



HAL
open science

Analyse de la matière organique et ses propriétés dans l'environnement naturel en spectroscopie de fluorescence 3D traitée par PARAFAC

Huiyu Zhao

► **To cite this version:**

Huiyu Zhao. Analyse de la matière organique et ses propriétés dans l'environnement naturel en spectroscopie de fluorescence 3D traitée par PARAFAC. Autre. Université de Toulon, 2011. Français. NNT: 2011TOUL0003 . tel-00626538

HAL Id: tel-00626538

<https://theses.hal.science/tel-00626538>

Submitted on 26 Sep 2011

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.

Ecole Doctorale SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT (ED251 - EDSE)

**Laboratoire PROcessus de Transferts et d'Echanges dans
l'Environnement (PROTEE) – Equipe d'Accueil EA3819**

THÈSE présentée par :

[Huiyu ZHAO]

soutenue le : **25 février en chimie de l'environnement 2011**

pour obtenir le grade de Docteur en chimie de l'environnement
Spécialité : CHIMIE, chimie analytique, spectrochimie, chimie de
l'environnement, modélisation

Analyse de la matière organique et ses propriétés dans l'environnement naturel en spectroscopie de fluorescence 3D traitée par PARAFAC

THÈSE dirigée par :

[Dr. MOUNIER Stéphane]

[Dr. REDON Roland]

Maître de conférences (HDR), Université du Sud Toulon-Var

Maître de conférences, Université Paul-Cézanne

JURY :

[Pr. BAKER Andy]

[Dr. GOUTX Madeleine]

[Dr. RICHARD Claire]

[Pr. SENESI Nicola]

[Dr. THERAULAZ Frédéric]

[Dr. VOUVÉ Florence]

Professeur, University of New South Wales (Australie)

Directrice de recherche, CNRS-Université de la Méditerranée

Directrice de recherche, CNRS-Université Blaise Pascal

Professeur, University of Bari (Italie)

Maître de conférences (HDR), Université de Provence

Maître de conférences, Université de Perpignan

THESE

pour obtenir le grade de DOCTEUR

dans la discipline de : **CHIMIE, chimie analytique, spectrochimie, chimie de l'environnement, modélisation**

par

ZHAO Huiyu (Annaëlle)

Équipe de recherche : Laboratoire PROTEE
(PROcessus de Transferts et d'Echanges dans l'Environnement, EA3819)
de l'Université du Sud Toulon - Var

Analyse de la matière organique et ses propriétés dans l'environnement naturel en spectroscopie de fluorescence 3D traitée par PARAFAC

Le 25 février 2011

S. MOUNIER R. REDON	Directeurs de thèse :	
	Maître de conférences (HDR)	Université du Sud Toulon-Var
	Maître de conférences	Université Paul-Cézanne
C. RICHARD N. SENESI	Rapporteurs :	
	Directrice de recherche	CNRS, Université Blaise Pascal
	Professeur	University of Bari (Italie)
A. BAKER	Examineurs :	
	Professeur	University of New South Wales (Australie)
M. GOUTX	Directrice de recherche	CNRS, Université de la Méditerranée
F. THERAULAZ	Maître de conférences (HDR)	Université de Provence
F. VOUVÉ	Maître de conférences	Université de Perpignan

~~至爸爸妈妈~~

A papa et maman

A mon chéri Yoann Louis
et également à mon beau papa et ma belle maman

Remerciements :

Approchant de la fin de ma rédaction de thèse, souffrant des difficultés de ce dernier moment, je m'encourage en pensant à toutes les personnes qui peuvent témoigner de tous mes progrès en passant des grands moments « chimiques », qui m'ont aidée à traverser mes plus de trois années de travaux de recherches et d'enseignements et qui m'ont guidée dans le chemin de destination, et qui m'ont également corrigé mes inévitables défauts (ordre alphabétique des noms de famille).

Tout d'abord, je remercie le Professeur Yves Lucas, pour sa sympathie, son esprit scientifique et sa capacité à rassembler les membres de l'équipe du laboratoire PROTEE (PROcessus de Transferts et d'Échanges dans l'environnement). Il m'a montré le bon exemple d'être à la fois un chercheur scientifique et une personne qui sait reconnaître l'humain.

Je tiens à remercier sincèrement avec toute ma gratitude mes deux directeurs de thèse : Dr. Stéphane Mounier et Dr. Roland Redon, sans qui je ne pouvais même pas imaginer la lumière qu'on peut trouver dans le domaine des techniques spectrales.

Dr. Stéphane Mounier m'a appris, guidée et éclairée sur cette piste de recherche combinant en même temps la méthode physique et les analyses chimiques pour la matière organique. Depuis mon stage de Master II, il m'a appris toutes les connaissances sur la fluorescence, comme un père qui tient la main de sa fille dans son apprentissage à la marche. Il m'a encouragée tout au long de ma thèse, y compris lors d'échanges contredisant ses pensées. Il m'a laissée une liberté d'indépendance énorme dans la recherche en me faisant confiance. Ses connaissances dans ce domaine et ses idées intéressantes font partie de mon aventure de thèse. Sa personnalité, son humanité, ses centres d'intérêts vastes et son humour piquant me montrent un chimiste aux multiples facettes.

Dr. Roland Redon a apporté un autre esprit de pensée, différent du domaine de la chimie, en physique et en analyse informatique. Son attitude sérieuse m'a rappelée l'importance des détails dans la science ; sa logique de physicien différente de celle du Dr. Stéphane Mounier ajoute un point de vue remarquable dans ma thèse. Ses connaissances et ses talents ont assuré l'avancement de mes études dans des délais corrects en suivant un bon chemin ; sa patience et sa confiance m'ont encouragée durant ces années de thèse ; sa sympathie et son optimisme faisant partie de sa personnalité, facilitent les discussions scientifiques et quotidiennes ; ses façons de pensées directes et réalistes m'ont aidée à grandir pendant mes trois ans d'études de thèse.

Un grand merci pour mes deux rapporteurs de thèse : Mme Claire Richard et M. Nicola Senesi qui ont accepté la lecture de ma thèse et m'ont donné des conseils indispensables, également un grand merci à tous les quatre examinateurs de ma soutenance : M. Andy Baker, Mme Madeleine Goutx, M. Frédéric Theraulaz et Mme Florence Vouvé.

Mes remerciements les plus sincères aux membres de mon comité de thèse : M. Frédéric Coppin, M. Cédric Garnier, M. Frédéric Theraulaz. Ils m'ont aidée à éclairer la direction précise de ma thèse dès la première année.

Un merci profond pour les personnels de l'équipe CAPTE : Gaël Durrieu, Cédric Garnier, Véronique Lenoble, Christophe Lepoupon, Patricia Merdy et Nathalie Patel pour leurs nombreux conseils, leurs discussions scientifiques et nos échanges importants pour la recherche ainsi que les enseignements tout au long de mon étude.

Un grand merci pour tous les personnels du laboratoire PROTEE : André Bois, Romain Garrouste, Jean-Louis Jamet, Natacha Jean-De Luigi, Michel Raynaud et Marc Ripert.

Je tiens de plus à remercier les nombreux anciens doctorants (docteurs maintenant) qui m'ont aidée dans ma thèse : Yoann Louis, Xavier Luciani, Nadège Rossi et Yannick Viano (également sa copine : Claire Laperruque).

Je remercie aussi les nombreux doctorants actuels et je leur souhaite une bonne continuation et du courage jusqu'au moment de la fin de thèse : Cheikh Gadio, Hanane Hayzoun, Nicola Loffredo, Marie Loustau-Cazalet, Eric Noirtin, Benjamin Oursel, Emilie Dehant, Zhao Yi, et notamment ma copine Marion Peirache, et particulièrement mon cher collègue de bureau Erwan Tessier (également sa chérie Alix) pour tous nos échanges scientifiques et quotidiens.

Je dois aussi remercier les aides, les conseils et les sympathies des personnels du laboratoire MAPIEM qui ont partagé tous les bons moments durant mes études et également mes enseignements : Yves Blache, Olivier Bottzeck, Pascal Carrière, Gérald Culioli, Linda Dombrowsky, Maëlle Molmeret, Annick Ortalo-Magne, Mireille Richou, Annie Tabaries-Praud ; ainsi que les doctorants et contractuels : Amina Bendaoud, Florence Brian-Jaisson, Mercedes Camps, Céline Martias, Isabelle Martin, Nicolas Penez, Zomalala Ramanarivo...

Je remercie tous les personnels du bâtiment R qui ont témoigné de mon évolution (particulièrement Vincente) et ceux du bâtiment U qui ont facilité mes travaux d'enseignement.

Je tiens également à remercier tous les collaborateurs qui m'ont donné différents conseils : Daniel Cossa, Jean-Louis Gonzalez, Lars-Eric Heimbürger (responsable du projet DYCOMED), Catherine Massiani (Professeure retraitée de Marseille 1), Dario Omanović, Hans-Rudolf Pfeifer, Ivanka Pižeta, Cécile Potot (responsable du projet BasVar), les personnels de l'école doctorale ED251 et du CIES, la communauté scientifique de 15e MESAEP, M. Christian Clément (Hypothèse) et spécialement ma marraine Collette Faravel qui m'a encouragée sur mes études ainsi que sur mon futur.

Je remercie sincèrement toute l'équipe du handball loisir de la Garde, vous êtes géniaux !!!! Surtout Sophie, je tiens à la remercier sa gentillesse infinie et son charme naturel.

Excepté les trois personnes particulièrement importantes, à qui je n'ai jamais assez dit merci, je veux aussi embrasser de tout mon cœur les autres membres de ma belle famille, avec qui j'ai passé des supers moments culturellement français: Audrey, Nicolas, Mamie, Mickette et le petit trésor de la famille, Océane.

A la fin, j'embrasse toute la nouvelle génération mignonne du labo : Axel, Charlotte, Jeanne, Joseph, Lili, Quentin, Simon, et ceux à venir.

Table des matières

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I. MATIERE ORGANIQUE NATURELLE	3
I.A COMPOSITION GENERALE.....	3
I.A.1 Biopolymères.....	5
I.A.2 Géopolymères (Substances humiques)	5
I.B ORIGINES.....	6
I.B.1 Terrestres (continents)	6
I.B.2 Marines.....	7
I.B.3 Zones de transition	8
I.C ROLES DANS LES CYCLES DES ELEMENTS CHIMIQUES	8
I.C.1 Rôle dans le cycle du carbone.....	8
I.C.2 Rôle dans le transport des métaux - complexation	8
I.D CARACTERISATION DE LA MON	9
I.D.1 Description générale des propriétés de la MON.....	10
I.D.2 Propriétés optiques de la MON.....	14
CHAPITRE II. SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	15
II.A L'INTERACTION PHOTON - MOLECULE	15
II.B MESURE DE LA FLUORESCENCE	16
II.B.1 Spectres d'absorption et émission en mode continu.....	16
II.B.2 La fluorescence résolue en temps.....	25
II.C DEPENDANCES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA FLUORESCENCE	28
II.C.1 Paramètres physico-chimiques (pH, auxochrome, T°, solvants, photolyse).....	28
II.C.2 « Quenchers ».....	30
CHAPITRE III. MOD ET SPECTROSCOPIE : TRAITEMENT DU SIGNAL	32
III.A TRAITEMENT DES SPECTRES D'EMISSION	32
III.B APPLICATION DE « PEAK-PICKING » AUX MEEF	33
III.C PARAFAC	35
III.C.1 Principe.....	36
III.C.2 Prétraitements	37
III.C.3 Limitation due à la variabilité des spectres.....	42
CHAPITRE IV. FLUO 3D : UBIQUITE OU DIVERSITE ?	44
IV.A JEUX DE DONNEES (ORIGINES, PROPORTIONS, PH D'ORIGINE, FI).....	44
IV.A.1 Croatie estuaire (EC) et ses eaux interstitielles de sédiment (EI).....	46
IV.A.2 Rade de Toulon (EM)	47

IV.A.3	<i>DYCOMED (EM)</i>	48
IV.A.4	<i>GIRAC (ED) et MARSECO (EM)</i>	49
IV.A.5	<i>Zone tropicale (Brésil)</i>	50
IV.A.6	<i>BasVar (ED, Eaux de nappe dans une zone tempérée)</i>	51
IV.A.7	<i>Bosnie (ED)</i>	52
IV.A.8	<i>Grottes croates (ED)</i>	52
IV.A.9	<i>AURORA (ED)</i>	52
IV.A.10	<i>Brésil LINS</i>	53
IV.A.11	<i>Rade de Toulon (Eaux interstitielles)</i>	53
IV.B	PARAMETRES D'ACQUISITION DES MEEF	54
IV.C	APPLICATION DE PARAFAC AUX MEEF	55
IV.D	FORMAT DE SORTIE DU PROGRAMME PARAFAC	56
IV.E	APPLICATION PARAFAC : COMPOSANTS MISSION PAR MISSION	59
IV.E.1	<i>Eaux côtières – l'estuaire en Croatie 2008 – 2009</i>	59
IV.E.2	<i>Eaux côtières – Rade de Toulon</i>	60
IV.E.3	<i>Eaux de mer – DYCOMED</i>	61
IV.E.4	<i>Eaux de mer – MARSECO</i>	62
IV.E.5	<i>Eaux de sol – Brésil Sao Gabriel (eaux tropicales – Podzols)</i>	64
IV.E.6	<i>Eaux de sol – Brésil LINS campagnes 2007 à 2009</i>	65
IV.E.7	<i>Eaux douces – BasVar</i>	67
IV.E.8	<i>Eaux douces – Bosnie 2009</i>	69
IV.E.9	<i>Eaux douces – Brésil SGC (Arcus) 2009</i>	70
IV.E.10	<i>Eaux douces – Cameroun</i>	71
IV.E.11	<i>Eaux de grotte de systèmes karstiques</i>	71
IV.E.12	<i>Eaux douces – GIRAC</i>	73
IV.E.13	<i>Eaux douces – AURORA en Norvège</i>	74
IV.E.14	<i>Eaux extraites – Arcus Toulon et Tunisie</i>	74
IV.E.15	<i>Eaux extraites – Brésil LINS (2007)</i>	75
IV.E.16	<i>Eaux extraites - Brésil LINS (campagne 2009)</i>	75
IV.E.17	<i>Eaux interstitielles – Croatie 2010</i>	76
IV.E.18	<i>Eaux interstitielles – Rade de Toulon</i>	78
	<i>Résumé des fluorophores trouvés dans toutes les missions MEEF</i>	79
IV.F	APPLICATION DE PARAFAC AUX MISSIONS GROUPEES PAR MILIEUX	82
IV.F.1	<i>Milieu des eaux côtières</i>	82
IV.F.2	<i>Milieu des eaux de mer</i>	84
IV.F.3	<i>Milieu des eaux de sol</i>	86
IV.F.4	<i>Milieu des eaux douces</i>	87
IV.F.5	<i>Milieu des eaux extraites</i>	90

IV.F.6	<i>Milieu des eaux interstitielles</i>	91
	<i>Résumé des fluorophores trouvés dans les milieux d'échantillon</i>	93
IV.G	APPLICATION PARAFAC AUX MISSIONS EN FONCTION A LA SALINITE	94
IV.G.1	<i>Groupement des eaux non-salées</i>	94
IV.G.2	<i>Groupement des eaux salées</i>	95
	<i>Résumé des fluorophores trouvés dans les groupements d'échantillon</i>	96
IV.H	APPLICATION PARAFAC A L'ENSEMBLE DE LA BASE DE DONNEES	97
IV.I	DISCUSSION SUR L'IMPACT DE LA CATEGORISATION SUR LES COMPOSANTS PARAFAC	98
IV.J	PARAFAC ET VARIABILITES ENVIRONNEMENTALES	99
IV.J.1	<i>Méthodologie</i>	99
IV.J.2	<i>Résultats</i>	99
IV.K	DISCUSSION AVEC LES DONNEES DE DIFFERENTS REGROUPEMENTS	103
CHAPITRE V. PHENOMENES DE COMPLEXATION ET DU QUENCHING DE FLUORESCENCE.....		106
V.A	LA COMPLEXATION MON-M.....	106
V.B	PRINCIPES DE QUENCHING	108
V.B.1	<i>Complexation et équilibre chimique : cas simple</i>	109
V.B.2	<i>Cas d'un système complexe multi-éléments</i>	110
V.B.3	<i>PROSECE : optimisation des paramètres de complexation</i>	111
V.C	HISTORIQUE DU QUENCHING CONTINU.....	111
V.C.1	<i>Quenching en 1D (1 λ_{EX} et 1 λ_{EM} fixées)</i>	113
V.C.2	<i>Quenching en 2D (1 λ_{EX} ou 1 λ_{EM} fixée)</i>	113
V.C.3	<i>Quenching en 3D</i>	114
V.D	UTILISATION DE PARAFAC DANS LE QUENCHING EN 3D	114
CHAPITRE VI. PARAFAC – PROSECE : APPLICATION AUX MEEF DE MOND COMPLEXEE		115
VI.A	COUPLAGE PARAFAC – PROSECE.....	115
VI.B	CONCLUSION ET PERSPECTIVES DU QUENCHING DE FLUORESCENCE TRAITÉ PAR PARAFAC - PROSECE.....	126
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		127
REFERENCES		130
ANNEXE 1 – LISTE DES FIGURES		154
ANNEXE 2 – LISTE DES TABLEAUX.....		157
ANNEXE 3 – TABLEAU DES REFERENCES « PEAK –PICKING » ET PARAFAC		158
ANNEXE 4 – POSTERS		160
ANNEXE 5 – TOUS LES TRAITEMENTS PARAFAC.....		164

Introduction

La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir de notre nature, la curiosité.

- Ernest Renan

La matière organique naturelle (MON) est présente dans tous les environnements. Elle joue un rôle important dans la circulation des éléments chimiques en général et du carbone en particulier. Elle intervient, entre autres, dans le recyclage par les microorganismes de certains éléments comme l'azote, le soufre, et le phosphore. La MON sert également de nourritures aux microorganismes. Elle regroupe deux catégories de molécules : les biopolymères et les géopolymères. Les biopolymères peuvent être des acides aminés, des protéines, des lipides ou des sucres, par exemple. Les géopolymères résultent, quant à eux, de la dégradation ou de l'association de biopolymères.

La MON interagit également avec les cations et favorise, en partie, le transport des métaux lorsqu'ils sont associés à la MON (complexation). Les métaux ainsi complexés peuvent voir aussi leur toxicité modifiée par rapport à leurs formes inorganiques. Cette modification de la forme chimique de métaux est importante car elle permet l'assimilation du métal par les organismes vivants. La MON joue aussi un rôle de tampon dans le contrôle du pH dans certains environnements, ainsi que dans les processus d'oxydo-réduction de l'environnement.

L'étude de la MON se fait par le biais de différentes techniques. Citons entre autres, la pyrolyse-GC-MS, les techniques isotopiques, la spectroscopie infrarouge (IR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrofluorimétrie. La pyrolyse-GC-MS consiste à mesurer les composés de dégradation de la MON, les techniques isotopiques fournissent des informations sur les différents isotopes présents dans la MON, la spectroscopie IR et la RMN permettent d'identifier les fonctions moléculaires ou parfois des fragments de structure. La spectrofluorimétrie, qui est une des techniques utilisées dans le laboratoire PROTEE permet, quant à elle, d'analyser la MON en conservant sa concentration naturelle et de manière non destructive. Cette technique reste performante même si la concentration en matière organique fluorescente est faible, car la fluorimétrie permet la mesure de spectres d'émission même pour de très faibles quantités de MON.

Depuis 1963, la spectrofluorimétrie d'émission progresse puisque les premières mesures de fluorescence se limitent à l'intensité dépendant d'un couple de longueurs d'onde d'excitation et d'émission fixes (mesure 1D). Dans les années 70 et 80, la technique permet la mesure de spectres d'émission à longueur d'onde d'excitation fixe, ou bien la mesure de spectres d'excitation à longueur d'onde d'émission fixe, ou encore la mesure de spectres synchrones : on parle alors de spectres 2D. En 1988, on mesure pour la première fois une matrice d'excitation et d'émission (MEEF). Ces matrices sont également qualifiées de spectres 3D ou encore de signaux de luminescence totale.

A la fin des années 80 et au début des années 90, l'analyse des MEEF est très simple : elle consiste à repérer les maxima locaux de l'intensité de fluorescence (ou pics) en fonction des longueurs d'excitation et d'émission (« peak-picking »). Très rapidement, l'application de cette technique aux MEEF mesurées est à l'origine d'un nombre conséquent de pics inventoriés par les auteurs. Malgré la subjectivité du repérage des pics, on peut constater que certains entre eux sont toujours situés dans les mêmes domaines spectraux. Cependant, les pics les plus proches s'influencent mutuellement et cela induit généralement une erreur de pointé des pics (mauvaise position du pic et mauvaise estimation du maximum local).

Conscients des limites du « peak-picking », des auteurs ont défini un modèle mathématique trilineaire qui rend compte des variations de l'intensité de fluorescence en fonction des concentrations relatives de fluorophores et de leurs spectres d'excitation et d'émission. La résolution numérique basée sur ce modèle trilineaire permet de calculer, à partir de MEEF de plusieurs échantillons, les concentrations relatives et les spectres d'excitation et d'émission de fluorophores présents dans tous les échantillons. Cette méthode de résolution est couramment appelée « PARAllel

FACTor analysis » (PARAFAC). A l'aide de cette méthode, on peut séparer les différentes contributions spectrales associées aux fluorophores, cela signifie qu'il devient possible de repérer les pics de fluorescence (contributions spectrales) sans qu'ils soient influencés par d'autres pics : la position du maximum et la valeur de celui-ci sont alors déterminées avec une erreur minimale.

Le modèle trilineaire admet, cependant lui aussi une limite, quand l'absorbance des échantillons devient trop importante. En effet, le modèle mathématique trilineaire tient compte seulement de l'absorption linéaire de la lumière excitatrice. Cependant, lorsque la concentration en fluorophores augmente de façon conséquente, on ne peut plus négliger le phénomène d'absorption de la fluorescence induite : on parle alors d'effet d'écran interne. Pour appliquer la méthode PARAFAC aux MEEF mesurées, il est alors nécessaire de corriger celles-ci de l'effet d'écran interne.

Ce travail est constitué de deux études distinctes visant à caractériser la MON. La première étude concerne la variabilité des contributions spectrales calculées par PARAFAC à partir de MEEF des échantillons prélevés dans différents milieux : eaux côtières (EC), eaux de mer (EM), eaux de sol (ES), eaux douces (ED), eaux extraites (EE) et eaux interstitielles (EI). Ces prélèvements étaient effectués des projets auxquels a participé le laboratoire PROTEE. Certains de ces projets a débuté avant ce travail. Sur les 14 projets dans ce travail, les échantillons prélevés issus de 5 de ces projets sont caractérisés par spectroscopie de fluorescence alors que ces projets initiaux ne le prévoyaient pas. Pour atteindre l'objectif de connaître les variations de la MON liées à sa diversité environnementale, il est défini une méthode originale de représentation des domaines spectraux sur lesquels l'intensité de fluorescence des composants PARAFAC dépasse un seuil prédéfini : cette représentation est appelée « recouvrement des zones PARAFAC ». La seconde étude porte sur les propriétés complexantes de la MON d'un échantillon et plus précisément des fluorophores contenus dans cet échantillon. Pour obtenir ce résultat, on utilise une combinaison originale de quatre outils déjà connus : ajout logarithmique d'ions métalliques dans l'échantillon, la mesure de MEEF pour chaque ajout, l'application de PARAFAC à l'ensemble de MEEF mesurées et l'optimisation des valeurs de constantes de complexation et des capacités complexantes des fluorophores à partir des intensités relatives calculées par PARAFAC. Cette optimisation est effectuée par le programme d'optimisation et de spéciation chimique dans l'environnement (PROSECE) développé au sein du laboratoire PROTEE.

Le chapitre I définit la MON, son origine, ses propriétés et ses rôles dans l'environnement. Le chapitre II retrace l'évolution de la mesure de la fluorescence depuis les années 60. Le chapitre III décrit les traitements numériques appliqués aux signaux spectroscopiques de la MON, le principe de la méthode PARAFAC et la correction de l'effet d'écran interne. Le chapitre IV aborde les questions qui concernent la variabilité spectrale des composants PARAFAC à partir d'un millier d'échantillons d'eaux naturelles. Enfin, les chapitres V et VI porte sur les phénomènes de complexation et sur le quenching de fluorescence et sur un résultat des propriétés complexantes des composants PARAFAC dans le cas particulier d'un échantillon de MON complexant des ions de cuivre.

Chapitre I.

Matière organique naturelle

Le bon sens surtout vaut mieux que la science.

- Lombard de Langres

La matière organique naturelle (MON) constitue l'objet de cette étude en raison de son importance dans l'environnement. La MON est composée de molécules organiques dégradables ou non, représentant des groupes de familles aux propriétés diverses et présentes partout dans la géosphère. Elle joue un rôle de connexion entre les organismes vivants et les différents réservoirs de l'environnement. La MON, elle-même, provient principalement de l'activité et la dégradation de la biomasse. La MON participe en particulier aux échanges des espèces chimiques entre les végétaux, les animaux, les micro-organismes et les milieux : elle est donc le siège de nombreuses réactions d'échanges et de transformations dont les cinétiques s'échelonnent de la seconde à la dizaine d'années voire quelques millénaires. Ainsi, le réservoir de la MON joue un rôle central dans l'équilibre qui existe entre les êtres vivants et l'environnement.

En fonction de sa concentration, de ses caractères et de l'environnement, la MON est un élément régulateur ou un élément perturbateur : par exemple, la MON aide au développement de certains végétaux, en jouant le rôle de nutriments ; cependant, si la concentration de la MON dépasse la capacité de stockage d'un sol, une partie de la MON va diffuser dans l'eau entraînant avec elle nutriments et micro-polluants. Ces éléments transférés dans un milieu aquatique peuvent alors déséquilibrer la chaîne alimentaire incluant les micro-organismes, les végétaux, les animaux et les humains. Autre exemple, la MON peut aussi se complexer avec de nombreux métaux (Elkins & Nelson, 2001) qui sont alors sous forme organique. Ce changement de forme chimique entraîne un comportement différent du métal dans l'environnement. Dans le cas de certains métaux comme, par exemple, le cuivre, le plomb ou le chrome, la fixation par la MON limite leur toxicité vis-à-vis des organismes vivants. A l'inverse, la complexation du mercure par la MON est problématique, car le mercure organique est plus dangereux pour la biosphère que le mercure inorganique (Stober et al. 1995 ; Stordal et al., 1996 a & b ; Lu & Jaffé, 2001). C'est pourquoi il est nécessaire de caractériser correctement la MON dans sa composition, sa structure et ses propriétés.

Ce chapitre présente tout d'abord la composition générale de la MON, son origine possible, son rôle dans les cycles élémentaires, ses propriétés ainsi que les méthodes d'analyse appliquées pour la caractériser.

1.A Composition générale

La définition de la MON dépend de plusieurs domaines scientifiques : la chimie, la physique et la biologie. En effet, la MON est le résultat de la dégradation et de la condensation des molécules en provenance de la biomasse principalement (Buffle, 1988 ; Hedges, 1988 ; Hatcher & Spiker, 1988 ; De Souza Sierra, 1992). La MON est généralement un mélange des produits de la synthèse, de la dégradation et des rejets des êtres vivants ou parfois même de fragments biologiques sans modification. Ces composés peuvent avoir une masse molaire comprise entre celle d'une petite molécule (< 400 Da) et celle de polymères suffisamment grands (jusqu'à 3000 Da) pouvant alors former des colloïdes ou des particules.

Souvent, la MON est définie en deux familles principales : les biopolymères et les géopolymères (ou les substances humiques).

Dans la **Figure 1**, les relations sont données entre les composants de la MON (biopolymères et géopolymères), entre les composants des géopolymères (acides fulviques, acides humiques et humines), entre la MON et l'environnement jusqu'à sa transformation finale en pétrole.

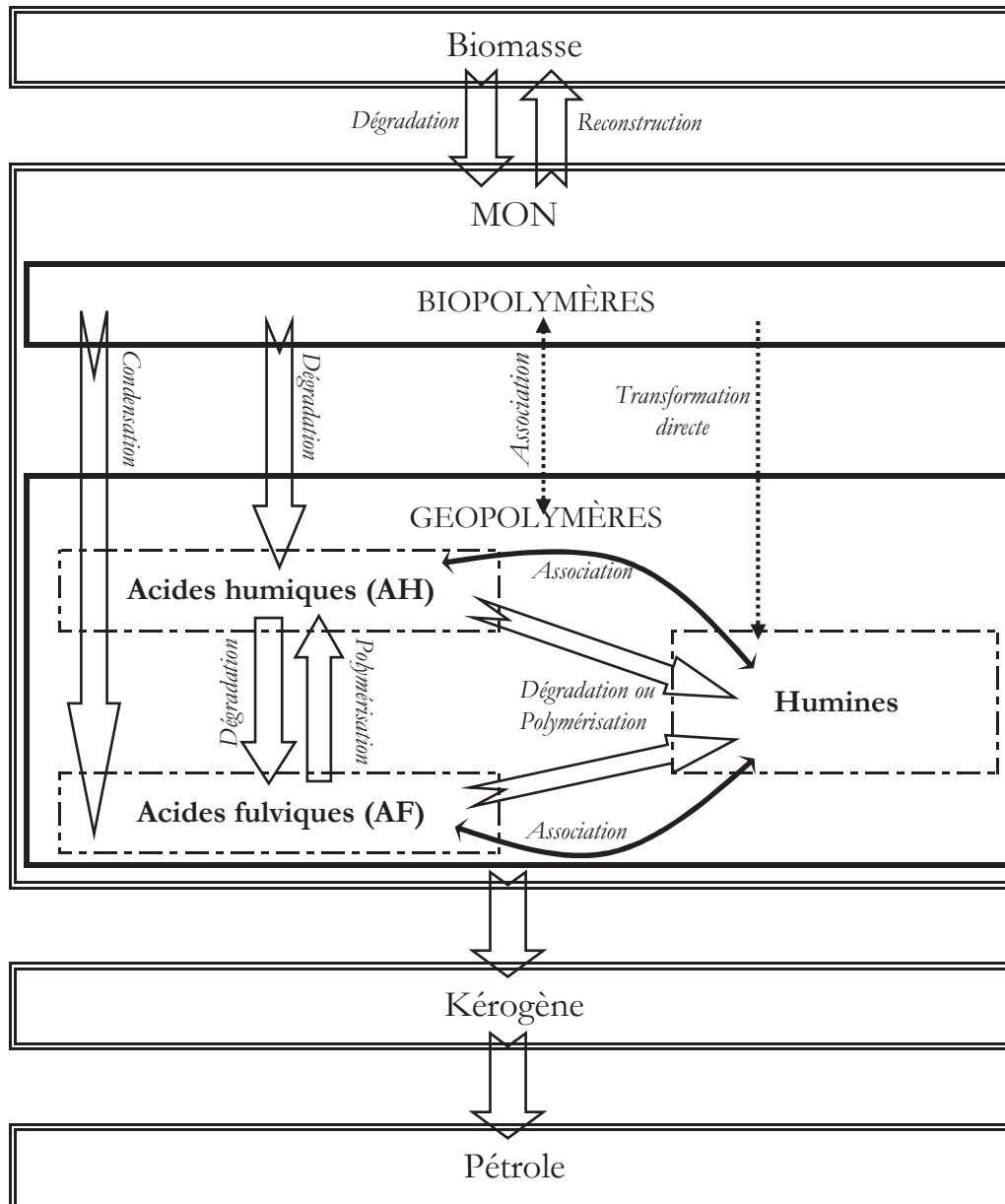


Figure 1: Schéma relationnel des composants de la MON

Il y a les réactions de dégradation et de reconstruction moléculaires entre les biomasses et la matière organique biopolymères ou géopolymères. Puis dans la MON, les biopolymères et les géopolymères peuvent se transformer par des dégradations, des condensations, des précipitations et des associations. Dans les géopolymères, trois grandes catégories sont montrées ainsi que les relations et les transformations qui les relient. Les acides humiques peuvent se dégrader en particules plus petites comme les acides fulviques, les acides fulviques peuvent aussi polymériser en particules plus grosses, les acides humiques ; les deux types d'acide peuvent se transformer en humine par dégradation ou polymérisation. Ils peuvent aussi s'associer aux humines dans l'environnement. La MON est une des sources possibles d'origine de la formation des pétroles.

I.A.1 Biopolymères

Les biopolymères sont des molécules caractérisables (acides aminés, protéines, lipides, sucres, polysaccharides, etc. (Croué et al., 2003) dans la MON. Ils appartiennent à la famille des biomolécules qui peuvent participer au processus métabolique des organismes vivants. Ce sont des macromolécules naturelles qui proviennent souvent des dégradations simples des organismes vivants par des mécanismes soit physiques (pression, séchage, changement thermique), soit biologiques (bactérienne, absorption végétale, chaîne alimentaire), soit chimiques (hydrolyse, photolyse).

Les biopolymères sont beaucoup moins persistants que les géopolymères à cause de leur réactivité biologique. Ils représentent une étape du processus de dégradation des organismes vivants vers les substances humiques. Selon l'estimation de Hansell & Carlson (2002), les biopolymères ne constituent que 15 à 20% du carbone organique naturel. Une partie des biopolymères se transforme en géopolymères, encore appelés substances humiques, ou en humines (Hatcher & Spiker, 1988). L'autre partie subissant une dégradation ultime retourne à l'état minéral de nutriment. Les biopolymères peuvent également s'associer aux géopolymères (acides humiques, acides fulviques et humines) pour y être finalement incorporés partiellement ou totalement (Hedges, 1988).

I.A.2 Géopolymères (Substances humiques)

Selon l'hypothèse la plus couramment admise, les biopolymères sont transformés en géopolymères (ou substances humiques, SH) suivant un processus de dégradation ou d'association (Buffle, 1988 ; Hedges, 1988). Les SH sont des molécules plus résistantes à la dégradation. Elles peuvent être âgées de dizaines, de centaines voire de quelques milliers d'années (William & Druffel, 1987). Certaines études montrent les caractères aromatique et aliphatique des SH. Ces caractères sont principalement représentés par les groupes phénoliques et les groupes carboxyliques. Les propriétés optiques des SH sont semble-t-il dues principalement à la fonction semi-quinone (Florence & Batley, 1980).

Les SH peuvent être classées soit en acide humique (AH), soit en acide fulvique (AF) ou soit en humines (Seitz, 1981). Ces trois catégories constituent un système supramoléculaire extrêmement hétérogène. Cependant, il faut noter qu'il n'existe aucune division formelle entre les trois groupes. Les classifications sont basées sur la solubilité dans l'eau : les humines insolubles, les acides humiques solubles dans une base et les acides fulviques solubles à tous les pH (Seitz, 1981 ; Buffle, 1988). Même si l'ordre de formation dans la nature n'est pas toujours clairement défini en raison de la simplicité des protocoles employés, une théorie commune propose que les AH sont des molécules venant directement de la dégradation des biopolymères. Les AF sont donc des produits plus réactifs et donc moins résistants vis-à-vis des réactions chimiques (dégradation ou association moléculaire) par des micro-organismes à partir des AH (Hedges, 1988). Ces mêmes réactions transforment également les AH en humines. En revanche, la polymérisation transforme les petites molécules des AF en AH qui représentent souvent une part importante de la MON dans l'environnement (Buffle, 1988). De plus, les biopolymères et les substances humiques peuvent à tout moment être dégradés en partie ou totalement par des réactions chimiques ou biochimiques (Figure 1).

I.A.2.a Humines

Les humines sont des composés d'origine essentiellement terrestre. Ces composés proviennent de la dégradation des composés vivants et bien souvent de la lignine. Ils sont stables dans le sol,

insolubles dans l'eau quelque soit le pH et résistants à la dégradation (Hansell & Carlso, 2002). Ces composés ne jouent pas un rôle nutritionnel pour les organismes vivants, mais plutôt un rôle de cohésion pour le sol (Hedges, 1988). Leur poids moléculaire est généralement compris entre 1100 et 2400 Da.

I.A.2.b Acides humiques (AH)

Les AH sont un des composants majeurs des SH. Ces composés sont solubles à pH basique ($\text{pH} \geq 12$) et insolubles à pH acide ($\text{pH} \leq 2$). Ils constituent aussi une des fractions les plus importantes des SH dans l'humus et dans les eaux. Par rapport aux acides fulviques, ces molécules contiennent moins d'oxygène (Seitz, 1981). Les AH sont moins complexants, plus âgés et plus stables dans les sols (Buffle, 1988). Bien que majoritaire, la proportion des AH est très variable d'un milieu à l'autre. Comparés aux acides fulviques (AF), les AH ont un poids moléculaire plus élevé, généralement compris entre 750 et 1230 Da.

I.A.2.c Acides fulviques (AF)

Les AF sont des molécules solubles dans l'eau à n'importe quel pH. Un acide fulvique typique contient 50% de carbone, environ 40% d'oxygène, 3-4% d'hydrogène et environ 1% d'azote (Schnitzer, 1974). Mais le rapport C/N peut varier d'un environnement à un autre (Wolfe et al., 2002). Les acides fulviques représentent moins de 35% du carbone organique total (COT) de l'environnement selon Buffle (1988). Le poids moléculaire des AF est plus faible que celui des AH (Seitz, 1981), généralement inférieur à 450 Da.

I.B Origines

La matière organique naturelle peut être terrestre ou marine, elle est présente soit dans une matrice solide (sol, sédiment, etc.), soit dans une matrice liquide (lac, rivière, mer, océan, etc.). La MON possède des propriétés chimiques (composition élémentaire, fonctions chimiques, rapport isotopique), physiques (absorbance, fluorescence, taille, ...) et biologiques (proportion de biopolymères, ...) qui semblent indépendantes du milieu d'origine. Cependant, entre ces molécules, il existe un certain nombre de différences mesurables concernant l'acidité, les propriétés de complexation, le rapport C/N, les propriétés chromophoriques, etc. (Florence & Batley, 1980). Ces dernières semblent liées à l'environnement géochimique et aux processus d'humification subis (Hansell & Carlso, 2002) ce qui permet de trouver des indicateurs d'origine et d'état de l'environnement.

I.B.1 Terrestres (continents)

On distingue deux systèmes essentiels d'origine soit pédogénique soit aquatique. Buffle (1988) a classifié la MON terrestre par ses fractions chimiques et physiques, puis il l'a liée à la classification biologique (**Figure 2**) en trois groupes majeurs : hydrocarbonates, protéines et lipides.

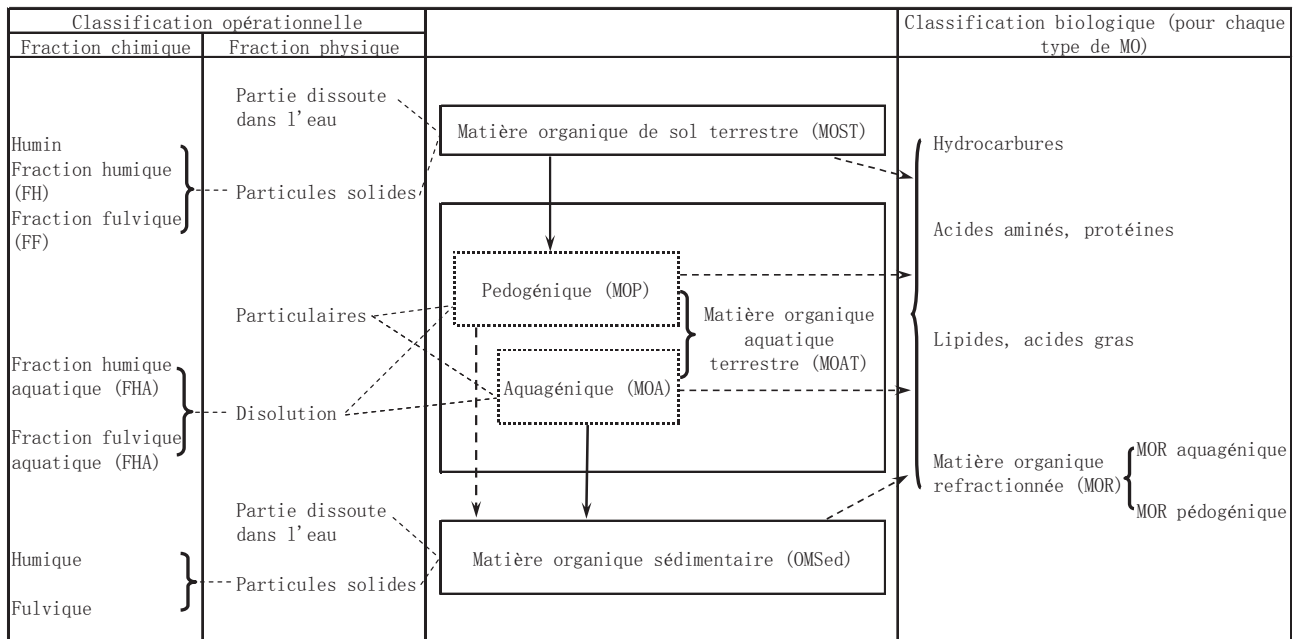


Figure 2: Schéma relationnel des composants de la MON terrestre selon Buffle (1988)

I.B.1.a MON pédogénique

Existant essentiellement dans les humus de la couverture pédogénique, la MON pédogénique est le résultat de la décomposition des molécules organiques par les micro-organismes du sol. Différente de la MON aquatique, la MON pédogénique est formée et développée dans un milieu compact et dense. Les informations sur la MON pédogénique ont une très grande importance dans les études biologiques terrestres. Sa qualité et sa quantité sont essentielles pour l'agriculture, l'élevage, la sylviculture, etc (Provençano, 2004 et Baker, 2005, 2007).

I.B.1.b MON aquagénique

Transportée par l'eau, une partie de la MON produite dans les sols entre dans le système aquatique. Dans ce nouveau milieu, des phytoplanctons et des bactéries aquatiques utilisent et/ou transforment ces composants. Les transformations sont soit une dégradation supplémentaire de la MON allochtone*, soit une polycondensation de cette MON avec la MON autochtone#. Ces nouveaux composés formés dans un milieu aquatique souvent à faible force ionique sont considérés comme de la matière organique aquagénique - la matière organique aquatique continentale. Il faut remarquer que cette matière organique a une plus grande similarité avec les MON marines qu'avec les MON pédogéniques, car les conditions biologiques et chimiques du milieu aquatique continental sont proches de celles du milieu marin (Hansell & Carlson, 2002 ; Yamashita & Tanoue, 2003b ; Zhang et al., 2006).

I.B.2 Marines

La mer et les océans sont la destination de tous les courants d'eau terrestres. Le milieu est également un mélange de matières organiques autochtones et des matières organiques allochtones. Les transformations subies par la MON dans les océans diffèrent de celles qui se produisent sur le continent (notamment temps de résidence, photodégradation, force ionique, ...). Elles mènent à des différences par rapport aux matières organiques continentales au niveau de la composition de la

* et # : En géologie, allochtone qualifie des terrains qui ont été charriés et qui en recouvrent d'autres pouvant être plus récents, dits autochtones.

matière organique, des propriétés spectroscopiques (Coble, 1990, 1993, 1996), des propriétés complexantes (Saar & Weber, 1980) entre autres.

I.B.3 Zones de transition

Dans les zones de transition, comme les côtes, les estuaires et les sédiments, les conditions peuvent être très différentes. On observe alors une forte variabilité de la composition et des propriétés de la MON au cours du temps dans une même zone de transition, car ces zones correspondent à des mélanges de phases soit entre des eaux douces et des eaux salées (par exemple, les estuaires), soit de la phase liquide et de la phase solide (par exemple, les côtes et les sédiments) (Buffle, 1988). La MO présente dans les zones de transition n'est pas simplement un mélange des matières organiques terrestres et marines. Au contraire, les zones de transition doivent être considérées comme un milieu spécifique. De plus, ces zones sont souvent l'objet d'une influence anthropique qui apporte des propriétés particulières (Chen, 1999 ; Parlanti, 2000).

I.C Rôles dans les cycles des éléments chimiques

La MON est le résultat final des dégradations et des transformations à partir des organismes vivants ou de leurs fragments biotiques. Elle représente une partie du réservoir de l'élément carbone et elle est aussi une source indispensable aux activités biologiques.

I.C.1 Rôle dans le cycle du carbone

Le stock de carbone joue un rôle important dans le système environnemental global. Le carbone peut être utilisé directement par des organismes sous la forme de matière organique (Buffle, 1988). La MON joue également un rôle de transport du carbone entre les différents réservoirs en particulier via la respiration et le transport par voie aqueuse. En plus de son rôle de transport du carbone, la MON est aussi une source de CO₂ pour des bactéries et des photolyses (Figure 3). Le compartiment de la matière organique naturelle représente une très petite partie du carbone présent sur Terre. Son rôle est pourtant primordial dans le cycle du carbone car il intervient dans les processus de transfert du carbone organique vers le carbone minéral (dioxyde de carbone, carbonate et combustibles fossiles).

I.C.2 Rôle dans le transport des métaux - complexation

La MON est aussi capable de se complexer avec des cations dont les métaux. Elle s'associe avec les ions multivalents (Mg²⁺, Ca²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, etc.). La complexation entre la MON et les métaux facilite la mobilisation de ces derniers (Schmitt et al., 2003). Elle favorise la mise en solution des éléments dans l'environnement en changeant leur forme chimique (Batley & Florence, 1976). A ce titre, elle joue un rôle important dans le cycle de nombreux contaminants (Hering et Morel, 1989 ; Cornejo et Hermosín, 1996).

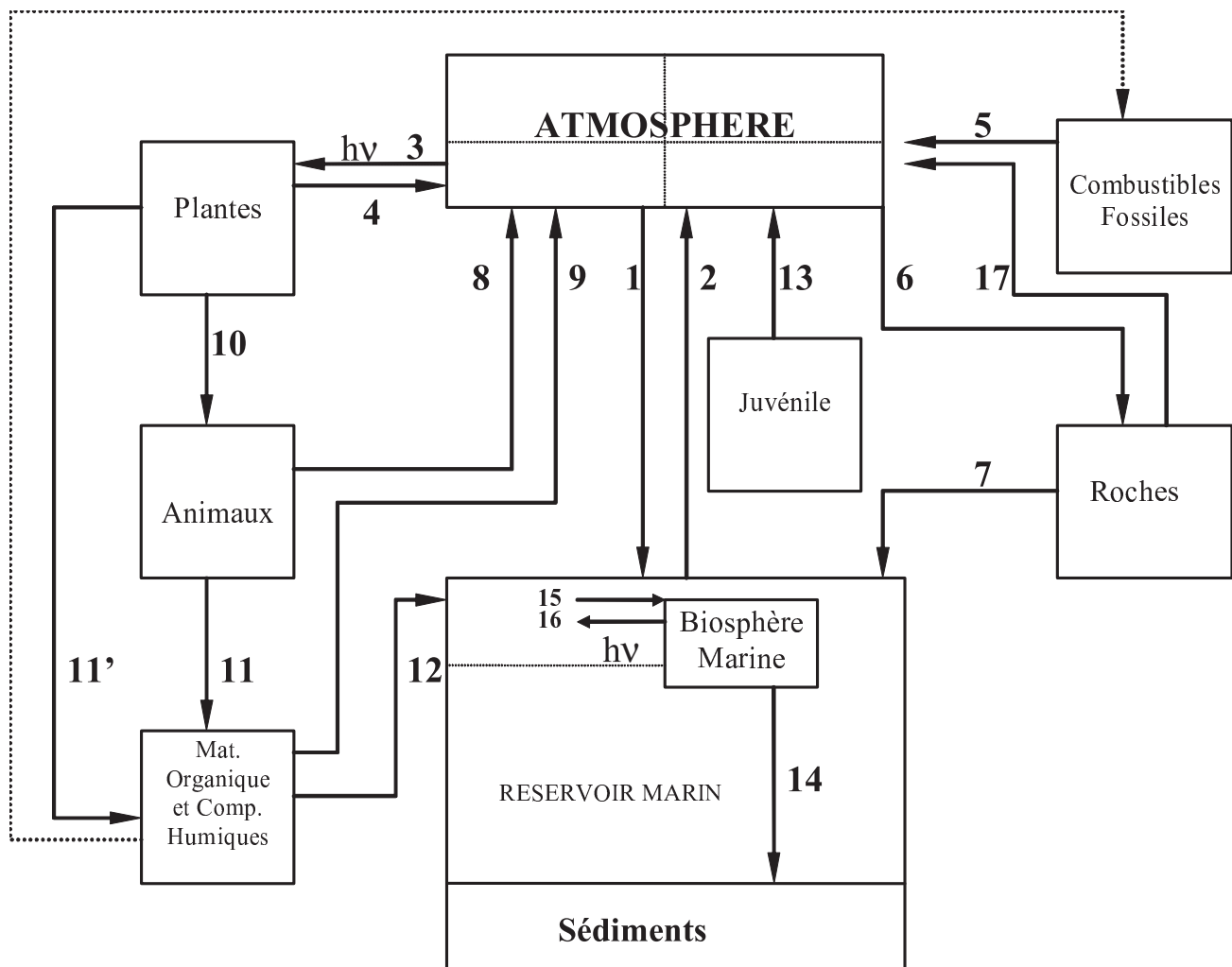


Figure 3: Schéma du cycle du carbone :

Transferts possibles entre les différents réservoirs de carbone (De Souza-Sierra et al., 1994). Seuls les principaux réservoirs et les possibilités de transfert de C sont montrés. Les surfaces relatives des réservoirs montrés dans le diagramme n'ont pas de signification. Transferts de CO_2 : 1 et 2, échange entre l'atmosphère et l'océan ; 3 et 4, photosynthèse et respiration ; 5 feux de combustibles ; 6 et 7, désagrégation des roches ; 8, respiration des animaux ; 9, oxydation des composés humiques et des débris organiques ; 10, consommation des plantes par les animaux ; 11 et 11', formation des composés humiques ; 12, transfert des composés humiques aux océans ; 13, CO_2 juvénile ; 14, décomposition de la matière organique et précipitation de $CaCO_3$; 15 et 16, photosynthèse et respiration dans la biosphère marine ; 17, génération de CO_2 par calcination des pierres pour l'obtention du CaO , etc. (Sigg, 1990)

I.D Caractérisation de la MON

Afin de mieux comprendre le rôle précis de la MON dans l'environnement, il est nécessaire de la caractériser du point de vue de sa composition, de sa structure et de ses propriétés (Buffle, 1988 ; Weber, 1988).

En ce qui concerne sa composition, la MON contient une proportion importante de carbone environ entre 8,5% et 11,7% pour des sédiments et jusqu'à environ 50% pour du sol d'azote de 0,25 à 10% selon l'origine de la MON (Senesi, 1990 ; Pernet-Coudrier, 2008, Xu et Jaffé, 2009) (Tableau 1). L'oxygène est également un élément important dans la composition de la MON puisqu'il participe aux fonctions chimiques présentes sur la MON, c'est-à-dire les fonctions carboxyliques ($-COOH$),

phénoliques (ϕ -OH) ou hydroxyles (-OH). D'autres fonctions minoritaires sont aussi présentes sur les squelettes carbonés de la MON comme les fonctions quinones, thiols, phtalates, ... Ces fonctions confèrent à la MON diverses propriétés comme la complexation vis-à-vis des cations, les propriétés d'absorbance et luminescence, la formation de structure tertiaire, les propriétés surfactantes, ... Dans ce travail, nous nous focalisons principalement sur les propriétés optiques et complexantes de la MON. Depuis la découverte des caractéristiques optiques de la MON (Saar & Weber, 1980 ; Ryan & Weber, 1982 ; Cabaniss & Shuman, 1986, 1988a), la spectroscopie de fluorescence permet d'analyser l'émission lumineuse de la MON particulièrement pour les courtes longueurs d'onde d'excitation de 200 nm à 500 nm.

I.D.1 Description générale des propriétés de la MON

***I.D.1.a* Composition élémentaire de la MON**

La MON contient principalement des éléments chimiques comme le carbone, l'azote, le phosphore, le soufre, l'hydrogène, l'oxygène et des éléments métalliques. La composition élémentaire est le résultat des multiples réactions qu'a subi la MON au cours de son histoire. Elle donne donc une information sur l'état de la MON. Les fonctions chimiques étant plus réactives que le squelette, elles se minéralisent plus rapidement, ce qui a pour conséquence la perte des atomes autres que le carbone ou l'hydrogène. Ainsi, il est souvent observé les rapports des compositions C/N, C/H ou C/O, rapports qui augmentent avec l'âge ou la maturation de la MON. Ces rapports peuvent être comparés entre deux sites pour une MON d'âge identique ou pour un même site entre deux MON d'âges ou d'environnements différents. Le rapport carbone-azote (C/N) est donc utilisé pour comparer la MON d'échantillons différents pour mieux comprendre l'activité biologique de la MON (Buffle, 1988 ; Wolfe et al., 2002 ; Zhang et al., 2006 ; Maie et al., 2007 ; Tian et al., 2010). Dans le tableau ci-après (Tableau 1), les proportions des principaux éléments dans des échantillons de MON référencées (International Humic Substance Society) sont présentées.

Il est possible d'observer plus finement la composition élémentaire de la MON en s'intéressant à l'abondance isotopique d'éléments. L'isotope 13 ou 14 du carbone par rapport à une référence ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$) ou celle de l'azote 15 par rapport 14 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) sont beaucoup étudiées (Deines, 1980 ; Macko et Estep, 1984 ; Buffle, 1988 ; Gjssing et al., 1998 ; Schell et al., 1998 ; Xu et Jaffé, 2009). L'écart de la concentration en isotope par rapport une référence permet également d'obtenir des informations sur l'origine ou l'environnement de la MON. Ces valeurs peuvent varier de -28,2‰ à -22,6‰ pour $\delta^{13}\text{C}$ (Tableau 1 et Xu & Jaffé, 2009), 0,5‰ à 6‰ pour $\delta^{15}\text{N}$ (Pernet-Coudrier, 2008).

Le phosphore est un élément nutritionnel important (Ricklefs & Miller, 2005-Chapitre 13). La proportion de phosphore contenue dans la MON peut varier de <0,01 à 0,55% . Le phosphore organique est aussi mesuré après oxydation en milieu liquide (Ohno et al., 2005 ; Ohno et Amirbahman, 2010 ; Tian et al., 2010). Cependant, les informations apportées par cet élément ne sont pas souvent discriminantes.

Bien que les composés organo-soufrés soient très importants dans la chimie du vivant (un dixième des acides aminés sont des composés organo-soufrés), la proportion de soufre dans la MON est très faible (0,29 à 3,03%). Le soufre organique peut être mesuré par spectroscopie infrarouge, Raman et fluorescence (Kister & Dou, 1986).

Sample	Cat. No.	H ₂ O	Ash	C	H	O	N	S	P	δ ¹³ C	δ ¹⁵ N
Standard HA											
Suwannee River I *	1S101H	10.0	3.10	52.55	4.40	42.53	1.19	0.58	<0.01	-27.7	-1.41
Suwannee River II	2S101H	20.4	1.04	52.63	4.28	42.04	1.17	0.54	0.013		
Elliott Soil	1S102H	8.2	0.88	58.13	3.68	34.08	4.14	0.44	0.24	-22.6	5.34
Pahokee Peat	1S103H	11.1	1.12	56.37	3.82	37.34	3.69	0.71	0.03	-26.0	1.29
Leonardite	1S104H	7.2	2.58	63.81	3.70	31.27	1.23	0.76	<0.01	-23.8	2.13
Standard FA											
Suwannee River I	1S101F	8.8	0.46	52.44	4.31	42.20	0.72	0.44	<0.01	-27.6	-1.85
Suwannee River II	2S101F	16.9	0.58	52.34	4.36	42.98	0.67	0.46	0.004	nd	nd
Elliott Soil I *	1S102F	8.8	0.86	50.57	3.77	43.70	2.72	0.56	0.03	-25.4	3.89
Elliott Soil II	2S102F	11.2	1.00	50.12	4.28	42.61	3.75	0.89	0.12	-25.6	5.40
Elliott Soil III	3S102F	nd	2.64	49.79	4.27	44.34	3.25	1.23	0.11	nd	nd
Pahokee Peat I *	1S103F	11.7	4.61	50.45	3.52	45.47	2.56	0.73	0.02	-25.8	1.42
Pahokee Peat II	2S103F	9.3	0.90	51.31	3.53	43.32	2.34	0.76	<0.01	nd	nd
Reference HA											
Suwannee River *	1R101H	9.8	3.46	52.89	4.14	43.40	1.17	0.58	<0.01	-28.2	-2.42
Pahokee Peat	1R103H	10.4	1.72	56.84	3.60	36.62	3.74	0.70	0.03	-26.3	1.43
Nordic Lake	1R105H	9.1	0.31	53.33	3.97	43.09	1.16	0.58	0.01	-27.8	-1.55
Summit Hill Soil	1R106H	8.1	1.41	54.00	4.84	37.90	5.13	0.64	0.40	-26.3	2.99
Waskish Peat	1R107H	6.93	1.60	54.72	4.04	38.54	1.47	0.36	0.31	nd	nd
Reference FA											
Suwannee River	1R101F	8.9	0.98	53.04	4.36	43.91	0.75	0.46	<0.01	-27.9	-2.76
Pahokee Peat *	1R103F	11.8	1.58	52.12	3.23	43.93	2.43	0.53	0.01	-26.1	0.98
Nordic Lake	1R105F	9.2	0.45	52.31	3.98	45.12	0.68	0.46	<0.01	-27.8	-3.19
Waskish Peat	1R107F	8.29	0.16	53.63	4.24	41.81	1.07	0.29	0.12	nd	nd
Pony Lake	1R109F	4.32	1.25	52.47	5.39	31.38	6.51	3.03	0.55	nd	nd
Aquatic NOM											
Suwannee River	1R101N	8.15	7.0	52.47	4.19	42.69	1.10	0.65	0.02	nd	nd
Nordic Lake	1R108N	nd	41.4	53.17	5.67	nd	1.10	nd	nd	nd	nd
Bulk Materials											
Elliott Soil	1BS102M	1.52	nd	2.9	nd	nd	0.25	nd	nd	nd	nd
Pahokee Peat	1BS103P	7.1	15	45.70	4.74	nd	3.13	nd	nd	nd	nd
Pahokee Peat II	2BS103P	6.2	12.7	46.90	3.90	30.3	3.42	0.58	nd	-26.6	0.37
Leonardite	1BS104L	10.9	13	49.2	4.52	nd	0.9	nd	nd	nd	nd

Tableau 1: Compositions élémentaires de la MON extraite par l'association IHSS
(<http://www.ihss.gatech.edu/elements.html>)

Source: analyses élémentaires du laboratoire Huffman (Huffman Laboratory), Wheat Ridge, CO, USA; analyses isotopiques du laboratoire de la biochimie du sol (Soil Biochemistry Laboratory), Dept. of Soil, Water, and Climate, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA.

La valeur d'**H₂O** du pourcentage de masse d'eau dans l'échantillon équilibré dans l'air (une fonction d'humidité relative).

La valeur d'**Ash** est du pourcentage de masse des résidus inorganiques dans l'échantillon sec.

Les valeurs de **C**, **H**, **O**, **N**, **S**, et **P** sont des pourcentages de masse des compositions élémentaires dans l'échantillon sec et sans résidus inorganiques.

Les valeurs **δ¹³C** et **δ¹⁵N** sont des abondances par mille (‰) relatives en fonction de leur isotope stable.

* signifie que l'échantillon n'est plus valable, et **nd** signifie que pas de valeur déterminée.

Les deux références des acides fulviques aquatiques, **1S101F** et **2S101F**, sont prélevées à partir d'un même site dans la rivière Suwannee, Georgia, U.S.A. in 1982-83 and 2003, respectivement.

Même si les méthodes de mesure précédentes permettent de connaître les principaux éléments qui constituent la MON, la composition élémentaire n'est pas suffisante pour comprendre toute la complexité moléculaire de la MON. Des identifications moléculaires sont donc nécessaires.

1.D.1.b Fonctions et structures de la MON

La MON est le résultat d'un mélange de plusieurs molécules organiques et inorganiques. Elle contient des composés organiques de tailles différentes et de structures variées. Il existe des techniques pour identifier des composés organiques par leur masse et leurs structures. Ces techniques sont performantes avec des échantillons purs, mais elles sont difficilement appliquées dans les analyses de la MON à cause de la variabilité et de la complexité de la composition de la MON. Toutefois, on peut tirer quelques informations importantes de l'analyse directe.

- Fonctions identifiées par Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les signaux mesurés par résonance magnétique nucléaire (RMN) montrent que la matière organique contient un grand nombre de fonctions allant de la chaîne aliphatique jusqu'aux fonctions les plus déblindées (aldéhyde, acide, phénol). Suivant le développement des techniques de mesures, les environnements chimiques autour de ^1H , ^{13}C et ^{15}N peuvent être identifiés, classés et quantifiés en RMN 1D (liaison directe), RMN 2D (liaison indirecte ou parallèle dans l'espace). Les fonctions alkyles (C-H), esters (COO), éthers (C-O), amine ou nitrile (C-N), aromatiques, carboxyles (C=O), carbohydrate (CHO) et acétylènes (C≡C) entre autres ont été identifiées (Thomsen et al., 2002 ; Lu et al., 2003 ; Jagadamma et al., 2010).

Dans la pratique, cette technique nécessite la plupart du temps un protocole incluant une procédure de dissolution, de séparation, de concentration et de purification pour les échantillons liquides (Hatcher et al., 1981 ; Dudley et Fyfe, 1982 ; Poirier et al., 2000 ; Gonzalez-Vila et al., 2001 ; Hatcher et al., 2001 ; Peuravuori et al., 2003 ; Cook, 2004 ; McDonald et al., 2004). Cependant, la MON, de part sa dispersion en différentes fonctions, ne permet pas une analyse précise de sa structure. Par spectroscopie RMN, seule une proportion des grandes familles de fonctions est accessible.

- Fonctions acido-basiques

La titration acido-basique permet d'étudier la densité en sites acido-basiques (Christensen et al., 1998 ; Masini et al., 1998 ; Milne et al., 2001 ; Lu et Allen, 2001, 2002 ; Impellitteri et al., 2002 ; Ritchie et Perdue, 2003). Selon les propriétés acido-basiques, les substances humiques sont séparées en deux types : AF et AH (Smith et Kramer, 1998, 1999, De Souza Sierra et al., 1994, 1997, 2001 ; Milne et al., 2001 ; Ritchie et Perdue, 2003). Les fonctions acides, comme les groupes carboxyliques et les groupes phénoliques, sont identifiées et quantifiées. Dans les analyses de De Souza Sierra (2001), 75% des sites carboxyliques liés aux AH et 40% liés aux AF avec les gammes de la constante d'acidité ($\text{p}K_a$) de 5,51 à 5,99 pour les sites carboxyliques et de 9,09 à 9,85 pour les sites phénoliques dans les deux familles de la MON (AH et AF) ont été trouvés. Smith et Kramer (1999) a par contre trouvé la constante d'acidité ($\text{p}K_a$) de 3 à 5 correspondant aux groupes carboxyliques et celle de 9 à 11 concernant des phénoliques et celles intermédiaires (entre 5 et 9) pouvant correspondre aux fonctionnements des énols, des alcools, des β -dicarbonyl ou des substituants inorganiques.

Ces mesures permettent de modéliser et de caractériser les interactions entre la MON et le proton, mais il est nécessaire de faire des mesures complémentaires pour modéliser les propriétés générales de complexation de la MON.

- Polydispersion moléculaire importante

La pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (pyrolyse-GC-MS) permet la caractérisation des macromolécules organiques en caractérisant les fragments organiques issus de la pyrolyse (Dignac, 1998). Les résultats ne permettent pas seulement une interprétation qualitative : par exemple, 322 composés ont été identifiés par Saiz-Jimenez & De leeuw en 1986. Il est possible aussi d'obtenir une estimation de la proportion en sucres, en protéines, en sucres-aminés et en composés aromatiques polyhydroxylés dans un échantillon grâce à un calcul semi-quantitatif (Bruchet et al., 1991 ; Pernet-Coudrier, 2008). Cependant, cette méthode n'est capable ni de donner la structure exacte de la MON ni d'identifier les origines des molécules de la MON, même si elle est appliquée dans des comparaisons entre différents échantillons (Pernet-Coudrier, 2008).

- Groupements fonctionnels identifiés par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est répandue dans la caractérisation de la MON (Davis et al., 1999 ; Croué et al., 2000 ; Rinnan et Rinnan, 2007). Cette technique permet notamment de mettre en évidence de nombreux groupements fonctionnels tels que O-H, N-H, C-H, COOH, COOR, C=O aromatique, C-O, N-C=O, SOOH (Davis et al. 1999 ; Skoog et al., 2003). Cependant, comme toutes les techniques précédentes, l'IRTF apporte une information globale quantitative sur les groupes de fonctions présents dans la MON, mais elle ne permet pas une caractérisation structurale fine à cause de la variabilité des environnements fonctionnels.

Ensuite, si les techniques utilisées permettent de déterminer la présence de fonctions chimiques dans la MON, elles ne permettent pas de relier ses fonctions entre elles dans une structure moléculaire de la MON. En effet, la MON est constituée de nombreuses macro-molécules, il apparaît impossible de proposer une structure type de la MON. Pour cette raison, on étudie généralement les variations quantitatives des groupements fonctionnels par rapport à l'environnement ou à l'historique de l'échantillon.

1.D.1.c Relations MON-métaux

Comme cela a été dit précédemment (partie I.C.2), la MON joue un rôle dans le transport des métaux grâce à ses propriétés de complexation. Les métaux sont très répandus dans l'environnement sous forme minéralisée mais aussi dans les environnements liquides en raison de leur solubilité. Ces métaux peuvent faire partie des éléments structurels de la MON (Fe et Al), sous forme dissoute, sous forme ionique (libre ou minérale) ou sous forme complexée organique dans l'environnement.

L'interaction MON-métaux peut influencer le devenir des métaux dans l'environnement. La MON diminue la toxicité de certains métaux tels que, par exemple, le cuivre, le plomb et le nickel (Smith & Kramer, 2000 ; Provenzano et al., 2004 ; Zhao & Nelson, 2005 ; Plaza et al., 2005 ; Markiewicz-Patkowska et al., 2005). De plus, la MON complexante peut transporter les métaux dans un endroit à un autre, déplaçant ainsi les contamination (Senesi et al., 1992 ; Hernández et al., 2006).

La propriété de la complexation de la MON peut être quantifiée par une concentration de sites complexants rattachés à la MON, i.e. la concentration en sites. Ces sites sont caractérisés par leur capacité à fixer les métaux au travers d'une constante thermodynamique de complexation. L'analyse de la complexation entre la MON et les métaux peut être réalisée de manière directe par électrochimie (Filella et Town, 2000 ; Town et Filella, 2000 ; Kogut et Voelker, 2001 ; Voelker et

Kogut, 2001 ;Louis et al., 2008), par titration acido-basique (Garnier et al., 2004) et par quenching de fluorescence (Mounier et al., 2010), ou par toute autre méthode analytique permettant de mesurer une ou plusieurs concentrations des formes chimiques présentes à l'équilibre.

I.D.2 Propriétés optiques de la MON

Selon les environnements, 40% à 60% de la MON fluoresce (Senesi, 1993). Les analyses en spectroscopie de fluorescence nous apportent des informations complémentaires à la connaissance de la MON comme : la caractérisation spectrale et l'origine des fluorophores (Coble, 1996 ; Smith & Kramer, 1999 ; Wolfe et al., 2002 ; Murphy et al., 2006), les réactivités chimiques (Saar & Weber, 1980 ; Plaza et al., 2005) et biologiques (Rinnan et Rinnan, 2007 ; Zhang et al., 2008).

La technique de fluorescence présente plusieurs avantages (Weber, 1988). Elle permet d'analyser directement les échantillons sans préparation particulière hormis la filtration pour les mesures de laboratoire. Elle est très sensible car dépendante de l'intensité incidente et ne nécessite pas l'ajout d'électrolyte ou de tampon. Le matériel de mesure n'induit pas de perturbation et n'introduit pas de pollution par diffusion. De plus, les informations contenues dans les résultats de fluorescence nous permettent d'identifier plusieurs origines de composants dans la MON (Coble, 1996). Le principe de la fluorescence, la technique de mesure et son évolution récente sont détaillés dans le prochain chapitre.

Chapitre II.
Spectroscopie de fluorescence

*La science doit être tirée de la lumière de la nature,
elle ne doit pas être retirée de l'obscurité de l'antiquité.*

- Francis Bacon

La spectroscopie est une technique qui permet d'obtenir des informations moléculaires et structurales à partir de l'interaction entre la matière et les ondes électromagnétiques. Parmi ces techniques, la spectroscopie de fluorescence est utilisée depuis longtemps dans le domaine de la chimie (Kalle, 1963). Excitée par une onde électromagnétique (OEM), une molécule organique peut absorber une partie de l'énergie dans un premier temps, puis dans un second temps émettre une énergie plus faible après quelques réarrangements internes : c'est le phénomène de fluorescence.

En environnement, cette technique s'est développée à partir d'une simple mesure d'intensité de fluorescence (Kalle, 1963) jusqu'à l'utilisation du spectre total de luminescence qui analyse la réponse de fluorescence des composés naturels pour toutes les longueurs d'onde de l'UV au visible (Coble, 1996).

II.A L'interaction photon - molécule

Quand une OEM interagit avec une molécule, cette dernière peut absorber l'énergie électromagnétique. Cette énergie (E) est proportionnelle à la fréquence (ν) de l'OEM absorbée : on a $E=h\nu$, avec h constante de Planck (1901).

Après l'absorption d'un photon (Figure 4, étape A), la molécule change d'état électronique, passant du niveau fondamental S_0 à un niveau électronique supérieur ($S_1, S_2...S_n$). Les fonctions chimiques capables d'interagir ainsi avec une OEM sont appelées chromophores.

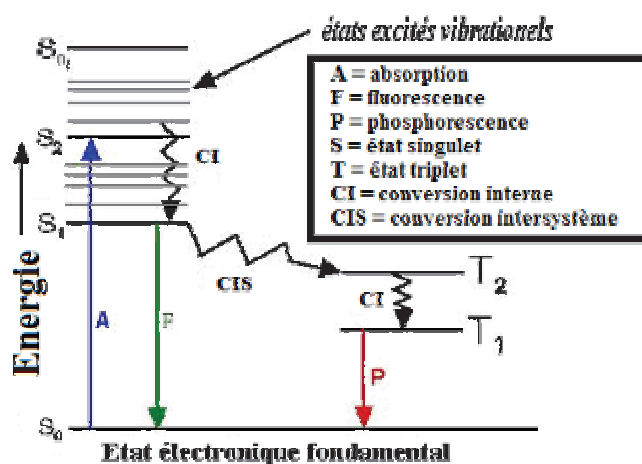


Figure 4: Diagramme de Jablonski

L'état excité correspond à un niveau d'énergie constitué d'énergies électronique, vibrationnelle et rotationnelle. En milieu liquide, la molécule excitée perd de l'énergie avant d'atteindre le niveau électronique le plus bas de même multiplicité (S_1). Cette perte d'énergie se fait principalement par conversion interne (CI) et sans radiation : elle se produit en 10^{-11} - 10^{-9} s. Cette règle dite de Kasha's est valable pour toutes les molécules à l'exception des azulènes et des thiophénones. Le retour à l'état fondamental S_0 peut se faire par trois voies différentes. Le retour sans radiation par conversion interne et collision représente la majeure partie des cas. Pour certaines molécules, le retour à S_0 peut se faire au travers de l'émission d'une OEM correspondant à la différence d'énergie entre S_0 et S_1 . Ce phénomène est appelé fluorescence (F). La troisième voie de relaxation consiste à partir du niveau S_1^* en une conversion intersystème (CIS) pour atteindre l'état triplet T_1, T_2, \dots . La molécule perd alors de l'énergie suivant la règle de Kasha's pour atteindre le niveau T_1 . A partir de cet état triplet, la molécule peut retourner à l'état fondamental S_0 par conversion interne (sans radiation) ou en émettant une OEM dont l'énergie correspond à la différence de niveaux entre T_1 et S_0 (P). C'est le phénomène de phosphorescence.

