental Science and Technology* **37**, 1114-1121.

Tsui M. T. K., Wang W.-X. and Wong M. H. (2006). "Influences of macroalga-derived dissolved organic carbon on the aquatic toxicity of copper and cadmium". *Chemosphere* **65** (10), 1831-1835.

Turkey J. W. (1977). "Exploratory data analysis". *Adsison-Wesley*, New York, 506p.

Tusseau-Vuillemin M.-H., Gilbin R., Bakkaus E. and Garric J. (2004). "Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *"Dapnia Magna"*". *Environmental Toxicology and Chemistry* **23** (9), 2154-2161.

Van Ginneken L., Bervoets L. and Blust R. (2001). "Bioavailability of Cd to the common carp, *"Cyprinus carpio"*, in the presence of humic acid". *Aquatic Toxicology* **52** (1), 13-27.

Van Leeuwen H. P. (1999). "Metal speciation dynamics and bioavailability: Inert and labile complexes". *Environmental Science and Technology* **33** (21), 3743-3748.

Vigneault B. and Campbell P. G. C. (2005). "Uptake of cadmium by freshwater green algae: Effects of pH and aquatic humic substances". *Journal of Phycology* **41** (1), 55-61.

Vijver M. G., Van Gestel C. A. M., Lanno R. P., Van Straalen N. M. and Peijnenburg W. (2004). "Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: A review". *Environmental Science and Technology* **38** (18), 4705-4712.

Villaescusa I., Martinez M., Pilar M., Murat J. C. and Hosta C. (1996). "Toxicity of cadmium species on luminescent bacteria". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **354** (5-6), 566-570.

Villavicencio G., Urrestarazu P., Carvajal C., De Schamphelaere K. A. C., Janssen C. R., Torres J. C. and Rodriguez P. H. (2005). "Biotic ligand model prediction of copper toxicity to daphnids in a range of natural waters in Chile". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1287-1299.

Westcott K. and Kalff J. (1996). "Environmental factors affecting methyl mercury accumulation in zooplankton". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53** (10), 2221-2228.

Zhang H. and Davison W. (1995). "Performance-characteristics of Diffusion Gradients in Thin-films for the *in situ* measurement of trace-metals in aqueous-solution". *Analytical Chemistry* **67** (19), 3391-3400.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les systèmes aquatiques urbanisés présentent des teneurs importantes en micropolluants organiques et métalliques en raison notamment des rejets urbains de temps sec domestiques et industriels. L'impact de ces micropolluants, notamment des micropolluants métalliques, sur le milieu récepteur va dépendre pour une large part de leur spéciation. En effet, les métaux traces sont présents dans les milieux aquatiques sous différentes formes chimiques. Au sein de la phase dissoute (au sens opérationnel du terme), les métaux peuvent être sous forme libre hydratée ou sous forme de complexe inorganique ou organique voire adsorbée sur une fraction colloïdale. Ces différentes formes, qui évoluent en fonction des conditions physico-chimiques du milieu, conditionnent non seulement le temps de séjour dans les différents compartiments du milieu, mais aussi la biodisponibilité, voire la toxicité du métal vis à vis des organismes vivants.

Dans les systèmes aquatiques, la matière organique dissoute joue un rôle clé sur les cycles géochimiques métaux traces. Si durant les dernières décennies, de nombreuses études ont été publiées sur la capacité de la matière organique dissoute (MOD) à complexer les métaux, beaucoup d'entre elles ont trouvé des capacités et des constantes de complexation variant significativement pour le cuivre, le plomb, le zinc et le cadmium de 3 à 12 ordres de grandeurs pour les constantes de complexation et jusqu'à 6 ordres pour la concentration en sites complexants. Cette grande dispersion peut être due à la variabilité expérimentale, aux fenêtres analytiques employées (limites de détection, de quantification), aux choix des ratios métal-ligand, ainsi qu'aux conditions expérimentales (pH, force ionique, température) qui ne permettent de détecter qu'une partie des complexes formés ainsi qu'aux modèles utilisés pour déterminer ces paramètres. Mais cette dispersion des données peut également être imputée à la nature et l'origine des matériaux isolés. Pour autant, il est intéressant de noter que la plupart des travaux se sont bornées à étudier les substances humiques qui représentent en moyenne de 40 à 60 % du carbone organique dissous dans les eaux naturelles de surface. Cependant, dans les cours d'eau urbanisés, en raison des rejets urbains et de la productivité primaire induite, le caractère hydrophobe de la matière organique dissoute diminue au profit de son caractère hydrophile et des études récentes menées sur des eaux usées urbaines ont mis en évidence leur capacité à complexer les métaux malgré (ou en raison de) leur forte teneur en substances hydrophiles. Cependant en raison de la très grande difficulté de l'isolation de la matière organique hydrophile, très peu d'informations sont disponibles dans la littérature.

L'objectif de mon travail était donc d'étudier les interactions entre la matière organique dissoute d'origine urbaine, notamment la fraction hydrophile, et les métaux (cuivre, plomb) afin de mettre en évidence l'influence de la MOD des milieux urbanisés sur la spéciation, la biodisponibilité des métaux dans les milieux récepteurs en zone urbaine.

Afin de mettre en évidence le rôle de la matière organique dissoute d'origine urbaine sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux et de le comparer à des substances hydrophobes issues du milieu naturel, quatre sites ont été étudiés dans le cadre de travail. Il s'agit tout d'abord de la station d'épuration Seine-Aval à Achères (78) qui traite chaque jour plus de 70 % des eaux usées de l'agglomération parisienne par temps sec. Cette station d'épuration est donc particulièrement représentative des rejets urbains parisiens de temps sec dans le milieu récepteur. Un site localisé à l'amont de l'agglomération parisienne, sur la Marne à Méry sur Marne, a également été choisi en raison de sa faible urbanisation et a constitué en quelque sorte notre « référence » peu urbanisée. Deux autres sites localisés sur la

seine, à l'aval de l'agglomération parisienne et des principaux points de rejets des eaux usées de temps sec de l'agglomération, ont été choisis. Il s'agit du site d'Andrésy qui en aval proche de la STEP Seine-Aval. Ce site a été choisi afin d'évaluer l'impact des rejets urbains sur la qualité de la MOD en Seine. Le second site aval est localisé à Méricourt à 50 km à l'aval d'Andrésy et a été choisi pour évaluer les éventuelles modifications des MOD durant leur séjour dans le milieu.

La complexité des eaux de surface en fait un milieu particulièrement délicat à étudier et à comprendre dans son ensemble. Si l'étude directe des eaux peut s'avérer préférable dans le cadre de projets à vocation très appliquée, l'extraction préalable des MOD trouve un intérêt indéniable pour des travaux à caractère plus fondamental nécessitant un contrôle rigoureux des conditions expérimentales. L'extraction qui sous-entend la séparation de la phase organique de la phase minérale devient indispensable lorsque l'étude structurale des MOD s'impose, la présence de sels engendrant des interférences importantes au niveau de nombreux outils de caractérisation (i.e. analyses élémentaires, infrarouge, SUVA, RMN ^{13}C, etc.). Il n'existe pas de méthode simple permettant l'extraction quantitative des MOD, ce résultat ne pouvant être aujourd'hui qu'approché (la procédure expérimentale induisant toujours des pertes) grâce à la combinaison de plusieurs opérations (adsorption, précipitation, distillation, etc.). Etant donné notre objectif, il a été décide de réaliser le fractionnement de la MOD selon des critères de polarité. De plus, ce fractionnement permet de « simplifier » l'analyse structurale des MOD et offre par ailleurs la possibilité d'une étude plus sélective des sites réactionnels de ces fractions.

Sur chacun de nos sites d'étude, un grand volume d'eau brute a été prélevé, filtré, adouci et préconcentré par osmose inverse. L'échantillon préconcentré est alors acidifié puis passé sur deux résines (DAX-8 et XAD-4) placées en série dans le but de fractionner l'échantillon selon la polarité en trois fractions. La fraction hydrophobe et la fraction transphilique sont récupérées par élution des résines. La fraction hydrophile, qui nous intéresse tout particulièrement dans le cadre de cette étude, n'est pas retenue par les résines, elle est part conséquent récupérée dans l'effluent de résines avec tous les sels initialement présents dans l'échantillon. La purification (séparation de la MOD hydrophile et des sels) de la fraction hydrophile a été réalisée par des successions de distillations zéotrophiques. Le protocole déjà existant, a été modifié afin d'améliorer l'extraction de la MOD à caractère hydrophile. Les modifications et évolutions que le protocole d'extraction a reçues permettent aujourd'hui de disposer d'un outil intéressant dans la mesure où l'objectif d'une extraction quantitative peut être pratiquement atteint. Grâce à la diversité des propriétés physico-chimiques des ressources étudiées, l'expérience acquise nous permet également de prédire les performances de chacune des opérations développées. Les modifications apportées ici au protocole d'extraction des MOD permettent désormais d'accéder à des fractions hydrophiles d'une pureté raisonnable permettant par la suite une bonne caractérisation. En effet, la matière organique hydrophile purifiée ne comporte que très peu de résidu en plus du carbone, hydrogène, oxygène, azote et soufre qui représentent plus de 90% en masse de ces fractions. Le protocole de fractionnement de la matière organique dissoute est désormais maîtrisé ce qui nous permet d'avoir accès à la répartition du carbone organique dissous dans les échantillons étudiés entre les fractions hydrophobes, transphiliques et hydrophiles. En revanche des efforts sont nécessaires pour augmenter le rendement d'extraction de cette fraction HPI, car les phénomènes de coprécipitation avec les sels sont encore trop importants et peuvent parfois altérer la représentativité de la fraction HPI extraite. L'utilisation d'autres techniques telles que l'électrodialyse ou la combinaison de colonnes échangeuses de cations et d'anions pourrait être une solution dans la séparation des MOD HPI vis-à-vis de la phase inorganique.

La répartition du COD selon les fractions varie fortement d'un site à l'autre puisque la fraction hydrophobe représente plus de 60% du COD dans l'échantillon de Méry/Marne qui est notre échantillon référence relativement peu urbanisé alors que cette fraction hydrophobe est de l'ordre de 35% dans les effluents de la STEP Seine-Aval. Pour les échantillons d'origine urbaine, la fraction hydrophile est la fraction prédominante puisqu'elle représente près de la moitié du COD. La fraction transphilique représente de 15 à 25% selon les échantillons. La forte proportion de COD hydrophile dans les rejets urbains influence sensiblement le site d'Andrésy (situé à l'aval immédiat des rejets de la STEP Seine-Aval) avec une fraction hydrophile qui est presque équivalente à la fraction hydrophobe alors qu'elle est trois fois plus faible à l'amont de l'agglomération. L'hydrophobicité augmente ensuite à Méricourt avec une fraction hydrophobe qui redevient majoritaire. Nous pouvons donc observer qu'en période d'étiage (juin 2007), période ou l'impact des rejets urbains est maximal en raison d'une plus faible dilution, le COD est principalement sous forme non hydrophobe dans les cours d'eau en zone fortement urbanisée. Il est donc confirmé que si l'on veut étudier les interactions entre la MOD et les micropolluants métalliques dans les cours d'eau fortement urbanisés, il est indispensable de prendre en compte la fraction hydrophile.

Un large éventail d'outils analytiques (*analyses élémentaires* : C, H, O, N, S ; *isotopiques* : ^{13}C, ^{15}N ; *fonctionnelles* : UV-vis, IRTF, fluorescence, HPSEC, titration acido-basique, redissolution cathodique des complexes MOD-Mo(VI) ; et *moléculaire* : pyrolyse-CG-SM) a été déployé dans le but de caractériser, dans les meilleurs conditions possibles, les fractions de MOD extraites (en particulier les fractions HPI). Les échantillons provenant des effluents de STEP présentent des teneurs très importantes en azote, notamment la fraction hydrophile (10 à 12% d'azote). D'une manière générale, on peut noter des teneurs en carbone qui diminuent et des teneurs en azote qui augmentent lorsque le caractère hydrophile augmente. Les teneurs en soufre (1 à 2%) sont plus importantes que dans les substances humiques de référence (0.5%), notamment pour les effluents de STEP mais sans lien apparent avec la nature de la fraction. Les analyses, notamment en spectroscopie UV-visible mettent en évidence une faible aromaticité pour tous nos échantillons comparée à celle des substances humiques de référence, particulièrement pour les effluents de STEP, et qui décroît avec l'augmentation du caractère hydrophile. Une forte proportion de matière organique d'origine protéique pour les effluents de STEP notamment pour les fractions hydrophiles a également pu être observée (spectrofluorescence, pyrolyse-CG-SM), cela entraînant une présence importante de groupements fonctionnels azotés (spectroscopie infrarouge, confirmée par l'étude des interactions avec le proton et les métaux).

L'influence des différentes fractions de MOD préalablement isolées sur la spéciation du cuivre et du plomb a été étudiée. Pour ces deux métaux, les constantes et capacités de complexation ont été obtenues grâce à la titration de la MOD par des ajouts croissants de métaux. L'étude des propriétés complexantes des fractions de MOD vis-à-vis du cuivre a été abordée grâce à des techniques et avec des conditions expérimentales communément retrouvées dans la bibliographie (électrode ionique spécifique, pH 5 et 7, force ionique 0,1 M). L'objectif et l'intérêt de notre étude a été de produire des données de complexations relatives aux MOD HPI, pour ainsi évaluer leur rôle (par comparaison à celui des substances hydrophobes) dans le transport et le devenir des métaux en Seine. Les résultats obtenus ici pour la première fois vis-à-vis des MOD hydrophiles d'origine urbaine ont montré une réactivité particulière vis-à-vis du cuivre. En effet les fractions HPI extraites et caractérisées précédemment et plus généralement les fractions issues des effluents de station d'épuration ont montré une teneur en sites complexants plus élevée que ce qu'il avait été déjà observé pour des matières organiques naturelles. Les valeurs des constantes ne semblent pas varier

d'une fraction à l'autre et assez peu suivant l'origine de la MOD. Des corrélations intéressantes ont pu être dégagées entre les paramètres de complexation et les caractéristiques structurales des fractions mettant en évidence le rôle particulier de l'azote dans la complexation du cuivre notamment sous la forme de groupements amines. Toutefois, ces corrélations restent d'un ordre assez général. L'étude de la structure des complexes par l'emploi de techniques telles que la spectroscopie d'absorption des rayons X permettrait peut-être d'affiner le niveau de comparaison entre les différentes fractions et, par là même, de mieux définir la nature des sites complexants.

Pour le plomb, la détermination du plomb libre en solution durant la titration a été effectuée à l'aide de la méthode voltampérométrique AGNES qui permet de mesurer l'ion libre en solution (contrairement à la plupart des autres méthodes voltampérométriques). Les résultats expérimentaux obtenus ont été modélisés avec le modèle NICA. Si, dans le cas du plomb, les résultats obtenus sont entachés d'une trop grande incertitude pour pouvoir être interprétés, nous disposons aujourd'hui d'une méthodologie permettant l'étude des interactions MOD – plomb dans des conditions dites « environnementales » (faible concentration en plomb, en MOD, large gamme de pH).

L'effet des métaux sur les écosystèmes dépend principalement de leurs diverses formes en solution, c'est-à-dire leur spéciation. En dépit de certaines exceptions, les modèles FIAM et désormais le BLM, ont montré que la forme libre du métal est celle à l'origine d'un effet biologique en prenant en compte les facteurs pouvant modifier cet effet tel que la composition cationique et anionique, la présence de certains ligands organiques, etc.. La biodisponibilité du cuivre a été évaluée ici de trois manières différentes et complémentaires : chimiquement en estimant la spéciation du métal dans l'environnement (grâce aux paramètres de complexation précédemment déterminés) et en faisant une hypothèse de biodisponibilité sur chacune des formes chimiques prise par le métal, biologiquement en mesurant la concentration en métal accumulé dans une mousse aquatique (*Fontinalis antipyretica*) au cours de l'exposition (la bioaccumulation mesurée reflétant alors la biodisponibilité), et biologiquement encore en évaluant la réponse toxique d'un crustacé (*Daphnia magna*) à une exposition (cette réponse biologique reflétant alors la concentration biodisponible du métal). Ces trois approches ont révélé pour l'ensemble des fractions de MOD un effet protecteur vis-à-vis du cuivre sur les organismes vivants. Ainsi pour la première fois le rôle de la MOD HPI a été mis en évidence et est loin d'être négligeable face à celui des autres fractions. En effet, la MOD d'origine urbaine en général et la fraction hydrophile en particulier influence fortement la biodisponibilité et la toxicité du cuivre avec notamment un effet protecteur au moins aussi important que (i) les fractions issues de sites moins urbanisés (Mery/Marne) et que (ii) les substances humiques de référence (Acides fulviques de la rivière Suwannee).

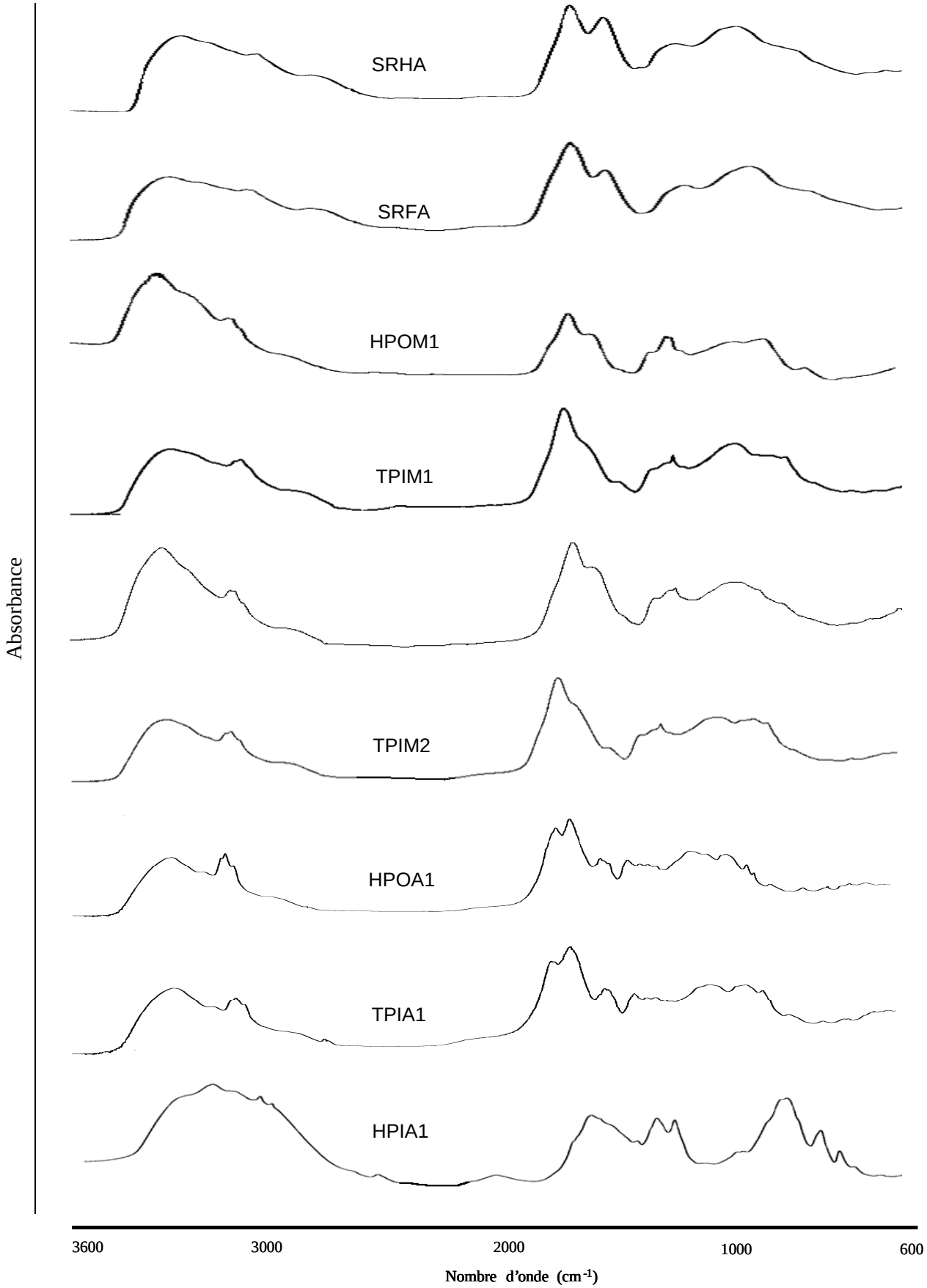
Néanmoins l'effet protecteur de l'ensemble des fractions n'est pas à la hauteur de celui pouvant être prédit par les modèles FIAM et BLM puisque le cuivre libre n'explique qu'une faible partie du cuivre toxique et du cuivre bioaccumulable. Une partie du cuivre complexé se trouve donc accessible pour les organismes en présence de ces MOD. Ceci est également montré par la mesure du cuivre labile par DGT qui se révèle être un bon indicateur du cuivre biodisponible. Cette exception aux modèles FIAM et BLM pourrait être due à l'existence de complexes biodisponibles : capable de traverser les cellules ou à la formation de complexes ternaires à la surface des cellules et facilitant l'entrée du métal. Ces hypothèses peuvent être confortées par les résultats du premier chapitre montrant un taux de structures d'origines protéiques importants dans ces MOD, les protéines jouant un rôle important dans les mécanismes de transports des métaux au sein des organismes et étant déjà impliquées dans un certain nombre d'exception aux modèles FIAM et BLM.

