



**HAL**  
open science

# Influences de l'oxydation et de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de l'argile oligocène de Boom (Mol, Belgique) : Conséquences sur la formation d'espèces organiques hydrosolubles

Pascale Blanchart

► **To cite this version:**

Pascale Blanchart. Influences de l'oxydation et de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de l'argile oligocène de Boom (Mol, Belgique) : Conséquences sur la formation d'espèces organiques hydrosolubles. Sciences de la Terre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL108N . tel-01749442

**HAL Id: tel-01749442**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749442v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Nancy-Université  
INPL



## Institut National Polytechnique de Lorraine

---

Laboratoire G2R : Géologie et Gestion des Ressources minérales et énergétiques UMR 7566

SCK-CEN: StudieCentrum voor Kernenergie · Centre d'Etude de l'énergie Nucléaire

Ecole doctorale RP2E: Ressources, Produits, Procédés, Environnements

### Thèse

*Présentée pour l'obtention du titre de*

### Docteur de l'INPL en Géosciences

*par*

**Pascale BLANCHART**

## **INFLUENCES DE L'OXYDATION ET DE LA BIODEGRADATION ANAEROBIE SUR LA MATIERE ORGANIQUE DE L'ARGILE OLIGOCENE DE BOOM (MOL, BELGIQUE): CONSEQUENCES SUR LA FORMATION D'ESPECES ORGANIQUES HYDROSOLUBLES**

Soutenance publique le 13 décembre 2011

#### **Membres du jury :**

Mme Isabel Suarez-Ruiz	Directrice de recherche INCAR	Rapporteur
M. Pierre Adam	Directeur de recherche CNRS UMR 7177	Rapporteur
Mme Edith Parlanti	Chargée de recherche, CNRS UMR 5805	Examineur
M. Yoann Copard	Maître de conférences, Université de Rouen	Examineur
M. Guillaume Echevarria	Professeur, INPL, UMR 1120 INRA	Examineur
M. Raymond Michels	Chargé de recherche, CNRS UMR 7566	Directeur de thèse
M. Pierre Faure	Chargé de recherche, CNRS UMR 7566	Co-directeur de thèse
M. Christophe Bruggeman	Directeur de recherche SCK-CEN	Co-encadrant industriel
Mme Mieke De Craen	Directrice de recherche SCK-CEN	Invitée



## AVANT-PROPOS

L'ensemble de ces travaux ont été effectués, à la fois, au sein du laboratoire de géochimie organique de l'Unité Mixte de Recherche 7566 G2R à Nancy et au laboratoire du SCK-CEN (StudieCentrum voor Kernenergie-Centre d'Etude de l'énergie Nucléaire, Belgique). Je remercie les directeurs successifs du laboratoire G2R Michel Cathelineau, puis Jacques Pironon, de m'avoir acceptée au sein de leur unité pour réaliser cette thèse.

Cette recherche a été entièrement financée par le SCK-CEN ; je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à toute l'équipe du SCK-CEN pour m'avoir aidée et encadrée lors de mes séjours en Belgique. En particulier, je remercie Mieke de Craen et Christophe Bruggeman pour leur accueil chaleureux en Belgique, leur disponibilité et leurs réponses pertinentes à l'ensemble de mes questions ; je pense aussi à Hugo Moors qui a pris le temps de m'expliquer les mystères des bactéries sulfato-réductrices et à Louis qui m'a beaucoup aidée lors des manipulations en boîte à gants.

Evidemment, je n'oublie pas de remercier très chaleureusement mes deux directeurs de thèse, Raymond Michels et Pierre Faure, pour leur soutien, leur confiance et leur regard critique sur mon travail.

Je tiens à remercier également les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail: Mme Isabel Suarez-Ruiz et M. Pierre Adam qui ont bien voulu le juger en tant que rapporteurs, Mme Edith Parlanti, M. Yoann Copard et M. Guillaume Echevarria qui ont accepté de l'examiner.

Je remercie aussi tous les membres du G2R ainsi que les autres membres des laboratoires nancéens que j'ai pu croiser durant cette recherche, en particulier :

Régine Ruck pour son aide relative à la DRX et sa bibliographie sur les argiles

Stéphane Parant qui a analysé patiemment tous mes échantillons en fluorescence 3D

David Billet du LIMOS pour les analyses de COD.