L'absorption d'un photon ne dure que 10^{-15} s, la molécule ne change pas de conformation durant l'absorption. Par contre, la relaxation vibrationnelle dure entre 10^{-11} et 10^{-9} s puisqu'elle fait intervenir des mouvements d'atomes. La molécule reste environ 10^{-10} s à 10^{-7} s dans l'état excité S_1 ce qui correspond au temps de vie de fluorescence. Dans le cas de la phosphorescence, le passage d'un état triplet à un état singulet est quantiquement défavorable, ce qui explique une durée de vie variant de 10^{-6} jusqu'à 1s (Valeur, 2001 ; Skoog et al., 2003). En milieu liquide, pendant la durée de vie de l'état T_1 , le nombre de collisions entre molécules est considérable, ce qui favorise la relaxation par voie non radiative au point de faire disparaître ce phénomène de phosphorescence.

En milieu liquide, la perte d'énergie par CI est suffisamment importante pour entraîner un décalage de longueur d'onde appelé « déplacement de Stokes » (Valeur, 2004). Ainsi, la longueur d'onde d'émission est toujours plus grande que la longueur d'onde d'excitation. Il en est de même entre la longueur d'onde d'émission de fluorescence et celle de phosphorescence. D'autre part, la règle de Kasha's induit que l'émission de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation. Une molécule ou une fonction capable d'absorber l'énergie de photons et d'émettre ensuite une autre OEM dans la gamme du spectre visible, s'appelle un fluorophore.

II.B Mesure de la fluorescence

II.B.1 Spectres d'absorption et émission en mode continu

II.B.1.a La spectroscopie d'absorbance

Dans l'histoire du développement de mesures spectrales, la mesure d'absorbance est la première utilisée (Malmstadt & Vassallo, 1957). Elle est mesurée pour obtenir la relation entre l'intensité lumineuse incidente et transmise (Figure 5). La mesure de l'absorbance se fait grâce à un spectrophotomètre.

L'absorbance est une propriété qui décrit la capacité d'absorption d'une OEM par le milieu. C'est la première étape du processus de fluorescence. La relation connue comme la loi de Bouguer et aussi comme la loi de Beer-Lambert a été formulée par Pierre Bouguer dans son livre « Essai d'Optique sur la Gradation de la Lumière » en 1729.

II.B.1.a.i Principe de mesure

Par définition, l'absorbance $A(\lambda)$ est égale au logarithme en base 10 du rapport de l'intensité lumineuse incidente $I_0(\lambda)$ sur l'intensité lumineuse transmise $I_t(\lambda)$:

$$A(\lambda) = \log_{10} \left(\frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda)} \right) = l.c.\varepsilon(\lambda) \quad \text{ou encore} \quad I_t(\lambda) = I_0(\lambda).10^{-A(\lambda)} \quad \text{Équation 1}$$

avec l qui représente la longueur du trajet optique (en cm) parcouru par le faisceau lumineux et c la concentration molaire exprimée par mol.L^{-1} . Le terme $\varepsilon(\lambda)$ est défini comme le coefficient d'extinction molaire en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Ce coefficient est caractéristique de la molécule présente dans le milieu. Si N molécules sont présentes en concentrations respectives c_i alors les absorbances $A_i(\lambda)$

de chacune d'elles s'additionnent pour donner l'absorbance totale :

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^N A_i(\lambda) = l \cdot \sum_{i=1}^N \varepsilon_i(\lambda) \cdot c_i \quad \text{Équation 2}$$

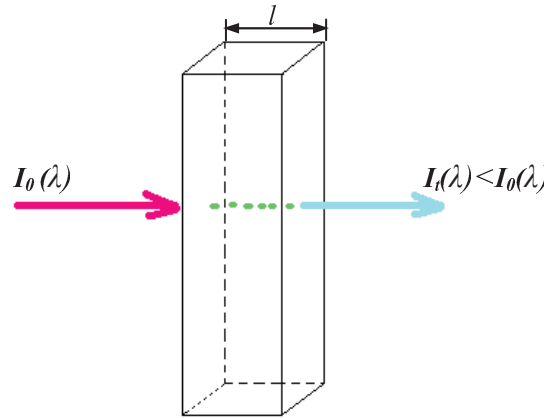


Figure 5: Principe de la mesure d'absorption

On peut aussi modéliser la décroissance de l'intensité lumineuse de la façon suivante :

$$I_t(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot e^{-\alpha(\lambda) \cdot l}, \quad \text{Équation 3}$$

où $\alpha(\lambda)$ est le coefficient d'absorption exprimé en cm^{-1} .

II.B.1.a.ii Applications en suivi environnemental

La spectrométrie d'absorption est une méthode d'analyse physique. Elle s'applique facilement aux échantillons en phase liquide ou gazeuse en environnement. La mesure de l'absorbance par spectrométrie d'absorption permet d'étudier les propriétés chromophoriques de la MON en fonction des conditions environnementales.

En ce qui concerne la MON les spectres d'absorbance sont généralement peu caractéristiques (Figure 6). Il est nécessaire d'avoir une forte concentration de certaines molécules (acides aminés, protéines, HAP) pour qu'apparaissent des pics d'absorbance caractéristiques (Figure 7). En effet, au fur et mesure que le processus de condensation se produit, l'absorbance de la MON devient de moins en moins spécifique. Toutefois, la mesure de l'absorbance étant très facile à mettre en oeuvre, elle est encore et souvent utilisée comme première approche dans les études environnementales. (Trubetskaya et al. 2002 ; Del Vecchio et Blough, 2004 ; Hong et al., 2005 ; Belzile et Guo, 2006).

Pour palier le manque d'information spécifique dans les spectres d'absorbance de la MON, il est souvent utilisé une représentation semi-logarithmique de l'absorbance $A(\lambda)$. En effet, l'absorbance de la MON semble décroître exponentiellement en fonction de la longueur d'onde. Cette transformation permet d'atténuer les erreurs dues au bruit provenant soit du milieu, soit de l'instrument. La pente de cette courbe semi-logarithmique est visiblement plus caractéristique. La transformation est obtenue en choisissant une longueur d'onde de référence λ_0 et la régression donne une pente spectrale (S) dont la relation avec le coefficient d'absorption $\alpha(\lambda)$ est définie par :

$$\alpha(\lambda) = \alpha(\lambda_0) \cdot e^{-S(\lambda-\lambda_0)} + cte \quad \text{Équation 4}$$

Un exemple de l'utilisation de cette équation dans l'étude de la MON est présenté par la **Figure 8** (Bricaud et al., 1981).

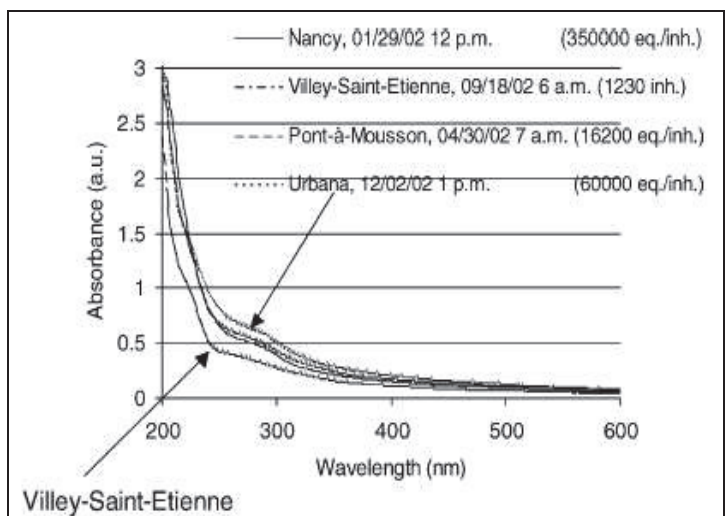


Figure 6: Spectres d'UV-Visible de différentes eaux de rivières urbaines (Pons et al., 2004)

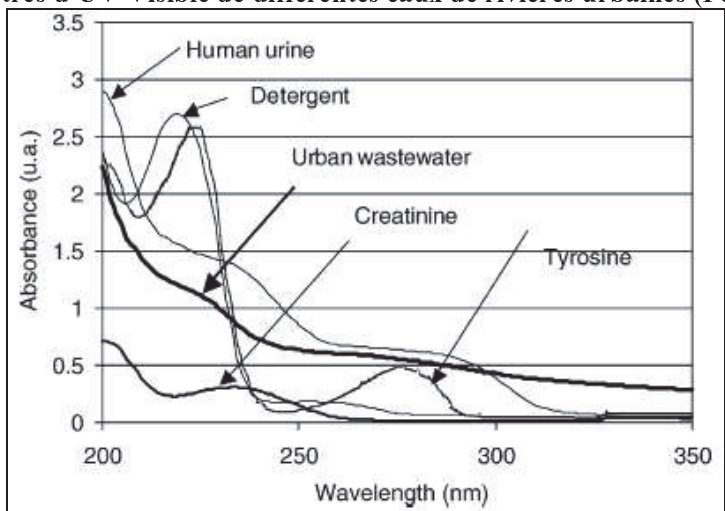


Figure 7: Spectres UV-Visible de certaines substances anthropogéniques (Pons et al., 2004)

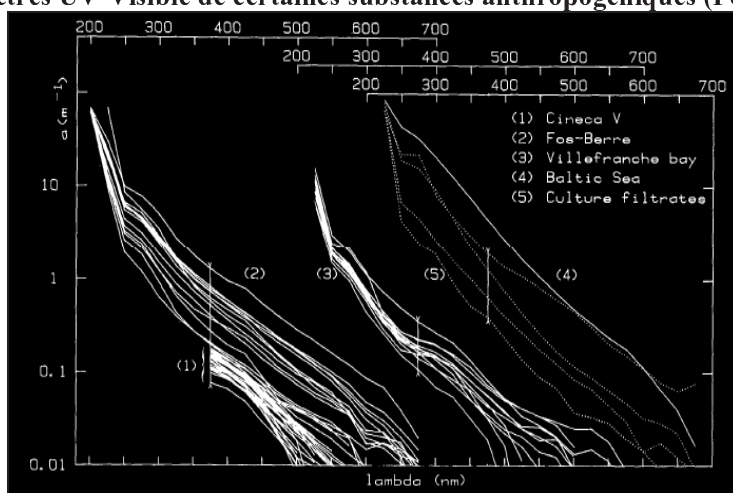


Figure 8: Représentation suivie logarithmique de l'absorbance de différents milieux. La pente = S .

Les pentes des coefficients d'absorption permettent de comparer quantitativement les absorbances de différents échantillons (Andersen et al., 2000). Ce type de comparaisons ne peut pas donner d'information ni sur la composition des échantillons, ni sur leur réactivité. A cause de cette

limitation, le spectroscopie d'absorbance reste cantonnée à des techniques analytiques spécifiques (colorimétrie) ou à des mesures globales ne permettant pas une bonne caractérisation de la MON. C'est pourquoi la spectroscopie de fluorescence a connu un tel essor ces dernières années.

II.B.1.b Principe de fluorescence et simple mesure de l'intensité

Ensuite, l'observation de l'intensité de fluorescence est mise en place. Le faisceau émis est mesuré à angle droit pour limiter le signal de la lumière d'excitation. Rapidement, les mesures en 2D sont capables d'augmenter les informations recueillies, soit pour des longueurs d'onde d'excitation (λ_{EX}) en axe X soit des pour des longueurs d'onde d'émission (λ_{EM}) en axe X et l'intensité de fluorescence (I_f) en axe Y (Ryan & Weber, 1982 ; Elkins & Nelson, 2001). La mesure synchrone qui est aussi une mesure 2D a été développée (Miano & Senesi, 1992) au même moment que la mesure en 3D car elle nécessite deux réseaux de diffraction. Les spectres 3D sont pour l'instant la meilleure technique pour observer la globalité de l'intensité de fluorescence d'un échantillon (Coble, 1993).

II.B.1.b.i Principe physique

On a vu précédemment que la fluorescence est un des chemins de relaxation de la molécule excitée. Le rendement quantique de fluorescence Φ_F est défini comme le nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés par les molécules. D'où la définition suivante :

$$\Phi_F = \frac{\int I_F(\lambda') d\lambda'}{I_A(\lambda)} \quad \text{Équation 5}$$

Selon l'équation 3, l'intensité lumineuse $I_A(\lambda)$ absorbée par le milieu au cours du trajet optique de longueur l est définie par :

$$I_A(\lambda) = I_0(\lambda) - I_t(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot (1 - e^{-\alpha(\lambda)l}) \quad \text{Équation 6}$$

L'intensité de fluorescence $I_F(\lambda')$ émise à la longueur d'onde λ' après une excitation à la longueur d'onde λ est égale à :

$$I_F(\lambda, \lambda') = I_A(\lambda) \cdot k \cdot F(\lambda') \quad \text{Équation 7}$$

avec le coefficient k qui est le produit du rendement quantique Φ_F et d'une constante qui dépend du système de mesure. $F(\lambda')$ représente la densité de probabilité d'émission d'un photon à la longueur d'onde λ' dont le profil est celui du spectre d'émission. On a donc :

$$I_F(\lambda, \lambda') = k \cdot F(\lambda') \cdot I_0(1 - e^{-\alpha(\lambda)l}) \quad \text{Équation 8}$$

avec :

$$\int F(\lambda') d\lambda' = 1 \quad \text{Équation 9}$$

Dans le cas de la loi de Beer-Lambert, on peut alors relier l'intensité de fluorescence au coefficient d'extinction molaire $\varepsilon(\lambda)$ et à la concentration c :

$$I_F(\lambda, \lambda') = k.F(\lambda').I_0(1 - e^{-2,303\varepsilon(\lambda)lc}) \quad \text{Équation 10}$$

Cette équation est valable quelque soit la concentration. Dans le cas de solution diluée, c'est-à-dire $\varepsilon(\lambda)lc$ faible, il est possible de simplifier l'équation 10 en utilisant le développement limité du terme exponentiel :

$$e^{-2,303\varepsilon(\lambda)lc} = 1 - \frac{2,303\varepsilon(\lambda)lc}{1!} + \frac{(2,303\varepsilon(\lambda)lc)^2}{2!} - \dots (-1)^n \frac{(2,303\varepsilon(\lambda)lc)^n}{n!} \quad \text{Équation 11}$$

Ce qui donne :

$$I_F(\lambda, \lambda') = 2,303 k.I_0(\lambda).F(\lambda').\varepsilon(\lambda).l.c = k'.I_0(\lambda).F(\lambda').\varepsilon(\lambda).l.c \quad \text{Équation 12}$$

en négligeant les termes d'ordre supérieur à 1.

Dans ce cas-là, les intensités de fluorescence $I_F(\lambda, \lambda')$ sont proportionnelles à la concentration c , au chemin optique l , et à l'intensité incidente $I_0(\lambda)$. Le facteur de proportionnalité est une constante qui intègre le rendement quantique Φ_F de fluorescence et la constante d'appareil. Ainsi, la réponse de fluorescence étant proportionnelle à l'intensité incidente, la spectroscopie de fluorescence est une méthode très sensible pour l'analyse des milieux dilués, contrairement à la spectroscopie d'absorbance. On peut ainsi mesurer la fluorescence de la MO naturelle pour des concentrations très faibles (Midorikawa et Tanoue, 1998).

II.B.1.b.ii *Principe de mesure*

La mesure de fluorescence est obtenue à l'aide d'un spectrofluorimètre (HITACHI F4500) dont le schéma de fonctionnement est donné par la **Figure 9**.

Habituellement, la source de lumière excitatrice est une lampe au xénon (Xe) associée à un monochromateur. Une telle source peut émettre toute la gamme de longueurs d'onde allant de 200 nm à 850 nm environ. D'autres configurations de spectrofluorimètre sont possibles. Une source laser ou bien une diode électroluminescente, souvent appelée LED (Light Emitting Diode) peut remplacer la source lumineuse. Le monochromateur d'excitation étant muni d'une fente de largeur réglable permet de sélectionner une longueur d'onde d'excitation. En modifiant la position angulaire du réseau de diffraction constituant le monochromateur, on change la longueur d'onde d'excitation λ_{EX} envoyée sur cette fente. Les autres longueurs d'onde dispersées par le réseau de diffraction sont arrêtées par les bords métalliques de la fente.

Le faisceau lumineux divergent qui sort de la fente est ensuite transformé en faisceau parallèle par une lentille divergente. Une partie de ce faisceau est envoyée sur une photodiode qui mesure en permanence une intensité lumineuse proportionnelle à l'intensité lumineuse reçue par l'échantillon situé dans une cuve en quartz.

Le volume de l'échantillon éclairé par le faisceau exciteur devient alors fluorescent et une faible partie de l'émission fluorescente parvient à l'entrée du second monochromateur, appelé par la suite monochromateur d'émission. La direction d'observation de la fluorescence est perpendiculaire au faisceau d'excitation car, dans cette direction, l'intensité de la diffusion par les molécules du solvant est minimale. Le monochromateur d'émission possède également une fente de largeur réglable et un

réseau de diffraction dont on peut modifier la position angulaire. Il faut noter que, dans une majorité de spectrofluorimètres, les deux monochromateurs ont des caractéristiques identiques. La fente de sortie du monochromateur d'émission laisse seulement passer la lumière dont la longueur d'onde correspond à λ_{EM} , longueur d'onde d'émission définie par le logiciel du spectrofluorimètre.

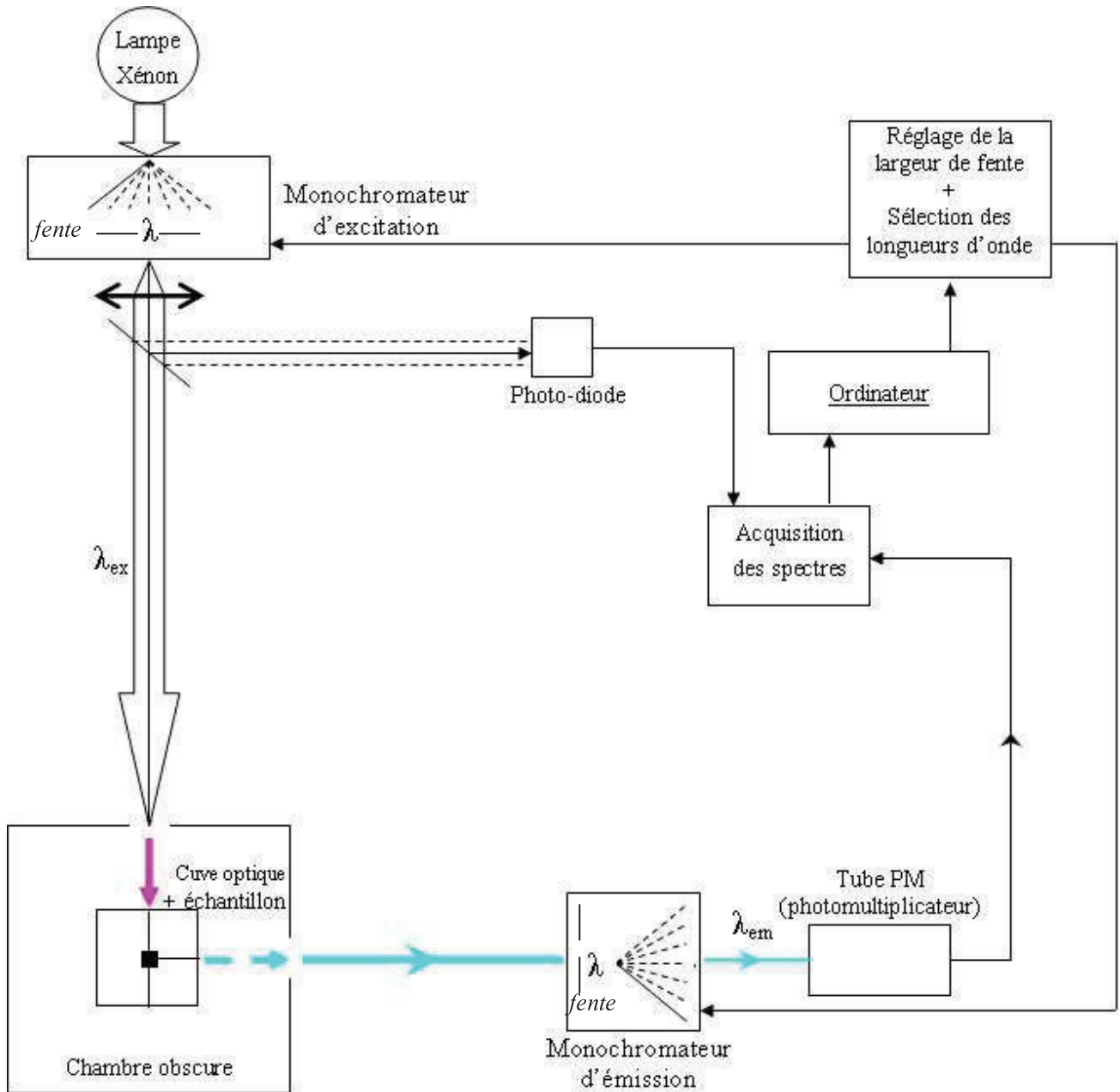


Figure 9: Principe du spectrofluorimètre.

Les flèches représentent les faisceaux lumineux du chemin optique, les traits avec les bouts arrondis représentent les liaisons entre les composants de l'appareil.

Le tube photomultiplicateur (PM) reçoit la lumière sortant du second monochromateur. Le rôle d'un tube PM est de multiplier les électrons primaires (photo-électrons) engendrés par les photons, de longueur d'onde λ_{EM} tombant sur la photocathode du tube PM. Les photo-électrons sont accélérés par une tension de plusieurs centaines de volts et leur énergie cinétique permet de générer, par collisions successives, un nombre croissant d'électrons arrachés aux dynodes qui constituent le tube

PM. Le gain du tube PM dépend donc de la tension accélératrice appliquée à ses bornes.

Pour mesurer un spectre d'émission, on fixe la longueur d'onde d'excitation λ_{EX} pendant la variation continue de la position angulaire du réseau de diffraction du second monochromateur, autrement dit le balayage en longueurs d'onde d'émission. Ainsi, on obtient à chaque instant une valeur en sortie du tube PM qui est ainsi divisée par la tension délivrée par la photodiode. Cela permet de s'affranchir des variations d'intensité lumineuse de la source d'excitation.

Il existe une autre méthode dite du point arrêté, pour mesurer un spectre d'émission. Elle consiste à faire varier la valeur de λ_{EM} de façon discontinue en fonction du temps et à mesurer la sortie du tube PM (corrigée par celle de la photodiode) pendant la durée d'intégration où λ_{EM} est fixe.

Le profil du spectre mesuré dépend bien évidemment des caractéristiques spectrales des fluorophores et de leur concentration respective, mais aussi des paramètres d'acquisition, à savoir : la largeur des fente d'excitation et d'émission, la vitesse de balayage en longueur d'onde d'émission et le temps de réponse.

La vitesse de balayage détermine la durée d'acquisition d'un spectre pour un intervalle spectral d'émission donné. Si l'on souhaite obtenir une durée d'acquisition la plus faible possible, cela se traduit par une vitesse de balayage élevée. Cela signifie que la durée d'exposition du tube PM aux photons de longueur d'onde λ_{EM} est courte. Par conséquent, le nombre de photons reçus par le tube PM est faible. Dans le cas de signaux de fluorescence de faible intensité, une vitesse de balayage élevée n'est donc pas adaptée pour obtenir un spectre d'émission peu bruité.

En fait, le signal produit par le tube PM est envoyé dans un filtre passe-bas (ou intégrateur) qui est totalement défini par son temps de réponse. La vitesse de balayage conditionne la valeur optimale du temps de réponse. En effet, un temps de réponse trop petit implique une perte de signal issu du tube PM.

A l'opposé, un temps de réponse trop grand entraîne une déformation notable du spectre mesuré. Cette déformation est particulièrement visible sur le profil de la raie de diffusion Rayleigh. La valeur optimale de ce paramètre est donc le compromis entre le spectre mesuré d'intensité maximale et la déformation de spectre minimale.

Les largeurs de fente (excitation et émission) ont une influence à la fois sur la largeur à mi-hauteur de raies de diffusion et sur l'amplitude du spectre mesuré. Si l'on suppose qu'on augmente la largeur de la fente d'excitation, il est évident que la quantité de photons excitateurs sera plus élevée et que le spectre mesuré sera lui aussi plus intense. Dans le même temps, le profil de la raie de diffusion Rayleigh se sera élargi car celui-ci dépend, notamment, de la largeur des deux fentes. Ceci entraîne une perte de résolution spectrale : deux raies proches ne sont peut-être pas résolues si les largeurs de fente sont trop importantes. Là encore, il est important de trouver le bon compromis entre l'amplitude du signal mesuré et la résolution spectrale.

La **Figure 10** montre le passage du faisceau exciteur de longueur d'onde λ_{EX} (flèche en trait plein) et quelques faisceaux de fluorescence émis par l'échantillon (flèches en trait pointillé) de longueur d'onde λ_{EM} .

La flèche en pointillé à droite représente la portion de l'émission fluorescente reçue par le tube PM du fluorimètre.

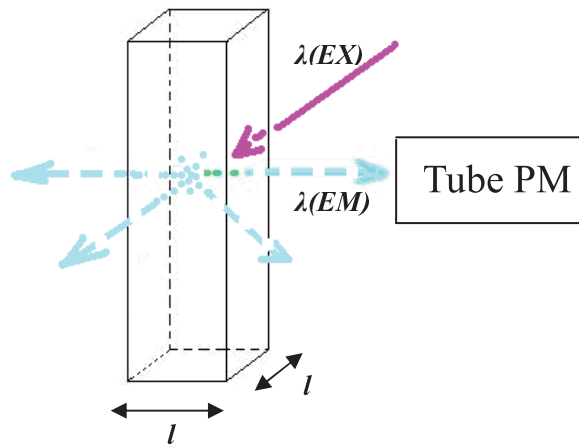


Figure 10: Passage des faisceaux d'excitation et d'émission de fluorescence dans la cuve de mesure

II.B.1.b.iii Simple mesure de l'intensité en suivi environnemental

Les mesures de l'intensité de fluorescence en un point fixe (λ_{EX} , λ_{EM}) sont généralement utilisées pour des mesures sur place ou in-situ (Vodacek et al., 1997 ; Tedetti et al., 2010). Initialement utilisée pour des raisons techniques, cette méthode de mesure de fluorescence est encore appliquée pour le suivi environnemental, car facile à mettre en oeuvre. Toutefois, les informations apportées par ce type de mesure sont limitées si l'on tient compte du domaine spectral restreint observé.

La Figure 11 représente un exemple de l'information obtenue à l'aide d'un spectrofluorimètre embarqué qui mesure l'intensité de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation de 355 nm, le long d'un estuaire. On observe une décroissance de la fluorescence en fonction de la salinité. Cette variation semble dépendre de la saison. Il est toutefois difficile d'aller au delà de cette simple interprétation, car la fluorescence mesurée ne donne pas d'information sur la composition de la MON présente dans le milieu.

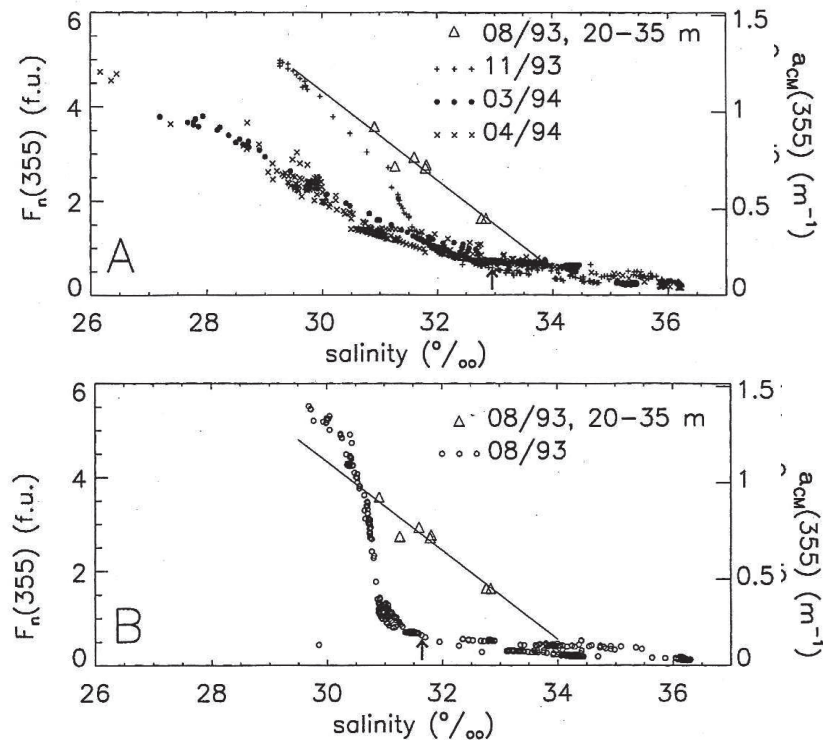


Figure 11: Variations saisonnières du coefficient d'absorption et de fluorescence de la MODC (Chromophoric Dissolved Organic Matter) à 355 nm et en fonction de la salinité pour la rivière du Delaware

jusqu'à la mer des Sargasses A et pour le MAB Shelf break (Vodacek et al., 1997)

Pour avoir des informations plus complètes sur les fluorophores présents en solution, il est nécessaire d'observer plus de longueurs d'onde, ce qui est le cas des spectres de fluorescence 2D.

II.B.1.c Spectres 2D (émission, excitation et synchrone)

En fixant une longueur d'onde d'excitation λ_{EX} et en mesurant l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission λ_{EM} , on obtient un spectre d'émission de fluorescence 2D (Figure 12) (Ryan et Weber, 1982). Les spectres d'excitation quant à eux sont obtenus en fixant la longueur d'onde d'émission λ_{EM} et en balayant les longueurs d'onde d'excitation λ_{EX} (Ghosh, 1980, Mafra et al., 2007). Pour les spectres synchrones, les longueurs d'onde d'excitation λ_{EX} et d'émission λ_{EM} varient simultanément avec une différence définie le plus souvent par : $\Delta\lambda = \lambda_{EM} - \lambda_{EX}$ (Lloyd, 1971 ; Vo-Dinh, 1981 ; Galapate et al., 1998 ; Peuravuori et al., 2002 ; Reynolds, 2003 ; Fuentes et al., 2006 ; Hua et al., 2007 ; Yang et al., 2008), et parfois par une fonction reliant λ_{EM} et λ_{EX} .

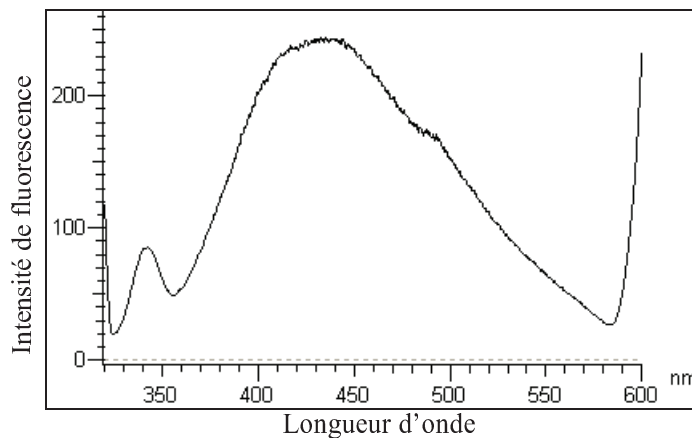


Figure 12: Exemple de spectre 2D d'émission pour l'AH extrait à $\lambda_{EX}=350$ nm avec λ_{EM} variant de 300 à 600 nm.

II.B.1.d Matrice de fluorescence 3D

La méthode revient à construire une matrice d'intensité de fluorescence à partir des spectres d'émission (excitation) mesurés à différentes longueurs d'onde d'excitation (émission) respectivement. Par la suite, on peut représenter la matrice d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) sous forme d'image en fausses couleurs ou bien sous forme de carte d'intensités symbolisées par des courbes de niveaux (Figure 13, a). Cette matrice est aussi appelée par certains auteurs le spectre de luminescence ou fluorescence totale (Plaza et al., 2005).

Bien évidemment, une MEEF contient, par construction, l'ensemble des spectres d'émission pour différentes longueurs d'onde d'excitation, mais également des spectres d'excitation et des spectres synchrones tels qu'ils ont été définis. Ceci est illustré par la Figure 13, qui montre un spectre d'émission, un spectre d'excitation et un spectre synchrone extraits à partir d'une MEEF.

Sur les MEEF, on observe systématiquement des intensités fortes à $\lambda_{EM}=\lambda_{EX}$ et dans une moindre mesure $\lambda_{EM} = 2\lambda_{EX}$. Ces signaux correspondent à la diffusion élastique des OEM incidentes par les molécules du solvant. Ce phénomène est un phénomène physique inévitable qui est minimisé par

une observation de la fluorescence à un angle de 90° par rapport au faisceau incident. Ce phénomène correspond à la diffusion Rayleigh.

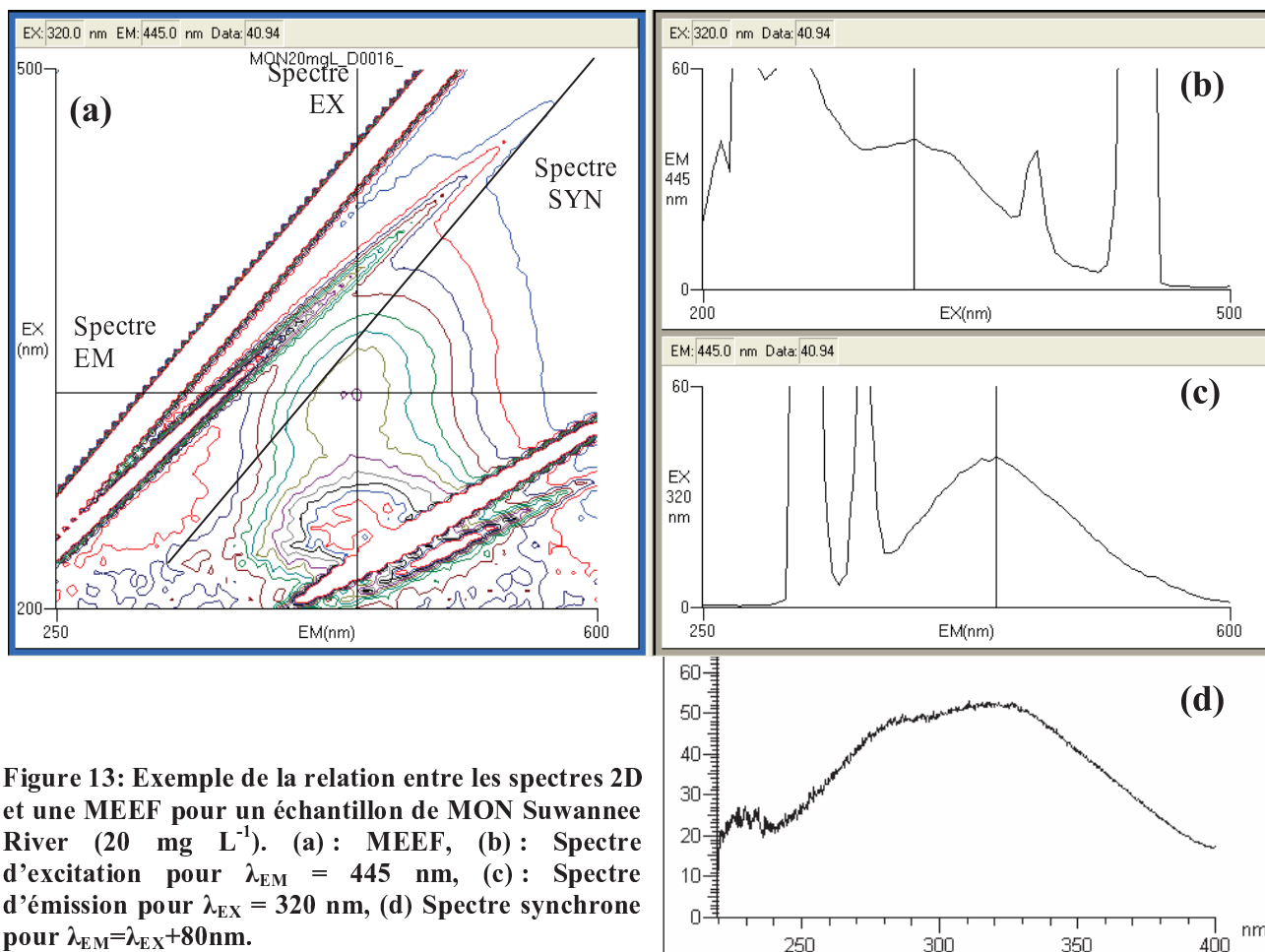


Figure 13: Exemple de la relation entre les spectres 2D et une MEEF pour un échantillon de MON Suwannee River (20 mg L⁻¹). (a) : MEEF, (b) : Spectre d'excitation pour $\lambda_{EM} = 445$ nm, (c) : Spectre d'émission pour $\lambda_{EX} = 320$ nm, (d) Spectre synchrone pour $\lambda_{EM} = \lambda_{EX} + 80$ nm.

Dans le même temps, un autre phénomène physique se produit, la diffusion Raman, correspondant à la collision inélastique d'un photon avec une molécule du solvant. Avec une intensité nettement plus faible que celle de la diffusion Rayleigh, les longueurs d'onde de diffusion Raman obéissent à l'équation suivante :

$$\frac{1}{\lambda_{EM}} = \frac{1}{\lambda_{EX}} - \frac{E_{vib}}{hc} \quad \text{Équation 13}$$

avec E_{vib} l'énergie perdue par l'OEM incidente correspondant dans le cas de l'eau à l'énergie de vibration. Ainsi, dans une MEEF, la diffusion Raman apparaît comme une bande s'éloignant de la bande de la diffusion Rayleigh au fur et à mesure que la longueur d'onde d'émission augmente. Contrairement à la diffusion Rayleigh, son intensité diminue très rapidement avec la longueur d'onde d'émission.

II.B.2 La fluorescence résolue en temps

Dans le chapitre précédent, nous avons vu un signal de fluorescence obtenu à partir d'une source d'intensité constante au cours du temps. Dans ce cas, il n'est pas possible de déterminer le temps de

relaxation de la fluorescence qui est un paramètre important pour caractériser un fluorophore. Pour étudier les temps de vie des états excités des molécules fluorescentes, il faut utiliser une source d'excitation produisant un éclairement $\Phi(t)$ qui varie au cours du temps t .

Dans ce qui suit, on suppose qu'il n'existe qu'un fluorophore caractérisé par un temps de vie de fluorescence noté τ , durée pendant laquelle la molécule reste excitée dans l'état S_1 (voir II.A). A chaque instant t , on a un nombre de molécules excitées $N(t)$. La relation entre $N(t)$ et $\Phi(t)$ est donnée par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dN(t)}{dt} + \frac{N(t)}{\tau} = \Phi(t) \quad \text{Équation 14}$$

On compte deux techniques pour mesurer le temps de vie τ de la fluorescence d'un fluorophore. La première de ces techniques est la modulation d'amplitude qui utilise un éclairement $\Phi(t)$ variant de façon sinusoïdale. La seconde de ces techniques repose sur une source impulsionnelle.

II.B.2.a Modulation d'amplitude (mesure de phase)

La première méthode courante est la modulation d'amplitude. Dans cette méthode, l'échantillon est excité par une lumière d'intensité modulée sinusoïdalement avec une pulsation ω . L'intensité d'émission possède obligatoirement la même fréquence. Cependant, l'intensité d'émission modulée est déphasée d'un angle ϕ . L'angle ϕ dépend du temps de vie τ . (Figure 14).

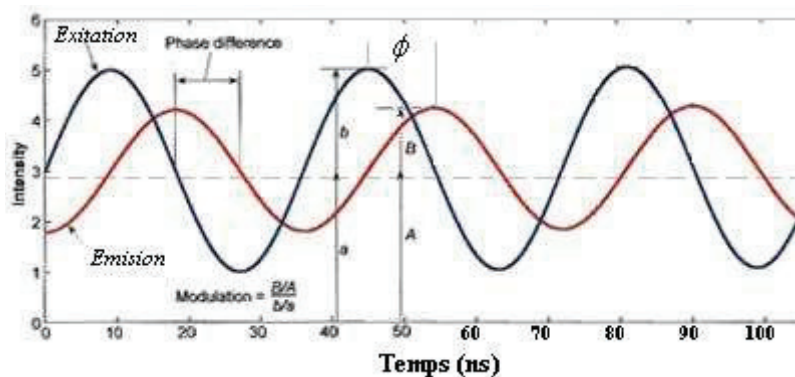


Figure 14: Description des mesures de la modulation d'amplitude

Dans le cas présent, l'équation 12 est définie avec les grandeurs suivante :

$$\Phi(t) = a + b \sin \omega t \quad \text{Équation 15}$$

$$N(t) = A + B \sin(\omega t - \phi) \quad \text{Équation 16}$$

Le taux de modulation β_0 de l'excitation $\Phi(t)$ est défini par $\beta_0 = b/a$ et le taux de modulation β_1 de la fluorescence est égal à $\beta_1 = B/A$. En remplaçant les expressions de $\Phi(t)$ et de $N(t)$ dans l'équation 12, on obtient :

$$\begin{aligned}\frac{dN(t)}{dt} &= (a + b \sin \omega t) - \frac{A + B \sin(\omega t - \phi)}{\tau} \\ &= \omega B \cos(\omega t - \phi)\end{aligned}\tag{Équation 17}$$

Ceci implique que $A = a\tau$.

On exprime le déphasage $\phi(t)$ et le facteur de démodulation α en fonction de la pulsation ω (connue) et du temps de vie τ que l'on cherche à déterminer :

$$\tan \phi = \omega\tau \tag{Équation 18}$$

$$\text{et } \alpha = \frac{\beta_1}{\beta_0} = \frac{B/A}{b/a} = \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} \quad (= \cos \phi) \tag{Équation 19}$$

On déduit immédiatement les deux expressions possibles de τ dépendant des ϕ et de α :

$$\tau = \frac{\tan \phi}{\omega} \tag{Équation 20}$$

$$\text{et } \tau = \frac{1 - \alpha^2}{\omega\alpha^2} \tag{Équation 21}$$

Les valeurs du temps de vie τ obtenues par ces deux expressions sont théoriquement identiques. Cependant, pour les expériences réelles, ces deux expressions donnent des valeurs de τ différentes en raison des erreurs de mesure sur le déphasage ϕ et sur le facteur de démodulation α . Pour améliorer la précision sur la mesure du temps de vie τ , on peut augmenter le nombre de mesures avec une pulsation ω fixe, ou bien en faisant varier la pulsation ω dans un intervalle $[\omega_1, \omega_2]$. Habituellement, pour mesurer un temps de vie τ de l'ordre de quelques nanosecondes, on utilise une fréquence de modulation de l'ordre de 10 MHz (Rocha et al., 1999 ; He et al., 2001).

II.B.2.b Source impulsionnelle (LIF)

On appelle N_0 le nombre de molécules excitées à l'instant $t=0$ qui correspond à l'instant de l'impulsion. En supposant que la durée de l'impulsion est négligeable par rapport à celle du phénomène de fluorescence, le nombre $N(t)$ de fluorophores excités à l'instant t :

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\gamma + k)N(t) \tag{Équation 22}$$

Le coefficient γ représente la proportion de fluorophores participant à l'émission de fluorescence par unité de temps alors que le coefficient k est lié aux fluorophores non-émissifs. En effet, une partie de l'énergie de l'excitation est transformée en énergie non-radiative. L'intensité de fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de fluorophores $N(t)$, on a donc :

$$I_F = \gamma \cdot N(t) \tag{Équation 23}$$

On définit le temps de vie τ de fluorescence tel que :

$$\tau = \frac{1}{\gamma + k} \quad \text{Équation 24}$$

L'équation 22 devient donc :

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-(\gamma+k)t} = N_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{Équation 25}$$

Bien évidemment, ce modèle de croissance de fluorescence est valable uniquement pour un échantillon composé d'un seul fluorophore.

Cette technique permet de mesurer le temps de vie de fluorescence et donc de caractériser une molécule autrement que par ses seuls spectres d'excitation et d'émission. Pour cette raison, la LIF est aujourd'hui considérée comme un outil complémentaire rapide et non-destructif pour l'analyse de la matière organique naturelle (Donard et al., 1989 ; Pant, 2001 ; Xiao et al., 2006 ; Duan et al., 2006 ; Milori et al., 2006 ; Navin et al., 2006 ; González-Pérez et al., 2007).

II.C Dépendances physico-chimiques de la fluorescence

Des paramètres physiques et chimiques ont une influence sur le phénomène de fluorescence tels que la température, la viscosité, la photolyse, le pH, la force ionique, la nature des auxochromes, les propriétés diélectriques du solvant. La préparation de l'échantillon et son conditionnement sont également des facteurs importants dont il faut tenir compte. Pour obtenir des mesures de fluorescence fiables et comparables, il est nécessaire de connaître et de maîtriser tous ces paramètres.

II.C.1 Paramètres physico-chimiques (pH, auxochrome, T°, solvants, photolyse)

II.C.1.a pH

Le potentiel hydrogène (pH) est un paramètre important qui peut changer la forme chimique des fluorophore. En effet, en milieu acide, le fluorophore est sous forme protonée, alors qu'il est sous forme déprotonée en milieu basique. Ces deux formes possèdent des énergies moléculaires différentes qui entraînent des spectres d'absorbance et de fluorescence différents. On peut traduire ce phénomène en exprimant l'intensité de fluorescence dans un milieu dilué par l'équation suivante :

$$I_F(\lambda, \lambda') = I_0(\lambda) \cdot l \cdot [k'_{H^+} \cdot \varepsilon_{H^+}(\lambda) \cdot [A_{H^+}] \cdot F_{H^+}(\lambda') + k'_{OH^-} \cdot \varepsilon_{OH^-}(\lambda) \cdot [A_{OH^-}] \cdot F_{OH^-}(\lambda')] \quad \text{Équation 26}$$

Avec en indice H^+ et OH^- pour les formes protonée et déprotonée respectivement, et k' la constante incluant le rendement quantique des espèces, F le spectre de fluorescence, ε le coefficient d'extinction molaire, $I_0(\lambda)$ l'intensité d'excitation, l le chemin optique et $[A]$ la concentration en fluorophores.

La Figure 15 montre l'effet du pH sur le paramètre ε . Le passage de la forme protonée à la forme

déprotonée est confirmé par le point isobestique*. Ainsi, le changement d'absorbance influence également les mesures de fluorescence. La Figure 16 montre clairement l'influence du pH sur la fluorescence d'un échantillon de AH (Trubetskaya et al., 2002). L'intensité de fluorescence mesurée de 350 nm à 600 nm pour une excitation 340 nm est de 125, 250 et 325 pour des pH de 2, 13 et 6,5 respectivement.

Ces changements d'intensité peuvent provoquer des erreurs très importantes pendant les mesures. Par conséquent, pour pouvoir comparer les spectres de fluorescence d'échantillons issus de différents environnements, il est indispensable que le pH soit contrôlé et au minimum signalé dans les données de publications.

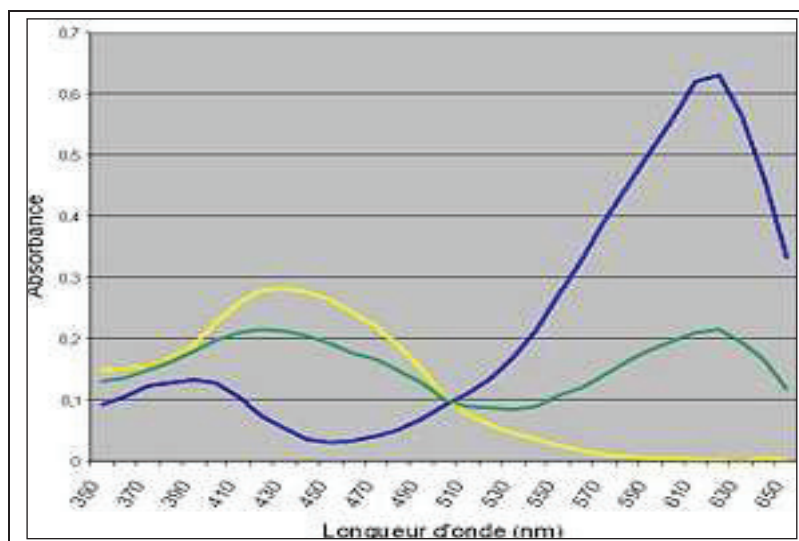


Figure 15: Le changement courbes d'absorbances de vert de bromocrésol en fonction du pH (ligne jaune : pH acide ; ligne verte : pH intermédiaire ; ligne bleue : pH basique)

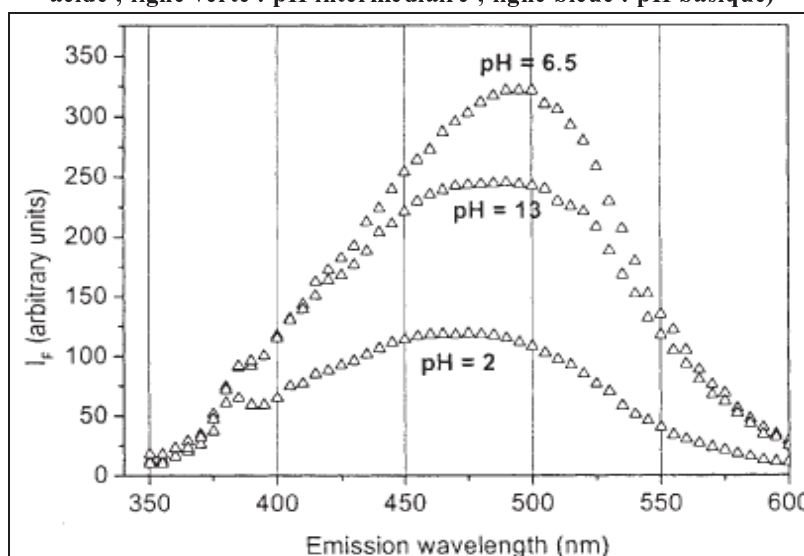


Figure 16: Le changement des spectres de fluorescence (b) en fonction du pH (Trubetskaya et al., 2002)

***II.C.1.b* Groupements auxochromes**

Les groupements auxochromes sont des groupes fonctionnels qui n'absorbent pas la longueur d'onde d'excitation mais dont la proximité avec un chromophore ou un fluorophore modifie les propriétés

* Point isobestique : un point commun (la même valeur d'Absorbance à une longueur d'onde spécifique) pour tous les pH d'une espèce dans les mesures de spectrophotométrie UV-Visible.

optiques de ce dernier. Les électrons non partagés des groupes appelés auxochromes peuvent se coupler aux groupements chromophores et ainsi influencer la réaction des molécules vis-à-vis des longueurs d'onde d'excitation. C'est donc l'origine des différences entre les intensités de fluorescence des composés présentant la même structure de base. Dans une certaine mesure, des modifications notables observées sur différentes MEEF permettent de distinguer différentes origines (terrestre, marine, côtière) de la MON (Coble, 1996 ; Yamashita et Tanoue, 2003, 2004 ; Jaffé, 1995, 2004 ; Shirshova et al., 2009).

***II.C.1.c* Température**

La température influence le mouvement moléculaire. Elle modifie donc le phénomène de fluorescence car elle augmente les collisions entre les molécules et donc la probabilité d'atténuation de la fluorescence. De plus, une augmentation de température implique une possibilité accrue du mouvement vibrationnel interne favorisant aussi la conversion interne non-radiative (Lakowicz, 1983). Dans les deux cas, il s'agit du phénomène de quenching dû à un paramètre physique, en particulier la température. Afin d'obtenir des données de fluorescence fiables, une température stable est nécessaire. Au cours de nos mesures, la température des échantillons est stabilisée à $20^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ à l'aide d'une circulation d'eau passant dans un bain-marie.

***II.C.1.d* Les effets du solvant**

Dans le milieu aqueux, la molécule d'eau est à l'origine de la diffusion Rayleigh et de la diffusion Raman. Les signaux dus à ces phénomènes peuvent être intenses par rapport aux spectres de fluorescence (II.B.1.d). De plus, l'eau absorbe particulièrement les longueurs d'onde d'excitation inférieures à 250 nm.

***II.C.1.e* Photolyse**

La photolyse est une réaction qui se produit à partir des molécules excitées par un photon. Elle peut faire décroître l'intensité de la fluorescence dans le temps (Del Vecchio & Blough, 2002). Ce phénomène introduit un risque de décomposition dans les mesures de fluorescence. Plusieurs paramètres (principalement les UV et les oxydants) peuvent causer ce phénomène (Vodacek et al., 1997). En conséquence, un stockage d'échantillons dans l'obscurité et une étape de dégazage à l'azote sont nécessaires dans la procédure de préparation des échantillons avant chaque mesure spectroscopique. En éliminant l'oxygène dans la solution, l'échantillon n'est plus soumis au phénomène de photo-dégradation pendant la mesure de spectre.

II.C.2 « Quenchers »

Certains éléments, appelés « quenchers », diminuent l'intensité ou le temps de vie de la fluorescence de l'échantillon en favorisant la désexcitation des molécules. L'oxygène, les nitrates et certains métaux sont des quenchers connus. Il est important de savoir si, dans un échantillon, ces composés sont présents et en quelle concentration pour pouvoir interpréter les signaux de fluorescence correspondante.

***II.C.2.a* Oxygène**

Soumis à une excitation lumineuse, l'oxygène peut se transformer en oxygène singulé ($^1\text{O}_2$) à partir de l'oxygène triplet ($^3\text{O}_2$). En présence d'oxygène, une molécule fluorescente à l'état excité transfère de l'énergie à $^3\text{O}_2$ au lieu de produire une transition radiative. Ceci entraîne une diminution de la fluorescence, ce qui est pénalisant pour toutes les analyses quantitatives de la MON liées à la concentration de fluorophores (Zepp, 1988 ; Hessler et al., 1996 ; Holst et al., 1997).

L'oxygène et son rôle sur l'extinction de luminescence ont été étudiés très tôt par de nombreux auteurs (Kautsky, 1939 ; Weber & Lakowicz, 1973 ; Vanderkooi et Wilson, 1986 ; P. Hartmann et al., 1995).

***II.C.2.b* Métaux**

Des métaux présents dans une solution sont également à l'origine de changement de l'intensité de fluorescence. Les métaux sont des complexants de la MON. Un complexe MON-métal peut avoir un rendement quantique de fluorescence différent de celui de la MON non complexée. En conséquence, l'intensité de fluorescence peut diminuer ou augmenter en fonction du métal complexant (Saar & Weber, 1980 ; Senesi, 1990 ; Zhao & Nelson, 2005 ; Mellace et al., 2006 ; Lee et al., 2007 ; Lavrik et Mulloev, 2010).

Cette propriété est d'ailleurs utilisée dans la technique de quenching de fluorescence pour caractériser les propriétés de complexation de la matière organique fluorescente.

Chapitre III.
MOD et spectroscopie :
traitement du signal

*La plupart des personnes un peu versées dans l'Optique,
çavent qu'il y a fort longtemps qu'on cultive cette partie des Mathématiques mixtes*

- Pierre Bouguer

On ne peut se passer d'une méthode pour se mettre en quête de la vérité des chose.

- René Descartes

La spectroscopie de fluorescence est une technique utilisée depuis de nombreuses années qui montre un développement grandissant depuis 1996 avec l'apparition de matrice de fluorescence 3D et la mise au point de sources d'excitation d'UV à faible énergie et de détecteurs miniaturisés (Coble 1996). Les développements actuels se font principalement sur le traitement des données de fluorescence.

Dans un premier temps, limité par la technique, les premières mesures étaient en 1 dimension : une λ_{EX} et un λ_{EM} . Dans ce cas de figure, un échantillon est représenté par une seule valeur, en unité arbitraire, mesurée à une longueur d'onde d'excitation et à une longueur d'onde d'émission. Cette valeur comprend l'ensemble des réponses des fluorophores présents dans l'échantillon. Ainsi, l'interprétation est difficile si les échantillons sont trop différents ou complexes. En sélectionnant plusieurs longueurs d'onde d'excitation il est possible d'obtenir plus d'informations, on construit alors un spectre d'excitation de fluorescence. Les spectres en 2 dimensions montrent ainsi l'évolution de l'intensité de fluorescence pour une gamme de longueurs d'onde d'émission. En observant la réponse de fluorescence à la fois pour une gamme de longueurs d'onde d'excitation et pour une gamme de longueurs d'onde d'émission, on construit un spectre 3D de fluorescence qui rassemble les longueurs d'onde d'excitation, les longueurs d'onde d'émission et l'intensité de fluorescence dans une même figure.

III.A Traitement des spectres d'émission

Suivant les différentes longueurs d'onde d'excitation choisies, les valeurs d'intensité et la forme des spectres varient (Del Vecchio & Blough, 2002). De plus, pour une longueur d'onde d'excitation choisie, les spectres d'émission de fluorescence varient d'un échantillon à l'autre, pour un même site, en fonction des paramètres physico-chimiques comme le pH, la salinité, la profondeur, la température, l'historique de la MON, etc. ce qui permet des interprétations sur la composition de la MON ou les transformations qu'elle subit (Vodacek et al., 1997 ; Weber, 1988).

Les spectres d'excitation (λ_{EM} fixe, λ_{EX} variable) permettent d'analyser les propriétés de complexation entre la MON et les métaux (Borissevitch, 1999 ; Elkins & Nelson, 2001). Ces spectres sont utilisés à partir des années 1980 par K. Ghosh and M. Schnitzer (1980) pour analyser des SH, puis, pour étudier leurs propriétés complexantes (Ghosh et al., 1981).

La technique synchrone ($\lambda_{EM}=f(\lambda_{EX})$) est tout d'abord utilisée par Lloyd en 1971 (LLOYD et al., 1971). Ensuite, elle est appliquée par exemple par Vo-dinh (VO-DINH, 1978 ; 1981) dans l'analyse de mélange de composés organiques. Contenant généralement plus d'information que les spectres d'excitation ou d'émission, elle a aussi été appliquée avec succès pour étudier diverses matières organiques naturelles dissoutes (Cabaniss, 1992 ; Miano and Senesi, 1992 ; De Souza Sierra et al., 1994 ; Ferrari and Mingazzini, 1995 ; Kalbitz et al., 2000 ; Lu and Jaffé, 2001).

Paula Coble (1996) a rendu populaire la fluorescence 3D en géochimie environnementale en introduisant la caractérisation des pics en fonction de leur origine. Ainsi, en pointant la présence de pics sur une matrice de fluorescence, il devient vraisemblable de déterminer la composition en fluorophores d'un échantillon à partir d'une simple mesure de fluorescence. Les positions les plus fréquemment observées sont le pic A et le pic C qui sont reliés aux SH, le pic D et le pic E correspondant probablement aux AF, le pic T et le pic N (ou nommé B suivant les auteurs) qui sont associés à certaines protéines et enfin le pic M initialement attribué à une matière organique d'origine marine (Lochmuller and Saavedra, 1986 ; Coble et al. 1990, 1998 ; Blough and Del Vecchio, 2002). De manière générale, la méthode la plus fréquente pour observer ces pics est la mesure de l'intensité de fluorescence à la position du maximum de pics pour un couple de longueurs d'onde (λ_{EM} , λ_{EX}). (Tableau 2)

Noms des Pics	λ_{EX} (nm)	λ_{EM} (nm)	
B	275	310	Protéinique, type Tyrosine
T	275	340	Protéinique, type Tryptophane
A	260	380-460	Substances humiques
M	312	380-420	Substances humiques marines
C	350	420-480	Substances humiques

Tableau 2: Exemple de présentation des données de spectre 3D (Coble, 1996)

III.B Application de « peak-picking » aux MEEF

Avec les mesures 3D, les pics fluorescents apparaissent avec leur forme, leur position et leur intensité de fluorescence (

Figure 17). Afin de comparer les valeurs entre des pics fluorescents, les maximums d'intensité liés à ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont directement utilisés. Cette méthode d'analyse de spectre de fluorescence, le "peak-picking", est utilisée très tôt (Cabaniss et Shuman, 1988) pour déterminer le couple de longueurs d'onde d'excitation et d'émission optimum pour les mesures d'extinction de fluorescence, couramment appelé quenching de fluorescence. Coble (1996) a utilisé cette méthode sur un ensemble d'analyses avec des échantillons en provenant de différents environnements aquatiques (rivières, estuaires, côtières, mers fermées, et océans). Différents pics ont alors été déterminés comme le pic M ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=312\text{nm}/380\text{-}420\text{nm}$), pic C ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=350\text{nm}/420\text{-}480\text{nm}$), pic A ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=260\text{nm}/380\text{-}460\text{nm}$), pic T ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=275\text{nm}/340\text{nm}$) et pic B ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=275\text{nm}/310\text{nm}$) en reliant la position du pic à l'origine de chaque composant correspondant respectivement aux SH de type marin, aux SH de type terrestre, aux SH dans la gamme d'UV, aux substances fluorescentes d'origine protéinique et aux substances d'origine phytoplanctonique.

La position des maxima d'intensité dans les MEEF est un outil direct pour caractériser les composants fluorescents. D'autres nomenclatures que celle de Coble (1996) (

Figure 17) peuvent être utilisées comme par exemple celle de Del Castillo (1999) (**Figure 18)** ou celle de Parlanti (2000) avec les pics α , α' , β , γ , et δ (**Figure 19)** qui sont par contre moins courantes.

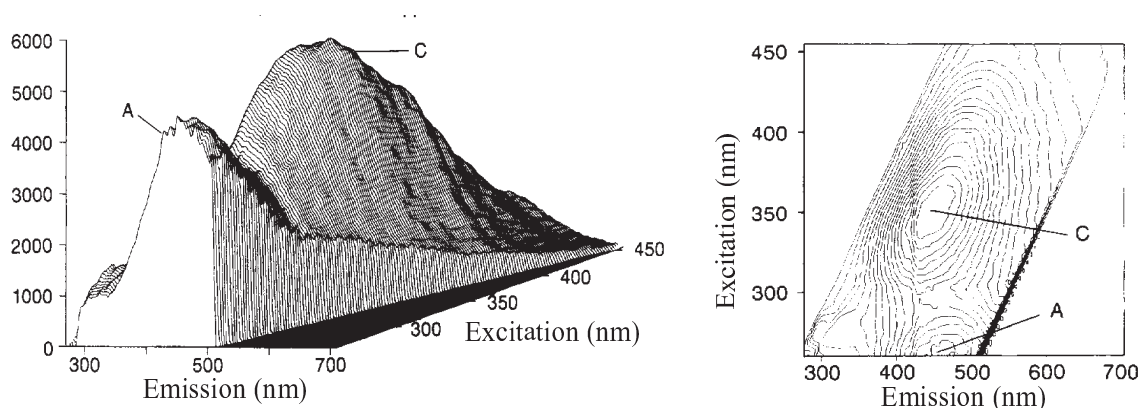


Figure 17: Exemple de l'image MEEF à Coble (1996)

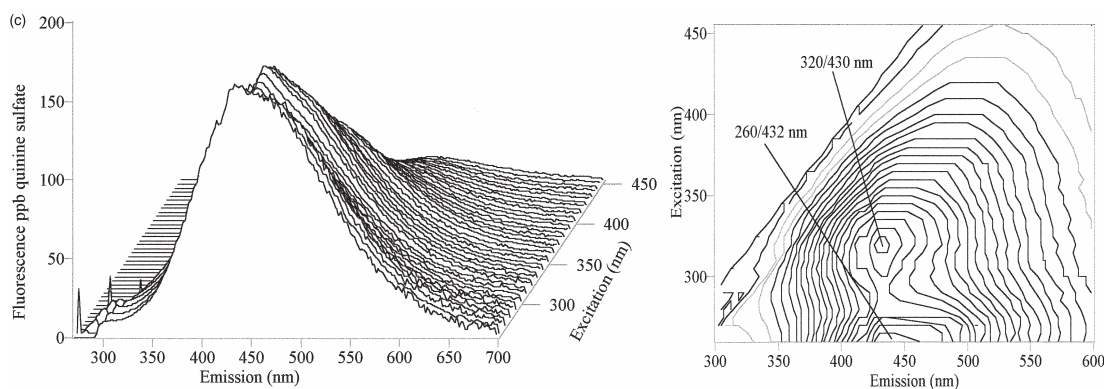
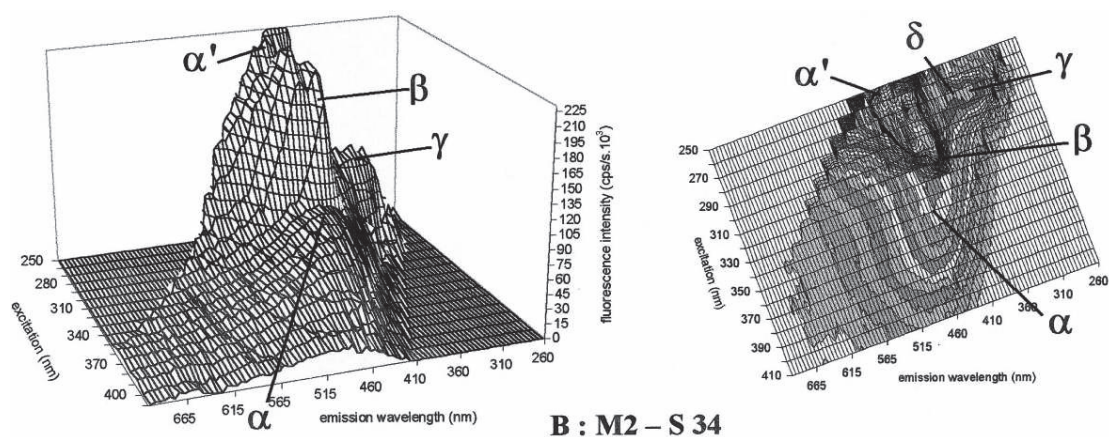


Figure 18: Exemple de l'image MEEF à Del Castillo (1999)



B : M2 – S 34

Figure 19: Exemple de l'image MEEF à Parlanti (2000)

Dans la **Figure 20** sont représentées les positions de pics observés par différents auteurs de 1996 à 2010 (**Annexe 3 – Tableau des références « peak-picking » et PARAFAC**). On observe dans un premier temps qu'un groupe formé de maxima suit une relation linéaire de la longueur d'onde d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation à partir de $\lambda_{EX}=300$ nm. Les fluorophores appartenant à ce groupe présentent donc un décalage de Stokes constant en longueur d'onde, indiquant une structure électronique de l'état excité similaire. Un autre groupe de fluorophores présente une émission de fluorescence aux alentours de 450 nm pour une excitation à 250 nm. Ce groupe-ci rassemble des composés dont les structures électroniques sont proches, faisant penser à la prédominance d'un même type de fonction chimique fluorescente. Enfin, un troisième groupe présente une émission de fluorescence de 250 à 400 nm pour une excitation de 200 ou 250 nm. Les fluorophores appartenant à ce groupe semblent avoir une structure électronique fondamentale similaire donnant une gamme d'excitation (absorption) restreinte.

Cette présentation, non exhaustive, des divers résultats obtenus montre que le positionnement des pics de fluorescence obéit à certaines règles, mais sans permettre de séparer de manière stricte les différents fluorophores présents dans un échantillon. En effet, l'intensité de fluorescence à une position donnée correspond à la contribution de l'ensemble des composants présents dans les échantillons. De ce fait, dans un mélange, les maxima de fluorescence dépendent également de la composition du mélange et non pas uniquement de l'importance d'un fluorophore. Par conséquent, la position de chaque maximum peut être influencée par les autres pics de fluorescence. Ainsi, il est indispensable de séparer ces différentes contributions spectrales, d'une part pour caractériser chaque composé, et d'autre part pour s'affranchir de la modification de la position des maxima (Matthews et al., 1996 ; Del Castillo et Coble, 2000 ; Bengraïne et Marhaba, 2003 ; Wu et al., 2003 ; Lepane et al., 2003 ; Nagao et al., 2003 ; Hong et al., 2005 ; Kowalczyk et al., 2005 ; Mariot et al., 2007). Pour cela, il faut recourir à un traitement mathématique particulier (Marhaba et al., 2003).

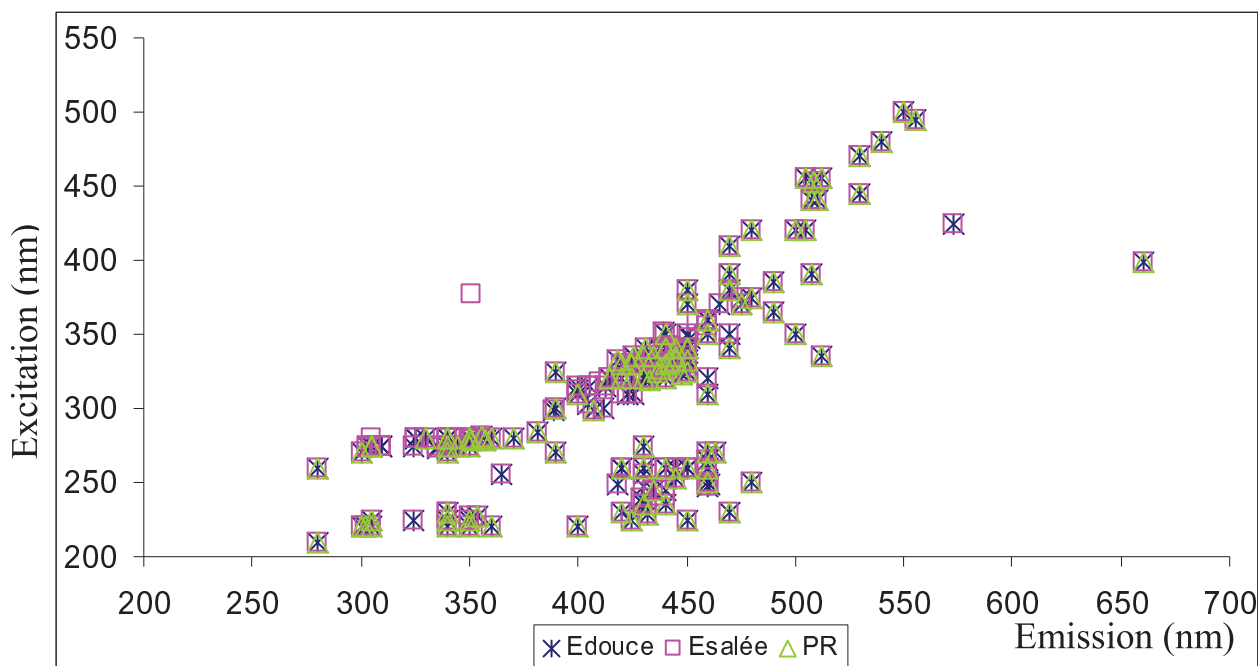


Figure 20: Positions des maxima obtenus par la méthode peak-picking
Edouce : eau douce ; Esalée : eau salée ; PR, différents produits de référence.