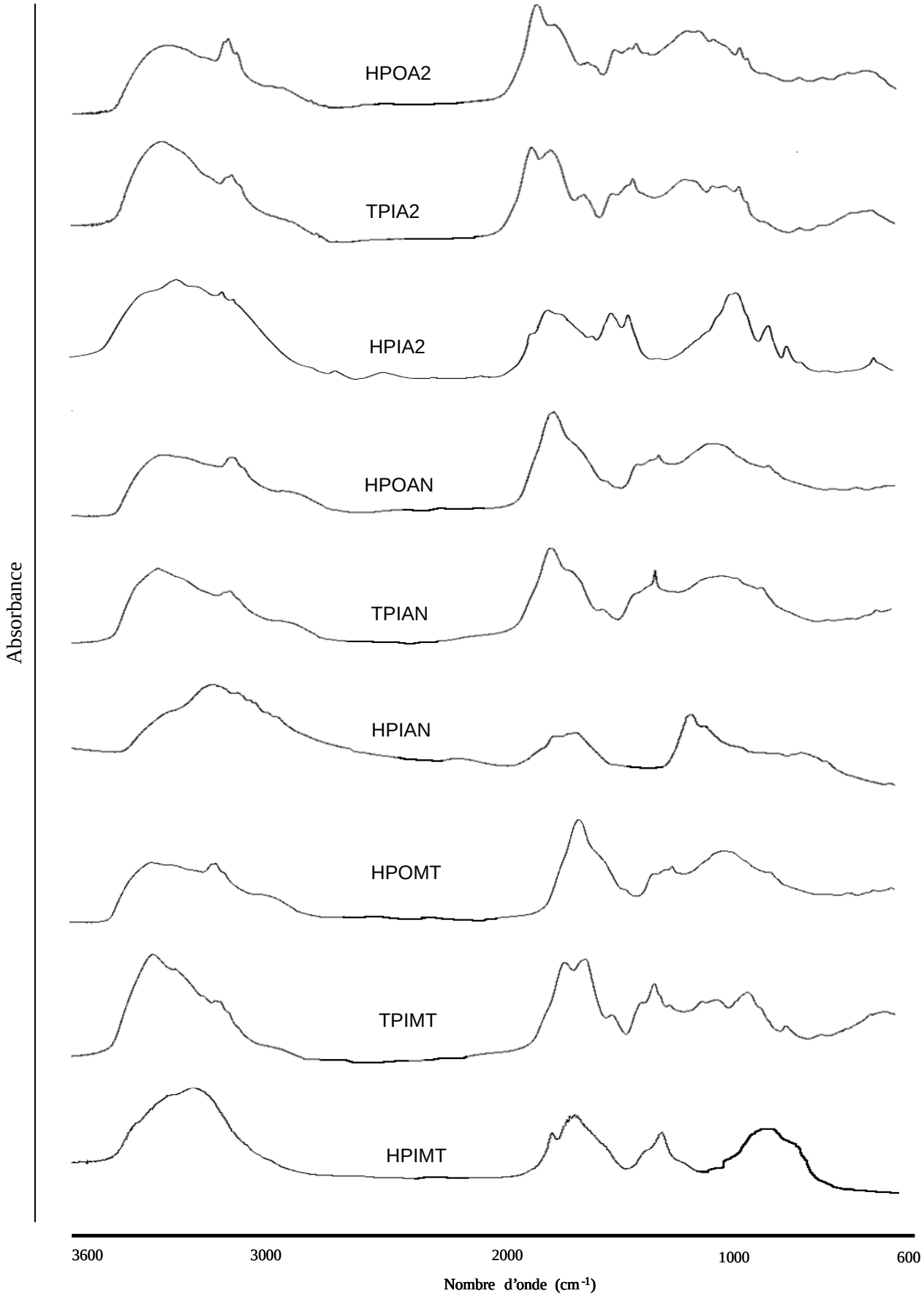
L'ensemble de cette étude a permis non seulement d'apporter de nombreuses informations sur la composition et la structure de la MOD en milieu urbain mais aussi d'évaluer son influence sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux. Si sa réactivité vis-à-vis des métaux semble particulièrement importante principalement en raison de sa richesse en groupements fonctionnels notamment azotés, en revanche son faible degré d'aromaticité, d'hydrophobicité autrement dit de maturation soulève de nouvelles perspectives sur le devenir de ces MOD d'origine anthropique dans le milieu récepteur en particulier notamment vis-à-vis de la spéciation et de la biodisponibilité des métaux. En effet, il est particulièrement important de pouvoir évaluer, grâce à des études de biodégradabilité de la MOD urbaine, la persistance de cette MOD dans le milieu récepteur et donc la persistance de son effet sur la spéciation, la biodisponibilité et la toxicité des métaux traces dans les systèmes urbanisés.

ANNEXES

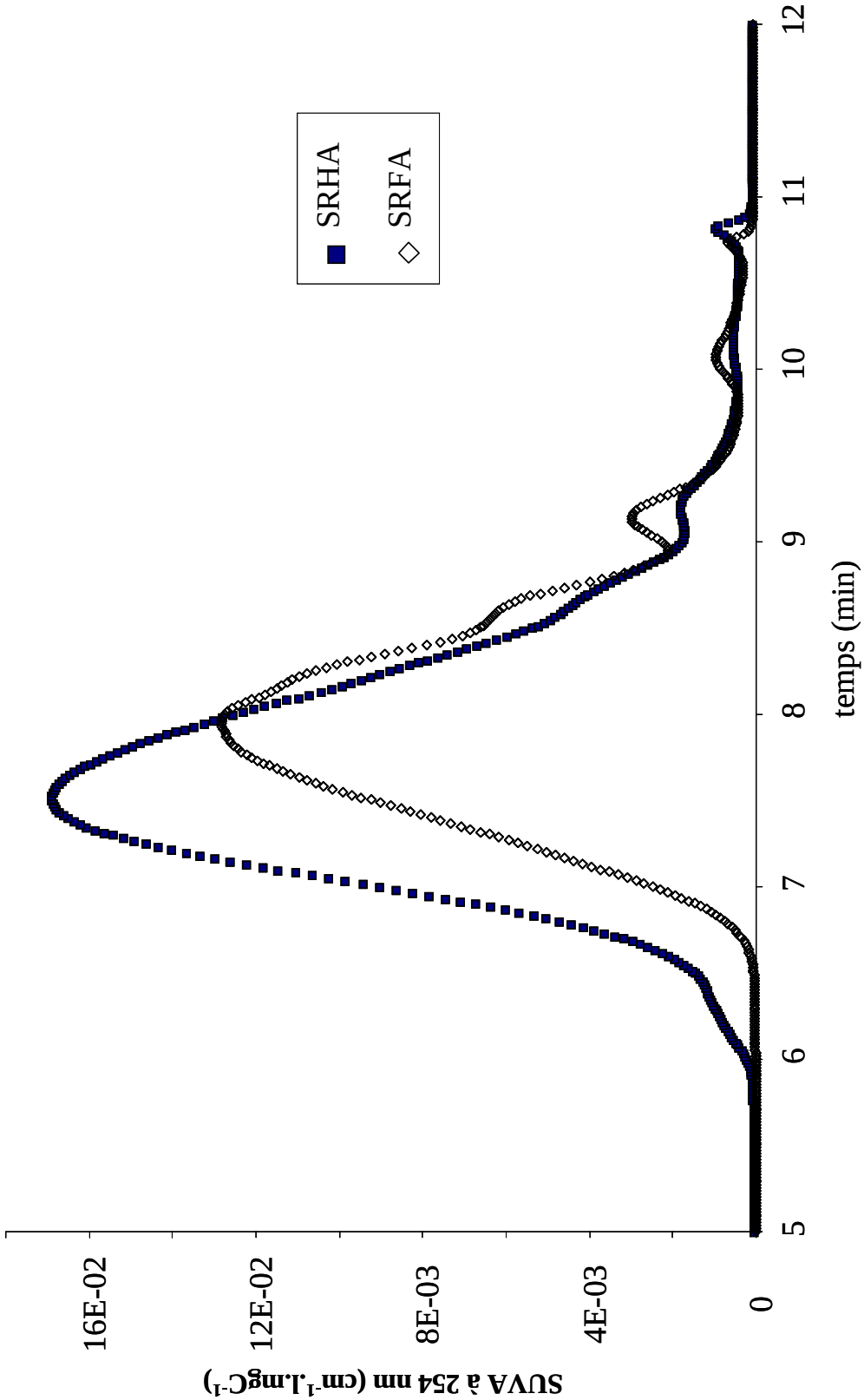
ANNEXE 1 : SPECTRES D'ABSORBANCE IRTF **232**
ANNEXE 2 : CHROMATOGRAMMES D'EXCLUSION DE TAILLE **234**
ANNEXE 3 : PYROGRAMMES DES FRACTIONS DE MOD **238**
ANNEXE 4 : COMPOSITIONS DES EAUX MINERALES UTILISEES POUR LES BIOTESTS **253**
ANNEXE 5: PROGRAMME DE MINERALISATION **254**
ANNEXE 6: CINETIQUE DE DISPARITION DU CUIVRE (BIOTESTS DE BIOACCUMULATION) **255**
ANNEXE 7: ARTICLE 1 ..... **261**
ANNEXE 8 : ARTICLE 2 ..... **269**

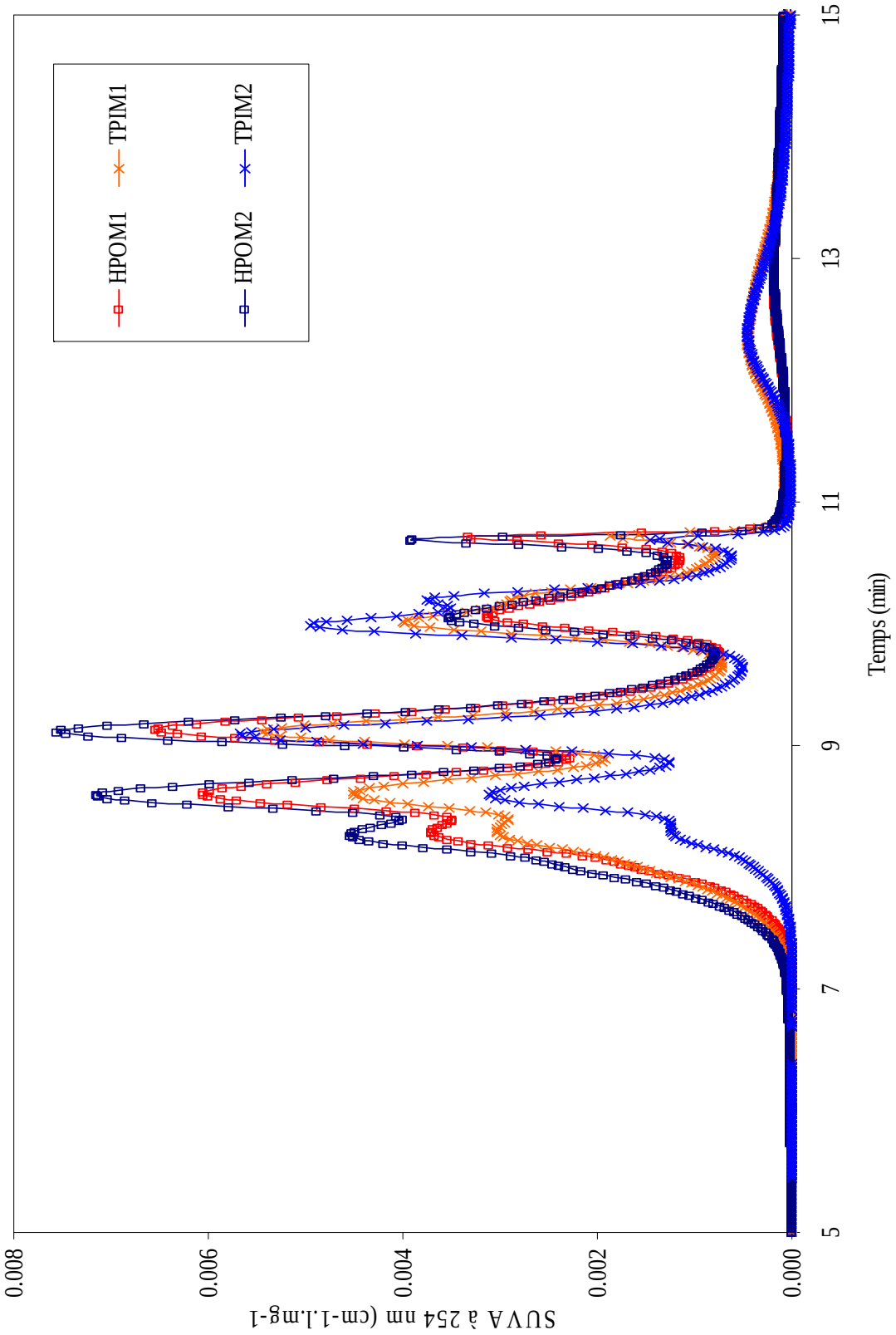
ANNEXE 1 : SPECTRES D'ABSORBANCE IRTF

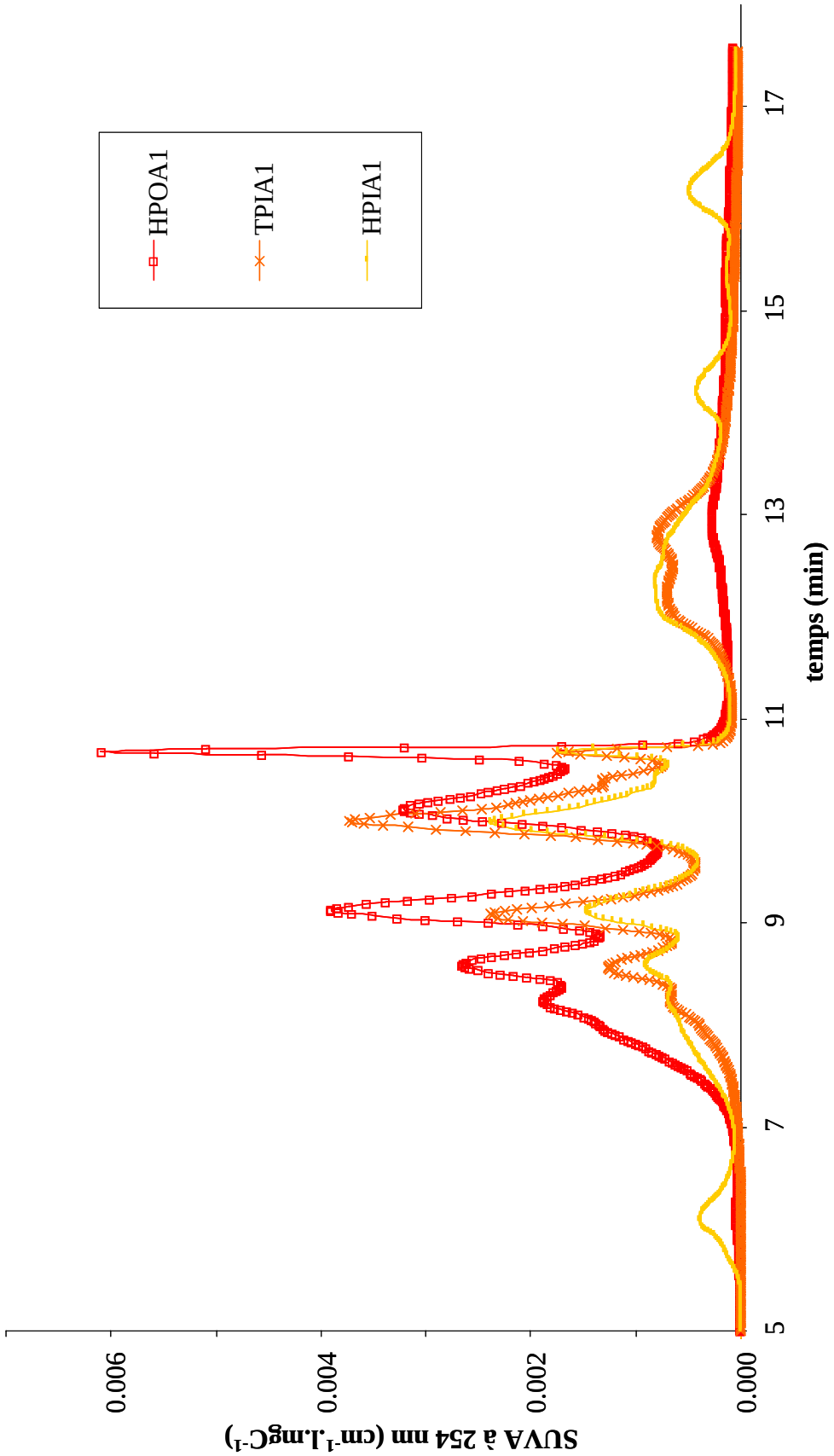


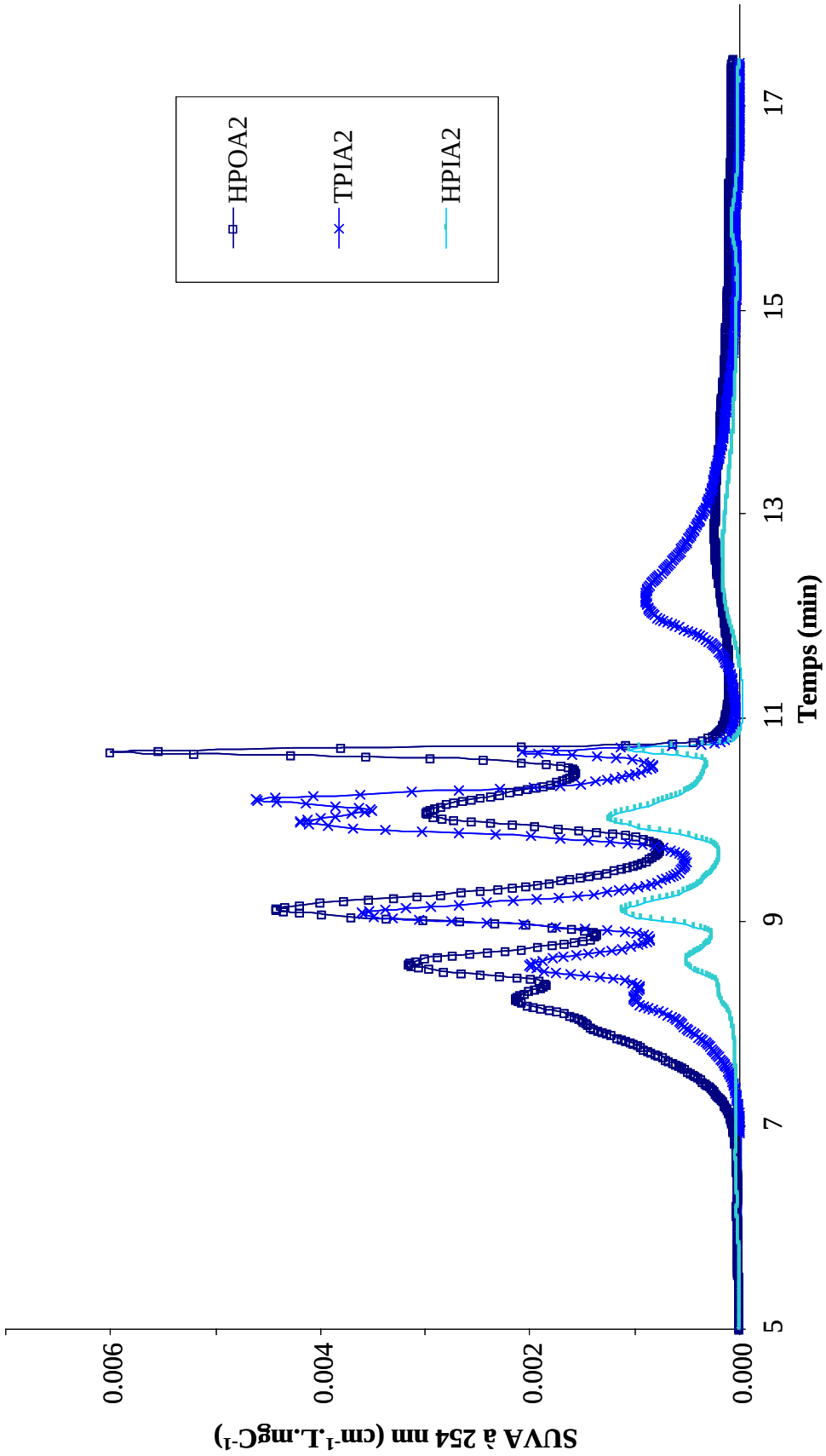

HPOA2
TPIA2
HPIA2
HPOAN
TPIAN
HPIAN
HPOMT
TPIMT
HPIMT
Absorbance
3600
3000
2000
1000
600
Nombre d'onde (cm-1)

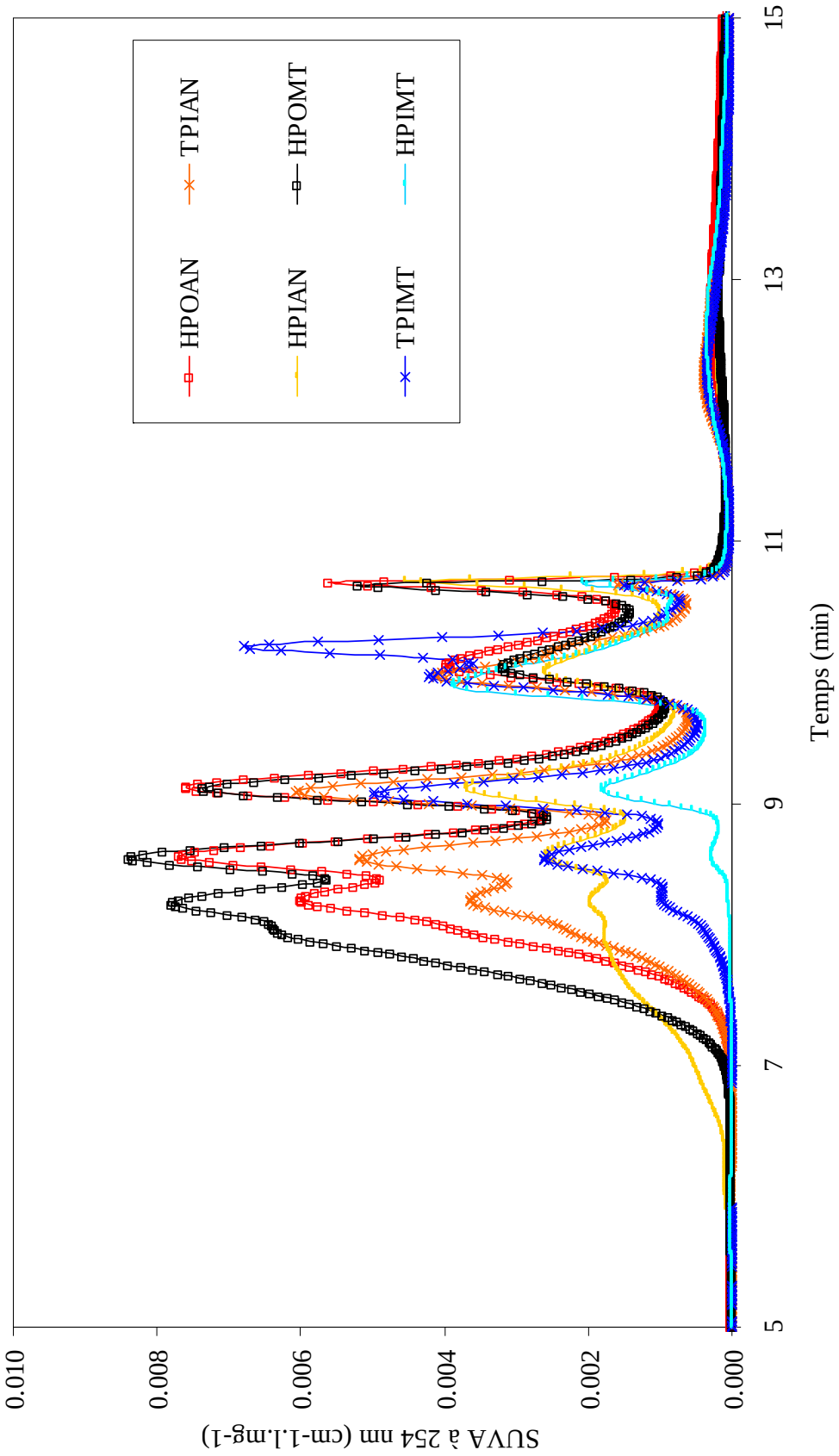
ANNEXE 2 : CHROMATOGRAMMES D'EXCLUSION DE TAILLE