Un grand merci à Christine Léonard et Marie-Odile Campadiou pour tous les services administratifs et à Patrick Lagrange pour son aide à la mise en page, les trucs et astuces de Word et Adobe ainsi que les moments de bonne humeur !

Ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est sans, bien sûr, le support de l'équipe géochimie organique : une mention spéciale à Gilles pour tous les petits bricolages et les discussions sur tout et n'importe quoi autour du café (beaucoup trop fort), à Aurélien pour avoir joué l'homme fort du labo (il en faut bien un...), à Sabrina pour sa bonne humeur et sa vie en

rose, à Catherine pour ses coups de main en fin de thèse et bien sûr à la PhD team : Coralie, Thierry, Olivia, Fatima, Yueming et Phuc. Une dédicace particulière à Seyed et ses gâteaux d'Iran (avec lui, on grossit avec plaisir...) et aux squatteurs du LCPME, Oriane et Momo (merci pour les traductions franco-anglo-pakistanaïses de dernière minute). Une pensée pour Nadia qui a eu la « chance » de partager mon bureau ces 10 derniers mois.

Pour finir, un grand merci à ma famille ! Malgré les hauts et les bas, c'est grâce à eux que j'en suis là ! Merci de votre soutien, de ne pas avoir baissé les bras lors des moments critiques et de m'avoir permis d'aller aussi loin dans mes études. Une mention spéciale à ma mère qui a passé des soirées à corriger mes fautes d'orthographes et aussi pour son regard très extérieur sur mon travail : « là ta phrase, elle ne veut rien dire ...»!

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.  
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.  
Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne ... et personne ne  
sait pourquoi ! »*

Albert Einstein



## RESUME

Dans le contexte de l'étude de la faisabilité de stockage de déchets nucléaires en couche géologique profonde, il est important d'évaluer les conséquences du creusement de galeries sur les propriétés de la roche encaissante. Parmi les fractions susceptibles d'être affectées par l'excavation, la matière organique (MO) est connue pour être particulièrement réactive. C'est pourquoi, ce travail de thèse porte sur l'étude des conséquences des perturbations, induites par l'excavation, sur la matière organique fossile de la formation géologique de Boom (Belgique). Il cible, en particulier, les effets d'oxydation à l'air et de biodégradation anaérobie sur la MO.

Cette formation géologique a été étudiée, car elle est identifiée par le Centre d'Etude Nucléaire de Belgique (SCK-CEN) comme un éventuel site de stockage et fait, actuellement, l'objet d'études dans le laboratoire souterrain de Mol. Les implications liées à une formation potentielle d'espèces organiques hydrosolubles ont été particulièrement ciblées, car le suivi des eaux issues de piézomètres placés sur le site semble indiquer des perturbations induites par la mise en place des galeries.

Les travaux portant sur les effets de l'oxydation à l'air ont combiné à la fois des suivis expérimentaux (série artificielle) et des études sur des échantillons altérés *in situ* (série naturelle) dans les galeries du laboratoire souterrain. Ils ont ciblé le kérogène, la fraction organique extractible aux solvants (MOE) et la fraction hydrosoluble (MOD).

La confrontation des données des séries, artificielle et naturelles, révèle, dans un premier temps, que nos simulations expérimentales sont représentatives des processus ayant lieu dans les galeries. Ces travaux démontrent que l'oxydation à l'air induit (i) une augmentation importante de la quantité de MOD et (ii) une modification majeure de la chimie de la MOE et de la MOD caractérisée par la formation de molécules oxygénées de faible poids moléculaire. Par ailleurs, l'étude comparative des eaux issues des échantillons altérés avec celles prélevées dans les piézomètres du site démontre que ces dernières ne sont pas affectées par des processus d'oxydation et sont comparables aux eaux issues des échantillons sains.