Ces « pics » sont en fait la combinaison de plusieurs contributions pour un couple de longueur d'onde d'excitation et d'émission donné. Pour mieux caractériser des composés, des traitements mathématiques peuvent être employés. Deux séparations de zones des pics se mettent en évidence pour les longueurs d'onde d'émission de 275 nm à 375 nm et de 400 nm à 500 nm. Dans ces longueurs d'onde d'émission, les pics sont séparés en haut et en bas dans les longueurs d'onde d'excitation.

III.C PARAFAC

Comme cela a déjà été évoqué, les pics de fluorescence 3D sont superposés et ont une influence mutuelle sur leur profil et donc sur la position de leur maximum. Dans le cas d'un échantillon peu concentré en fluorophores, cette superposition est en fait une combinaison linéaire de pics de fluorescence propres à chaque fluorophore.

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = I_0 \cdot l \cdot \sum \varepsilon_i(\lambda_{ex}) \cdot c_i \cdot \Phi_i(\lambda_{em}) \quad \text{Équation 27}$$

En 1997, Bro a mis au point une méthode numérique permettant la séparation de ces différentes contributions spectrales. Cette méthode est connue sous le nom de PARAFAC (PARAllel FACtors analysis). Elle est en fait inspirée d'un algorithme utilisé depuis 1970 dans le domaine de la psychométrie (Luciani, 2007), algorithme dont le fondement mathématique est encore plus ancien (Lasker, 1904 ; Hitchcock, 1927).

En quelques années, la méthode PARAFAC est devenue incontournable pour traiter des données multidimensionnelles (Bro, 1999 ; Bro et Kiers, 2003). Stedmon et al. (2003) ont appliqué PARAFAC aux MEEF pour analyser la MON, et ainsi, suivre sa production et sa dégradation dans

l'environnement (Stedmon, Markager et Bro, 2003). Depuis ces travaux, l'application de PARAFAC est devenue courante (Zepp et al., 2004 ; Stedmon et Markager, 2005 ; Cory et Mcknight, 2005 ; Holbrook et al., 2006 ; Wang et al., 2007 ; Hunt et al., 2008 ; Luciani et al., 2008, 2009 ; Murphy et al., 2008 ; Nie et al., 2008 ; Chen et Kenny, 2010 ; Chen et al., 2010 ; Gheorghiu et al., 2010).

III.C.1 Principe

PARAFAC est une méthode d'analyse de données basée sur un modèle trilineaire. Cet algorithme utilise un jeu de données, noté \underline{X} , constitué de l'ensemble des MEEF mesurées. Chaque élément $x_{i,j,k}$ de \underline{X} correspond à l'intensité de fluorescence du i -ième échantillon obtenue pour la j -ième longueur d'onde d'émission et pour la k -ième longueur d'onde d'excitation. Dans ce modèle trilineaire, le jeu de données \underline{X} dépend de trois matrices A, B et C, appelées modes, dont les dimensions respectives sont $I \times N$, $J \times N$ et $K \times N$ avec N qui représente le nombre estimé de fluorophores, I le nombre d'échantillon, J et K respectivement le nombre de longueurs d'émission et d'excitation mesurées. La colonne a_n de la matrice A contient les facteurs de fluorescence (produit des concentrations et du rendement quantique) du fluorophore n pour les I échantillons. Les colonnes b_n et c_n représentent respectivement le spectre d'émission (composé de J valeurs) et le spectre d'excitation (composé de K valeurs) du fluorophore n . Si le jeu de données \underline{X} vérifie exactement le modèle trilineaire, les éléments $x_{i,j,k}$ ont la forme suivante :

$$\forall i, j, k \quad x_{i,j,k} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} \quad \text{Équation 28}$$

Dans le cas d'un jeu de données obtenues à partir de mesures de MEEF, il est extrêmement rare que \underline{X} suive exactement le modèle trilineaire. Cela signifie donc qu'il existe un écart résiduel $e_{i,j,k}$ entre l'intensité de fluorescence mesurée $\hat{x}_{i,j,k}$ et le modèle trilineaire $x_{i,j,k}$. On a alors :

$$\forall i, j, k \quad \hat{x}_{i,j,k} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{i,j,k} \quad \text{Équation 29}$$

L'algorithme PARAFAC estime les trois matrices A, B et C à partir du jeu de données \underline{X} en utilisant habituellement la méthode ALS « Alternating Least Squares ». L'avantage de PARAFAC par rapport à toutes les autres méthodes de séparation de contributions est sa capacité à calculer une solution unique de matrices A, B et C, à une permutation quelconque de leurs colonnes près.

Dans ce qui suit, nous rappelons brièvement le principe de la méthode ALS. Dans un premier temps, on initialise les matrices A, B et C avec des coefficients aléatoires. Ensuite, on estime successivement ces trois matrices en utilisant les relations suivantes :

$$\hat{A} = f_A(\hat{B}, \hat{C}) \quad \text{Équation 30}$$

$$\hat{B} = f_B(\hat{C}, \hat{A}) \quad \text{Équation 31}$$

$$\hat{C} = f_C(\hat{A}, \hat{B}) \quad \text{Équation 32}$$

On calcule l'écart quadratique e entre tous les $\hat{x}_{i,j,k}$ et les $x_{i,j,k}$ calculés à partir des estimés \hat{A} , \hat{B} et \hat{C} des matrices A, B et C :

$$e = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K (x_{i,j,k} - \hat{x}_{i,j,k})^2 \quad \text{Équation 33}$$

On recommence le calcul à partir du calcul des estimés des matrices A, B et C tant que la convergence de l'algorithme n'est pas atteinte, autrement dit, jusqu'à l'obtention d'un minimum de l'écart quadratique e .

Il faut noter que l'expression des fonctions f_A , f_B et f_C fait appel à des notions d'algèbre tensorielle qui ne seront pas développées ici mais qui ont été présentées notamment par Bro (1997) et par Luciani (2007).

Comme tout algorithme d'optimisation, l'algorithme ALS peut converger vers un minimum local de l'écart quadratique e , ce qui implique que les matrices A, B et C sont mal estimées dans ce cas-là. Une solution à ce type de difficulté consiste simplement à lancer plusieurs fois l'algorithme PARAFAC avec de nouveaux coefficients aléatoires pour les matrices initiales A, B et C et à choisir les matrices estimées \hat{A} , \hat{B} et \hat{C} associées à l'écart quadratique e le plus faible. De plus, il est indispensable que le nombre de MEEF mesurées soit au moins égal au nombre N de fluorophores. En pratique, cette condition est aisément vérifiée puisque le nombre d'échantillons mesurés est généralement très supérieur au nombre N de fluorophores : cela permet d'améliorer la précision sur les matrices estimées.

En fait, le principal problème lié à l'utilisation du programme PARAFAC concerne le nombre N de fluorophores qui doit être choisi par l'utilisateur. En effet, hormis le cas particulier de mélanges synthétiques parfaitement connus, il est impossible de déterminer *a priori* le nombre de fluorophores présents dans les échantillons de MON. Il faut donc définir un critère pour estimer ce paramètre N dont dépend le modèle trilineaire. Ce point sera abordé dans le chapitre V.

III.C.2 Prétraitements

Avant d'appliquer la méthode PARAFAC aux MEEF mesurées, il est important de s'assurer que les signaux de fluorescence 3D vérifient le modèle trilineaire (Équation 28). Deux phénomènes physiques viennent perturber la trilinearité de ces signaux : il s'agit du phénomène de diffusion et de l'effet d'écran interne. Dans ce qui suit, nous présentons quelques techniques qui permettent de s'affranchir des effets non-linéaires de ces phénomènes physiques.

III.C.2.a Diffusions

Dans la partie II.B.1.d, nous avons présenté les deux phénomènes physiques de diffusion élastique (Rayleigh) et inélastique (Raman). Ces pics de diffusion, qui sont toujours présents dans les MEEF mesurées, ne vérifient pas le modèle trilineaire sur lequel est basé PARAFAC : l'algorithme n'est donc pas capable de séparer correctement les différentes contributions spectrales qui suivent cette loi trilineaire en présence de pics de diffusion qui ne la suivent pas. Il est donc nécessaire d'éliminer ces signaux de diffusion avant d'appliquer PARAFAC à l'ensemble des MEEF.

Il existe plusieurs méthodes permettant de supprimer les raies de diffusion, en particulier, la méthode décrite par Zepp (2004) qui offre de bonnes performances en termes de rapidité et de qualité de filtrage sur la totalité des MEEF traitées au cours de ce travail.

III.C.2.b Effets d'écran

Puisque la méthode PARAFAC est applicable uniquement si l'intensité de fluorescence vérifie le modèle trilineaire de l'Équation 28, il faut aussi prendre en compte le cas où la concentration en fluorophores devient importante. Pour des concentrations élevées, l'intensité de la lumière d'excitation décroissant de façon exponentielle, seul un faible pourcentage de l'énergie d'excitation atteint le volume de mesure : il s'agit de l'effet d'écran primaire (EEP). Il est également possible qu'un fluorophore absorbe une partie de la fluorescence émise par un autre fluorophore : il s'agit dans ce cas de l'effet d'écran secondaire (EES). Ces deux effets d'absorption constituent l'effet d'écran interne (EEI, ou Inner Filter Effect, IFE dans la littérature internationale, Larsson et al., 2007 ; Gu et Kenny, 2009).

Ayant des propriétés optiques très variables, la MON peut produire un effet d'écran interne plus ou moins important. Avant d'effectuer un certain nombre de mesures préalables, il est difficile voire impossible de prévoir quelle sera l'importance de l'effet d'écran dû à la MON. Dans la partie suivante, nous décrivons deux approches possibles pour quantifier et pour éliminer cet effet d'écran.

III.C.2.c Correction des effets d'écran par absorbance

En environnement, l'effet d'écran est plus souvent corrigé en utilisant la mesure de l'absorbance des échantillons (Ohno, 2002 ; Stedmon et al., 2003 ; Murphy et al., 2006).

III.C.2.c.i Principe

Selon la loi de Beer-Lambert (partie II.B.1.a), l'absorbance est égale à :

$$A(\lambda) = \log_{10} \left(\frac{I_0(\lambda)}{I_A(\lambda)} \right) = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad \text{ou encore} \quad I_t(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-A(\lambda)}$$
$$\left(A(\lambda) = \log_{10} \left(\frac{I_0(\lambda)}{I_t(\lambda)} \right) = l \cdot c \cdot \varepsilon(\lambda) \quad \text{ou encore} \quad I_t(\lambda) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-A(\lambda)} \right) \text{Équation 1)}$$

Il est difficile de savoir si un échantillon est dans la zone de linéarité de la fluorescence. Afin d'éviter les effets d'écran, il est conseillé de diluer l'échantillon jusqu'à des valeurs d'absorbance définies par les auteurs eux-mêmes. Il n'y a pas de consensus sur les valeurs d'absorbance à atteindre car la zone de linéarité de fluorescence dépend de la longueur d'onde considérée.

Toutefois, à partir du spectre d'absorbance, il est possible de corriger l'effet non linéaire (Stedmon 2003, Holbrook et al., 2006a). L'utilisation de cette méthode nécessite alors la mesure de l'absorbance de l'échantillon. Puis pour chaque longueur d'onde d'excitation, l'intensité de fluorescence est corrigée par :

$$I_C = I_0 = I_A \cdot 10^{A\lambda} \quad (\text{Équation CA})$$

III.C.2.c.ii Limitations

Cette méthode est théoriquement correcte, mais souffre de la difficulté de mesurer correctement des fortes absorbances, en particulier dans le domaine de l'UV (Trubetskaya et al., 2002). En effet, l'absorbance dans la zone d'UV est nettement plus importante que celle de la zone visible. Les intensités de fluorescence dans la zone d'UV sont alors augmentées par la correction leur donnant un poids plus grand. Cette augmentation peut entraîner des difficultés lors de l'interprétation des signaux. Une sur-évaluation des composants dans la zone d'UV peut influencer toutes les

contribution des autres composants dans l'ensemble du jeu de données.

Ayant montré que la méthode par dilution était aussi efficace que la correction par l'absorbance, voire meilleure pour des échantillons concentrés (Luciani et al., 2009), ce travail utilise systématiquement la méthode par dilution pour l'ensemble des corrections de l'effet d'écran.

III.C.2.d Correction des effets d'écran par dilution

Les méthodes les plus courantes sont la correction par l'absorbance (Stedmon et al., 2003) et la correction par dilution (Luciani et al., 2009). La correction par l'absorbance utilise l'équation de correction ci-dessus (Équation CA). La seconde méthode, basée sur un autre modèle numérique, a été proposée par X. Luciani au cours de sa thèse (2007).

La correction de l'effet d'écran nécessite un modèle numérique qui prend en compte les paramètres physiques intervenant dans le processus de fluorescence d'un échantillon liquide contenu dans une cuve en quartz. La Figure 5 montre une section horizontale de la cuve orientée suivant les directions x et y dans laquelle se propage l'excitation lumineuse. En réalité, le faisceau d'excitation se propage dans un volume de liquide d'épaisseur Δ_z mais on suppose que l'intensité lumineuse ne dépend pas de la direction z . La suite du raisonnement porte donc uniquement sur des surfaces plutôt que sur des volumes de liquide traversés par la lumière.

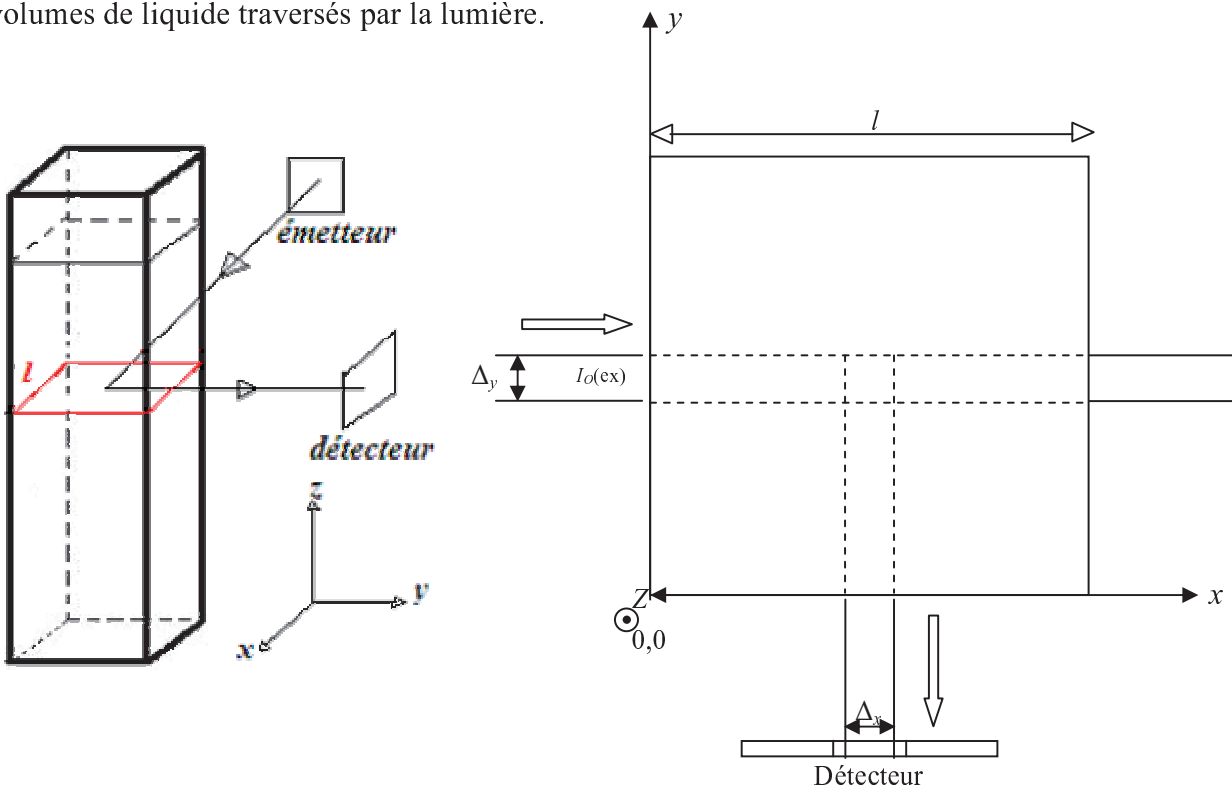


Figure 21: Modèle du passage lumineux dans l'espace (xyz) .

On note Δ_y la largeur du faisceau d'excitation de l'intensité excitatrice I_0 et Δ_x la largeur effective du détecteur. La zone d'émission est définie par l'intersection de la surface associée au faisceau excitateur et celle du faisceau de fluorescence, qui est perpendiculaire au précédent et qui atteint le détecteur. Cette zone se situe au centre de la cuvette et ses dimensions sont Δ_x et Δ_y .

Le modèle proposé par Luciani (2009) exprime l'intensité de fluorescence obtenue $I_{3D}(\lambda_{ex}, \lambda_{em})$ en fonction des coefficients d'absorption α_n , des rendements quantiques Φ_n et des spectres d'émission

normés γ_n des N composants et de l'intensité excitatrice I_0 :

$$I_{3D}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = I_0 \Delta_x \left(\sum_n \alpha_n(\lambda_{ex}) \Phi_n \gamma_n(\lambda_{em}) \right) e^{-\frac{\alpha(\lambda_{ex})l}{2}} e^{-\frac{\alpha(\lambda_{em})l}{2}} \quad \text{Équation 34}$$

En posant $g = 0,5$ et $G_n = I_0 \Delta_x \Phi_n$, on peut regrouper tous les paramètres constants ou inconnus liés à l'effet d'écran. Dans l'expression finale du modèle, les termes ε_n représentent les coefficients d'absorption molaires normés :

$$I_{3D}(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = \left(\sum_{n=1}^N G_n c_n \varepsilon_n(\lambda_{ex}) \gamma_n(\lambda_{em}) \right) \prod_{n=1}^N e^{-g(c_n \varepsilon_n(\lambda_{ex}) + c_n \varepsilon_n(\lambda_{em}))} \quad \text{Équation 35}$$

On constate que le modèle trilineaire, défini par le terme entre parenthèses, est multiplié par un terme non-linéaire qui traduit l'influence de l'effet d'écran interne (EEP et EES).

Dans le cas simple d'une solution pure contenant un seul produit, le spectre d'émission de fluorescence est une fonction qui dépend de la longueur d'onde λ_{em} et de la concentration c . L'expression précédente devient donc :

$$I_{3D}(c) = G'' c e^{-g'c} \quad \text{Équation 36}$$

Ce modèle a été validé dans le cas d'une solution contenant un seul fluorophore, la fluorescéine (Luciani, 2007). Sa bonne adéquation avec les données expérimentales est illustrée par la **Figure 23** :

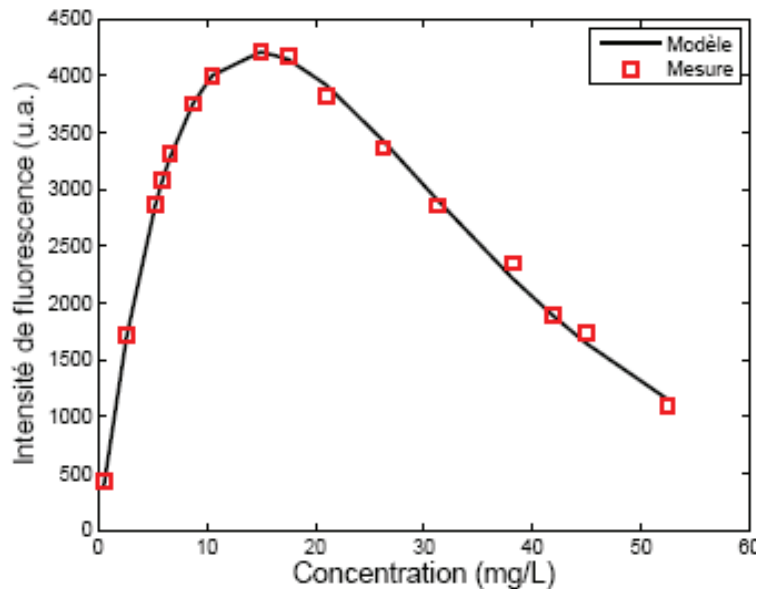


Figure 22: Modélisation de l'effet d'écran sur la fluorescéine seule (Luciani, 2007)

III.C.2.d.i Application aux MEEF

Dans cette méthode, un seul instrument est utilisé au lieu de 2 pour la méthode utilisant l'absorbance, par contre l'échantillon est dilué par un facteur p connu (habituellement égal à 2). Dans tous les cas, le facteur de dilution p doit être choisi suffisamment faible pour éviter de détériorer le rapport signal

sur le bruit de la MEEF de l'échantillon dilué. Si le rapport des intensité de fluorescence des deux MEEF diffère du facteur de dilution p de façon significative, la simple comparaison d'un couple de MEEF ("originale", "diluée") permet de détecter rapidement un éventuel effet d'écran. On corrige alors l'effet d'écran en appliquant la méthode décrite ci-après.

III.C.2.d.ii **Principe**

Comme le montre l' $I_{3D}(c) = G''ce^{-g'c}$ **Équation 36**, le modèle trilineaire est multiplié par deux termes non linéaires multiplicatifs, traduisant l'influence de l'effet d'écran primaire (EEP) lié à l'excitation et de l'effet d'écran secondaire (EES) lié à l'émission. Nous conservons le système d'indices utilisé dans la section de PARAFAC : ainsi, l'indice i représente le numéro de l'échantillon, l'indice n celui du fluorophore, les indices j et k désignent respectivement les longueurs d'onde d'émission et d'excitation. Par ailleurs, nous introduisons $L(i, j, k)$ le terme linéaire du modèle et $H(i, j, k)$ la déviation due à l'effet d'écran. L'intensité de fluorescence de l'échantillon i mesurée pour la j -ième longueur d'onde d'émission et pour la k -ième longueur d'onde d'excitation peut s'exprimer sous la forme suivante :

$$I_{3D}(i, j, k) = L(i, j, k)H(i, j, k) \quad \text{Équation 37}$$

Le facteur h représente une déviation pour l'échantillon i :

$$h(i, m) = \prod_{n=1}^N e^{-g c_n(i) \varepsilon_n(m)} = e^{-\sum_{n=1}^N g c_n(i) \varepsilon_n(m)} \quad \text{Équation 38}$$

où m désigne l'indice d'une longueur d'onde soit d'excitation soit d'émission.

L' $I_{3D}(i, j, k) = L(i, j, k)H(i, j, k)$ **Équation 37** peut aussi s'écrire :

$$I_{3D}(i, j, k) = L(i, j, k)h(i, j)h(i, k) \quad \text{Équation 39}$$

Par souci de simplification des notations, on considère que la correction de l'effet d'écran par dilution s'applique au même échantillon i : par conséquent, l'indice i est rendu muet. Nous notons donc $I_{3D}(j, k)$ pour la MEEF originale et $I_{3Dp}(j, k)$ pour la MEEF du même échantillon dilué d'un facteur p . On a donc :

$$I_{3D}(j, k) = \left(\sum_{n=1}^N G_n c_n \varepsilon_n(k) \gamma_n(j) \right) \prod_{n=1}^N e^{-g(c_n \varepsilon_n(k) + c_n \varepsilon_n(j))} = L(j, k)H(j, k) \quad \text{Équation 40}$$

$$I_{3Dp}(j, k) = \frac{1}{p} \left(\sum_{n=1}^N G_n c_n \varepsilon_n(k) \gamma_n(j) \right) \left(\prod_{n=1}^N e^{-g(c_n \varepsilon_n(k) + c_n \varepsilon_n(j))} \right)^{\frac{1}{p}} = \frac{1}{p} L(j, k)H(j, k)^{\frac{1}{p}} \quad \text{Équation 41}$$

Après résolution de ce système d'équations, on obtient l'expression de $L(j, k)$ et de $H(j, k)$:

$$L(j, k) = \left(\frac{(pI_{3Dp}(j, k))^p}{I_{3D}(j, k)} \right)^{\frac{1}{p-1}} \quad \text{Équation 42}$$

$$\text{et} \quad H(j, k) = \left(\frac{I_{3D}(j, k)}{pI_{3Dp}(j, k)} \right)^{\frac{p}{p-1}} \quad \text{Équation 43}$$

L'équation 43 permet de modéliser l'effet d'écran qui affecte l'échantillon i . Si l'effet d'écran est inexistant (ou négligeable), la déviation $H(j,k)$ est une matrice dont les coefficients sont égaux à un (ou très proches de l'unité) et les MEEF de l'échantillon original et de l'échantillon dilué sont (presque) identiques à un facteur p près.

L'équation 42, quant à elle, permet de calculer directement le terme linéaire $L(j,k)$ du modèle, sans calcul préalable de la déviation $H(j,k)$. Le terme $L(j,k)$ représente donc la MEEF de l'échantillon corrigée de l'effet d'écran interne. Cela signifie que le terme $L(j,k)$ est une grandeur trilineaire qui peut être traitée par PARAFAC.

III.C.2.d.iii Limitations

Cette méthode développée par X. Luciani (2008) permet de corriger l'effet d'écran interne d'un échantillon (Luciani, 2007 et 2009). Cependant, la principale limitation de cette approche tient au fait qu'elle nécessite la dilution de l'échantillon. En plus du temps exigée par la préparation et la mesure de la MEEF dilué s'ajoutent des modifications physico-chimiques de l'échantillon due à la dilution, comme par exemple celle du pH, de la température, de la salinité, et de la quantité de gaz dissous. Ceci peut éventuellement entraîner une modification notable de l'intensité de fluorescence. Toutefois, il faut noter que ces modifications physico-chimiques peuvent avoir lieu dans un environnement de type estuarien. D'autre part, il ne semble pas y avoir de solution autre que la dilution de l'échantillon qui est utilisé par de nombreux auteurs apparemment sans modification sérieuses des propriétés optiques de l'échantillon (Cory et Mcknight, 2005, Luciani et al., 2008, 2009).

III.C.3 Limitation due à la variabilité des spectres

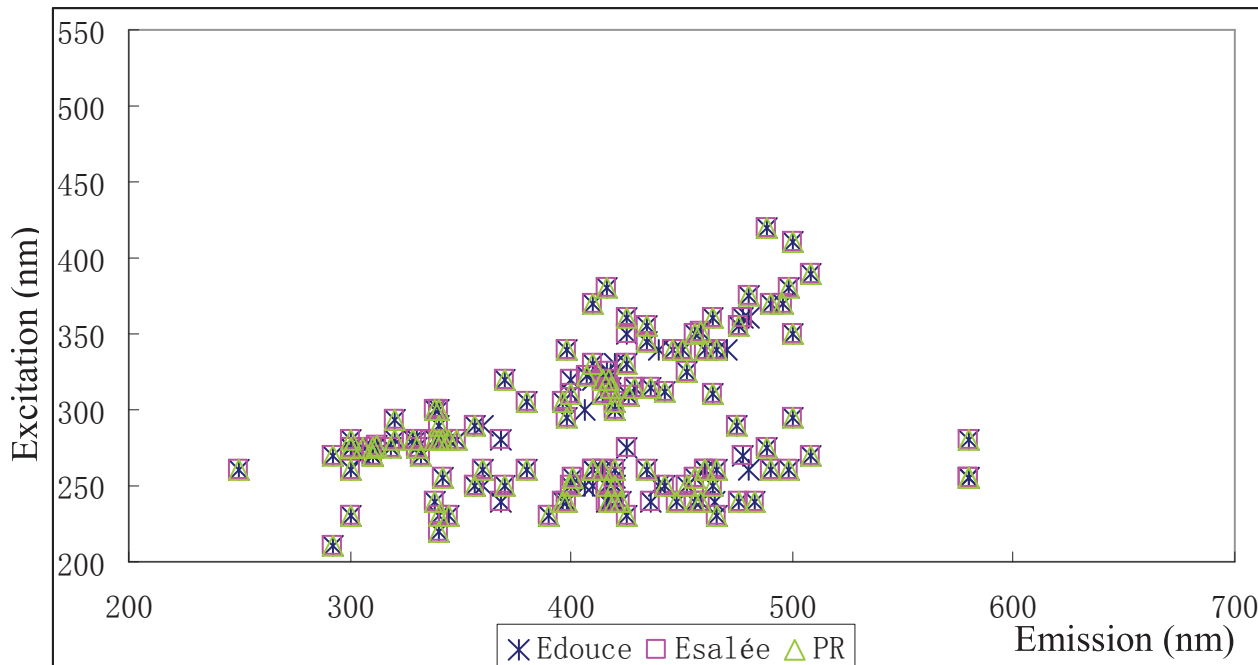


Figure 23: Positions des maxima obtenus par la méthode PARAFAC
Edouce : eau douce ; Esalée : eau salée ; PR, différents produits de référence.

Les pics historiques trouvés par PARAFAC sont rassemblés dans une MEEF (Figure 23) pour montrer leur position de pic dans différents environnements (Annexe 3 – Tableau des références « peak-picking » et PARAFAC). Ces positions de pics sont pointées par les maxima de chaque fluorophore.

En comparant cette présentation avec celle du peak-picking (**Figure 20**), on voit que les pics dans les longueurs d'onde d'excitation sont plus proches. Cependant, les différences entre les deux méthodes ne sont pas importantes.

L'algorithme PARAFAC permet de séparer les différentes sources spectrales contenues dans les MEEF à condition que celles-ci ne soient pas (ou plus) affectées par l'effet d'écran interne. Cependant, quelle que soit la méthode de correction de l'effet d'écran appliquée aux MEEF mesurées, il subsistera toujours une information inconnue liée à la variabilité des spectres d'excitation et d'émission qui caractérisent les échantillons. Or, rappelons-le, PARAFAC est capable d'excellentes performances uniquement si ces spectres sont communs à tous les échantillons. Si les variations du profil des spectres sont suffisamment importantes entre deux groupes d'échantillons, par exemple, PARAFAC et ses outils de diagnostic vont mettre en évidence la présence de fluorophores supplémentaires. Dans le cas où ses variations sont plus subtiles, aucun fluorophore supplémentaire ne sera détecté. Cela signifie alors que les spectres calculés par PARAFAC correspondent à des moyennes de spectres puisque les spectres des fluorophores "proches" d'un point de vue spectral ne sont plus séparés. Cela implique aussi que les facteurs d'intensité associés à ces spectres "moyens" seront entachés d'erreurs.

Malgré tout, le traitement de données PARAFAC appliqué sur des spectres de fluorescence de la MOND permet de comparer les échantillons entre eux non plus seulement en mesurant un ou deux pics grâce à leur maximum de fluorescence (peak-picking par Coble, 1996), mais au travers des signaux complets de luminescence des composants PARAFAC. Cela améliore les connaissances de la MON en travaillant sur sa composition en fluorophores. Dans ce travail, PARAFAC a été appliqué à différentes séries d'échantillons en provenance de divers environnements. En effet, afin de connaître les limites du domaine d'application de l'outil PARAFAC, une étude de son comportement face à des séries hétérogènes a été menée en plus de l'étude environnementale de chaque campagne de prélèvements. De plus, une utilisation originale de PARAFAC a été faite sur une expérience de quenching de fluorescence montrant que PARAFAC n'est pas seulement un outil d'étude environnementale, mais aussi un outil de suivi moléculaire en laboratoire et qu'il est tout à fait possible d'utiliser les composants PARAFAC comme informations dans l'étude des interactions MOND-métaux traces. En effet, les propriétés complexantes de la MOND avec des métaux est un des sujets d'actualité (Seitz, 1981 ; Buffle, 1988 ; Mounier et al., 2010), car la réaction de la complexation influence fortement la biodisponibilité, la mobilité et le transport des ions métalliques (Stevenson, 1973 ; Senesi et al., 1990 ; Aldrich et al., 2002 ; Plaza et al., 2005). Parmi les méthodes employées pour étudier ces propriétés, le quenching de fluorescence est une technique souvent appliquée car rapide et facile à mettre en œuvre pour qui possède un spectrofluorimètre (Ryan & Weber, 1982 ; Cabaniss & Shuman, 1986, 1988 ; Senesi et al., 1992, 1994 ; Cabaniss & Shuman, 1986, 1988a,b,c, 1990 ; Cabaniss, 1992 ; Luster et al., 1996, Fukushima et al., 1997 ; Hernández et al., 2006).

Chapitre IV. Fluo 3D : ubiquité ou diversité ?

C'est par l'expérience que progressent la science et l'art.

- Aristote

L'objectif de cette étude est une meilleure connaissance de la composition de la MON dans la nature, et la comparaison de sa composition pour différents environnements naturels. Autrement dit, nous nous intéressons à la composition de la MON des échantillons d'une même campagne de prélèvement mais aussi des échantillons de plusieurs campagnes d'une même catégorie de milieux (eaux douce, sol, eaux salées, etc). La dernière étape de cette étude est donc le regroupement des MEEF de tous ces échantillons. Ce regroupement est une nouvelle façon d'interpréter la composition globale de la MON en fonction de ses origines.

Une MEEF contient les informations de toutes les longueurs d'onde d'excitation et d'émission acquises à la mesure et également les intensités correspondant aux longueurs d'onde obtenues par la mesure. Elle montre une image globale de la MONF dans l'échantillon étudié. Cette image nous permet de caractériser la MON sans perte d'information. Une des questions à la quelle nous tentons de répondre est : les MEEF de la MON peuvent-elles décrire les caractères de la MON en fonction de chaque origine ?

Pour mener à bien cette étude, nous utilisons le logiciel PARAFAC qui permet de décomposer les MEEF mesurées en contributions spectrales (spectres d'excitation et d'émission) de fluorophores ainsi que l'importance relative de ces fluorophores.

Ce chapitre présente tous les jeux de données, les paramètres d'acquisition des MEEF, l'élimination des MEEF comportant des problèmes des mesures aberrantes, le protocole d'utilisation de PARAFAC, l'importance de corriger l'effet d'écran, l'influence des hétérogénéités des MEEF de la MON et enfin les résultats et leurs premières interprétations.

IV.A Jeux de données (origines, proportions, pH d'origine, FI)

Les données sont rassemblées à partir des projets d'environnement du laboratoire PROTEE et de ses collaborations. Ces projets font partie d'études sur les eaux de mer (EM), les eaux douces (ED, de rivières, de sources ou de nappes), les eaux de sol (ES), les eaux côtières (EC), les eaux extraites (EE) et les eaux interstitielles de sédiments (EI).

Les prélèvements des échantillons demandent des protocoles rigoureux pour éviter les contaminations. Les protocoles sont différents selon les milieux.

Les échantillons de la MON des milieux aquatiques (EM, ED, ES, EC, EE et EI) sont tous prélevés et filtrés sur les sites d'études à l'aide d'un filtre en verre (les filtres en verre sont lavés et brûlés préalablement pour éviter la contamination de carbone) ou sans être filtrés (selon la concentration de COD estimée) avant d'être placés dans des tubes en verre lavés à l'acide nitrique de 10%, à l'eau MilliQ et brûlé à 490°C pendant 12 heures afin d'éviter les pollutions carboniques. Après les prélèvements, les échantillons sont empoisonnés par 0.1 mol.L⁻¹ d'azide de sodium (NaN₃) et sont gardés dans l'obscurité et au froid jusqu'au moment de la mesure pour éviter les effets micro-biologiques, d'oxydation et de photolyse qui peuvent modifier les informations spectrales de MEEF. Les pH et les forces ioniques sont conservés à condition naturelle.

Les échantillons des extraits de sol ou de sédiment (EE) sont obtenus dans le laboratoire à partir des solides prétraités (séchage, séparation par densité, conservation dans l'obscurité et au froid) avec de l'acide ou de la soude selon le pH de l'extraction pour récupérer l'AH, l'AF ou les SH totales. Les mélanges solides/liquides sont placés sous agitation pendant 12 heures pour que les solvants aient suffisamment de temps pour retirer la MON de la phase solide. Une séparation par filtration ou par centrifugation est réalisée pour récupérer la phase liquide qui contient la MON extraite.

Nom de milieu	Nom de mission	Durée d'analyse	Nombre de campagnes	Nombre de répertoires	Nombre d'échantillons	Nombre de MEEF
Eaux côtières	Croatie 2008	03-07/2008	2	2	16	32
	Croatie 2009	07/2009	2	1	84	168
	Rade de Toulon 2009 Eaux de mer	06/2009	1	1	17	34
Eaux de mer	DYCOMED	04/2008-05/2009	9	9	131	262
	MARSECO 1	02/2010	1	1	12	24
	MARSECO 2	03/2010	1	1	10	20
	MARSECO 3	04/2010	1	1	19	38
Eaux de sol	Brésil SGC 2007	03/2010	2	2	69	138
	Brésil SGC 2008 [#]	05/2008	1	1	56	112
	Brésil LINS 071219	19-12-07	1	1	35	70
	Brésil LINS 080430	30-04-08	1	1	42	84
	Brésil LINS 090616	16-06-09	1	1	42	84
Eaux douces	BasVar 2008	01-05/2008	3	3	59	118
	BasVar 2009	03/2009	1	1	36	72
	BasVar 2009 Hebdo	01-04/2009	9	1	45	90
	Bosnie 2009	07/2009	1	1	10	20
	Brésil SGC 2009	06/2009	1	1	65	130
	Cameroun 2008 [*]	03-07/2008	1	1	63	126
	Croatie grottes 2008	07/2008	1	1	24	48
	Croatie grottes 2009	06/2009	1	1	19	38
	Croatie grottes 2010	07/2010	1	1	9	18
	GIRAC	09-11/2009	3	1	81	162
Norvège Aurora 2010	02/2010	1	1	29	58	
Eaux extraites	Toulon Tunisie (TT) ARCUS 2010	02/2010	1	1	47	94
	Brésil LINS SI et E66 07-09	12/2007-06/2009	1	1	13	26
	Brésil LINS SI et E66 10	06/2010	1	1	118	236
Eaux interstitielles	Croatie-Marina 2010 EI	02/2010	1	1	11	22
	Croatie-Martinska 2010 EI	03/2010	1	1	10	20
	Rade de Toulon 2009 Eaux interstitielles	2009	1	1	93	186

Total: 51 41 1265 2530

Total appliqué (Total-*-#) : 49 38 1146 2292

Tableau 3: Tableau des missions appliquées aux mesures de MEEF

* et # : missions non prises en compte par la suite pour des raisons techniques de compatibilité.

Les eaux de sol (ES) sont prélevées avec un système de bougie poreuse insérée dans le sol qui contient de l'eau en équilibre avec celle du sol. Ces eaux sont filtrées et stockées comme dans le protocole pour les échantillons liquides expliqué précédemment.

Les eaux interstitielles (EI) de sédiments sont retirées à partir de sa colonne de sédiment qui était conservée sans contact avec l'oxygène jusqu'au laboratoire. Les mélanges eaux-sédiments sont prélevés à deux profondeurs, soit 20 mm soit 50 mm. Chaque tranche est séparée par centrifugation de 15 min à 4000 tour.min⁻¹.

Les missions sont classées en fonction de leur milieu incluant les noms des missions, comme par exemple : DYCOMED, Rade de Toulon 2009 EDM, BasVar (2008, 2009 et 2009 Hebdo), Bosnie 2009, Croatie Grotte (2008, 2009), Croatie (2008, 2009), Brésil 2010, Brésil LINS SI et E66 (2007-2010), Rade de Toulon 2009 EIS, etc. (**Tableau 3**).

Pour mieux comprendre les catégories de ces missions et la MON contenue dans les études, certains sites de prélèvements sont décrits ci-dessous.

IV.A.1 Croatie estuaire (EC) et ses eaux interstitielles de sédiment (EI)

L'estuaire de la rivière Krka se situe à l'est de la mer Adriatique, en face de la côte est de l'Italie. La rivière Krka amène une grande quantité d'eau douce dans la mer Adriatique et par conséquent à toute la mer Méditerranée. Bien qu'il y ait peu de pollution le long de la rivière, cet estuaire est entouré par des habitations, des activités touristiques et également des transports commerciaux. La qualité de l'eau dans cet estuaire intéresse les scientifiques depuis de nombreuses années (Garnier et al., 2004 ; Louis et al., 2008). La collaboration avec l'institut Ruđer Bošković (Croatie) permet l'accès sur ce site et donc les analyses de cet environnement estuarien.

Dans cette étude, trois points sont choisis pour comparer les résultats entre eux (**Figure 24**). Le premier point de ces trois sites (**Figure 24**, point 1) représente la masse d'eau douce dans la rivière Krka avant la rentrée dans l'estuaire. Ce site est choisi avant la dernière chute d'eau pour éviter la possibilité d'un mélange avec l'eau de mer. Deux points de prélèvements (« Martinska » et « ŠibenikHarbour » = « Marina ») se situent dans l'estuaire et sont étudiés chacun sur la colonne avec un profil vertical pour mieux comprendre les influences des activités humaines sur la MON dans cet estuaire. Le point 3 éloigné de l'estuaire est situé entre deux îles afin d'éviter l'influence directe de l'estuaire. Les point 1 et 3 sont des témoins de comparaison.

Les prélèvements en profondeur sont réalisés manuellement par un plongeur. Chaque flacon (prétraité et vidé) est ouvert à la profondeur de prélèvement afin que l'eau d'échantillon remplisse ce flacon. Les flacons sont bouchés avant d'être amenés en surface. Les empoisonnement et les filtrations sont faits une fois les flacons arrivés en surface. Les échantillons sont gardés dans l'obscurité et au froid jusqu'en France pour les mesures de fluorescence.

Les eaux intersititielles de sédiment sont prélevées et stockées suivant le protocole standard. Au lieu de prélever avec des machines spéciales, les sédiments d'estuaire Krka sont prélevés par plongeur.

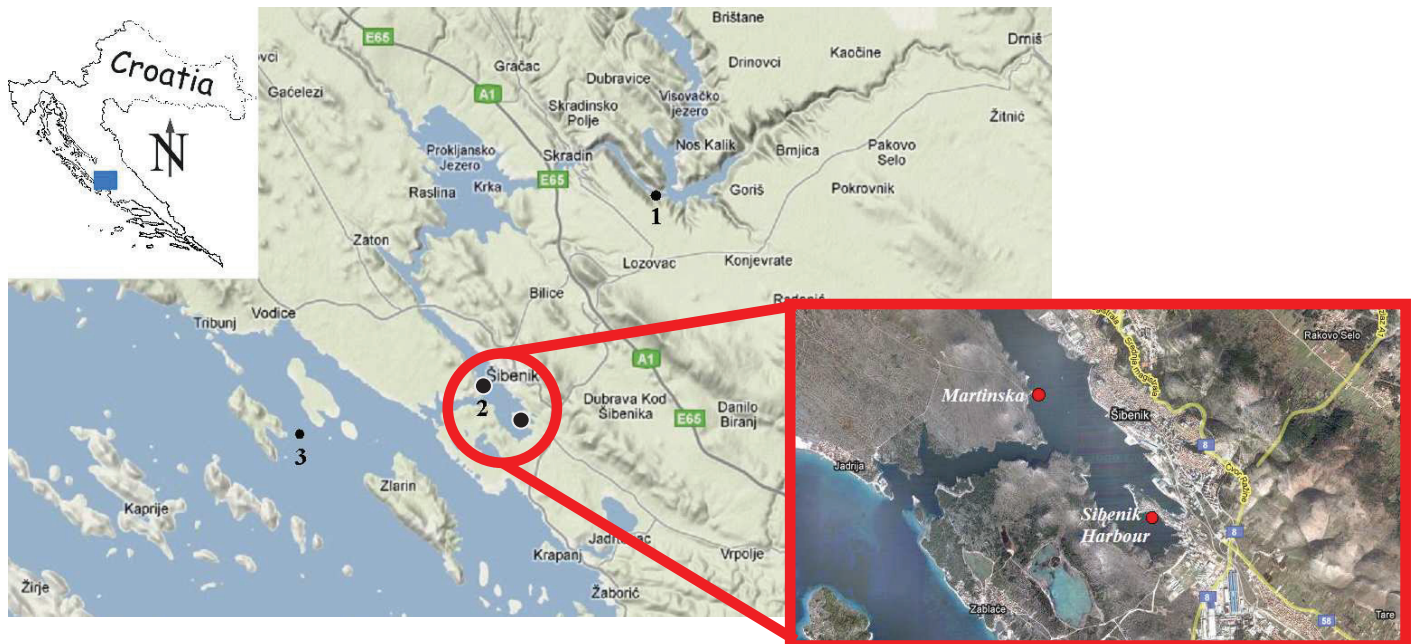


Figure 24: Plan des sites de prélèvement du projet Croatie estuaire

1 – site de l'eau douce de la rivière Krka, 2 – site des colonnes d'eau dans un profil de l'estuaire Krka, 3 – site de l'eau de mer.

Point 1 (coordonnées GPS : 43°48'12.42 N, 15°58'18.48 E) est dans la rivière Krka avant la dernière chute d'eau avant rentrer dans l'estuaire. Il représente une masse d'eau douce en train de rejoindre dans la mer ;

Point 2a (coordonnées GPS : 43°44'07.92 N, 15°52'39.61 E) correspondant à une site de mélange par l'eau douce de rivière et l'eau de mer, se situe à côté de la station scientifique marine "Martinska" (Institut Ruđer Bošković) en face du village Šibenik town; Point 2b (coordonnées GPS : 43°43'09.73 N, 15°53'57.04 E) est un site touristique avec la présence de beaucoup d'activités humaines;

Point 3 (coordonnées GPS : 43°42'44.88 N, 15°47'43.98 E) représentant une référence de masse d'eau de mer est un point dans la mer sans l'influence directe de l'estuaire.

Pendant les années 2008 et 2009, deux campagnes de prélèvements de l'eau de mer sont réalisées. Les eaux interstitielles de sédiment sont prélevées lors d'une campagne en février 2010. Les mesures de fluorescence sont faites sur tous ces échantillons. Ces échantillons sont classés dans les catégories du milieu des eaux côtières (EC).

IV.A.2 Rade de Toulon (EM)

L'étude des eaux de mer dans la rade de Toulon a pour objectif de comprendre les influences anthropogéniques sur les communautés microbiologiques ou phytoplanctoniques. La rade de Toulon est une rade naturellement fermée par sa condition géographique. Elle contient de nombreuses activités humaines telles que le port de Toulon, le port militaire, les transports communs en bateau concentrés plutôt dans la petite rade, certaines activités aqua-sportives (ex. : pêches, peignades, plongés) dans la grande rade ainsi qu'une activité de transport longue distance. Les analyses de la MON par la fluorescence sont des informations complémentaires nécessaires pour ce projet.

Les 14 points de prélèvements sont choisis en partant de la grande rade vers la petite rade (Figure 25). Les points 8 et 13 sont prélevés à 3 profondeurs jusqu'à 8 m, filtrés sur un filtre de 0,45µm, empoisonnés et conservés après filtration dans des flacons prétraités. Dans cette étude, 17 échantillons sont prélevés et mesurés, puis classés dans le milieu des eaux EI salées.

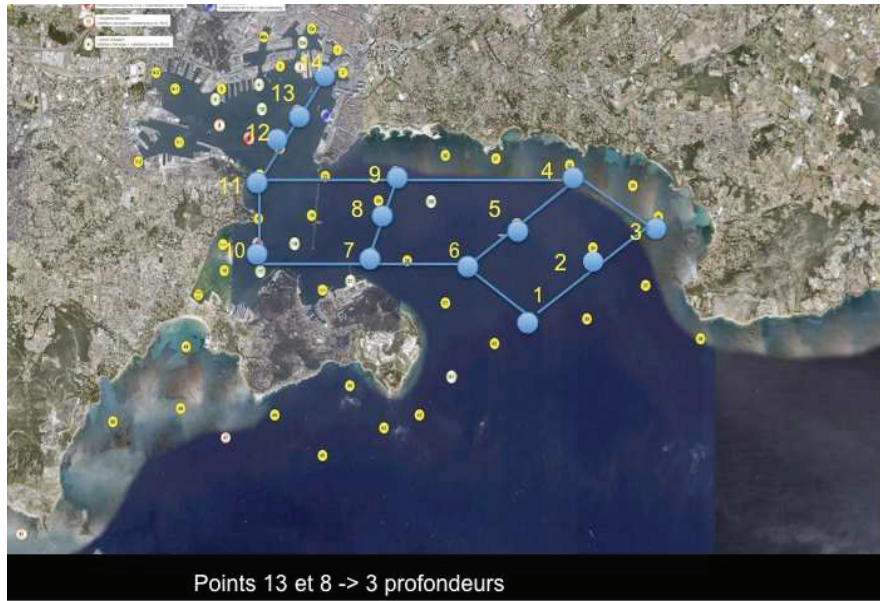


Figure 25: Site des prélèvements de l'eau de mer dans la rade de Toulon

IV.A.3 DYCOMED (EM)

Le projet DYCOMED (Dynamics of organic carbon in the Mediterranean Sea) est le fait d'une collaboration entre l'Ifremer et l'observatoire océanologie à Villefranche sur mer (LOV). Il est basé sur le site DYFAMED (Dynamics of Atmospheric Fluxes in the Mediterranean Sea) situé dans la zone centrale du bassin Ligurien ($43^{\circ}25'N$, $7^{\circ}52' E$) au nord-ouest de la mer Méditerranée (Figure 26). Ce site est dans une zone séparée des côtes en raison du circuit d'eau ligurien (Figure 26, flèches bleues).

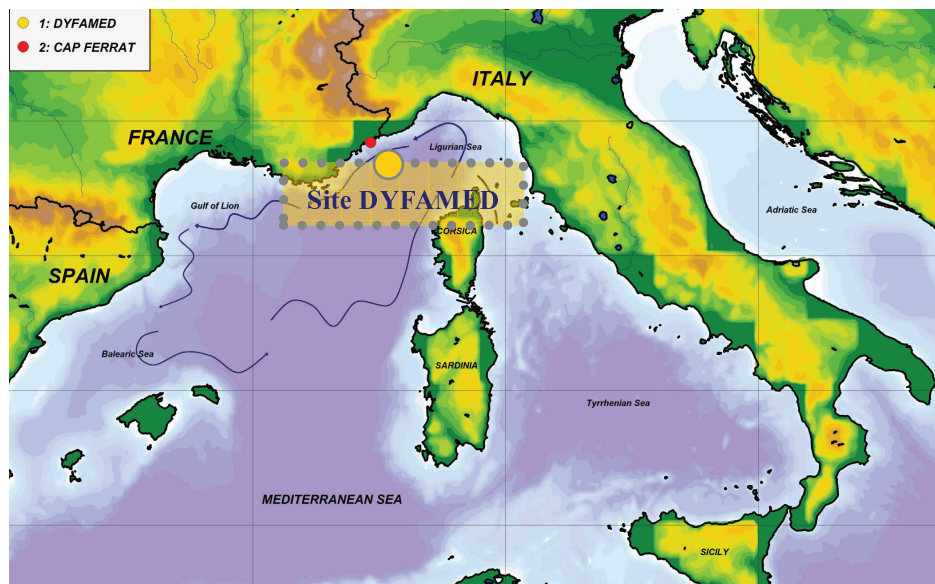


Figure 26: Location du site DYFAMED

Ce courant coupe le contact entre le site DYFAMED et le site côtier CAP FERRAT par un rapide changement horizontal de densité de matière (Lévy et al., 1998; Sournia et al., 1990; Niewiadomska et al., 2008) et il n'y a pas de grande masse d'eau douce apportée dans le bassin (Copin-Montégut, 1988). En conséquence, l'influence côtière est négligeable la plupart de temps en ce point (Avril et

al., 2002).

Ces caractéristiques particulières du site DYFAMED permettent d'analyser une colonne d'eau de mer ouverte jusqu'à 2200 m de profondeur afin de connaître la distribution et le rôle de la MON suivant la profondeur.

Les échantillons de ce projet sont prélevés par 12 bouteilles Niskin attachées ensemble (**Figure 27**). Ces bouteilles sont plongées jusqu'à 2200 m de profondeur. Chaque bouteille est remplie à une profondeur d'analyse prédéfinie soit 12 profondeurs. Les profondeurs sont choisies autour de -3 m, -10 m, -30 m, -50 m, -100 m, -200 m, -400 m, -600 m, -1000 m, -1500 m, -2000 m et -2200 m. Des variations de profondeurs sont réalisées pour mieux observer des modifications dynamiques de la MON. Une sonde in-situ attachée avec les bouteilles Niskin mesure les paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité, etc). Les échantillons sont transmis sans être filtrés dans les tubes lavés et brûlés. Ils sont empoisonnés et stockés comme expliqué précédemment. Ces échantillons contenant peu de particules ne nécessitent pas de filtration.



Figure 27: Bouteilles Niskin attachées et lancées dans la mer sur le site DYFAMED

Les mesures de fluorescence sont faites pour 9 campagnes de prélèvement qui couvrent les mois d'avril à novembre 2008 et mai 2009. Un triplicat a été réalisé pour la campagne en octobre 2008. 131 MEEF sont obtenues au total, pour ce site. Ces échantillons sont également classés dans le milieu des eaux de mer et le groupe des eaux salées.

IV.A.4 GIRAC (ED) et MARSECO (EM)

Les programmes MARSECO et GIRAC portent sur l'étude et le suivi des rejets urbains en milieu côtier. Marseille étant la troisième plus grande ville de France, il a été prévu l'étude des rejets de la station d'épuration de la ville sur les flux entrants (GIRAC) et sur leur devenir en mer (MARSECO). GIRAC est un projet FUI qui analyse la qualité des rejets urbains composés des eaux fluviales, des rejets de la station d'épuration et des fleuves Huveaune et Jarret (**Figure 28**). MARSECO est un programme ANR qui étudie les mécanismes de dispersion au niveau des zones côtières de la région de Marseille en analysant la qualité des eaux de mélange de l'exotoire de Cortiou. Les échantillons d'eau ont subi le protocole de prélèvement et de conservation des échantillons aquatiques avant d'être mesurés par spectrofluorimétrie. Ils correspondent à des prélèvements en régime d'étiage et de crue. Les prélèvements sont faits selon un gradient de salinité permettant de suivre les phénomènes de mélange.



Figure 28: Plan des sites de prélèvement du projet MARSECO (France).

IV.A.5 Zone tropicale (Brésil)

IV.A.5.a Brésil SGC

Les échantillons du bassin du Rio Negro sont prélevés dans la ville Sao Gabriel (Brésil). Ces prélèvements sont autorisés dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire PROTEE et NUPEGEL (Núcleo de Pesquisa em Geoquímica e Geofísica da Litosfera) pour étudier la qualité de l'eau de rivière, le rôle de la MON dans le cycle du carbone et la formation des sols.

Le prélèvement des eaux de la rivière suit le protocole standard. Les filtrations sont faites par les filtres avec un diamètre de $0,77\mu\text{M}$ pour conserver le maximum de MOND.

Ces échantillons sont classés dans le milieu des eaux douces et le groupe non-salé.

IV.A.5.b Sao Gabriel (ES, Eau de sols tropicaux type podzols)

Dans le cadre de l'étude des formations de sols de type podzol (Bardy et al., 2008), des prélèvements d'eau de sols ont été effectués à l'aide de lysimètre. Les prélèvements sont situés à proximité de la ville de Sao Gabriel da Cachoeira (Brésil) sur un site podzolique pour lequel la toposéquence du sol a été déterminée (Montes et al., 2007). Durant des périodes d'une semaine, des prélèvements quotidiens ont été effectués à différents niveaux de la toposéquence. Par succion, l'eau est amenée dans un flacon récepteur. Puis, elle est filtrée sur place et conditionnée pour une analyse ultérieure en laboratoire. Ces échantillons sont classés dans le milieu des eaux de sol et le groupe des eaux non-salées.

IV.A.6 BasVar (ED, Eaux de nappe dans une zone tempérée)

Le Var, un fleuve important dans la région Provence Alpes Côtes d'Azur (PACA), représente un grand volume d'eau qui sert potentiellement de source d'eau potable au département des Alpes-Maritimes où se situent les grandes villes de Nice, Cannes et Monaco. Le programme BaVar financé par la région PACA et collaboré avec différents laboratoires publiques et privés tente de tracer les différentes masses d'eau afin de comprendre le fonctionnement hydrologique des nappes phréatiques en présence des différentes formations géologiques contrastées qui se trouvent autour du fleuve et des nappes,. Parmi les paramètres à l'étude, la fluorescence de la matière organique dissoute combinée à l'analyse des éléments métalliques traces est l'un des plus prometteurs.

Les prélèvements sont faits en différents points au long de 24 km en amont de l'embouchure jusqu'à la mer comme indiqué sur la carte (Figure 29). Les échantillons de nappe sont choisis selon leur situation à droite ou à gauche de la rivière ou encore la formation particulière de source comme les poudingues. Des sources karstiques sont également prélevées pour les comparer avec les autres types de sites.

Les mesures de fluorescence sont appliquées sur 13 campagnes dont 3 campagnes de janvier à mai 2008, 1 en mars 2009 et 9 campagnes en suivi hebdomadaire sur 4 points d'intérêt. Ces prélèvements sont considérés comme représentant des eaux douces continentales à faible conductivité.

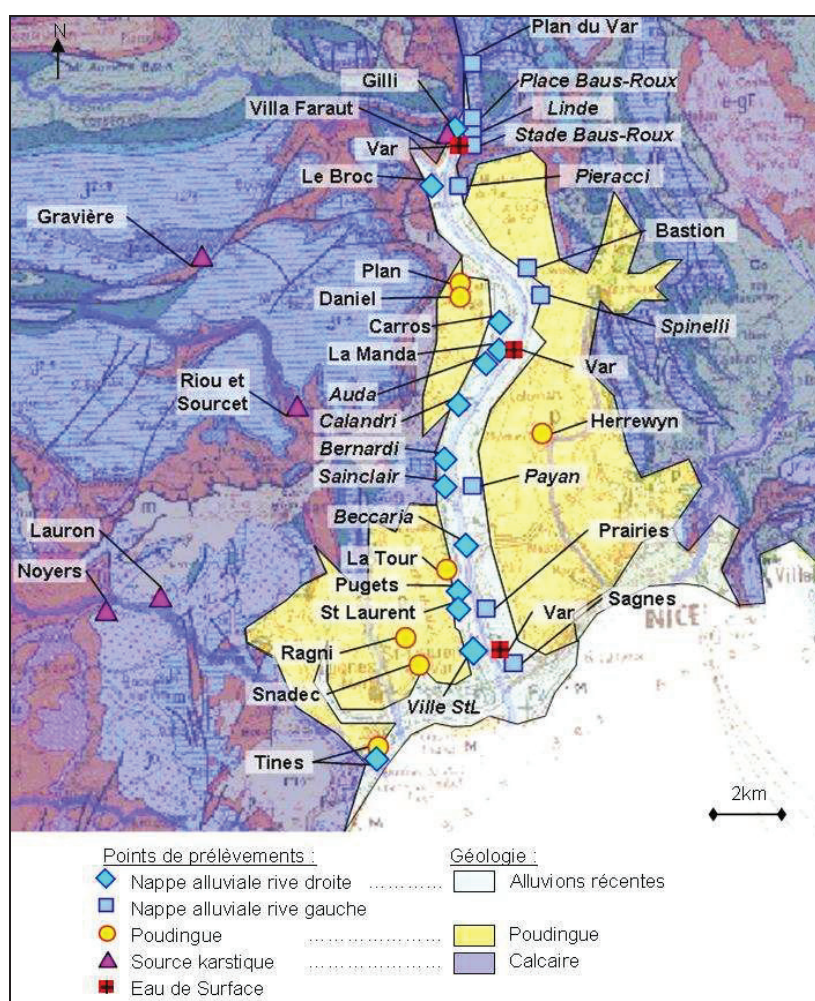


Figure 29: Plan des sites de prélèvement du projet BasVar

IV.A.7 Bosnie (ED)

Les prélèvements effectués en 2009 en Bosnie sont effectués le long du parcours d'une petite rivière alimentée par de nombreuses sources aux propriétés physico-chimiques très contrastées. Les mesures de fluorescence sont en complément des analyses pour le suivi de cette rivière. Le type de matière organique, bien que continentale, a également une composition contrastée. En particulier, il est attendu une corrélation entre la MON et la concentration en arsenic (As) de ces eaux particulièrement chargées. Ces échantillons représentent des eaux continentales de zone tempérée à faible conductivité.

IV.A.8 Grottes croates (ED)

Des échantillons provenant de grottes croates ont été prélevés en 2009. Dans ces grottes, la profondeur des nappes peut atteindre plusieurs dizaines de mètres. Le fond de ces systèmes karstiques est en contact avec l'eau de mer et montre une salinité croissante dépendant principalement des apports en eau douce du système de surface. Les eaux de ces grottes sont particulièrement stratifiées. A l'aide de plongeurs, il a été possible de prélever à plusieurs profondeurs des échantillons d'eau pour des analyses physico-chimiques, et des mesures de fluorescence 3D. Une fois prélevées, ces eaux sont empoisonnées, filtrées et stockées suivant le protocole standard.

Les échantillons contenant des eaux douces en surface et des eaux plus mélangées en profondeur sont tous classés dans la catégorie des eaux douces à faible conductivité dans les regroupements pour les traitements statistiques, car du point de vue de l'environnement, ces eaux peuvent être plutôt influencées par des eaux douces. Cependant, tous les résultats vont être analysés plus en détail dans les rapports du projet.

IV.A.9 AURORA (ED)

Le programme AURORA est une collaboration entre le département de chimie de l'Université Norvégienne des Sciences et Technologies (Department of Chemistry – Norwegian University of Sciences and Technology – Norway) et le laboratoire PROTEE.

L'objectif de cette étude est d'analyser et d'observer les influences anthropogéniques des rivières urbaines sur les eaux du fjord de Trondheim. Dans ce projet, des prélèvements au long des neuf rivières urbaines (**Figure 30**) ont été réalisés en été 2009. Cette campagne comporte 29 échantillons prélevés et conservés suivant le protocole des échantillons aquatiques. Ces échantillons sont classés dans la catégorie des eaux douces continentales. Ils représentent toutefois les eaux côtières de zone sub-polaire.

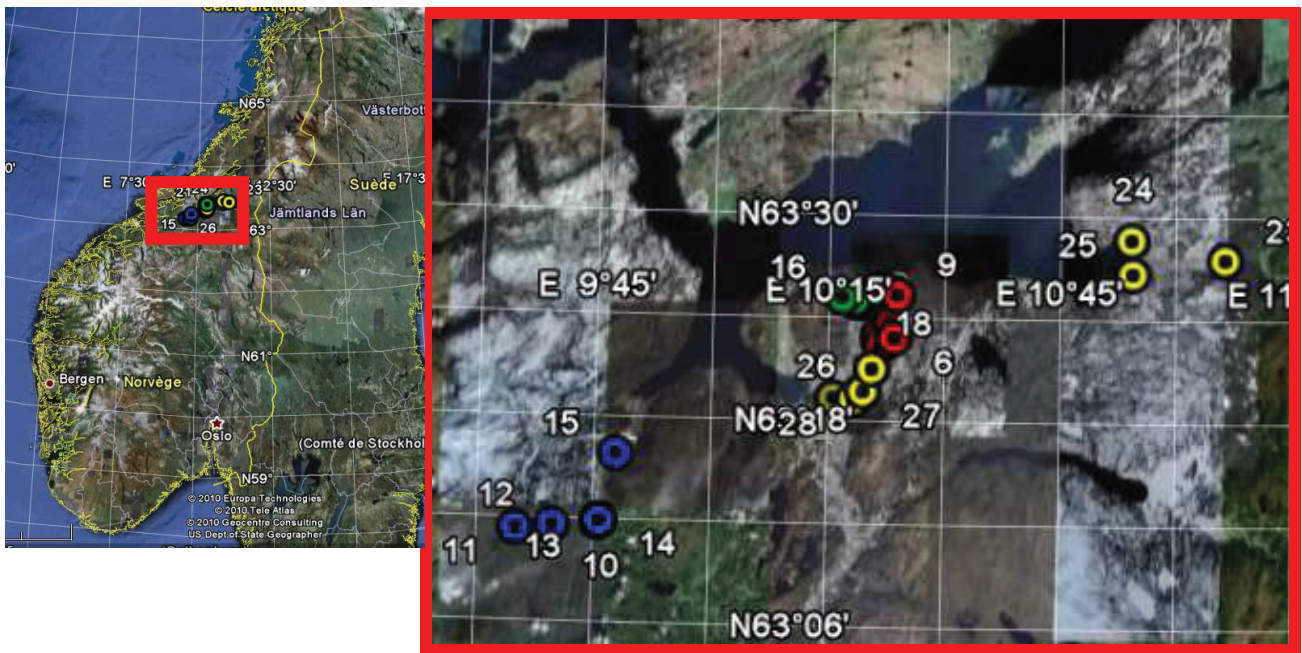


Figure 30: Plan des sites de prélèvement du projet AURORA (Norvège).

IV.A.10 Brésil LINS

Les échantillons en provenance du programme de fertirrigation mené à Lins (Brésil) sont des eaux de sols obtenues à l'aide de bougies poreuses implantés à différentes profondeurs et sur des parcelles irriguées, non-irriguées ou alimentées par des eaux de lagunage de traitement des rejets urbains. Les analyses de fluorescence de ces eaux font déjà l'objet d'un travail de thèse en complément des autres analyses physico-chimiques (Noirtin, 2010). Le but du travail était de suivre l'influence de la fertirrigation sur la matière organique des sols. Deux types d'échantillons proviennent de ce travail. Les eaux de sols à proprement parlé, provenant des bougies poreuses et prélevées régulièrement pour analyse, et des matières organiques extraites à partir d'échantillons de sols. Ces derniers échantillons sont obtenus par une extraction à la soude d'une masse connue de sols, ou de fraction de sols de densités différentes (Noirtin, 2009). Les eaux de sols représentent le groupe des eaux de sols tropicales urbaines et les extraits le groupe des MON extraites de sol.

IV.A.11 Rade de Toulon (Eaux interstitielles)

Les échantillons de ces eaux interstitielles sont prélevés à partir des sédiments de la rade de Toulon dans le cadre du projet CARTOCHIM rassemblant le laboratoire PROTEE, la Marine Nationale et l'IFREMER. Cette étude menée par Erwan Tessier fait l'objet d'une thèse en cours au laboratoire PROTEE.

Les eaux interstitielles sont obtenues par le protocole standard et conservées au frais et dans l'obscurité jusqu'au moment des mesures de la fluorescence.

Les prélèvements sont commencés en 2008 couvrant l'ensemble des fonds de la petite et grande rade de Toulon. Les échantillons sont analysés par fluorescence et représentent la MON à forte conductivité. Une campagne est réalisée chaque année et les échantillons sont analysés par la fluorescence et classés dans le milieu EI et l'eau salée.

IV.B Paramètres d'acquisition des MEEF

Les paramètres d'acquisition des MEEF ont été standardisés aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission, les résolutions spectrales, la vitesse de balayage, le temps de réponse, les largeurs de fente des monochromateurs, la tension appliquée au tube PM afin de les appliquer sur l'ensemble des échantillons. En effet, chaque changement de ces paramètres peut modifier les intensités et formes des MEEF. C'est pour cela qu'il est important pour le traitement des données de fluorescence de bien respecter cette contrainte. Ils doivent être identiques du début jusqu'à la fin des mesures de MEEF, en particulier si l'on traite les mesures par le logiciel PARAFAC. Le choix de ces paramètres d'acquisition (Tableau 4) se fait à l'issue de mesures préalables, et sont un compromis entre la résolution des mesures et le temps d'analyse d'une MEEF.

Le spectrofluorimètre utilisé est le modèle HITACHI F-4500, qui corrige automatiquement la variation de l'intensité lumineuse en excitation.

Les intervalles spectraux d'excitation et d'émission ont été choisis de telle sorte qu'ils contiennent les pics de fluorescence les plus représentatifs de MON (Coble, 1996). Autrement dit, la majorité de pics représentant les MONF se situe dans ces intervalles. Après différentes mesures préalables, les longueurs d'onde d'excitation sont définies dans l'intervalle allant de 200 à 500 nm (une suppression des signaux aux basses longueurs d'onde est appliquée à cause des influences de bruits), et les longueurs d'onde d'émission allant de 250 à 600 nm, par pas de 5 nm dans les deux cas.

Les MEEF sont construites en mesurant une série de spectres d'émission pour une longueur d'onde d'excitation fixée qui varie par pas de 5 nm. La vitesse de balayage est fixée à $2400 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Elle est un compromis entre la vitesse de balayage et le rapport signal/bruit de l'appareil.

Le temps de réponse a été choisi et fixé à des fins de comparaison et d'analyse des données, l'option automatique qui laisse l'appareil définir la valeur n'a pas été sélectionnée. Le temps d'intégration choisi et le temps le plus grand n'entraînant pas de déformation de pic à la vitesse de $2400 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$. Il est donc fixé à 0.1 s pour toutes les MEEF mesurées au cours de ce travail.

La tension appliquée au photomultiplicateur est fixée à 700 V.

Les fentes d'excitation et d'émission influencent par définition la résolution finale en longueur d'onde. Comme la résolution de sortie des MEEF qui seront traitées par PARAFAC est de 5 nm, il est inutile de prendre de fente plus petite, cela diminuerait le signal pour une meilleure résolution qui sera perdu par la suite, et il n'est inutile de prendre une résolution plus grande que 5 nm, car cela reviendrait à traiter des données à une résolution meilleure que celle des conditions d'acquisition. En conclusion, les fentes sont fixées à 5 nm pour l'excitation et l'émission.

Paramètres d'acquisition de MEEF			
Début de λ_{EX} :	200.0 nm	Vitesse:	2400 nm/min
Fin de λ_{EX} :	500.0 nm	Fente EX:	5.0 nm
Intervalle de λ_{EX} :	5.0 nm	Fente EM:	5.0 nm
Début de λ_{EM} :	250.0 nm	Tube PM:	700 V
Fin de λ_{EM} :	600.0 nm	Temps d'intégration:	0.1 s
Intervalle de λ_{EM} :	5.0 nm		

Tableau 4: Paramètres d'acquisition des mesures de MEEF

Les échantillons de MON sont placés dans une cuve en quartz miroitée avec deux faces adjacentes recouvertes par une couche d'argent (Hellma, 101R-QS, Tableau 5). Contrairement au verre, le

quartz suprasil, n'absorbe pas les UV ce qui permet l'analyse des propriétés optiques dans ce domaine de rayonnement. Dans ce travail, les mesures sont de plus faites avec des cuves miroitées car ce type de cuve augmente la sensibilité en redirigeant vers l'échantillon et vers le détecteur respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission.

Order Number	101R-10-40
Type	101R-QS
<hr/>	
Material Color Code:	■ QS ■
<hr/>	
Light Path:	10 x 10 mm
<hr/>	
Volume:	3500 µl
<hr/>	
Outer Dimensions:	
Height:	45 mm
Width:	12,5 mm
Depth:	12,5 mm
<hr/>	
Inner Dimensions:	
Width:	10 mm
<hr/>	
Base Thickness:	1,25 mm
<hr/>	
Number of windows:	2
<hr/>	




Tableau 5: Tableau des paramètres de cuve miroitée (Hellma)

IV.C Application de PARAFAC aux MEEF

Les MEEF une fois mesurées par un spectrofluorimètre sont toutes transformées en format texte afin d'être lues par le programme PARAFAC. Les textes contiennent le nom de fichier original, les paramètres de mesures, les valeurs de MEEF dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission et les intensités de fluorescence. Un groupe de MEEF, considéré comme un jeu de données, est stocké dans un dossier.