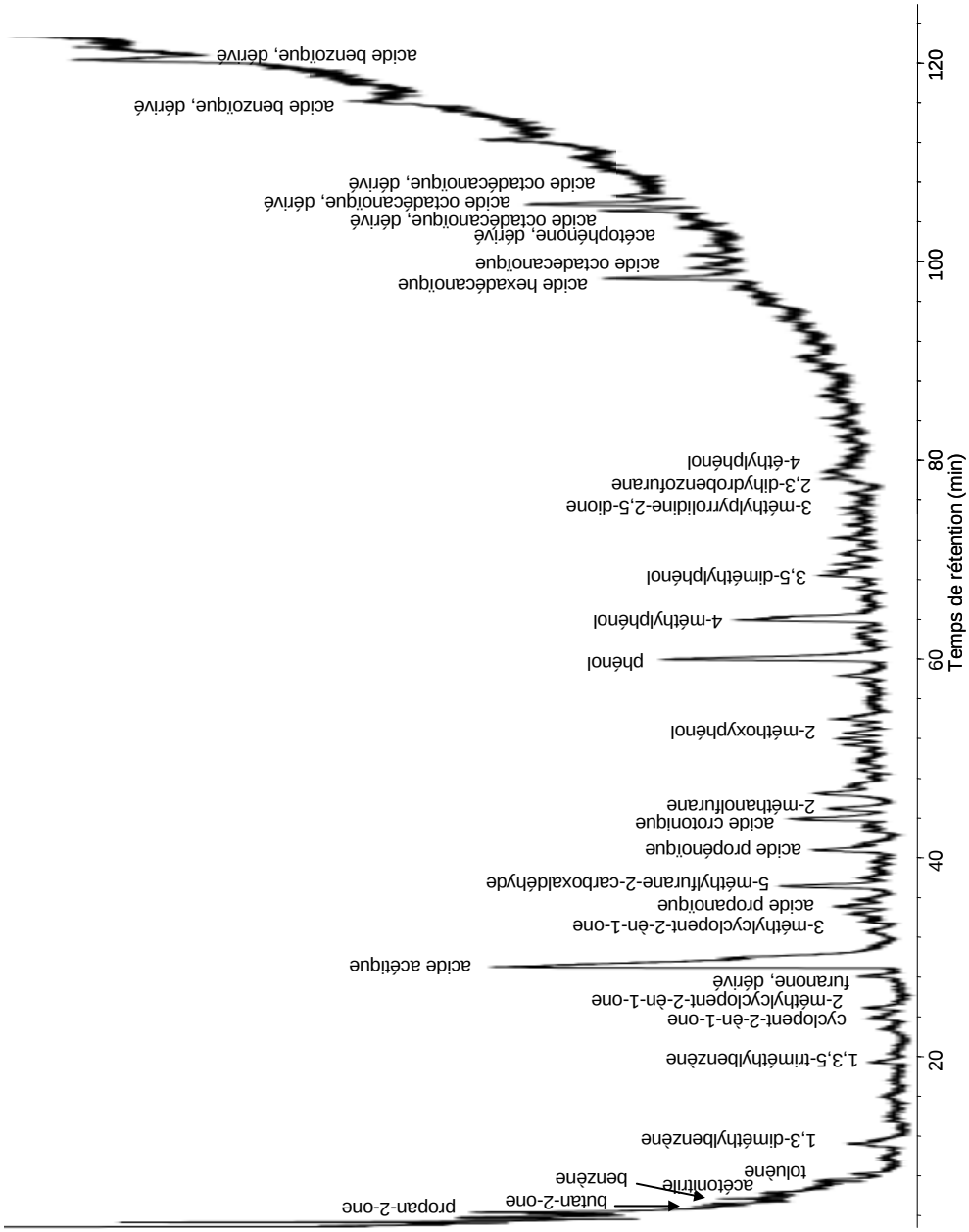

HPOM1
TPIM1
HPOM2
TPIM2
SUVA à 254 nm (cm-1.l.mg-1)
0.000
0.002
0.004
0.006
0.008
Temps (min)
5
7
9
11
13
15


SUVA à 254 nm (cm-1.L.mgC-1)
0.006
0.004
0.002
0.000
5
7
9
11
13
15
17
temps (min)
HPOA1
TPIA1
HPIA1

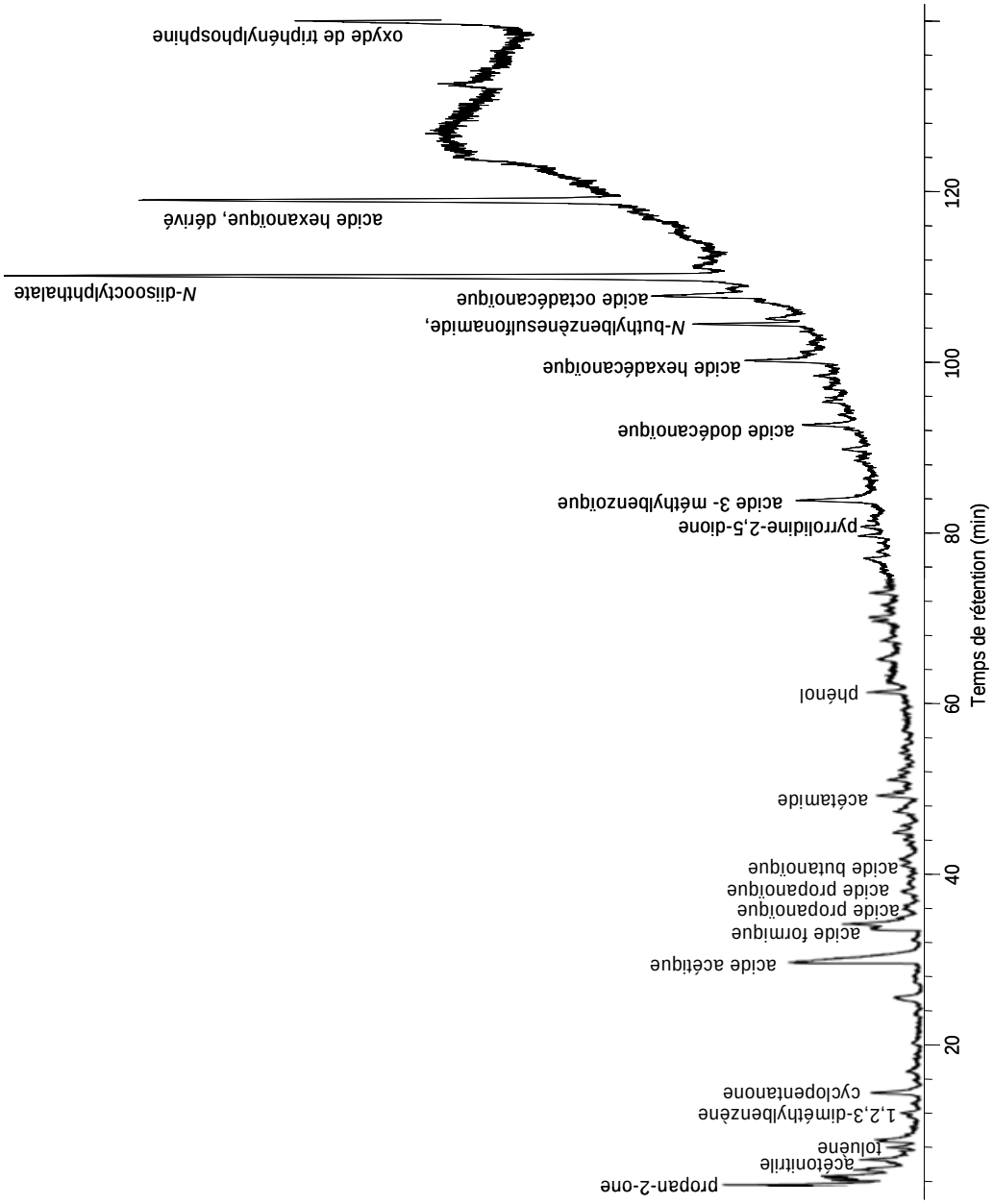

SUVA à 254 nm (cm-1.L.mgC-1)
0.006
0.004
0.002
0.000
5
7
9
11
13
15
17
Temps (min)
HPOA2
TPIA2
HPIA2


HPOAN
TPIAN
HPIAN
HPOMT
TPIMT
HPIMT
SUVA à 254 nm (cm-1.l.mg-1)
0.010
0.008
0.006
0.004
0.002
0.000
5
7
9
11
13
15
Temps (min)

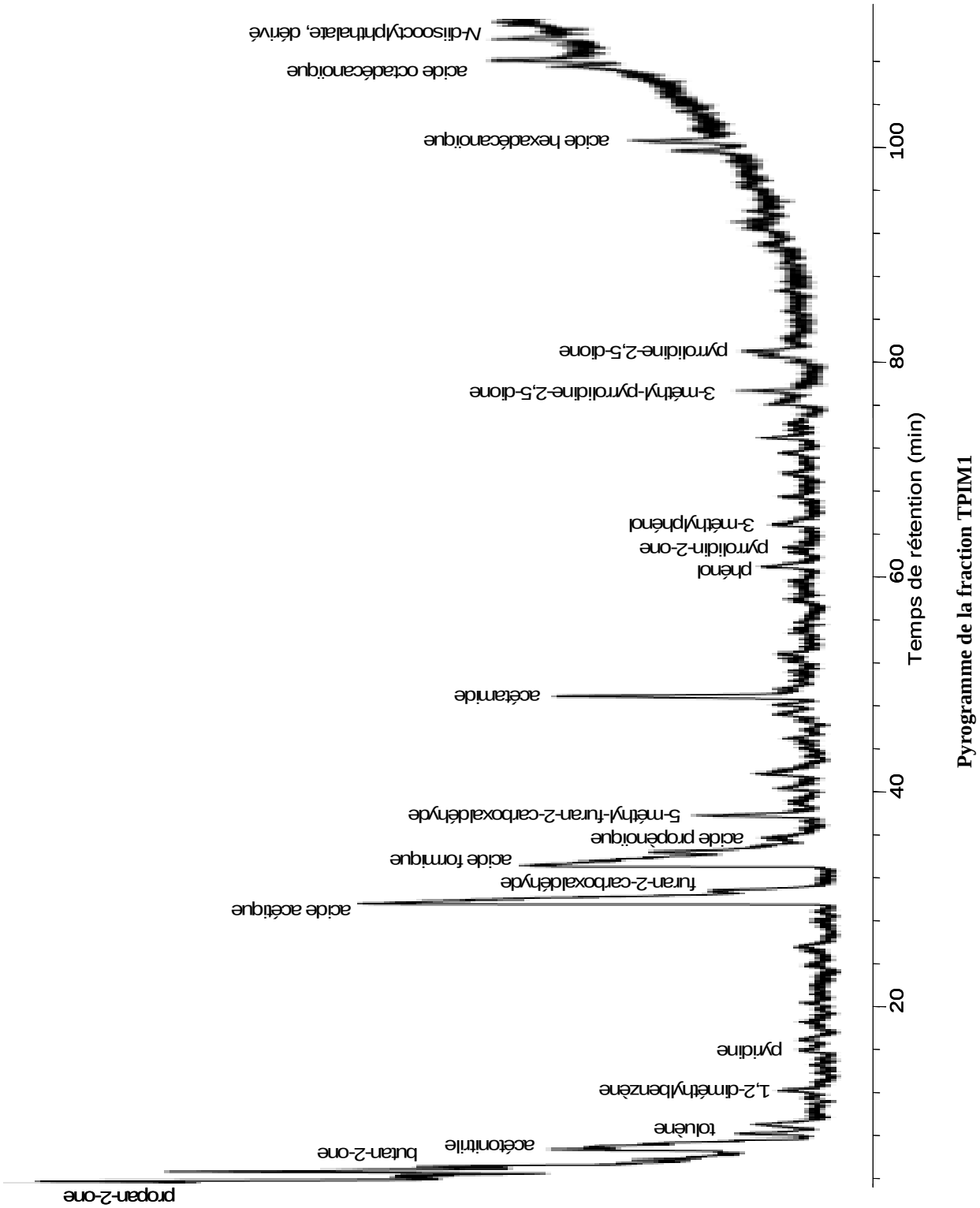
ANNEXE 3 : PYROGRAMMES DES FRACTIONS DE MOD



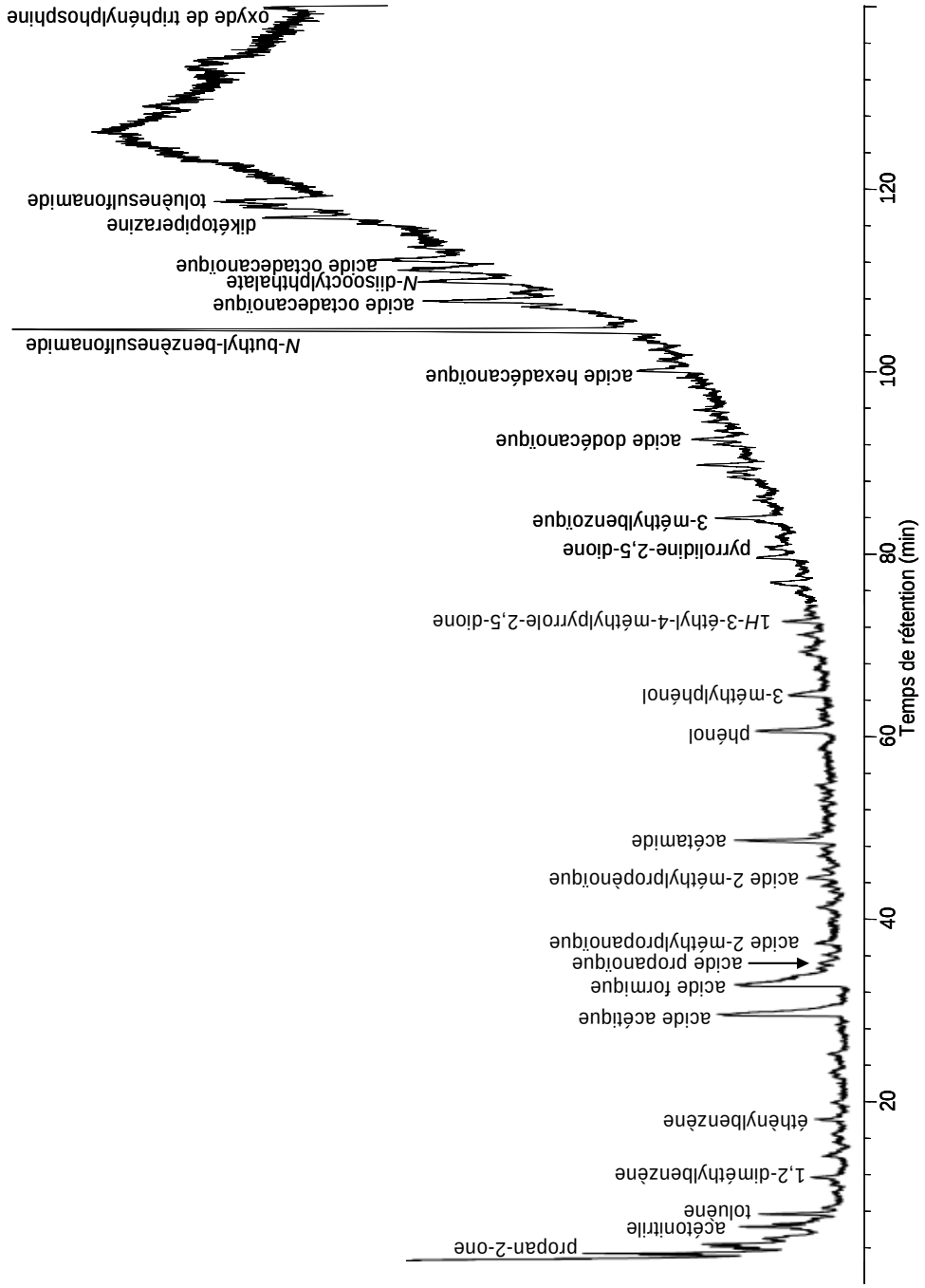
Pyrogramme de la fraction de référence SRFA