La biodégradation anaérobie par des bactéries sulfato-réductrices a été étudiée afin d'évaluer les conséquences d'une oxydation préalable de la roche encaissante suivie d'une isolation par « autosealing » des parois des galeries. Des expériences de biodégradation menées sur des argiles saines et préalablement oxydées artificiellement n'ont montré aucune évolution significative de la matière organique fossile (MOE et MOD). Il semble, donc, que la biodégradation anaérobie ne soit pas un processus dominant dans le contexte des perturbations induites par les excavations.

L'ensemble de ces travaux confirme la forte réactivité de la MO vis-à-vis de l'oxydation à l'air ; ils démontrent aussi que, dans le contexte du laboratoire de Mol, les eaux du site ne sont pas, pour le moment, affectées.

**Mots clefs :** *matière organique ; formation de Boom ; matière organique hydrosoluble ; oxydation ; biodégradation anaérobie ; stockage de déchets nucléaires.*



## ABSTRACT

In the context of studying the feasibility to store radioactive waste in the geological disposal, it is important to assess the consequences of galleries excavation on the properties of the host rock. Organic Matter (OM) is known for being particularly reactive among fractions susceptible to get affected by the excavation. Therefore, this work deals with studies about the consequences of excavation-induced disturbances on the fossil organic matter of geological formation of Boom Clay (Belgium). The particular focus of this study is the effects of air oxidation and anaerobic biodegradation on the OM.

This geological formation was focused because it is identified by the Nuclear Research Centrum of Belgium (SCK-CEN) as a possible storage site and *in situ* experiments are performed in the underground laboratory of underground of Mol. The monitoring of piezometers waters at the site suggests that the disturbances are induced by the excavation of the galleries.

The experiments dealing with the effects of air oxidation have combined studies of artificial oxidized samples (artificial series) and samples altered in the gallery of the underground laboratory (natural series). These experiments focus on the Kerogen, organic fraction extractable by organic solvent (EOM) and water-soluble fraction (DOM).

The comparison of data from artificial and natural series shows firstly that our experimental simulations are the representative of processes taking place in the galleries. These studies show that air oxidation induced (i) a significant increase in the amount of DOM and (ii) a major change in the chemistry of the EOM and DOM characterized by the formation of low molecular weight oxygenated molecules. Moreover, comparison between water extracted from altered samples and piezometers shows that the water of the site is not affected by oxidation processes. The piezometer water samples are similar to that extracted from non-altered samples.

Anaerobic biodegradation by sulfate-reducing bacteria was studied to assess the consequences of preliminary oxidation of the host rock followed by auto-sealing of galleries walls. Biodegradation experiments conducted on non altered and artificially oxidized clay did not show significant changes of fossil and dissolved organic matter. It seems that anaerobic biodegradation is not a major process in the context of disturbances induced by the excavation.

All these studies confirm the high reactivity of OM toward the air oxidation, but show that in the context of the Mol laboratory, the water samples of the site are, currently, not affected.

**Keywords:** *organic matter; Boom Clay; water-soluble organic matter; oxidation; anaerobic biodegradation; geological disposal; storage of nuclear wastes.*



## LISTE DES ABREVIATIONS

**APPI-QToF** : Photo Ionisation à Pression Atmosphérique-Quadripôle à Temps de vol  
**BSTFA** : N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide  
**CE** : Control Experiment  
**COT** : Carbone Organique Total  
**COD** : Carbone Organique Dissous  
**CPI** : Carbon Preference Index  
**DAD** : Détecteur à barrette de Diode  
**DCM** : Dichlorométhane  
**EEM** : Matrice d'Excitation et d'Emission  
**FLD** : Détecteur de Fluorescence  
**GC-MS** : couplage Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse  
**HADES** : High Activity Disposal Experimental Site  
**HPLC-SEC** : Chromatographie Liquide à Haute Pression-Chromatographie d'Exclusion Stérique  
**IH** : Indice d'hydrogène  
**IO** : Indice d'oxygène  
**IRTF** : spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier  
**MeOH** : Méthanol  
**MO** : Matière Organique  
**MOD** : Matière Organique Dissoute  
**MOE** : Matière Organique Extractible (aux solvants organiques usuels)  
**MOP** : Matière Organique Particulaire  
**MOT** : Matière Organique Totale  
**OC** : Oxidized Clay  
**Pr** : Pristane  
**PC** : Pristine Clay  
**Ph** : Phytane  
**PyGC-MS** : couplage Pyrolyse flash-Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse  
**Rapport LMW/HMW** : rapport des molécules de bas poids moléculaire sur les molécules de haut poids moléculaires ( $\sum (C_{n<21}) / (\sum (C_{n>20}))$ )  
**SBCW** : Synthetic Boom Clay Water  
**THM-GC-MS** : couplage Pyrolyse flash-Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse après méthylation *in situ*  
**TMAH** : Tetra-methyl-ammonium hydroxyde