Afin de faciliter les étapes du traitement, un groupement des fichiers doit être réalisé d'abord – une MEEF et une MEEF du même échantillon dilué. Ce groupement cherche les fichiers en couple, c'est-à-dire un fichier de MEEF représentant un échantillon original et l'autre représentant la dilution de cet échantillon par deux. Les deux fichiers sont liés entre eux et ils représentent un échantillon.

Puis, la suppression des diffusions Rayleigh et Raman est effectuée. Cette suppression permet d'obtenir uniquement des informations sur la fluorescence sans influence des diffusions pour toutes les MEEF. Un filtrage de bruit est ensuite appliqué pour diminuer le bruit induit par la suppression des diffusions Rayleigh et Raman. Il s'avère que ce traitement améliore les performances de PARAFAC (Luciani, 2007).

Ensuite, les couples de MEEF sont ainsi filtrés pour corriger l'effet d'écran à l'aide de l'équation 42 (page 41). La MEEF corrigée est alors considérée comme la MEEF sans effet d'écran de l'échantillon et est introduite dans le programme statistique de décomposition PARAFAC.

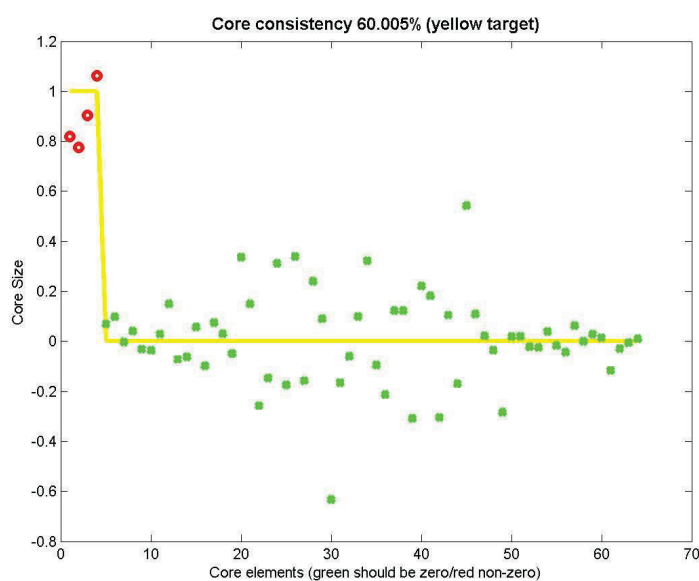


Figure 31: Exemple du résultat du corcondia (Core consistency)

Le nombre de fluorophores dans un jeu de données est estimé en analysant le résultat de la décomposition donné par PARAFAC en faisant varier de 2 à 6 le nombre de composants. Pour chacun de ces nombres, PARAFAC calcule un pourcentage appelé « corcondia » (Core consistency Diagnostic) qui détermine, selon un critère statistique, la qualité de la séparation des contributions spectrales. Comme il n'existe pas de méthode permettant de définir le nombre exact de composants PARAFAC, une approche systématique est adoptée dans ce travail : le nombre de fluorophores est choisi comme le nombre maximal qui donne un corcondia supérieur à 60% (Figure 31).

Tous les traitements de données sont montrés dans l'Annexe 3 – Tableau des références. Le choix de cette méthode de détermination du nombre de composants est arbitraire. Afin de comparer les divers traitements par la suite, ceci est nécessaire. Il faut remarquer qu'un traitement ou un choix spécifique pour chaque campagne bien plus adapté donnerait sans doute des résultats plus proches de l'échantillon dans une campagne. Mais il est différent lorsqu'on compare dans les regroupements par milieu ou par salinité.

IV.D Format de sortie du programme PARAFAC

Après chaque traitement, une série de résultats est obtenue permettant de vérifier la modélisation, la correction de l'effet d'écran et d'obtenir les MEEF des composants et leur contribution dans chaque MEEF d'origine. Ci-après est présenté l'exemple d'un traitement (nombre de fluorophores estimé à 2) de l'échantillon « Linde » dans la campagne BasVar 2008.

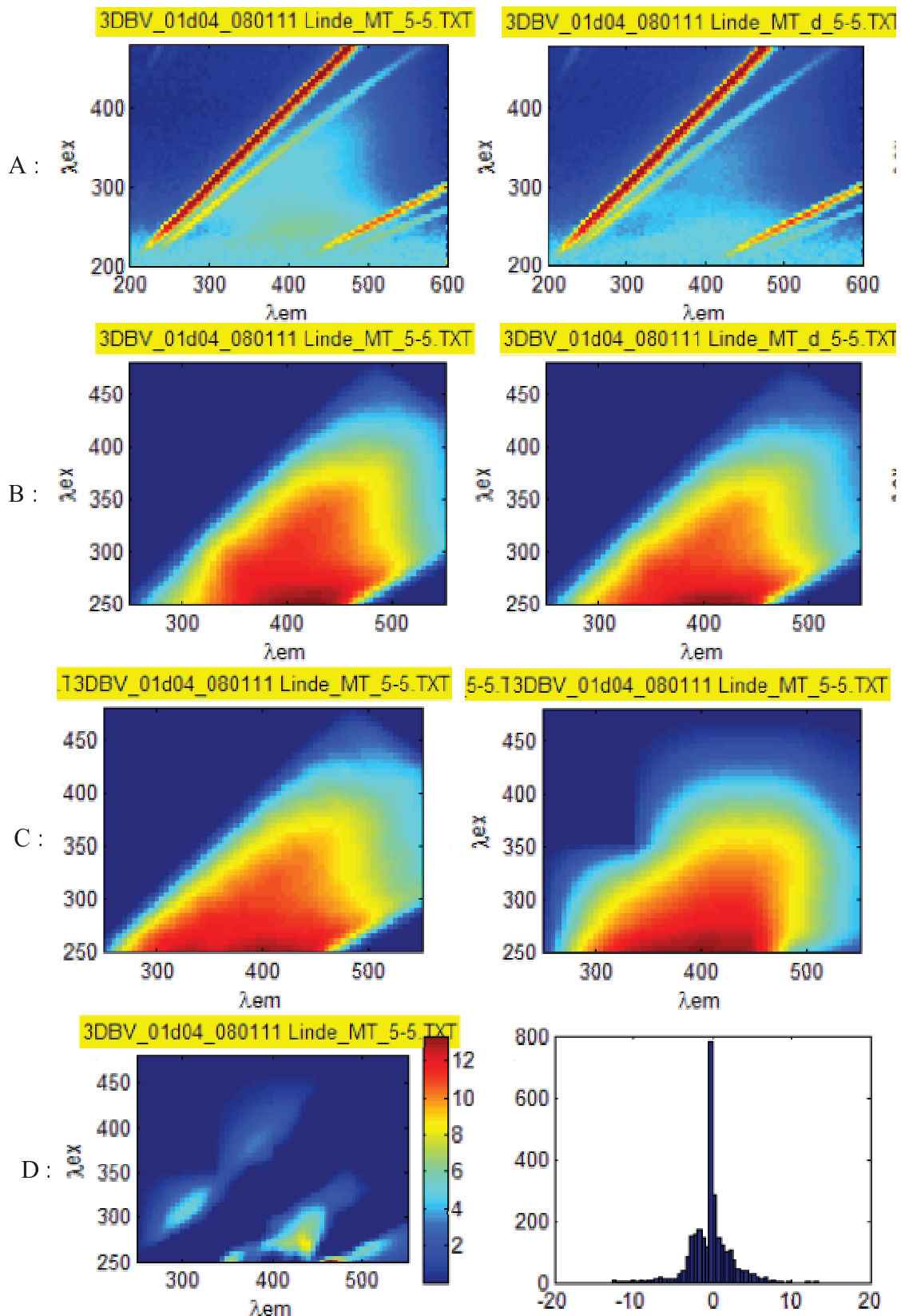


Figure 32: Images obtenues après les traitements de données de l'échantillon Linde (BasVar 2008)

A : Images des spectres originaux, concentration naturelle (gauche) et diluée (droite) ; B : Images filtrées des spectres ; C : Image corrigée de l'effet d'écran (gauche) et image reconstruite à partir des composants calculés par PARAFAC (droite) ; D : Différences spectrales entre l'échantillon et sa reconstitution (gauche) et distribution des valeurs de différences (droite).

Une fois le traitement achevé, une interface graphique permet de voir les spectres originaux à la concentration naturelle (Figure 32, A à gauche) ainsi que la dilution par deux (Figure 32, A à droite). Puis, sur la ligne suivante la résultante des spectres après élimination des diffusions physiques (Figure 32, B). Sur la ligne C (Figure 32) sont affichés la MEEF corrigée de l'effet d'écran (à gauche) qui a été utilisée dans le traitement PARAFAC et le résultat de la recombinaison du spectre MEEF à l'aide des composants PARAFAC (à droite). Enfin sur la ligne D, sont présentés à gauche la différence entre la MEEF mesurée et la MEEF reconstruite, et à droite l'histogramme de ces erreurs (Figure 32). Ce dernier graphique est un outil supplémentaire permettant de vérifier que la distribution des erreurs est monodale et centrée autour de la valeur 0. Dans l'exemple présenté dans la Figure 32, on peut remarquer en observant la ligne D qu'aux alentours des coordonnées ($\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440\text{nm}$) il existe un résidu formant un pic, bien que la distribution montre une forme d'apparence monodale.

Il faut noter que la qualité de MEEF obtenue par les mesures de spectrofluoromètre est importante, car PARAFAC est un outil qui utilise toutes les informations spectrales sans tri et donc des MEEF aberrantes peuvent influencer de traitement numérique. Un exemple est donné ci-dessous (Figure 33), deux traitements sont faits pour la mission des eaux extraites (eaux de la culture des phytoplanctons du projet Arcus Toulon-Tunisie). Le premier groupe de résultats contenant trois composants PARAFAC (ligne A) présente un pic ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/420\text{nm}$) déformé montrant une intensité élevée dans le fluorophore 2 : cela provient des MEEF bruitées par des impuretés. Le deuxième groupe représente quatre fluorophores après l'élimination des MEEF entachées d'erreurs de mesure. La différence des résultats PARAFAC avant et après le tri montre une nécessité d'attention sur les mesures.

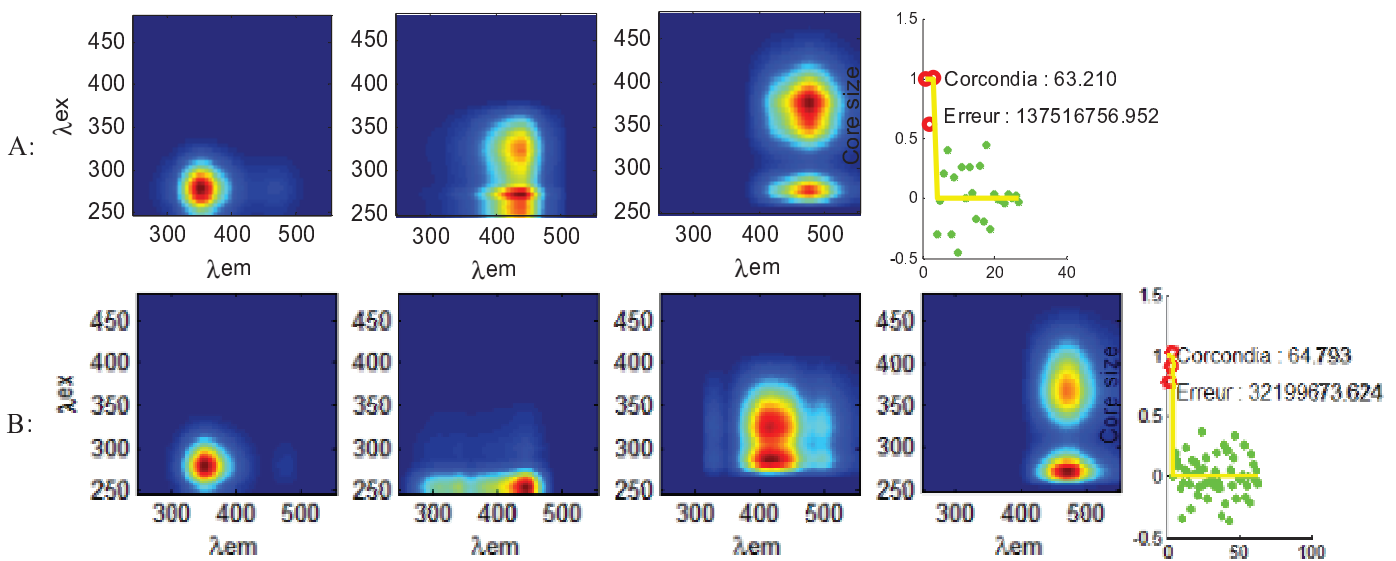


Figure 33: Comparaison des résultats avec et sans MEEF faussées
Ligne A représente les résultats avec des MEEF faussées et ligne B ceux-ci sans MEEF faussées
(Campagne Arcus Toulon-Tunisie)

IV.E Application PARAFAC : composants mission par mission

PARAFAC traite les jeux de données provenant des campagnes ou projets décrits précédemment. Certains résultats ont déjà fait l'objet de publication (Luciani et al., 2008) ou de communications lors de congrès (voir Annexe 4 – Posters). Toutefois, certains résultats précédemment publiés sont affectés par un défaut d'initialisation de PARAFAC qui est très sensible au bruit initial des MEEF introduites. Afin de travailler sur un ensemble homogène de données, l'ensemble des MEEF a été repris avec une paramétrisation différente de PARAFAC. En effet, il semble que la méthode soit moins sensible au bruit lorsque l'initialisation se fait avec l'option 4 de PARAFAC (les modes A, B et C sont initialisés avec des valeurs aléatoires). Les résultats montrés ci-dessous sont tous basés sur cette option PARAFAC, et peuvent parfois légèrement différer des résultats publiés précédemment. Ceci est un exemple de la nécessité de standardisation de la méthode de décomposition des MEEF à des fins de comparaison entre différents laboratoires, équipes ou même campagnes de prélèvement au sein d'un même laboratoire.

L'enjeu de ce travail étant la sensibilité des composants PARAFAC aux paramètres environnementaux, seuls les composants seront discutés sans leurs contributions pour éviter d'alourdir le texte.

IV.E.1 Eaux côtières – l'estuaire en Croatie 2008 – 2009

Les eaux de l'estuaire Krka sont prélevées chaque année dans l'estuaire Martinska. L'objectif de cette étude est d'analyser le système estuarien dû au mélange de l'eau douce amenée par la rivière Krka et de l'eau de mer. Les traitements des années 2008 (16 MEEF) et 2009 (84 MEEF) ont été faits séparément et donnent respectivement, deux et trois composants PARAFAC (**Figure 34** et **Figure 35**).

IV.E.1.a Croatie 2008

La campagne 2008 montre deux composants principaux (Figure 34) :

- le composant 1 : contient un pic vers $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250\text{nm}/350\text{nm}$ qui représente un des pics protéiniques de tryptophane (pic R selon Burdige, 2004) avec une partie du signal étalée de 400 nm à 450 nm qui peut être considéré comme des signaux bruités de fluorescence dans la zone UV des basses longueurs d'onde d'excitation ;
- le composant 2 : ce composant présente apparemment deux couples de fluorophores, un couple ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 305\text{nm}/405\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255\text{nm}/405\text{nm}$) représentant des acides humiques dits « marins » (pic M selon Coble, 1996 et pic A' selon Burdige, 2004) et un autre couple ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 325\text{nm}/460\text{nm}$ et $265\text{nm}/460\text{nm}$) faisant plus penser au fluorophore des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996).

Dans le cas du composant 2, PARAFAC n'est pas en mesure de séparer correctement les contributions de chacun des fluorophores, ceci est dû sans doute au fait que ces deux sources varient de manière concomitante dans tous les échantillons de la campagne. On remarque également qu'il n'y a pas vraiment de signal marin dans ces eaux estuariennes.

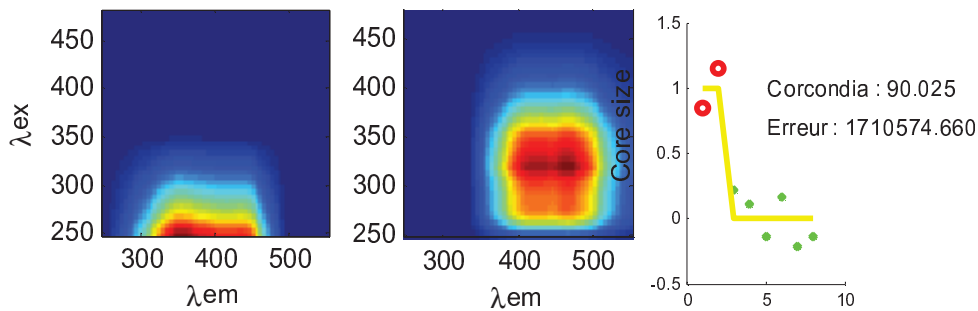


Figure 34: Composants obtenus par PARAFAC du projet de l'estuaire Martinska en Croatie 2008

IV.E.1.b Croatie 2009

La campagne 2009 par contre permet d'extraire trois fluorophores (Figure 35) :

- le composant 1 : à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/350\text{nm}$) ce composant représente un des pics protéiniques de tryptophane (pic R selon Burdige, 2004) et une partie du signal est étalée entre 400 nm et 450 nm comme dans la campagne précédente ;
- le composant 2 : à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 295\text{nm}/395\text{nm}$) peut être relié aux représentants des acides humiques dites marines (pic M selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 : à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/470\text{nm}$ et $265\text{nm}/470\text{nm}$) est typiquement considéré comme un couple de fluorophores représentant les substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996).

Pour cette campagne, on trouve un composant supplémentaire à caractère marin. On retrouve le composant protéinique ainsi que le signal terrestre.

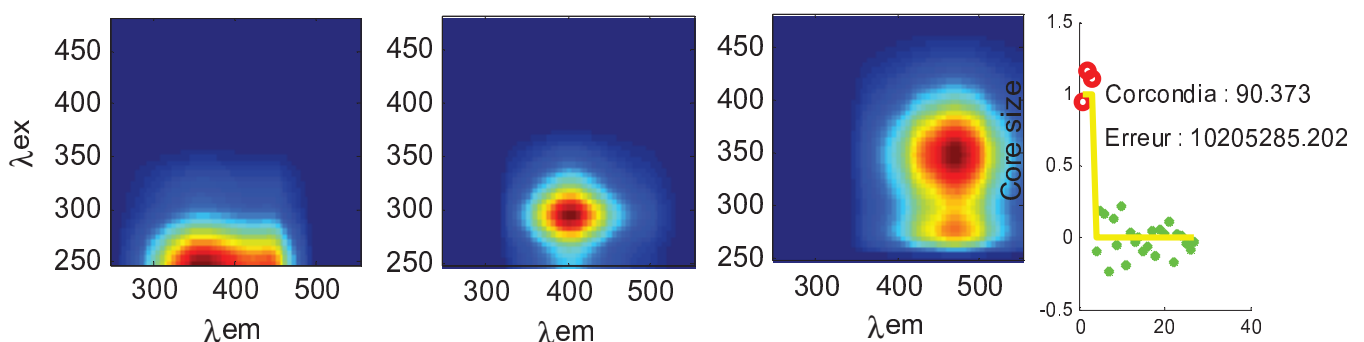


Figure 35: Composants obtenus par PARAFAC du projet de l'estuaire Martinska en Croatie 2009

Ces deux campagnes correspondant à un même site mais pour des périodes différentes de l'année montrent des zones de fluorescence communes, mais ne donnent pas le même nombre de composants PARAFAC en appliquant un protocole identique de choix du nombre de composants. Ceci est dû au fait que les composants ne sont pas présents, ou pas détecté/séparé, de manière systématique dans la campagne de 2008.

IV.E.2 Eaux côtières – Rade de Toulon

Dans la rade de Toulon, trois composants PARAFAC ont été séparés pour les eaux de mer à partir des 17 MEEF mesurées. (Figure 36) :

- le composant 1 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} < 250\text{nm}/340\text{nm}$) peut représenter un fluorophore protéinique (pic R selon Burdige, 2004). Le signal est toutefois très étalé, en particulier pour la région entre 400 nm et 450 nm ;
- le composant 2 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/350\text{nm}$) représente un fluorophore connu comme protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/460\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/460\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore construit par un couple de pics fluorescents en provenance des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996).

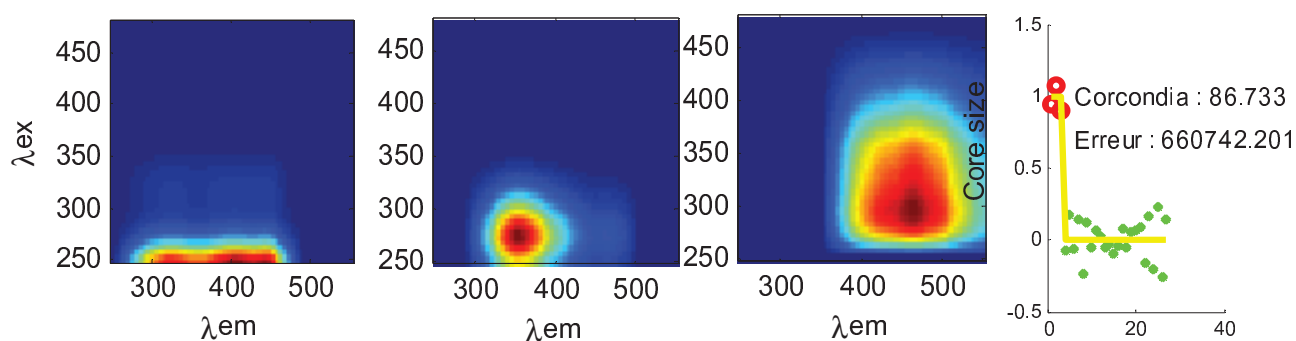


Figure 36: Composants obtenus par PARAFAC du projet Rade de Toulon (Eaux de mer)

On remarque que, pour ces échantillons présentant une forte salinité (>35), il n'est pas observé de pic de type marin. Le composant terrestre quant à lui est nettement plus large en émission que dans le cas de la campagne croatie 2009 (Figure 36).

IV.E.3 Eaux de mer – DYCOMED

Les échantillons du projet DYCOMED, constituant un jeu de 131 MEEF, sont décomposés de la manière suivante (Figure 37) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/345\text{nm}$), un fluorophore connu comme protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} < 250\text{nm}/310\text{nm}$), un fluorophore protéinique (pic S selon Persson et Wedborg, 2001) et les bruits résultant des signaux bruités dans la zone de longueurs d'onde d'excitation courtes ;
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 300\text{nm}/400\text{nm}$), un fluorophore de type acide humique défini comme « marin » (pic M selon Coble, 1996) ;
- le composant 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 340\text{nm}/445\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/445\text{nm}$), un couple de fluorophores tous de type d'acide humique pic C et pic A (Coble, 1996) ;
- le composant 5 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 370\text{nm}/480\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/480\text{nm}$), un couple de fluorophores représentant les acides fulviques terrestres pic D (Stedmon et al., 2003) et pic F (Alberts & Takacs, 2004b).

Il est intéressant de noter que le composant 5 généralement défini comme terrestre est observé pour une zone a priori plutôt sous influence terrigène.

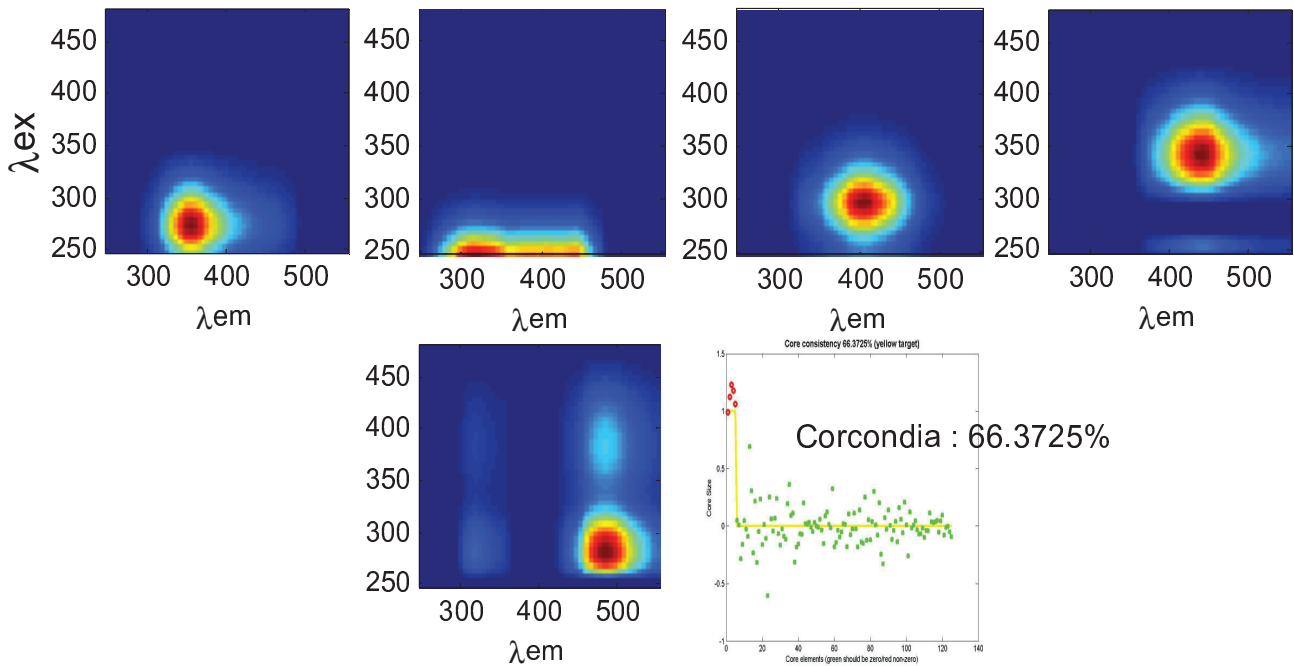


Figure 37: Composants obtenus par PARAFAC du projet DYCOMED

IV.E.4 Eaux de mer – MARSECO

Trois campagnes du projet MARSECO sont réalisées en février (12 MEEF), mars (10 MEEF) et avril (19 MEEF) de l'année 2010. Chaque campagne est analysée ici séparément avant d'être regroupé avec les MEEF des deux autres campagnes.

IV.E.4.a Campagne MARSECO février 2010

Les résultats obtenus sont présentés (Figure 38) :

- le composant 1 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=320\text{nm}/420\text{nm}$, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=255\text{nm}/420\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996)
- le composant 2 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=280\text{nm}/345\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996)
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=360\text{nm}/490\text{nm}$, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=270\text{nm}/490\text{nm}$) étalé verticalement dans une longueur d'onde d'émission est probablement un fluorophore des acides fulviques (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

Les composants trouvés pour cette campagne possèdent un domaine de longueur d'onde d'émission nettement plus restreint que les composants précédemment trouvés. Ils ont également une gamme de longueurs d'onde en excitation nettement plus large. Dans les deux cas, pour les composants 1 et 3, le pic maximum est présent dans les longueurs d'onde 255 nm et 270 nm, domaine d'excitation plus proche des acides fulviques que des acides humiques.

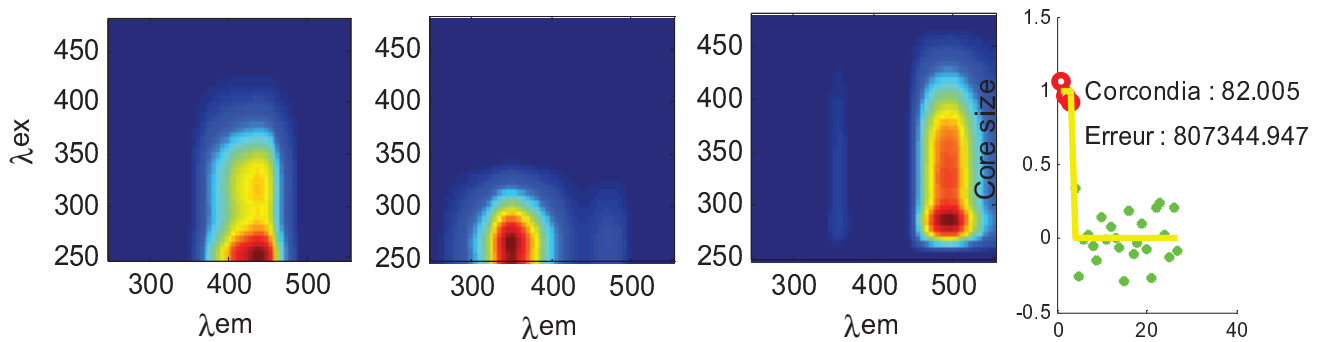


Figure 38: MARSECO 1 – mission du 16/02/2010

IV.E.4.b Campagne MARSECO mars 2010

La mission de prélèvement a eu lieu le 18/03/2010, seulement deux composants fluorescents sont extraits (Figure 39) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=270\text{nm}/350\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=350\text{nm}/440\text{nm}$, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=260\text{nm}/440\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996).

Contrairement à la campagne précédente de février, les composants obtenus sont moins allongés. Le composant 1 semble lié un autre fluorophore émettant à des longueurs d'onde supérieure à 400 nm. Les variations d'intensité et le faible nombre d'échantillons n'ont pas permis de séparer correctement les composants.

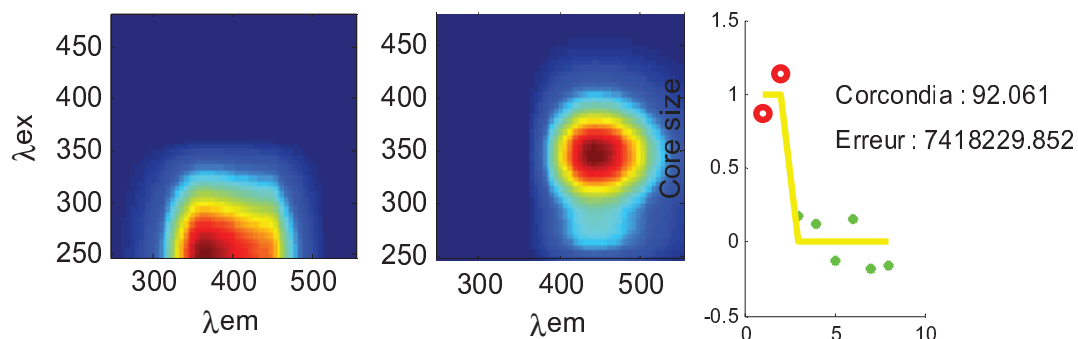


Figure 39: MARSECO 2 – mission du 18/03/2010

IV.E.4.c Campagne MARSECO avril 2010

La mission du 26 avril 2010 laisse apparaître de nouveau trois composants suite à la décomposition PARAFAC (Figure 40) :

- le composant 1 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=275\text{nm}/350\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=330\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}<250\text{nm}/430\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=360\text{nm}/480\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=280\text{nm}/480\text{nm}$) est probablement un fluorophore des acides fulviques terrestres (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

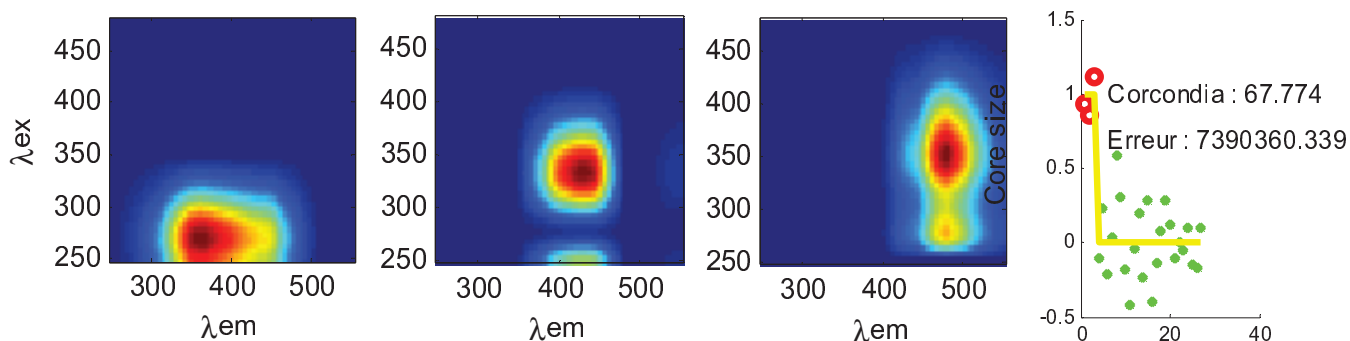


Figure 40: MARSECO 3 – mission du 26/04/2010

IV.E.4.d MARSECO 2010 global

Le traitement global (Figure 41) de ces trois campagnes donne deux composants et permet de retrouver les deux composants montrés dans la campagne 2. Ceci signifie que la participation des composants dans ces trois campagnes n'est pas identique. Les composants protéiniques et des substances humiques terrestres sont proportionnellement plus importants dans le traitement de données. Dans la suite, ce traitement est pris en compte comme le traitement MARSECO.

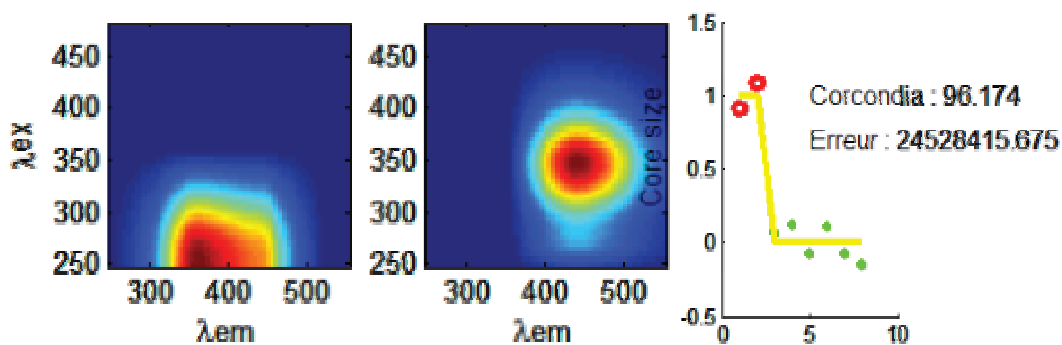


Figure 41: MARSECO global – trois missions en 2010

IV.E.5 Eaux de sol – Brésil Sao Gabriel (eaux tropicales – Podzols)

IV.E.5.a Campagne 2007

Pour la campagne de prélèvement ayant eu lieu en 2007, trois composants sont observés (Figure 42) .

- le composant 1 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/480\text{nm}$, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/480\text{nm}$) représente un couple de fluorophores des acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b) ;
- le composant 2 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 310\text{nm}/410\text{nm}$) est dans le domaine des fluorophores considérés comme provenant des acides humiques dits « marins » (pic M selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 345\text{nm}/440\text{nm}$) correspond au fluorophore des pics fluorescents des substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996).

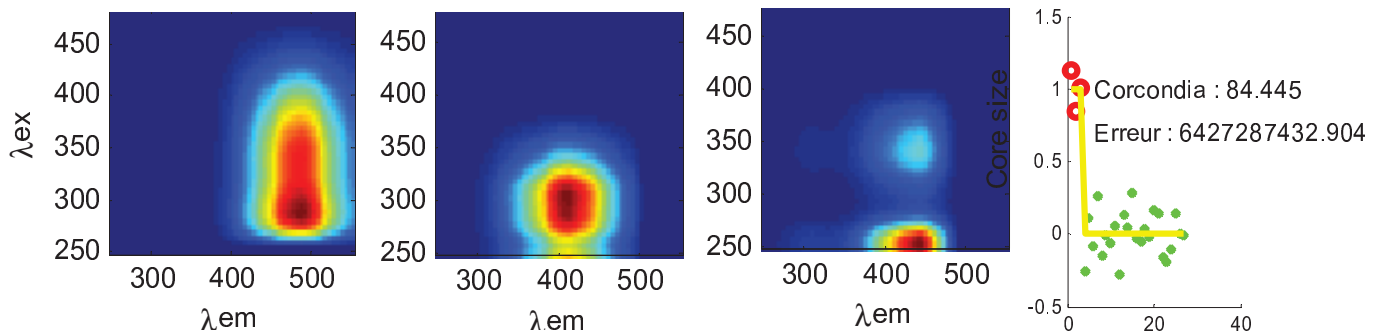


Figure 42 : Eaux de sol – Brésil Sao Gabriel campagne 2007

IV.E.5.b Campagne 2008

La campagne 2008 est analysée à partir des longueurs d'onde d'émission de 300 nm. Trois composants de fluorophores sont observés (Figure 43) :

- le composant 1 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 330\text{nm}/440\text{nm}$) représente un fluorophore isolé des substances humiques terrestre (pic C selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 370\text{nm}/490\text{nm}$, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{nm}/490\text{nm}$) est dans le domaine du fluorophore d'un couple des acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b) ;
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/440\text{nm}$) peut être la partie bruitée des signaux dans la zone UV même si la position de pic correspond bien au fluorophore qui est lié souvent à un fluorophore (pic M) des substances humiques dits « marins » (pic A' selon Burdige, 2004).

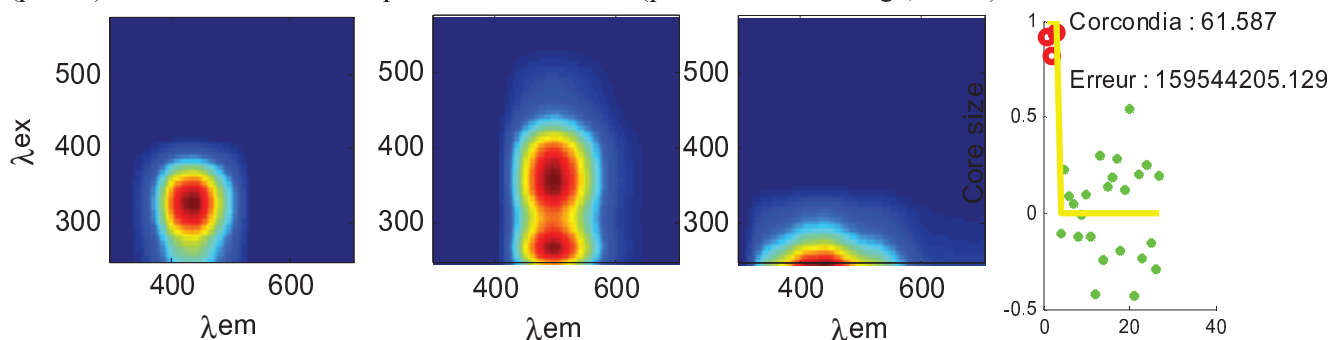


Figure 43 : Eaux de sol – Brésil Sao Gabriel campagne 2008

IV.E.6 Eaux de sol – Brésil LINS campagnes 2007 à 2009

Les trois campagnes des années 2007, 2008 et 2009 sont traitées d'abord séparément et avant d'être regroupées dans un même jeu de données. Selon les résultats, le nombre de composants varie d'une campagne à l'autre (Figure 44, Figure 45 et Figure 46).

Dans la campagne du 19/12/2007, quatre composants sont trouvés (Figure 44) :

- le composant 1 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/340\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/310\text{nm}$) ressemble à un fluorophore protéinique en zone de basse longueur d'onde d'excitation (pic S selon Brudige, 2004) ;
- le composant 3 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/430\text{nm}$) se situe dans les zones des

pics fluorescents considérés des substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;

- le composant 4 : ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 360\text{nm}/470\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 290\text{nm}/470\text{nm}$) représente un fluorophore constitué par deux pics fluorescents considérés des acides fulviques terrestres ou du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

Dans les campagnes du 30/04/2008 (Figure 45) et du 16/06/2009 (Figure 46), les composants 1, 3 et 4 de la campagne 2007 sont retrouvés, mais pas le composant 2.

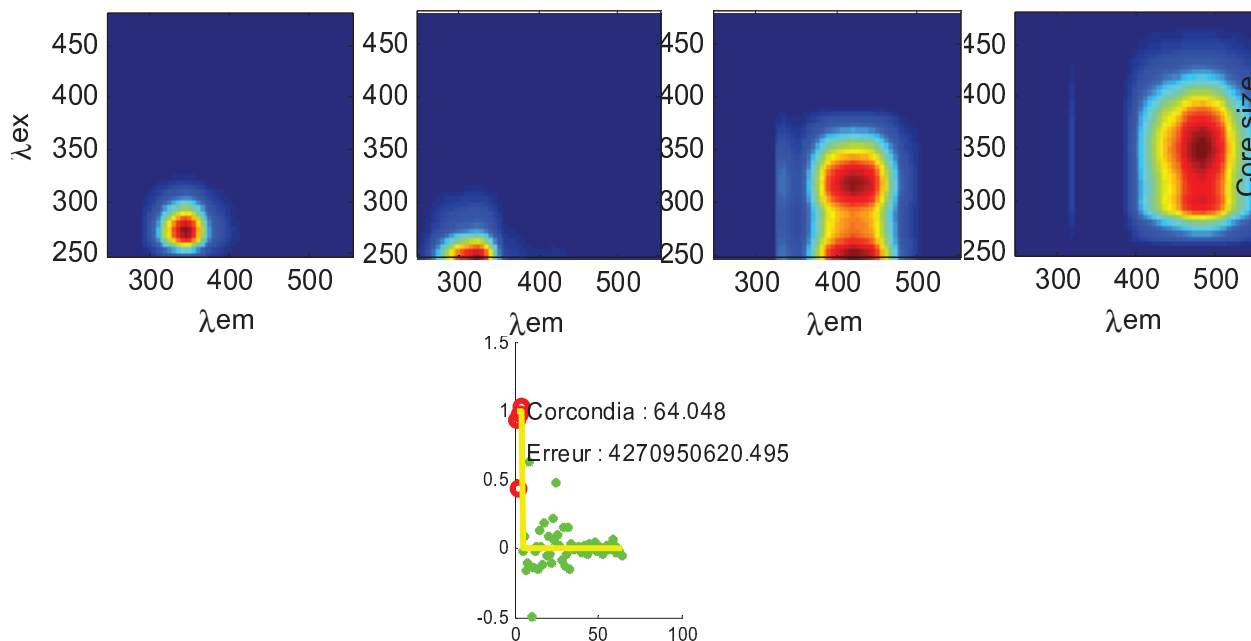


Figure 44: Eaux de sol – Brésil LINS campagne 19/12/2007

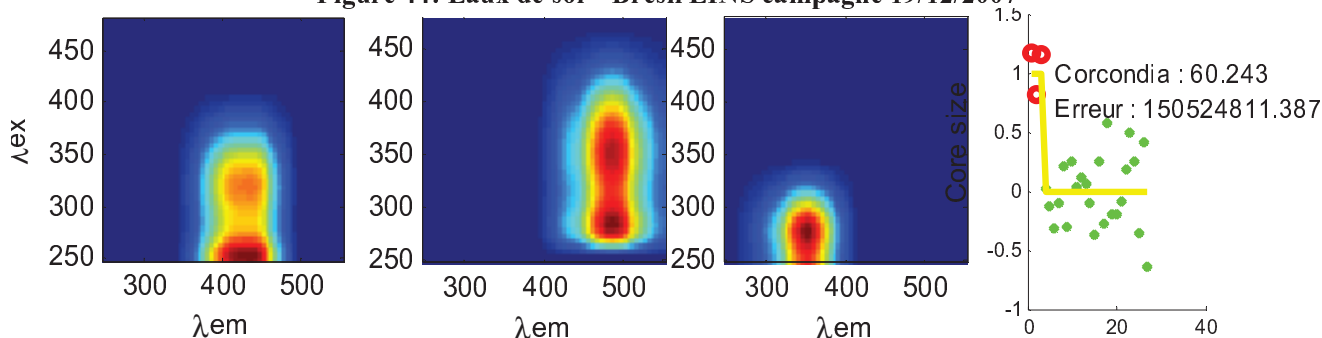


Figure 45: Eaux de sol – Brésil LINS campagne 30/04/2008

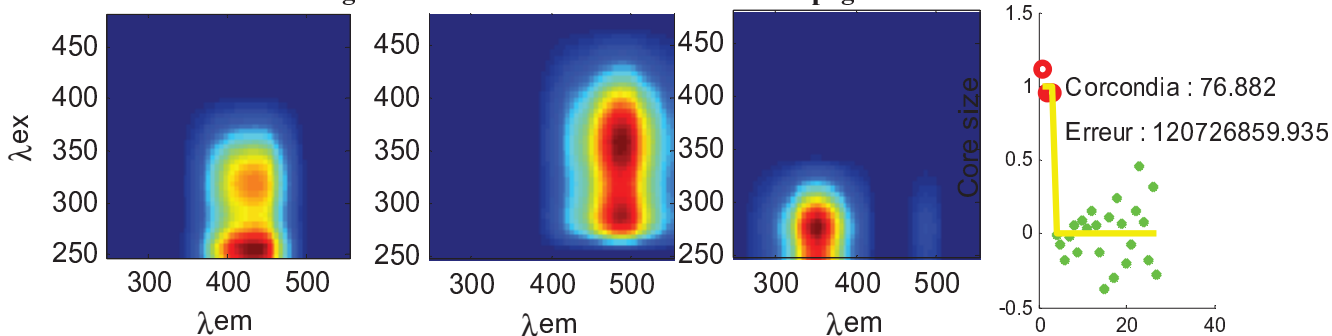


Figure 46: Eaux de sol – Brésil LINS campagne 16/06/2009

IV.E.7 Eaux douces – BasVar

Le projet BasVar a duré environ deux ans dans le cadre de la thèse Cécile Potot (Février 2011). Le travail sur les analyses de la MON a pour objectif de compléter les informations pour l'étude sur les métaux dans les eaux du fleuve, ses affluents et les eaux souterraines. Les échantillons dans les campagnes détaillées sur deux ans sont analysées par fluorescence. Avec toutes ces analyses, deux jeux de données sont faits un pour l'année 2008 et un pour l'année 2009. Les échantillons hebdomadaires sont traités dans un jeu de données différent des deux autres.

IV.E.7.a BasVar 2008

Dans ce jeu de données (59 MEEF), trois campagnes de prélèvement en 2008 sont rassemblées et traitées ensemble (janvier, mars et mai 2008). Quatre composants sont trouvés par PARAFAC (Figure 47) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} < 250\text{nm}/340\text{nm}$), un fluorophore protéinique (pic R selon Burdige, 2004) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/350\text{nm}$), un fluorophore connu comme protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/415\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255\text{nm}/415\text{nm}$), un fluorophore de l'acide humique connu comme « marin » (pic M selon Coble, 1996) et son pic couplé (pic A' selon Burdige, 2004) ;
- le composant 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 360\text{nm}/465\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{nm}/465\text{nm}$), un couple de fluorophores défini comme les matières d'acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

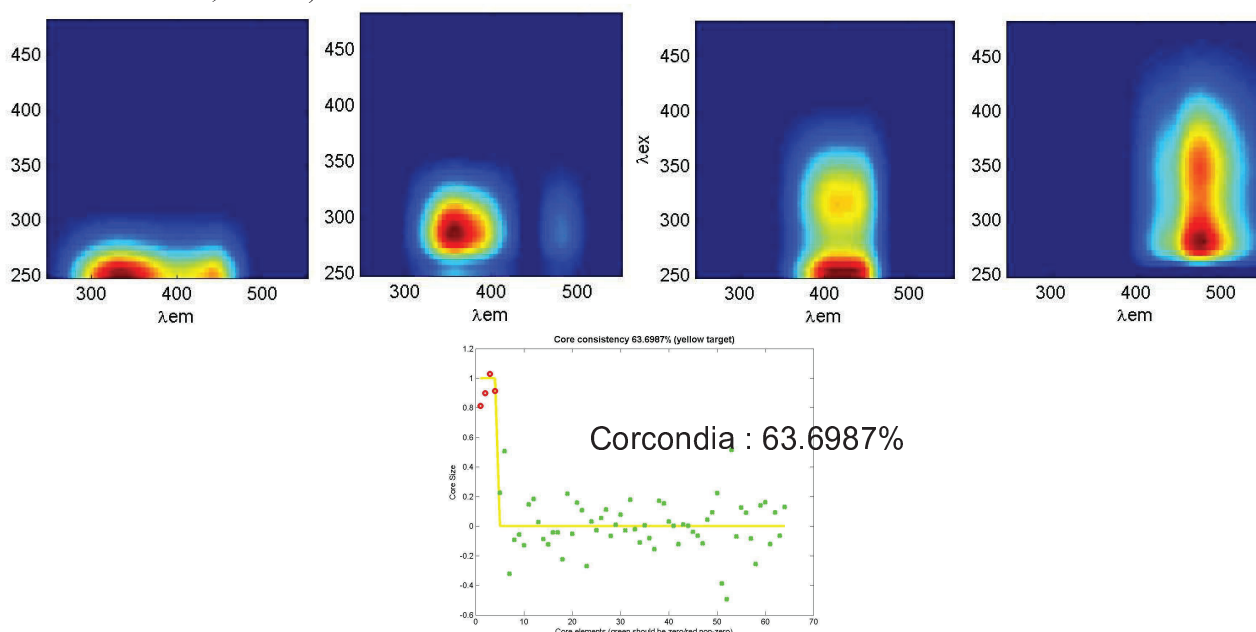


Figure 47: Composants obtenus par PARAFAC du projet BasVar en 2008

Dans ce jeu de données, un phénomène de corrélation entre les intensités du composant 3 et celles du composant 4 est observé (Figure 48). Notamment, les deux composants sont en corrélation maximum en mars 2008, prélèvements effectués après une précipitation. On observe donc une relation linéaire

entre les contributions des acides humiques et celle des acides fulviques sur le site d'étude. Donc, les acides humiques et les acides fulviques peuvent probablement venir d'une ou des même(s) origine(s).

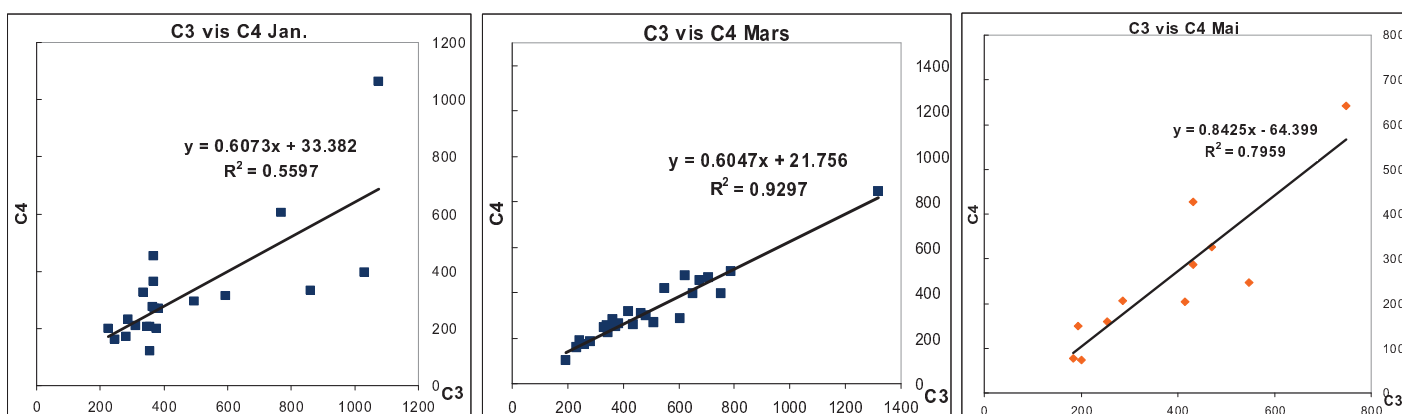


Figure 48: Corrélations entre composant 3 et composant 4 (BasVar 2008)

IV.E.7.b BasVar 2009

Les campagnes du projet BasVar faites en 2009 permettent d'extraire trois composants au lieu de quatre pour l'année 2008 (Figure 49) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=315\text{nm}/425\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=260\text{nm}/425\text{nm}$) ressemble au composant 3 trouvé en 2008 d'origine « marine » (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=365\text{nm}/470\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=275\text{nm}/470\text{nm}$) considéré comme lié aux acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b) et proche du composé 4 trouvé en 2008 ;
- le composant 3 est mal défini : il correspond à un signal de type protéinique, avec une partie de la réponse due au bruit des faibles longueurs d'onde.

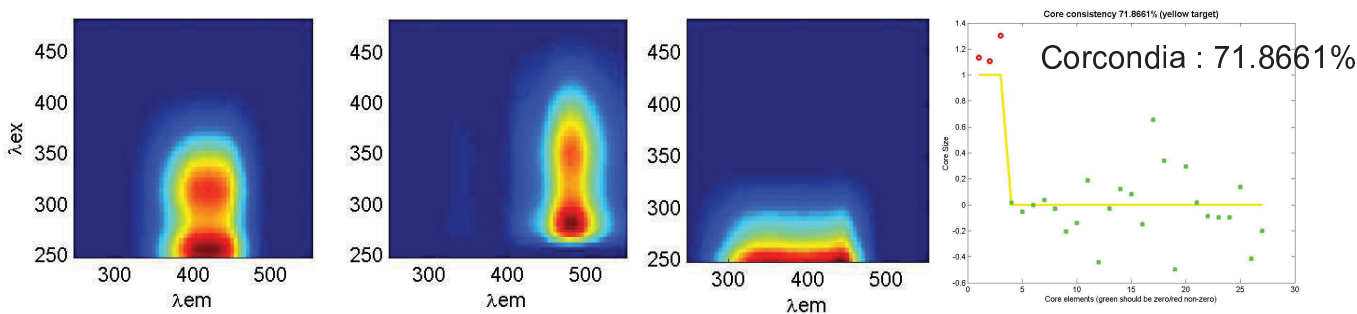


Figure 49: Composants obtenus par PARAFAC du projet BasVar en 2009

IV.E.7.c BasVar 2009 Hebdo

L'évolution dynamique de la MON dans le site BasVar a été observée durant une série de prélèvements hebdomadaires réalisée de janvier en avril 2009. Cette campagne de prélèvement concerne uniquement quelques sites d'intérêt parmi les sites des campagnes précédentes. Trois à quatre points ont été choisis par rapport à leur relation géographique et les intérêts d'étude. Les composants fluorescents trouvés sont décrits ci-dessous (Figure 50) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 315\text{nm}/420\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255\text{nm}/420\text{nm}$) indique un fluorophore en couple de pics des acides humiques (pic M selon Coble, 1996 et pic A' selon Burdige, 2004) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 365\text{nm}/470\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{nm}/470\text{nm}$) représente un couple de pics en provenance des acides fulviques du sol (pic D selon Stedmon et al., 2003 et pic F selon Alberts & Takacs, 2004b) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/350\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/350\text{nm}$) représente deux pics protéiniques en relation avec le tryptophane (pic T selon Coble, 1996 et pic R selon Burdige, 2004).

Ces premiers résultats seront appliqués dans un logiciel statistique en cours de programmation pour analyser les caractères de la MON avec les données géochimiques des échantillons.

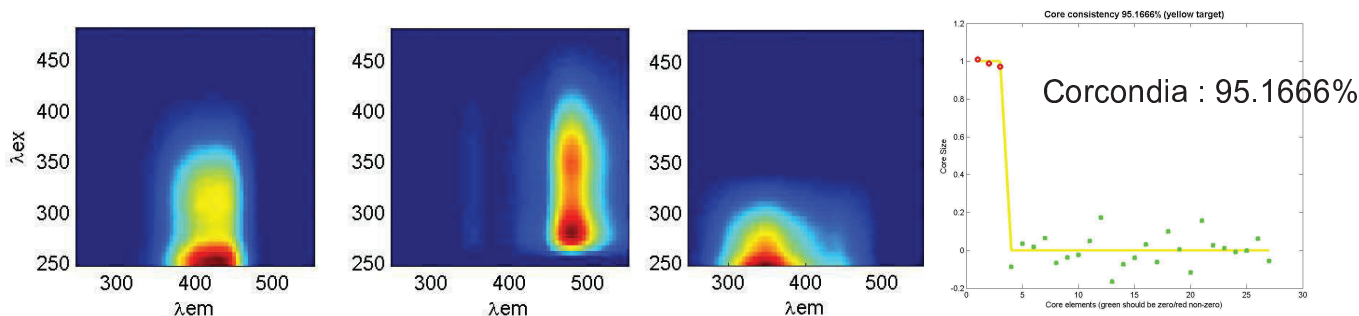


Figure 50: Composants obtenus par PARAFAC du projet BasVar hebdomadaire en 2009

Dans les trois parties du projet BasVar dont BasVar 2008, BasVar 2009 et BasVar 2009 Hebdo, il y a trois fluorophores systématiquement présents : le fluorophore protéinique, le fluorophore des acides humiques et le fluorophore des acides fulviques terrestres.

IV.E.8 Eaux douces – Bosnie 2009

Les échantillons ont été analysés et traités. Trois composants sont également trouvés (**Figure 51**) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/330\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996) même si les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont toutes plus basses que d'habitude ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 300\text{nm}/405\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255\text{nm}/405\text{nm}$) se situe à la position des pics fluorescents des acides humiques dits « marins » souvent couplés entre eux (pic M selon Coble, 1996 et pic A' selon Burdige, 2004) ;
- le composant 3 représente deux couples des pics fluorescents tous d'origine terrestre – le couple à gauche ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 345\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{nm}/430\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore des substances humiques (pic C et pic A selon Coble, 1996) et le couple à droite ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 355\text{nm}/470\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{nm}/470\text{nm}$) signifient deux pics des acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

Il est intéressant de remarquer encore une fois que le composant 3 semble contenir deux fluorophores différents. Ce résultat signifie une même origine pour les acides humiques et les acides fulviques. Les pics montrés sur le composant 2 ne sont pas de forme ronde, mais étalées horizontalement, c'est-à-dire que les pics ne semblent pas parfaitement isolés.

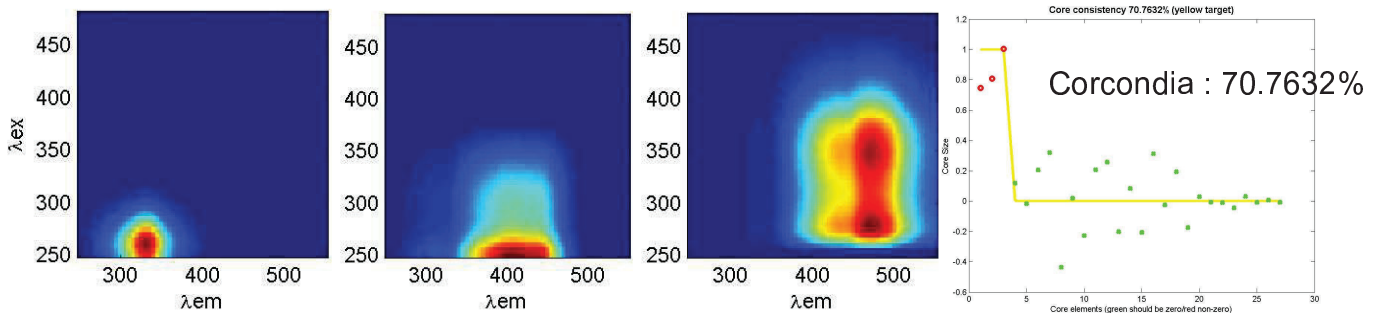


Figure 51: Composants obtenus par PARAFAC du projet en Bosnie en 2009

IV.E.9 Eaux douces – Brésil SGC (Arcus) 2009

Des eaux de rivières de la forêt amazonienne ont été prélevées et analysées. Les mesures ont permis d'extraire quatre composants (Figure 52) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 355\text{nm}/480\text{nm}$) qui est étalé verticalement sur les longueurs d'onde d'excitation basé sur une même longueur d'onde d'émission peut être un fluorophore des acides fulviques de sol (pic D selon Stedmon et al., 2003) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/450\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 265\text{nm}/450\text{nm}$) représente un fluorophore constitué par deux pics des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 315\text{nm}/410\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250\text{nm}/410\text{nm}$) correspond au fluorophore des acides humiques dits « marins » et à son couple (pic M et pic A' selon Coble, 1996 et Burdige, 2004) ;
- le composant 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/340\text{nm}$) est lié à un fluorophore protéinique (pic T selon Coble).

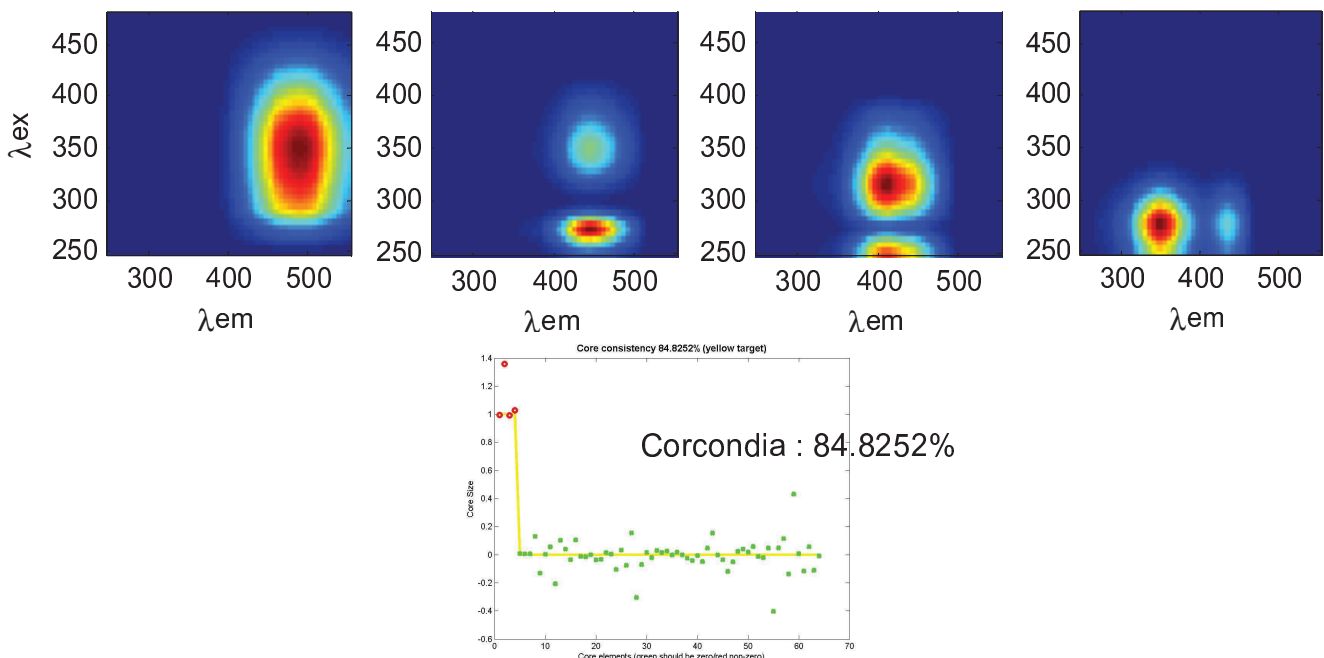


Figure 52: Composants obtenus par PARAFAC en provenance du projet Brésil SGC (Arcus) en 2009

IV.E.10 Eaux douces – Cameroun

Une campagne sur cours d'eau urbains de la région de Dchang (Cameroun) est analysée, donnant deux composants après traitement PARAFAC (**Figure 53**) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/370\text{nm}$) est étalé horizontalement sur les longueurs d'onde d'émission allant du domaine des fluorophores de type protéinique (pic T selon Coble, 1996) jusqu'au domaine des substances humiques « marines » ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 330\text{nm}/430\text{nm}$) signifie un fluorophore des acides humiques faisant partie du fluorophore d'origine terrestre (pic C selon Coble).

Cette campagne est mesurée avec une résolution spectrale de 4 nm en excitation et en émission au lieu de 5 nm pour toutes les autres campagnes. Afin de ne pas introduire de biais par la suite, cette campagne bien qu'analysée ne fera pas partie des regroupements.

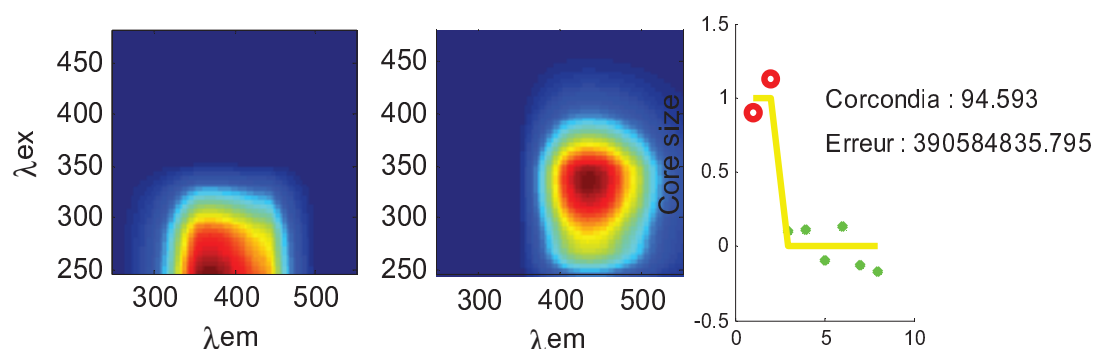


Figure 53: Composants obtenus par PARAFAC à partir des eaux de rivières à la région Dchang (Cameroun)

IV.E.11 Eaux de grotte de systèmes karstiques.

IV.E.11.a Traitement individuel des campagnes

Trois campagnes de prélèvement ont été faites en 2008, 2009 et 2010 sur les systèmes de grottes karstiques de la région de Šibenik. Chaque campagne est analysée de manière indépendante par PARAFAC. Les résultats en terme de composant sont présentés dans les figures suivantes : **Figure 54**, **Figure 55** et **Figure 56**. Quatre composants ont été extraits de ces jeux de données, le **Tableau 6** résume la présence ou non de ces composés dans les campagnes :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/350\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996) fait partie des campagne 2008 (composant 1) et 2009 (composant 1) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 290\text{-}300\text{nm}/390\text{nm}$) est relié à la présence d'un fluorophore de types acides humiques dits « marins » (pic M et pic A' selon Coble, 1996 et Burdige, 2004) qui se retrouvent dans les campagnes 2009 (composant 2) et 2010 (composant 1) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{-}340\text{nm}/425\text{-}450\text{nm}$ et $260/425\text{-}450\text{nm}$) présent dans les campagnes 2008 (composant 3) et 2010 (composant 3) est un couple de pics fluorescents en lien avec les substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 380\text{nm}$ et $270\text{-}280/480\text{nm}$) est également en relation avec des fluorophores de type acide fulvique d'origine terrestre ou plutôt du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

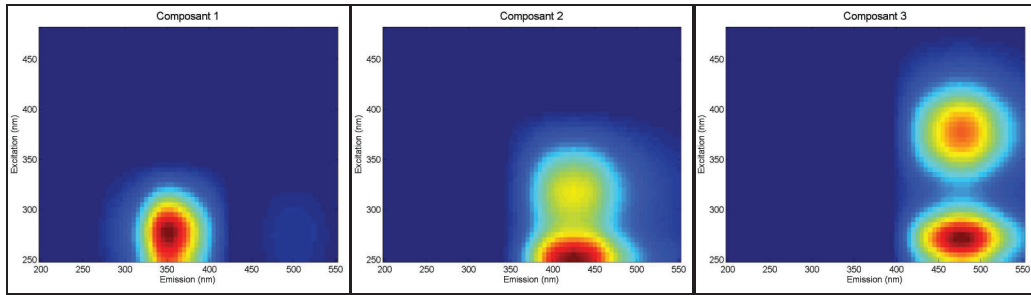


Figure 54: Composants obtenus par PARAFAC des eaux de grottes de la campagne 2008

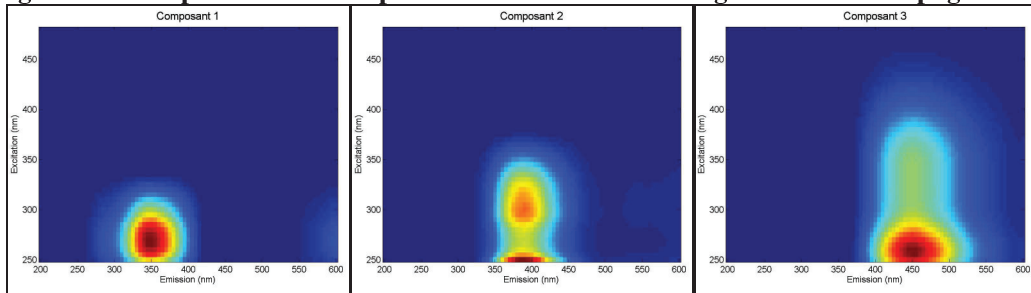


Figure 55: Composants obtenus par PARAFAC des eaux de grottes de la campagne 2009

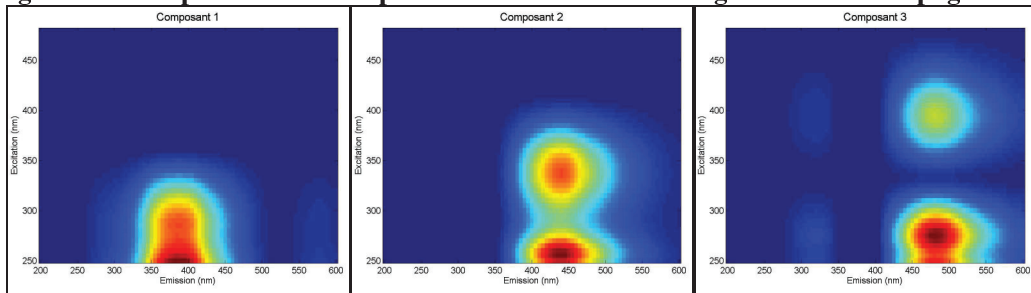


Figure 56: Composants obtenus par PARAFAC des eaux de grottes de la campagne 2010

	Fluorophore commun 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ = 280nm/350nm)	Fluorophore commun 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ = 290-300nm/390nm)	Fluorophore commun 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ = 320-340nm et 260/425-450nm)	Fluorophore commun 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ = 380nm et 270-280/480nm)
Estuaire Grotte 2008	Composant 1		Composant 2	Composant 3
Estuaire Grotte 2009	Composant 1	Composant 2	Composant 3	
Estuaire Grotte 2010		Composant 1	Composant 2	Composant 3
Grottes globales		Composant 3	Composant 1	Composant 2

Tableau 6: Fluorophores et leurs participations communes dans les campagnes de grottes croates.

Bien que provenant d'un même environnement, on observe que les composants trouvés ne sont pas présents dans toutes les campagnes. Le fait d'avoir un choix du nombre de composants standardisé peut entraîner ce comportement et souligne le caractère encore subjectif de l'appréciation du nombre de composants.

IV.E.11.b Traitement global des campagnes

Un traitement de l'ensemble des spectres de ces trois campagnes dans un même jeu de données aboutit à la réduction du nombre de composants (trois au lieu de quatre) (Figure 57) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ = 330nm/440nm et 260/440nm) représente un fluorophore des substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ = 380nm et 270-280/480nm) sur la position d'un fluorophore constitué par un couple des deux pics fluorescents en provenance des acides fulviques d'origine terrestre ou du sol

(pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b) ;

- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 290\text{nm}/390\text{nm}$) représente un fluorophore des acides humiques dits d'origine « marine » (pic M selon Coble, 1996).