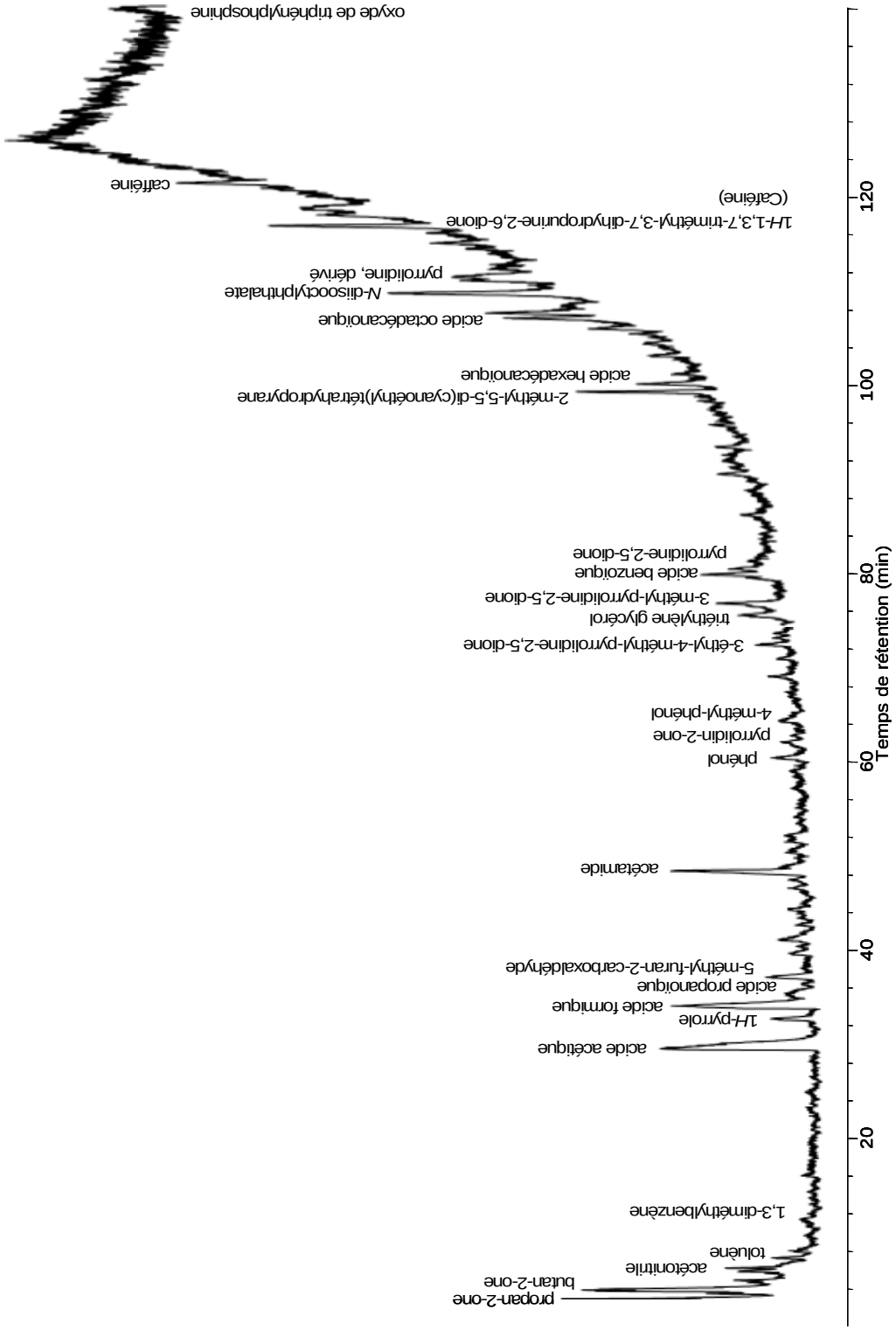
Pyrogramme de la fraction HPOM1



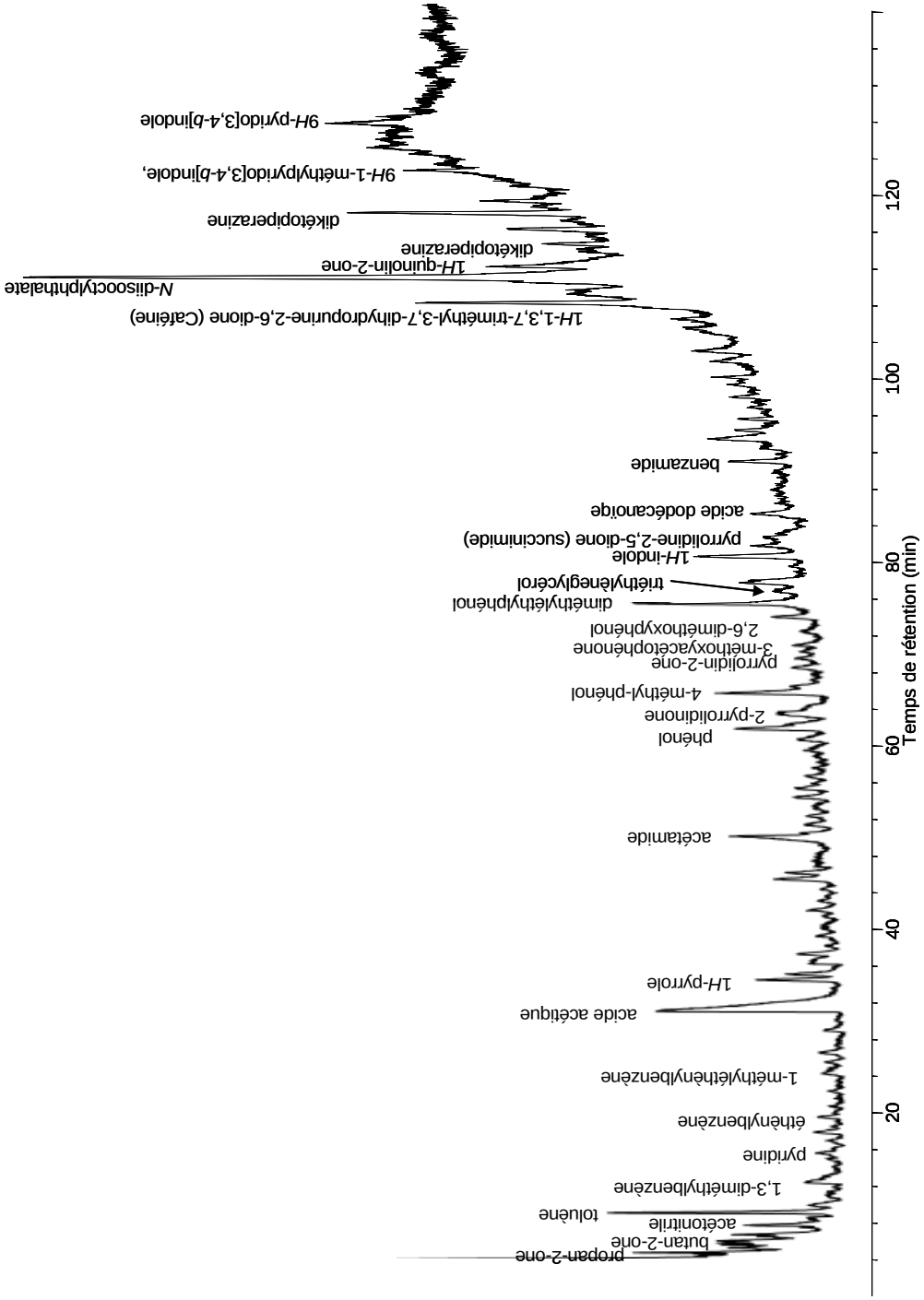
Pyrogramme de la fraction TPIM1



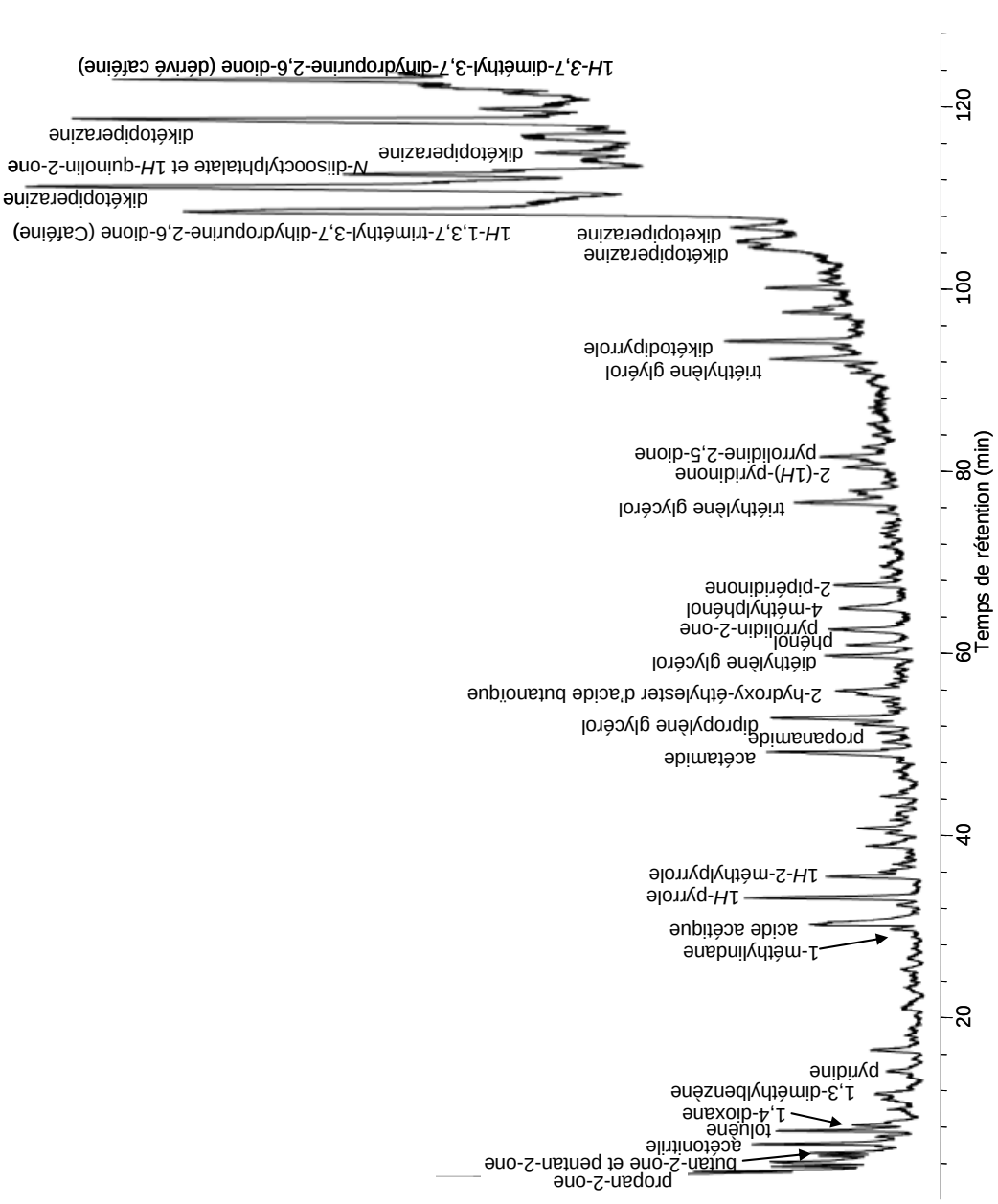
Pyrogramme de la fraction HPOM2



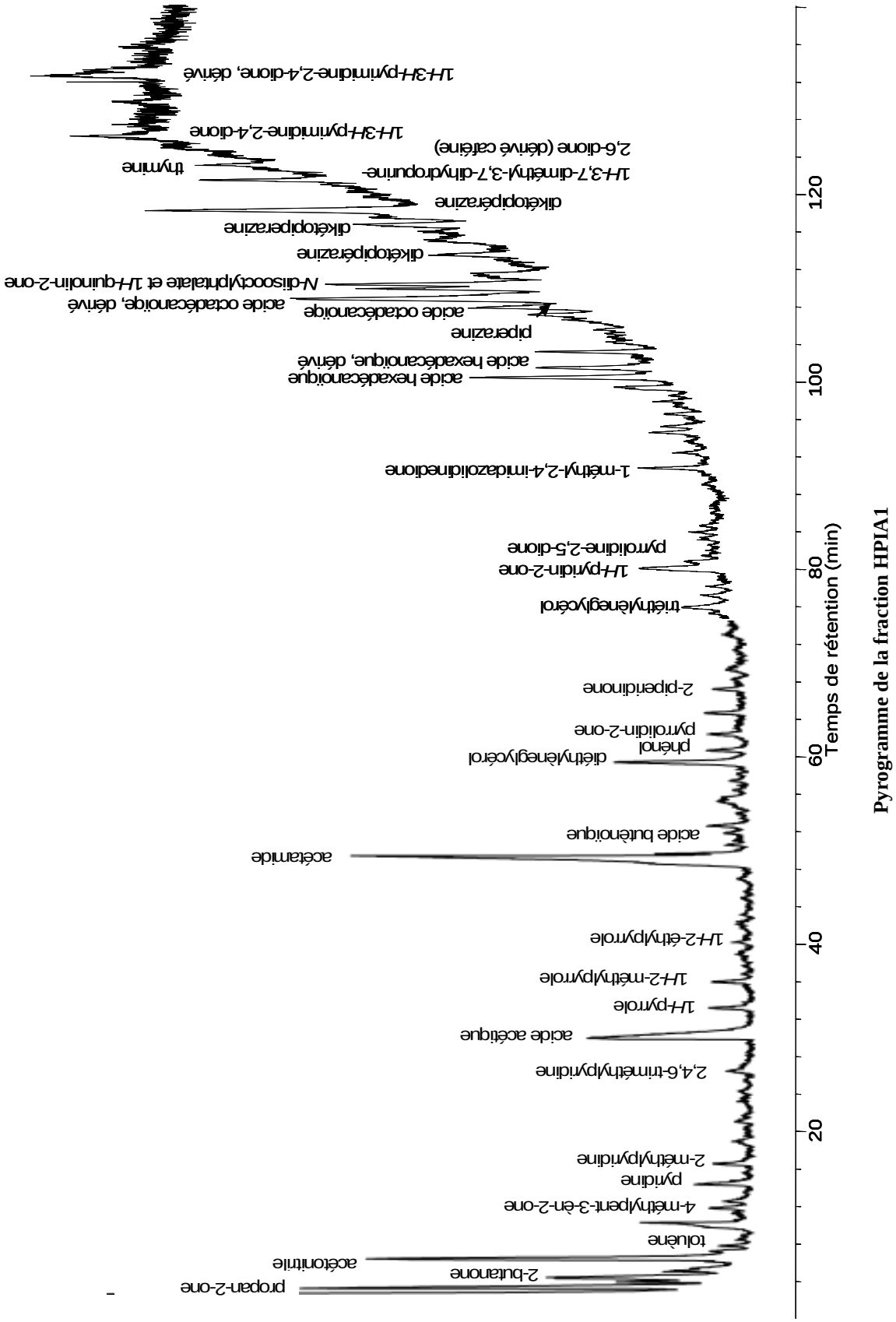
Pyrogramme de la fraction TPIM2



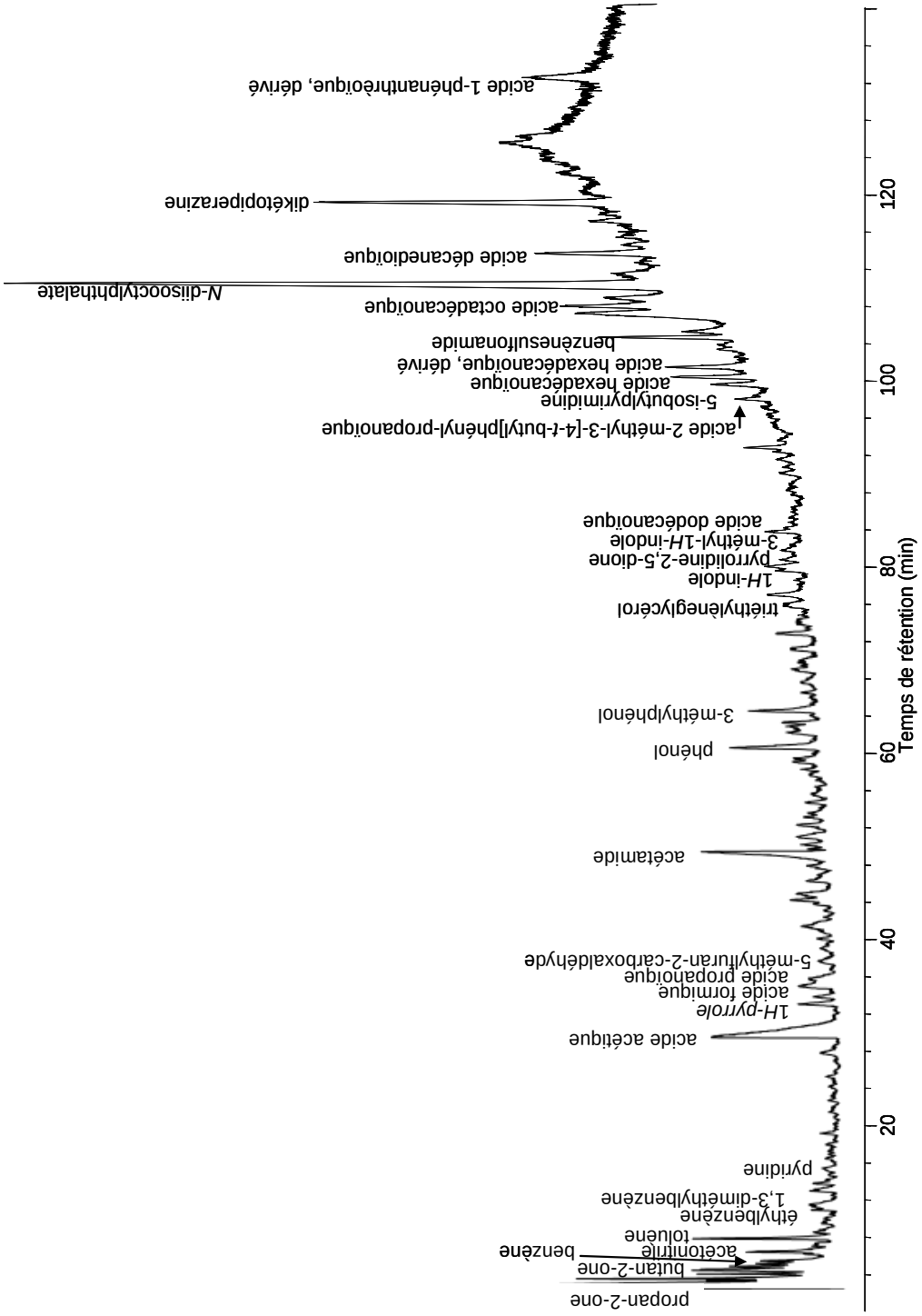
Pyrogramme de la fraction HPOA1



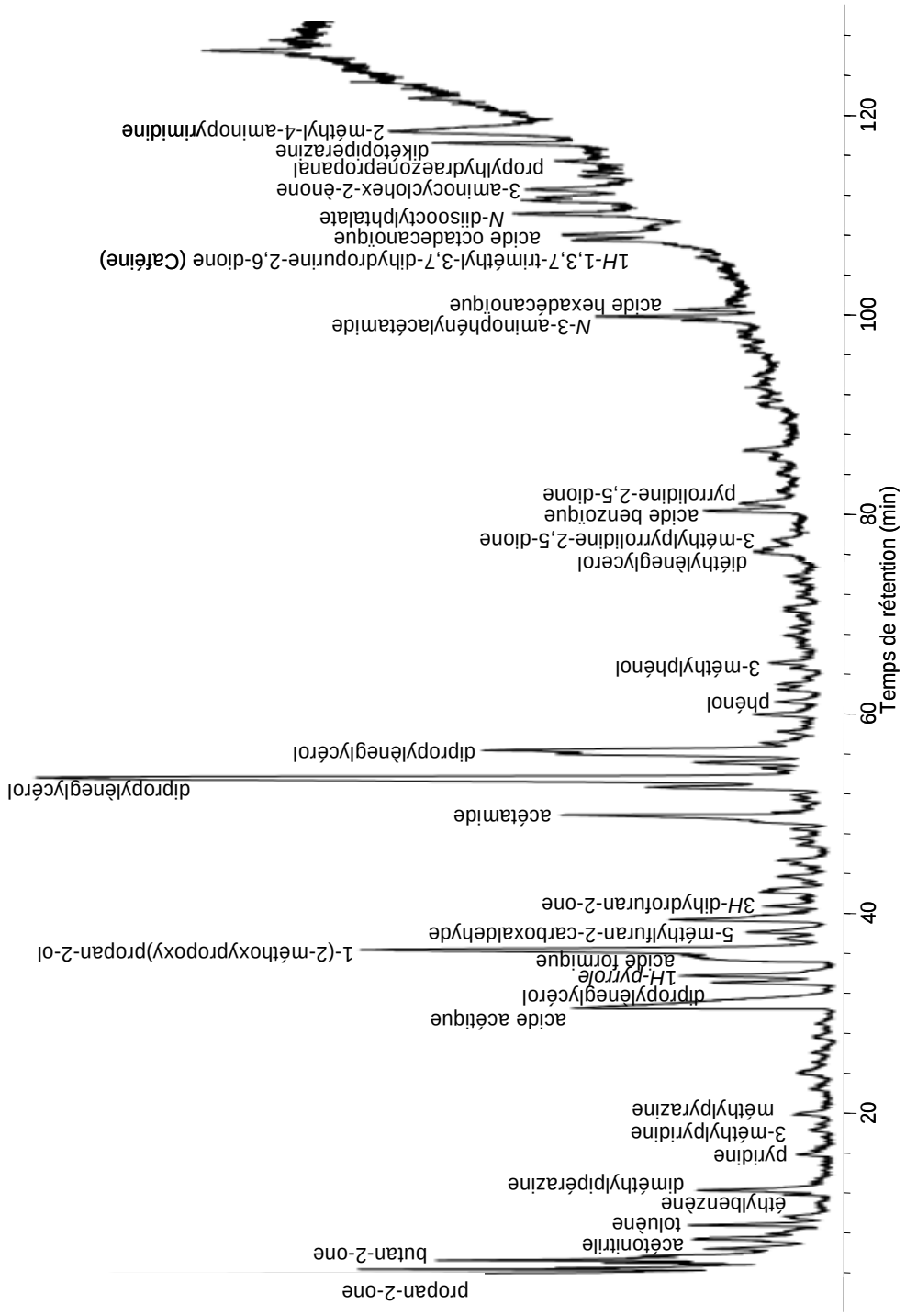
Pyrogramme de la fraction TPIA1



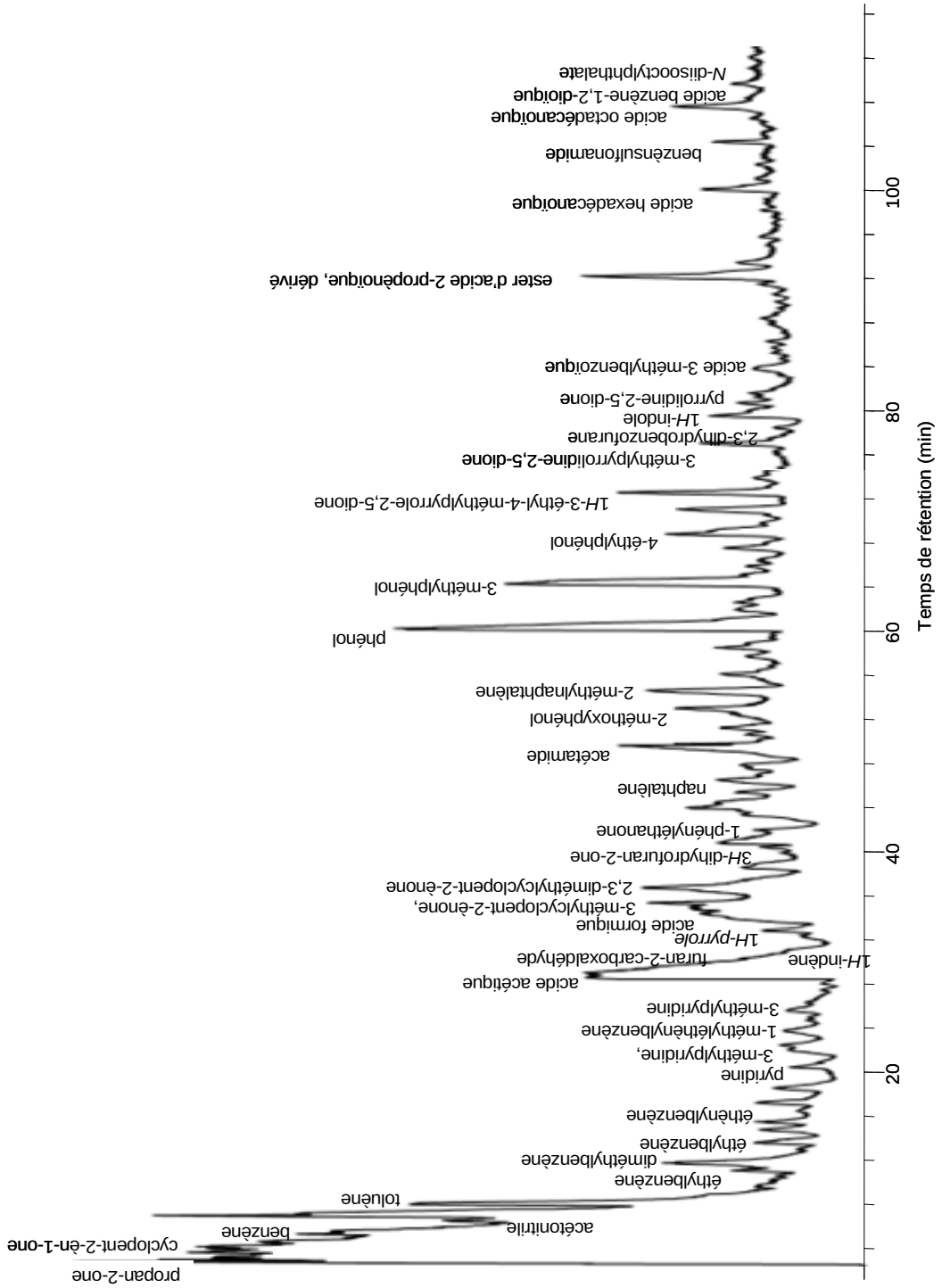
Pyrogramme de la fraction HPIA1



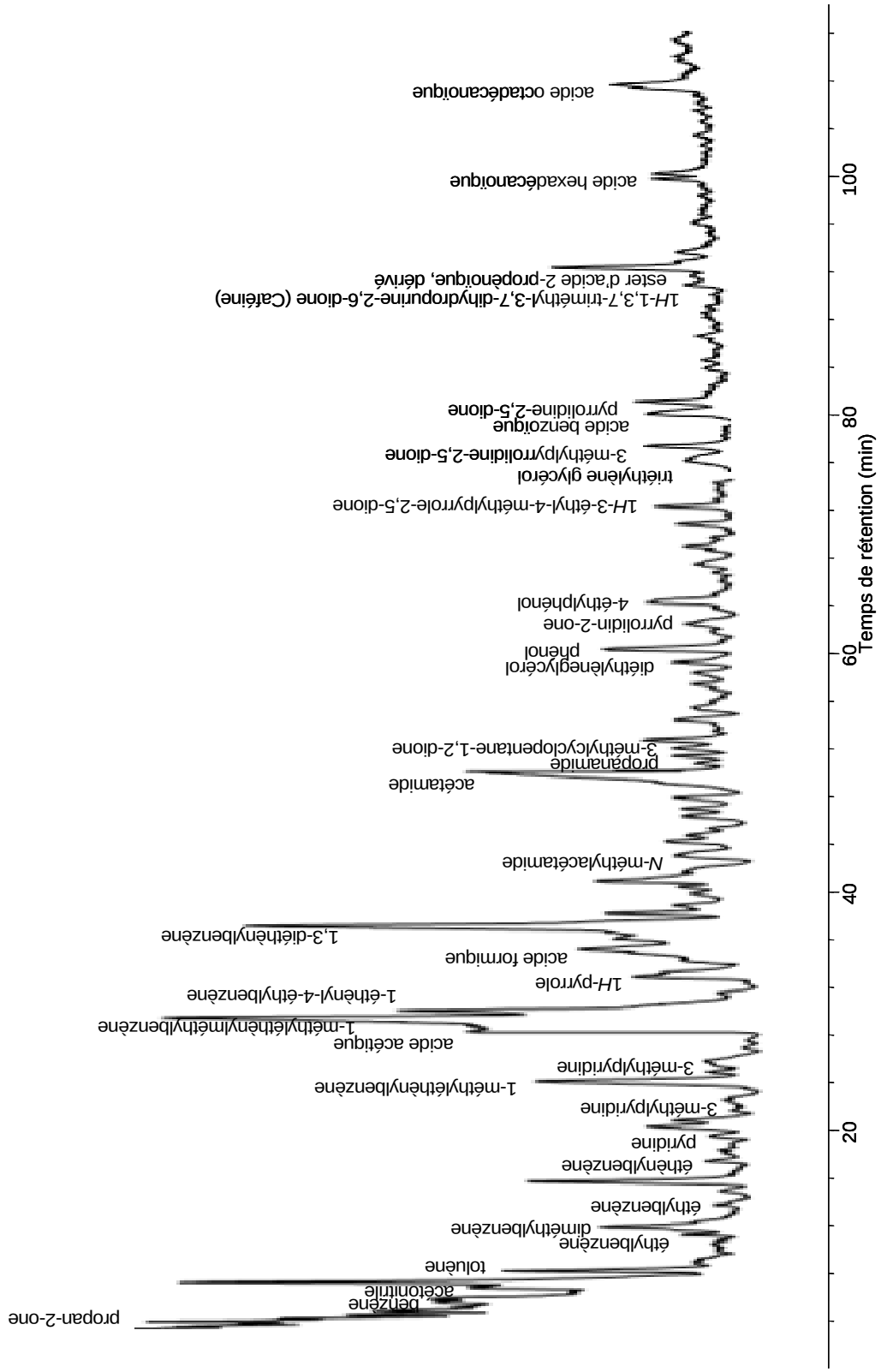
Pyrogramme de la fraction HPOA2



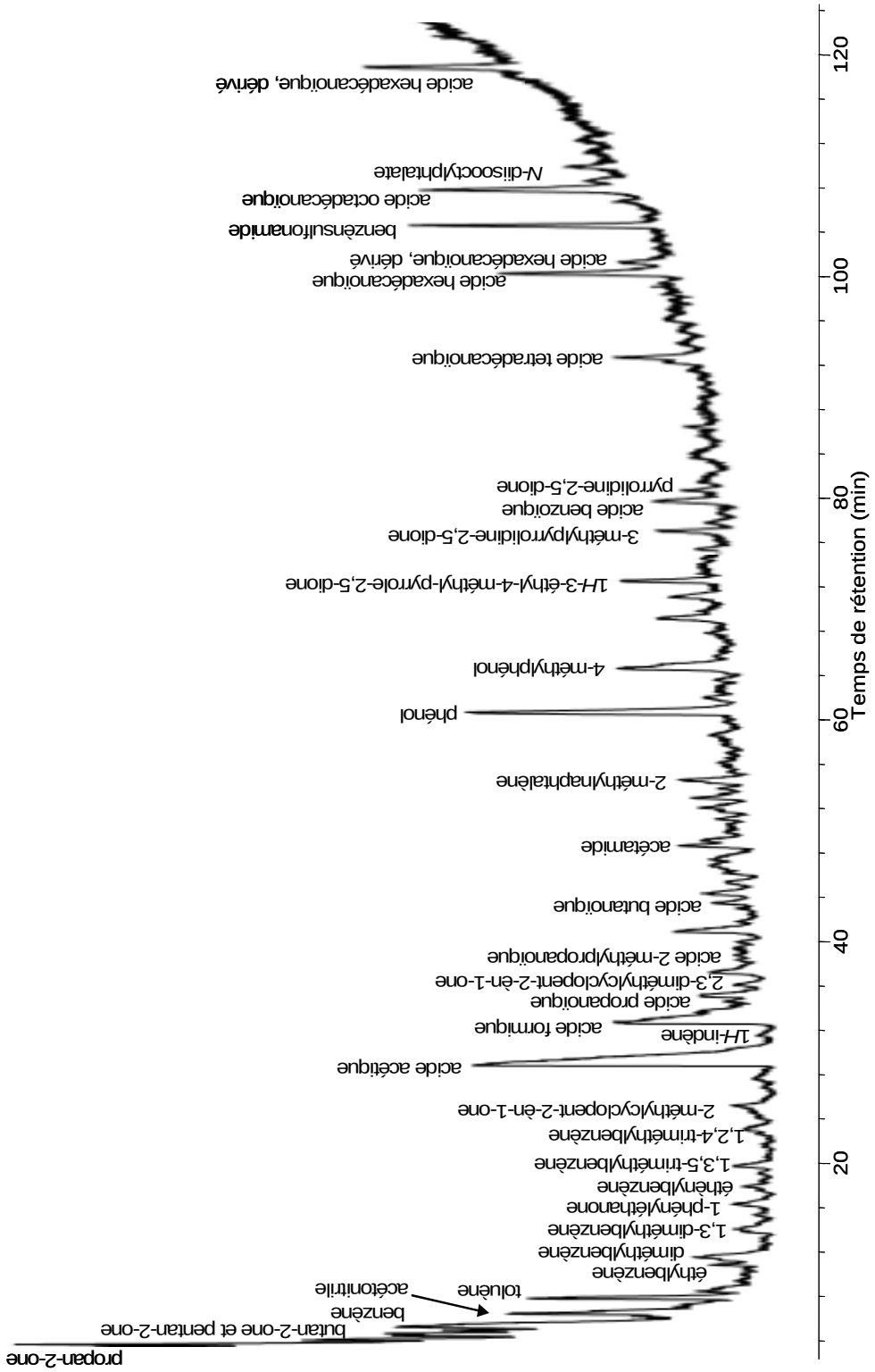
Pyrogramme de la fraction TPIA2



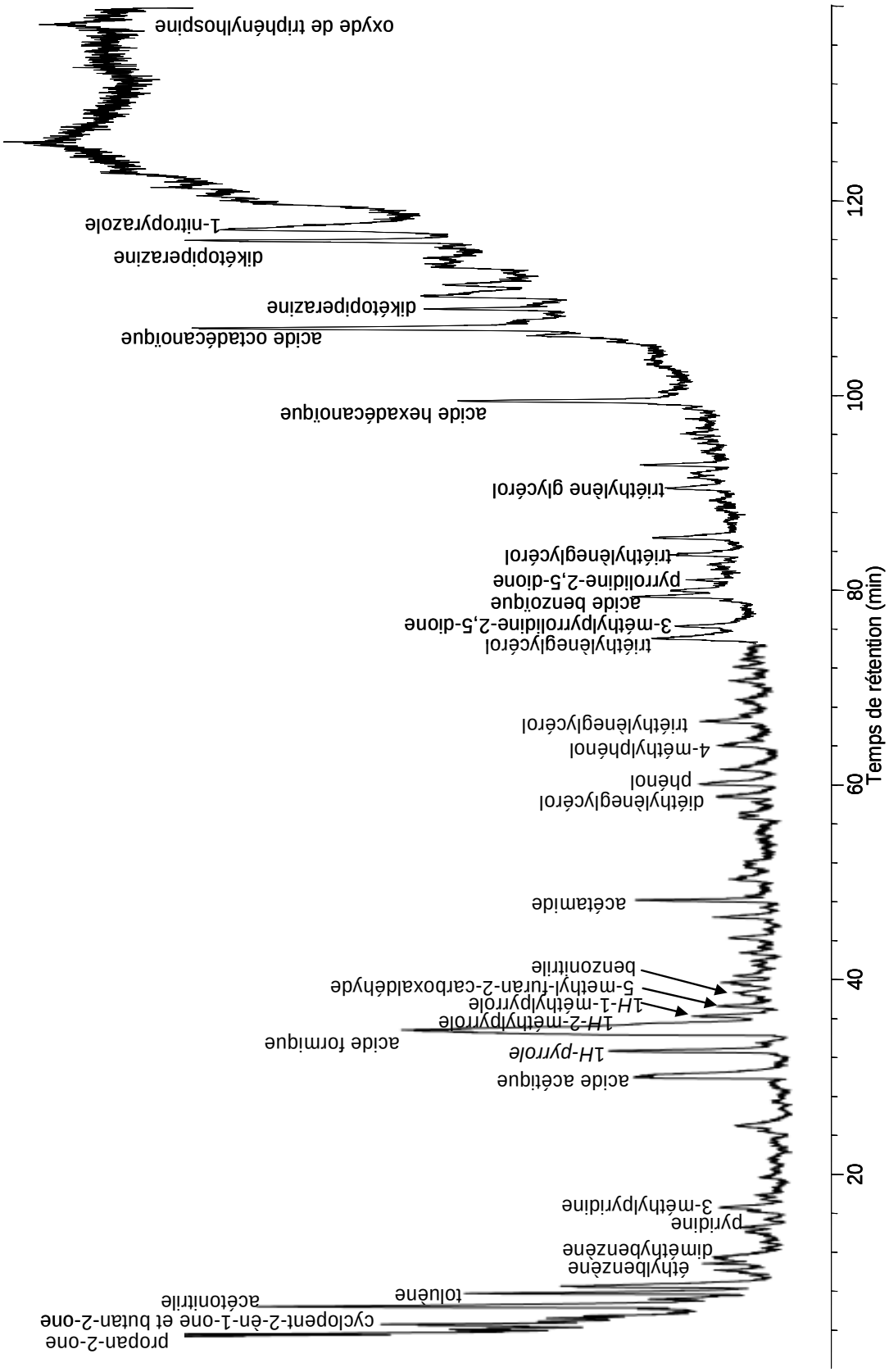
Pyrogramme de la fraction HPOAN



Pyrogramme de la fraction TPIAN



Pyrogramme de la fraction HPOMT



Pyrogramme de la fraction TPIMT

ANNEXE 4 : COMPOSITIONS DES EAUX MINERALES UTILISEES POUR LES BIOTESTS

Composition chimique de l'eau Mont-Dore (*Daphnies*)

	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^{+}	Na^{+}	HCO_3^{-}	SO_4^{2-}	Cl^{-}	NO_3^{-}	SiO_2
Composition en $mg.l^{-1}$	4,1	1,7	0,9	2,7	25,8	1,1	0,9	0,8	32,7
pH					7,3				

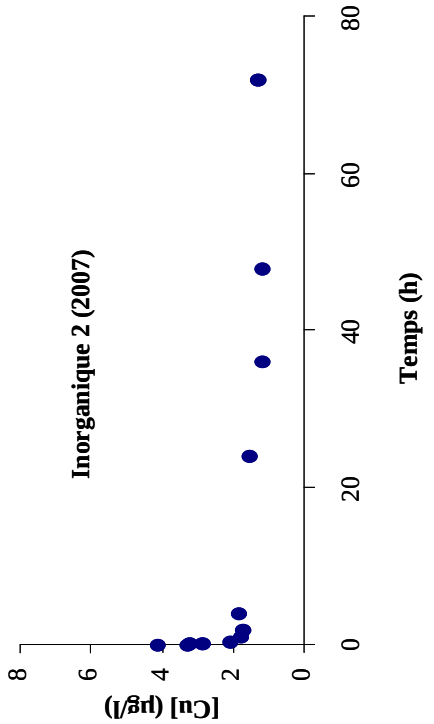
Composition chimique de l'eau Mont Calm (Bryophytes)

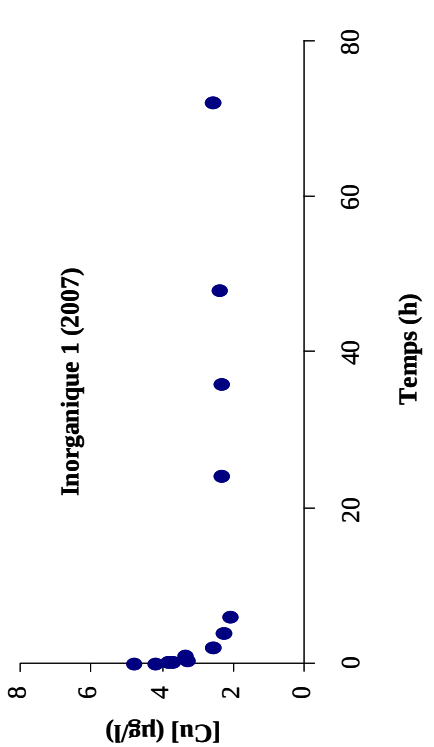
	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^{+}	Na^{+}	HCO_3^{-}	SO_4^{2-}	Cl^{-}	NO_3^{-}	SiO_2
Composition en $mg.l^{-1}$	3	0,6	0,4	1,5	5,2	8,7	0,7	< 1	7,5
pH					6,8				

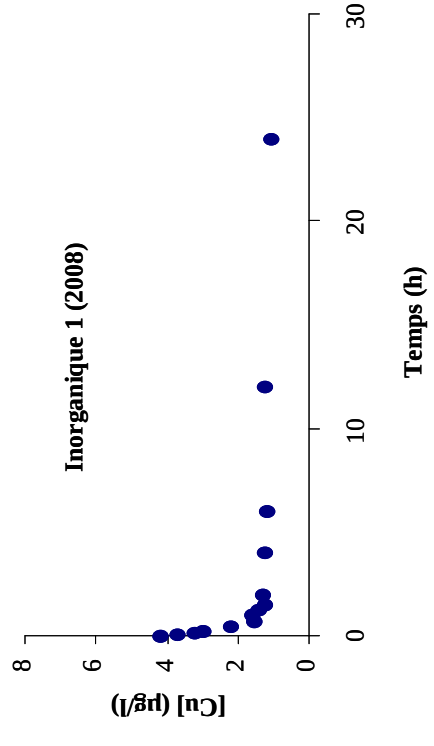