## SOMMAIRE

<b>Introduction Générale</b> .....	<b>01</b>
<b>Chapitre 1: La matière organique sédimentaire : définitions, description et évolution</b> .....	<b>09</b>
<b>1.1. LE KEROGENE</b> .....	<b>15</b>
1.1.1. Définitions .....	15
1.1.2. Classification du kérogène.....	16
<b>1.2. LES DIFFERENTS BIOMARQUEURS DE LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE</b> .....	<b>17</b>
1.2.1. Les hydrocarbures .....	17
1.2.1.1. Les <i>n</i> -alcanes .....	17
1.2.1.2. Les iso-alcanes.....	18
1.2.1.3. Les terpénoïdes .....	19
<b>1.2.1.3.1. Les monoterpénoïdes</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.1.3.2. Les sesquiterpénoïdes</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2.1.3.3. Les diterpénoïdes</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2.1.3.4. Les sesterterpénoïdes</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2.1.3.5. Les triterpénoïdes</b> .....	<b>21</b>
1.2.1.3.5.1. Les hopanoïdes .....	21
1.2.1.3.5.2. Autres triterpénoïdes pentacycliques .....	24
1.2.2. Les stéroïdes .....	25
1.2.3. Les biomarqueurs aromatiques.....	27
1.2.4. Les lipides acycliques.....	27
1.2.4.1. Les acides gras .....	28
1.2.4.2. Les alcanols.....	28
1.2.5. La lignine et ses dérivés.....	29
<b>1.3. LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUE</b> .....	<b>31</b>
1.3.1. Définitions .....	31
1.3.2. Les substances non humiques .....	32
1.3.2.1. Les glucides.....	32
1.3.2.2. Les acides aminés et les protéines .....	33
1.3.2.3. Les tanins.....	33
1.3.3. Les substances humiques .....	33
1.3.3.1. Définitions .....	33
1.3.3.2. Compositions élémentaires.....	35
1.3.3.3. Les modèles structuraux .....	36
<b>1.3.3.3.1. Le modèle polymérique</b> .....	<b>36</b>
<b>1.3.3.3.2. Le modèle micellaire</b> .....	<b>37</b>
<b>1.3.3.3.3. Le modèle supramoléculaire</b> .....	<b>37</b>
1.3.3.4. Propriétés .....	38
<b>1.4. EVOLUTION DE LA MATIERE ORGANIQUE FOSSILE</b> .....	<b>38</b>
1.4.1. La biodégradation de la matière organique fossile .....	39