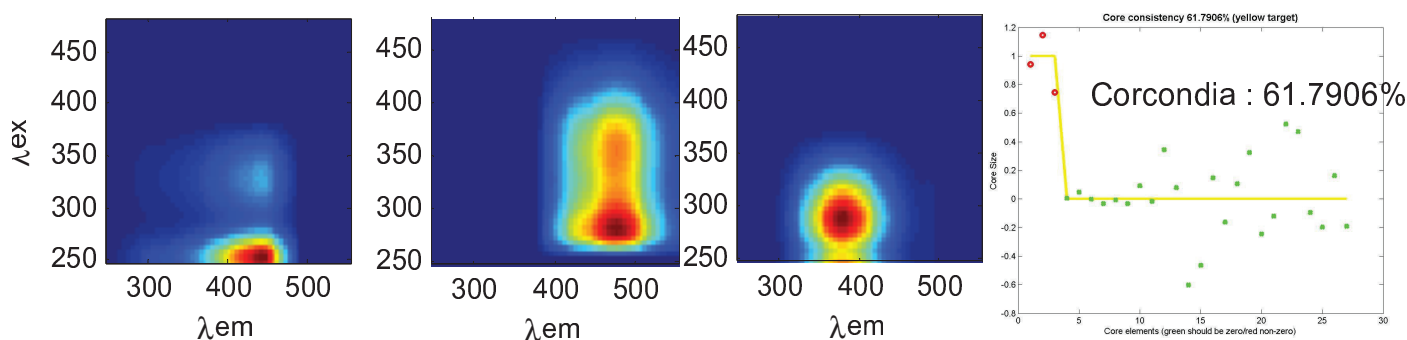


Figure 57: Composants obtenus par PARAFAC des eaux ensembles des grottes croates

On remarque que le composant protéinique n'est plus représenté dans le système global. Cette disparition est sans doute compensée par le composant 3 du système global qui peut contenir la réponse de fluorescence pour des longueurs d'onde inférieures à 390 nm.

IV.E.12 Eaux douces – GIRAC

Trois composants fluorescents sont nécessaires pour reconstituer les réponses de fluorescence des trois campagnes de prélèvement du projet GIRAC 2009. Ces échantillons proviennent des rivières urbaines marseillaises (Figure 58) :

- le composant 1 contient deux fluorophores apparemment en parallèle par rapport aux longueurs d'onde d'émission à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 340\text{nm}/430\text{nm}$ et $270/430\text{nm}$) représentant un fluorophore de type substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996) et à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 380\text{nm}$ et $270\text{-}280/480\text{nm}$) sur la position des fluorophore de type acides fulviques d'origine terrestre (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b) ;

- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/350\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble, 1996) ;

- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 310\text{nm}/410\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250\text{nm}/410\text{nm}$) correspond aux pics fluorescents des acides humiques dits d'origine « marine » (pic M selon Coble, 1996 et pic A' selon Burdige, 2004).

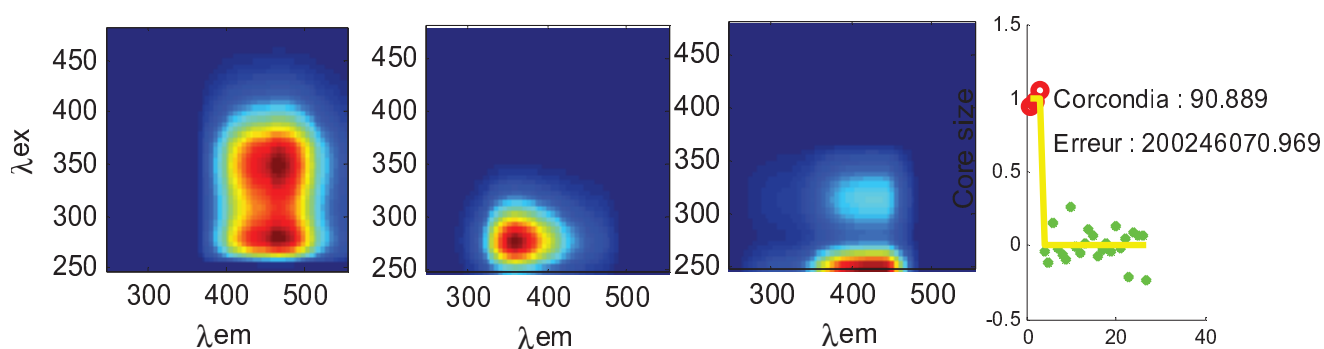


Figure 58: Composants obtenus par PARAFAC du projet GIRAC

Deux composants – composant 1 et composant 3 – ont des formes étalées dans le sens horizontal.

Comme dans l'interprétation précédente, l'étalement du composant 1 représente deux types de fluorophores parallèles. Le composant 3 montre clairement un mouvement horizontal du fluorophore qui peut être dû au changement de condition entre différents sites de prélèvement.

IV.E.13 Eaux douces – AURORA en Norvège

Les résultats du projet AURORA montrent deux composants fluorescents (**Figure 59**) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 290\text{nm}$ et $250\text{nm} / 390\text{nm}$) se situe dans la position des pics considérés des fluorophores des acides humiques dits d'origine « marine » (pic M selon Coble, 1996 et pic A' selon Burdige, 2004) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 325\text{nm}/420\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 265\text{nm}/420\text{nm}$) représente un fluorophore proche des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996).

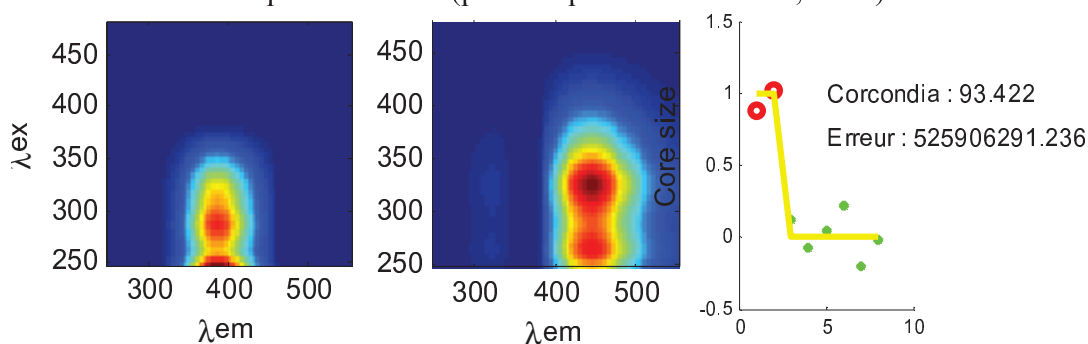


Figure 59: Composants obtenus par PARAFAC du projet AURORA

IV.E.14 Eaux extraites – Arcus Toulon et Tunisie

Le traitement de données nous permet d'obtenir quatre composants principaux. Ces composants sont décrits dans la **Figure 60** est caractérisés comme suivant :

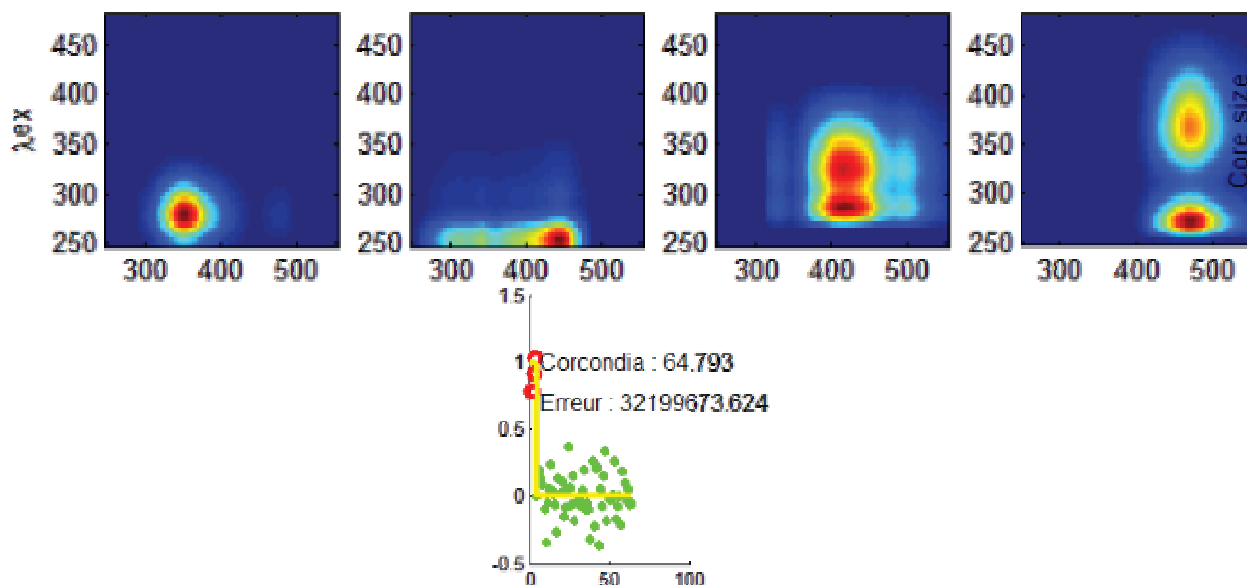


Figure 60: Composants obtenus par PARAFAC du projet Arcus de Toulon-Tunisie

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/340\text{nm}$) représente un fluorophore protéinique (pic T selon Coble,

1996) ;

- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=260\text{nm}/440\text{nm}$) lié à une zone de faibles signaux dans le domaine protéinique ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=250\text{nm}/340\text{nm}$, pic R selon Burdige, 2004) représente un pic des substances humiques d'origine terrestre (pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=330\text{nm}/410\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=280\text{nm}/410\text{nm}$) montre deux pics fluorescents des substances humiques d'origine terrestre (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=380\text{nm}/480\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=270\text{nm}/480\text{nm}$) se présente dans le domaine fluorescent des acides fulviques du sol d'origine terrestre (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b).

IV.E.15 Eaux extraites – Brésil LINS (2007)

Les extractions de MON du Brésil sont faites pour les échantillons de sol pour le site LINS prélevés en 2007. Les MEEF de la MON extraite sont traitées et les composants ci-dessous sont trouvés (Figure 61) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/430\text{nm}$) représentant un fluorophore constitué par des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 360\text{nm}/480\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/480\text{nm}$) correspondant à un fluorophore constitué par un couple des pics des acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Alberts & Takacs, 2004b). Ce composant semble correspondre aux composants 3 et 4 de la campagne 2007.

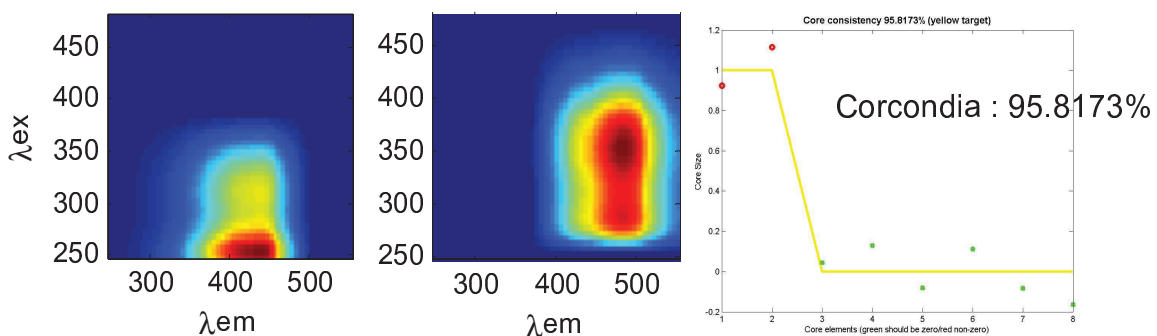


Figure 61: Composants obtenus par PARAFAC du projet LINS au Brésil 2007

IV.E.16 Eaux extraites - Brésil LINS (campagne 2009)

Dans la campagne de sol prélevé en 2009, les résultats montrent trois composants différents (Figure 62) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/430\text{nm}$) peut être le couple des pics des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996) et le pic A, à la basse longueur d'onde d'excitation est plus visible que le pic C ;
- le composant 2 contient deux pics à la même longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/425\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/480\text{nm}$) représentant une partie des acides fulviques terrestres (pic A selon Coble, 1996) et une partie des acides fulviques du sol (pic F selon Albert & Takacs, 2004), mais l'un à une basse longueur d'onde d'émission et l'autre à une longueur d'onde d'émission plus élevée ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/480\text{nm}$) presque circulaire se situe à la position d'un fluorophore

souvent considéré comme faisant partie des acides fulviques du sol (pic D selon Stedmon et al., 2003).

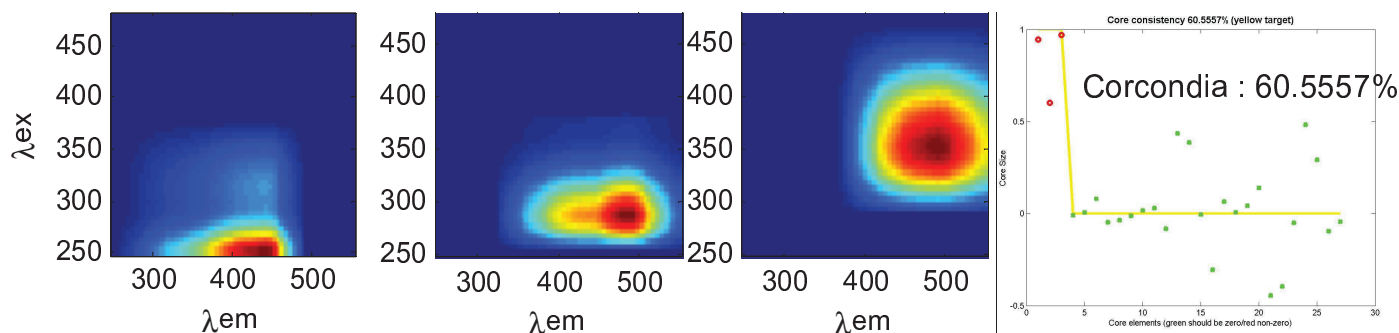


Figure 62: Composants obtenus par PARAFAC du projet LINS au Brésil 2009

Un phénomène particulier est apparu dans ce traitement : une « séparation » des pics D et F qui sont considérés comme un couple des acides fulviques terrestres. Les deux pics se présentent deux fluorophores différents au lieu de former un seul fluorophore. Ces résultats inhabituels nous posent la question : est-ce que les conditions physico-chimiques peuvent modifier les liens entre deux fluorophores – car cette série de mesure est faite à pH 12, qui n'est pas un pH naturel ? La réponse devrait être cherchée en comparant les données obtenues à la suite dans des manipulations prévues au pH 2 et 8.

IV.E.17 Eaux interstitielles – Croatie 2010

Deux sites dans l'estuaire Krka en Croatie sont analysés en 2010. La marina est le port de Šibenik et la station Marinska de l'autre côté de l'estuaire éloignée de l'activité humaine. Les eaux interstitielles sont prélevées à partir des sédiments collectés dans ces deux sites.

IV.E.17.a Marina du port Šibenik

Les résultats des eaux interstitielles de la marina dans l'estuaire Krka donnent deux composants principaux (Figure 63) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/345\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore protéinique lié au tryptophane (pic T selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 265\text{nm}/430\text{nm}$) contient deux pics de type acide humique aquatiques souvent décrit comme d'origine « marine » (pic M et pic A' selon Coble, 2003 et Burdige, 2004).

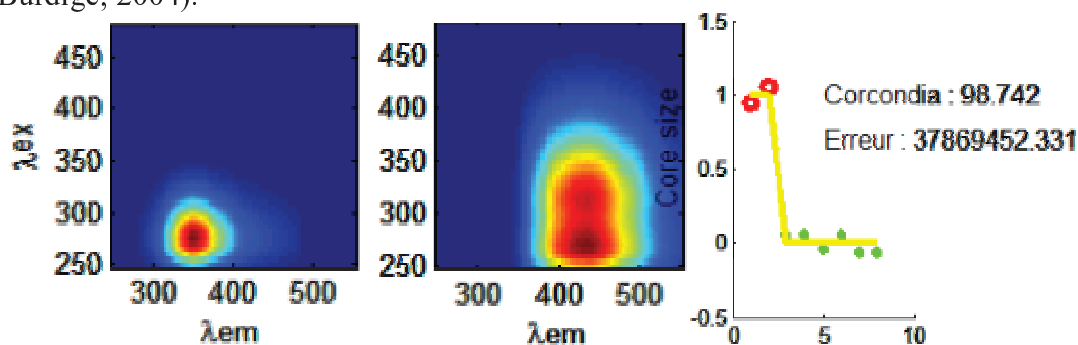


Figure 63: Composants globaux obtenus par PARAFAC des EI Croates 2010-Marina

L'absence de fluorophore terrestre signifie que la zone est soit peu en contact avec l'eau douce de l'estuaire, soit qu'il y a une disparition des substances terrestres très rapide en raison de conditions spécifiques.

IV.E.17.b Station Martinska

Les résultats de la station Martinska montrent trois composants (**Figure 64**) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 375\text{nm}/490\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/490\text{nm}$) contient un pic à la longueur d'onde d'émission élevée venant des acides fulviques du sol (pic E selon Provenzano et al., 2004 et Hernández et al., 2006) et un pic couplé avec pic E qui est sûrement de la même origine comme le pic E mais pas encore référencé ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 315\text{nm}/435\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 355\text{nm}/435\text{nm}$) représentent le couple des pics des substances humiques considérés comme terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/345\text{nm}$) signifie un fluorophore protéinique lié au tryptophane (pic T selon Coble, 1996).

Les résultats montrent que le composant 1 contient un pic provenant des acides humiques (Plaza et al., 2005). Ce pic est nommé « Z » dans ce travail. Ce pic, en concentration naturelle, possède une très faible intensité de fluorescence qui est masquée ici par les pics voisins de fortes intensités, pic A ou F, qui sont aussi d'origine terrestre. C'est pourquoi la méthode « peak-picking » ne peut pas le détecter dans des échantillons naturels. Puisque ce pic a une intensité relative qui varie de façon différente des pics A et F, PARAFAC peut séparer sa contribution spectrale de celle des pics connus A et F. La mise en évidence du pic Z dans le cas d'échantillon à concentration naturelle montre bien l'avantage de l'utilisation de PARAFAC par rapport à la méthode du « peak-picking ».

Le couple de pics E-Z est détecté et analysé par « peak-picking » dans les extractions de matière organique de sol (Provenzano et al., 2004, Plaza et al., 2005 et Hernández et al., 2006). Toutefois, dans l'inventaire fait par Carstea et al. (2010), ce pic n'a pas été détecté dans les eaux de rivière. Apparemment, les MEEF des échantillons d'eau prélevés dans la rivière Krka ne contiennent pas le pic E. La présence du pic à la fois dans les sols et dans les sédiments et son absence a priori dans les rivières impliquent une première question : le fluorophore associé au pic E est-il transporté par la rivière du sol vers le sédiment ? Si le transport venait à être prouvé, cela signifierait peut-être que la non-détection du pic E est liée à une concentration en fluorophore trop faible dans la rivière. On peut aussi imaginer que les milieux compacts que sont les sols et les sédiments favorisent le développement d'une population microbienne spécifique à l'origine de ce pic E.

En comparant les résultats dans les deux sites de l'estuaire Krka, seuls les échantillons de la station Martinska ont montré le fluorophore terrestre. Ce fait signifie que les eaux douces entrées dans l'estuaire peuvent influencer la composition de la MON dans les sédiments et donc les eaux interstitielles des sédiments. Cependant, cette influence n'est pas valable dans tous les sites de cet estuaire, car les eaux interstitielles des sédiments du site du port Marina ne contient pas ce fluorophore terrestre qui signifie l'absence de l'influence des eaux douces dans ce site. Cette différence permettra nous guider dans une nouvelle interprétation des résultats dans les études géochimiques de ce site.

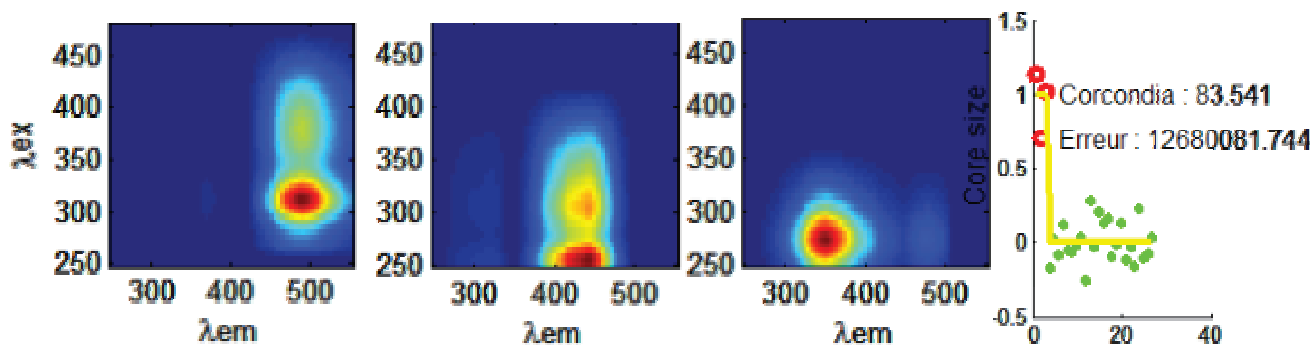


Figure 64: Composants globaux obtenus par PARAFAC des EI Croates 2010-Martinska

IV.E.18 Eaux interstitielles – Rade de Toulon

Les résultats des eaux interstitielles de la rade de Toulon montrent trois composants (Figure 65) :

- le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/435\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 265\text{nm}/435\text{nm}$) représente un fluorophore constitué par un couple des pics fluorescents en provenance des substances humiques terrestres (pic C et pic A selon Coble, 1996) ;
- le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 365\text{nm}/485\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/485\text{nm}$) est considéré comme un fluorophore produit par des acides fulviques du sol (pic D et pic F selon Stedmon et al., 2003 et Albert & Takacs, 2004) ;
- le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 380\text{nm}/340\text{nm}$) signifie la présence du fluorophore protéinique lié à la tryptophane (pic T selon Coble, 1996).

La rade de Toulon est une rade recevant très peu d'eau douce. La composition de la MON a théoriquement comme origine des substances marines ou aqueuses. Cependant, les résultats montrent une composition d'origine terrestre plutôt que d'origine marine comme le pic M et le pic A'. Ces résultats indiquent l'origine des fluorophores dits « terrestres » jusqu'à maintenant comme le pic A, le pic C, le pic D et le pic F ne se forme pas forcément sur la terre, mais peut-être aussi dans le sédiment, en tous les cas dans un milieu avec des matières compactes.

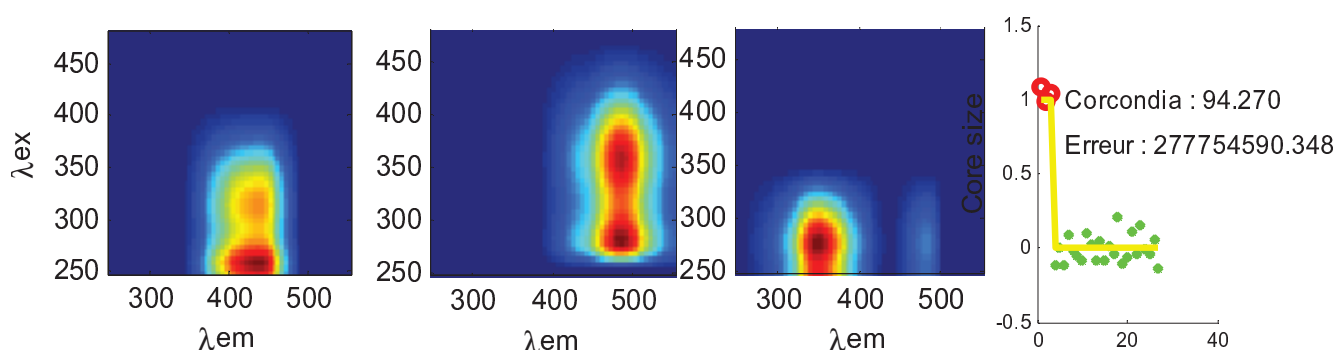


Figure 65: Composants globaux obtenus par PARAFAC des EI de la rade de Toulon

Résumé des fluorophores trouvés dans toutes les missions MEEF

A la vue des résultats concernant les différentes campagnes de prélèvement, et quelque soit le type de prélèvement, on retrouve souvent le même type de composants qui recouvrent les mêmes domaines spectraux. Afin de formaliser cela, le **Tableau 7** résume la présence de pics dans les différentes campagnes de prélèvement et leur relation avec des pics déjà décrits.

La fréquence d'apparition de certains fluorophores laisse à penser qu'ils sont omniprésents comme composants de la matière organique fluorescente. On peut sans trop exagérer définir le nombre de composants différents trouvés à sept. Ce sont par ordre croissant de fréquence d'apparition décroissant (**Tableau 7**) :

Trois composants qui signifient la présence des fluorophores protéiniques montrant des fréquences variables :

Le composant de type T ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270-285\text{nm}/340-355\text{nm}$) encore une fois d'origine protéinique plus spécifiquement lié au tryptophane (Coble, 1996) est présent dans vingt missions et dans tous les milieux aquatiques ;

Le composant de type pic S ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/295-310\text{nm}$) représentant les substances protéiniques (tyrosine selon Brudige, 2004) apparaît dans deux missions : DYCOMED et Brésil LINS 2007 ;

Le composant de type pic R ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/340-355\text{nm}$) considéré également comme un pic protéinique lié au tryptophane (Burdige, 2004) apparaît cinq fois, dans les eaux côtières et les eaux douces en contact avec les sols;

Ces derniers deux composants protéiniques ont une fréquence assez faible (<20% des campagnes) comparé aux composant suivants.

Dans ce travail, plusieurs spectres d'excitation de composant sont bimodaux. Une étude (Burdige et al., 2004) a posé l'hypothèse d'un lien entre les pics A et C ainsi qu'entre les pic A' et M (dans la publication originale de Brudige et al., 2004, les symboles des pics A et A' sont inversés). Cette hypothèse est confirmée ici par le traitement PARAFAC appliqués aux MEEF.

Le composant bimodal caractérisé par le pic E ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 375\text{nm}/490\text{nm}$) et par le pic Z ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/490\text{nm}$) représenterait les acides humiques de sol (selon Smith & Kramer, 1999 ; Plaza et al., 2005, 2006 ; Hernández et al., 2006 et Kwiatkowska et al., 2008). Ce composant bimodal est présent dans des échantillons ayant subi un protocole d'extraction (Provenzano et al., 2004 et Hernández et al., 2006). Notre travail a permis de détecter ce composant dans des eaux interstitielles de sédiment (Croatie 2010 – station Martinska) sans modification importante des échantillons. Il est raisonnable de penser que ce composant E-Z est commun entre l'environnement terrestre et l'environnement sédimentaire marin.

Avec la même fréquence, les composants pic D ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 360-390\text{nm}/455-490\text{nm}$) et pic F ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255-280\text{nm}/445-490\text{nm}$) sont caractéristiques des substances fulviques d'origine terrestre (Stedmon et al., 2003 et Albert & Takacs, 2004). Ils sont présents dans vingt missions concernant tous les milieux qu'il soit aquatiques ou terrestres, exception faite des eaux côtières. Les pics D et F apparaissent dans les eaux de mer, les eaux de sol, les eaux douces, les eaux extraites de sol et les eaux interstitielles.

<i>Nom de milieu</i>	<i>Nom de mission</i>	<i>N° de fluorophores trouvés</i>	<i>Pic S</i>	<i>Pic R</i>	<i>Pic T</i>	<i>Pic M + Pic A'</i>	<i>Pic C + Pic A</i>	<i>Pic D + Pic F</i>	<i>Pic E + Pic Z</i>
Eaux côtières	Croatie 2008	2		X		X	X		
	Croatie 2009	3		X		/ (M)	X		
	Rade de Toulon 2009 Eaux de mer	3		X	X		X		
Eaux de mer	DYCOMED	5	X		X	/ (M)	X	X	
	MARSECO 1	3			X		X	X	
	MARSECO 2	2			X		X		
	MARSECO 3	3			X		X	X	
Eaux de sol	Brésil SGC 2007	3				/ (M)	X	X	
	Brésil SGC 2008#	3				/ (A')	/ (C)	X	
	Brésil LINS 071219	4	X		X		X	X	
	Brésil LINS 080430	3			X		X	X	
	Brésil LINS 090616	3			X		X	X	
Eaux douces	BasVar 2008	4		X	X	X		X	
	BasVar 2009	3					X	X	
	BasVar 2009 Hebdo	3		M	M	X		X	
	Bosnie 2009	3			X	X	M	M	
	Brésil SGC 2009	4			X	X	X	/ (D)	
	Cameroun 2008*	2			X		/ (C)		
	Croatie Grottes 2008	3			X		X	X	
	Croatie Grottes 2009	3			X	X	X		
	Croatie Grottes 2010	3				X	X	X	
	GIRAC	3			X	X	M	M	
	Norvège Aurora 2010	2				X	X		
Eaux extraites de sol	Toulon Tunisie (TT) ARCUS 2010	3		X	X		X	X	
	Brésil LINS SI et E66 2007	2					X	X	
	Brésil LINS SI et E66 2009	3					X	S	
Eaux interstitielles	Croatie-Marina 2010 EI	2			X	X			
	Croatie-Martinska 2010 EI	3			X	X			X
	Rade de Toulon 2009 Eaux interstitielles	3			X		X	X	
N° de participations:			2	6	20	15	25	20	1
N° de missions:			29						
Taux de participation:			6.90%	20.69 %	68.97%	51.72%	86.21%	68.97%	3.45%

X : participation complète comme un fluorophore ; M : demi – participation, construction d'un fluorophore avec un autre pic ; S : désigné séparément dans deux fluorophores ; / (*) : une seule partie montrée comme un fluorophore. Tous les genres de participation sont comptés une fois de participation.

Tableau 7: Fluorophores trouvés dans chaque mission et leurs participations dans le jeu de données.

Les composants pic M ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 285-320\text{nm}/390-415\text{nm}$) et pic A' ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250-265\text{nm}/390-415\text{nm}$) correspondant aux substances humiques dites « marines » mais souvent trouvés dans des milieux aquatiques d'origine autre que marine (Coble, 1996, Burdige, 2004, Luciani et al., 2008). Ils sont présents dans quinze missions ayant un caractère aquatique marin ou terrestre et sont totalement absents dans les extraits de sol. Les demi-participations des fluorophores (M) sont très fréquentes dans les missions venant des eaux douces. Ce composant n'apparaît pas dans les autres milieux. Le pic M a été présenté par Coble comme un fluorophore en provenance des substances humiques marines. Cependant, la présence de pic M est prouvée dans les eaux côtières, les eaux de sol, les eaux douces et les eaux interstitielles.

Enfin, les plus fréquents, le composant comportant le pic C ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 315-340\text{nm}/420-445\text{nm}$) et le pic A ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255-280\text{nm}/420-445\text{nm}$) apparaissent souvent ensemble et indiquent la présence des substances humiques terrestres (Coble, 1996). Ils sont présents dans 25 missions sur 29 représentant toutes les origines.

Un des buts de ce travail est de connaître l'influence de l'hétérogénéité des jeux de donnée sur les résultats PARAFAC : nombre de composants, représentation des composés, etc. Les différents environnements analysés montrent une grande variété des conditions environnementales et pourtant seulement 7 contributions spectrales (Tableau 7), recouvrant l'ensemble des domaines spectraux analysés, semblent nécessaires pour représenter les fluorophores présents dans les six milieux qui seront décrits dans la partie suivante. D'autre part, le fait de traiter chaque campagne individuellement entraîne une difficulté pour comparer les composants entre eux. Il n'est d'ailleurs pas conseillé de le faire car ils sont issu de traitements différents. Toutefois, pour avoir une base de comparaison identique, il faut traiter les échantillons dans le même jeu de données. La partie suivante traite des résultats de ces regroupements PARAFAC.

IV.F Application de PARAFAC aux missions groupées par milieu

L'analyse des MEEF provenant d'une même campagne de prélèvement permet d'obtenir les composants participant à la fluorescence. Dans ce travail, nous souhaitons nous intéresser au comportement de PARAFAC lorsque des MEEF provenant de missions différentes sont traitées dans le même jeu de données. En effet, il est observé dans les résultats précédents que les composants obtenus sont souvent similaires. On peut donc s'attendre à ce que ces composants soient retrouvés par PARAFAC dans un jeu de données recoupant les MEEF de différentes missions. Cette étude est d'autant plus intéressante que les composants présentent de légères différences en forme et en position même s'ils sont relativement similaires. Afin d'étudier l'influence de ces regroupements sur les résultats de PARAFAC, les MEEF de l'ensemble des missions traitées précédemment vont être analysées en regroupant dans un premier temps les échantillons par milieu : les eaux côtières (ET), les eaux de mer (EM), les eaux de sol (ES), les eaux douces (ED), les eaux extraites de sol (EES) et les eaux interstitielles (EI). Le deuxième regroupement rassemblera les MEEF des différents milieux en fonction de la force ionique. Finalement, l'ensemble des échantillons dans un seul jeu de données (2292 MEEF en total) sera étudié.

Pour comparer les résultats du regroupement avec le traitement du milieu, les composants calculés par PARAFAC individuellement par campagne sont présentés par ligne identifiées dans les figures par les lettres : A, B, C, ... La dernière ligne (T) représente les composants obtenus par PARAFAC pour la totalité des échantillons correspondant au regroupement. Rappelons ici que le nombre F de fluorophores est la grande valeur de F telle que le corcondia soit au moins égal à 60%. Dans cette étude, le nombre F ainsi calculé ne dépasse jamais la valeur 5.

D'autre part, à des fins de comparaison, la valeur de la fluorescence intégrée, c'est-à-dire l'intégration des valeurs d'intensité de fluorescence des échantillons a été calculée. Cette valeur représente le poids des signaux de fluorescence de chaque campagne dans le jeu de données global.

IV.F.1 Milieu des eaux côtières

On rappelle le nombre d'échantillons prélevés pour les missions Croatie 2008, Croatie 2009 et Rade de Toulon 2009 (Tableau 8) ainsi que la fluorescence intégrée de chaque mission.

Nom de milieu	Nom de mission	Numéro dans le regroupement	Fluorescence intégrée	Nombre d'échantillons
Eaux côtières	Croatie 2008	A	51620	16
	Croatie 2009	B	74419	84
	Rade de Toulon 2009 Eaux de mer	C	17853	17
Nombre total d'échantillons				117

Tableau 8: Composition du groupe eaux côtières, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.

Trois composants fluorescents sont trouvés pour l'ensemble des eaux en provenance du milieu côtier (Figure 66, ligne T) pour un corcondia de 89% :

Le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/350\text{nm}$) représentant un pic protéinique plutôt de type tryptophane (pic R selon Burdige, 2004) et son épaulement ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/440\text{nm}$, pic A selon Coble, 1996) est présent dans les résultats obtenus pour la totalité des échantillons d'eaux côtières. Il semble représenter les composants 1, lignes A, B et C (**Figure 66**), des différentes missions. De plus, son spectre d'émission est très proche de ceux des composants 1 précédents. Quant à son spectre d'excitation, on peut noter qu'il varie notablement d'une mission à l'autre : le spectre d'excitation du composant 1 de la ligne T est donc apparemment une moyenne des spectres d'excitation précédents.

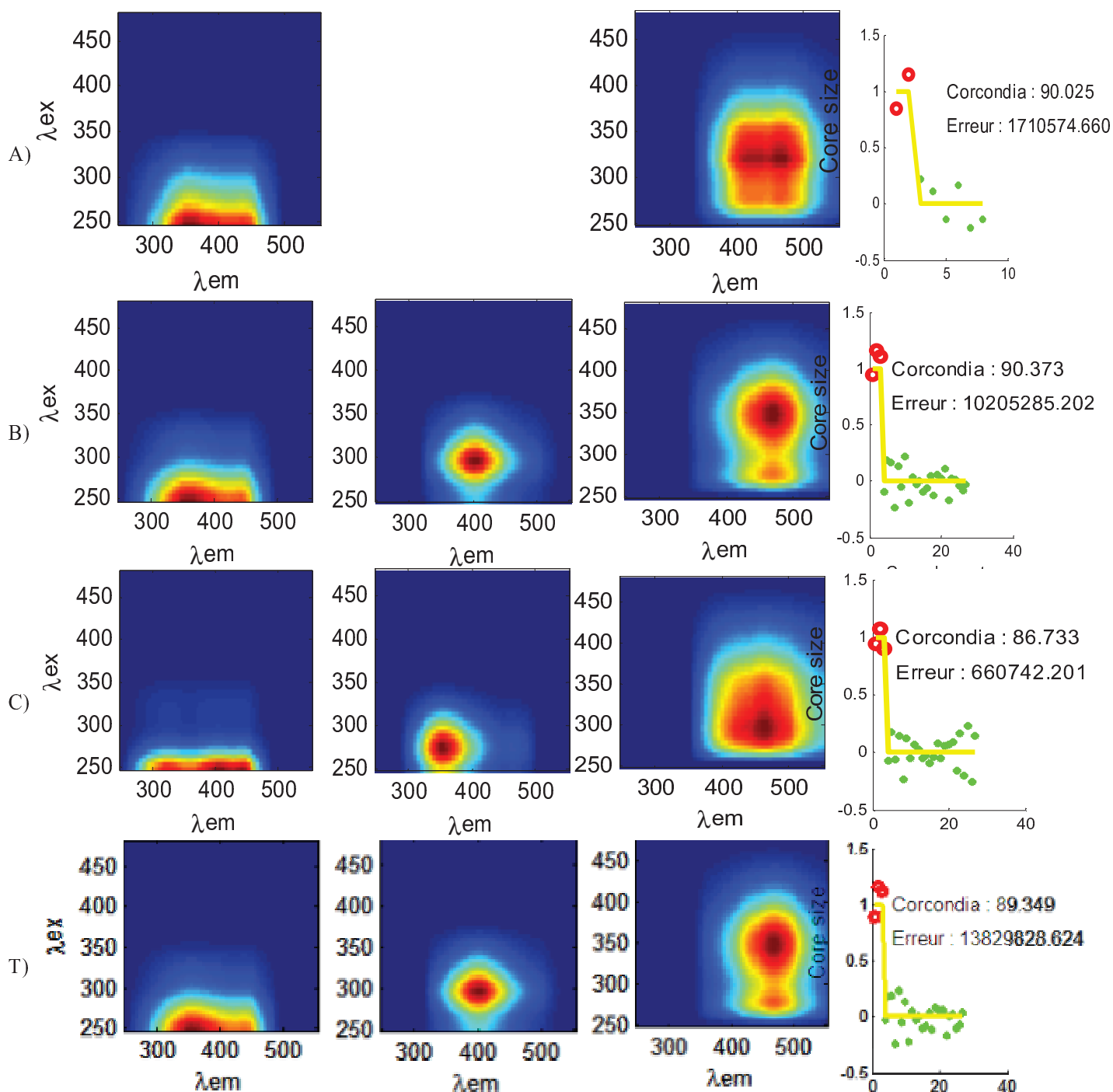


Figure 66: Composants obtenus par PARAFAC pour le milieu des eaux côtières.

Les lignes A, B et C représentent les composants obtenus pour le traitement individuel des missions Croatie 2008, Croatie 2009 et Rade de Toulon (eaux de rade) respectivement.

Le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 295\text{nm}/395\text{nm}$) de la ligne T qui est considéré comme un fluorophore représentant des acides humiques d'origine marine (pic M selon Coble, 1996) semble proche du composant 2 de la ligne B. Bien que le composant 2 de ligne C ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/350\text{nm}$) soit proche spectralement du composant 2 de la ligne B, il doit très probablement correspondre à un pic protéinique de type tryptophane pic T (Coble, 1996).

Le composant 3, bimodal en excitation ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 355\text{nm}/470\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/470\text{nm}$) signifiant un fluorophores de double pics provenant des acides fulviques de sol (pic D selon Stedmon et al., 2003 et pic F selon Albert & Takacs, 2004) est identique au composant 3 de la ligne B. On ne retrouve pas les formes des composants 3 dans les lignes A et C, respectivement.

On peut constater que, dans ce cas précis, les contributions spectrales de la ligne T sont très proches (en forme et en position) des composants de la ligne B. Ceci constitue un résultat auquel on pouvait s'attendre puisque le nombre d'échantillons de la mission B représente plus de 71% de l'ensemble des échantillon d'eaux côtières, de plus, la fluorescence intégrée de la mission B correspond à plus de la moitié de la fluorescence de l'ensemble des échantillons. De ce fait, le nombre de composants présents dans l'ensemble des eaux côtières ne dépasse pas 3. Le seuil de 60% appliqué au corcondia pour définir le nombre de fluorophores pourrait expliquer ce résultat.

IV.F.2 Milieu des eaux de mer

Dans le tableau, on retrouve les quatre missions de prélèvements effectuées dans l'eau de mer (Tableau 9). Ce groupe représente 172 échantillons. La mission qui contient le plus d'échantillons est DYCOMED, alors que le maximum de fluorescence intégrée est lié à la mission MARSECO 2.

Nom de milieu	Nom de mission	Numéro dans le regroupement	Fluorescence intégrée	Nombre d'échantillons
Eaux de mer	DYCOMED	A	24110	131
	MARSECO 1	B	20256	12
	MARSECO 2	C	264582	10
	MARSECO 3	D	25069	19
Nombre total d'échantillons				172

Tableau 9: Composition du groupe eaux de mer, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.

Le traitement global pour les eaux de mer donne trois composants fluorescents avec un corcondia de 79% (**Figure 67**, ligne T). Contrairement au traitement global précédent, il y a diminution du nombre de composants nécessaires pour la caractérisation de l'ensemble des données. Les composants de la mission qui contient le plus d'éléments, DYCOMED (ligne A), n'apparaissent pas en totalité dans les composants obtenus pour le groupe eaux de mer. Seuls les composants 1, 2 et 4 (**Figure 67**, ligne A) persistent dans la décomposition finale (ligne T).

Pour le composant 1 de la ligne T représentant un type protéinique, on a un maintien de la forme et de la région spectrale alors que ce composant n'apparaît pas clairement parmi les composants des missions MARSECO (lignes B, C et D).

Le composant 2 du jeu global (ligne T) est très semblable aux composants 2 des missions C et D. On

ne le retrouve pas dans son intégrité dans les autres missions. Par contre, on trouve dans ces missions des composants qui recouvrent partiellement des zones de fluorescence du traitement global. Pour ce regroupement il est quasiment impossible de comprendre pourquoi les composants des missions individuelles sont absents.

Le composant 3 (ligne T) est commun aux missions A, C et D et il semble encore présent parmi les composants du groupe eaux de mer.

Une hypothèse que l'on peut avancer est que la mission C (MARSECO 2) qui a un poids important en signal (>79%) impose le composant 3. De même, le composant 1 semble imposé par la mission A (DYCOMED) dont le poids en nombre d'échantillons représente 76% des échantillons du groupe eaux de mer. Le composant 2 quant à lui, semble provenir des missions A et B qui représente ensemble un nombre d'échantillons important (>83%). Ce comportement montre que PARAFAC est sensible à la fois au nombre d'échantillons et à l'importance du signal de fluorescence sans pouvoir prévoir lequel de ces deux paramètres est prépondérant.

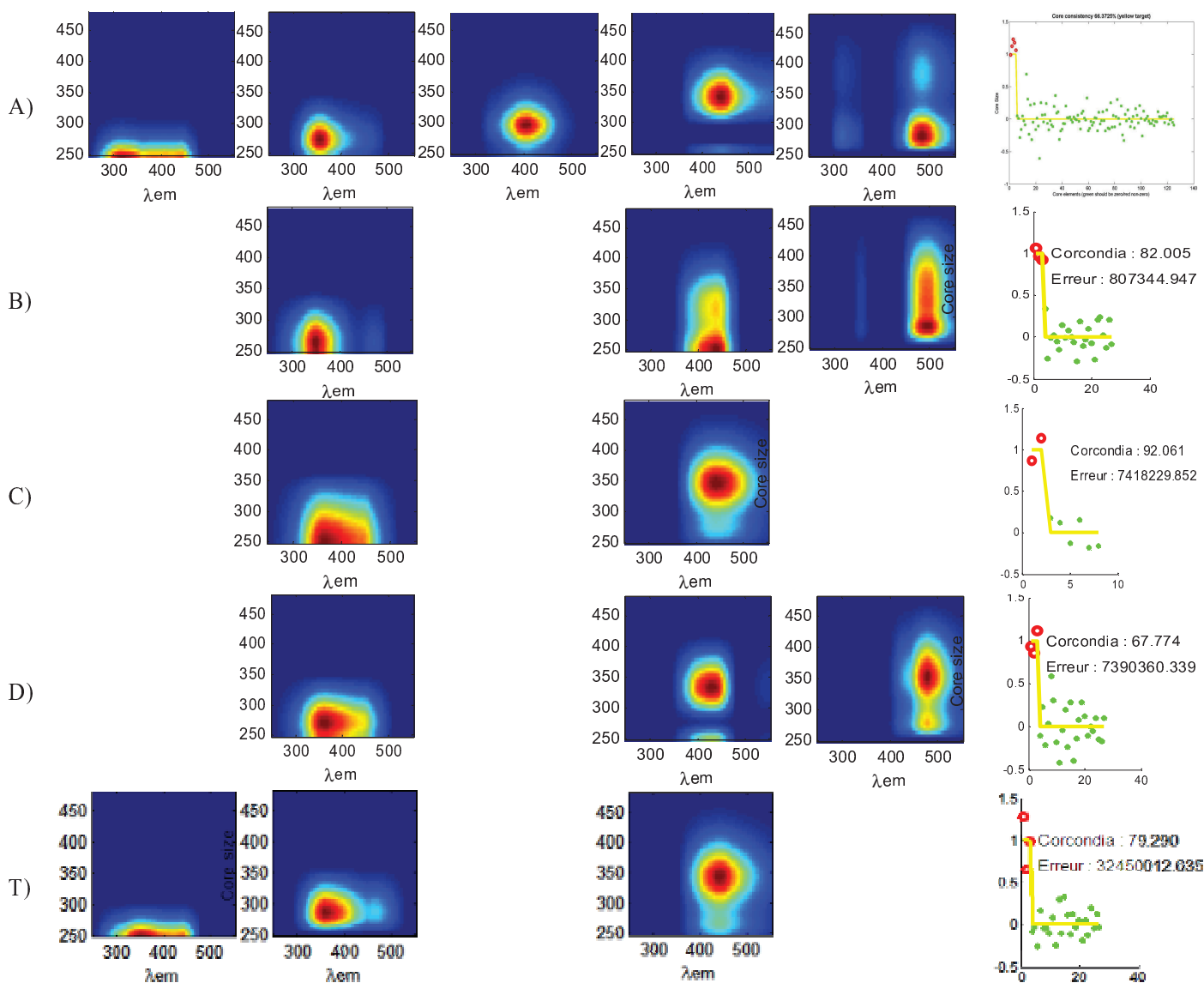


Figure 67: Composants obtenus par PARAFAC pour le milieu des eaux de mer. Les lignes A, B, C, D représentent les résultats obtenus individuellement pour les campagnes DYCOMED, MARSECO février 2010, mars 2010 et avril 2010 respectivement. La ligne T représente le traitement global pour l'ensemble d'échantillons.

Finalement, pour les eaux de mer, la variabilité des composants est plus importante puisque nous avons pour les missions individuelles un nombre de composant variant de 2 à 5. Par contre malgré le poids important de la mission A, le traitement PARAFAC diminue fortement le nombre de composants à 3 pour l'ensemble du jeu de données. Les composants extraits semblent fondre les composants disparus en les intégrant dans des élargissements de domaines spectraux. Mis à part pour une campagne (ligne C), le corcondia reste aux environs de 80%. Il est même meilleur pour la campagne DYCOMED (ligne A) qui est individuellement à un corcondia de 66%. Lorsque les jeux de données individuels montrent une hétérogénéité en composant, le traitement PARAFAC lisse cette hétérogénéité en nombre de composants.

IV.F.3 Milieu des eaux de sol

Les quatre missions effectuées associées aux eaux de sol rassemblant un total de 188 échantillons sont listées dans le Tableau 10. La mission Brésil SGC 2007 qui contient 69 échantillon, est la campagne la plus importante. Le maximum de fluorescence intégrée est lié à la mission Brésil LINS 071219.

Nom de milieu	Nom de mission	Numéro dans le regroupement	Fluorescence intégrée	Nombre d'échantillons
Eaux de sol	Brésil SGC 2007	A	1684540	69
	Brésil LINS 071219	B	1767040	35
	Brésil LINS 080430	C	374191	42
	Brésil LINS 090616	D	830497	42
Nombre total d'échantillons				188

Tableau 10: Composition du groupe eaux de sol, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.

Le milieu des eaux de sol représente un groupe homogène en nombre d'échantillons (69, 35, 42 et 42) mais dont les composants extraits individuellement sont assez hétérogènes en forme. Dans le traitement du regroupement (**Figure 68**, ligne T) on peut s'apercevoir que les composants listés par ordre de longueur d'onde représentent plutôt les composants des missions Brésil LINS (**Figure 68**, lignes B à D). Ici, le composant 1 qui apparaît dans la seule mission Brésil LINS 071219 est représenté quand même dans le traitement de ce regroupement.

La mission Brésil SGC 2007 (**Figure 68**, ligne A) qui contient le plus d'échantillons n'est pas représentée par le traitement de ce milieu, spécialement un fluorophore ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 300\text{nm}/410\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/410\text{nm}$) dans cette mission est apparemment absent dans le traitement de l'ensemble des MEEF considérées ici (**Figure 68**, ligne T).

Pour les eaux de sol, le composant 3 à la ligne T ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/430\text{nm}$, faible et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/460\text{nm}$, fort) possède une forme particulière avec un massif aux courtes longueurs d'onde d'excitation assez inhabituel. Ce composant est présent dans toutes les missions, même s'il ne possède pas la même intensité relative des pics C et A. Ce composant contient le pic C et le pic A avec des hauteurs respectives variables. Ceci peut signifier la présence majoritaire d'acide fulvique dans ce système (Mounier et al., 1999 ; Patel-Sorrentino et al., 2002). Ce résultat se différencie du cas de la mission Brésil LINS 071219 qui contient une participation égale des pics C et A.

Dans ce groupe-ci, ressort principalement le composant 4 (ligne T) ayant une émission proche de 500 nm ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/480\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{-}285\text{nm}/480\text{nm}$) correspondant au pic D (Stedmon et al., 2003) ou au pic F (Albert & Takacs, 2004). Ce composant est également présent dans le traitement individuel de chaque mission.

Les fluorophores 3 et 4 du traitement de ce milieu sont similaires à ceux trouvés dans les traitements individuels bien qu'il y ait des modifications de position et d'intensité relative.

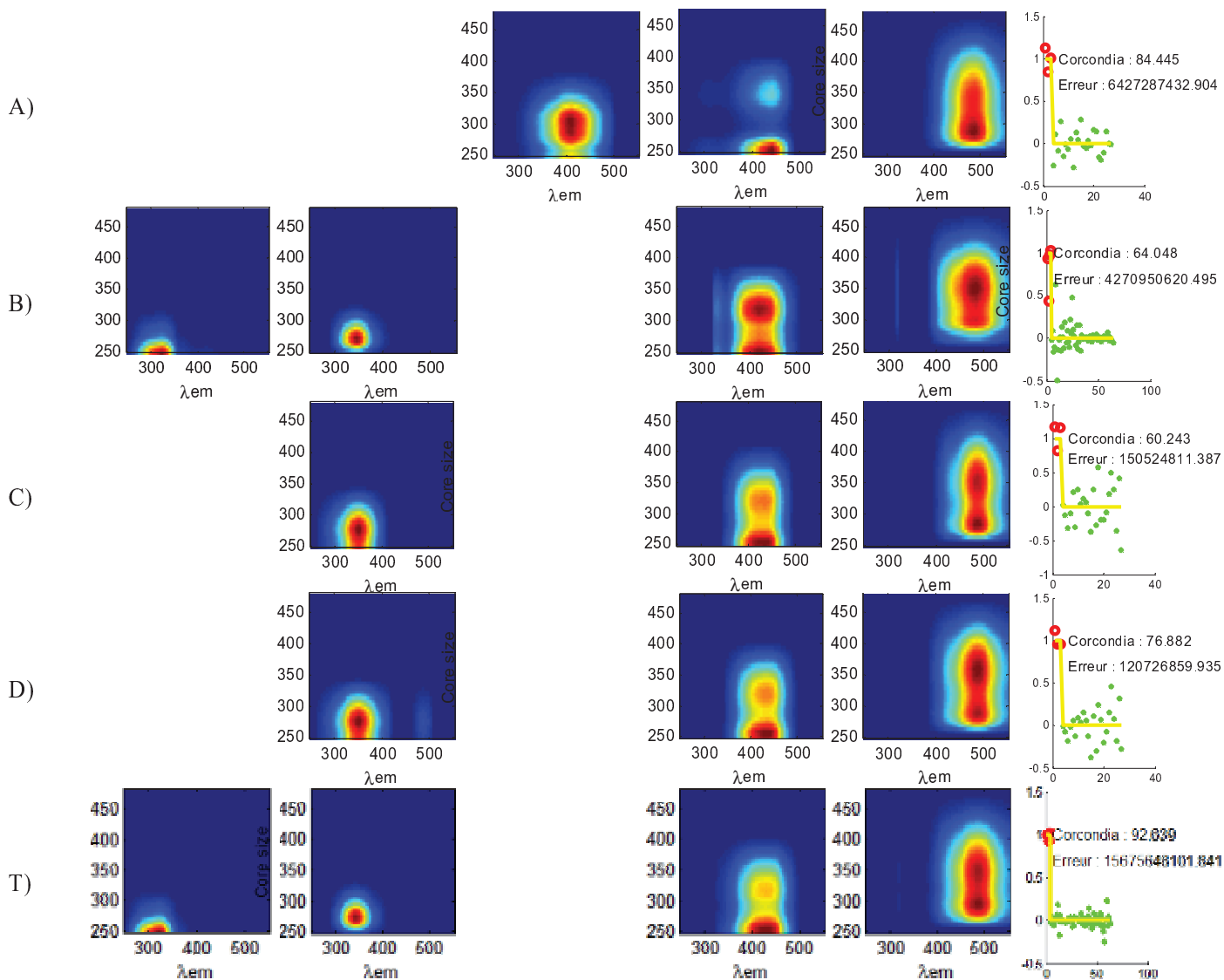


Figure 68: Composants obtenus par PARAFAC du milieu des eaux de sol

Les lignes A, B, C, D et T représentent les résultats obtenus individuellement pour les campagnes Brésil SGC 2007, Brésil LINS 071219, 080430, 090616 et le traitement global de ce milieu.

IV.F.4 Milieu des eaux douces

Le traitement de ce milieu rassemble 8 campagnes représentant 377 échantillons (Tableau 11). Les comparaisons entre chaque mission et le traitement du milieu est présenté (Figure 69).

Nom de milieu	Nom de mission	Numéro dans le regroupement	Fluorescence intégrée	Nombre d'échantillons
Eaux douces	BasVar 2008	A	27254	59
	BasVar 2009	B	24809	36
	BasVar 2009 Hebdo	C	45181	45
	Bosnie 2009	D	36155	10
	Brésil SGC 2009	E	52178	65
	Croatie Grottes 2008- 10	F	379807	52
	GIRAC	G	564628	81
	Norvège Aurora 2010	H	266811	29

Nombre total d'échantillons

377

Tableau 11: Composition du groupe eaux douces, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.

Dans ce traitement, on pourrait s'attendre à une augmentation du nombre de composants car les échantillons d'origines différentes, bien que provenant d'un même milieu, présentent une grande variété de composants. Ce n'est apparemment pas le cas (**Figure 69**, ligne T) puisque l'on obtient 4 composants. Pour mieux comparer les composants, tous les traitements sont listés par ordre de longueurs d'onde d'émission croissante.

Le composant 1 de la ligne T ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/355\text{nm}$) est typiquement protéinique. Le recouvrement spectral est assuré dans toutes les missions individuelles, mais soit par des composants de forme différentes, soit par des épaulements ou des étirements qui englobent la zone des protéines (**Figure 69**, ligne A, composant 1 et 2 ou ligne B, composant 1). Dans la zone protéinique, plusieurs fluorophores sont trouvés dans les résultats des traitements individuels. Mais dans le traitement de ce milieu, il n'y a qu'un seul fluorophore protéinique obtenu. Ce fluorophore de type tryptophane ressemble à celui de la ligne G qui représente la mission GIRAC contenant le nombre d'échantillons et la fluorescence intégrée les plus grands.

Le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/405\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/405\text{nm}$) et le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 265\text{nm}/430\text{nm}$) à la ligne T semblent être une décomposition des fluorophores comprenant les pics A, C, A' et M. Ces composants reliés aux substances humiques sont présents dans toutes les campagnes, mais sous des formes ou des combinaisons différentes. Dans ce groupe également, le traitement global semble favoriser une prépondérance aux pics excités par les courtes longueurs d'onde dans les composants 2 et 3 qui sont bimodaux. Les formes de ces deux fluorophores ne ressemblent pas du tout à celles de la mission GIRAC (ligne G), mais plutôt à celles de la mission Brésil SGC 2009, qui ne participe ni au nombre maximal, ni à la fluorescence intégrée maximale du jeu de données, c'est-à-dire que les importances spectrales de la mission Brésil SGC 2009 sont plus concentrées sur ces deux composants provenant des substances humiques. Ceci est confirmé par les résultats de contributions PARAFAC.

Le composant 4 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 350\text{nm}/480\text{nm}$) (**Figure 69**, ligne T) est proche de celui de la mission Brésil SGC 2009 (ligne E). Cette forme est particulière, car la zone des intensités maximales est allongée sur une grande gamme de longueurs d'onde d'excitation, au lieu d'être séparée en deux pics comme dans les autres missions. Ce composant est peut être un composant différent. Selon la longueur d'onde, il peut contenir le pic « Z » (Plaza et al, 2005).

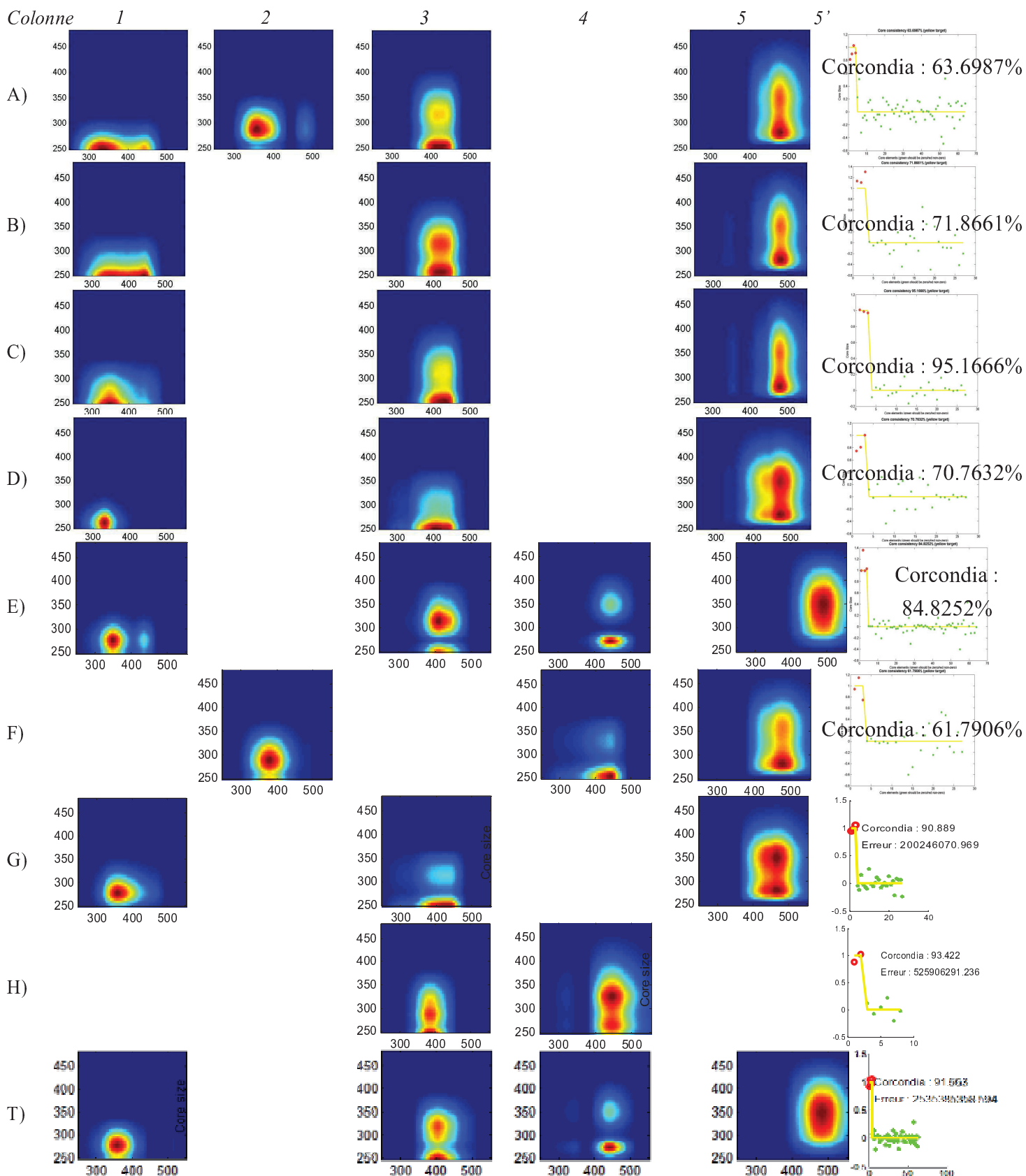


Figure 69: Composants obtenus par PARAFAC du milieu des eaux douces

Les lignes A, B, C, D, E, F, G, H et T représentent les résultats obtenus individuellement pour les campagnes BasVar 2008, BasVar 2009, BasVar 2009 Hebdo, Bosnie 2009, Brésil SGC 2009, Croatie Grottes 2008- 10, GIRAC, Norvège Aurora 2010 et le traitement global de ce milieu.

Ainsi, il ne suffit pas d'avoir un poids important ni en nombre d'échantillons ni en fluorescence intégrée dans le jeu de données pour avoir une influence dans le résultat final. L'exemple de la campagne Brésil SGC 2009 (**Figure 69**, ligne E), qui comporte 65 échantillons (Tableau 11) et une faible fluorescence intégrée (52 178 par rapport le maximum 564 628 dans le jeu de données, Tableau 11) fait partie des composants PARAFAC du milieu.

Dans ce regroupement, on a également le cas de la campagne Bosnie 2009 (**Figure 69**, ligne D) qui ne représente que 10 échantillons sur un jeu de 377 et dont la matière organique provient d'un milieu peu commun. Le pic protéinique de cette campagne (**Figure 69**, ligne D, composant 1) est pris en compte dans le composant 1 (**Figure 69**, ligne T) qui représente un autre pic protéinique voisin. Son poids dans le système du traitement global n'est pas suffisant pour persister à l'issue du traitement du milieu. Les contributions spectrales qui disparaissent sont probablement réparties dans les quatre autres contributions du regroupement.

Le traitement du milieu des eaux douces donne un corcondia supérieur à 91%. Ce score est à comparer à la variation des corcondia des traitements individuels qui varient de 61% à 95%. Le nombre de fluorophores (quatre) trouvés dans ce traitement est inférieur au nombre des fluorophores (cinq ou six) trouvés dans les traitements individuels des campagnes.

IV.F.5 Milieu des eaux extraites

Dans le milieu des eaux extraites, 187 échantillons provenant de 3 missions sont regroupés ensemble (Tableau 12). Tous ces échantillons ne sont pas prélevés sur les terrains de prélèvement, mais extraits avec des solvants chimiques.

Nom de milieu	Nom de mission	Numéro dans le regroupement	Fluorescence intégrée	Nombre d'échantillons
Eaux extraites de sol	Toulon Tunisie (TT) ARCUS 2010	A	891048	47
	Brésil LINS SI et E66 2007	B	264843	13
	Brésil LINS SI et E66 2009	C	48720	118
Nombre total d'échantillons				187

Tableau 12: Composition du groupe des eaux extraites, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.

On observe de grandes différences entre les composants associés aux trois missions individuelles.

Dans le traitement global, le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{nm}/345\text{nm}$) considéré comme un fluorophore protéinique de type tryptophane (pic T selon Coble, 1996) représente le composant seulement trouvé dans la mission A uniquement (Toulon-Tunisie ARCUS 2010). L'absence de ce pic dans les autres missions n'influence pas l'importance de ce composant. Le composant 2 représente un composant aux basses longueurs d'onde d'excitation avec un pic à l'intensité maximale ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/435\text{nm}$). Ce composant représente un pic de type acide humique souvent lié à un milieu aquatique (pic A' selon Burdige et al., 2004). Le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/400\text{nm}$, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 300\text{nm}/400\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 330\text{nm}/400\text{nm}$) et il semble également présent dans les échantillons des missions TT ARCUS 2010 (TT) et Brésil LINS SI et E66 2009 (Brésil 2009). Dans la ligne A de la **Figure 70**, les dernières contributions spectrales ne trouvent pas leur équivalent dans les lignes B, C et T. Cette remarque est valable aussi pour les deux dernières contributions de la ligne C. En fait,

dans le cas des missions TT et Brésil 2009, le corcondia est très proche du seuil de 60% fixé arbitrairement pour définir le nombre optimal de fluorophores utilisés par PARAFAC. Si l'on relève ce seuil, le nombre de composants passe de 4 à 3 pour la mission TT et de 3 à 2 pour la mission Brésil 2009 (Annexe 5 – Tous les traitements PARAFAC). Dans ce cas, la dernière nouvelle contribution spectrale de la ligne A ressemble à la dernière contribution de la ligne B, de même pour la deuxième contribution de la ligne C. Un tel résultat montre que le choix automatique du nombre optimal de composants PARAFAC n'est pas une solution que l'on peut généraliser au traitement de toutes les MEEF. Ceci peut être dû également au fait que les échantillons subissent une sélection spécifique due au traitement d'extraction.

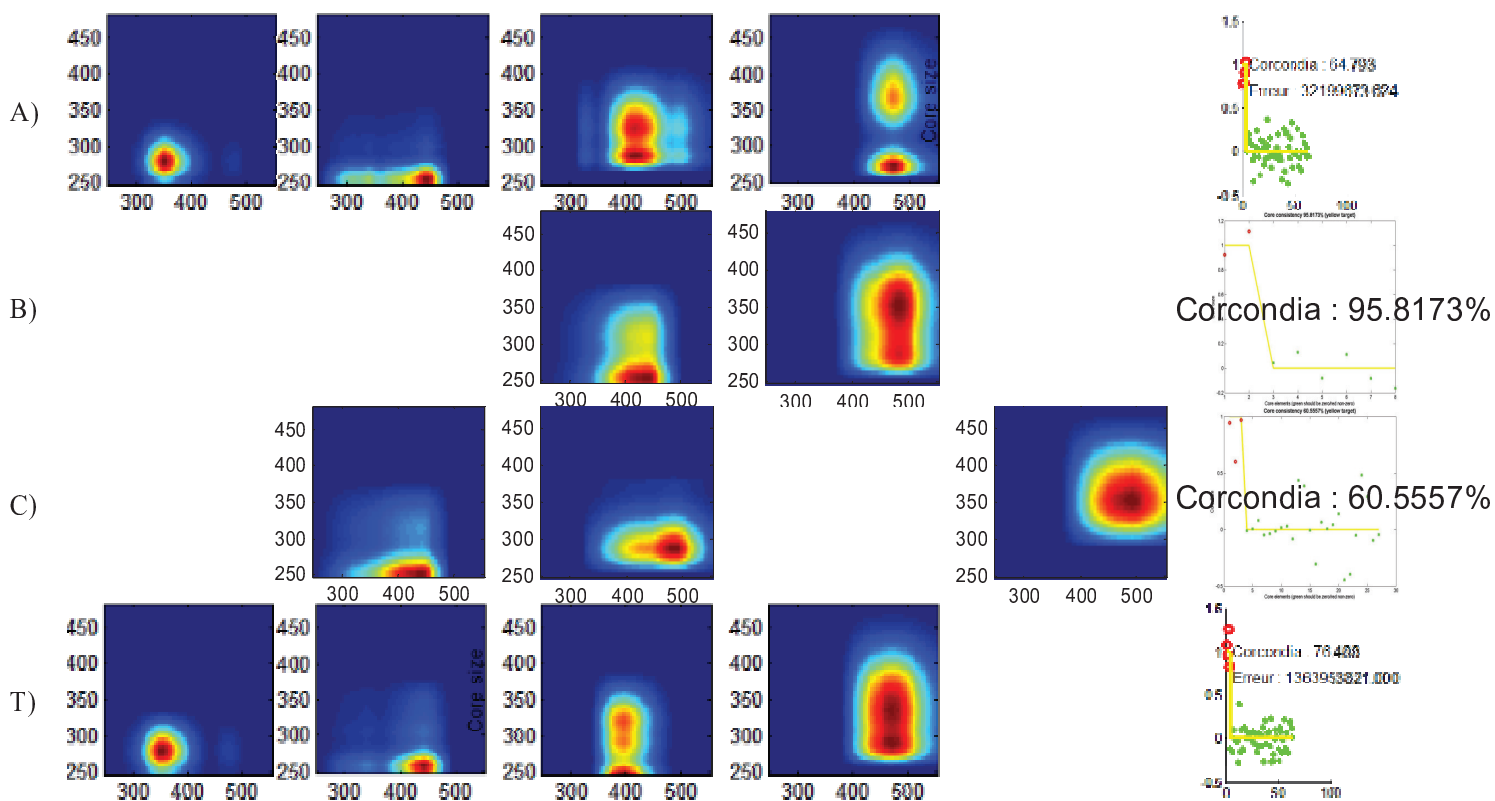


Figure 70: Composants obtenus par PARAFAC du milieu des eaux douces

Les lignes A, B, C, et T représentent les résultats obtenus individuellement pour les campagnes Toulon Tunisie (TT) ARCUS 2010, Brésil LINS SI et E66 2007, Brésil LINS SI et E66 2009 et le traitement global.

IV.F.6 Milieu des eaux interstitielles

Trois missions des eaux interstitielles prélevées dans les sédiments en provenance de Croatie et de Toulon sont rassemblées ensemble (Tableau 13). Parmi 115 échantillons, la mission de la rade de Toulon représente le nombre maximal des échantillons, mais la mission Croatie-Marina contient le poids maximal de fluorescence intégrée. Les fluorophores trouvés des missions individuelles et globale sont montrés dans la Figure 71.

On retrouve, dans toutes les campagnes le composant protéinique et les composants de type humique. Pour les eaux interstitielles du port de Martinska seulement deux composants sont extraits, mais le composant de type humique (Figure 71, ligne A, composant 2) a une gamme spectrale plus large en émission, sans doute dû à une mauvaise séparation. Dans ce groupe, la disproportion entre le nombre d'échantillon pour la campagne Toulon (93) et les deux campagnes croates (22) fait que le résultat de

l'analyse globale est très proche de l'extraction de la campagne Toulon (Figure 71, ligne C). Seul le composant protéinique global a été un peu raboté dans les courtes longueurs d'onde d'excitation (Figure 71, ligne T, composant 3). En ce qui concerne le nombre de composants nécessaires pour décrire l'ensemble du système (N=3), il reste cohérent, mais contrairement au groupe précédemment traité, dans ce cas, le corcondia du traitement global est le plus mauvais score : 80% par rapport au traitement individuel (83 à 98%).

Nom de milieu	Nom de mission	Numéro dans le regroupement	Fluorescence intégrée	Nombre d'échantillons
Eaux interstitielles	Croatie-Marina 2010 EI	A	177293	11
	Croatie-Martinska 2010 EI	B	87647	10
	Rade de Toulon 2009 Eaux interstitielles	C	147557	93
Nombre total d'échantillons				115

Tableau 13: Composition du groupe des eaux interstitielles, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.