ANNEXE 5: PROGRAMME DE MINERALISATION

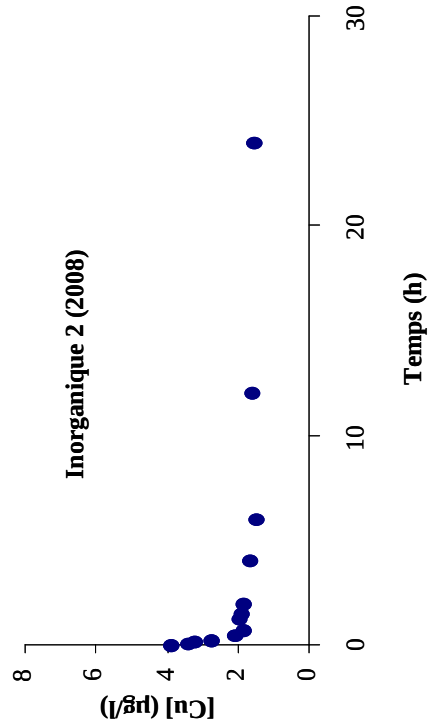
Etapes	1	2	3	4	5
Durée (min)	2	2	5	5	5
Puissance (W)	250	0	250	400	500

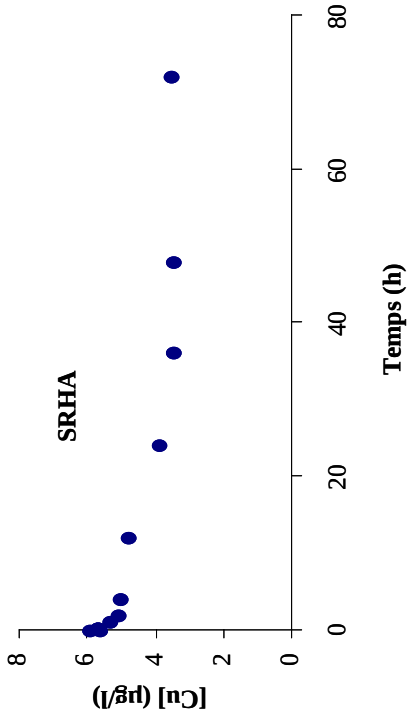
ANNEXE 6: CINETIQUE DE DISPARITION DU CUIVRE (BIOTESTS DE BIOACCUMULATION)

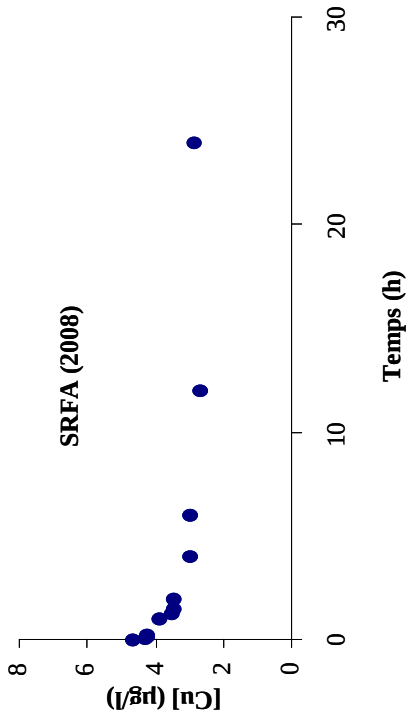


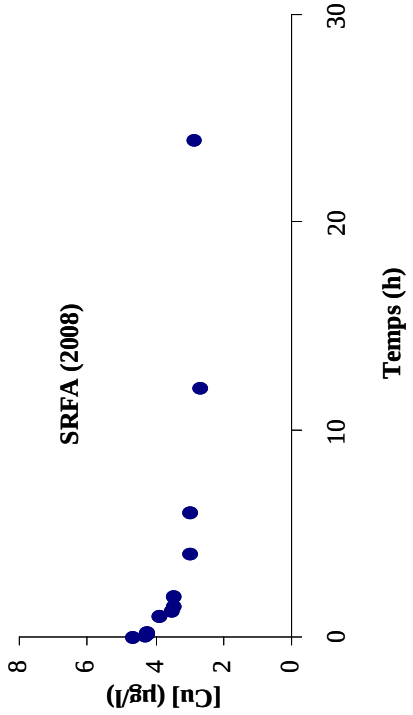


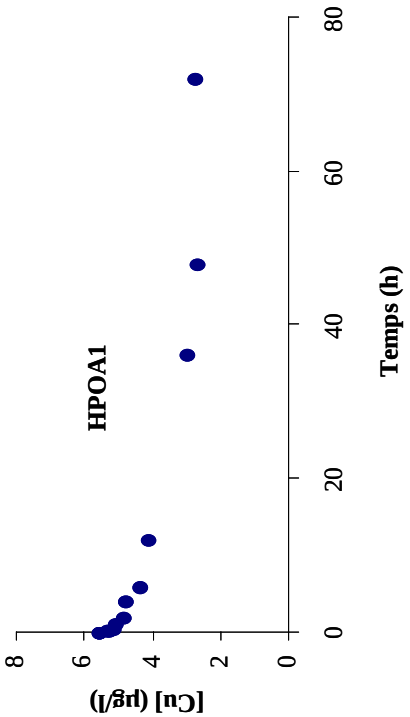


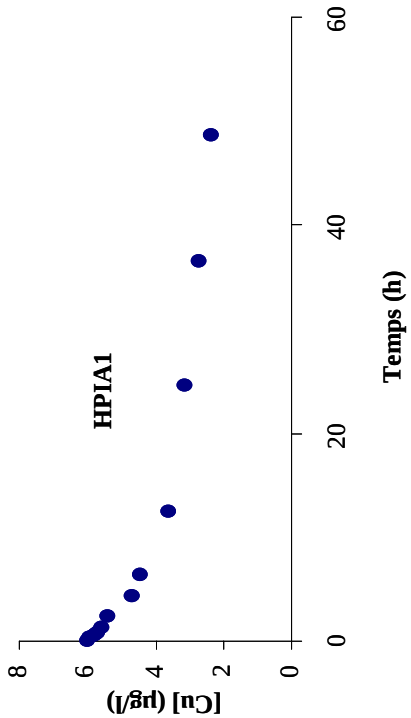


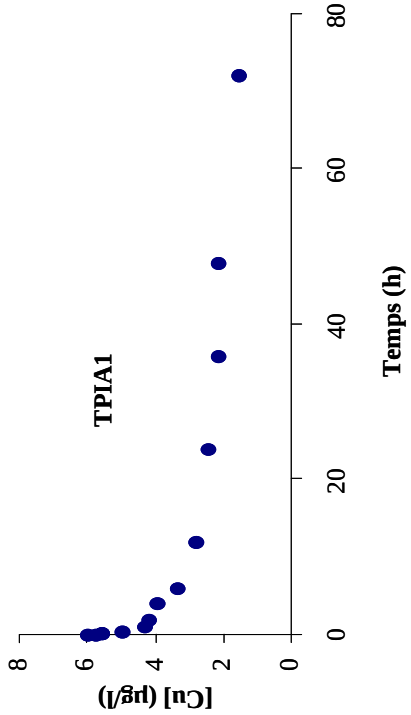

SRHA
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80

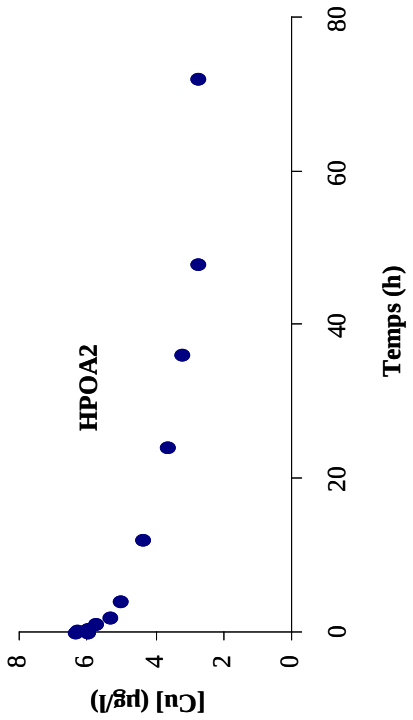

SRFA (2008)
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
10
20
30

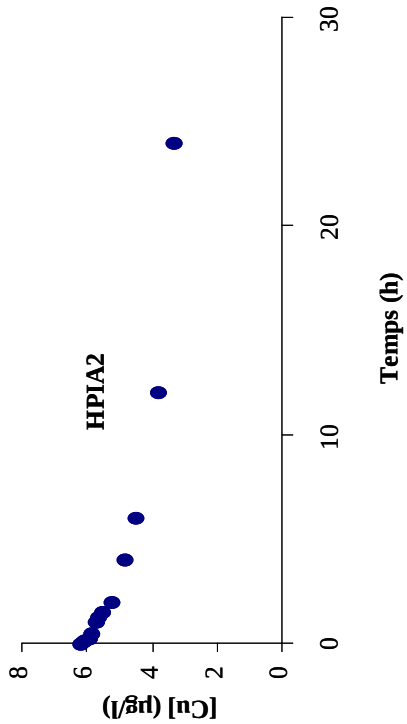

SRFA (2008)
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
10
20
30

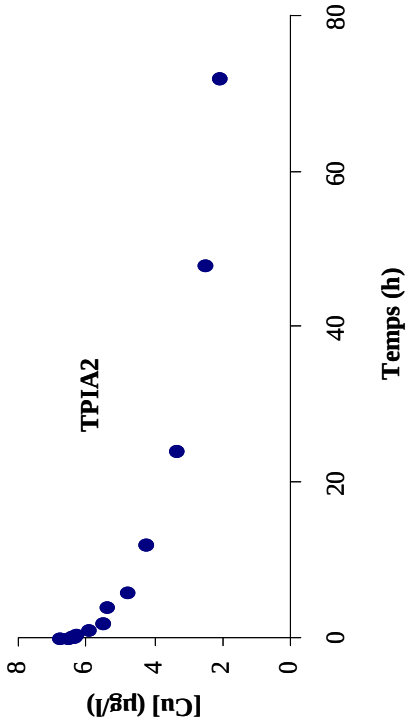

HPOA1
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80

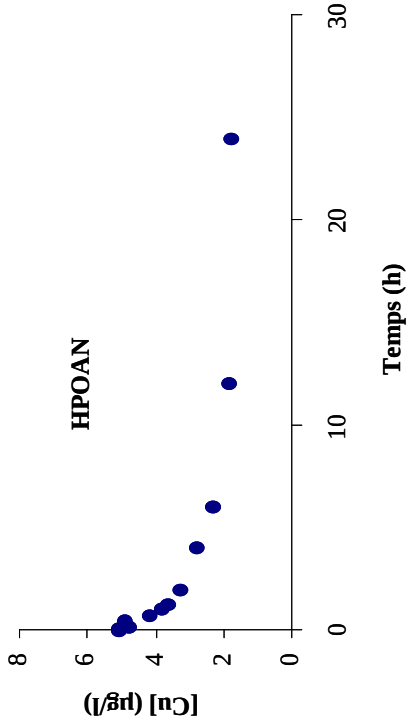

HPIA1
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
20
40
60

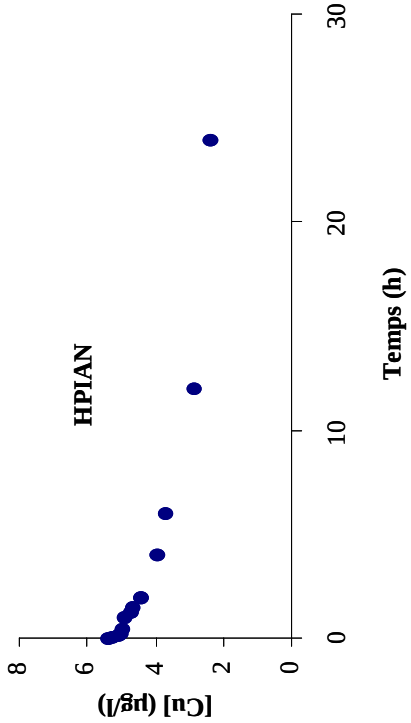

TPIA1
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80

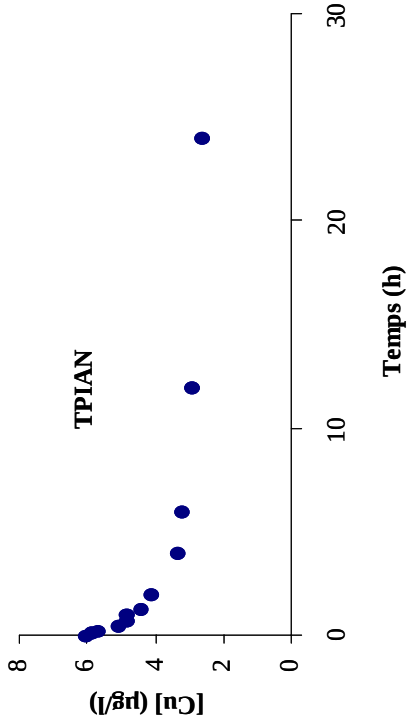

HPOA2
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80

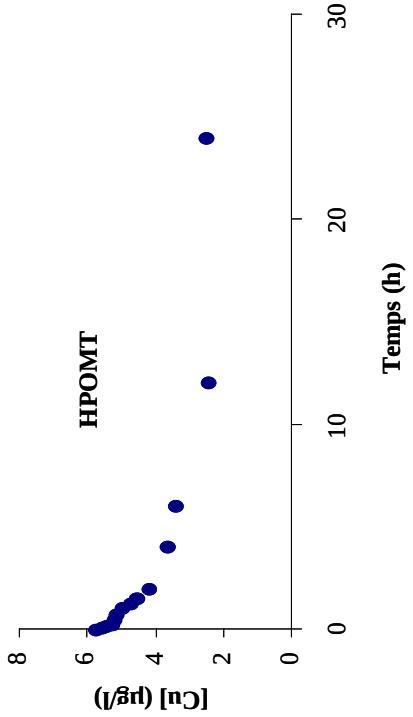

HPIA2
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
10
20
30

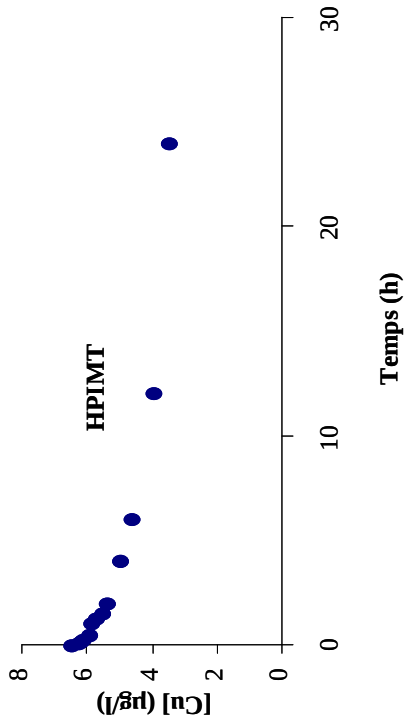

TPIA2
[Cu] (µg/l)
Temps (h)
0
2
4
6
8
0
20
40
60
80

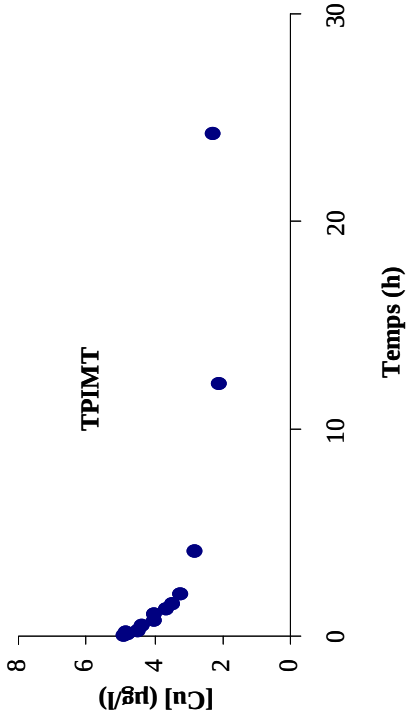

HPOAN
[Cu] (µg/l)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
Temps (h)