1.4.1.1.	La biodégradation de la MOE .....	39
1.4.1.2.	La biodégradation de la matière organique dissoute fossile .....	42
1.4.1.3.	Contrôle de la biodégradation de la matière organique fossile .....	42
1.4.1.3.1.	<b>Contrôle de la biodisponibilité de la MO</b> .....	43
1.4.1.3.2.	<b>Contrôle de la biodégradabilité de la MO</b> .....	44
1.4.1.3.2.1.	<i>Les paramètres intrinsèques de la MO</i> .....	44
1.4.1.3.2.2.	<i>Les propriétés du sol, du sédiment ou du réservoir et de la solution de culture</i> .....	45
1.4.2.	<i>Evolution de la matière organique dans les bassins sédimentaires</i> .....	45
1.4.2.1.	La diagenèse précoce .....	46
1.4.2.2.	Les phases de la maturation thermique .....	47
1.4.3.	<i>L'oxydation de la matière organique fossile</i> .....	49
1.4.3.1.	L'oxydation naturelle ou « weathering » .....	49
1.4.3.2.	L'oxydation artificielle .....	50
1.4.3.3.	Rôle des phases minérales .....	51
<b>1.5.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>52</b>
<b>1.6.</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>53</b>
<b>Chapitre 2: Méthodes analytiques</b> .....		<b>67</b>
<b>2.1.</b>	<b>PRETRAITEMENT ET EXTRACTION</b> .....	<b>71</b>
2.1.1.	<i>Conditionnement, lyophilisation, broyage</i> .....	71
2.1.2.	<i>Extraction de la MOE et la MOD</i> .....	72
2.1.2.1.	Extraction aux soxhlets .....	72
2.1.2.2.	Extraction de la matière organique dissoute par leaching .....	73
2.1.3.	<i>Extraction de la matière organique dissoute sur phase solide</i> .....	74
2.1.3.1.	Principe .....	74
2.1.3.2.	Protocole .....	74
<b>2.2.</b>	<b>TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT DE LA MATIERE ORGANIQUE</b> .....	<b>75</b>
2.2.1.	<i>Technique de fractionnement de la MOE par chromatographie liquide sur phase solide</i> .....	75
2.2.1.1.	Principe .....	76
2.2.1.2.	Fractionnement sur alumine .....	76
2.2.1.3.	Fractionnement sur silice .....	77
2.2.2.	<i>Fractionnement de la MOD à pH acide</i> .....	78
2.2.2.1.	Définitions .....	78
2.2.2.2.	Protocole de séparation .....	78
2.2.3.	<i>Fractionnement de la MOD par dialyse</i> .....	79
<b>2.3.</b>	<b>ANALYSES MOLECULAIRES</b> .....	<b>80</b>
2.3.1.	<i>Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse</i> .....	80
2.3.1.1.	Appareillage .....	80
2.3.1.2.	Principe .....	81
2.3.1.3.	Méthode d'analyse .....	82

2.3.2.	<i>Pyrolyse flash-Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (PyGC-MS).....</i>	<b>83</b>
2.3.2.1.	Principe et appareillage.....	<b>83</b>
2.3.2.2.	Méthodes d'analyse .....	<b>84</b>
2.3.3.	<i>Chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) - exclusion stérique .....</i>	<b>86</b>
2.3.3.1.	Appareillage du montage HPLC-exclusion stérique .....	<b>86</b>
2.3.3.2.	Principe.....	<b>86</b>
2.3.3.3.	Méthode d'analyse des extraits organiques .....	<b>87</b>
2.3.3.4.	Méthode d'analyse des extraits aqueux .....	<b>88</b>
2.3.4.	<i>Spectromètre hybride quadripôle-temps de vol (Qtof) .....</i>	<b>89</b>
2.3.4.1.	Principe et appareillage.....	<b>89</b>
2.3.4.2.	Méthode d'analyse.....	<b>91</b>
<b>2.4.</b>	<b>TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES .....</b>	<b>92</b>
2.4.1.	<i>Généralité sur les méthodes spectroscopiques .....</i>	<b>92</b>
2.4.2.	<i>Spectroscopie IRTF en mode transmission .....</i>	<b>93</b>
2.4.2.1.	Principe.....	<b>93</b>
2.4.2.2.	Appareillage, conditions opératoires et préparation des échantillons ...	<b>95</b>
2.4.2.3.	Utilisation des données de microspectroscopie IRTF .....	<b>96</b>
2.4.3.	<i>La spectroscopie de fluorescence .....</i>	<b>97</b>
2.4.3.1.	Définitions et principe .....	<b>97</b>
2.4.3.2.	Facteurs influençant la fluorescence .....	<b>98</b>
2.4.3.2.1.	<b>Influence de la concentration-Relations fondamentales .....</b>	<b>99</b>
2.4.3.2.2.	<b>Les phénomènes de quenching .....</b>	<b>99</b>
2.4.3.2.3.	<b>Les diffusions de Rayleigh, Tyndall et Raman .....</b>	<b>99</b>
2.4.3.2.4.	<b>Autres facteurs .....</b>	<b>100</b>
2.4.3.3.	Appareillage.....	<b>100</b>
2.4.3.4.	Spectres de fluorescence .....	<b>101</b>
2.4.3.5.	Méthode d'analyse.....	<b>101</b>
2.4.3.6.	La fluorescence des eaux naturelles .....	<b>102</b>
2.4.3.6.1.	<b>Bibliographie .....</b>	<b>102</b>
2.4.3.6.2.	<b>Indices de fluorescence .....</b>	<b>103</b>
2.4.3.6.2.1.	<i>L'intensité de fluorescence (FI).....</i>	<b>104</b>
2.4.3.6.2.2.	<i>L'indice Biologique (BIX).....</i>	<b>104</b>
2.4.3.6.2.3.	<i>L'indice d'humification (HIX) .....</i>	<b>105</b>
<b>2.5.</b>	<b>ANALYSE ROCK EVAL .....</b>	<b>105</b>
2.5.1.	<i>Principe.....</i>	<b>105</b>
2.5.2.	<i>Indices Rock Eval .....</i>	<b>106</b>
<b>2.6.</b>	<b>DOSAGE DU CO<sub>2</sub> .....</b>	<b>107</b>
<b>2.7.</b>	<b>REFERENCES.....</b>	<b>108</b>