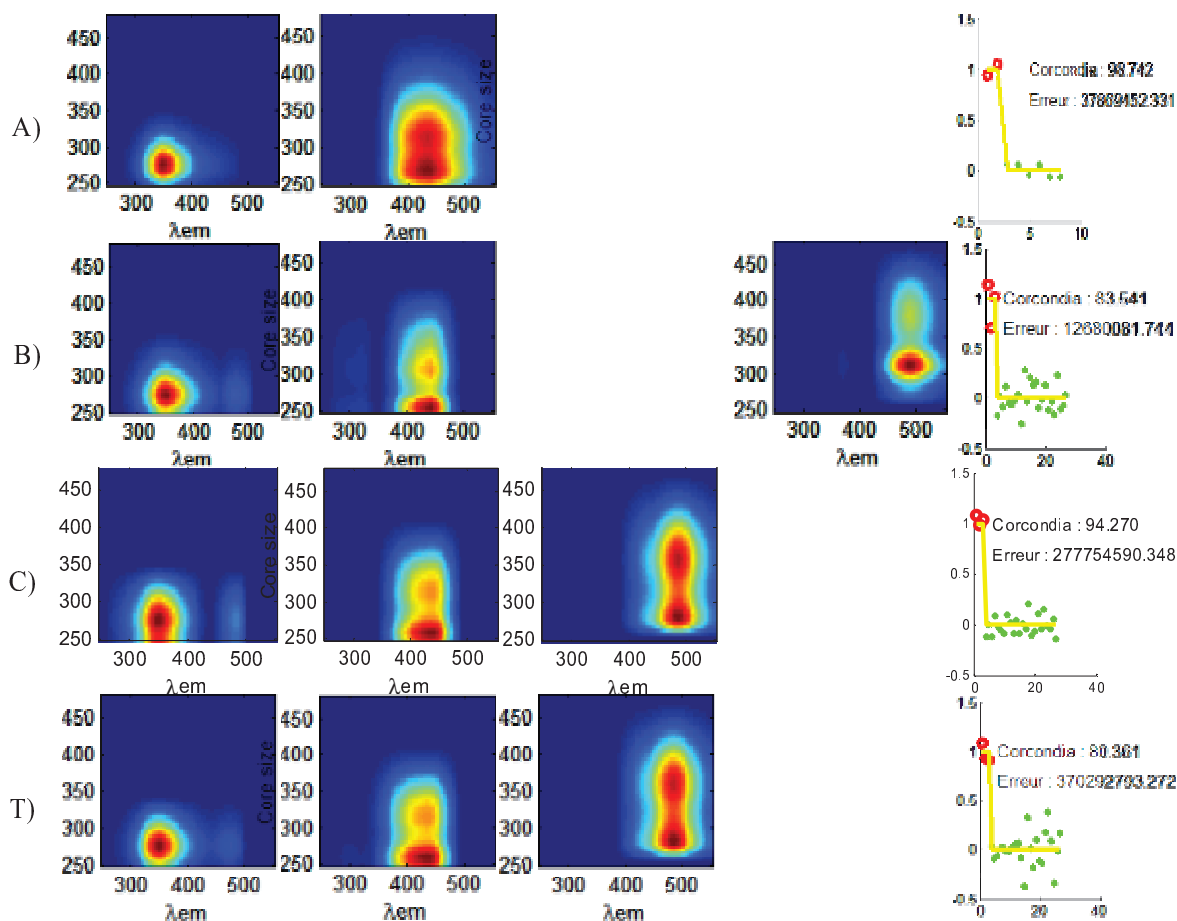


Figure 71: Composants obtenus par PARAFAC pour les eaux interstitielles de sédiment.

Les lignes A, B, C, et T représentent les résultats obtenus individuellement pour les campagnes Croatie-Marina 2010 EI, Croatie-Martinska 2010 EI, Rade de Toulon 2009 Eaux interstitielles et le traitement global du milieu.

Deux fluorophore terrestres (composant 1 et composant 2) sont trouvés dans ce milieu. Ceci signifie que le milieu sédimentaire est plus proche de la terre au lieu de la mer, même s'il y a l'influence des eaux de mer en surface. Les composants 1 et 2 étant considérés terrestres peuvent aussi se former dans le milieu super compact de sédiment. Autrement dit, les composants sont des produits obtenus

dans les conditions spéciales où il y a des molécules solides et compactes. Ils ne sont pas uniquement réservés pour le milieu terrestre.

Résumé des fluorophores trouvés dans les milieux d'échantillon

λ_{EX} (nm)			< 250	< 250	270-280	290-300 + < 250	320-340 + 255 - 270	365-390 + 270-280	375 + 320
λ_{EM} (nm)			295-305	335-360	335-360	390-415	425-450	465-490	495
Nom de milieu	Somme des N° de fluorophores trouvés dans les missions	N° de fluorophores trouvé dans le milieu	Pic S	Pic R	Pic T	Pic M + Pic A'	Pic C + Pic A	Pic D + Pic F	Pic E + Pic Z
Eaux côtières	4	3		M		/(M)	M/(A)	X	
Eaux de mer	5	3		X	X		X		
Eaux de sol	4	3	X		X		X	X	
Eaux douces	5	4			X	X	X	X	
Eaux extraites	4	4			X	X	X	X	
Eaux interstitielles	5	3			X		X	X	
N° de participations:			1	1.5	4.5	3.5	5.5	5	0
N° de milieux:			6						
Taux de participation:			16.67%	25%	60.00%	58.33%	91.67%	83.33%	0%

X : participation complète comme un fluorophore ; M : demi – participation, construction d'un fluorophore avec un autre pic ; S : désigné séparément dans deux fluorophores ; / (*) : une seule partie montrée comme un fluorophore. Tous les genres de participation sont comptés une fois de participation.

Tableau 14: Fluorophores trouvés dans chaque milieu et leurs participations dans le jeu de données.

Le **Tableau 14** rassemble les résultats obtenus en terme de fluorophores présents et de nombre de composants PARAFAC extraits. En utilisant une systématique de détermination du nombre de composants nécessaires pour la caractérisation du système par PARAFAC, comme défini dans ce travail, on observe un maintien ou une diminution du nombre maximal de fluorophore nécessaire pour décrire des jeux de données plus grands, rassemblant des échantillons de même milieu ou de même environnement physico-chimique.

D'une manière générale, les composants similaires qui apparaissent plusieurs fois dans différentes missions, comme les composants de type C ou A (**Tableau 14**) sont en quelque sorte mutualisés. Par contre pour les composants spécifiques, il n'y a pas de règles particulières. Un composant spécifique peut persister dans le traitement global même si le nombre de MEEF le concernant est faible. Toutefois, la tendance générale pour ces composants est l'assimilation ou la disparition pure et simple des composants du traitement global.

Si on observe l'occurrence des composants dans les différents groupes (**Tableau 14**) on remarque que les composés de type C + A sont présents pratiquement dans tous les milieux avec 91% d'occurrence. Ce sont donc des composés présents dans tous les systèmes, avec une variabilité des domaines spectraux plus ou moins importante en fonction du milieu. Les composés de type D ou F, occurrence 83%, sont présents dans tous les milieux terrestres ou proches de terrestre, les sédiments et les eaux côtières mais apparemment pas dans les eaux de mer. Par contre, les composés recouvrant les domaines spectraux des pics M et A', habituellement considérés comme marins (Coble, 1996) sont

présents dans les eaux côtières, les eaux de sol et les eaux douces. La présence dans les eaux de mer est souvent en relation avec le pic protéinique (pic T).

Afin de pousser plus loin le traitement global des jeux de donnée, un traitement rassemblant uniquement trois groupes de milieu (forte salinité, faible salinité et matière organique d'extraction) est entrepris dans le paragraphe suivant.

IV.G Application PARAFAC aux missions en fonction à la salinité

Trois groupements sont définis pour analyser les échantillons des eaux en fonction de la salinité de leur environnement. En effet, la salinité est un facteur discriminant des environnements différents. De manière arbitraire, le groupe des eaux non-salées, ou de faible force ionique, contient les eaux douces et les eaux de sol ; le groupe des eaux salées, ou de forte salinité, rassemble les eaux côtières, les eaux de mer et les eaux interstitielles de sédiment marin ; enfin le groupe des eaux extraites est classé à part car bien que dans un milieu d'extraction à force ionique extrêmement forte, les conditions sont différentes des deux premiers groupes. Ce groupe contenant un seul milieu qui est étudié précédemment (IV.F.5, page 90) n'est pas détaillé dans cette partie.

IV.G.1 Groupement des eaux non-salées

Le traitement global du groupe des eaux non-salées maintient le nombre de composant à 5. On retrouve l'ensemble des composants extraits pour les deux milieux précédents (Figure 72, ligne A et B) : Les composants ayant une émission à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/305\text{nm}$), le composant protéinique ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/340\text{nm}$), les deux composants bimodaux à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 315\text{nm}/415\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/415\text{nm}$) et à ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 345\text{nm}/445\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 275\text{nm}/445\text{nm}$), et un composant de type fulviques allongé sur $\lambda_{EM} = 480\text{nm}$.

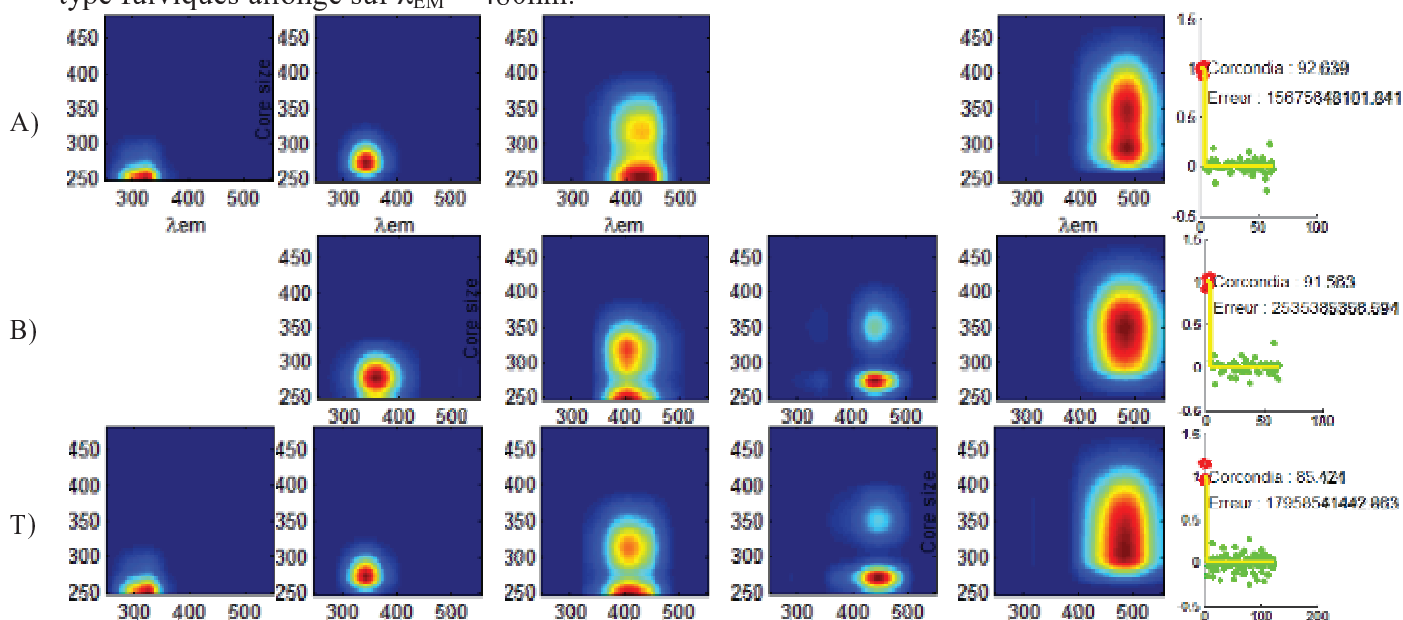


Figure 72: Composants obtenus par PARAFAC du groupe des eaux non-salées

Les lignes A, B, et T représentent les résultats obtenus pour les milieux des eaux de sol, des eaux douces et le traitement global du groupe des eaux non-salées.

Le composant 5 est allongé selon les longueurs d'onde d'excitation, au lieu de montrer deux pics séparés (pic D et pic F). Ce composant est souvent présent dans les résultats.

IV.G.2 Groupement des eaux salées

Trois composants sont de nouveau trouvés en traitant toutes les eaux salées (Figure 73, ligne T) : le composant 1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/355\text{nm}$) protéinique (Figure 73, ligne T, composant 1) ; le composant 2 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 325\text{nm}/430\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 260\text{nm}/430\text{nm}$) des substances humiques (pic C et pic A selon Coble, 1996) (Figure 73, ligne T, composant 2) ; et enfin le composant 3 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 365\text{nm}/485\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/485\text{nm}$) contient les pics D (Stedmon et al., 2003) et F (Alberts & Takacs, 2004b) en rapport avec les acides fulviques terrestres (Figure 73, ligne T, composant 3).

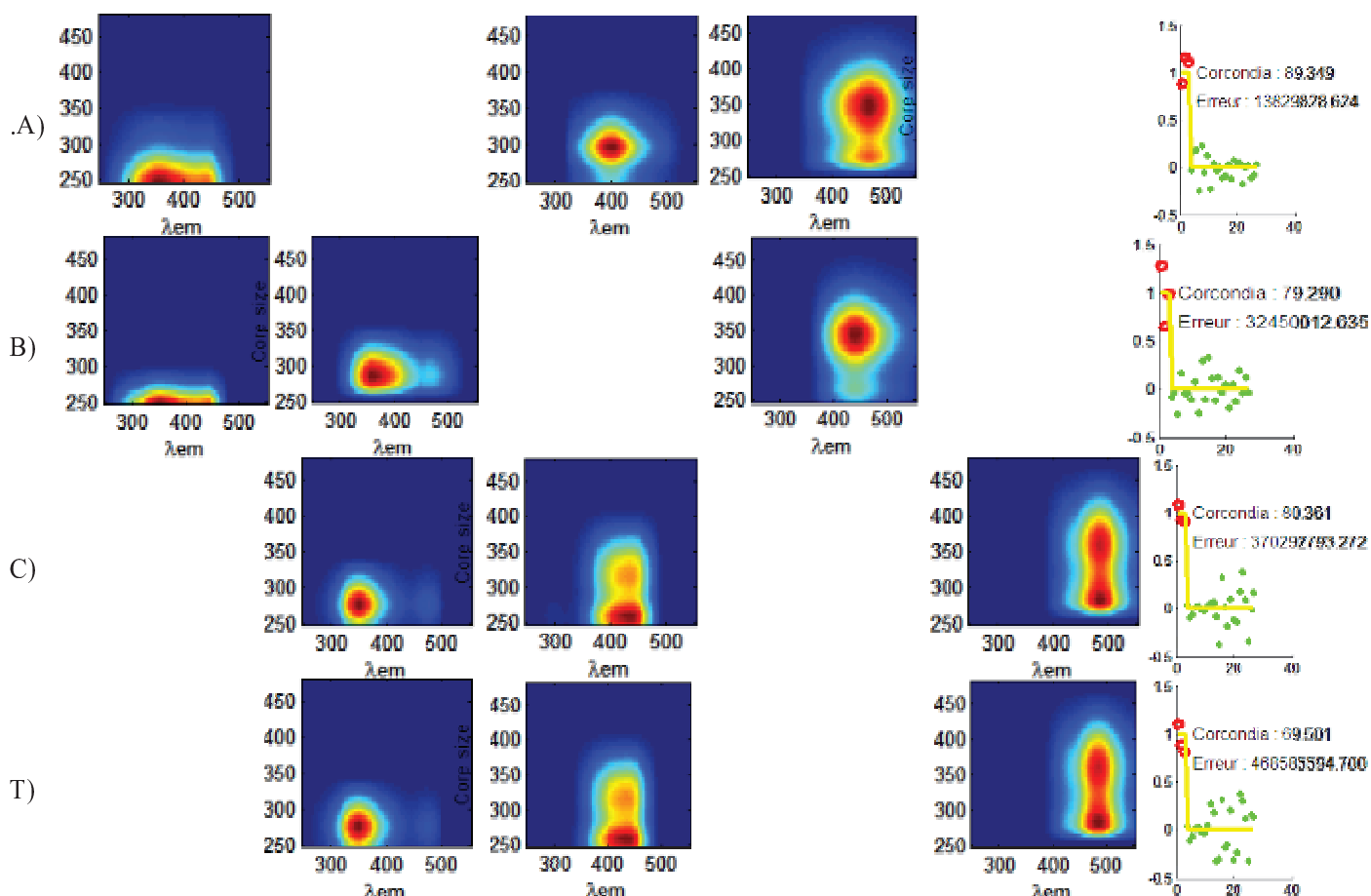


Figure 73: Composants obtenus par PARAFAC du groupe des eaux salées

Les lignes A, B, C et T représentent les résultats obtenus pour les milieux des eaux côtières, des eaux de mer, des eaux interstitielles et le traitement global du groupe des eaux salées.

Dans le cas du traitement des eaux à forte salinité, il y a apparemment une perte d'information en ce qui concerne de nombreux pics. Malgré l'importance du nombre d'échantillons d'eau de mer, il semble que ce soit les échantillons d'eau interstitielle qui prédomine dans la définition des composants du traitement global. En traitant l'ensemble, il y a une modification importante de la morphologie et de la position des composants. Le pic protéinique des eaux de mer profonde (Figure 73, ligne B, composant 1) n'est plus exprimé, sans doute partagé dans le traitement global entre le pic protéinique (Figure 73, ligne T, composant 1) et le pic humique (Figure 73, ligne T, composant 2).

Résumé des fluorophores trouvés dans les groupements d'échantillon

λ_{EX} (nm)			< 250	< 250	270-280	290-300 + < 250	320-340 + 255 - 270	365-390 + 270-280	375 + 320
λ_{EM} (nm)			295-305	335-360	335-360	390-415	425-450	465-490	495
Nom de milieu	Somme des N° de fluorophores trouvés dans le milieu	N° de fluorophores trouvé dans le groupe	Pic S	Pic R	Pic T	Pic M + Pic A'	Pic C + Pic A	Pic D + Pic F	Pic E + Pic Z
Groupe des eaux non-salées	4	4	X		X	X	X	X	
Groupe des eaux salées	5	3			X		X	X	
Eaux traitées	4	4	X		X		X	X	
N° de participations:			2	0	3	1	3	3	0
N° de groupe:			3						
Taux de participation:			66.67%	0%	100%	33.33%	100%	100%	0%

X : participation complète comme un fluorophore ; M : demi – participation, construction d'un fluorophore avec un autre pic ; S : désigné séparément dans deux fluorophores ; / (*) : une seule partie montrée comme un fluorophore. Tous les genres de participation sont comptés une fois de participation.

Tableau 15: Fluorophores trouvés dans chaque groupe en fonction de salinité et leurs participations dans le jeu de données.

Le tableau des fluorophores trouvés dans trois groupes d'environnement et la fréquence d'apparition des composants (**Tableau 15**) montre un nombre de fluorophores qui varie entre trois ou quatre et reste constant lorsque l'on rassemble les données d'un même milieu dans un même jeu de données. Ceci signifie que, s'il y a une possible diminution de nombre de composants lorsque l'on rassemble les échantillons par leur nature de salinité, le risque de perte d'information dans les rassemblements est assez faible si l'on reste dans la même catégorie de force ionique. Globalement, des domaines spectraux comme le pic R ou le pic E ne sont plus repérés. On peut considérer que les informations spectrales sont intégrées dans les autres composants.

Les trois composants représentant les pics T, C-A et D-F sont présents dans tous les groupes, et donc dans tous les environnements naturels, même dans les matières organiques extraites. Par contre, le composant en rapport avec les pics M-A' n'apparaît que dans le groupe des eaux non-salées. On peut donc penser que ce composant a une relation avec les groupes non salés uniquement.

IV.H Application PARAFAC à l'ensemble de la base de données

Finalement, un traitement PARAFAC est effectué à l'ensemble des MEEF soit 1146 échantillons provenant de différents environnements précédemment décrits. Les résultats obtenus montrent cinq composants toujours avec la même systématique de choix du nombre maximal de composants. La **Figure 74** présente les résultats obtenus pour les trois grandes catégories d'environnements et le résultats pour l'ensemble des MEEF. Deux composants sont dans la région des composés de type protéine : $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = <250\text{nm}/330\text{nm}$, pic R et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 280\text{nm}/350\text{nm}$, pic T (**Figure 74**, ligne T, composants 1 et 2). On retrouve le composant de pic R dans les eaux non-salées et le pic T dans les trois traitements précédents : l'information sur ces composés ne semble pas avoir été perdue. On peut remarquer toutefois que les pics protéiniques du résultat global (**Figure 74**, ligne T, composants 1 et 2) sont très proches de ceux en provenance des eaux non-salées (**Figure 74**, ligne A, composants 1 et 2) qui est majoritaire dans le jeu de donné global (565 MEEF, soit 49% du total).

On retrouve également le composant 5 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 355\text{nm}/475\text{nm}$ et $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 295\text{nm}/475\text{nm}$) présent dans les trois grandes catégories également. La contribution spectrale du composant global, en particulier sa gamme spectrale d'émission, est intermédiaire entre le même composant en provenance des échantillons extraits (**Figure 74**, ligne C, composant 4) et celui des eaux de haute salinité (**Figure 74**, ligne B, composant 2). La forme et le domaine spectral sont très proches du composant de la catégorie eaux douces (**Figure 74**, ligne A, composant 1), il s'agit du composant qui représente le pic D d'origine des acides fulviques généralement terrestres.

Les deux autres composés bimodaux, avec un maximum de signal pour les courtes longueurs d'onde d'excitation (**Figure 74**, ligne T, composants 3 & 4) sont ceux en relation avec les pics M-A', et le pic C-A.

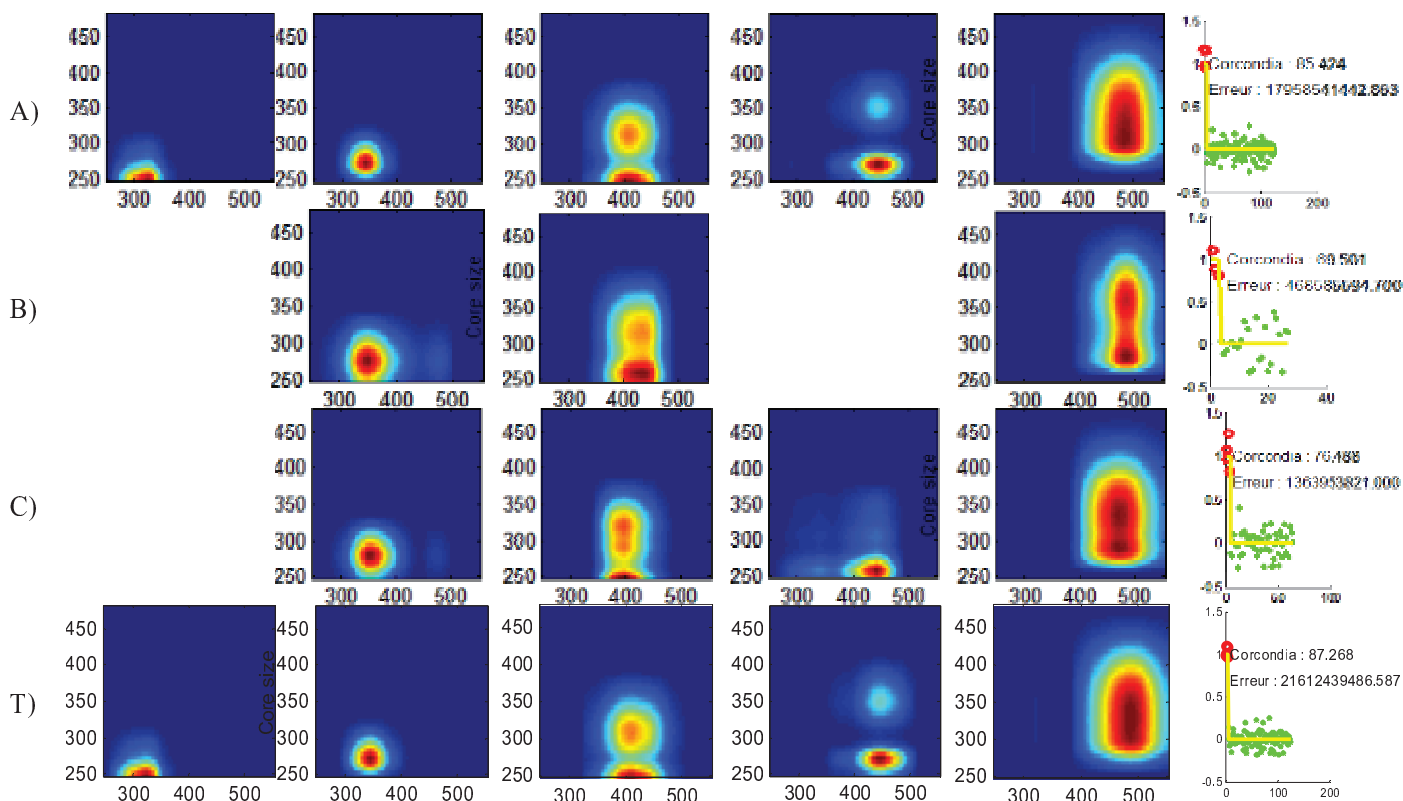


Figure 74: Composants obtenus par PARAFAC de toutes les MEEF

Les lignes A, B, C et T représentent les résultats obtenus pour les groupes des eaux non-salées, des eaux salées, des eaux extraites et le traitement global de tous les 1146 échantillons.

Les contributions spectrales présentes dans les lignes A, B et C sont suffisamment séparées. Lorsqu'on regroupe l'ensemble des MEEF (1146 échantillons), on trouve quasiment les mêmes contributions spectrales déjà présentes dans la ligne A.

Cet ultime regroupement de MEEF ne provoque pas la perte du nombre de fluorophores (N=5) par rapport au dernier niveau de groupement. Par contre, le nombre de fluorophores trouvés est inférieur au nombre maximal des fluorophores (N=7) référencé dans le **Tableau 7**. Finalement, parmi sept composants qui ont constitué ce jeu de données, cinq composants principaux sont retrouvés.

IV.1 Discussion sur l'impact de la catégorisation sur les composants

PARAFAC

Les résultats obtenus montrent plusieurs comportements en fonction du type de regroupement et de la qualité d'échantillon. On peut retenir, dans un premier temps, qu'il n'est apparemment pas nécessaire d'avoir un nombre important d'échantillons pour qu'un fluorophore persiste dans la solution après un regroupement. Ainsi ce n'est pas le nombre qui fait le composant. D'autre part, il en est de même pour la forme des composés. Dans certains cas, le jeu de donnée réarrange les composants du départ en les répartissant sur de nouveaux composants ou bien sur des composants existants ou communs.

On remarque également que pour un jeu de données d'un même environnement, l'augmentation du nombre d'échantillons entraîne généralement une réduction ou un maintien du nombre de composants. Ce comportement se retrouve jusqu'aux regroupements des grandes catégories de salinité. Par contre, lorsque des environnements très distincts et présentant des composants bien distincts sont rassemblés, le nombre de composants augmente comme c'est le cas dans le dernier regroupement.

Ces comportements sont toutefois associés, il faut le rappeler, à une systématique de choix du nombre de composants à des fins de comparaison. En effet, le choix d'un composant est souvent subjectif en raison des erreurs de mesure et du fait que l'on ne connaisse pas le nombre exact de composants. Si on compare ce travail à d'autres travaux publiés dans la littérature, on observe qu'avec l'augmentation du nombre d'échantillons naturels, le nombre de composants PARAFAC augmente peu.

Afin de comprendre comment les domaines spectraux sont couverts par les composants PARAFAC une étude de recouvrement en fonction des regroupements par milieu (ou catégorie) est proposée.

IV.J PARAFAC et variabilités environnementales

Les résultats précédents montrent que PARAFAC est un outil particulièrement performant pour séparer les différentes contributions spectrales de la MON. Dans cette partie, nous proposons une représentation particulière de ces contributions qui permet de mettre en évidence les domaines spectraux de la MON dont les fréquences d'occurrence sont les plus élevées, et ce, en fonction des missions de prélèvement, des milieux, etc. Cette nouvelle approche, différente de celle habituellement utilisée (« peak-picking ») est appelée par la suite "zones de recouvrement PARAFAC" (PARAFAC cross-over zone).

IV.J.1 Méthodologie

Les spectres d'excitation et d'émission des différents composants estimés par PARAFAC sont combinés pour construire les massifs de fluorescence. Pour chacun de ces massifs, on détermine le domaine spectral pour lequel l'intensité de fluorescence est, arbitrairement, au moins égale à 30% (ou à 40% ou à 50%) de sa valeur maximale : on obtient donc une image binaire formée de 1 pour tous les points qui vérifient cette condition et de 0 pour tous les autres. On combine ensuite toutes ces images binaires à l'aide de l'opérateur "ou logique" ce qui définit une nouvelle image binaire correspondant à la zone de présence des différentes contributions du jeu de données considéré (associé à une mission, par exemple). Toutes ces étapes sont répétées pour les autres jeux de données. Finalement, on calcule l'image du recouvrement des zones PARAFAC en sommant toutes les zones de présence précédentes. Dans ces conditions, le nombre d'occurrences maximal correspond au nombre de jeux de données utilisés pour construire les zones de recouvrement.

IV.J.2 Résultats

IV.J.2.a Recouvrement des composants issus des missions

La **Figure 75** représente les zones de recouvrement liées aux composants PARAFAC issus des missions. Toutes les zones de recouvrement font partie d'un domaine spectral allant de 250 nm à 480 nm en excitation et de 250 nm à 550 nm en émission. Elles sont également encadrées par les deux droites délimitant les phénomènes physiques de diffusion.

Dans la zone recouverte dans la **Figure 75**, on distingue aisément 3 zones qui reviennent fréquemment :

- * une zone située entre les longueurs d'onde d'excitation allant de 260 nm à 290 nm et les longueurs d'onde d'émission allant de 330 nm à 380 nm, que l'on nommera zone I ;
- * une zone située aux longueurs d'onde d'excitation allant de 250 nm à 350 nm et délimitée par les longueurs d'onde d'émission entre 390 nm et 460 nm, cette zone est appelée ensuite zone II ;
- * enfin une troisième zone qui se situe dans les longueurs d'onde d'excitation entre 270 nm et 390 nm et les longueurs d'onde d'émission entre 460 nm et 520 nm, cette zone sera nommée III.

Dans la zone I, on a un recouvrement assez uniforme centré autour de la position ($\lambda_{EX}=275$ nm / $\lambda_{EM}=350$ nm). Cette zone est généralement attribuée aux pics protéiniques. Dans la zone II, on

distingue 3 zones pour des longueurs d'onde d'excitation de 250, 280 et 325 nm pour une émission à 425 nm.

Si l'on compare ces recouvrements avec les pics habituellement relevés par peak-picking, on observe que la zone I recouvre le centre de gravité du pic T. Cette zone est fortement en relation avec les protéines. Dans la zone II, on remarque que les pics habituellement rencontrés sont au bord des zones recouvertes par l'ensemble des composants des missions. Ceci peut s'expliquer par le fait que les composants sont calculés par PARAFAC à partir de MEEF corrigées de tout effet d'écran interne alors que les pics A, A', C et M sont obtenus à partir de MEEF d'échantillons non dilués et dont les contributions spectrales n'ont pas été séparées. Il y a une très forte fréquence des pics A et A', montrant une prédominance des matières organiques de type fulvique dans l'ensemble des échantillons. Enfin dans la zone III, on retrouve les pics D, E et F au bord des domaines de recouvrement des composants, probablement pour les mêmes raisons évoquées précédemment.

Il est intéressant de noter que la partie centrale de la zone III, pourtant souvent représentée dans les composants avec une fréquence d'occurrence supérieure à 20 sur 25, ne fait l'objet d'aucun positionnement de pic dans les autres études de la MON.

Finalement, cette nouvelle méthodologie est appliquée aux composants PARAFAC avec trois seuils de pourcentage (30%, 40% et 50%). On remarque que le recouvrement obtenu avec le seuil de 30% sépare mieux certaines zones fluorescentes situées notamment dans la zone III ($\lambda_{EX}=325$ nm / $\lambda_{EM}=475$ nm) qui n'est pas détecté habituellement. Cependant, ce même seuil entraîne la disparition d'un pic de la zone II ($\lambda_{EX}=280$ nm / $\lambda_{EM}=425$ nm) qui est présent dans les **Figure 75, A et B**).

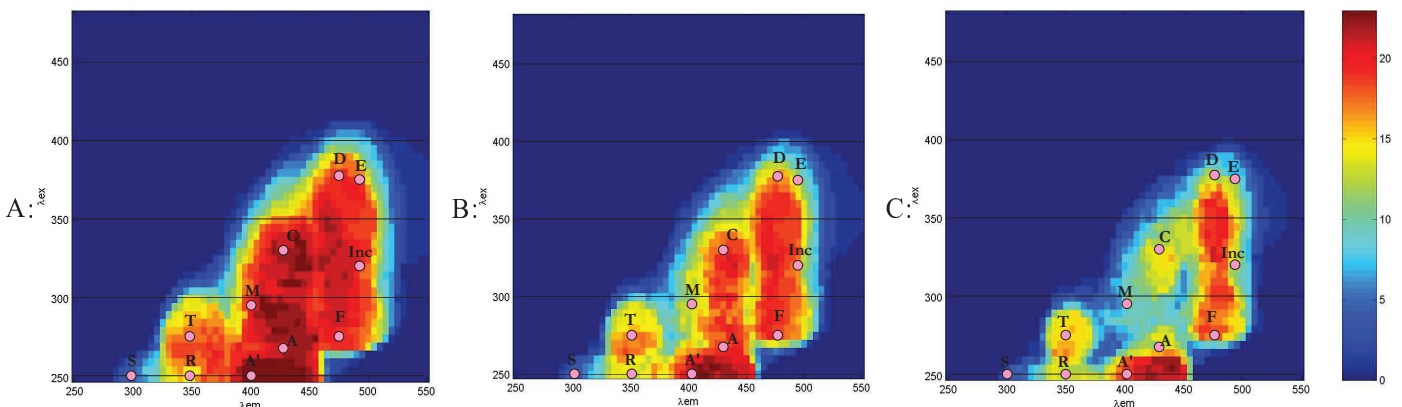


Figure 75: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour toutes les missions avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).

IV.J.2.b Recouvrement des composants liés aux milieux

En observant le recouvrement spectral obtenu par les composants extraits du traitement par milieu, on constate que le nombre de composant diminue globalement alors que le domaine recouvert reste généralement le même (**Figure 76**). On observe notamment que la zone spectrale des pics C et A est encore une fois la plus fréquente. Dans un jeu de données global, ces zones sont exprimées plusieurs fois et on peut s'attendre à ce que dans un traitement plus global, les composants représentant ces domaines spectraux, soient rassemblés dans des composants communs. On peut remarquer également que le pic S est faiblement représenté – un seul composant présent.

Parmi les traitements du recouvrement spectral ci-dessous (**Figure 76**) par les composants issus des

différents milieux, le graphique A montrant le choix de 50% des maxima d'intensité de chaque fluorophore ne marque pas une distinction claire entre les zones spectrales I, II et III. Cependant, le traitement avec 40% des maxima spectraux (graphique B) désigne les limites des zones spectrales clairement. Par contre, le traitement en provenant de 30% des maxima des signaux fluorescents (graphique C) perd son information spectrale à cause de sa limitation. Ceci confirme la limite de « peak-picking », car on ne peut pas obtenir assez d'informations sur des points ou des zones très limitées des pics spectraux.

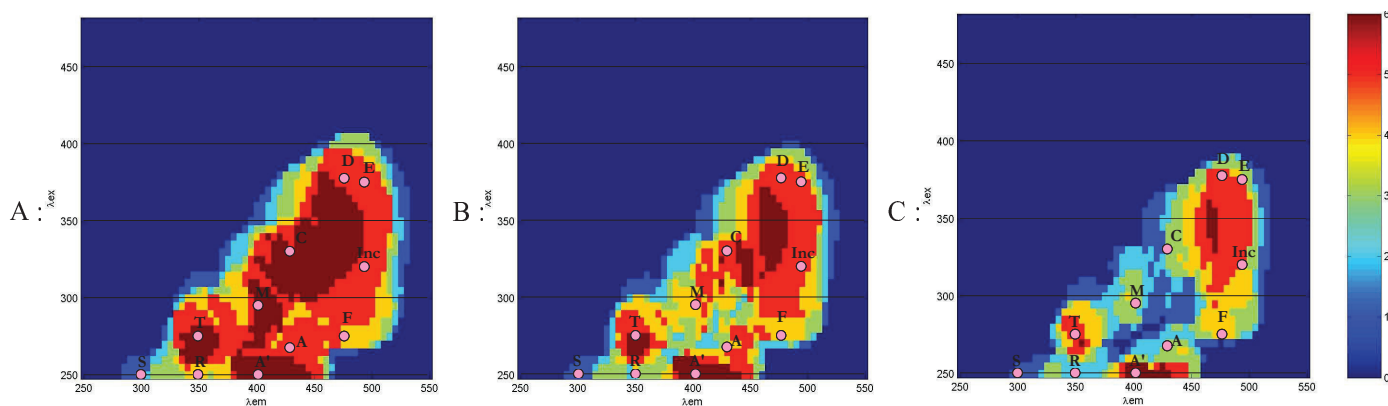


Figure 76: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour tous les milieux avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).

IV.J.2.c Recouvrement des grands groupes

Même si le nombre d'occurrence maximale est faible (qui correspond aux 3 grands groupes), on retrouve des zones assez similaires à celles précédemment observées. Ainsi, le seuil de 40% permet de mettre évidence les zones I, II et III. Par contre, dans le cas présent, le seuil de 50% ne permet pas une telle distinction et le seuil de 30% entraîne une perte importante de domaines spectraux incluant des pics connus (Figure 77, graphiques A, B et C).

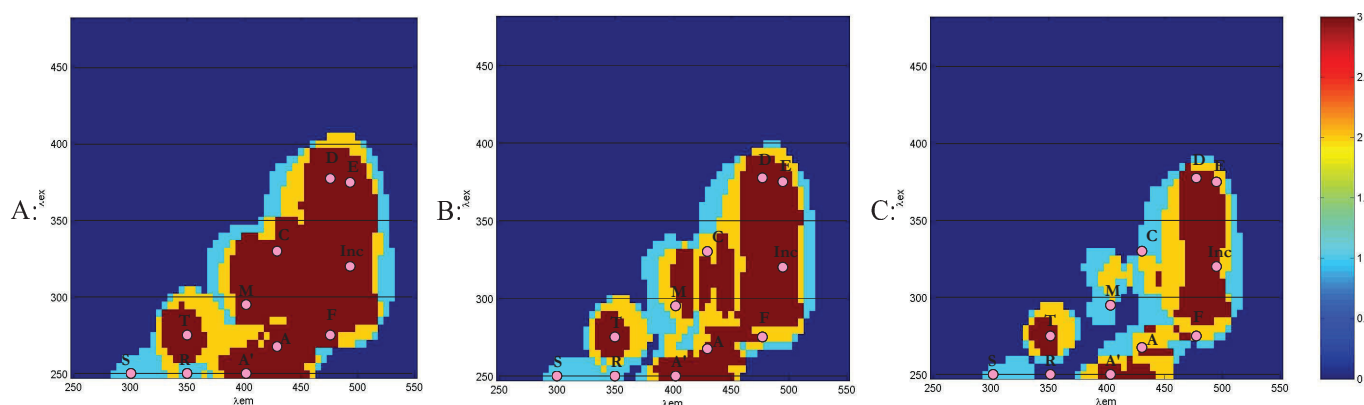


Figure 77: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour toutes les salinités avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).

IV.J.2.d Recouvrement de l'ensemble des échantillons

Dans ce cas, on dispose d'un seul ensemble de contributions spectrales ce qui signifie que le nombre d'occurrence maximale est égal à 1. La zone de recouvrement associée du seuil de 50% (40% et 30%)

respectivement) possède globalement les mêmes frontières que les régions spectrales que les zones de recouvrement précédentes obtenues avec les mêmes seuils respectifs. On remarque que pour la première fois les pics R et C ne font pas partie des zones de recouvrements dans le cas du seuil égal à 30%.

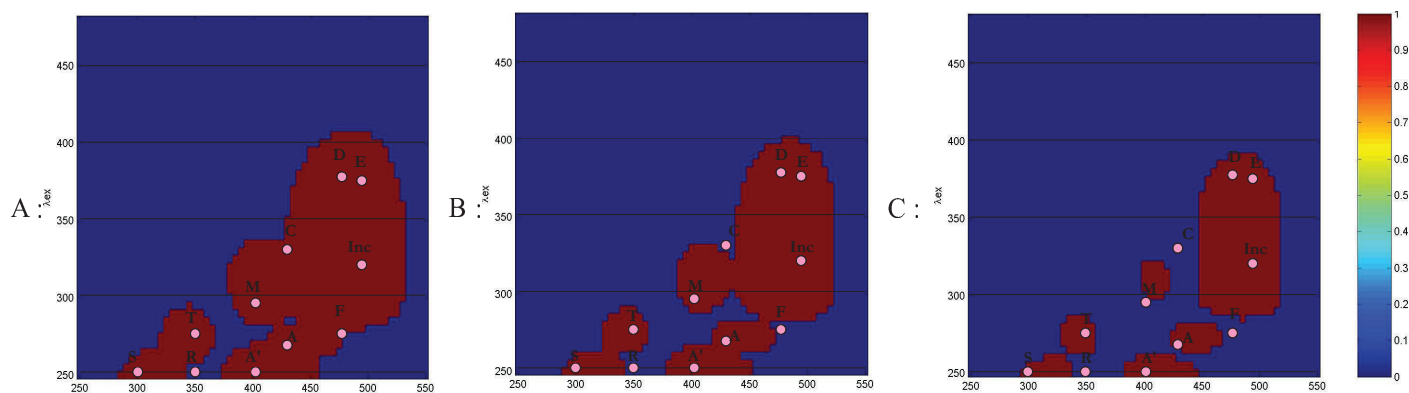


Figure 78: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour l'ensemble des échantillons avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).

Même s'ils restent différents des autres traitements des zones spectrales (missions, milieux et groupes par salinité), les zones spectrales me mettent à des mêmes positions allongées en diagonale de 250 nm à plus de 400 nm pour les longueurs d'onde d'excitation et de 300 nm à 500 nm. Ceci est confirmé par la plupart des publications. Les fluorophores varient dans leur cadre spectral de fluorescence.

IV.K Discussion avec les données de différents regroupements

L'étude des zones de recouvrement PARAFAC montre que la zone I associée aux fluorophores de type protéinique est caractérisée par une variabilité plus forte que les zones II et III liées aux substances humiques (respectivement acides humiques et acides fulviques). Afin d'illustrer différemment les conséquences de cette variabilité, on analyse une campagne de prélèvements, issue de la mission Rade de Toulon 2009, en fonction des quatre niveaux de regroupement (mission, milieu, salinité et totalité). Dans un premier temps, on relie entre elles, arbitrairement mais judicieusement, les contributions spectrales des différents milieux de regroupement. Les contributions spectrales similaires sont considérées comme équivalentes, c'est-à-dire représentant le même type de fluorophores (**Tableau 16**). La Figure 79 présente l'évolution de l'intensité relative des trois composants PARAFAC en fonction de la profondeur, et ce, pour les quatre niveaux de regroupement. Si en passant à un niveau de regroupement supérieur, les MEEF de la campagne considérée ici sont associées à d'autres MEEF dont les intensités de fluorescence sont plus élevées, il est évident que les intensités relatives de la campagne Rade de Toulon 2009 seront plus faibles que les autres. Cela signifie aussi qu'il est possible de comparer l'importance des composants PARAFAC à l'aide des intensités relatives de deux échantillons issus d'un même milieu ou bien de deux milieux différents, à condition que les MEEF associées fassent partie du même jeu de données traité par PARAFAC.

On constate que l'évolution des intensités relatives est globalement identique à un facteur multiplicatif près. Ceci est confirmé par la **Figure 80**, qui montre l'intensité relative des composants C1, C2 et C3 pour les trois niveaux de regroupements les plus élevés (milieu, salinité et totalité) en fonction de l'intensité relative du niveau de regroupement le plus bas (mission). Pour les composants 1 et 2, il existe une forte corrélation entre les intensités relatives liées aux différents niveaux de regroupement : on peut donc dire que le regroupement affecte très peu l'intensité relative des fluorophores. Autrement dit, dans le cas des composants 1 et 2, le regroupement entraîne une faible perte d'information. En revanche, pour le composant 3, la corrélation entre l'intensité relative calculée pour les différents niveaux diminue de façon notable. Dans ce cas, le regroupement implique une perte d'information. En fait, pour chaque niveau, le composant 3 de la campagne Rade de Toulon 2009 est regroupé avec d'autres composants similaires issus d'autres campagnes. Puisque la corrélation diminue, cela implique que les contributions spectrales des différents composants 3 varient en forme et en position d'une campagne à une autre. Finalement, la **Figure 80 (C)** du composant 3 illustre autrement ce qui est montré dans la partie précédente (IV.J.2), à savoir la variabilité des contributions spectrales de la zone I de type protéinique.

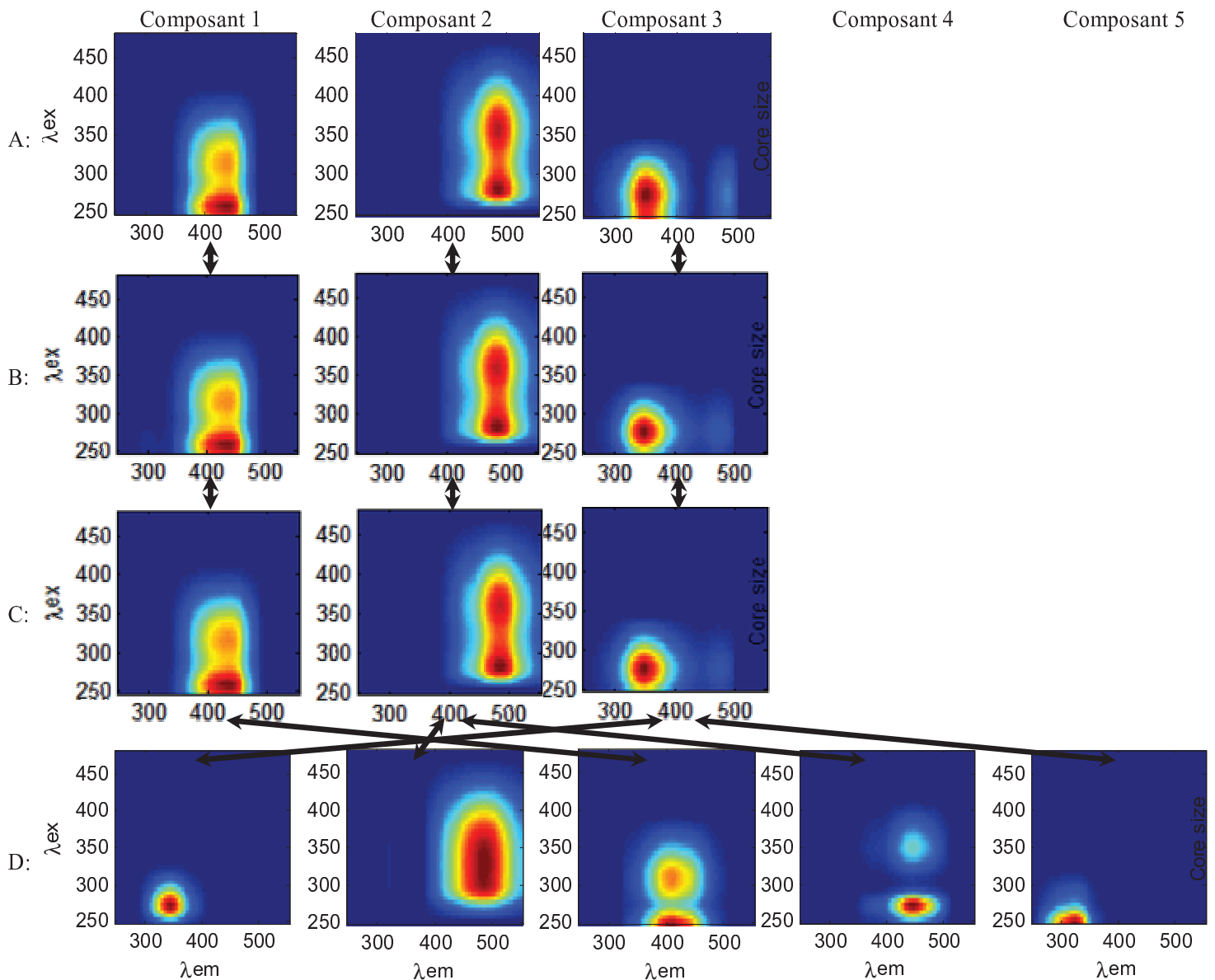


Tableau 16: Composants PARAFAC correspondant à l'EI de Rade de Toulon (point 12HR)

Les composants sont numérotés par ordre de fluorophore calculé par PARAFAC sans être arrangés par leurs longueurs d'onde d'émission croissantes. Les lignes numérotées A, B, C et D représentent respectivement : les composants trouvés dans le traitement PARAFAC sur les eaux interstitielles de la campagne Rade de Toulon 2009, ceux du milieu de toutes les EI, ceux du groupe des eaux salées et ceux de l'ensemble des échantillons (Nb : 1146).

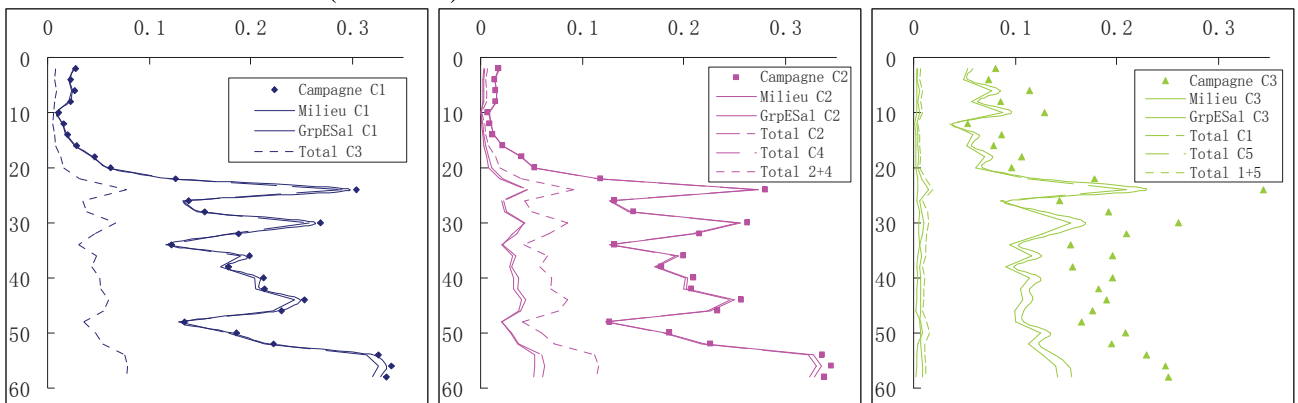


Figure 79: Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la profondeur (des EI du point 12HR de la campagne Rade de Toulon 2009)

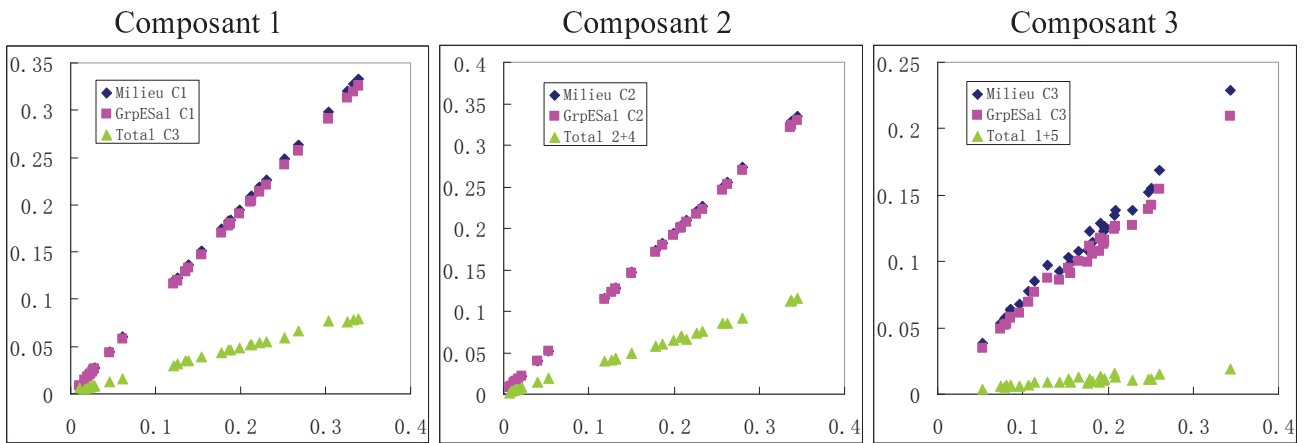


Figure 80: Relations contributionnelles des composants PARAFAC en fonction du traitement individuel

Les axes X représentent les intensités relatives PARAFAC de chaque composant et les axes Y correspondent aux données des trois regroupements :

- (◆) – Contributions du regroupement du milieu des eaux interstitielles ;
- (■) – Contributions du groupe des eaux salées ;
- (▲) – Contributions du traitement global.

Chapitre V.
Phénomènes de complexation
et du quenching de fluorescence

Se réunir est un début ; rester ensemble est un progrès ;...

- Henry Ford

L'interaction entre la MON dissoute (MOND) et les métaux est étudiée depuis les années 1960 (Good et al., 1966 ; Stumm et al., 1970). Différentes méthodes analytiques incluant principalement la voltamétrie (ASV), la potentiométrie et les électrodes sélectives (ISE), l'échange ionique, la séparation par dialyse, l'ultrafiltration (Florence & Batley, 1980 ; Buffle, 1988 ; Plaza et al., 2005 ; Aksuner et al., 2008) ont été appliquées aux études de la complexation métallique par la MON.

Le « quenching de fluorescence », signifiant l'extinction de la fluorescence, est un phénomène physique qui permet d'analyser la propriété complexante de la MOND avec des molécules connues ou inconnues (Ryan & Weber, 1982 ; Cabaniss & Shuman, 1986 ; Antelo et al., 1998 ; Elkins & Nelson, 2001 ; Plaza et al., 2005 ; Zhao & Nelson, 2005), des échantillons naturels dans les milieux aquatiques (Cabaniss & Shuman, 1986 ; Hering et Morel, 1989 ; Lu & Jaffé, 2001 ; Baker, 2005) ou dans les sols (Senesi et al., 1993 ; Cabaniss, 1992 ; Chen et al., 2003 ; Plaza et al., 2005a ; Hernández et al., 2006 ; Esteves da Silva et al., 2006), voire même certaines fonctions biologiques (Zhang et al., 2008). A partir de Ryan et Weber (1982), le traitement des mesures de fluorescence en fonction de la concentration de métal permet d'atteindre la constante de complexation et la concentration en sites. C'est une méthode rapide et qui possède également l'avantage de mesurer l'état de spéciation de la MOND. Elle est donc complémentaire des autres méthodes qui mesurent généralement une ou plusieurs espèces chimiques du métal.

Ce chapitre décrit tout d'abord le principe de la complexation et son rôle dans l'environnement, puis le principe et le calcul du quenching de fluorescence. La technique du quenching de fluorescence sera appliquée en mesurant une MEEF après chaque ajout de métal. L'ensemble des MEEF sera alors traité par PARAFAC. Les constantes de complexation et les capacités complexantes de chaque fluorophore seront modélisées par le logiciel de modélisation non linéaire « PROSECE » (Garnier et al., 2004).

V.A La complexation MON-M

La complexation entre la MOND et les métaux joue un rôle central dans la distribution et la circulation des ions métalliques dans de nombreux milieux naturels comme les rivières (Cabaniss & Schuman, 1988 ; Zhao & Nelson, 2005), les sols (Provenzano et al., 2004 ; Plaza et al., 2005a et b ; Claret et al., 2005 ; MacDonald et Hendershot, 2006), les eaux de mer (Van den Berg, 1982, 1984 ; Louis et al., 2009 ; Millero et al., 2009), les estuaires (Louis et al., 2009). En particulier, les réactions de complexation sont connues pour être responsables de la sélectivité biologique vis-à-vis des ions métalliques qui servent d'intermédiaires pour la plupart des processus vitaux comme par exemple maintenir la structure 3D de macromolécules cellulaires, ou encore permettre le transport d'éléments essentiels à travers des membranes cellulaires (Buffle, 1988). Selon Weber (1988), même si la complexation entre la MOND et les métaux n'éclaircira pas la composition du mélange dans la MON, il est très important de l'étudier pour connaître de la réactivité, toxicité ou les capacités de transport des ions métalliques dans les environnements aquatiques à des fins prédictives.

Le schéma **Figure 81** présente les différentes formes chimiques d'un ion métallique dans un milieu aquatique naturel. L'ion peut se complexer avec des molécules, quelles soient inorganiques ou organiques comme les carbonates, les nitrates, les chlorures ou encore de l'EDTA ou de l'acétate (1). Il peut aussi se complexer avec des macromolécules organiques comme la MON (2) qui elle même peut être en équilibre avec des complexes macromoléculaires suivant les conditions physico-chimiques du milieu (8). Le complexe entre l'ion métallique et les macromolécules organiques peut être absorbé puis rejeté par les organismes vivants comme les algues ou les planctons

(5) qui échangent également des ions libres avec le milieu aquatique (3). Un ion métallique peut participer à la formation des particules en suspension (4). Celles-ci peuvent aussi interagir avec les organismes vivants (6) ou encore, avec des complexes micromoléculaires par des phénomènes de sorption-désorption (7).

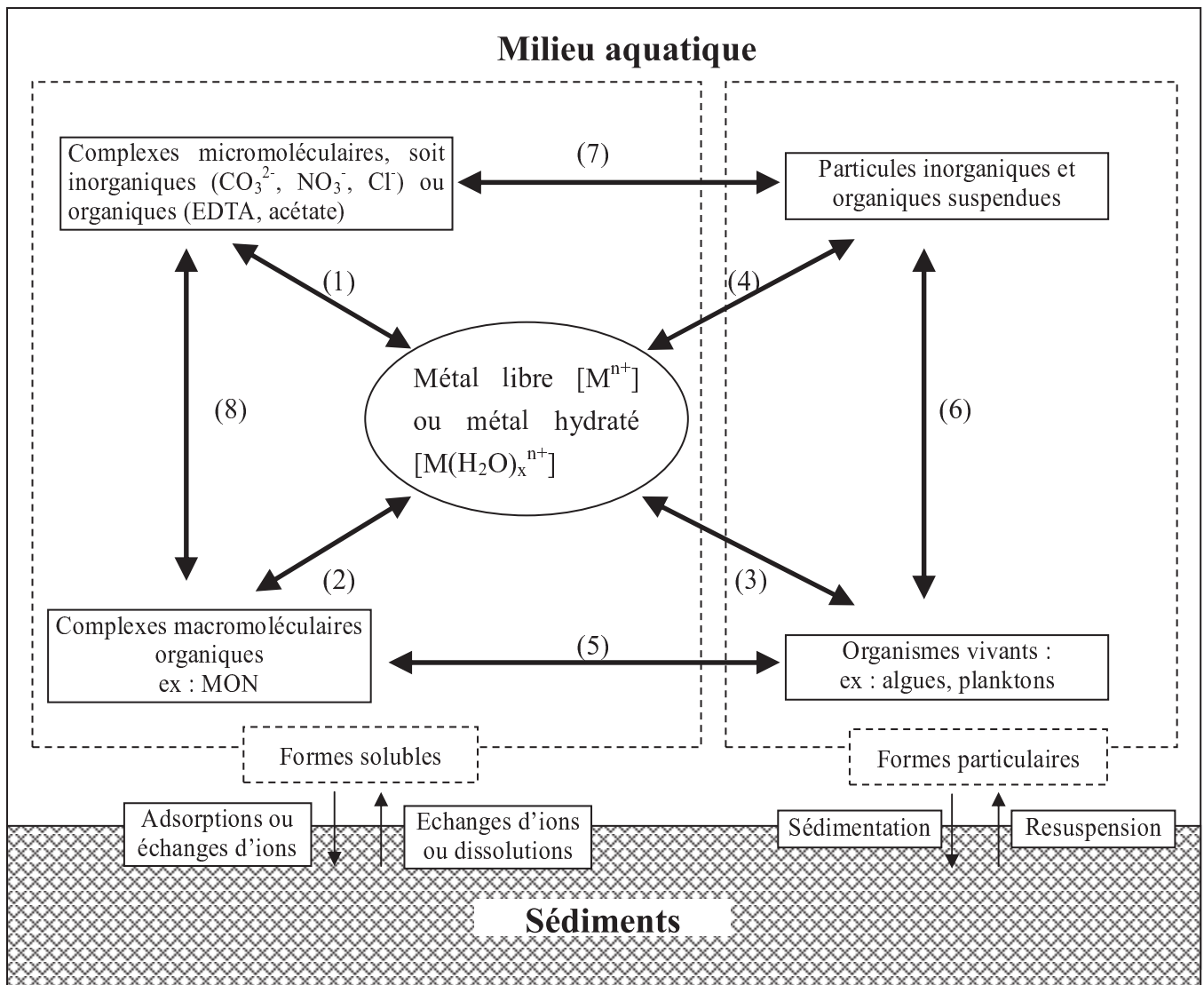


Figure 81: Formes chimiques d'un métal dans un milieu aquatique et leurs réactions dans le système (repris de Buffle, 1988, « Complexation Reaction in Aquatic Systems »)

Un ion métallique peut faire partie d'une solution (formes solubles) ou d'un processus insoluble (formes particulaires) (Weber, 1988). Les métaux sous forme soluble peuvent sédimenter par des processus d'adsorption ou d'échanges ioniques, mais peuvent également revenir en solution par des échanges ioniques ou par dissolution. De même, les métaux présents sous forme particulaire peuvent sédimenter par des processus de précipitation-agglomération et revenir en solution par des phénomènes de remise en suspension (Ares et Ziehrmann, 1988 ; Nierop et al., 2002).

Entre toutes ces formes, quelles soient solubles ou insolubles, dans les conditions aquatiques naturelles, la MON complexe les métaux souvent sous forme labile avec une bonne rapidité réactionnelle entre eux. Ces complexes métalliques contrôlent la concentration d'ions métalliques sous forme libre ou plus précisément leurs activités (Weber, 1988).

Un exemple célèbre de Buffle (1988) est reproduit ci-dessous (**Figure 82**) sur la toxicité du Cu(II). La toxicité du cuivre est mesurée par son influence sur les bactéries pendant 30 minutes. La MON est exprimée par son carbone organique dissous (COD). Dans la figure (a), les influences de la concentration totale en cuivre sont montrées. Quand la concentration en cuivre total augmente de 10^{-6} à 10^{-5} mol/L, la consommation de glucose par les bactéries chute, montrant un fort accroissement de la toxicité. Un phénomène similaire est observé avec des concentrations en cuivre libre sur la figure (b). Il faut remarquer que dans ce cas, la concentration de cuivre libre provoquant la toxicité est généralement 10 000 fois plus faible que celle de cuivre total. Ceci démontre bien la forte toxicité du cuivre sous sa forme libre et le lien de la toxicité avec une espèce bien spécifique d'élément. La toxicité du cuivre est étudiée aussi dans les études biologiques (Croot et al., 2000)

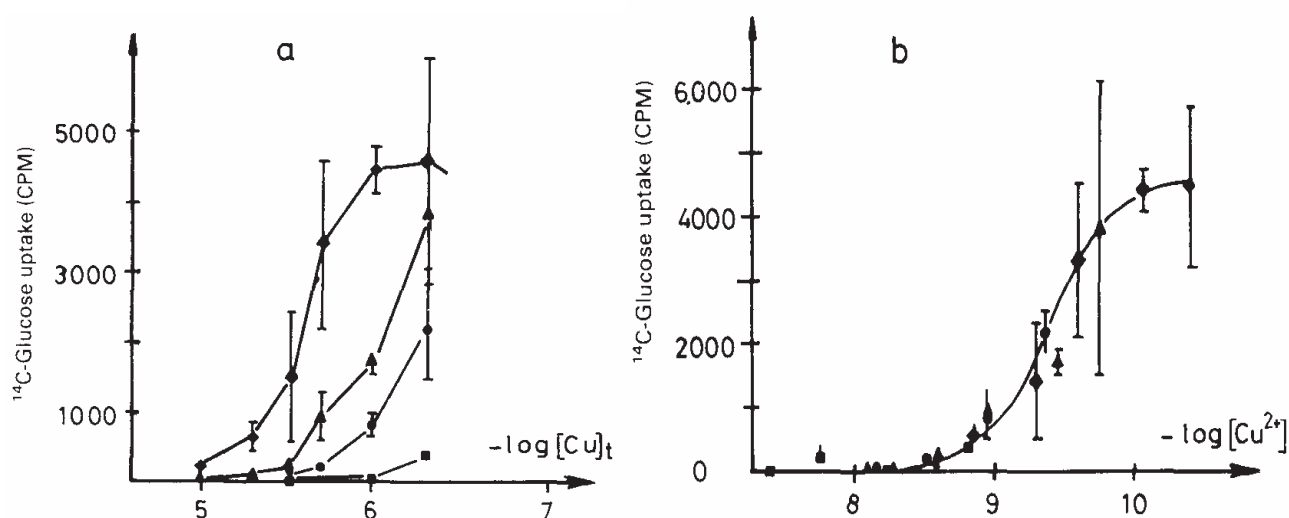


Figure 82: Toxicité du cuivre dans l'eau douce pour différentes concentrations de MON (d'après Buffle, 1988) Les symboles « ♦ » et « ● » représentent l'eau de rivière avec les concentrations de COD respectivement égale à 21 et 4,4 milligramme par litre ($[COD]=21$ et $4,4 \text{ mg.L}^{-1}$). Les « ▲ » et « ■ » représentent des AH commerciaux respectivement $[COD]=10$ et $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

En outre, cet exemple montre notamment les différents niveaux de toxicité que l'on peut obtenir suivant la nature de MON présente et sa concentration dans le milieu (**Figure 82, a**). Ces différences sont plus importantes en fonction du cuivre total qu'en fonction du cuivre libre. Ceci montre la nécessité d'étudier les interactions métaux-MON dans différents environnements afin de pouvoir limiter ou contrôler la toxicité des métaux. Ces propriétés de complexation peuvent être observées et modélisées. Parmi les techniques utilisées la spectroscopie de fluorescence, et plus particulièrement le quenching de fluorescence, est souvent appliquée. D'ailleurs, le quenching de fluorescence couplé à une autre méthode d'analyse est une des manières les plus utilisées pour observer à la fois le métal et la MON complexante.

V.B Principes de quenching

La complexation entre des métaux et les ligands de la MON peut être mesurée par la méthode du quenching de fluorescence (Ryan et Weber, 1982). On considère 3 espèces chimiques en équilibre de complexation : le métal (M), le ligand ou la matière organique dissoute (L) et le complexe (ML). Elles sont reliées entre elles par la réaction chimique suivante :



Dans le cas d'échantillons d'eaux naturelles, L peut être un ligand fluorescent (par exemple les AF). La concentration du métal lié $[ML]$ diminue la concentration de ligand libre qui possède des propriétés optiques différentes du complexe, en particulier un rendement quantique de fluorescence généralement plus élevé. La fluorescence diminue donc au fur et à mesure que les complexes se forment, c'est ce que l'on appelle quenching de fluorescence. La méthode a été validée sur des ligands modèles en couplant des mesures de quenching de fluorescence avec de mesures d'électrode sélective (Cabaniss et Shuman, 1988).

Bien qu'il soit d'origine différente, il faut distinguer le quenching physique par collision (dynamique) du quenching par complexation (statique). Dans le premier cas, les ions quenchers en solution entrent en collision avec des molécules dans l'état excité singulet, relaxant l'énergie de l'état excité sans émission de fluorescence. Par définition, le temps de vie de l'état singulet excité diminue avec l'augmentation des ions quenchers, entraînant dans le même temps une diminution de fluorescence. A l'inverse, le quenching statique, est un phénomène de fluorescence qui se produit à partir du complexe métallique dans l'état singulet excité. Ce complexe possède son propre temps de vie, et ce dernier n'évolue pas avec la concentration d'ion quenseur.

Bien que les mécanismes physiques soient fondamentalement différents, il n'est pas possible de faire la différence entre ces deux phénomènes avec un appareillage qui n'est pas résolu en temps. C'est le cas de l'HITACHI F4500. Les valeurs de constantes de quenching (statique ou dynamique) sont obtenues par le même calcul, à partir de la décroissance de fluorescence lors de l'ajout d'élément quenseur.

V.B.1 Complexation et équilibre chimique : cas simple

Dans l'exemple de l'équilibre 1 : 1 entre un ion métal (M) et un ligand (L), la constante de complexation K_S peut être exprimée par :

$$K_S = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad \text{Équation 44}$$

Avec $[L]$ la concentration du ligand libre, $[ML]$ la concentration en complexe et $[M]$ la concentration en métal libre. La concentration totale en métal C_M et la concentration totale en ligand C_L sont définies par les équations de conservation de la matière suivantes :

$$C_M = [M] + [ML] \quad \text{Sous-équation i}$$

$$C_L = [L] + [ML] \quad \text{Sous-équation ii}$$

Le rapport de la concentration ligand lié sur la concentration de ligand total est calculé par la relation entre la constante de complexation (K_S) et la concentration de l'ion métallique libre à partir de l'équation 44 et la sous-équation vi :

$$\frac{[ML]}{C_L} = \frac{K_S [M]}{K_S [M] + 1} \quad \text{Sous-équation iii}$$

En augmentant la concentration en métal, il y a une augmentation de la proportion de sites complexés par rapport au nombre de site total. L'intensité totale de fluorescence (I) mesurée, est égale à la somme

des intensités des ligands libres (I_L) et des intensités des complexes (I_{ML}).

$$I_F = I_0 \cdot I \cdot A \cdot (\Phi_L \cdot \epsilon_L \cdot [L] + \Phi_{ML} \cdot \epsilon_{ML} \cdot [ML]) \quad \text{Sous-équation iv}$$

Ainsi le quenching $Q = I_0 - I$ est lié par la relation suivante avec la concentration en complexes :

$$Q = A[ML] \quad \text{Sous-équation v}$$

où A est la constante correspondante au système d'expérience (les appareils, la solution, etc.). En mesurant les intensités au début et en fin, i.e. C_M très supérieure à C_L , de quenching de fluorescence on peut définir le quenching total de l'expérience Q_{ML} et ainsi, on peut alors obtenir l'équation du coefficient du quenching :

$$\frac{Q}{Q_i} = \frac{[ML]}{C_L} = \frac{I_L - I}{I_L - I_{ML}} = \frac{A[ML]}{I_L - I_{ML}} \quad \text{Équation 45}$$

La concentration du complexe et le coefficient de complexation peuvent alors être calculées :

$$[ML] = C_L \cdot \frac{I_L - I}{I_L - I_{ML}} \quad \text{Sous-équation vi}$$

L'équation 45 prend en compte la concentration métallique ajoutée et la concentration de ligand :

$$\frac{[ML]}{C_L} = \frac{1}{2K_S C_L} (K_S C_L + K_S C_M + 1) - \sqrt{(K_S C_L + K_S C_M + 1)^2 - 4K_S^2 C_L C_M} \quad \text{Sous-équation vii}$$

Si l'intensité du ligand seul est ramenée à 100, on peut obtenir l'intensité de fluorescence mesurée par l'équation suivante:

$$I = 100 + \frac{I_{ML} - 100}{2K_S C_L} \cdot \left[(K_S C_L + K_S C_M + 1) - \sqrt{(K_S C_L + K_S C_M + 1)^2 - 4K_S^2 C_L C_M} \right] \quad \text{Équation 46}$$

avec I_{ML} l'intensité de fluorescence à l'équilibre pour une concentration en métal $C_M \gg C_L$.