HPIAN
[Cu] (µg/l)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
Temps (h)


TPIAN
[Cu] (µg/l)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
Temps (h)


HPOMT
[Cu] (µg/l)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
Temps (h)


HPIMT
[Cu] (µg/l)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
Temps (h)


TPIMT
[Cu] (µg/l)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
Temps (h)

ANNEXE 7: ARTICLE 1

Author's personal copy

Chemosphere 73 (2008) 593–599

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

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

Dissolved organic matter from treated effluent of a major wastewater treatment plant: Characterization and influence on copper toxicity

Benoît Pernet-coudrier [a], Ludiwine Clouzot [a], Gilles Varrault [a,*], Marie-Hélène Tusseau-vuillemin [b], Alain Verger [c], Jean-Marie Mouchel [d]

[a] Université Paris-Est, CEREVE UMR MA 102 – ENPC – ENGREF – Univ Paris 12, 61 av. du Gal de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France
[b] CEMAGREF – Unité QHAN, Parc de Tourvoie, BP 44, 92163 Antony Cedex, France
[c] SIAAP – Direction de la Recherche et du Développement, 82 av. Kléber, 92700 Colombes, France
[d] SISYPHE, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 January 2008
Received in revised form 23 May 2008
Accepted 26 May 2008
Available online 15 July 2008

Keywords:
Daphnia magna
Complexation
Hydrophilic/hydrophobic substances
Isolation
Trace metals
Toxicity

ABSTRACT

A combination of reverse osmosis (RO) concentration and DAX-8/XAD-4 resin adsorption techniques is used to isolate the various constituents of urban dissolved organic matter (DOM) from inorganic salts. Three fractions: hydrophobic (HPO), transphilic (TPI) and hydrophilic (HPI) accounting respectively for 35%, 20% and 45% of extracted carbon, are isolated from effluents of a major French wastewater treatment plant. This atypical DOC distribution, in comparison with natural water where the HPO fraction dominates, shows the significance of HPI fraction which often gets neglected because of extraction difficulties. A number of analytical techniques (elemental, spectroscopic: UV, FTIR) allow highlighting the weak aromaticity of wastewater effluent DOM (EfOM) due to fewer degradation and condensation processes and the strong presence of proteinaceous structures indicative of intense microbial activity. Copper toxicity in the presence of DOM is estimated using an acute toxicity test on *Daphnia Magna* (Strauss). Results reveal the similar protective role of each EfOM fraction compared to reference Suwannee river fulvic acid despite lower EfOM aromaticity (i.e. specific UV absorbance). The environmental implications of these results are discussed with respect to the development of site-specific water quality criteria.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In aquatic systems, dissolved organic matter (DOM) constitutes a key component of the carbon cycle controlling the speciation, bioavailability and toxicity of trace metals (Buffle, 1988; Tessier and Turner, 1995). The sources of dissolved organic carbon (DOC) may be categorized as natural autochthonous (1), being derived from biota (e.g. algae, bacteria, macrophytes) growing in the water body, natural allochtonous (2a) entering the system from the terrestrial watershed and anthropogenic allochtonous (2b), streaming water (urban runoff and landfill leachate) and urban sewage (both domestic and industrial) whether treated or untreated.

Over the past few decades, many studies have been published regarding the capacity of DOM to complex copper. Most of these studies have found that binding capacities and binding constants vary significantly depending on the experimental conditions employed (conditional constants) or the range of binding constants considered (analytical windows) (Town and Filella, 2000). They also depend on the nature and origin of isolated organic matter (Mantoura et al., 1978; Buffle et al., 1980). It is interesting to note however that the published data pertain mainly to the so called "humic substances" (HS) and demonstrate the ability of these substances to complex metals. HS are heterogeneous polyelectrolyte organic material and the most hydrophobic fraction of the DOM isolated from natural water, based on XAD-8 resin adsorption at acid pH. HS are derived from oxidative and hydrolytic biodegradation of plants and animals (Stevenson, 1994) and they make up 40–60% of DOC in natural surface water (Martin-Mousset et al., 1997). In urbanized water, the hydrophobic characteristic of DOM is weaker as a result of various urban DOM discharges and the strong primary productivity induced by these discharges (Ma et al., 2001; Imai et al., 2002). Recent studies carried out on urban wastewater (Sarathy and Allen, 2005; Buzier et al., 2006) have emphasized its great potential to complex metals despite the expected large amount of hydrophilic substances it contains. Because of the difficulty in isolating the hydrophilic fraction of DOM, very little information is available in the literature regarding hydrophilic DOM and their influence on metal complexation. Moreover De Schamphelaere et al. (2004), states that the variability of natural DOM with respect to metal binding is important chemically, biologically and toxicologically because metal speciation severely affects the fate of trace metals in the water column.

* Corresponding author. Tel.: +33 (1) 45 17 16 31; fax: +33 (1) 45 17 16 27.
E-mail address: varrault@univ-paris12.fr (G. Varrault).

0045-6535/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chemosphere.2008.05.064

Author's personal copy

The primary objective of this study is to exhaustively extract DOM from wastewater effluent (EfOM) then to fractionate it according to polarity criteria (Croué, 2004) and to further characterize the obtained fractions by means of various analyses (elemental, spectroscopic UV and FTIR). The second goal is to study the influence of every isolated fraction on copper toxicity. Since the speciation of dissolved metals strongly affects their biological availability, i.e. their capacity to reach the biological target (Tessier and Turner, 1995), a biotest based on an acute toxicity test using *Daphnia Magna* has been applied to assess the influence of each EfOM fraction on metal toxicity. A Suwannee river fulvic acid obtained from International Humic Substances Society (IHSS) was purchased to compare EfOM with a natural organic matter. DGT (diffusion gradient in thin films) were dipped in the solutions used for the bioassay in order to measure labile metal and to assess whether or not the DOM influence recorded during the bioassay could be attributed to trace metal complexation.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Treated effluent from the Seine-Aval wastewater treatment plant (WWTP) was sampled (250 L) in April 2006 during a dry weather period. This WWTP was chosen for the present study since it collects over 70% of the dry weather (combined sewer) flows from Paris and the surrounding suburban metropolitan area (≈8 million inhabitants). These effluents are highly representative of discharged effluent from Paris and are treated at this WWTP by primary settling and aerobic activated sludge. The sample was collected using a double membrane pump (IR ARO®) and filtered onsite through subsequent 10-μm and 0.45-μm polypropylene cartridge filters (Predel®). One IHSS standard fulvic acid (Suwannee River Fulvic Acid SRFA 1S101F) was used as a natural organic matter for follow-up investigations.

2.2. Dissolved organic matter isolation: The RO/DAX resins protocol

The sample was then softened on sodium cation-exchange resin in order to eliminate calcium and magnesium ions that co-precipitate with DOM and could clog the reverse osmosis (RO) membranes. The RO step enables reducing sample volume by one order of magnitude. During the concentration step, conductivity was monitored through permeate to stop the concentration step before any major DOM leakage could occur. The aliquots for DOC measurement and UV absorbance were also sampled in permeate in order to accurately calculate the slight DOM leakage. After the concentration step, a final rinsing of membranes (Filmtech TW 30) with a 0.05 M sodium hydroxide solution allowed recovering adsorbed DOM in the eluate (Croué, 2004). Sample filtration, softening and concentration were carried out in line and onsite so as to limit process duration and potential DOM biodegradation. The obtained sodic eluate and the RO concentrate, added and collected in a stainless steel bottle (50 L), were then acidified (HCl, 0.01 mol L^{-1}) and filtered back at the laboratory on nonionic macroporous Amberlite® DAX-8 resins (an attractive substitute for the well-known XAD-8, according to Peuravuori et al., 2001, 2002) (acrylate ester) and Supelite® XAD-4 (divynil benzene) combined with one another. According to Leenheer (1981) a column capacity factor, k' equal to 50 was applied to isolate HPO substances. DOC measurements were conducted in both influent and effluent of DAX-8 and XAD-4 resins to assess the proportion of each fraction. Hydrophobic (HPO) and transphilic (TPI) fractions were derived following the procedure described in Fig. 1. The HPI fraction, i.e. the fraction of DOM not adsorbed on the DAX-8 and XAD-4 resins, contains all the salts initially present in the sample and requires further purification given that salts would interfere during the various investigations. The separation of inorganic salts from the HPI fraction was performed according to a protocol described by Leenheer et al. (2000) which consists of a zeotrophic distillation and successive evaporation steps to precipitate the inorganic salts. All Teflon and stainless steel materials used for sampling and isolation were washed several times with ultrapure deionised water. The glass material was washed with a detergent (TFD4, 5%), rinsed thoroughly with ultrapure deionised water and then precombusted for 5 h at 500 °C. Before application, the resins were washed by means of soxhlet extraction and successive acid and sodic rinsing in accordance with a protocol described by Leenheer (1981). Blanks experiments were carried out, by implementing this protocol with ultrapure deionised water throughout the system (pipes, pump, and filters all prewashed using ultrapure deionised water). The DOC values for these blank tests never reached the DOC quantification limit of 0.5 mgC L^{-1}.

2.3. Effluent dissolved organic matter characterization

DOC content were determined using the O.I. Analytical (quantification limit = 0.5 mgC L^{-1}) carbon analyzer. Elemental analyses were carried out by the *Service Central des Analyses* Laboratory of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, Solaize) and enabled determining the C, H, O, N, S contents to a precision of 0.3% and a standard deviation of 0.2%. Specific UV absorbance (SUVA) is defined as the UV absorbance of a given sample determined at 254 nm and divided by the organic carbon content of the solution, according to U.S. EPA recommended method 415.3 (United State Environmental Protection Agency, 2005). SUVA was also evaluated at 350 nm. UV absorbance at 254 nm was obtained using a Lambda Perkin Elmer spectrophotometer with 1-cm long quartz cells. Infrared spectra of 2–5 mg of DOM fraction isolates in potassium bromide pellets were determined on a Fourrier Transform InfraRed spectrometer (Perkin Elmer Spectrum BX). All spectra were normalized after acquisition with a maximum absorbance of 1.0 for comparative purpose.

2.4. Acute toxicity tests on Daphnia Magna

The acute 24-h immobilization assay was performed in accordance with the ISO 6341 standard procedure (International Standard Organization, 1993). The test organisms originating from a healthy *Daphnia Magna* clone (K6) were cultivated in soft spring water (Mont-Dore spring) under controlled lighting (100 lux, with a 8:16 h light:dark period), temperature (22 ± 1 °C) and feeding conditions (daily feeding with *Selanastrum capricornutum* in an exponential growth phase). Five *Daphnia magna* juveniles (<24 h old) were exposed in triplicate in 15 mL of different media at pH 7: Mont-Dore soft spring mineral water (reference inorganic media), and four organic media. Mont Dore water was chosen for its neutral pH and low mineralization. The four tested organic media were obtained by dissolving in Mont-Dore water 2 mgC L^{-1} of the three previously-isolated fractions and SRFA. All solutions were prepared the day before the experiment in order to allow for overnight equilibration (one night at 22 °C). The copper stock solution used was an atomic absorption spectroscopy standard solution (Acros Organics, 1000 mg L^{-1} Cu in 2% HNO_3). The number of immobilized daphnia was counted after 24 h of exposure. The dose-effect curves and the toxic concentrations for 50% of population (EC50) were obtained by a nonlinear fit of the logistical model (REGTOX software, E. Vindimian, available at <http://perso.wanadoo.fr/eric.vindimian>) to experimental data (Isnard et al., 2001), with a 95% confidence interval. The control samples (medium with no copper spike) showed no toxicity of DOM fractions to daphnids.

Author's personal copy

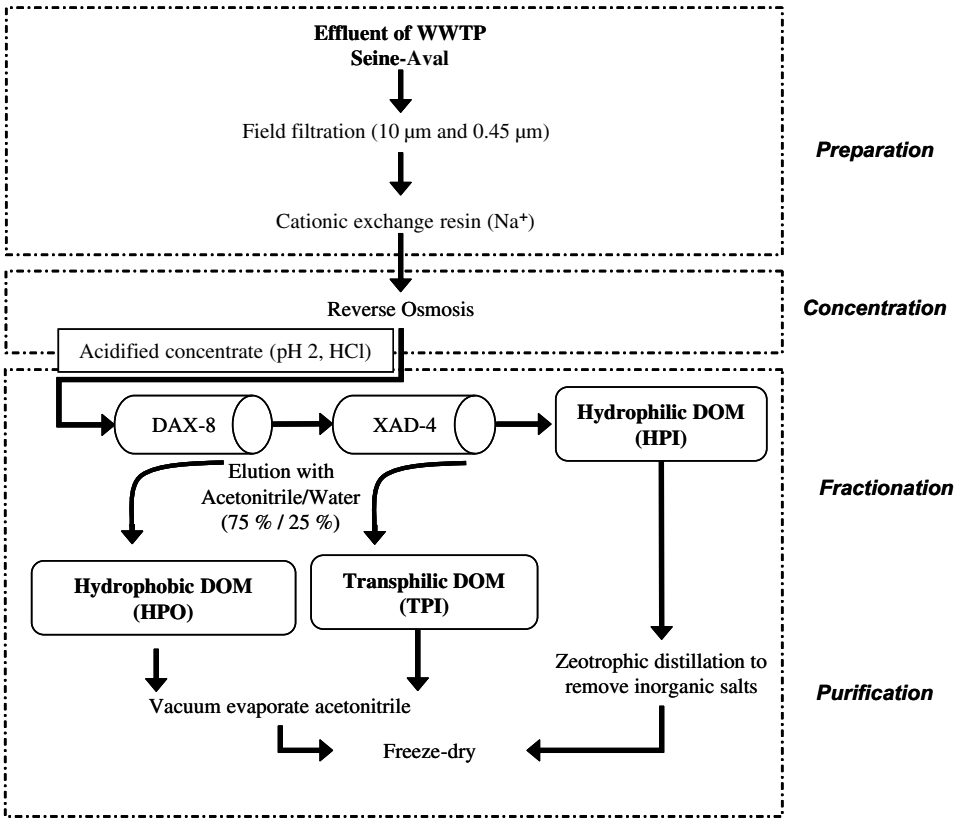


Fig. 1. Comprehensive isolation protocol of DOM: The RO/DAX protocol.

2.5. Total and labile copper measurements

The DGT holders (piston type, 2-cm diameter window) were purchased from DGT Research (Lancaster, UK), along with the diffusive gel disks (restricted gel type, 0.8 mm thickness) and the Chelex binding resin. An additional cellulose ester filter membrane (Millipore, thickness 0.13 mm) was used to separate the gel from the solution. For each of the 30 treatments (5 media, 6 copper concentrations), two DGT were deployed in a 500 mL polypropylene-stirred beaker containing a well-stirred sample solution. The beakers were previously soaked at least 24 h in HNO_3 10%, then thoroughly rinsed with ultrapure deionised water. At both the beginning and the end of each experiment, an aliquote of the solution was collected and acidified (ultrapure HNO_3, 10%) for total copper measurement. Once retrieved from the DGT, the Chelex resin was eluted overnight in 5 mL of 1 M ultrapure nitric acid. Copper was measured in each sample by graphic furnace-atomic absorption spectroscopy (GFAAS) (Varian SpectrAA 220Z). The mass of metal sequestered on the resin was evaluated considering an 80% elution yield (Zhang and Davison, 1995). The labile copper concentration could then be calculated (Davison and Zhang, 1994) as

$$C_{DGT} = \frac{M \cdot \Delta g}{t \cdot A \cdot D}$$

where M is the mass of copper accumulated on the resin after a deployment time t, Δg is the thickness of the diffusive layer (here 0.8 mm hydrogel thickness plus 0.13 mm due to the membrane), A the window area and D the diffusion coefficient of copper (4.76 10^{-6} cm^2 s^{-1} at 22 °C in restricted gel, data from DGT Research, available at <http://www.dgtresearch.com>). The quantification limit of GFAAS for copper analyses is 0.5 µg L^{-1} and the deviation among replicates was typically less than 15%.

2.6. Biological determination of copper complex stability constants

If we consider the elementary complexation scheme of a free metal ion M capable of forming a complex ML by association with the ligand L, i.e.:

$$M + L \underset{K_d}{\overset{K_a}{\rightleftarrows}} ML \quad (1)$$

where charges have been omitted for the sake of simplicity, the rate constants for association and dissociation, K_a and K_d, respectively relate to the conditional complex stability constant K (Eq. (2)):

$$K = \frac{K_a}{K_d} = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{[M]_{tot} - [M]}{[M][L]} \quad (2)$$

Under assumptions of the free ion activity model (FIAM) (Morel, 1983), the bioavailability of copper to *Daphnia magna* is proportional to Cu^{2+}. Since ionic copper at pH 7 is the predominant toxic species in short-term toxicity (Andrew et al., 1977; Meador, 1991), the possible contribution to the toxicity of other inorganic copper species has been discarded. Based on FIAM, the free metal concentrations inducing 50% effect on *Daphnia magna* ($EC50_{free}$) were considered to be identical (for the same effect) in each medium and taken as the value in the inorganic reference medium calculated by the VisualMinteq software (v 2.50). According to the biotic ligand model (BLM), major cations mitigate the free metal ion toxicity by means of the competition effect (De Schamphelaere and Janssen, 2002). This effect was assessed and then neglected herein due to the very low major cations concentrations (soft spring water) as well as the low effect of major cations concentrations beside the strong effect of DOM. In using the $EC50_{free}$ instead of [M], and [DOC] instead of [L] (as a result of the excess ligand condition) in (2), we can calculate a biologically determined constant K_{bio} expressed in L mg^{-1} of DOC for a critical effect to *Daphnia magna* (Eq. (3)):

Author's personal copy

$$K_{bio} = \frac{[M]_{tot} - EC50_{free}}{EC50_{free}[DOC]} \quad (3)$$

In other words, *Daphnia magna* has been used as a biological speciation tool to estimate free copper concentration for the purpose of calculating the biologically determined constant for each DOM fractions.

3. Results and discussion

3.1. DOM Isolation and fractionation

The treated wastewater sample contains 38 mgC L^{-1}. The loss of DOM in the permeate amounted to less than 0.5 mgC l^{-1}, which in this case enabled calculating a DOC rejection efficiency for the RO membrane higher than 98%. This rejection rate has typically ranged between 91% and 98% for a number of studied water samples (Croué, 2004), which demonstrates the efficiency of the RO membrane to concentrate DOM into a restricted volume. The additional rinsing of the membrane surface (with sodium hydroxide solution) leads to overall DOC recovery rates of 100 ± 3% among concentrate, permeate and membrane surface. The last rinsing solution of RO membranes (15 L vs. 25 L for the concentrate) contains 5% of the total DOM. Carbon balances before and after each purification step have enabled to reconstituting the initial DOM sample composition and estimating DOM loss. The DOM recovered as brownish powder represents 75% of the total DOC (in the raw sample). The majority of DOC loss stems from the HPI fraction due to a certain level of co-precipitation of organic matter with inorganic salts during the purification step. As a matter of fact, only 62% of this fraction was recovered, thereby revealing the difficulty of HPI isolation. The others DOC losses originate from the lack of complete elution of HPO and TPI fractions. Fractionation of the RO concentrated sample on DAX-8/XAD-4 resins led to three fractions, with the most hydrophilic one (HPI) representing 45% of the concentrated DOC, hydrophobic fraction (HPO) and transphilic fraction (TPI) represent 35% and 20%, respectively, of the concentrated DOC (see Table 1). Such a distribution, atypical in natural water (Violleau, 1999), has also been observed in another study on WWTP effluent, wherein the hydrophobic fraction represents less than 40% of DOC and the hydrophilic fraction varies between 60% and 75% (Imai et al., 2002).