V.B.2 Cas d'un système complexe multi-éléments

Dans le cas naturel, la MON est composée d'un ensemble de sites complexants ayant des propriétés de complexation et des concentrations différentes. De plus, la présence en même temps de plusieurs cations engendre des compétitions durant l'expérience de quenching qui sont difficiles à prédire en quelques expériences. Elkins et Nelson (2001) puis Zhao et Nelson (2005) ont tenté ce type d'expériences. Après avoir fixée dans un premier temps la concentration en Fe^{3+} , Tb^{3+} ou Al^{3+} dans une solution de MOND provenant de la référence SRFA (Suwanne River Fulvic Acid, IHSS), une titration par un autre métal compétiteur respectivement (Al^{3+} ou Tb^{3+}), (Fe^{3+} ou Al^{3+}) et (Tb^{3+} ou Fe^{3+}) est effectuée. En comparant les différents spectres de fluorescence obtenus pour les différentes

titrations, les auteurs ont observé la propriété d'exaltation de fluorescence de l'aluminium. Mais les résultats n'ont pas pu apporter beaucoup plus d'information sur le nombre de site ou sur les constantes de complexation. Par contre, un ordre d'affinité entre Al^{3+} , Fe^{3+} et Tb^{3+} vis à vis de la MOND SRFA a pu être établies.

V.B.3 PROSECE : optimisation des paramètres de complexation

PROSECE (PRogramme d'Optimisation et de SpEciation Chimique dans l'Environnement) est un programme créé par C. Garnier au laboratoire PROTEE (2004). Une version développée en 2006 permet d'analyser spécifiquement les propriétés de la complexation de la MON et des métaux en utilisant les données de quenching de fluorescence (Mounier et al., 2010).

Le programme PROSECE optimise les valeurs des constantes de complexation, les concentrations en sites pour des systèmes contenant plusieurs ligands. Les compétitions entre éléments métalliques sont également prises en compte. PROSECE est un programme d'optimisation et de modélisation discret, modélisant la matière organique par ses propriétés de complexation définie pour chaque type de site par une concentration totale et les constantes de complexation correspondantes.

V.C Historique du quenching continu

Le quenching de fluorescence est largement utilisé depuis une trentaine d'années (Saar et Weber, 1980), dans de nombreuses études pour analyser des substances très variées dans la nature.

Nature d'échantillon	Références
Protéines	Ryan et Weber, 1982 ; Baker, 2005
AF de lacs	Cabaniss et Shuman, 1986
AF de Rivière	Underknown et al., 1985 ; Cabaniss et Shuman, 1988 ; Elkins et Nelson, 2001 ; Zhao et Nelson, 2005 ; Baker, 2005 ; Manciualea et al., 2009
AF de sols	Saar et Weber, 1980 ; Ryan et Weber, 1982 ; Ryan et Ventry, 1990 ; Plaza et al., 2005 ; Esteves da Silva et al., 2006
AH de Rivière	Smith et Kramer, 2000 ; Baker, 2005 ; Antunes et al., 2007
AH de Sols	Esteves da Silva et al., 1998 ; Provenzano et al., 2004 ; Plaza et al., 2005, 2005 ; Hernandez et al., 2006
AH de déchets	Provenzano et al., 2004 ; Baker, 2005 ; Henderson et al., 2009
MOND Marine	Tani et al., 2003 ; Takata et al., 2004 ; Baker, 2005 ; Henderson et al., 2009
MOND Côtières	Lu et Jaffé, 2001 ; Tedetti et al., 2010
MOND Estuaire	Lu et Jaffé, 2001
MOND Rivières	Lu et Jaffé, 2001 ; Baker, 2001, 2005 ; Antunes et al., 2007
Marécages	Lu et Jaffé, 2001

Tableau 17 : Travaux sur le quenching de fluorescence en fonction d'origine des échantillons.

Parmi les différents types d'échantillon rencontrés dans la littérature, on trouvera des protéines (Ryan et Weber, 1982 ; Baker, 2005) ; des substances humiques extraites dont les acides fulviques de lacs (Cabaniss et Shuman, 1986), de rivières (Underknown et al., 1985 ; Cabaniss et Shuman, 1988 ; Elkins et Nelson, 2001 ; Zhao et Nelson, 2005 ; Baker, 2005 ; Manciualea et al., 2009) et de sols (Saar et Weber, 1980 ; Ryan et Weber, 1982 ; Plaza et al., 2005 ; Esteves da Silva et al., 2006), ainsi que les acides humiques de rivières (Smith et Kramer, 2000 ; Baker, 2005 ; Antunes et al., 2007), de sols (Esteves da Silva et al., 1998 ; Provenzano et al., 2004 ; Plaza et al., 2005, 2005 ; Hernandez et al., 2006) et de déchets (Provenzano et al., 2004 ; Baker, 2005 ; Henderson et al.,

2009) ; ou encore la MON dissoute (MOND) en provenance de mers (Rashid, 1985 ; Midorikawa et Tanoue, 1998), de côtes (Lu et Jaffé, 2001 ; Tedetti et al., 2010), d'estuaires (Lu et Jaffé, 2001), de rivières (Lu et Jaffé, 2001 ; Baker, 2001, 2005 ; Antunes et al., 2007), de zones humides (Lu et Jaffé, 2001).

De très nombreux métaux peuvent « quencher » la fluorescence de la MON. Par exemple, on peut citer, sans que la liste soit exhaustive, le plomb, Pb^{2+} (Saar et Weber, 1980 ; Zhao et Nelson, 2005), le zinc, Zn^{2+} (Provenzano et al., 2004 ; Hernández et al., 2006), le nickel, Ni^{2+} (Provenzano, 2004), le cadmium, Cd^{2+} (Underknown et al., 1985), le mercure, Hg^{2+} (Lu et Jaffé, 2000 ; Antunes et al., 2007), l'uranium, UO_2^{2+} (Esteves da Silva, 1998 ; Antunes et al., 2007), le fer, Fe^{3+} (Esteves da Silva, 1998 ; Zhao et Nelson, 2005 ; Antunes et al., 2007), l'aluminium, Al^{3+} (Elkins et Nelson, 2001 ; Zhao et Nelson, 2005), le terbium, Tb^{3+} (Elkins et Nelson, 2001 ; Zhao et Nelson, 2005), le calcium, Ca^{2+} (Mayer, 1985 ; Elkins et Nelson, 2001 ; Zhao et Nelson, 2005), le magnésium, Mg^{2+} (Zhao et Nelson, 2005), et le lanthane, La^{3+} (Zhao et Nelson, 2005).

Parmi tous les métaux, l'un d'entre eux a plus particulièrement été étudié : le cuivre, Cu^{2+} (Saar et Weber, 1980 ; Seitz et al., 1981 ; Ryan et Weber, 1982 ; Cabaniss et Shuman, 1986, 1988 ; Modorikawa et al., 1998 ; Esteves da Silva et al., 1998 ; Zhao et Nelson, 2005 ; Hernández et al., 2006 ; Mounier et al., 2010), qui est toxique sous forme libre (Cu^{2+}) dès 10 pM environ (10^{-11} M, Sunda et al., 1987), alors que la toxicité de ses complexes avec un ligand organique peut être moindre voire nulle (Buffle, 1988 ; Weber, 1988). Le cuivre est aussi un très bon « quencheur » de fluorescence, car il peut rapidement former des complexes de haute stabilité avec les substances humiques (Saar et Weber, 1980 ; Ryan et Weber, 1982 ; Cabaniss et Shuman, 1986, 1988 ; Weber, 1988). Une étude faite par Rashid (1985) sur la compétition des ions métalliques sur des acides humiques d'origine marine a montré l'ordre de complexation suivant :



où le cuivre peut complexer environ 50% de sites dans ce type de MON.

Le calcul du quenching de fluorescence (paragraphe V.B.1) sur la complexation simple du complexe Tyrosine- Cu^{2+} (Ryan et Weber, 1982) a ouvert la voie vers la modélisation des interactions entre la MON et les métaux. Cependant, cette étude a été faite à partir de spectres à une dimension (spectre 1D), c'est-à-dire avec une mesure d'intensité de fluorescence sur un seul point et pour un couple fixé de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Cette méthode de mesure est très limitée de part le seul point de signal observé. Cabaniss et Shuman (1988) ont mesuré le quenching de fluorescence par spectre d'excitation, d'émission et synchrone afin de construire une matrice d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) leur permettant de cibler le point de mesure d'intensité maximale toujours en spectre 1D. Ensuite, la comparaison des spectres 2D du quenching de fluorescence a été développée, mais sans réaliser de la modélisation de la complexation (Provenzano et al., 2004). Cette comparaison permet de visualiser les différents spectres superposés, donc d'observer la modification des fluorophores sur une même longueur d'onde, mais les informations de quenching se limitent là aussi à une estimation 1D. L'étude du quenching à l'aide de spectre 3D prend son essor dans les années 2000. Mis à part les expériences de quenching réalisées sur les propriétés de la MON vis-à-vis des changements de leurs paramètres physico-chimiques, comme la température (Baker, 2005) ou le pH (Manciulea et al., 2009), les mesures du quenching de fluorescence en spectre 3D appliquées dans des études de la complexation MON-métaux (Smith et Kramer, 1998, 2000 ; Elkins et Nelson, 2001) sont limitées et ne sont pas utilisées de manière systématique. Dans ce travail, à l'aide de PARAFAC et de PROSECE, il est possible d'utiliser un quenching de fluorescence sur l'ensemble des fluorophores liés au métal et prendre ainsi en compte l'ensemble des informations contenues dans les MEEF.

V.C.1 Quenching en 1D (1 λ_{EX} et 1 λ_{EM} fixées)

L'étude par quenching 1D a été réalisée en premier en 1980. Saar & Weber (1980) ont testé la complexation entre le cuivre et la MOND (acide fulvique extrait de rivière, Suwanne River Fulvic Acid, SRFA) avant que Ryan & Weber (1982) aient établi la théorie de la complexation pour un modèle 1:1. Ce modèle a été testé tout d'abord sur la complexation tyrosine-cuivre, même si la complexation entre la tyrosine et le cuivre devrait être considérée comme un modèle de type MON:Cu = 2:1, et ensuite sur la MON (SRFA). En 1982, la spectrométrie de fluorescence de la MON permettait de mesurer uniquement l'intensité de fluorescence pour un couple de longueurs d'onde donné : $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=350\text{nm}/445\text{nm}$. Ce domaine spectral a par la suite été identifié comme étant celui d'un pic de fluorescence de substances humiques (Coble, 1996). Ce travail a montré aussi l'influence du pH dans le quenching de fluorescence permettant d'attirer l'attention sur le contrôle du pH dans les études de ce type.

Cabaniss & Shuman (1986) ont combiné la mesure de l'électrode sélective (ISE) de cuivre avec un quenching 1D. Puis, ils ont employé pour la première fois (1988) la matrice d'excitation et d'émission (MEEF) afin d'améliorer la précision sur la détermination des maximums des pics, et par conséquent, sur les positions des fluorophores. Cinq sites de complexation ont pu être identifiés dans le SRFA à l'aide de cette technique. Le traitement du signal de quenching de fluorescence a été réalisé sur chacun de ces sites séparément.

Parmi toutes ces études sur le quenching de fluorescence en provenance de la complexation MON-métaux, les mesures ont systématiquement été limitées par la technique de mesure en spectre 1D.

Le quenching 1D ne permet d'observer qu'une petite partie du domaine spectral. Il est donc parfaitement adapté lorsqu'il s'agit d'analyser une molécule dont on connaît la position de son pic de fluorescence maximum. Par contre, dans un mélange complexe comme la MOND, un seul point d'observation peut être influencé par différents fluorophores. Par conséquent, le quenching 1D n'est pas suffisant pour analyser un système plus complexe comme la MON.

V.C.2 Quenching en 2D (1 λ_{EX} ou 1 λ_{EM} fixée)

Avec l'utilisation des spectres synchrones introduits par Miano & Senesi (1992), il devient nécessaire d'utiliser une comparaison multi-pics directement. Les modifications de l'intensité de fluorescence entre différents fluorophores ne sont pas toujours identiques dans la MOND, ceci étant dû à la complexité de sa composition. Le quenching de fluorescence 2D a plus largement été appliqué dans des analyses environnementales. Les résultats du quenching d'échantillons d'eaux de mer (Midorikawa & Tanoue, 1998 ; Lu & Jaffé, 2000), d'eaux douces (Zhao & Nelson, 2005), de sols (Esteves da Silva, 1998 ; Provenzano et al., 2004) et encore de déchets (Provenzano et al., 2004) sont souvent comparés avec de simples superpositions de spectres 2D sur une même figure afin de faciliter la visualisation des différences entre les spectres correspondant à différents ajouts d'ion métallique (Midorikawa & Tanoue, 1998 ; Esteves da Silva et al., 1998 ; Lu & Jaffé, 2000 ; Provenzano et al., 2004 ; Zhao & Nelson, 2005 ; Zhang et al. 2008). Cependant, les calculs par l'équation Ryan-Weber sont généralement basés sur un seul fluorophore qui donne une série de valeurs de fluorescence provenant d'un couple de longueurs d'onde (Ex et Em) fixé sur la courbe de mesure en spectre 2D (Seritti et al., 1994 ; Midorikawa & Tanoue, 1998 ; Esteves da Silva, 1998). Certains auteurs (Smith & Kramer, 2000 ; Elkins & Nelson, 2001) ont tenté une prise en compte simultanée des signaux de

fluorescence en envisageant une vision plus globale de la MON avec des mesures du quenching de fluorescence en plusieurs points d'un spectre ou à partir d'une mesure de MEEF.

V.C.3 Quenching en 3D

Elkins et Nelson (2001) ont effectué avec la MOND SRFA une comparaison des spectres 3D durant le quenching de fluorescence et ils ont mis en évidence par "peak-picking" le déplacement de pics fluorescents en fonction de la concentration de MON. Ces déplacements de pics ont donc été pris en compte pendant le quenching dans cette expérience. Ces mêmes observations ont été faites par Zhao & Nelson (2005) qui ont également mis en évidence le changement d'intensité irrégulier.

Cependant, à part l'observation du déplacement de pics, les comparaisons sont encore souvent limitées par le pointage des valeurs maximales et le calcul des constantes de complexation avec l'équation Ryan-Weber (Plaza et al. 2005 ; Hernández et al., 2006). Esteves da Silva et son groupe a employé un modèle bilinéaire (MCR-ALS) et l'analyse en composantes principales (ACP) afin de décomposer les MEEF obtenues dans le quenching de fluorescence (Esteves da Silva et al., 2005, 2006). Ensuite, ils ont appliqué l'équation de Stern-Volmer modifiée pour trouver la constante de complexation de chaque métal (Cu^{2+} , Fe^{3+} , UO_2^{2+} et Hg^{2+}) liée au quenching global des spectres 3D de fluorescence (Antunes et al. 2007). Il faut noter que dans ces travaux le calcul de constante de complexation est mutualisé : c'est-à-dire que tous les sites de complexation sont représentés par une seule valeur de constante.

Pour résoudre cette difficulté, un code de calcul, SIMPLISMA, est utilisé pour avoir par une séparation mathématique des fluorophores présents dans un échantillon de MOND. Cette technique bilinéaire pour décomposer la MEEF est utilisée par Smith et Kramer (1999, 2000) dans des études concernant l'aluminium. Ce code se développe assez peu car il apparaît entre-temps la méthode trilineaire de séparation appelée PARAFAC.

PARAFAC permet de décomposer les spectres 3D de quenching et donc de modéliser des données en intensité relative de fluorescence de chaque fluorophore. Ces pseudoconcentrations étant obtenues, il est possible de les utiliser dans les calculs des constantes de complexation. Cette méthode a été développée car elle dépasse toutes les autres approches pour analyser la MON par spectrofluorométrie : elle permet, en effet, de calculer la contribution de chaque fluorophore pour chaque ajout d'ion métallique dans l'échantillon. Compte-tenu de ses performances, la méthode PARAFAC appliquée au quenching de fluorescence en spectre 3D est promise à un bel avenir.

V.D Utilisation de PARAFAC dans le quenching en 3D

Le quenching de fluorescence 3D (QF 3D) a commencé à être traité par PARAFAC sur des échantillons contenant un seul fluorophore (Nikolajsen et al., 2003 ; Nahorniak et al., 2005 ; Kim et al., 2005 ; Muñoz de la Peña et al., 2006 ; Rodríguez et al., 2009). Cependant, cette association QF 3D – PARAFAC appliquée à un mélange complexe comme la MON n'en est qu'à ses débuts (Mounier et al., 2010). Une publication sur l'application de PARAFAC sur le traitement des MEEF du quenching de fluorescence est montrée dans le chapitre suivant.

Chapitre VI.
PARAFAC – PROSECE :
application aux MEEF de
MOND complexée

VI.A Couplage PARAFAC – PROSECE

Le quenching de fluorescence est obtenu en mesurant les spectres 3D de fluorescence d'un échantillon après chaque ajout métallique. Ces ajouts sont faits de telle manière que la concentration totale en métal varie de manière logarithmique dans la solution analysée. Les spectres de luminescence totale pour chaque point de cette titration sont rassemblés dans un jeu de données qui est ensuite traité par PARAFAC afin d'obtenir les contributions spectrales et les intensités relatives des composants PARAFAC. Chaque valeur d'intensité relative équivaut à une variation de concentration dans la solution au cours de la titration métallique. Chacune de ces intensités est alors convertie en concentration en la multipliant par l'efficacité de fluorescence et utilisée dans le programme PROSECE adapté au traitement du quenching de fluorescence.

L'analyse PROSECE est faite à partir des valeurs de concentration connues de métal total et des concentrations des composants obtenues par conversion pour calculer sur l'ensemble de la titration, les paramètres de complexation optimaux ainsi que les différentes efficacités de fluorescence. Le modèle 1 : 1 n'explique pas les variations d'intensité calculées par PARAFAC alors que le modèle pour lequel chaque composant présente deux sites de complexation indépendantes décrit correctement ces mêmes variations d'intensité relative.

Les résultats des expériences présentés ci-après donnent au final deux composants C_1 et C_2 ayant chacun deux sites de complexation, respectivement (L_{11} et L_{12}) et (L_{21} et L_{22}) affectés des constantes (K_{11} ; K_{12}) et (K_{21} ; K_{22}). Dans la modélisation PROSECE, tous ces sites sont en compétition et sont traités de manière simultanée.

Ces travaux originaux ont donné lieu à la publication suivante.

Que la stratégie soit belle est un fait, mais n'oubliez pas de regarder le résultat.

- Winston Churchill

VI.B Conclusion et perspectives du quenching de fluorescence

traité par PARAFAC - PROSECE

Le quenching de fluorescence utilisé dans ce travail est basé sur la mesure de matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) d'échantillons à concentration naturelle auxquels on ajoute une concentration croissante de métal à pH, force ionique et volume constants. Les mesures de MEEF apportent une information plus complète sur la fluorescence totale des échantillons. En même temps, cette mesure permet des comparaisons qualitatives entre les différents pics fluorescents.

On applique aux MEEF corrigées de l'effet d'écran interne la méthode PARAFAC qui sépare les différentes contributions spectrales des fluorophores présents dans les échantillons. Cette séparation de contributions permet d'éviter les erreurs de mesure de quenching commises habituellement avec la méthode du « peak-picking ». En effet, avec cette dernière approche encore couramment employée, les maxima locaux des spectres d'émission mesurés résultent de la somme de différentes intensités relatives, ce qui induit à la fois un déplacement de la position de chaque maximum local et une mauvaise estimation de leur intensité.

Les intensités relatives calculées par PARAFAC permettent un suivi quantitatif des fluorophores soumis à une concentration de métal de plus en plus élevée. A partir des intensités relatives des fluorophores, PROSECE optimise deux types de paramètres associés aux fluorophores : les constantes de complexation et les concentrations en sites des ligands exprimées en mol.L⁻¹.

L'ajout logarithmique en métal total (Cu, dans le cas présent) dans l'échantillon de MON permet d'obtenir une gamme de concentration métallique beaucoup plus étendue qu'avec un ajout linéaire : cela limite le nombre de MEEF mesurées tout en couvrant un intervalle de concentrations métalliques qui améliore l'ajustement des données expérimentales par PROSECE. Ce type d'ajout est aussi utilisé pour atteindre des sites de complexation agissant pour de faibles concentrations.

Pour la première fois, les quatre outils précédents – l'ajout logarithmique, le quenching de fluorescence en 3D, PARAFAC et PROSECE – sont combinés pour, premièrement, déterminer le nombre de fluorophores, deuxièmement, calculer leurs intensités relatives et enfin, obtenir leurs constantes de complexation et leurs concentrations en sites.

La combinaison originale de ces quatre outils est appliquée à un échantillon d'eau de rivière prélevé dans une rivière tropicale (Rio Negro, Sao Gabriel da Cachoeira, Brésil). A partir des MEEF obtenues par quenching, PARAFAC calcule deux fluorophores. L'outil PROSECE détermine que chacun de ces deux fluorophores est lui-même caractérisé par deux sites de complexation aux constantes de complexation et aux concentrations en sites différentes.

Conclusion et perspectives

Avec le temps et la patience, on acquiert la science.

- Carmontelle

La matière organique naturelle (MON), qui existe dans tous les environnements, est analysée au travers de ses propriétés de luminescences en mesurant des matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF). Les données extraites de ces MEEF permettent de caractériser différents composants fluorescents de la MON. Ces MEEF sont en fait la somme de plusieurs contributions spectrales dont on ne connaît a priori ni la forme ni l'intensité. La méthode numérique, appelée PARAFAC, permet de séparer ces différentes contributions. Ce travail est composé de deux parties : la première concerne l'étude des régions spectrales couvertes par les composants calculés par PARAFAC et l'influence du regroupement sur les intensités relatives. La seconde partie s'intéresse aux propriétés de complexation de la MON en analysant la variation d'intensité de chaque composant calculé par PARAFAC en fonction du métal ajouté dans l'échantillon, en l'occurrence du cuivre.

Le jeu de données sur lequel repose ce travail est constitué de 1146 échantillons de MON prélevés au cours de 29 missions couvrant 6 milieux différents (eaux côtières – EC, eaux de mer – EM, eaux de sol – ES, eaux douces – ED, eaux extraites – EE, eaux interstitielles – EI,) et 3 groupes de salinité différents (eaux non-salées, salées et eaux extraites). Les MEEF associées à ces échantillons sont, dans un premier temps, corrigées de tout effet d'écran interne. Ensuite, PARAFAC est appliqué aux échantillons mission par mission. Les pics connus sont retrouvés : S ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250\text{nm}/295\text{-}305\text{nm}$), R ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250\text{nm}/335\text{-}365\text{nm}$), T ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{-}280\text{nm}/335\text{-}365\text{nm}$), M ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 290\text{-}300\text{nm}/390\text{-}415\text{nm}$), A' ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 250\text{nm}/390\text{-}415\text{nm}$), C ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{-}340\text{nm}/410\text{-}450\text{nm}$), A ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 255\text{-}280\text{nm}/410\text{-}450\text{nm}$), D ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 365\text{-}390\text{nm}/465\text{-}490\text{nm}$), F ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 270\text{-}280\text{nm}/465\text{-}490\text{nm}$), E ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 375\text{nm}/495\text{nm}$). Ces premiers résultats confirment qu'il existe plusieurs composants bimodaux dont le spectre d'excitation possède deux maxima locaux pour un spectre d'émission comparable (pics R-T, pics M-A', pics C-A, pics D-F). La méthode PARAFAC permet de confirmer ainsi le lien existant entre ces derniers pics.

Il apparaît pour la première fois sur les échantillons des eaux interstitielles prélevés dans l'embouchure de la rivière Krka (Croatie) que le pic E ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 375\text{nm}/495\text{nm}$) est caractérisé en fait par un spectre d'excitation possédant lui aussi deux maxima locaux ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 375\text{nm}/495\text{nm}$ - $\lambda_{EX}/\lambda_{EM} = 320\text{nm}/495\text{nm}$) : ce second pic est nommé pic « Z » dans ce travail. C'est la première fois que ce pic est détecté dans un échantillon à concentration naturelle. Ce travail montre qu'en utilisant une séparation numérique des contributions spectrales, on peut mettre en évidence un pic de fluorescence de faible intensité qui, dans le cas d'une superposition avec d'autres pics proches, ne peut pas être détecté par la méthode classique du « peak-picking » lorsqu'elle est appliquée à des MEEF des échantillons de concentration naturelle (paragraphe IV.E.17.b).

Un des objectifs de ce travail est d'étudier la variation des contributions spectrales lorsqu'on regroupe les échantillons issus de différents environnements. Le premier niveau de regroupement est celui des milieux, le second regroupement est lié à la salinité et le dernier niveau de regroupement correspond à l'ensemble des 1146 échantillons. Le choix du nombre de composants est défini selon un critère arbitraire systématiquement appliqué au cours de cette étude. Tout facteur subjectif étant écarté, la comparaison entre les résultats issus des différents niveaux de regroupement devient alors possible. On constate que ces regroupements successifs d'échantillons impliquent une augmentation du nombre de composants calculés par PARAFAC lorsque les contributions spectrales sont suffisamment éloignées les unes des autres. Par contre, ce nombre de composants reste stable voire diminue si les contributions spectrales sont proches. Dans ce cas, PARAFAC fournit une contribution spectrale moyenne. Ainsi on observe que l'augmentation du nombre de MEEF n'entraîne pas une augmentation importante du nombre de composants PARAFAC. Dans le cas de cette étude et selon le critère évoqué précédemment, le nombre maximal de composants est égal à 5

pour le traitement global.

D'autre part, il est important de noter qu'un composant présent dans plusieurs échantillons d'une même mission a une forte probabilité d'être encore présent pour un niveau de regroupement supérieur (milieux, salinité et total). De ce fait, la variation de l'intensité relative de ce composant reste quasiment inchangée quel que soit le niveau de regroupement. La persistance d'un composant dans les résultats après un regroupement semble liée, à la fois, à sa fréquence d'apparition et à l'importance relative du signal de fluorescence de ce composant. Toutefois, il n'a pas été possible de décrire une règle stricte dans ce travail.

Il est raisonnable de penser que sur l'ensemble des missions de prélèvements, la variabilité environnementale a une influence notable sur les composants. Pour mettre en évidence cette variabilité, une nouvelle représentation des contributions spectrales est utilisée, basée sur la superposition des domaines spectraux occupés par les composants. De cette façon, on peut suivre aisément toute modification des régions spectrales en fonction du niveau de regroupement des échantillons.

On observe que les composés de type humique ($\lambda_{EX}[265-410nm]-\lambda_{EM}[380-455nm]$, défini comme la zone II) et fulvique ($\lambda_{EX}[250-360nm]-\lambda_{EM}[455-520nm]$, dit zone III) sont toujours présents quel que soit le niveau de regroupement alors que la zone protéinique ($\lambda_{EX}[250-310nm]-\lambda_{EM}[290-380nm]$, dit zone I) laisse apparaître une plus forte variabilité.

Ainsi, la première partie de ce travail montre que le regroupement d'échantillons d'eaux n'entraîne pas une perte d'information et permet une comparaison spectrale des divers milieux. Il permet même une analyse plus fine des contributions spectrales et parfois des séparations de pics et, dans tous les cas, un maintien des zones de recouvrement PARAFAC.

La seconde approche originale de ce travail combine quatre outils pour analyser le quenching de fluorescence en vue de caractériser les propriétés de complexation de la MON : l'ajout logarithmique d'ions métalliques, la mesure de MEEF, la méthode PARAFAC et l'algorithme PROSECE. Rappelons que l'ajout logarithmique permet d'obtenir une gamme de concentration en métal avec un petit nombre d'ajouts de faible volume. Dans le cas de cette étude, PARAFAC est appliqué aux MEEF associées à ces différents ajouts, ce qui donne un ensemble de contributions spectrales et leurs intensités relatives respectives. Finalement, ces intensités relatives sont utilisées dans un logiciel d'optimisation de spéciation PROSECE pour calculer les constantes de complexation et les concentrations en site des composants PARAFAC. PROSECE peut attribuer à un composant PARAFAC plusieurs sites de complexation, chacun de ces sites étant caractérisé par un couple de paramètres de complexation qui lui est propre.

La combinaison de ces quatre outils est appliquée à un échantillon de MON (Rio Negro, Sao Gabriel da Cachoeira, Brésil) dilué pour éviter tout effet d'écran interne. Les ajouts logarithmiques d'ions métalliques couvrent la gamme de concentration de $1,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ à $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. PARAFAC calcule deux contributions spectrales et leurs intensités relatives. A partir de ces résultats, PROSECE quantifie les propriétés complexantes des composants PARAFAC en utilisant le modèle dans lequel un composant possède deux sites complexants. Le logarithme décimal des quatre constantes de complexation ($\text{Log } K$) varie de 2,8 à 5,8 et leur concentration en sites (L_T) varie entre $7,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ et $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Ainsi, pour la première fois dans l'histoire du quenching de fluorescence, la totalité du signal de fluorescence a été utilisé pour déterminer les propriétés de complexation de la MON fluorescente.

Dans ce travail, l'échantillon étudié a été dilué pour éviter l'effet d'écran interne, ceci peut entraîner une modification de propriété de complexation. On peut supposer que les échantillons d'eaux à concentration naturelle sont très probablement affectés par ce phénomène. Il est donc important à l'avenir de prendre en compte l'effet d'écran interne au cours du traitement numérique qui sépare les contributions spectrales et qui leur attribue les paramètres liés à la complexation. Cet outil numérique devrait permettre de traiter, sans dilution préalable, des échantillons liquides de MON de référence ou prélevés dans tout type de milieu, sans modification, auxquels on ajoute un métal pouvant complexer avec la MON, comme l'argent (Ag), l'aluminium (Al), le calcium (Ca), le fer (Fe), le mercure (Hg), le magnésium (Mg), le nickel (Ni), ou le plomb (Pb).

Références

La science du passé est d'un grand usage pour l'avenir.

- Christine de Suède

AKSUNER Nur, HENDEN Emur, YILMAZ Ibrahim, CUKUROVALI Alaaddin, 2008, "Selective optical sensing of copper (II) ions based on a novel cyclobutane-substituted Schiff base ligand embedded in polymer films", *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol.134, p. 510-515

ALBERTS James J., TAKACS Monika, EGEBERG Per Kristian, 2002, "Total luminescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC)", *Organic Geochemistry*, vol.33, p. 817-828

ALBERTS James J., TAKACS Monika, 2004a, "Total luminescence spectra of IHSS standard and reference fulvic acids, humic acids and natural organic matter: comparison of aquatic and terrestrial source terms", *Organic Geochemistry*, vol.35, p. 243-256

ALBERTS James J., TAKACS Monika, 2004b, "Comparison of natural fluorescence distribution among size fractions of terrestrial fulvic and humic acids and aquatic natural organic matter", *Organic Geochemistry*, vol.35, p. 1141-1149

ALDRICH C., FENG D., 2000, "Removal of heavy metals from wastewater effluents by biosorptive flotation", *Minerals Engineering*, vol. 13, p. 1129-1138

ANDERSEN Dag, ALBERTS James J., TAKÁCS Monika, 2000, "Nature of natural organic matter (NOM) in acidified and limed surface waters", *Water Research*, vol.34, p. 266-278

ANTELO Juan M., ARCE Florencio, PENEDO Francisco J., 2008, "Effect of Seasonal Changes on the Complexing of Cu(II) by Dissolved Organic Matter in river water", *Water Research*, vol.32, p. 2714-2720

ANTUNES Maria Cristina G., PEREIRA Cláudia C.C., ESTEVES DA SILVA Joaquim C.G., 2007, "MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions", *Analytica Chimica Acta*, vol.595, p. 9-18

ARES Jorge, ZIEHRNANN Wolfgang, 1988, "Interactions of organic matter and aluminum ions in acid forest solutions: metal complexation, flocculation, and precipitation", *Soil Science*, vol.145, p. 437-447

ARIK Mustafa, CELEBI Neslihan, ONGANER Yavuz, 2005, "Fluorescence quenching of fluorescein with molecular oxygen in solution", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 170, p. 105–111

AVRIL Bernard, 2002, "DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea", *Deep-Sea Research II*, vol.49, p. 2163-2182

BAGHOTH S.A., SHARMA S.K., AMY G.L., 2010, "Tracking natural organic matter (NOM) in a drinking water treatment plant using fluorescence excitation emission matrices and PARAFAC", *Water Research*, doi.10.1016/j.watres.2010.09.005 0

BAKER A., GENTY D., 1999, "Fluorescence wavelength and intensity variations of grotte waters", *Journal of Hydrology*, vol.217, p.19-34

BAKER Andy, 2001, "Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of Some Sewage-Impacted Rivers", *Environmental science, technology* vol.35, p. 948-953

BAKER Andy, 2002, "Fluorescence properties of some farm wastes: implications for water quality monitoring", *Water Research*, vol.36, p. 189-195

BAKER Andy, 2002, "Fluorescence Excitation-Emission Matrix Characterization of River Waters Impacted by a Tissue Mill Effluent", *Environmental science, technology*, vol.36, p. 1377-1382

BAKER Andy, SPENCER Robert G.M., 2004, "Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy", *Science of the Total Environment*, vol.333, p. 217-232

BAKER Andy, 2005, "Thermal fluorescence quenching properties of dissolved organic matter", *Water Research*, vol.39, p. 4405-4412

BAKER Andy, ELLIOTT Sarah, LEAD Jamie R., 2007, "Effects of filtration and pH perturbation on freshwater organic matter fluorescence", *Chemosphere*, vol.67, p. 2035-2043

BAKER A., TIPPING E., THACKER S.A., GONDAR D., 2008, "Relating dissolved organic matter fluorescence and functional properties", *Chemosphere*, vol.73, p. 1765-1772

BANAITS Michael R, WALDRIP-DAIL Heidi, DIEHL Melinda S., HOLMES Brett C., HUNT James F., LYNCH Ryan P., OHNO Tsutomu, 2006, "Investigation sorption-driven dissolved organic matter fractionation by multidimensional fluorescence spectroscopy and PARAFAC", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.304, p. 271-276

BARDY M., FRITSCH E., DERENNE S., ALLARD T., DO NASCIMENTO N.R., BUENO G.T., 2008, "Micromorphology and spectroscopic characteristics of organic matter in waterlogged podzols of the upper Amazon basin", *Geoderma*, Vol.145, p. 222-230

BATLEY G.E., FLORENCE T.M., 1976, "Determination of the chemical forms of dissolved cadmium, lead and copper in seawater", *Marine Chemistry*, vol.4, p. 347-363

BECK A.J., JONES K.C., HAYES M.H.B., MINGELGRIN U., 1993, "Organic Substances in Soil and Water: Natural Constituents and Their Influences on Contaminant Behaviour", *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, 200 page

BELZILE Claude, GUO Laodong, 2006, "Optical properties of low molecular weight and colloidal organic matter: Application of the ultrafiltration permeation model to DOM absorption and fluorescence", *Marine Chemistry*, Vol.98, p. 183-196

BENGRINE Karim, MARHABA Taha F., 2003, "Comparison of spectral fluorescent signatures-based models to characterize DOM in treated water samples", *Journal of Hazardous Materials B*, vol.100, p. 117-130

BIEROZA Magdalena, BAKER Andy, BRIDGEMAN John, 2009, "Relating freshwater organic matter fluorescence to organic carbon removal efficiency in drinking water treatment", *Science of the Total Environment*, vol.407, p. 1765-1774

- BLOUGH Neil V., DEL VECCHIO Rossana, 2002, "Chromophoric DOM in the Coastal Environment", *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*, p. 509-546
- BOEHME Jennifer, COBEL Paula G., CONMY Robyn, STOVALL-LEONARD Antoya, 2004, "Examining CDOM fluorescence variability using principal component analysis: seasonal and regional modeling of three-dimensional fluorescence in the Gulf of Mexico", *Marine Chemistry*, vol.89, p. 3-14
- BORISSEVITCH Iouri E., 1999, "More about the inner filter effect: corrections of Stern-Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher", *Journal of Luminescence*, vol.81, p. 219-224
- BOUGUER Pierre, 1729, "Essai d'Optique sur la Gradation de la lumière", Claude Jombert
- BRICAUD Annick, MOREL André, PRIEUR Louis, 1981, "Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substances) in the UV and visible domains", *Limnology and Oceanography*, vol.26, p. 43-53
- BRO Rasmus, KIERS Henk A.L., 2003, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", *Journal of Chemometrics*, vol.17, p. 274-286
- BRO Rasmus, 1997, "PARAFAC. Tutorial and applications", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.38, p. 149-171
- BRUCHET A., LEGRAND M.F., ARPINO P., DILETTATO D., 1991, "Recent methods for the determination of volatile and non-volatile organic compounds in natural and purified drinking water", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol.562, p. 469-480
- BUFFLE J., 1988, "COMPLEXATION REACTIONS IN AQUATIC SYSTEMS (an analytical approach)", Ellis Horwood Ltd., XXI+692 pages
- BURDIGE David J., KLINE Scott W., CHEN Wenhao, 2004, "Fluorescence dissolved organic matter in marine sediment pore waters", *Marine Chemistry*, vol. 89, p. 289-311
- CABANISS Stephen E., SHUMAN Mark S., 1986, "Combined Ion Selective Electrode and Fluorescence Quenching Detection for Copper-Dissolved Organic Matter Titrations", *Analytical chemistry*, vol.58, p. 398-401
- CABANISS Stephen E., SHUMAN Mark S., 1988a, "Fluorescence Quenching Measurements of Copper-Fulvic Acid Binding", *Analytical chemistry*, vol.60, p. 2418-2421
- CABANISS Stephen E., SHUMAN Mark S., 1988b, "Copper binding by dissolved organic matter: I. Suwannee River fulvic acid equilibria", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.52, p. 185-193
- CABANISS Stephen E., SHUMAN Mark S., 1988c, "Copper binding by dissolved organic matter: II. Variation in type and source of organic matter", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.52, p. 195-200
- CABANISS Stephen E., SHUMAN Mark S., 1990, "Exchange of Comments on Fluorescence Quenching Measurements of Copper-Fulvic Acid Binding", *Analytical chemistry*, vol.63, p.

CABANISS Stephen E., 1992, "Synchronous Fluorescence Spectra of Metal Fulvic Acid Complex", *Environmental Science & Technology*, vol.26, p. 1133-1135

CARSTEA Elfrida M., BAKER Andy, BIEROZA Magdalena, REYNOLDS Darren, 2010, "Continuous Fluorescence Excitation Emission Matrix Monitoring of River Organic Matter", *Water Research*, DOI: 10.1016/j.watres.2010.06.036 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.036>), vol. 44, p. 5356-5366

CHEN Hao, KENNY Jonathan E., 2010, "Application of PARAFAC to determination of distribution constants and spectra of fluorescent solutes in micellar solutions", *Analyst*, vol.135, p. 1704-1717

CHEN Jie, LEBOEUF Eugene J., DAI Sheng, GU Baohua, 2003, "Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions", *Chemosphere*, vol.50, p. 639-647

CHEN Meilan, PRICE René M., YAMASHITA Youhei, JAFFE Rudolf., 2010, "Comparative study of dissolved organic matter from groundwater and surface water in the Florida coastal Everglades using multi-dimensional spectrofluorometry combined with multivariate statistics", *Applied Geochemistry*, vol.25, p. 872-880

CHEN Robert F., 1999, "In situ fluorescence measurements in coastal waters", *Organic Geochemistry*, vol.30, p. 397-409

CHRISTENSEN T.R., JONASSON S., MICHELSEN A., 1998, "Environmental controls on soil respiration in the Eurasian and Greenlandic Arctic: Trace gas fluxes from arctic ecosystems", *Journal of geophysical research A.*, vol.103, p. 29015-29021

CLARET Francis, SCHAFFER Thorsten, RABUNG Thomas, WOLF Manfred, BAUER Andreas, BUCKAU Gunnar, 2005, "Differences in properties and Cm(III) complexation behavior of isolated humic and fulvic acid derived from Opalinus clay and Callovo-Oxfordian argillite", *Marine Chemistry*, vol.78, p. 121-135

CLARK Catherine D., JIMENEZ-MORAIS Jennifer, JOUNES Guilford, ZANARDI-LAMARDO Eliete, MOORE Cynthia A., ZIKA Rod G., 2002, "A time-resolved fluorescence study of dissolved organic matter in a riverine to marine transition zone", *Marine Chemistry*, vol.78, p. 121-135

COBLE Paula G., 1990, "Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy", *Nature*, vol.348, p. 432-435

COBLE Paula G., GREE Sarah A., BLOUGH Neil V., GAGOSIAN Robert B., 1990, "Characterization of dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy", *Nature*, vol.348, p. 432-435

COBLE Paula G., SCHULTZ Christopher A., MOPPER Kenneth, 1993, "Fluorescence contouring analysis of DOC Intercalibration Experiment samples: a comparison of techniques", *Marine Chemistry*, vol.41, p. 173-178

COBLE Paula G., 1996, "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy", *Marine Chemistry*, vol.51, p. 325-346

COBLE P.G., TIMPERMAN A.T., 1998, "Fluorescence detection of proteins and amino acids in capillary electrophoresis using a post-column sheath flow reactor", *Journal of Chromatography A*, vol.829, p. 309-315

COBLE Paula G., DEL CASTILLO Carlos E., AVRIL Bernard, 1998, "Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon", *Deep-Sea Research II*, vol. 45, p. 2195-2223

COOK Robert L., 2004, "Coupling NMR to NOM: Analytical and bioanalytical applications", *Analytical and bioanalytical chemistry A*, vol.378, p. 1484-1503

COPIN-MONTEGUT Claire, 1988, "A new formula for the effect of temperature on the partial pressure of CO₂ in seawater", *Marine Chemistry*, vol.25, p. 29-37

CORNEJO J., HERMOSÍN M.C., 1996, "Interaction of Humic Substances and Soil Clays", *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*, p. 595-624

CORY Rose M., MCKNIGHT Diane M., 2005, "Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter", *Environmental Science, Technologie* vol.39, p. 8142-8149

CROOE J.-P., VIOLLEAU D., LABOUYRIE L., 2000, "Disinfection by-product formation potentials of hydrophobic and hydrophilic natural organic matter fractions: A comparison between a low- and a high-humic water", *ACS Symposium Series A*, vol.761, p. 139-153

CROOE J.-P., BENEDETTI M.F., VIOLLEAU D., 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 & technology A*, vol.37, p. 328-336

CROOT Peter L., MOFFETT James W., BRAND Larry E., 2000, "Production of extracellular Cu complexing ligands by eukaryotic phytoplankton in response to Cu stress", *Limnology and Oceanography*, vol.45, p. 619-627

DAI JingYu, RAN Wei, XING Baoshan, GU Min, WANG Liansheng, 2006, "Characterization of fulvic acid fractions obtained by sequential extractions with pH buffers, water, and ethanol from paddy soils", *Geoderma*, vol.135, p. 284-295

DE SOUZA SIERRA Maria Marta, Thèse, 1992, "Caracterisation et reactivité de la matière organique fluorescente dans des milieux côtiers et marins", Université de Bordeaux 1

DE SOUZA SIERRA Maria Marta, DONARD O.F.X., LAMOTTE M., BELIN C., EWALD M., 1994, "Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters", *Marine Chemistry*, vol.47, p. 127-144

DE SOUZA SIERRA Maria Marta, DONARD Olivier F.X., LAMOTTE Michel, 1997, "Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processus", *Marine Chemistry*, vol.58, p. 51-58

DE SOUZA SIERRA Maria Marta, AREND Karine, FERNANDES Andreia Neves, GIOVANELA Marcelo, SZPOGANICZ Bruno, 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*, vol.5445, p. 86-98

DEINES Peter, 1980, "The carbon isotopic composition of diamonds: relationship to diamond shape, color, occurrence and vaport composition", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.44, p. 943-961

DEL CASTILLO Carlos E., COBLE Paula G., MORELL Julio M., LOPEZ José M., CORREDOR Jorge E., 1999, "Analysis of the optical properties of the Orinoco River plume by absorption and fluorescence spectroscopy", *Marine Chemistry*, vol.66, p.35-51

DEL CASTILLO Carlos E., COBLE Paula G., 2000, "Seasonal variability of the colored dissolved organic matter during the 1994-95 NE and SW Monsoons in the Arabian Sea", *Deep-Sea Research II*, vol.47, p. 1563-1579

DEL VECCHIO Rossana, BLOUGH Neil V., 2002, "Photobleaching of chromophoric dissolved organic matter in natural waters: kinetics and modeling", *Marine Chemistry*, vol.78, p. 231-253

DEL VECCHIO Rossana, BLOUGH Neil V., 2004, "Spatial and seasonal distribution of chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in the Middle Alantic Bight", *Marine Chemistry*, vol.89, p. 169-187

DIGNAC Marie-France, SCRIBE Pierre (directeur de thèse), 1998, "Caractérisation chimique de la matière organique au cours du traitement des eaux usées par boues actives – Chemical characterization of organic matter during the treatment of wastewater by activated sludge process", Thèse, Université de Paris 6.

DONARD O.F.X., LAMOTTE M., BELIN C., EWALD M., 1989, "High-Sensitivity Fluorescence Spectroscopy of Mediterranean Waters Using a Conventional or a Pulsed Laser Excitation Source", *Marine Chemistry*, vol.27, p. 117-136

DUAN Zicheng, FIELD Robert W., YAMAKITA Nami, TSUCHIYA Soji, 2006, "Differential temperature laser induced fluorescence spectroscopy", *Chemical Physics*, vol.324, p. 709-720

DUDAL Y., HOLGADO R., MAESTRI G., GUILLON E., DUPONT L., 2006, "Rapid screening of DOM's metal-binding ability using a fluorescence-based microplate assay", *Science of the Total Environment*, vol. 354, p. 286– 291

DUDLEY R.L., FYFE C.A., 1982, "Evaluation of the quantitative reliability of the ^{13}C CP/MAS technique for the analysis of coals and related materials", *Fuel A.*, vol.61, p. 651–657

ELKINS Kelly M., NELSON Donald J., 2001, "Fluorescence and FT-IR spectroscopy studies of Suwannee river fulvic acid complexation with aluminum, terbium and calcium", *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol.87, p. 81-96

ESTEVEZ DA SILVA Joaquim C.G., MACHADO Adélio A.S.C., 1995, "Evolving factor analysis of synchronous fluorescence spectra of humic substances in the presence of Cu(II)", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.27, p. 115-128

ESTEVEZ DA SILVA Joaquim C.G., MACHADO Adélio A.S.C., 1996, "Characterization of the binding sites for Al(III) and Be(II) in a sample of marine fulvic acids", *Marine Chemistry*, vol.54, p.

ESTEVEES DA SILVA Joaquim C.G., MACHADO Adélio A.S.C., SILVA Carla S.P.C.O., 1996, "Simultaneous use of evolving factor analysis of fluorescence spectral data and analysis of pH titration data for comparison of the acid-base properties of fulvic acids", *Analytica Chimica Acta*, vol. 318, p. 365-372

ESTEVEES DA SILVA Joaquim C.G., MACHADO Adélio A.S.C., OLIVEIRA César J.S., PINTO Marta S.S.D.S., 1998, "Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu(II), Fe(III) and UO_2^{2+} ", *Talanta*, vol.45, p. 1155-1165

ESTEVEES DA SILVA Joaquim C.G., TAVARES Maria J.C.G., TAULER Romá, 2006, "Multivariate curve resolution of multidimensional excitation-emission quenching matrices of a Laurentian soil fulvic acid", *Chemosphere*, vol.64, p. 1939-1948

FERNÁNDEZ-CALVIÑO D., SOLER-ROVIRA P., POLO A., ARIAS-ESTÉVEZ M., PLAZA C., 2010, "Influence of humified organic matter on copper behavior in acid polluted soils", *Environmental Pollution*, vol.158, p. 3634-3641

FERRARI G.M., MINGAZZINI M., 1995, "Synchronous fluorescence spectra of dissolved organic matter (DOM) of algal origin in marine coastal waters", *Marine Ecology Progress Series A.*, vol.125, p. 305-315

FILELLA Montserrat, TOWN Raewyn, 2000, "Determination of metal ion binding parameters for humic substances Part 1. Application of a simple calculation method for extraction of meaningful parameters from reverse pulse polarograms", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol.485, p. 21-33

FLORENCE T.M., BATLEY G.E., 1980, "Chemical Speciation in Natural Waters", *Analytical Chemistry*, vol.9, p. 1962

FUENTES Marta, GONZÁLEZ-GAITANO Gustavo, GARCÍA-MINA José M., 2006, "The usefulness of UV-visible and fluorescence spectroscopies to study the chemical nature of humic substances from soils and composts", *Organic Geochemistry*, vol.37, p. 1949-1959

FUKUSHIMA M., TANAKA S., NAKAYASU K., 1997, "Investigation of copper(II)-binding behavior of fulvic acids by three-dimensional fluorescence spectrometry", *Analytical sciences A.*, vol.13, p. 1011-1015

GALAPATE Ríchelita P., BAES Aloysius U., ITO Kazuaki, MUKAI Tetsuo, SHOTO Eiji, OKADA Mitsumasa, 1998, "Detection of Domestic Wastes in Kurose River Using Synchronous Fluorescence Spectroscopy", *Water Research*, vol.32, p. 2232-2239

GARCIA-MINA Jose M., 2006, "Stability, solubility and maximum metal binding capacity in metal-humic complexes involving humic substances extracted from peat and organic compost", *Organic Geochemistry*, vol.37, p. 1960-1972

GARNIER Cédric, Thèse, 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, 200 pages

GHEORGHIU C., SMITH D.S., AL-REASI H.A., MCGEER J.C., WILKIE M.P., 2010, "Influence of natural organic matter (NOM) quality on Cu-gill binding in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)", *Aquatic Toxicology*, vol.97, p. 343-352

GHOSH K., SCHNITZER M., 1980, "Fluorescence excitation spectra of humic substances", *Canadian Journal of Soil Science*, vol.60, p. 373-379

GHOSH K., SCHNITZER M., 1981, "Fluorescence Excitation Spectra and Viscosity Behavior of a Fulvic Acid and its Copper and Iron Complexes", *Soil Science Society America Journal*, vol.44, p. 975-978

GJESSING Egil T., ALBERTS J.J., BRUCHET August, EGEBERG Per Kristian, LYDERSEN Espen, MCGOWN Linda B., MOBED Jarafshan J., MUNSTER Uwe, PEMPKOWIAK Janusz, PERDUE Mike, RATNAWERRA Harsha, RYBACKI D., TAKACS M., ABBAT-BRAUN Gudrun, 1998, "Multi-method Characterisation of Natural Organic Matter Isolated from Water: Characterisation of Reverse Osmosis-Isolates from Water of Two Semi-Identical Dystrophic Lakes Basins in Norway", *Water Research*, vol.32, p. 3108-3124

GONZÁLEZ-VILA F.J., LANKES U., LÜDEMANN 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 A.*, vol.58-59, p. 349-359

GONZÁLEZ-PÉREZ Martha, MILORI Débora M.B.P., COLNAGO Luiz A., MARTIN-NETO Ladislau, MELO Wanderley J., 2007, "A laser-induced fluorescence spectroscopic study of organic matter in a Brazilian Oxisol under different tillage systems", *Geoderma*, vol.138, p. 20-24

GOOD N.E., WINGET G.D., WINTER W., 1966, "Hydrogen ion buffers for biological research", *Biochemistry A.*, vol.5, p. 467-477

GORE Michael G., 2000, "SPECTROSCOPIE (Modern Spectroscopy)", *Practical approach*, XVII+363 pages

GOSLAN Emma H, VOROS Sandrine, BANKS Jenny, WILSON Derek, HILLIS Peter, CAMPBELL Andrew T., PARSONS Simon A., 2004, "A model for predicting dissolved organic carbon distribution in a reservoir water using fluorescence spectroscopy", *Water Research*, vol.38, p. 783-791

GU Qun, KENNY Jonathan E., 2009, "Improvement of Inner Filter Effect Correction Based on Determination of Effective Geometric Parameters Using a Conventional Fluorimeter", *Analytical chemistry*, vol.81, p. 420-426

HANSELL Dennis A., CARLSON Craig A., 2002, "Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter", *Academic Press*, XXii+774 pages

HARTMANN Paul, LEINER Marc J.P., LIPPITSCH Max E., 1995, "Response characteristics of luminescent oxygen sensors", *Sensors and Actuators B: Chemical A.*, vol.B29, p. 251-257

HASSOUNA Mohammad, MASSIANI Catherine, DUDAL Yves, PECH Nicolas, THERAULAZ Frédéric, 2010, "Changes in water extractable organic matter (WEOM) in a calcareous soil under field conditions with time and soil depth", *Geoderma*, vol.155, p. 75-85

- HATCHER Patrick G., MACIEL Gary E., DENNIS Larry W., 1981, "Aliphatic structure of humic acids; clue to their origin", *Organic Geochemistry*, vol.3, p. 43-48
- HATCHER P.G., SPIKER E.C., 1988, "Selective Degradation of Plant Biomolecules", F.H. Frimmel, R.F. Christman, p. 59-74
- HATCHER Patrick G., DRIA Karl J., SUNGHWAN Kim, FRAZIER Scott W., 2001, "Modern analytical studies of humic substances", *Soil science A.*, vol.166, p. 770-794
- HE Yan, WANG Gufeng, COX Jason, GENG Lei, 2001, "Two-Dimensional Fluorescence Correlation Spectroscopy with Modulated Excitation", *American Chemical Society*, vol.73, p. 2302-2309
- HEDGES J.I., 1988, "Polymerization of Humic Substances in Natural Environments", F.H. Frimmel, R.F. Christman, p. 45-58
- HENDERSON R.K., BAKER A., MURPHY K.R., HAMBLY A., STUETZ R.M., KHAN S.J., 2006, "Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review", *Water Research*, vol.43, p. 863-881
- HENDERSON R.K., BAKER A., MURPHY K.R., HAMBLY A., STUETZ R.M., KHAN S.J., 2009, "Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review", *Water Research*, vol.43, p. 863-881
- HERING Janet G., MOREL François M.M., 1989, "Slow coordination reactions in seawater", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.53, p. 611-618
- HERNANDEZ Diana, PLAZA César, SENESI Nicola, POLO Alfredo, 2006, "Detection of Copper(II) and Zinc(II) binding to humic acids from pig & slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy", *Environmental Pollution*, vol.143, p. 212-220
- HERNÁNDEZ Diana, PLAZA César, SENESI Nicola, POLO Alfredo, 2007, "Fluorescence analysis of copper(II) and zinc(II) binding behaviour of fulvic acids from pig slurry and amended soils", *European Journal of Soil Science*, vol.58, p. 900-908
- HESSLER Diane P., FRIMMEL Fritz H., OLIVEROS Esther, BRAUN André M., 1996, "Quenching of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) by humic substances", *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, vol.36, p. 55-60
- HITCHCOCK F.L., 1927, "Multiple invariants and generalized rank of a p-way matrix or tensor", *Journal of Mathematics and Physics*, vol.7, p. 39-79
- HOLBROOK R. David, YEN James H., GRIZZARD Thomas J., 2006, "Characterizing natural organic material from the Occoquan Watershed (Northern Virginia, US) using fluorescence spectroscopy and PARAFAC", *Science of the Total Environment*, vol.361, p. 249-266
- HOLBROOK R. David, DEROSE Paul C., LEIGH Stefan D., RUKHIN Andrew L., HECKERT N. Alan, 2006, "Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy for Natural Organic Matter Characterization: A Quantitative Evaluation of Calibration and Spectral Correction Procedures", *Applied Spectroscopy*, vol.60, p. 791-799

- HOLLAS J. Michael, 1998, "Spectrophotometry, Spectrofluorimetry", Dunod, XXii+385
- HOLST Gerhard, GLUD Ronnie N., KÜHL Michael, KLIMANT Ingo, 1997, "A microoptode array for fine-scale measurement of oxygen distribution", *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.38, p. 122-129
- HONG Huasheng, WU Jingyu, SHANG Shaoling, HU Chuanmin, 2005, "Absorption and fluorescence of chromophoric dissolved organic matter in the Pearl River Estuary, South China", *Marine Chemistry*, vol.97, p. 78-89
- HUA Guoxiong, BRODERICK John, SEMPLE Kirk T., KILLHAM Ken, SINGLETON Ian, 2007, "Rapid quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) soil extracts by synchronous fluorescence spectroscopy (SFS)", *Environmental Pollution*, vol.148, p. 176-181
- HUNT James F., OHNO Tsutomu, FERNANDEZ Ivan J., 2008, "Influence of foliar phosphorus and nitrogen contents on chemical properties of water extractable organic matter derived from fresh and decomposed sugar maple leaves", *Soil Biology, Biochemistry*, vol.40, p. 1931-1939
- IMPELLITTERI Christopher A., LU Yuefeng, SAXE Jennifer K., ALLEN Herbert E., PEIJNENBURG Willie J.G.M., 2002, "Correlation of the partitioning of dissolved organic matter fractions with the desorption of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from 18 Dutch soils", *Environment international A.*, vol.28, p. 401-410
- JAFFE R., BOYER J.N., LU X., MAIE N., YANG C., SCULLY N.M., MOCK S., 2004, "Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove-dominated estuary by fluorescence analysis", *Marine Chemistry*, vol.84, p. 195-210
- JAGADAMMA Sindhu, LAL Rattan, USSIRI David A.N., TRUMBORE Susan E., MESTELAN Silvia, 2010, "Evaluation of structural chemistry and isotopic signatures of refractory soil organic carbon fraction isolated by wet oxidation methods", *Biogeochemistry*, vol.98, p. 29-44
- KALBITZ K., GEYER S., GEYER W., 2000, "A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances", *Chemosphere*, vol.40, p. 1305-1312
- KALLE K., 1963, "Über das Verhalten und die Herkunft der in den Gewässern und in der Atmosphäre vorhandenen himmelblauen Fluoreszenz – On the behaviour and the origin of the azure fluorescence present in all kinds of waters and in the atmosphere", *Deutsche Hydrographische Zeitschrift A.*, vol.16, p. 153-166
- KAUTSKY H., MERKEL H., 1939, "Phosphoreszenz, Selbstausslöschung und Sensibilisatorwirkung organischer Stoffe", *Die Naturwissenschaften A.*, vol.27, p. 195-196
- KELLER Jason K., WEISENHORN Pamela B., MEGONIGAL J. Patrick, 2009, "Humic acids as electron acceptors in wetland decomposition", *Soil Biology, Biochemistry*, vol.41, p. 1518-1522
- KIM Young-shin, LEE Jin Koo, PARK Won Ho, LEE Taek Seung, 2005, "Synthesis of bipyridine polymer linked with cyanostyryl groups for colorimetric and fluorescent anion sensing", *Thin Solid Films*, vol. 477, p. 100-103

- KISTER Jacky, DOU Henri, 1986, "Global characterization of the chemical constituents of coal by X scanner, UV fluorescence spectroscopy and FTIR spectroscopy", *Fuel Processing Technology*, vol.12, p. 19-29
- KOBBERØ Claus, KEIDING Kristian, LARSEN Kim L., NIELSEN Per Halkjær, 2008, "Quenching effects in the application of multi-channel fluorescence in activated sludge suspended solids", *Water Research*, vol.42, p. 2449-2456
- KOGUT Megan B., VOELKER Bettina, 2001, "Strong Copper-Binding Behavior of Terrestrial Humic Substances in Seawater ", *Environmental Science and Technology*, vol.35, p. 1149-1156
- KOWALCZUK Piotr, STON-EGIERT Joanna, COOPER William J., WHITEHEAD Robert F., DURAKO Michael J., 2005, "Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy", *Amsterdam, PAYS-BAS*, vol.96, p. 273-292
- KOWALCZUK Piotr, DURAKO Michael J., YOUNG Heather, KAHN Amanda E., COOPER William J., GONSIOR Michael, 2010, "Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: Interannual variability", *Marine Chemistry*, vol.118, p. 22-36
- KWIATKOWSKA J., PROVENZANO M.R., SENESI N., 2008, "Long term effects of a brown coal-based amendment on the properties of soil humic acids", *Geoderma*, vol.148, p. 200-205
- LAKOWICZ Joseph.R., 1983, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, XiV+496 pages
- LAPWORTH D.J. GOODDY D.C., BUTCHER A.S., MORRIS B.L., 2008, "Tracing groundwater flow and sources of organic carbon in sandstone aquifers using fluorescence properties of dissolved organic matter (DOM)", *Applied Geochemistry*, vol.23, p. 3384-3390
- LARSSON Tobias, WEDBORG Margareta, TURNER David, 2007, "Correction of inner-filter effect in fluorescence excitation-emission matrix spectrometry using Raman scatter", *Analytica Chimica Acta*, vol.583, p. 357-363
- LASKER E., 1904, "Kanonische formen", *Mathematische Annalen*, vol.58, p. 434-440
- LAVRIK N.L., MULLOEV N.U., 2010, "Fluorescence Quenching Study of the Effect of Association on the Structure of Humic Acids", *Journal of Applied Spectroscopy*, vol.77, p. 582-587
- LEE Ji Hoon, CARRAWAY Elizabeth R., HUR Jin, YIM Soobin, SCHLAUTMAN Mark A., 2007, "Pyrene fluorescence in the presence of nonquenching and dynamic quenching salting-out agents", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol.185, p. 57-61
- LEPANE V., PERSSON T., WEDBORG M., 2003, "Effects of UV-B radiation on molecular weight distribution and fluorescence from humic substances in riverine and low salinity water", *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol.56, p. 161-173
- LEVY M., MEMERY L., ANDRE J.-M., 1998, "Simulation of primary production and export fluxes in the Northwestern Mediterranean Sea", *Journal of marine research A.*, vol.56, p. 197-238

LLOYD J.B.F., 1971, "Synchronized excitation of fluorescence emission spectra", *Nature Physical Science*, Vol.231, p. 64

LOCHMÜLLER C.H., SAAVEDRA S.S., 1986, "Conformation changes in a soil fulvic acid measured by time-dependent fluorescence depolarization", *Analytical chemistry (Washington) A.*, vol.58, p. 1978-1981

LOUIS Yoann, Thèse, 2008, "Mise au point d'une systématique de caractérisation des interactions matière organique naturelle dissoute (MOND) – contaminants métalliques", Université du Sud Toulon - Var, 214 pages

LOUIS Yoann, GARNIER Cédric, LENOBLE Véronique, MOUNIER Stéphane, DUKROV Neven, OMANOVIC Dario, PIZETA Ivanka, 2009, "Kinetic and equilibrium studies of copper-dissolved organic matter complexation in water column of the stratified Krka River estuary (Croatia)", *Marine Chemistry*, vol.114, p. 110-119

LOUIS Yoann, GARNIER Cédric, LENOBLE Véronique, OMANOVIC Dario, MOUNIER Stéphane, PIZETA Ivanka, 2009, "Characterisation and modelling of marine dissolved organic matter interactions with major and trace cations", *Marine Environmental Research*, vol.67, p. 100-107

LU Fan, CHANG Cheng-Hsuan, LEE Duu-Jong, HE Pin-Jing, SHAO Li-Ming, SU Ay, 2009, "Dissolved organic matter with multi-peak fluorophores in landfill leachate", *Chemosphere*, vol.74, p. 575-582

LU Xiaoqiao, JAFFE Rudolf, 2001, "Interaction between Hg(II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study ", *Water Research*, vol.35, p. 1793-1803

LU X.Q., MAIE N., HANNA J.V., CHILDERS D.L., JAFFE R., 2003, "Molecular characterization of dissolved organic matter in freshwater wetlands of the Florida Everglades", *Water Research*, vol.37, p. 2599-2606

LU Yuefeng, ALLEN Herbert E., 2001, "Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters", *Science of the total environment A.*, vol.277, p. 119-132

LUCIANI Xavier, Thèse, 2007, "Analyse numérique des spectres de fluorescence 3D issus de mélanges non linéaires", Université du Sud Toulon - Var

LUCIANI X., MOUNIER S., PARAQUETTI H.H.M., REDON R., LUCAS Y., BOIS A., LACERDA L.D., RAYNAUD M., RIPERT M., 2008, "Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices", *Marine Environmental Research*, vol.65, p. 148-157

LUCIANI X., MOUNIER S., REDON R., BOIS A., 2009, "A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol.96, p. 227-238

LUSTER J., LLOYD T., SPOSITO G., FRY I.Y., 2006, "Multi-wavelength molecular fluorescence spectrometry for quantitative characterization of copper(II) and aluminium(III) complexation by dissolved organic matter", *Environmental science & technology A.*, vol.30, p. 1565-1574

- MACDONALD J.D., HENDERSHOT W.H., 2006, "Modelling trace metal partitioning in forest floors of northern soils near metal smelters ", *Environmental Pollution*, vol.143, p. 228-240
- MACKO S.A., ESTEP M.L.F., 1984, "Microbial alteration of stable nitrogen and carbon isotopic compositions of organic matter – Altération microbienne de la composition en isotopes stables du carbone et de l'azote de la matière organique", *Organic geochemistry A.*, vol.6, p. 787-790
- MAIE Nagamitsu, PARISH Kathleen J., WATANABE Akira, KNICKER Heike, BENNER Ronald, ABE Tomonori, KAISER Kari, JAFFÉ Rudolf, 2006, "Chemical characteristics of dissolved organic nitrogen in an oligotrophic subtropical coastal ecosystem", *Geochimica*, vol.70, p. 4491-4506
- MAIE Nagamitsu, SCULLY Norman M., PISANI Oliva, JAFFE Rudolf, 2007, "Composition of a protein-like fluorophore of dissolved organic matter in coastal wetland and estuarine ecosystems", *Water research*, vol. 41, p. 563-570
- MALMSTADT H.V., VASSALLO D.A., 1957, "Rapid and accurate titrations with a convenient and compact automatic derivative spectrophotometric titrator", *Analytica Chimica Acta*, vol.16, p. 455-463
- MANCIULEA Adriana, BAKER Andy, LEAD Jamie R., 2009, "A fluorescence quenching study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with iron oxide nanoparticles", *Chemosphere*, vol.76, p. 1023-1027
- MARHABA Taha F., BENGRAÏNE Karim, PU Yong, ARAGO Jaime, 2003, "Spectral fluorescence signatures and partial least squares regression: model to predict dissolved organic carbon in water", *Journal of Hazardous Materials*, vol.B97, p. 83-97
- MARKIEWICZ-PATKOWSKA Julita, HURSTHOUSE Andrew, PRZYBYLA-KIJ Hanna, 2005, "The interaction of heavy metals with urban soils: sorption behaviour of Cd, Cu, Cr, Pb and Zn with a typical mixed brownfield deposit", *Environment International*, vol.31, p. 513-521
- MARIOT Mélody, DUDAL Yves, FURIAN Sônia, SAKAMOTO Arnaldo, VALLÈS Vincent, FORT Monique, BARBIERO Laurent, 2007, "Dissolved organic matter fluorescence as a water-flow tracer in the tropical wetland of Pantanal of Nhecolândia", *Science of The Total Environment*, vol.388, p. 184-193
- MASINI J.C., ABATE G., LIMA E.C., HAHN L.C., NAKAMURA M.S., LICHTIG J., NAGATOMY H.R., 1998, "Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs", *Analytica chimica acta A.*, vol.364, p. 223-233
- MATTHEWS B.J.H., JONES A.C., THEODOROU N.K., TUDHOPE A.W., 1996, "Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs", *Marine Chemistry*, vol.55, p. 317-332
- MAYER Lawrence M., SCHICK Linda L., LODER III Theodore C., "Dissolved protein fluorescence in two Marine estuaries", *Marine Chemistry*, vol.64, p. 171-179
- MELLACE Maria G., FAGALDE Florencia, KATZ Néstor E., HESTER Heidi R., SCHMEHL Russell, 2006, "Photophysical properties of the photosensitizer $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{-CNphen})]^{2+}$ and intramolecular quenching by complexation of Cu(II)", *Journal of Photochemistry and Photobiology*,

vol.181, p. 28-32

MIANO T.M., SENESI N., 1992, "Synchronous excitation fluorescence spectroscopy applied to soil humic substances chemistry", Elsevier, Kidlington, ROYAUME-UNI, vol. 117-118, p. 41-51

MIDORIKAWA Takashi, TANOUE Eiichiro, 1998, "Molecular masses and chromophoric properties of dissolved organic ligands for copper (II) in oceanic water", Marine Chemistry, vol.62, p. 219-239

MILLERO F.J., WOOSLEY R., DITROLIO B., WATERS J., 2009, "Effect of Ocean Acidification on the Speciation of Metals in Seawater", Oceanography, vol.22 (4), p. 72-85

MILNE Christopher J., KINNIBURGH David G., TIPPING Edward, 2001, "Generic NICA-Donnan model parameters for proton binding by humic substances", Environmental science & technology A., vol.35, p. 2049-2059

MILORI Débora Marcondes Bastos Pere, GALETI Helder Winicius Avanco, MARTIN-NETO Ladislau, DIECKOW Jeferson, GONZÁLEZ-PÉREZ Martha, BAYER Cimélio, SALTON Julio, 2006, "Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy", Soil Science Society of America Journal A., vol.70, p. 57-63

MONTES Célia Regina, LUCAS Yves, MELFI Adolpho José, ISHIDA Débora Ayumi, 2007, "Systèmes sols ferrallitiques-podzols et génèse des kaolins", Comptes Rendus Geosciences, vol. 339 (1), p. 50-56

MOUNIER Stéphane, Thèse, 1997, "Etude de la matière organique transportée par les fleuves du bassin Amazonien", Université Paris 6

MOUNIER Stéphane, HDR, 2004, "Modélisation de la matière organique dissoute en environnement et contribution de la spectroscopie de fluorescence à la détermination rapide de classes de chimiotype", Université du Sud Toulon - Var, 51 pages

MOUNIER S., BRAUCHER R., BENAÏM J.Y., 1999, "Differentiation of Organic Matters Properties of the Rio Negro Basin by Cross-Flow Ultra-Filtration and UV-Spectrofluorescence", Water Research, vol.33, p. 2363-2373

MOUNIER S., PATEL N., QUILICI L., BENAÏM J.Y., BENAMOU C., 1999, "Fluorescence 3D de la matière organique dissoute du fleuve amazon (Three-dimensional fluorescence of the dissolved organic carbon in the Amazon River)", Water Research, vol.33, p. 1523-1533

MOUNIER Stéphane, ZHAO Huiyu, GARNIER Cédric, REDON Roland, 2010, "Copper complexing properties of dissolved organic matter: PARAFAC treatment of fluorescence quenching", Biogeochemistry, DOI: 10.1007/s10533-010-9486-6

MUÑOZ DE LA PEÑA A., DÍEZ N. Mora, GIL D. Bohoyo, OLIVIER A.C., ESCANDAR G.M., 2006, "Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation-emission fluorescence data", Analytica Chimica Acta, vol.569, p. 250-259