3.2. Chemical characterization of DOM

Table 1 lists the results from an elemental analysis along with SUVA of the HPO, TPI and HPI fractions. The sums of elemental masses exceed 94% in each of the fractions, which indicates that the isolation protocol has efficiently removed inorganic constituents from the sample. The carbon contents of EfOM fractions are close to those observed for SRFA and in the literature for surface water (Violleau, 1999; Ma et al., 2001; Peuravuori et al., 2001; Croué, 2004). The hydrogen, nitrogen and sulphur contents however are especially high and on the opposite the oxygen content is lower for EfOM fractions (Croué et al., 2003). As previously observed (Violleau, 1999; Croué, 2004), H/C, N/C and O/C ratios increase with the hydrophilic nature of the samples (HPO < TPI < HPI), thus indicating a smaller degree of unsaturation and an enrichment in nitrogenized structures and oxygenated functional groups. The likely presence of more aromatic structure in HPO and, to a lesser extent TPI than in HPI has once again been confirmed again by SUVA, with adsorption at 254 nm being an indicator of aromatic structures (Leenheer and Croué, 2003). SUVA obtained for these fractions are ranging between 2.0 and 0.9 m^{-1} L mgC^{-1} and close to those obtained from fractions of treated effluent of WWTP by Imai et al. (2002). Nevertheless, EfOM SUVA remains weaker than that of SRFA (4.3 m^{-1} L mgC^{-1}) and DOM in natural water, since humic substances reach values of SUVA of 5 m^{-1} l mgC^{-1} (Violleau, 1999; Imai et al., 2001; Croué, 2004). This finding indicates a low aromatic characteristic of EfOM, most likely due to fewer degradation and condensation processes.

Fig. 2 presents the FTIR spectra of the three EfOM fractions and the SRFA. The first observation is that the absence of bond vibration for inorganic salts (sodium, carbonate or silicate) shows the purity of EfOM fractions and the isolation protocol efficiency to remove inorganic salts. Ten bands can be attributed to the various chemical bond vibrations. The first band, very broad, is attributed to the O–H bond in alcohols and carboxylic acids. Bands 2, 6 and 7 are all correlated with amides and amines, which are characteristic of proteins and amino sugars (Leenheer and Rostad, 2004), thus explaining the high nitrogen content previously determined in EfOM. Proteinaceous structures are also observed for the HPO fraction of wastewater treatment effluents, and this is interpreted as an indicator of intense microbial activity (Drewes and Croué, 2002). Because of the low nitrogen content in SRFA and the slight

Table 1
Elemental composition and SUVA of isolated fractions from WWTP Seine-Aval

DOM	Fractions	Distribution (%)	Elemental composition (%)						Atomic ratios			SUVA (m^{-1} L mgC^{-1})	
			C	H	O	N	S	Total	H/C	O/C	N/C	254 nm	350 nm
Treated effluent from WWTP This study	HPO	35	53.6	6.5	27.9	5.7	2.6	96.3	1.45	0.39	0.09	2.0	0.61
	TPI	20	48.4	6.4	28.8	8.4	2.1	94.1	1.56	0.45	0.15	1.4	0.32
	HPI	45	43.8	7.1	29.4	12.3	2.1	94.7	1.92	0.50	0.24	0.9	0.25
IHSS SRFA	SRFA	–	52.3	4.4	43.0	0.7	0.5	100.9	0.99	0.62	0.01	4.3	1.38
Ribou water Croué (2004)	HPO	68	49.2	5.2	38.7	2.7	–	95.8	1.25	0.59	0.05	3.4	–
	TPI	25	45.6	5.0	41.5	4.6	–	96.7	1.31	0.68	0.09	2.1	–
	HPI	8	35.2	4.3	44.4	4.8	–	88.7	1.44	0.95	0.12	1.2	–
Blavet river Violleau (1999)	HPO	79	47.0	4.6	38.8	2.0	–	92.4	1.17	0.62	0.04	4.3	–
	TPI	10	45.2	5.6	41.0	2.3	–	94.1	1.49	0.68	0.04	2.3	–
	HPI[a]	11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gartempe river Violleau (1999)	HPO	66	47.0	4.7	38.1	1.9	–	91.7	1.20	0.61	0.03	4.0	–
	TPI	19	43.2	4.7	44.4	2.6	–	94.9	1.31	0.77	0.05	2.9	–
	HPI [a]	15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Loire river Violleau (1999)	HPO	60	49.7	5.0	33.5	2.1	–	90.3	1.21	0.51	0.04	2.9	–
	TPI	28	45.7	5.0	39.8	4.2	–	94.7	1.31	0.65	0.08	1.9	–
	HPI[b]	12	26.0	3.5	36.2	4.3	–	70.0	1.61	1.04	0.14	1.2	–

[a] not isolated.
[b] High content of inorganic salts.

Author's personal copy

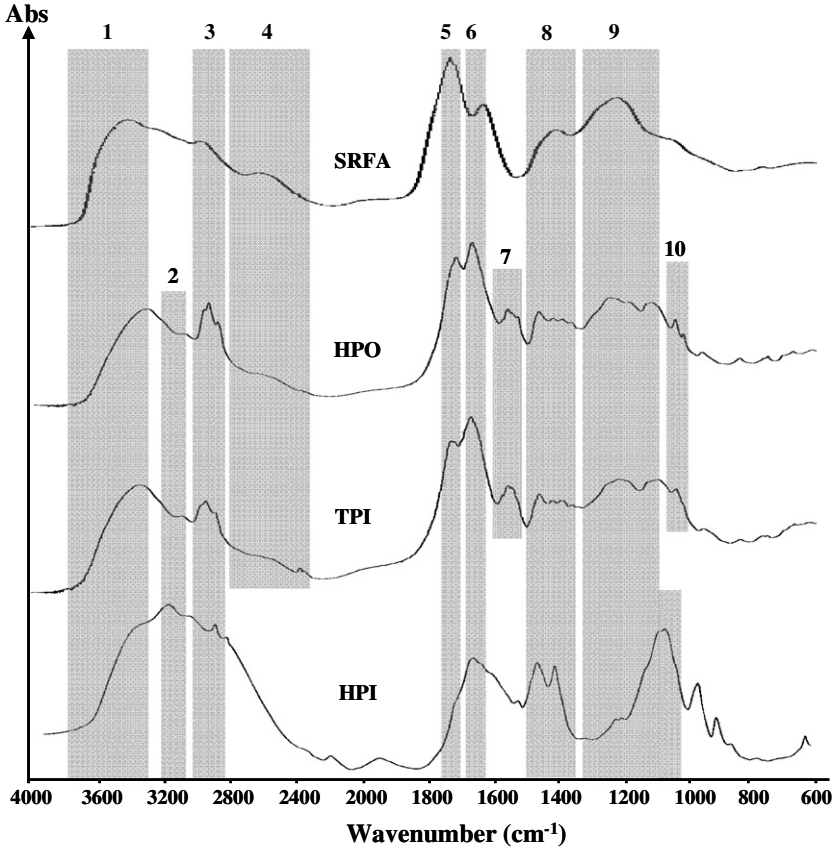


Fig. 2. FTIR spectra of SRFA and HPO, TPI, HPI fractions isolated from WWTP Seine-Aval effluents (band 1: O–H bonds; bands 2, 6, 7: nitrogen groups; bands 3, 8: aliphatic chains; bands 4, 5: carboxylic groups; band 9: C–O bonds; band 10: sulphonic groups).

shift, the band 6 for SRFA is attributed to aromatic carboxylic acid. The presence of aliphatic chains is revealed by the bands 3 and 8: at 2960 cm^{-1} with a small shoulder (C–H asymmetric stretching in CH_2 and CH_3) and at 2890 cm^{-1} (C–H symmetric stretching in CH_2) (Dignac et al., 2000). The variation in the intensity of the aliphatic peaks confirms the differences in alkyl chain abundance between these fractions. Bands 4 and 5 are associated with the carboxylic acid bonds. Peaks 5, at approximately 1700 cm^{-1} are very intense and this highlights the acid character of organic matter (Croué, 2004). Band 9 is attributed to the C–O of alcohols and sugars. The high intensity of this peak for the HPI fraction displays the abundance of sugars in HPI fraction (Leenheer and Rostad, 2004). Band 10 may be correlated to the presence of sulphonic group associated to carboxylic aromatic cycles. These compounds are breakdown products (metabolites) of a surfactant (LAS: linear alkyl sulphonates) as previously observed in municipal wastewater (Barber et al., 1997). In conclusion, EfOM fractions differ from SRFA in nitrogenized function and aromaticity due to the high content of proteinaceous structures.

3.3. Influence of DOM on copper toxicity

Figs. 3a and 3b show the dose-effect curves obtained for the HPO media and EC50 expressed in total ($EC50_{tot}$) and labile ($EC50_{lab}$) copper (measured by DGT), obtained for all media. The $EC50_{tot}$ and $EC50_{lab}$ are similar for the inorganic media (Mont-Dore mineral water without DOM) given that copper inorganic complexes are totally labile with DGT techniques. The $EC50_{tot}$ for organic media are definitely higher than the $EC50_{tot}$ of inorganic media, thereby highlighting the protective role of DOM. The $EC50_{tot}$ obtained for EfOM are not statistically different from the

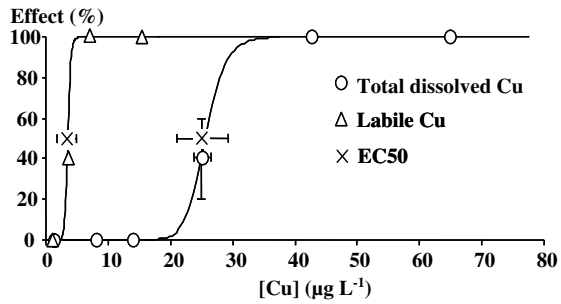


Fig. 3a. Dose-effect curves obtained for the HPO media.

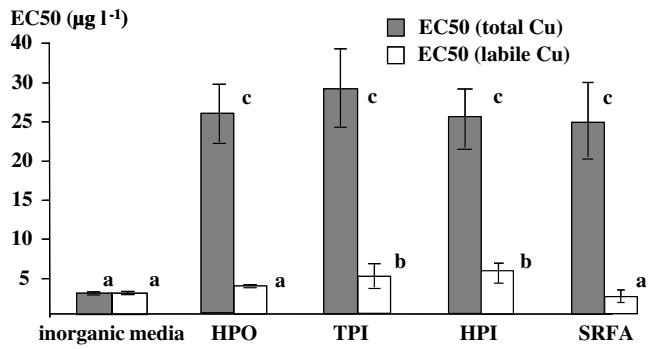


Fig. 3b. Copper EC50 obtained for each media. (groups a, b and c are statistically different).

Author's personal copy

$EC50_{tot}$ for SRFA, which indicates a similar and real protective effect of EfOM fractions, as compared to natural hydrophobic DOM. The labile toxic concentration ($EC50_{lab}$) for HPO and SRFA media are not statistically different from the toxic labile concentration (EC50) obtained in inorganic media. For HPI and TPI media, the labile toxic copper concentration is slightly higher statistically. In the present case, this feature reflects the relative effectiveness of DGT measurements in approximating copper toxicity within such media. Buzier et al. (2006) also observed toxic concentrations in labile copper ($EC50_{lab}$) in the both raw and treated effluent of the same WWTP higher than those obtained in inorganic media. Other studies have also shown that, depending on the nature of DOM, DGT measurements could overestimate copper toxicity (Luider et al., 2004; Tusseau-Vuillemin et al., 2004; Divis et al., 2007).

Biologically determined constant values of 9.9, 11.3 and 9.8 L mgC^{-1} are derived for EfOM fractions HPO, TPI and HPI, respectively. The biologically determined constants determined for isolated EfOM fractions are quite similar to the SRFA biologically determined constant (9.5 L mgC^{-1}), which underscores the real protective effect of EfOM. A similar constant (8.4 L mgC^{-1}) was found for the raw treated effluent from the same WWTP with data from Buzier et al. (2006). The biologically determined constants of isolated fractions are slightly higher than that obtained for raw complete treated effluent of the same WWTP. This finding can be explained by a competition effect relative to the toxicity and/or to the copper complexation with DOM since data of Buzier et al. (2006) were produced at higher major cations concentrations level. This finding could also underline that the DOM isolation procedure does not modified EfOM and moreover presents the advantage of separating DOM from inorganic salts and inorganic pollutants. De Schamphelaere et al. (2004) and Kramer et al. (2004) demonstrated that SUVA at 350 nm was a good proxy of biologically (*Daphnia magna*) relevant differences in copper complexing properties of natural DOM. In this study, regardless the wavelength being considered (254 or 350 nm), SUVA can not be used to explain the observed copper toxicity on *Daphnia magna* in presence of EfOM because the protective effect of DOM appears to be similar at the same DOC concentration whereas SUVA decreases strongly (two-to-fivefold) between natural hydrophobic DOM (SRFA) and EfOM depending on the polarity criteria (see Table 1). According to characterization results of EfOM, proteins and polysaccharides, e.g. substances with low SUVA, are suspected to shown metal binding properties. Lamelas et al. (2005) also have demonstrated that some fraction of DOM (polysaccharide, especially alginates) may exhibit complexing properties and a protective role, with respect to the organism, that are comparable to those of fulvic acids at similar concentrations. In this context, the development of site-specific water quality criteria should take into account not only the fulvic and humic acids, but others substances as well (proteins, polysaccharide, etc.), which exhibit a low SUVA but yet still could play an important role in metal complexation. In this respect, the introduction of correction factors based on NOM aromaticity measurement (specific absorbance coefficient or SUVA values), to account for NOM quality, may only be appropriate when the NOM is dominated by humic substances. Future research is needed to determine the extent and conditions with which EfOM can exert a major impact in attenuating metal toxicity.

4. Conclusion

According to a RO/DAX protocol, the DOM of treated wastewater was extracted and fractionated into three groups depending on polarity property (HPO, TPI and HPI). Hydrophilic DOM appeared to be the most significant fraction in WWTP discharge, as opposed to the natural aquatic ecosystem where hydrophobic DOM prevails. The quantitative isolation and purification of DOM (without salts) proved difficult to achieve due to the high proportion of HPI fraction. Various analytical techniques (elemental, spectroscopic: UV and FTIR) made it possible to highlight the weak aromaticity and high rate of proteinaceous structures in the whole EfOM compared to natural hydrophobic DOM. Concerning copper toxicity, results show a similar protective role of treated wastewater and natural DOM to the *Daphnia magna* organism. Substances with low SUVA, e.g. protein or polysaccharides, are strongly suspected to play a sizable role in the copper complexation by EfOM. Further characterization of DOM and an evaluation of complex stability constant will be soon performed in order to better understand the effect of DOM (both urban and natural) on trace metal speciation and bioavailability in within an urbanized aquatic system.

Acknowledgement

The authors would like to thank the SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne) for making the sampling site accessible, as well as Mohamed Saad, Isabelle Chardon and Mathieu Cladière for their technical assistance, Daniel Stadtmüller and Emmanuelle Kuhn for the chemical analyses during toxicity testing, Jean-Philippe Croué and David Violleau for their help in DOM fractionation, France's Ministry of Research and Higher Education for its financial support in the form of a Ph. D. Grant awarded to Benoît Pernet-Coudrier. This work has also been supported by the French National Research Agency (as part of project BIOMET JC05_59809).

Appendix. List of acronyms

BLM	biotic ligand model
DGT	diffusive gradient film
DOC	dissolved organic carbon
DOM	dissolved organic matter
EC50	lethal concentration for 50% of the population
EfOM	wastewater effluent dissolved organic matter
FIAM	free ion activity model
FTIR	fourier transform infrared
GFAAS	graphite-furnace atomic absorption spectroscopy
HPI	hydrophilic
HPO	hydrophobic
HS	humic substances
ICP-AES	inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
RO	reverse osmosis
SRFA	Suwannee river fulvic acid
SUVA	specific ultra violet absorbance
TPI	transphilic
WWTP	wastewater treatment Plant

References

Andrew, R.W., Biesinger, K.E., Glass, G.E., 1977. Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*. Water Res. 11, 309–315.

Barber, L.B., Brown, G.K., Kennedy, K.R., Leenheer, J.A., Noyes, T.I., Rostad, C.E., Thorn, K.A., 1997. Organic constituents that persist during aquifer storage and recovery of reclaimed water in Los Angeles County, California. Conjunctive use of water resources: aquifer storage and recovery, In: Proceedings of the American Water Resources Association Symposium, October 19–23, Long Beach, California, pp. 261–271.

Buffle, J., 1988. Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach. Ellis Horwood, New York.

Buffle, J., Deladoey, P., Greter, F.L., Haerdi, W., 1980. Study of the complex formation of copper (II) by humic and fulvic substances. Anal. Chim. Acta 116, 255–274.

Buzier, R., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Mouchel, J.-M., 2006. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. Sci. Total. Environ. 358, 277–285.

Croué, J.F., 2004. Isolation of humic and non-humic NOM fractions: structural characterization. Environ. Monit. Asses. 92, 193–207.

Croué, J.P., Benedetti, M.F., Violleau, D., Leenheer, J.A., 2003. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South

Author's personal copy

Platte river: evidence for the presence of nitrogenous binding site. Environ. Sci. Technol. 37, 328–336.
Davison, W., Zhang, H., 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. Nature 367, 546–548.
De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH. Environ. Sci. Technol. 36, 48–54.
De Schamphelaere, K.A.C., Vasconcelos, F.M., Tack, F.M.G., Allen, H.E., Janssen, C.R., 2004. Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1248–1255.
Dignac, M.-F., Derenne, S., Ginestet, P., Bruchet, A., Knicker, H., Largeau, C., 2000. Determination of structure and origin of refractory organic matter in bio-epurated wastewater via spectroscopic methods. comparison of conventional and ozonation treatments. Environ. Sci. Technol. 34, 3389–3394.
Divis, P., Docekalova, H., Brulak, L., Pavlis, M., Hekera, P., 2007. Use of the diffusive gradients in thin films technique to evaluate (bio)available trace metal concentrations in river water. Anal. Bioanal. Chem. 387, 2239–2244.
Drewes, J.E., Croué, J.P., 2002. New approaches for structural characterization of organic matter in drinking water and wastewater effluents. In: 2nd World Water Congress: Drinking Water Treatment, 1–10.
Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Hwan Kim, Y., 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers and other organic matter sources. Water Res. 35, 4019–4028.
Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K., 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. Water Res. 36, 859–870.
Isnard, P., Flammarion, P., Roman, G., Babut, M., Bastien, P., Bintein, S., Essermeant, L., Ferard, J.F., Gallotti-Schmitt, S., Saouter, E., 2001. Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. Chemosphere 45, 659–669.
Kramer, K.J.M., Jak, R.G., van Hattum, B., Hooftman, R.N., Zwolsman, J.J.G., 2004. Copper toxicity in relation to surface water-dissolved organic matter: Biological effects to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2971–2980.
Lamelas, C., Wilkinson, K.J., Slaveykova, V.I., 2005. Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. Environ. Sci. Technol. 39, 6109–6116.
Leenheer, J.A., 1981. Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. Environ. Sci. Technol. 15, 578–587.
Leenheer, J.A., Croué, J.-P., 2003. Characterized aquatic dissolved organic matter. Environ. Sci. Technol. 37, 19–26.
Leenheer, J.A., Croué, J.F., Benjamin, M., Korshin, G.V., Hwang, C.J., Bruchet, A., Aiken, G.R., 2000. Comprehensive isolation of natural organic matter from water for spectral characterizations and reactivity testing. ACS Symposium Series 76, Washington, DC, pp. 68–83.
Leenheer, J.A., Rostad, C.E., 2004. Fractionation and characterization of organic matter in wastewater from a Swine waste-retention basin. Scientific Investigations Report 2004–5217. US Department of the Interior and US Geological Survey.
Luider, C.D., Crusius, J., Playle, R.C., Curtis, P.J., 2004. Influence of natural organic matter source on copper speciation as demonstrated by Cu binding to fish gills, by ion selective electrode and by DGT gel sampler. Environ. Sci. Technol. 38, 2865–2872.
Ma, H., Allen, H.E., Yin, Y., 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. Water Res. 35, 985–996.
Mantoura, R.F.C., Dickson, A., Riley, J.P., 1978. The complexation of metals with humic materials in natural waters. Estuar. Coast. Mar. Sci. 6, 387–408.
Martin-Mousset, B., Croué, J.P., Lefebvre, E., Legube, B., 1997. Distribution et caractérisation de la matière organique dissoute d'eaux naturelles de surface. Water Res. 31, 541–553.
Meador, J.P., 1991. The interaction of pH, dissolved organic carbon and total copper in the determination of ionic copper and toxicity. Aquat. Toxicol. 19, 13–32.
Morel, F.M., 1983. Complexation: trace metals and microorganisms. In: Principles of Aquatic Chemistry. Wiley Interscience, New York.
Peuravuori, J., Ingman, P., Pihlaja, K., Koivikko, R., 2001. Comparisons of sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins from solid-state ^{13}C NMR spectroscopy's point of view. Talanta 55, 733–742.
Peuravuori, J., Lehtonen, T., Pihlaja, K., 2002. Sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins: comparative study using pyrolysis gas chromatography. Anal. Chim. Acta 471, 219–226.
Sarathy, V., Allen, H.E., 2005. Copper complexation by dissolved organic matter from surface water and wastewater effluent. Ecotox. Environ. Safe. 61, 337–344.
Stevenson, F.J., 1994. Humus Chemistry – Genesis, Composition, Reactions. John Wiley & Sons, New York.
Tessier, A., Turner, D.R., 1995. Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley & Sons, Chischester.
Town, R.M., Filella, M., 2000. A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters. Aquat. Sci. 62, 252–295.
Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gilbin, R., Bakkaus, E., Garric, J., 2004. Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 23, 2154–2161.
Violleau, D., 1999. Intérêt du fractionnement et de l'extraction des matières organiques naturelles d'eaux de surface pour l'étude de leur propriétés structurales et de leur pouvoir complexant vis-à-vis du cuivre, Thesis report. Laboratory of water chemistry, University of Poitiers, France.
Zhang, H., Davison, W., 1995. Performance-characteristics of diffusion gradients in Thin-films for the in situ measurement of trace-metals in aqueous-solution. Anal. Chem. 67, 3391–3400.

ANNEXE 8 : ARTICLE 2

Intern. J. Environ. Anal. Chem.
Vol. ??, No. ?, Month?? 2008, 1–9

Application of a refractory organic matter quantification method to wastewater effluents

Montserrat Filella[a]*, François Quentel[b], Benoît Pernet-Coudrier[c] and Gilles Varrault[c]

[a]*Department of Inorganic, Analytical and Applied Chemistry, University of Geneva, 30 Quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Geneva 4, Switzerland;* [b]*Laboratoire de Chimie Analytique, UMR-CNRS 6521, Université de Bretagne Occidentale, 6 avenue V. Le Gorgeu, CS 93837, F-29238 Brest Cedex 3, France;* [c]*Université Paris-Est, CEREVE, UMR MA 102 - AgroParisTech, 61 avenue du Gal de Gaulle, F-94010 Créteil Cedex, France*

(*Received 6 August 2008; final version received 16 January 2009*)

An already established analytical method for the quantification of freshwater refractory organic matter (often called humic substances) has been applied to organic matter from a wastewater treatment plant's effluent and a number of downstream locations impacted by the treatment plant. The method is based on measuring the peak currents obtained by adsorptive stripping voltammetry of the complex formed by freshwater refractory organic matter in the presence of trace amounts of Mo(VI). Organic matter is first concentrated by reverse osmosis, then fractionated according to its polarity by the sequential application of DAX-8 and XAD-4 resins. The results obtained show that the voltammetric method measures the refractory organic matter present in the different sewage-derived fractions and that the response obtained follows the trend expected for the fractionation method used (i.e. more hydrophobic fractions largely give the strongest signals). These results have been compared with those obtained from IHSS substances. The results of this study are of particular significance in that it shows that, when applied to surface waters, the voltammetric method measures any refractory organic matter present, irrespective of its origin.