MURPHY Kathleen R., RUIZ Gregory M., DUNSMUIR William T.M., WAITE T. David, 2006,

"Optimized Parameters for Fluorescence-Based Verification of Ballast Water Exchange by Ships", *Environmental science, technology* vol.40, p. 2357-2362

MURPHY Kathleen R., STEDMON Colin A., WAITE T. David, RUIZ Gregory M., 2008, "Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy", *Marine Chemistry*, vol.108, p. 40-58

NAGAO Seiya, MATSUNAGA Takeshi, SUZUKI Yasuhiro, UENO Takashi, AMANO Hikaru, 2003, "Characteristics of humic substances in the Kuji River waters as determined by high-performance size exclusion chromatography with fluorescence detection", *Water Research*, vol.37, p. 4159-4170

NAHORNIAK Michelle L., COOPER Gary A., KIM Yoon-Chang, BOOKSH Karl S., 2005, "Three- and four-way parallel factor (PARAFAC) analysis of photochemically induced excitation-emission kinetic fluorescence spectra", *Analyst A.*, vol.130, p. 85-93

NEVIN Austin, CATHER Sharon, ANGLIOS Demetrios, FOTAKIS Costas, 2006, "Analysis of protein-based binding media found in paintings using laser induced fluorescence fluorescence spectroscopy", *Analytica Chimica Acta, Volumes 573-574*, 28 July 2006, p. 341-346

NICOLAU Rudy, Thèse, 2005, "Caractérisation et quantification des transferts dus aux petites rivières côtières méditerranéennes", Université du Sud Toulon - Var, 150 pages

NIE Jin-Fang, WU Hai-Long, ZHU Shao-Hua, HAN Qing-Juan, FU Hai-Yan, LI Shu-Fang, YU Ru-Qin, 2008, "Simultaneous determination of 6-methylcoumarin and 7-methoxycoumarin in cosmetics using three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence coupled with second-order calibration methods", *Talanta*, vol.75, p. 1260-1269

NIEROP Klaas G.J., JANSEN Boris, VERSTRATEN Jacobus M., 2002, "Dissolved organic matter, aluminium and iron interactions: precipitation induced by metal/carbon ration, pH and competition", *The Science of the Total Environment*, vol. 300, p. 201-211

NIEWIADOMSKA Katarzyna, CLAUSTRE Hervé, PRIEUR Louis, D'ORTENZIO Fabrizio, MOLINE Mark A., PERRY Mary Jane, DICKEY Tommy D., ITSWEIRE Eric C., 2008, "Submesoscale physical-biogeochemical coupling across the Ligurian Current (northwestern Mediterranean) using a bio-optical glider", *Limnology and oceanography A.*, vol. 53, p. 2210-2225

NIKOLAJSEN Rikke P.H., BOOKSH Karl S., HANSEN Åse M., BRO Rasmus, 2003, "Quantifying catecholamines using multi-way kinetic modelling", *Analytica Chimica Acta*, vol. 475, p. 137-150

NOIRTIN Eric, Thèse, 2010, "Impact de l'irrigation par effluent de station d'épuration sur les caractéristiques et propriétés de la matière organique du sol et des solutions", Université du Sud Toulon Var

NOVOTNY Etelvino H., KNICKER Heike, COLNAGO Luiz A., MARTIN-NETO Ladislau, 2006, "Effect of residual vanadyl on the spectroscopic analysis of humic acids", *Organic Geochemistry*, vol. 37, p. 1562-1572

OHNO Tsutomu, 2002, "Fluorescence Inner-Filtering Correction for Determining the Humification Index of Dissolved Organic Matter", *Environ. Sci. Technol.*, 2002, 36 (4), pp 742-746

OHNO Tsutomu, GRIFFIN Timothy S., LIEBMAN Matt, PORTER Gregory A., 2005, "Chemical characterization of soil phosphorus and organic matter in different cropping systems in Maine, U.S.A.", *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol.105, p. 625-634

OHNO Tsutomu, FERNANDEZ Ivan J., HIRADATE Syuntaro, SHERMAN Jessica F., 2007, "Effects of soil acidification and forest type on water soluble soil organic matter properties", *Geoderma*, vol. 140, p. 176-187

OHNO Tsutomu, AMIRBAHMAN Aria, 2010, "Phosphorus availability in boreal forest soils: A geochemical and nutrient uptake modeling approach", *Geoderma*, vol.155, p. 46-54

ORSETTI Silvia, ANDRADE Estela Maria, MOLINA Fernando V., 2009, "Application of a constrained regularization method to extraction of affinity distributions: Proton and metal binding to humic substances", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol.336, p. 377-387

PANT Sanjay, TRIPATHI H.B., PANT D.D., 2001, "Solvent polarity and viscosity effect on the fluorescence spectrum and excited state lifetime of quinine dication", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol.85, p. 33-38

PARLANTIE., WORZ K., GEOFFROY L., LAMOTTE M., 2000, "Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs", *Organic Geochemistry*, vol.31, p. 1765-1781

PATEL-SORRENTINO N., MOUNIER S., BENAÏM J.Y., 2002, "Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers", *Water Research*, vol.36, p. 2571-2581

PEIRIS Ramila H., HALLÉ Cynthia, BUDMAN Hector, MORESOLI Christine, 2010, "Identifying fouling events in a membrane-based drinking water treatment process using principal component analysis of fluorescence excitation-emission matrices", *Water Research*, vol.44, p. 185-194

PEIRIS Ramila H., BUDMAN Hector, MORESOLI Christine, LEGGE Raymond L., 2010, "Understanding fouling behaviour of ultrafiltration membrane processes and natural water using principal component analysis of fluorescence excitation-emission matrices", *Journal of Membrane Science*, vol.357, p. 62-72

PERNET-COUDRIER Benoît, Thèse, 2008, "Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine ", Université Paris - Est, 278 pages

PERSSON Tomas, WEDBORG Margareta, 2001, "Multivariate evaluation of the fluorescence of aquatic organic matter", *Analytica Chimica Acta*, vol.434, p. 179-192

PEURAVUORI Juhani, KOIVIKKO Riitta, PIHLAJA Kalevi, 2002, "Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy", *Water Research*, vol.36, p. 4552-4562

PEURAVUORI Juhani, INGMAN Petri, PIHLAJA Kalevi, 2003, "Critical comments on accuracy of quantitative determination of natural humic matter by solid state ¹³C NMR spectroscopy", *Talanta*, vol.59, p. 177-189

PLAZA C., D'ORAZIO V., SENESI N., 2005a, "Copper(II) complexation of humic acids from the first generation of EUROSOLS by total luminescence spectroscopy", *Geoderma*, vol.125, p. 177-186

PLAZA C., SENESI N., GARCIA-GIL J.C., POLO A., 2005b, "Copper(II) complexation by humic and fulvic acids from pig slurry and amended and non-amended soils", *Chemosphere*, vol.61, p. 711-716

PLAZA César, BRUNETTI Gennaro, SENESI Nicola, POLO Alfredo, 2006a, "Fluorescence characterization of metal ion-humic acid interactions in soils amended with composted municipal solid wastes", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, vol.386, p. 2133-2140

PLAZA César, BRUNETTI Gennaro, SENESI Nicola, POLO Alfredo, 2006b, "Molecular and Quantitative Analysis of Metal Ion Binding to Humic Acids from Sewage Sludge and Sludge-Amended Soils by Fluorescence Spectroscopy", *Environmental Science and Technology*, vol.40, p. 917-923

POIRIER Natacha, DERENNE Sylvie, ROUZAUD Jean-Noël, LARGEAU Claude, MARIOTTI André, BALESSENT Jérôme, MAQUET Jocelyne, 2000, "Chemical structure and sources of the macromolecular, resistant, organic fraction isolated from a forest soil (Lacadée, south-west France)", *Organic Geochemistry*, vol.31, p. 813-827

PONS Marie-Noëlle, LE BONTE Sébastien, POTIER Olivier, 2004, "Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation", *Journal of Biotechnology*, vol.113, p. 211-230

POTOT Cécile, Thèse, 2011, "Etude géochimique et isotopique du système aquifère de la basse vallée du Var (Alpes Maritimes)", Laboratoire LRSAE, Université de Nice-Sophia Antipolis

PROVENZANO Maria Rosaria, D'ORAZIO Valeria, JERZYKIEWICZ Maria, SENESI Nicola, 2004, "Fluorescence behaviour of Zn and Ni complexes of humic acids from different sources", *Chemosphere*, vol.55, p. 885-892

RASHID Mohammed A., 1985, "Geochemistry of Marine Humic Substances", Springer-Verlag

REYNOLDS D.M., 2003, "Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy", *Water Research*, vol.37, p. 3055-3060

RICKLEFS Robert E., MILLER Gary L., 2005, "Écologie"- ISBN 2-7445-0145-X De Boeck, , 821 pages

RINNAN Riikka, RINNAN Asmund, 2007, "Application of near infrared reflectance (NIR) and fluorescence spectroscopy to analysis of microbiological and chemical properties of microbiological and chemical properties of arctic soil", Elsevier, Oxford, ROYAUME-UNI, vol. 39, p. 1664-1673

RICHE Jason D., PERDUE E. Michael, 2003, "Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.67, p. 85-96

ROCHA Claudio J., GEHLEN Marcelo H., DA SILVA Rosangela, DONATE Paulo M., 1999, "Time-resolved fluorescence spectroscopy of quinine dication free and bound to polymethacrylic

acid", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol.123, p. 129-136

RODRÍGUEZ N., ORTIZ M.C., SARABIA L.A., 2009, "Fluorescence quantification of tetracycline in the presence of quenching matrix effect by means of a four-way model", *Talanta*, vol.77, p. 1129-1136

RYAN David K., WEBER James H., 1982, "Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid", *Analytic Chemistry*, vol.54, p. 986-990

RYAN D.K., CABANISS S.E., SHUMAN M.S., VENTRY L.S., 1990, "Exchange of Comments on Fluorescence Quenching Measurements of Copper-Fulvic Acid Binding", *Analytical chemistry*, vol.62, p. 1523-1526

SAAR Robert A., WEBER James H., 1980, "Lead(II) complexation by fulvic acid: how it differs from fulvic acid complexation of copper(II) and cadmium(II)", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol.44, p. 1381-1384

SAIZ-JIMENEZ C., DE LEEUW J.W., 1986, "Chemical characterization of soil organic matter fractions by analytical pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry", *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, vol.9, p. 99-119

SANTIN C., YAMASHITA Y., OTERO X.L., ÁLVAREZ M.Á., JAFFÉ R., 2009, "Characterizing humic substances from estuarine soils and sediments by excitation-emission matrix spectroscopy and parallel factor analysis", *Biogeochemistry*, vol.96, p. 131-147

SCHELL D.M., BARNETT B.A., VINETTE K.A., 1998, "Carbon and nitrogen isotope in zooplankton of the Bering Chukchi and Beaufort Seas", *Marine Ecology Progress Series A.*, vol.162, p. 11-23

SCHMITT D., SARAVIA F., FRIMMEL F.H., SCHUESSLER W., 2003, "NOM-facilitated transport of metal ions in aquifers: importance of complex-dissociation kinetics and colloid formation", *Water Research*, vol.37, p. 3541-3550

SCHNITZER M., 1974, "Alkaline cupric oxide oxidation of a methylated fulvic acid", *Soil Biology and Biochemistry*, vol.6, p. 1-6

SEITZ W Rudolf, 1981, "Fluorescence methods for studying speciation of pollutants in water", *Analytical chemistry*, vol.1, p. 79-83

SENESI Nicola, 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*, vol. 232, p. 77-106

SENESI N., SAIZ-JIMINEZ C., MIANO T.M., 1992, "Spectroscopic characterization of metal-humic acid-like complexes of earthworm-composted organic wastes", *Science of The Total Environment*, vol.117-118, p. 111-120

SENESI Nicola, 1993, "Organic Substances in Soil and Water: Natural Constituents and Their Influences on Contaminant Behaviour", *The Royal Society of Chemistry, Cambridge*, p74

- SENESE N., SAKELLARIADOU F., 1994, "Structural and functional chemical properties of marine and coastal sedimentary humic acids", *Environment International*, vol.20, p. 3-9
- SEREDYNSKA-SOBECKA Bożena, BAKER Andy, LEAD Jamie R., 2007, "Characterisation of colloidal and particulate organic carbon in freshwaters by thermal fluorescence quenching", *Water Research*, vol.41, p. 3069-3076
- SERITTI A., MORELLI E., NANNICINI L., GIAMBELLUCA A., SCARANO G., 1994, "Fluorescence emission characteristics of naturally occurring organic matter in relation to metal complexation studies", vol.148, p. 73-81
- SHIN Hyun-Sang, HONG Kwang-Hee, LEE Myung-Ho, Cho Young-Hyun, Lee Chang-Woo, 2001, "Fluorescence quenching of three molecular weight fractions of a soil fulvic acid by $UO_2(II)$ ", *Talanta*, vol.53, p. 791-799
- SHIRSHOVA L.T., KHOLODOV A.L., ZOLOTAREVA B.N., FOMINYKH L.A., YEROLAYEV A.M., 2009, "Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands", *Geoderma*, vol.149, p. 115-123
- SKOOG Douglas A., HOLLER James, NIEMAN Timothy A., 2003, "Principes d'analyse instrumentale" - ISBN: 2-7445-0112-3, De Boeck, 968 pages
- SMITH D. Scott, KRAMER James R., 1998, "Multi-site aluminum speciation with natural organic matter using multiresponse fluorescence data", *Analytica Chimica Acta*, vol.363, p. 21-29
- SMITH D. Scott, KRAMER James R., 1999, "Fluorescence analysis for Multi-site Aluminum binding to Natural Organic Matter", *Environment International*, vol.25, p. 295-306
- SMITH D. Scott, KRAMER James R., 2000, "Multisite metal binding to fulvic acid determined using multiresponse fluorescence", *Analytica Chimica Acta*, vol.416, p. 211-220
- SOLER-ROVIRA Pedro, MADEJON Engracia, MADEJON Paula, PLAZA César, 2010, "*In situ* remediation of metal-contaminated soils with organic amendments: Role of humic acids in copper bioavailability", *Chemosphere*, vol.79, p. 844-849
- SOURNIA A., BRYLINSKI J.-M., DALLOT S., LE CORRE P., LEVEAU M., PRIEUR L., FROGET C., 1990, "Les caractéristiques physiques et biologiques des fronts océaniques (hydrologiques) ont été étudiés et comparés sur l'ensemble des côtes françaises", *Oceanologica acta A.*, vol. 13, p. 413-438
- STEDMON Colin A, MARKAGER Stiig, BRO Rasmus, 2003, "Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy", *Marine Chemistry*, vol. 82, p. 239-254
- STEDMON Colin A., MARKAGER Stiig, 2005, "Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis", *Limnologie and Oceanography*, vol. 50, p. 1415-1426
- STEVENSON F.J., KRASTANOV S.A., ARDAKANI M.S., 1973, "Formation constants of Cu^{2+} complexes with humic and fulvic acids", *Geoderma*, vol.9, p. 109-116

- STOBER Q.J., JONES R.D., SCHEIDT D.J., 1995, "Ultratrace level mercury in the Everglades ecosystem, a multimedia canal pilot study", *Water, Air & Soil Pollution*, vol.80, p. 991-1001
- STORDAL M.C., GILL G.A., WEN L.-S., SANTSCHI P.H., 1996a, "Mercury phases speciation in the surface waters of three Texas estuaries: Importance of colloidal forms", *Limnologie and Oceanography* vol.41, p. 52-61
- STORDAL M.C., SANTSCHI P.H., GILL G.A., 1996b, "Colloidal pumping: evidence for the coagulation process using natural colloids tagged with ^{203}Hg ", *Environmental science, technology* vol.30, p. 3335-3340
- STUMM W., HUANG C.P., JENKINS S.F., 1970, "Specific chemical interaction affecting stability of dispersed systems", *Croatica Chemica Acta A.*, vol.42, p. 223
- SUNDA W.G., TESTER P.A., HUNTSMAN S.A., 1987, "Effects of cupric and zinc ion activities on the survival and reproduction of marine copepods", *Marine Biologie* vol.94, p. 203-210
- TAKATA Hyoe, KUMA Kenshi, IWADA Shoei, YAMAJYOH Yoshinobu, YAMAGUCHI Atsushi, TAKAGI Shohgo, SAKAOKA Keiichiro, YAMASHITA Youhei, TANOUE Eiichiro, MIDORIKAWA Takashi, KIMURA Kan, NISHIOKA Jun, 2004, "Spatial variability of iron in the surface water of the northwestern North Pacific Ocean", *Marine Chemistry*, vol.86, p. 139-157
- TANI Heihachiro, NISHIOKA Jun, KUMA Kenshi, TAKATA Hyoe, YAMASHITA Youhei, TANOUE Eiichiro, MIDORIKAWA Takashi, 2003, "Iron(III) hydroxide solubility and humic-type fluorescent organic matter in the deep water column of the Okhotsk Sea and the northwestern North Pacific Ocean", *Deep-Sea Research I*, vol.50, p. 1063-1078
- TEDETTI Marc, GUIGUE Catherine, GOUTX Madeleine, 2010, "Utilization of a submersible UV fluorometer for monitoring anthropogenic inputs in the Mediterranean coastal waters", *Marine Pollution Bulletin*, vol.60, p. 350-362
- THOMSEN Marianne, LASSEN Pia, DOBEL Shima, HANSEN Poul Erik, CARLSEN Lars, MOGENSEN Betty Bügel, 2002, "Characterisation of humic materials of different origin: A multivariate approach for quantifying the latent properties of dissolved organic matter", *Chemosphere*, vol.49, p. 1327-1337
- TIAN Hanqin, CHEN Guangsheng, ZHANG Chi, MELILLO Jerry M., HALL Charles A.S., 2010, "Pattern and variation of C:N:P ratios in China's soils: a synthesis of observational data", *Biogeochemistry*, vol.98, p. 139-151
- TOWN Raewyn, FILELLA Montserrat, 2000, "Determination of metal ion binding parameters for humic substances Part 2. Utility of ASV pseudo-polarography", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol.488, p. 1-16
- TRUBETSKAYA Olga, TRUBETSKOJ Oleg, GUYOT Chislain, ANDREUX Francis, RICHARD Claire, 2002, "Fluorescence of soil humic acids and their fractions obtained by tandem size exclusion chromatography-polyacrylamide gel electrophoresis", *Organic Geochemistry*, vol.33, p. 213-220
- UNDERDOWN Alan W, LANGFORD Cooper H., GAMBLE Donald S., 1985, "Light scattering

studies of the relationships between cation binding and aggregation of fulvic acid", *Environnemental Science, Technologie* vol.19, p. 132-136

VALEUR Bernard, 2004, "Invitation à la fluorescence moléculaire" - ISBN: 2-8041-4597-2, De Boeck, 201 pages

VAN DEN BERG CONSTANT M.G., 1982, "Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂. II. Experimental procedures and application to surface seawater", *Marine Chemistry*, vol.11, p. 323-342

VAN DEN BERG CONSTANT M.G., 1984, "Determination of the complexation capacity and conditional stability constants of complexes of copper (II) with natural organic ligands in seawater by cathodic stripping voltammetry of copper-catechol complexation", *Marine Chemistry*, vol.15, p. 1268-1274

VANDERKOOI J.M., WILSON D.F., 1986, "A new method for measuring oxygen concentration in biological systems", *Advances in Experimental Medicine and Biology A.*, vol.200, p. 189-193

VODACEK Anthony, BLOUGH Neil V., DEGRANDPRE Michael D., PELTZER Edward T., NELSON Robert K., 1997, "Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: Terrestrial inputs and photooxidation", *Limnologie and Oceanography*, vol.42, p.674-686

VOELKER Bettina, KOGUT Megan B., 2001, "Interpretation of metal speciation data in coastal waters: the effects of humic substances on copper binding as a test case", *Marine Chemistry*, vol.74, p. 303-3186

VO-DINH Tuan, 1978, "Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry", *Analytical Chemistry*, vol.50, p. 396-401

VO-DINH T., MARTINEZ P.R., 1981, "Direct determination of selected polynuclear aromatic hydrocarbons in a coal liquefaction product by synchronous luminescence techniques ", *Analytica Chimica Acta A.*, vol.125, p. 13-19

WANG Feng, HUANG Wei, "Determination of curcumin by its quenching effect on the fluorescence of Eu³⁺-tryptophan complex", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol.43, p. 393-398

WANG Zhi-gang, LIU Wen-qing, ZHAO Nan-jing, LI Hong-bin, ZHANG Yu-jun, SI-MA Wei-cang, LIU Jian-guo, 2007, "Composition analysis of colored dissolved organic matter in Taihu Lake based on three dimension excitation-emission fluorescence matrix and PARAFAC model, and the potential application in water quality monitoring", *Journal of Environmental Sciences*, vol.19, p. 787-791

WEBER G., LAKOWICZ J.R., 1973, "Subnanosecond Solvent Relaxation Studies by Oxygen Quenching of Fluorescence", *Chemical Physics Letters*, vol.22, p.419-423

WEBER James H., 1988, "Binding and Transport of Metals by Humic Materials", F.H. Frimmel, R.F. Christman, p. 165-178

WILLIAMS P.M., DRUFFEL E.R.M., SMITH JR. K.L., 1987, "Dietary carbon sources for deep-sea

organisms as inferred from their organic radiocarbon activities", *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, vol.34, p. 253-266

WITT Melanie Louise Inez, SKRABAL Stephen, KIEBER Robert, WILLEY Joan, 2007, "Photochemistry of Cu complexed with chromophoric dissolved organic matter: implications for Cu speciation in rainwater", *Journal of Atmosphere Chemistry*, vol.58, p. 89-109

WOLFE Alexander P., KAUSHAL Sujay S., FULTON J. Robin, MCKNIGHT Diane M., 2002, "Spectrofluorescence of Sediment Humic Substances and Historical Changes of Lacustrine Organic Matter Provenance in Response to Atmospheric Nutrient Enrichment", *Environmental science, technology*, vol.36, p. 3217-3223

WU F.C., EVANS R.D., DILLON P.J., 2003, "Separation and Characterization of NOM by High-Performance Liquid Chromatography and On-Line Three-Dimensional Excitation Emission Matrix Fluorescence Detection", *American Chemical Society, Washington, DC, ETATS-UNIS*, vol.37, p. 3687-3693

XIAO Xiaoming, WILKINS R.W.T., LIU Dehan, LIU Zufa, SHEN Jiaqui, 2002, "Laser-induced fluorescence microscopy-application to possible high rank and carbonate source rocks", *International Journal of Coal Geology*, vol.51, p. 129-141

XU Yunping, JAFFE Rudolf, 2009, "Geochemical record of anthropogenic impacts on Lake Valencia, Venezuela", *Applied Geochemistry*, vol.24, p. 411-418

YAMASHITA Youhei, TANOUE Eiichiro, 2003a, "Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids", *Marine Chemistry*, vol.82, p. 255-271

YAMASHITA Youhei, TANOUE Eiichiro, 2003b, "Distribution and alteration of amino acids in bulk DOM along a transect from bay to oceanic waters", *Marine Chemistry*, vol.82, p. 145-160

YAMASHITA Youhei, TANOUE Eiichiro, 2004, "Chemical characteristics of amino acid-containing dissolved organic matter in seawater", *Organic Geochemistry*, vol.35, p. 679-692

YAMASHITA Youhei, TSUKASAKI Ayumi, NISHIDA Tamihito, TANOUE Eiichiro, 2007, "Vertical and horizontal distribution of fluorescent dissolved organic matter in the Southern Ocean", *Marine Chemistry*, vol.106, p. 498-509

YANG Xiu-Pei, SHI Bing-Fang, ZHANG You-Hui, TANG Jing, CAI Duo-Chang, 2008, "Identification of polycyclic hydrocarbons (PAHs) in soil by constant energy synchronous fluorescence detection", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol.69, p. 400-406

YARON Bruno, DROR Ishai, BERKOWITZ Brian, 2008, "Contaminant-induced irreversible changes in properties of the soil–vadose–aquifer zone: An overview", *Chemosphere*, vol.71, p. 1409-1421

ZEPP Richard G., SHELDON Wade M., MORAN Mary Ann, 2004, "Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation-emission matrices", *Marine Chemistry*, vol.89, p. 15-36

ZEPP R.G., 1988, "Environmental Photoprocesses involving Natural Organic Matter", F.H. Frimmel, R.F. Christman, p. 193-214

ZHANG Qian-Qian, , LEI Shu-He, WANG Xiu-Lin, WANG Lei, ZHU Chen-Jian, 2006, "Discrimination of phytoplankton classes using characteristic spectra of 3D fluorescence spectra", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol.63, Pages 361-369

ZHANG Yaheng, LI Jiazhong, DONG Lijun, LI Ying, CHEN Xingguo, 2008, "Characterization of interaction between esculin and human serum albumin in membrane mimetic environments", *Journal of Molecular Structure*, vol.889, p. 119-128

ZHAO Jingyan, NELSON Donald J., 2005, "Fluorescence study of the interaction of Suwannee River fulvic acid with metal ions and Al³⁺-metal ion competition", *Journal of Inorganic Biogeochemistry*, vol.99, p. 383-396

Articles d'avisement

CHAN Wing Hong, YANG Rong Hua, WANG Ke Min, 2001, "Development of a mercury ion-selective optical sensor based on fluorescence quenching of 5, 10, 15, 20-tetraphenylporphyrin", *Analytica Chimica Acta*, vol.444, p. 261-269

CHEN Zhenlong, LIU Qingliang, WANG Shouye, XU Xiaolong, YU Huaming, 1999, "Study on hemorrhagin III purified from the venom of *Agkistrodon acutus* by three-dimensional fluorescence spectrometry", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol.55, p. 1909-1914

FINIKOVA Olga S., CHEN Ping, OU Zhongping, KADISH Karl M., VINOGRADOV Sergei A., 2007, "Dynamic quenching of porphyrin triplet states by two-photon absorbing dyes: Towards two-photon-enhanced oxygen nanosensors", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol.198, p. 75-84

MEHATA M.S., JOSHI H.C., TRIPATHI H.B., 2001, "Edge excitation red shift and charge transfer study of 6-methoxyquinoline in polymer matrices", *Journal of Luminescence*, vol.93, p. 275-280

MENDHAM John, TOULLEC Jean, 2005, "Analyse chimique quantitative de Vogel" - ISBN: 2-8041-4799-1 De Boeck, 920 pages

TOMIN Vladimir I., ONCUL Sule, SMOLARCZYK Grzegorz, DEMCHENKO Alexander P., 2007, "Dynamic quenching as a simple test for the mechanism of excited-state reaction", *Chemical Physics*, vol.342, p. 126-134

TOMIN Vladimir I., SMOLARCZYK G., 2008, "Dynamic Quenching of the Multiband Fluorescence of 3-Hydroxyflavone", *Optics and Spectroscopy*, vol.104, Number 6, 832-837

VERBERCKMOES An A., WECKHUYSEN Bert M., SCHOONHEYDT Robert A., OOMS Kristine, LANGHANS Ivan, 1997, "Chemometric analysis of diffuse reflectance spectra of Co^{2+} -exchanged zeolites: spectroscopic fingerprinting of coordination environments", *Analytica Chimica Acta*, vol.348, p. 267-272

WARE William R., CHOW Peter, LEE Sai K., 1968, "Nanosecond Time-Resolved Emission Spectroscopy: Spectral Shifts due to Solvent-Excited Solute Relaxation", *Journal of Chemical Physics Letters*, vol.2, p. 4729-4737

WICZK Wieslaw, MROZEK Justyna, SZABELSKI Mariusz, KAROLCZAK Jerzy, GUZOW Katarzyna, MALICKA Joanna, 2001, "Determination of stoichiometry and equilibrium constants of complexes of tyrosine with cyclodextrins by time-resolved fluorescence spectroscopy and global analysis of fluorescence decays", Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS, vol.341, p. 161-167

XU Yunping, JAFFE Rudolf, SIMONEIT Bernd R.T., 2008, "Oxygenated *spiro*-triterpenoids possibly related to arborenes in sediments of a tropical, freshwater lake", *Organic Geochemistry*, vol.39, p. 1400-1404

Annexe 1 – Liste des Figures

Figure 1: Schéma relationnel des composants de la MON	4
Figure 2: Schéma relationnel des composants de la MON terrestre selon Buffle (1988).....	7
Figure 3: Schéma du cycle du carbone :	9
Figure 4: Diagramme de Jablonski	15
Figure 5: Principe de la mesure d'absorption	17
Figure 6: Spectres d'UV-Visible de différentes eaux de rivières urbaines (Pons et al., 2004).....	18
Figure 7: Spectres UV-Visible de certaines substances anthropogéniques (Pons et al., 2004)	18
Figure 8: Représentation suivi logarithmique de l'absorbance de différents milieux. La pente = S	18
Figure 9: Principe du spectrofluorimètre.	21
Figure 10: Passage des faisceaux d'excitation et d'émission de fluorescence dans la cuve de mesure.....	23
Figure 11: Variations saisonnières du coefficient d'absorption et de fluorescence de la MODC	23
Figure 12: Exemple de spectre 2D d'émission pour l'AH extrait.....	24
Figure 13: Exemple de la relation entre les spectres 2D.....	25
Figure 14: Description des mesures de la modulation d'amplitude.....	26
Figure 15: Le changement courbes d'absorbances de vert de bromocrésol en fonction du pH (ligne jaune : pH acide ; ligne verte : pH intermédiaire ; ligne bleue : pH basique).....	29
Figure 16: Le changement des spectres de fluorescence (b) en fonction du pH (Trubetskaya et al., 2002).....	29
Figure 17: Exemple de l'image MEEF à Coble (1996)	33
Figure 18: Exemple de l'image MEEF à Del Castillo (1999).....	34
Figure 19: Exemple de l'image MEEF à Parlanti (2000)	34
Figure 20: Positions des maxima obtenus par la méthode peak-picking	35
Figure 21: Modèle du passage lumineux dans l'espace (xyz).	39
Figure 22: Modélisation de l'effet d'écran sur la fluorescéine seule (Luciani, 2007)	40
Figure 23: Positions des maxima obtenus par la méthode PARAFAC.....	42
Figure 24: Plan des sites de prélèvement du projet Croatie estuaire.....	47
Figure 25: Site des prélèvements de l'eau de mer dans la rade de Toulon	48
Figure 26: Location du site DYFAMED	48
Figure 27: Bouteilles Niskin attachées et lancées dans la mer sur le site DYFAMED.....	49
Figure 28: Plan des sites de prélèvement du projet MARSECO (France).	50
Figure 29: Plan des sites de prélèvement du projet BasVar.....	51
Figure 30: Plan des sites de prélèvement du projet AURORA (Norvège).	53
Figure 31: Exemple du résultat du corcondia (Core consistency)	56
Figure 32: Images obtenues après les traitements de données de l'échantillon Linde (BasVar 2008)	57
Figure 33: Comparaison des résultats avec et sans MEEF faussées	58
Figure 34: Composants obtenus par PARAFAC du projet de l'estuaire Martinska en Croatie 2008	60

Figure 35: Composants obtenus par PARAFAC du projet de l'estuaire Martinska en Croatie 2009	60
Figure 36: Composants obtenus par PARAFAC du projet Rade de Toulon (Eaux de mer).....	61
Figure 37: Composants obtenus par PARAFAC du projet DYCOMED	62
Figure 38: MARSECO 1 – mission du 16/02/2010	63
Figure 39: MARSECO 2 – mission du 18/03/2010	63
Figure 40: MARSECO 3 – mission du 26/04/2010	64
Figure 41: MARSECO global – trois missions en 2010.....	64
Figure 42 : Eaux de sol – Brésil Sao Gabriel campagne 2007.....	65
Figure 43 : Eaux de sol – Brésil Sao Gabriel campagne 2008.....	65
Figure 44: Eaux de sol – Brésil LINS campagne 19/12/2007.....	66
Figure 45: Eaux de sol – Brésil LINS campagne 30/04/2008.....	66
Figure 46: Eaux de sol – Brésil LINS campagne 16/06/2009.....	66
Figure 47: Composants obtenus par PARAFAC du projet BasVar en 2008	67
Figure 48: Corrélations entre composant 3 et composant 4 (BasVar 2008)	68
Figure 49: Composants obtenus par PARAFAC du projet BasVar en 2009	68
Figure 50: Composants obtenus par PARAFAC du projet BasVar hebdomadaire en 2009	69
Figure 51: Composants obtenus par PARAFAC du projet en Bosnie en 2009	70
Figure 52: Composants obtenus par PARAFAC en provenance du projet Brésil SGC (Arcus) en 2009	70
Figure 53: Composants obtenus par PARAFAC à partir des eaux de rivières à la région Dcharg (Cameroun) 71	
Figure 54: Composants obtenus par PARAFAC des eaux de grottes de la campagne 2008	72
Figure 55: Composants obtenus par PARAFAC des eaux de grottes de la campagne 2009	72
Figure 56: Composants obtenus par PARAFAC des eaux de grottes de la campagne 2010	72
Figure 57: Composants obtenus par PARAFAC des eaux ensembles des grottes croates	73
Figure 58: Composants obtenus par PARAFAC du projet GIRAC.....	73
Figure 59: Composants obtenus par PARAFAC du projet AURORA	74
Figure 60: Composants obtenus par PARAFAC du projet Arcus de Toulon-Tunisie	74
Figure 61: Composants obtenus par PARAFAC du projet LINS au Brésil 2007.....	75
Figure 62: Composants obtenus par PARAFAC du projet LINS au Brésil 2009.....	76
Figure 63: Composants globaux obtenus par PARAFAC des EI Croates 2010-Marina	76
Figure 64: Composants globaux obtenus par PARAFAC des EI Croates 2010-Martinska.....	78
Figure 65: Composants globaux obtenus par PARAFAC des EI de la rade de Toulon.....	78
Figure 66: Composants obtenus par PARAFAC pour le milieu des eaux côtières.	83
Figure 67: Composants obtenus par PARAFAC pour le milieu des eaux de mer.	85
Figure 68: Composants obtenus par PARAFAC du milieu des eaux de sol.....	87
Figure 69: Composants obtenus par PARAFAC du milieu des eaux douces.....	89
Figure 70: Composants obtenus par PARAFAC du milieu des eaux douces.....	91
Figure 71: Composants obtenus par PARAFAC pour les eaux interstitielles de sédiment.	92
Figure 72: Composants obtenus par PARAFAC du groupe des eaux non-salées	94

Figure 73: Composants obtenus par PARAFAC du groupe des eaux salées.....	95
Figure 74: Composants obtenus par PARAFAC de toutes les MEEF.....	97
Figure 75: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour toutes les missions avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).....	100
Figure 76: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour tous les milieux avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).....	101
Figure 77: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour toutes les salinités avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).....	101
Figure 78: Zones de recouvrement PARAFAC obtenues pour l'ensemble des échantillons avec différents pourcentages du maximum d'intensité (A : 50% ; B : 40% et C : 30%).....	102
Figure 79: Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la profondeur.....	104
Figure 80: Relations contributionnelles des composants PARAFAC en fonction du traitement individuel....	105
Figure 81: Formes chimiques d'un métal dans un milieu aquatique et leurs réactions dans le système	107
Figure 82: Toxicité du cuivre dans l'eau douce pour différentes concentrations de MON	108

Annexe 2 – Liste des Tableaux

Tableau 1: Compositions élémentaires de la MON extraite par l'association IHSS	11
Tableau 2: Exemple de présentation des données de spectre 3D (Coble, 1996).....	33
Tableau 3: Tableau des missions appliquées aux mesures de MEEF	45
Tableau 4: Paramètres d'acquisition des mesures de MEEF	54
Tableau 5: Tableau des paramètres de cuve miroitée (Hellma).....	55
Tableau 6: Fluorophores et leurs participations communes dans les campagnes de grottes croates.	72
Tableau 7: Fluorophores trouvés dans chaque mission et leurs participations dans le jeu de données.	80
Tableau 8: Composition du groupe eaux côtières, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.....	82
Tableau 9: Composition du groupe eaux de mer, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.	84
Tableau 10: Composition du groupe eaux de sol, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.....	86
Tableau 11: Composition du groupe eaux douces, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.	88
Tableau 12: Composition du groupe des eaux extraites, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.	90
Tableau 13: Composition du groupe des eaux interstitielles, nombre d'échantillons et fluorescence intégrée.	92
Tableau 14: Fluorophores trouvés dans chaque milieu et leurs participations dans le jeu de données.	93
Tableau 15: Fluorophores trouvés dans chaque groupe en fonction de salinité et leurs participations dans le jeu de données.	96
Tableau 16: Composants PARAFAC correspondant à l'EI de Rade de Toulon (point 12HR).....	104
Tableau 17 : Travaux sur le quenching de fluorescence en fonction d'origine des échantillons.....	111

Annexe 3 – Tableau des références « peak –picking » et PARAFAC

Peak-picking:

Auteur	Année	Auteur	Année
Alberts & Takacs	2004	Hassouna et al.	2010
Alberts et al.	2002	Hernández et al.	2006
Baker	2001	Lapworth et al.	2008
Baker	2002	Lu & Jaffé	2001
Baker	2002	Lu et al.	2009
Baker	2005	Maie et al.	2007
Baker & Genty	1999	Manciulea et al.	2009
Baker & Spencer	2004	Mayer et al.	1999
Baker et al.	2008	Midorikawa & Tanoue	1998
Bieroza et al.	2009	Mounier et al.	2010
Bieroza et al.	2010	Parlanti et al.	2000
Boehme et al.	2004	Patel-Sorrentino et al.	2002
Burdige et al.	2004	Peiris et al.	2010
Cabaniss & Shuman	1988	Persson & Wedborg	2001
Carstea & Coble	2000	Plaza et al.	2005
Carstea et al.	2010	Provenzano et al.	2004
Chen et al.	2003	Seredynska-Sobecka et al.	2007
Coble	1996	Smith & Kramer	1999
Coble et al.	1998	Smith & Kramer	1999
Del Castillo et al.	1999	Smith & Kramer	1999
Elkins & Nelson	2001	Smith & Kramer	2000
Esteves da Silva et al.	2006	Wolfe et al.	2002
Goslan et al.	2004	Yamashita & Tanoue	2003
		Yamashita & Tanoue	2004

PARAFAC :

Auteur	Année
Baghoth et al.	2010
Banaitis et al.	2006
Chen et al.	2010
Esteves da Silva et al.	2006
Gheorghiu et al.	2010
Holbrook et al.	2006
Holbrook et al.	2006
Hunt et al.	2008
Kowalczyk et al.	2010
Lu et al.	2009
Luciani et al.	2008
Murphy et al.	2006
Murphy et al.	2008
Ohno et al.	2007
Stedmon & Markager	2005
Stedmon et al.	2003
Wang et al.	2007
Zepp et al.	2004

Annexe 4 – Posters

CHARACTERISATION OF NATURAL ORGANIC MATTER IN A DEPTH PROFILE OF THE MEDITERRANEAN SEA BY 3D-FLUORESCENCE FOLLOWED BY PARAFAC TREATMENT



H. Zhao^{1*}, G. Durrieu¹, R. Redon¹, L. E. Heimbürger², A. Dufour³ and S. Mounier¹

¹Laboratoire PROTEE - Bt R, Université du Sud Toulon Var, B.P. 20312, 83957 La Garde Cedex, France -

²Ifremer, Centre de Méditerranée, BP 330, F-83507 La Seyne-sur-Mer, France

³UPMC Univ. Paris 06 et CNRS, UMR 7093, LOV, Observatoire océanologique, F-06234, Villefranche/Mer, France



Introduction

Dissolved Organic Matter (DOM) has been studied in the central Ligurian Sea (DYFAMED site, NW Mediterranean Sea) by B. Avril (2002) following a long-lasting study of Gostan (1968). It allows us considering the hydrological and biological influences of some important factors (MEDOC group, 1970; Gascard, 1978; Béthoux and Prieur, 1983; Morel and André, 1991; Barlow et al., 1997; Send et al., 1999; Vidussi et al., 2000). According to B. Avril (2002), there is a "missing link" in the DOM global cycle, for what we have used the fluorescence spectroscopy to better understand the carbon cycle in this ecosystem. The excitation-emission matrix of fluorescence (EEM) is the most practical tool to observe the fluorescent components of DOM in different environments[#]. There are two goals in this work: (1) the comparison of DOM composition in the vertical water column for each season to understand the variations of fluorescent DOM (FDOM) quantity at different seawater depths; (2) the comparison of FDOM variations at different seasons.

Sampling description

The DYFAMED site (Dynamics of Atmospheric Fluxes in the Mediterranean Sea) is located in the central zone of the Ligurian basin (43° 25'N, 7° 52' E) in the North-western Mediterranean Sea (Fig. 1). This site is commonly used as a reference site for atmospheric inputs to an oligotrophic open-ocean water column (e.g., DYFAMED and MEDFLUX programs; see special issues Deep-Sea Research II 49, 11 (2002) and 56, 18 (2009), respectively). The offshore central zone is separated from the coast by the Ligurian current (Fig. 1), across which there is a rapid horizontal change of density (Lévy et al., 1998; Soumia et al., 1990; Niewiadomska et al., 2008). As a result, the coastal influences of the DYFAMED site should be negligible most of the time, since there are no major rivers flowing into the basin (Copin-Montégut, 1988).

Analysis method & numeric treatment

12 Niskin bottles fastened together were dived down to 2200m depth (Figure 2). Then, seawater was taken from each depth and poisoned without filtration before being stocked in darkness and low temperature in order to prevent the changes of natural organic matter (NOM).

The EEM spectra were measured by spectrofluometry HITACHI F4500 at excitation wavelengths 250-480nm and emission wavelengths 200-550nm. The intervals were both 5nm for excitation and emission wavelengths.

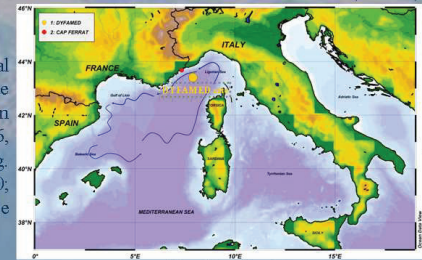


Figure 1. Sampling site



Figure 2. Sampling System

We used the parallel factors analysis (PARAFAC) to mathematically treat EEM signals, which leads to separate different fluorescent compounds, to discover some "hidden" peaks and to arrange these components in an order corresponding to the analyzed environment^{###}. Besides, PARAFAC helps comparing the estimated concentrations among total samples.

Results

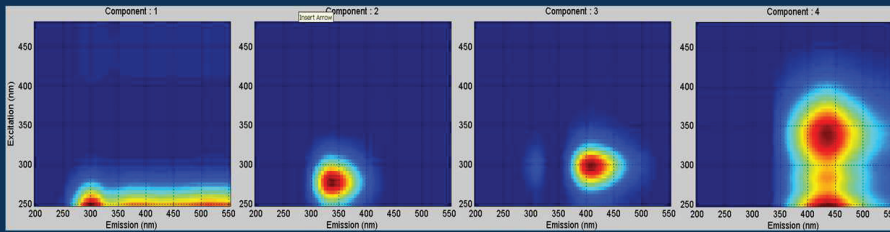


Figure 3. 4 fluorescent components of NOM found by PARAFAC

4 fluorescent components among 119 seawater samples have been found out by PARAFAC. The decomposition has been done after removing Rayleigh and Raman scattering as well as treating inner filter effect (X. Luciani et al., 2008).

Component 1 has expressed a protein-like component, Peak B ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=250\text{nm}/300\text{nm}$, probably tyrosine group) and a part of numerical filtration signals, while component 2 shows an identified protein-like component, Peak T ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=280\text{nm}/340\text{nm}$, presenting tryptophan group). Component 3 is often considered as a marine humic-like fluorophore, Peak M ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=295\text{nm}/410\text{nm}$), though some recent experiments have shown it is rather terrestrial (X. Luciani et al., 2008). Component 4 contains 2 peaks identified as Peak C (above, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=335\text{nm}/430\text{nm}$) and Peak A (below, $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}=230\text{nm}/430\text{nm}$)

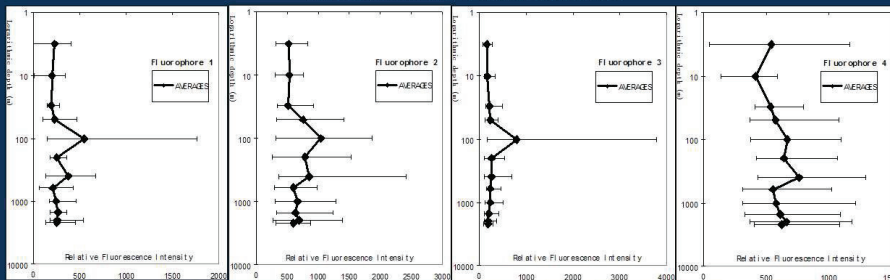


Figure 4. Fluorescence intensity averages and their minimal deviation VS. logarithmic depth profile for 4 fluorescent components.

In order to better understand the dynamical changes in the aquatic ecosystem, depth profiles were transformed to logarithmic ones, which makes the surface data clearer. The 4 fluorophore averages among different sampling seasons all show an increase towards deeper sea. Component 1 and 3 both show maximal average at 100m, while component 2 at nearly 400m. It is different from most carbon results that show maxima often at surface of seawater column. Component 4 was mostly homogenous throughout the whole year, although the major differences appeared at surface.

The fact that the averages are close to the minimal data tells a dynamical change just in one season of the year (Figure 4).

Discussions

Trying to find out the moving trends of NOM, we have drawn the Figure 5, which shows seasonal fluorescence intensity averages in 3 profile levels (surface from 0 to 100m in blue curve, middle level from 100 to 400m in pink curve and deep water column from 400 to 2200m in yellow). Component 1 stayed at surface in the spring months. In April and May, component 1 was the most concentrated in the middle level. Less proportion in surface was found out, though the least in the deep water column (400-2200m). It seems that this component went deeper in summer, because the value importance in deep water column increased from June. The increase lasted during 3 months. In August, the fluorescent component 1 took the biggest proportion in the deep water column, while it fluoresced the least in the middle level. This is probably due to the better protein consumption by living organisms. Besides, because of the increasing sunshine in summer, important water vaporization allows a salinity augmentation, which could push the living organisms to dive down. However, the relative fluorescence intensity was still behind the highest value in the middle level in spring, generally giving the bioactivities difference among the seasons. In September, component 1 became homogenous in the whole seawater column perhaps because of diving phenomenon of some fluorescent NOMs. Component 3 has showed a dynamically increasing signal in deep water column in October, although most of its changes among the different profile levels were similar to that of component 1. However, relative concentration of fluorescent component 3 stayed rather stable at surface from June to November. Component 2 changed much between April and July. Maximal signal in June has been found in the following month both for middle level and deep water column. It can be due to NOM deposition towards depth profile. It was confirmed by the relative component concentration importance which in deep water column was the highest in August. This deposition phenomenon appeared for all components but the corresponding speeds from middle level to sea floor were not the same (component 1 lasted 1 month during August, component 2 lasted 2 months from August to September, component 3 lasted 3 months from August to October as well as component 4), according to the duration of relative maximal concentration in deep water column. Another commune phenomenon is the increasing component concentration proportion at surface in November, which tells a stability reconstruction of NOM in the whole seawater column.

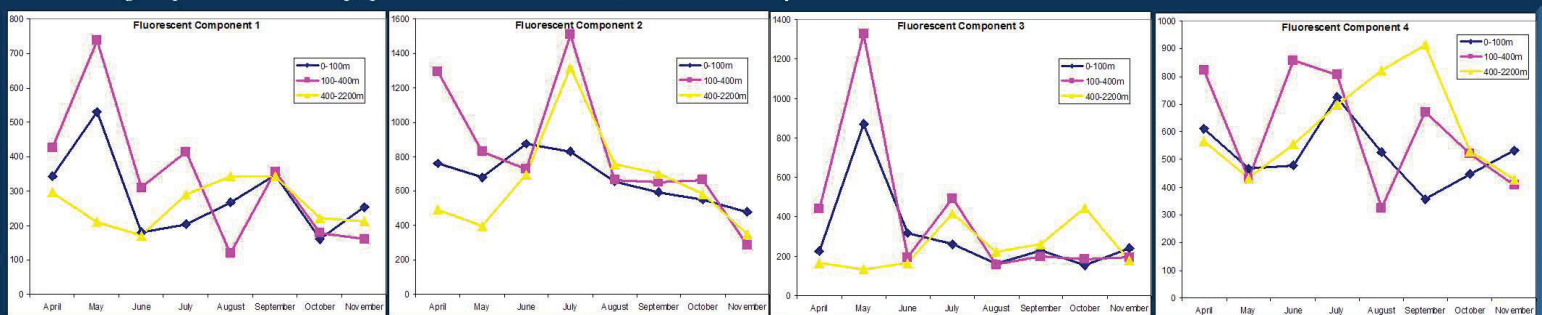


Figure 5. Seasonal modification of fluorescent components in different seawater levels.

Conclusion

NOM in seawater can be studied by the fluorescence technique coupled with the PARAFAC decomposition analysis. The components found out are close to some identified fluorophores. This method allows comparing the samples with the entire EEMs for all samples, so that information is totally completed. The NOM dynamical change in the Mediterranean Sea is important and the fluorescent elements are present rather in the depth 100m to 400m than at surface. This can be due to NOM bioactivity in various conditions.

*P.G. Coble, 1996; S. Mounier et al., 1999; Del Castillo et al., 1999; A. Baker, 1999, 2002, 2004; S. Nagao et al., 2003; R. Jaffe et al., 2004; D.J. Burdige, 2005

**R. Bro and H.A.L. Kiers, 2003; C.A. Stedmon et al., 2003; R.G. Zepp et al., 2004; C.A. Stedmon and S. Meriläager, 2005; R.M. Cory and D.M. McInright, 2006; M.R. Baranits et al., 2006; R.D. Holtbrook et al., 2006; X. Luciani et al., 2008; D.R. Murphy et al., 2008

Analyse de la matière organique naturelle dans l'écosystème de nappe du Var par matrices d'excitation et d'émission de fluorescence traitées par PARAFAC

H. Zhao^{1*}, C. Potot², G. Durrieu¹, R. Redon³, S. Mounier¹

¹ Equipe CAPTE (Chimie Analytique et Processus de Transferts dans l'Environnement, <http://protee.univ-tln.fr/capte/AccueilCapte.html>)

Laboratoire PROTEE - Bâtiment R, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, 83957 LA GARDE Cedex

² Laboratoire de Radiochimie Sciences Analytiques et Environnement (LRSAE), <http://www.unice.fr/lrsae/>

UMR Sciences - Parc Valrose - UFR Sciences - Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2

³ Equipe ISO (Instrumentation en Spectroscopie et Optique, <http://protee.univ-tln.fr/iso/AccueilIso.html>)

Laboratoire PROTEE - Bâtiment R, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, 83957 LA GARDE Cedex



Introduction

La matière organique naturelle (MON) dans les nappes entourant fleuve Var a été mise en étude depuis l'année 2008. Suite à l'analyse du carbone organique dissous (COD), il est nécessaire de détailler la composition de la MON dans cet écosystème particulier. Grâce aux caractères optiques de la MON, les matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) sont obtenues pour mieux comprendre la composition la MON fluorescente. Un nouvel outil mathématique "Parallel Factors Analysis" (PARAFAC) est appliqué dans cette analyse de spectres fluorescents.

Site d'analyse

Le Var, un fleuve important dans la région Provence Alpes Côtes d'Azur (PACA), représente un grand volume d'eau par an qui se présente comme une source d'eau la plus importante pour le département Alpes-Maritimes où se situent les grandes villes de Nice, Cannes et Monaco. A cause des différentes conditions environnementales formées autour du fleuve et de la nappe, des échanges entre les eaux du fleuve, les sources et la nappe peuvent influencer la qualité et le caractère de l'eau rejetée dans la mer méditerranéenne. L'intérêt de cette étude est de distinguer ces masses d'eau.

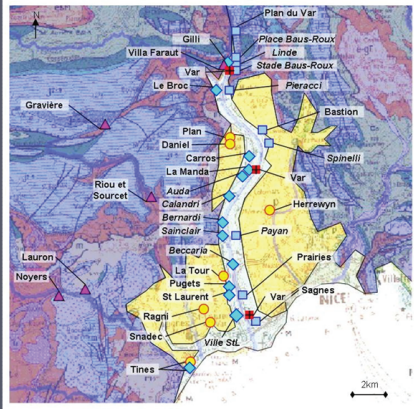


Fig. 1. Site de prélèvements

Séparation des composants fluorescents par PARAFAC

La technique de fluorescence permet d'analyser la MON fluorescente grâce aux propriétés optiques des fluorophores^{1,2,3}. Des matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) ont été traitées par le logiciel de modélisation PARAFAC (Parallel Factor Analysis) par séparer les composants initiaux dans les MEEF obtenues pour des échantillons expérimentaux. La Figure 2 montre 4 composants fluorescents trouvés par PARAFAC^{4,5}.

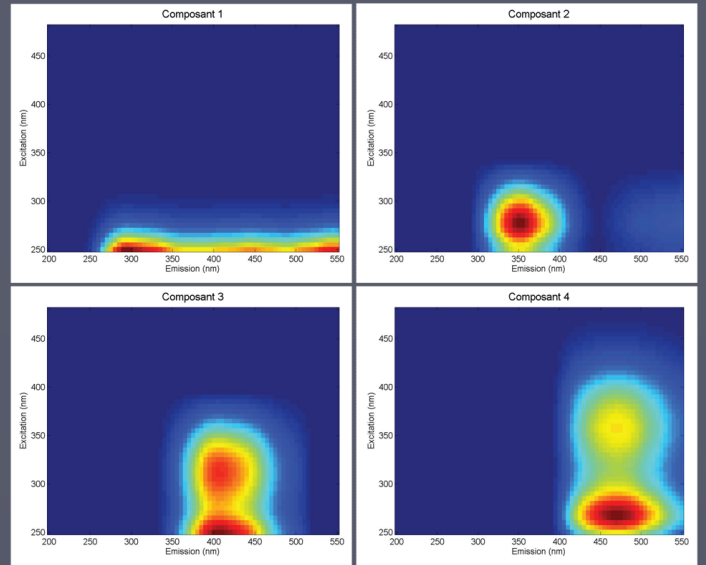


Fig. 2. Composants fluorescents trouvés par PARAFAC sur l'ensemble de MEEF. Composant 1: connu comme filtration des bruits, Composant 2: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=273nm/34nm$, pic T-fluorophore protéiné-like, Composant 3: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=305nm/405nm$ et $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=230nm/450nm$, pic M et pic de la substance humique-like en UV, fluorophore des substances humiques-like, Composant 4: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=355nm/460nm$ et $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=265nm/460nm$, pic O et pic A, fluorophore des substances humiques-like.

Comparaison des résultats

La participation se varie beaucoup même pour des points de prélèvement situé à petite distance. Ceci montre des échanges rapides qui se produisent entre le fleuve et la nappe. Il faut remarquer que la concentration des fluorophores est toujours plus importante dans le fleuve que dans la nappe. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que la direction du courant est plutôt du fleuve vers la nappe. En même temps, une "filtration" créée probablement par le lit du fleuve et les roches minérales peut expliquer modification de la concentration de MOND. Ce qui est assez surprenant, c'est que la nappe est plus influencée par les affluents qui se jettent dans le fleuve que par le fleuve lui-même.



Fig. 3. Concentration de carbone (colonne 1), quantités de 3 principaux composants fluorescents (colonnes 2 à 4), relation entre 4 composants et la concentration de carbone (colonne 5) et relation entre composant 3 et composant 4 (colonne 6) dans 3 campagnes 2008. Composant 1 est totalement indépendant du COD ; Composant 2 reste stable indépendamment de la variation de COD ; C3 et C4 varient directement vis-à-vis du COD, mais avec différents facteurs de réponse. La proportion de C3 et C4 dans le COD est variable selon différentes saisons : 50,4% de C3 et 35,7% de C4 en Janvier, très semblable à la quantité trouvée en Mars (C3 : 57,2% et C4 : 40,3%), mais différente de celle du mois de Mai (C3 : 50,4% et C4 : 15,6%). En effet, C4/C3 a modifié de 0,6073 en Janvier et 0,6047 en Mars à 0,8425 en Mai.

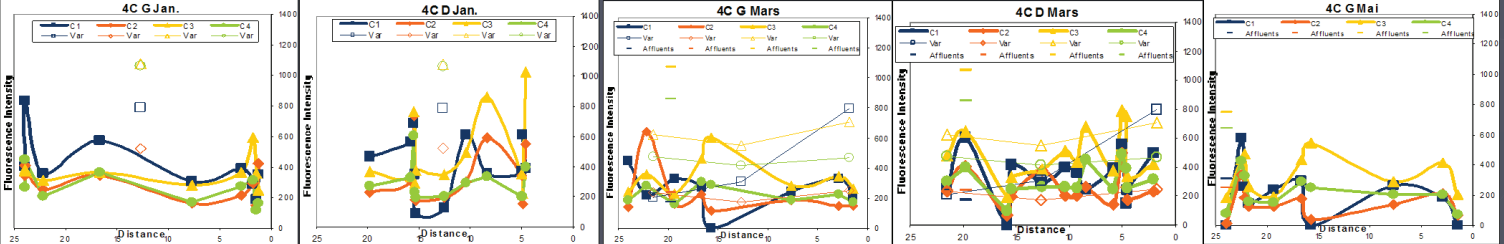


Fig. 4. Comparaison des 4 composants dans la nappe, le fleuve et les affluents.

Conclusion

Grâce à la décomposition des spectres de MEEF par PARAFAC, les composants fluorescents de la MOND correspondants à un environnement naturel sont suivis. Cette observation nous permet de quantifier et caractériser la MOND dans la nappe du Var. L'échange de l'eau entre la nappe, les effluents et le fleuve est évident. La nappe porte souvent la concentration de MOND plus faible que deux autres milieux. La distance du point de prélèvement à la mer n'influence pas sur la composition de la MOND. 2 composants varient proportionnellement par rapport du COD. Le rapport direct entre les substances dites marines et les substances terrestres est une nouvelle découverte qui peut prouver le doute sur l'origine des substances dites marines. La variation de la valeur de ce rapport a présenté une évolution saisonnière de la MOND.

* References: 1. Cole A, Stedmon, Stig Markager, Rasmussen B., Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. 2005, *Marine Chemistry*, 92 pp 239-254
2. K.R. Murphy, Colin A. Stedmon, T. D. White, Gregory M. Ruiz, Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. 2006, *Marine Chemistry*, 100 pp 40-56
3. Paula G. de Sá, 1998, Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. 1998, *Marine Chemistry*, 61 pp 235-246
4. X. Luciani, S. Mounier, H.M. Paragrett R. Redon, V. Lucas, A. Bais, L.O. Luciani, M. Raynaud, M. Ripert, Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices. 2006, *Marine Environmental Research*, 65 pp 148-157
5. X. Luciani, S. Mounier, R. Redon, A. Bais, A simple correction method of marine filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition. 2009, *Chromatographia and Intelligent Laboratory Systems*, 95 pp 227-238

Characterization of natural organic matter (NOM) in Krka River (Croatia) by PARAFAC treatment of total luminescence spectra



PARAFAC treatment of total luminescence spectra

H. Zhao¹, R. Redon¹, C. Garnier¹, I. Dizeta², S. Mounier¹

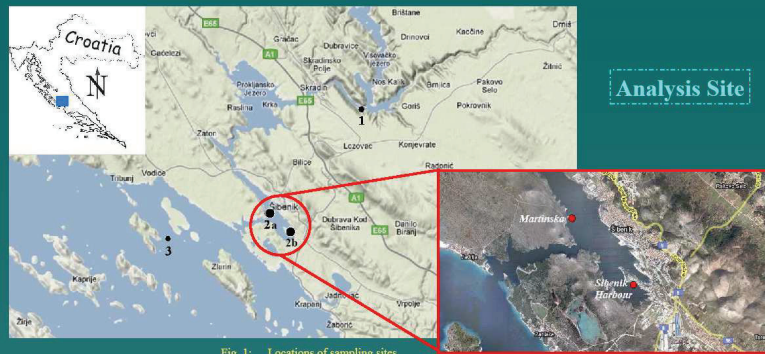
¹ Laboratoire PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP20132, 83957 La Garde cedex, France

² Ruder Bošković Institute, Bijenička 54, HR-10000 Zagreb, Croatia



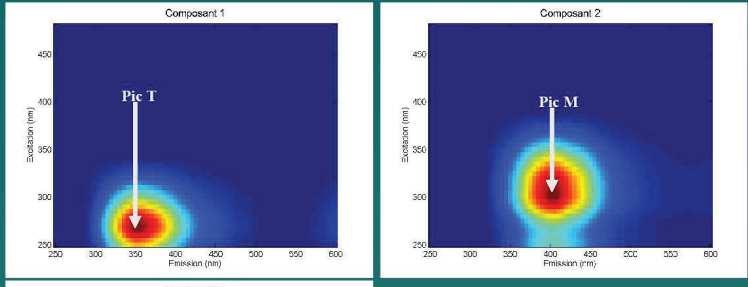
Introduction

Studies of natural organic matter (NOM) is taken in the Krka River Estuary from the year 2008. Dissolved organic matter (DOM) quantity and its character were analyzed by the fluorescence in low carbon concentration. However, the complexity of the fluorescence spectrum signals always leaves some doubts. Parallel Factors Analysis (PARAFAC) can solve the uncertainty of fluorescence spectrum by a mathematical degradation of spectra signals.



Analysis Site

Fig. 1: Locations of sampling sites
 Point 1 (GPS coordinates: 43° 48'12.42 N, 15° 58'18.48 E) in the Krka River before the waterfall, which represents the fresh water inflowing into the sea.
 Point 2a (GPS coordinates: 43° 44'07.92 N, 15° 52'39.61 E) near the scientific marine station "Martinska", Ruder Bošković Institute located in front of Šibenik town corresponds to a mixture site of river freshwater and seawater. Point 2b (GPS coordinates: 43° 43'09.73 N, 15° 53'57.04 E) is a tourist site presenting many human activities.
 Point 3 (GPS coordinates: 43° 42'44.88 N, 15° 47'43.98 E) out of the direct influence of the estuary is an comparison site like Point 1.1 - Freshwater sample of Krka River, 2 - Depth profile samples (Krka River estuary), 3 - Seawater sample.



Separation Results by PARAFAC

Fig. 2: Fluorophores components found by PARAFAC
 Fluorophore 1 presents a peak corresponding to the Peak T (tryptophan-like fluorophore group, Stedmon et al., 2003 and 2005) at excitation wavelength 275nm and emission wavelength 350nm.
 Fluorophore 2 corresponds to the peak M (marine humic substance group, Coble 1996) with 290nm excitation wavelength and 390nm emission wavelength.
 Fluorophore 3 in the low excitation wavelengths considered as noisy intensity (not presented).
 Fluorophore 4 represents two peaks at 322 nm and 269 nm excitation wavelengths with both emission wavelengths from 436 which are known as fulvic acid fluorophore group (Peak C) and humic acid fluorophore group (Peak A) (Coble 1996).

Aquatic ecosystem is impacted by development and activities of human-beings. Krka River is a natural Croatian stream preserved from human pollution. The Krka River is one of the least polluted rivers in the world thanks to its natural environment (Cukrov et al., 2008). It is also one of the freshwater resources of Mediterranean Sea. The Krka River is a medium sized non-contaminated river of 49 km of length with an average flow measured over the last 50 years varying between 40 and 60 m³ s⁻¹ (Bonacci et al., 2006).

Comparison Results

Samples (6 original samples, 6 diluted ones for March 2008; 6 samples, 6 diluted for July 2008 and 12 samples, 12 diluted for July 2009) have been collected on a depth profile depending to salinity changes where two layers, one of freshwater and one of seawater are separated by a mixing fringe (Žutić and Legović, 1987; Svensen et al., 2006). Each sample is filtered on a burned fiber glass filter and analyzed for total luminescence spectroscopy. Analysis of NOM at different salinities has been taken place. Comparisons was done to better understand the function of this aqua ecosystem.

3D-Fluorescence measurement has become a popular technique because of its sensibility for fluorescent NOM in natural concentration. A total excitation-emission matrix (EEM) was made with an Hitachi F4500 for excitation wavelengths from 200 to 500nm and emission wavelengths from 250 to 600 nm. Emission and excitation slits were fixed at 5 nm and scan speed was 2400 nm/min. Parallel Factors Analysis (PARAFAC) is a powerful statistical technique to treat the 3D-fluorescence spectra (Stedmon et al., 2003 and 2005). All EEM spectra were processed in order to remove the Rayleigh and Raman scattering peaks.

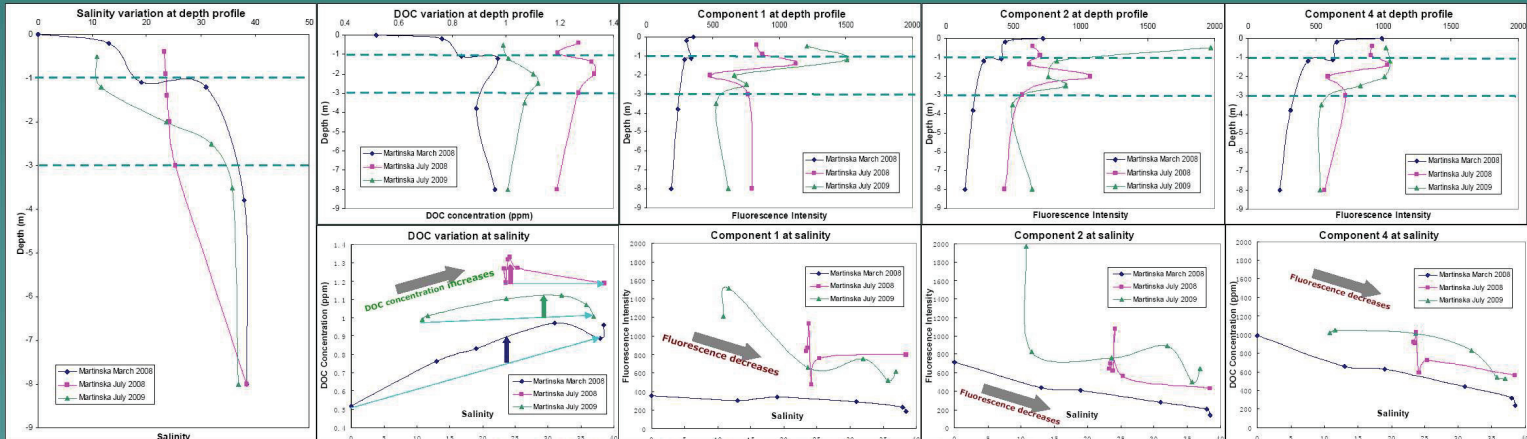


Fig. 3: DOC and Fluorescence Intensity Comparisons of Martinska results among three season periods

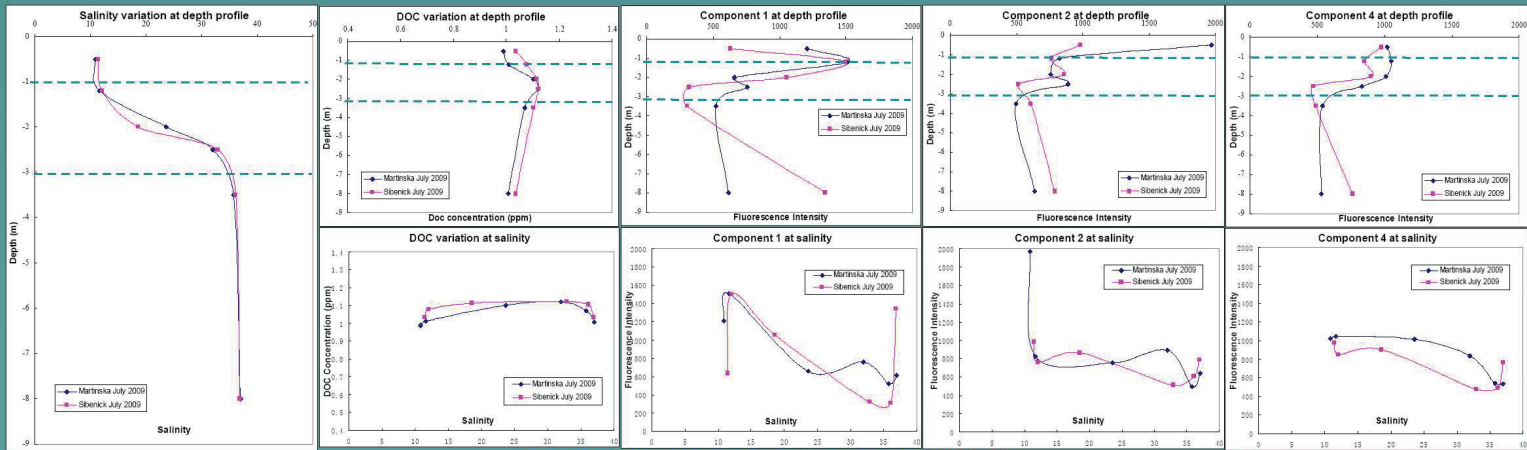


Fig. 4: DOC and Fluorescence Intensity Comparisons between Martinska and Šibenik results

Conclusion

The separation of NOM composition by PARAFAC analysis of EEM spectra permits us to clearly observe the corresponding components in the samples. By using total EEM spectra measurement on Krka river samples at different depths, a natural dilution at the mixing layer was shown, which is opposite of the DOC concentration. A great element exchange between terrestrial substances and marine substances has presented between the depth -1m and -2m, even though the fluorescent organic matter changed not totally as DOC concentration. The fluorophore presenting the peak M were considered as marine humic substances. But a diminution of fluorescence intensity in the depth profile and in the salinity augmentation showed that the peak M is not specially in the marine ecosystems. The human activities have not been greatly declined in the DOC concentration, though fluorescence intensity has shown some great difference between Martinska samples and Šibenik samples, specially for the protein-like fluorophore in this aqua-ecosystem.

* References:
 N. Gušon, P. Črnak, M. Mlakar, D. Črnarović, 2008, «Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia. An example of the self-purification», *Chemosphere*, 72 pp. 1568-1598
 D. Buncarić, D. Jukić, L. J. Jurešić, 2008, «Definition of catchment area in east coast of the river Krka and Krka, Croatia», *Journal of Hydrological Sciences*, 51 pp. 602-609
 E. Elwood-Jones, D. M. Guay, J. M. Martin, 1991, «Trace metal behavior in a high-salinity Mediterranean estuary: the Krka, Yugoslavia», *Marine Chemistry*, 32 pp. 211-224
 V. Žutić, T. Legović, 1987, «A film of organic matter at the fresh-water/sea-water interface of an estuary», *Marine*, 328 pp. 612-614
 C. Svensen, D. Vilhoj, P. Wassmann, E. Arnskov, T. Raskova, 2008, «Partition distribution and vertical flux of biogenic matter during high summer stratification in the Krka estuary (Eastern Adriatic)», *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 71 pp. 381-390
 C. Stedmon, S. Munksgaard, S. Munksgaard, 2003, «Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy», 2003, *Marine Chemistry*, 82 pp. 235-254
 K.R. Murphy, C. Stedmon, T. David Waite, Gregory W. Ruiz, «Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy», 2006, *Marine Chemistry*, 108 pp. 40-48

MESAEP-15th International Symposium on Environmental Pollution and its Impact on Life in the Mediterranean Region with focus on Environmental Threats in the Mediterranean Region, Problems and Solutions, Part 1, July 7-11 October 2009

Annexe 5 – Tous les traitements PARAFAC