Keywords: refractory organic matter; ROM; HPO; TPI; HPI; SWV; wastewaters; WWTP; ROM quantification

1. Introduction

Many studies have pointed out the importance of organic matter (OM), particularly the fraction which is more refractory to degradation, for many environmental issues ranging from the toxicity of trace elements and micropollutants to the production of undesirable disinfectious by-products to global change. Much research has focused on the fractionation and characterization [1] of the refractory organic matter (ROM), often called humic and fulvic substances (see [2] for a detailed description of the different terms used and their meanings), but very few methods exist for quantifying it. Spectroscopic techniques, such as UV–Vis and fluorescence, are still the most widely used. However, their value as quantification methods remains doubtful because they 'see' only a certain

*Corresponding author. Email: montserrat.filella@unige.ch

ISSN 0306–7319 print/ISSN 1029–0397 online
© 2008 Taylor & Francis
DOI: 10.1080/03067310902756169
http://www.informaworld.com

fraction of ROM [3], the proportion of which does not remain constant from system to system. In addition, UV–Vis is not sufficiently sensitive for samples with low ROM content. As an alternative, an electroanalytical method based on cathodic stripping preceded by the adsorptive collection of Mo(VI)-humic or fulvic acid complexes has also been proposed recently [4,5]. This method is fast and consumes only small amounts of the sample. It is therefore particularly well suited to environmental studies where a large number of samples needs to be analysed. Moreover, the method has a very low detection limit and can be used reliably in systems which are poor in OM (e.g. [6]).

It is usually assumed that ROM in rivers has two sources: soils and the decomposition of aquogenic biological materials. However, although often not explicitly acknowledged [7], sewage effluents are likely to be major contributors to the refractory pool of OM present in rivers in heavily populated areas. Sewage effluents contain a high concentration of OM, most of which degrades relatively easily in river waters, but they also contain a refractory fraction that will contribute to the riverine pool of ROM. In this study, the voltammetric response of different fractions of OM isolated from the effluent of a wastewater treatment plant (WWTP) and some downstream river locations has been tested in order to ascertain whether this type of ROM is also measured by the analytical method. Prior to analysis, WWTP organic matter was fractionated in operational categories according to its polarity using a well-established method [8]. Since this new analytical method had never before been applied to fractions isolated from river water using this fractionation method, samples from upstream river waters which had not been exposed to WWTP OM were also fractionated and the corresponding fractions analysed.

2. Experimental

2.1 *Apparatus*

All voltammetric measurements were taken with a potentiostat/galvanostat Autolab PGSTAT12 controlled by GPES 4.8 software. A hanging mercury drop electrode (HMDE) Metrohm model 663 VA with a mercury drop size of $0.52\,mm^2$ was used. All potentials were referred to an Ag/AgCl, $3\,mol\,L^{-1}$ KCl, reference electrode. The counter electrode was a platinum wire. The square-wave mode (SWV) was used for ROM measurements. The quartz voltammetric cell was thermostated at $25 \pm 0.1°C$ during the measurements to ensure that conditions were reproducible.

2.2 *Reagents*

All chemicals used were of analytical reagent grade except the mineral acid (HCl), which was of Suprapur grade. A $1000\,mg\,L^{-1}$ stock solution of Mo(VI) (atomic absorption standard, Merck) was diluted as required.

2.3 *Sampling*

Treated water from the Seine-Aval wastewater treatment plant (WWTP), Achères, France, was sampled twice. This WWTP collects over 70% of the dry weather wastewater (combined sewer system) from Paris and the surrounding suburban metropolitan area (≈8 million inhabitants). Wastewaters are treated by primary settling and aerobic activated sludge in this WWTP. Waters from the River Seine were also sampled at two

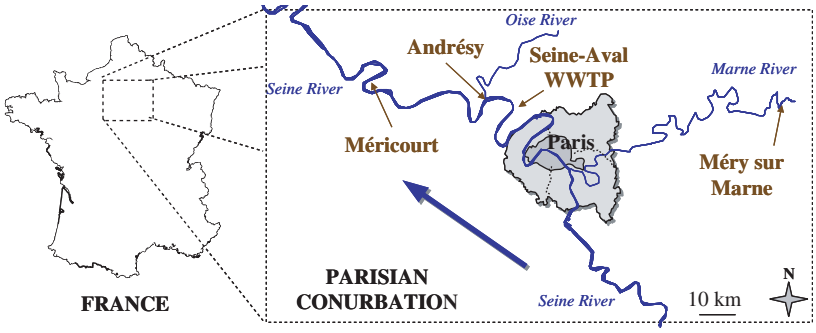


Figure 1. Location of the sampling sites.

Table 1. Location and dates of sampling and main physico-chemical characteristics of the sampled water.

Sampling site	Date	Identifier	Flow/ $m^3 s^{-1}$	Temperature/°C	pH	Conductivity/ $\mu S cm^{-1}$	DOC/ $mg C L^{-1}$
Méry/Marne	30/01/07	M1	80	7	8.5	560	2.0
	27/06/07	M2	35	19	8.3	517	2.0
Seine-Aval	06/04/06	A1	≈20	17	7.8	1580	38.7
WWTP	15/12/06	A2	≈20	14	8.1	1261	17.4
Andrésy	29/06/07	AN	120[a]	18	7.7	606	4.1
Méricourt	03/07/07	MT	120[a]	20	7.6	625	4.0

[a]Measured in Paris (Austerliz).

locations downstream of the WWTP pouring point, Andrésy and Méricourt. Additional samples were taken in the Marne River (Méry-sur-Marne), upstream from Paris. The location of the sampling points is shown in Figure 1. Sampling dates and the main characteristics of the sampled waters can be found in Table 1.

Water samples were collected during a period of dry weather using a double membrane pump (IR ARO®) and sequentially filtered on site through 10 and 0.45 μm polypropylene cartridge filters (Predel®). Subsequent softening and reverse osmosis (RO) concentration were performed in line and on site to reduce operation time and potential OM biodegradation. Prior to RO concentration, samples were softened with a sodium cation-exchange resin in order to eliminate Ca and Mg ions that could co-precipitate with OM and clog RO membranes (Filmtech TW 30). Conductivity was monitored during RO concentration in order to prevent OM leakage. A final rinsing of the membranes with a 0.05 mol L^{-1} NaOH permitted the recovery of adsorbed OM. Both rinsing waters and RO concentrate were added together and collected in a stainless steel bottle (50 L).

2.4 *Isolation of organic matter fractions*

Once in the laboratory, samples were acidified (0.01 mol L^{-1} HCl) and passed through nonionic macroporous Amberlite® DAX-8 and Supelite® XAD-4 (divynil benzene) resins

following the procedure described by Aiken and Leenheer [8]. Hydrophobic (HPO) and transphilic (TPI) fractions were obtained after elution of the resins with a mixture of acetonitrile and water (3:1) and freeze drying. The remaining hydrophilic OM (HPI fraction), neither adsorbed on DAX-8 nor on XAD-4 resins, contains all the salts initially present in the sample and required further purification. The separation of inorganic salts from the HPI fraction was carried out according to a protocol described by Leenheer and co-workers [8,9] which consists of zeotrophic distillation and successive evaporation steps to precipitate the inorganic salts. All Teflon and stainless steel material was washed several times with ultrapure deionised water. Glass material was washed with a detergent (5% TFD4), rinsed thoroughly with ultrapure deionised water and precombusted for 5 h at 500°C. Resins were washed before use by Soxhlet extraction and successive acid and base rinsing in accordance with the protocol described in [10].

2.5 *Measurement procedure*

All solutions were prepared with 18 MΩ.cm Milli-Q water. All glassware and polyethylene bottles were cleaned with 10% v/v HNO_3 and 0.5 mol L^{-1} NaOH and rinsed with Milli-Q water.

Stock solutions of each OM fraction were prepared in 0.01 mol L^{-1} NaOH. The procedure used for the measurements is the same as that described in [4]: (i) a small amount of Mo(VI) (10 μg L^{-1}) is added to an initial acidified (0.01 mol L^{-1} HCl) solution containing a given amount of an OM fraction, (ii) the sample is deaerated with nitrogen for 10 minutes, (iii) deposition at –0.2 V is carried out with stirring; (iv) after the deposition time, the stirring is stopped and, following a 20 s period of rest, the scan is initiated in the negative direction. The operational parameter values used were: frequency, 50 Hz; step potential, 1 mV; amplitude, 40 mV. Increasing amounts of the given OM fraction were added to the initial solution and the peak currents obtained measured in order to build the corresponding response curve. Typical SW voltammograms are shown in Figure 2. The electrochemical process has been previously described in references [5,11].

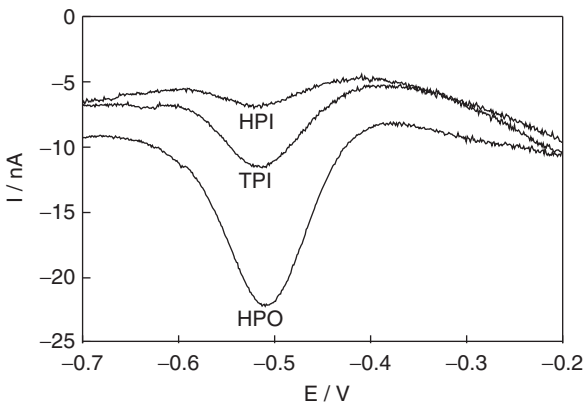


Figure 2. SW voltammograms for 0.250 mg L^{-1} solutions of HPI (1), TPI (2), HPO (3) after 3 min accumulation time.

3. Results

Nine different samples of OM related to the WWTP were analysed: four HPO fractions (two from the WWTP and two from downstream samples), four TPI fractions (two from the WWTP and two from downstream samples) and one HPI fraction from the WWTP. The main characteristics of the parent waters as well as the acronyms used to identify samples hereafter and in figures are shown in Table 1. The response curves obtained are shown in Figure 3. Even if, as shown in Table 2, the C-content of the various substances differs slightly, similar graphs are obtained when ROM concentrations are expressed as mg of C rather than as mg of ROM as in Figure 3 (graph not shown). The results obtained show a linear dependence between the analytical signal and OM concentrations. Signals from HPO fractions are stronger than those from other fractions. The signal from the only

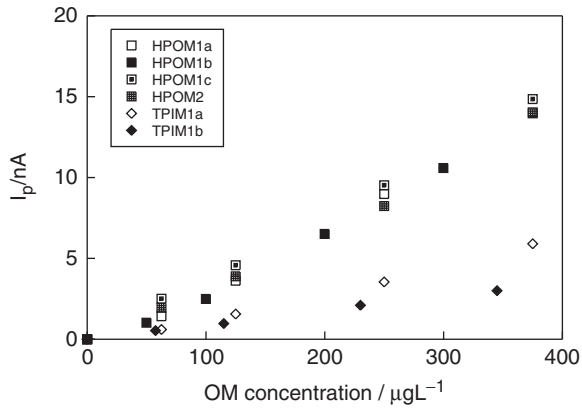


Figure 3. SWV response curves for OM isolated fractions from the WWTP Seine-Aval and the Seine River. OM concentrations are expressed in $\mu L\,g^{-1}$. Meaning of the abbreviations: HPO, hydrophobic; TPI, transphilic; HPI, hydrophilic; A1, WWTP April 2006; A2, WWTP Seine-Aval December 2006; AN: Seine River at Andrésy; Mt: Seine River at Méricourt.

Table 2. Elemental composition of isolated fractions [12,13][a].

Sample	C/wt%	H/wt%	O/wt%	N/wt%	S/wt%	Ash
HPOM1	45.0	5.5	35.7	3.0	1.0	9.1
TPIM1	46.0	5.3	36.7	4.8	1.8	2.2
HPOM2	40.4	4.5	29.7	2.8	1.6	12.5
TPIM2	47.3	5.6	37.0	4.9	1.5	4.0
HPOA1	53.6	6.5	27.9	5.7	2.6	2.9
HPOA2	54.1	6.4	29.2	4.4	2.7	4.5
HPOAN	50.2	5.1	32.9	3.4	1.9	5.0
HPOMT	46.5	5.0	31.0	3.1	2.3	4.7
TPIA1	48.4	6.4	28.8	8.4	2.1	4.7
TPIA2	47.3	6.1	34.1	6.9	2.2	2.5
TPIAN	41.4	4.6	35.9	4.9	0.8	14.6
TPIMT	35.4	5.0	29.0	5.5	0.8	7.8
HPIA1	43.8	7.1	29.4	12.3	2.1	5.0

[a]Standard deviation: 0.2.

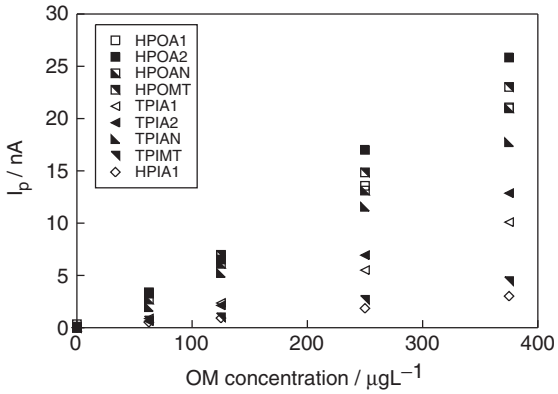


Figure 4. SWV response curves for OM isolated fractions from the Marne River (Méry-sur-Marne). OM concentrations are expressed in μL g^{-1}. Meaning of the abbreviations: HPO, hydrophobic; TPI, transphilic; M1, sampled 30/01/2007; M2, sampled 27/06/2007; a, first analysis; b, purified sample (see text); c, second, independent analysis.

HPI fraction measured is extremely weak. While all HPO signals are fairly similar, there are bigger differences between TPI signals and there is no clear trend among the samples.

River waters which had not been exposed to WWTP effluents were also sampled from the Marne River (Méry-sur-Marne) on two different dates (M1, 30/01/2007, and M2, 27/06/2007). Moreover, (i) one of the HPO fractions was analysed twice on different dates and using independently-prepared solutions (M1a and M1c) and (ii) the HPO and TPI fractions were purified in order to eliminate any remaining inorganic salts (M1b) and analysed again. All response curves are shown in Figure 4. The trends observed for the HPO and TPI fractions were similar to the previous ones. The results obtained for samples M1a and M1c show that the reproducibility of the sampling and fractionation method is good. Differences in HPO and TPI results before and after purification reflect the effect of the presence of excess salt in the unpurified fractions.

4. Discussion

In order to interpret the results obtained, a brief reminder of the basis of the fractionation and measuring methods is required.

The fractionation method – The fractionation scheme applied is based on the definition of operational categories based on polarity: a serial two column array of resins allows the isolation of a 'hydrophobic' (HPO, DAX-8 retained) and 'transphilic' (TPI, XAD-4 retained but not DAX-8 retained) fraction. A relatively complex cleaning procedure makes it possible to isolate a third fraction ('hydrophilic', HPI) not retained by any column. Since the classic operational definition of humic and fulvic acids in water includes the initial isolation of OM by using a DAX-8 resin (and further separation of the fulvic and humic fractions by their pH dependent solubility, thus mimicking the definition initially developed for soils), it is usually assumed that the HPO fraction is equivalent to the fulvic + humic categories and that it, therefore, represents refractory OM, as do fulvics and humics. Nevertheless, it has been known for a long time that isolated humic and fulvic fractions also contain a certain proportion of other hydrophobic, well-defined biochemical categories such as carbohydrates and proteins (see, for instance, the composition of the

standard fulvic and humic acids sold by the IHSS at http://www.ihss.gatech.edu/chemistry.html). Similar observations have been published for HPO fractions [14–16]. Moreover, different studies have shown that DAX-8 column elution with water-acetonitrile mixtures elutes about 30% more OM from the column than does NaOH, the traditional eluant in fulvic-humic fractionation procedure [17]. A whole range of organic compounds, ranging from different types of carbohydrates to lipids, proteins and low molecular weight organic compounds are present in the TPI and HPI fractions [13,14]. These compounds will be less hydrophobic and, in principle, more easily degradable than HPO. However, it is important to realise that neither property, hydrophobicity or degradability, shows a clear cut-off in natural OM but rather a continuum that is highly system dependent.

The measuring method – As mentioned in the introduction, the method is based on the cathodic stripping, preceded by the adsorptive collection, of Mo(VI)-ROM complexes. It has been proved that only water, soil and peat fulvic and humic acids, defined as fractions isolated by following the different standard procedures of the IHSS, give a signal, while none of the wide range of carbohydrates and proteins tested do [4].

As expected given the considerations above, the HPO fractions measured in this study for both river and WWTP OM produce a stronger signal than the TPI fractions, highly enriched in carbohydrates and proteins [12], and the HPI fraction gives an even weaker signal. The TPI fractions give a stronger signal than might be expected but this is not really surprising because this fraction 'still' contains a certain number of structures similar to those which are characteristic of the so-called humic substances. Interestingly, these are the fractions that show higher signal variability, which probably reflects the fact that their composition is more highly dependent on the media (i.e. degree of OM decomposition). This point clearly merits further attention. The availability of the voltammetric method may prove very useful for the study of the temporal and spatial dynamics of this OM because it allows for fast analysis of a large number of samples.

Figure 5 shows the comparison of the signals obtained from the different OM fractions measured in this study (hatched zone) and the signal given by 13 IHSS organic compounds studied in [5]. Our fractions give signal strengths between NLOM and peat (PPHA), soil (ESHA) and coal (LHA) humic acids. NLOM is a compound isolated by reverse osmosis and not by following the classic IHSS isolation procedure. It therefore contains all OM fraction considered in this study (i.e. HPO, HPI, TPI). Since WWTP ROM signals fall in the coal-peat zone, it can be deduced that WWTP ROM has a degree of degradation/evolution similar to that of those humic substances.

5. Conclusions

This study confirms that ROM present in wastewater effluents is measured by the voltammetric method. Therefore, when used in real freshwater samples, this analytical method gives a signal that is the composite of the contributions of ROM from any 'natural' origin (soil, aquogenic) and wastewaters. Application of this quantification method presents a clear advantage over the use of empirical corrections of DOC values as is the case nowadays in many fields (e.g. metal speciation modelling, productivity studies). Moreover, a combination of unspecific DOC measurements with specific voltammetric ROM measurements may be an extremely useful tool for following up dynamic processes related to the degradation and fate of wastewater in real systems, as has already happened with the study of the impact of productivity in unpolluted systems [6].

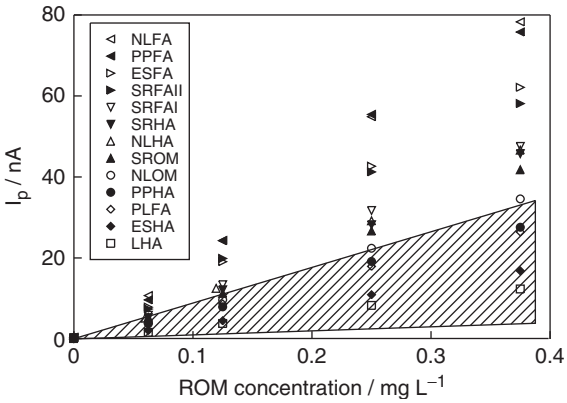


Figure 5. Comparison of SWV response curves obtained for from the WWTP Seine-Aval and the Seine River in this study and 13 IHSS substances (from [4]). Meaning of the abbreviations: NLFA = Nordic Lake FA (1R105F), PPFA = Pakohee Peat FA (2S103F), ESFA = Elliott Soil FA (2S102F), SRFAII = Suwanneee River FA II (2S101F), SRFAI = Suwanneee River FA I (1S101F), SRHA = Suwanneee River HA (2S101H), NLHA = Nordic Lake HA (1R105H), SROM = Suwanneee River NOM (1R101N), NLOM = Nordic Lake NOM (1R108N), PPHA = Pakohee Peat HA (1R103H), PLFA = Pony Lake FA (1R109F), ESHA = Elliott Soil HA (1S102H), LHA = Leonardite HA (1S104H).

Abbreviations

HMDE	hanging mercury drop electrode
HPI	hydrophilic OM fraction
HPO	hydrophobic OM fraction
IHSS	International Humic Substance Society
OM	organic matter
RO	reverse osmosis
ROM	refractory organic matter
SWV	square wave voltammetry
TPI	transphilic OM fraction
WWTP	wastewater treatment plant

Acknowledgements

We would like to thank Vincent Chanudet for carrying out a preliminary analysis of some wastewater samples. The isolation of OM fractions from the Paris conurbation has been supported by the French National Research Agency (project BIOMET JC05_59809).

References

[1] G.U. Abbt-Braun Lankes and F.H. Frimmel, Aquat. Sci. **66**, 151 (2004).
[2] M. Filella, Environ. Chem. Lett. ▮▮, ▮▮ (▮▮▮), available online at DOI: 10.1007/s10311-008-0158-x.
[3] J.L. Weishaar, G.R. Aiken, B.A. Bergamaschi, M.S. Fram, R. Fujii, and K. Mopper, Environ. Sci. Technol. **37**, 4702 (2003).

[4] V. Chanudet, M. Filella, and F. Quentel, Anal. Chim. Acta **569**, 244 (2006).
[5] F. Quentel and M. Filella, Anal. Bioanal. Chem. **392**, 1225 (2008).
[6] V. Chanudet and M. Filella, Org. Geochem. **38**, 1146 (2007).
[7] R.L. Malcolm, in *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, edited by G.R. Aiken, D.M. MacKnight, R.L. Wershaw, and P. MacCarthy (Wiley, Somerset NJ, 1985), pp. 181–209.
[8] G.R. Aiken and J.A. Leenheer, Chem. And. Ecol. **8**, 135 (1993).
[9] J.A. Leenheer, J.F. Croué, M. Benjamin, G.V. Korshin, C.J. Hwang, A. Bruchet, and G.R. Aiken, in *Natural Organic Matter and Disinfection By-products*, edited by S. Barrett, S.W. Krasner, and G.L. Amy (ACS Symposium Series 76, American Chemical Society, Washington DC, 2000), pp. 68–83.
[10] J.A. Leenheer, Environ. Sci. Technol. **15**, 578 (1981).
[11] F. Quentel and C. Elleouet, Electroanalysis **13**, 1030 (2001).
[12] B. Pernet-Coudrier, L. Clouzot, G. Varrault, M.H. Tusseau-Vuillemin, A. Verger, and J.M. Mouchel, Chemosphere **73**, 593 (2008).
[13] G. Varrault, B. Pernet-Coudrier, L. Curie, M.H. Tusseau-Vuillemin, and J.M. Mouchel, Communication at the *8th French Workshop of IHSS*, Lyon, 27–28 November 2007 (2007).
[14] L.B. Barber, J.A. Leenheer, T.I. Noyes, and E.A. Stiles, Environ. Sci. Technol. **35**, 4805 (2001).
[15] A. Imai, T. Fukushima, K. Matsushige, and Y. Hwan, Kim, Wat. Res. **35**, 4019 (2001).
[16] J.P. Croué, M.F. Benedetti, D. Violleau, and J.A. Leenheer, Environ. Sci. Technol. **37**, 328 (2003).
[17] R.L. Malcolm and P. MacCarthy, Environ. Intern. **18**, 597 (1992).