## **Chapitre 3: Présentation du site de Mol et des échantillons solides de roches – Caractérisation des eaux de piézomètres .....113**

<b>3.1. GEOLOGIE GENERALE .....</b>	<b>117</b>
<b>3.2. LE LABORATOIRE SOUTERRAIN HADES .....</b>	<b>122</b>
<b>3.3. LES ECHANTILLONS DE ROCHES .....</b>	<b>123</b>
3.3.1. <i>Description de l'échantillon de référence, P-T0.....</i>	<b>123</b>
3.3.1.1. <i>Lieu d'échantillonnage .....</i>	<b>123</b>
3.3.1.2. <i>Caractéristiques minéralogiques de l'échantillon P-T0.....</i>	<b>123</b>
3.3.2. <i>Description des échantillons naturels.....</i>	<b>125</b>
<b>3.4. DESCRIPTION DE LA MATIERE ORGANIQUE HYDROSOLUBLE DES EAUX DE PIEZOMETRES DU LABORATOIRE SOUTERRAIN HADES .....</b>	<b>126</b>
3.4.1. <i>Echantillons et protocole.....</i>	<b>126</b>
3.4.1.1. <i>Le piézomètre vertical EGBS .....</i>	<b>127</b>
3.4.1.2. <i>Les piézomètres horizontaux Spring 116, N2TD et N2CG.....</i>	<b>127</b>
3.4.1.3. <i>Protocole d'étude.....</i>	<b>128</b>
3.4.2. <i>Résultats.....</i>	<b>130</b>
3.4.2.1. <i>Analyse quantitative et distribution des masses moléculaires.....</i>	<b>130</b>
3.4.2.2. <i>Analyses spectroscopiques .....</i>	<b>133</b>
<b>3.4.2.2.1. Fluorescence 3D .....</b>	<b>133</b>
<b>3.4.2.2.2. IRTF .....</b>	<b>137</b>
3.4.2.3. <i>Analyse moléculaire de l'eau EGBS .....</i>	<b>138</b>
3.4.3. <i>Discussion .....</i>	<b>141</b>
3.4.3.1. <i>Etude de la distribution des tailles moléculaires des eaux de piézomètre .....</i>	<b>141</b>
3.4.3.2. <i>Caractéristiques spectroscopiques et moléculaires des eaux des piézomètres de HADES.....</i>	<b>142</b>
3.4.4. <i>Conclusion .....</i>	<b>144</b>
<b>3.5. REFERENCES.....</b>	<b>145</b>

## **Chapitre 4: Etude des conséquences de l'oxydation sur la matière organique de la formation de Boom à Mol.....151**

<b>4.1. IMPACT DE L'OXYDATION SUR LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE DE LA FORMATION DE BOOM .....</b>	<b>157</b>
4.1.1. <i>Méthodologie utilisée et représentativité.....</i>	<b>157</b>
4.1.1.1. <i>Protocole expérimental et analytique des échantillons .....</i>	<b>157</b>
4.1.1.2. <i>Représentativité des échantillons utilisés : comparaison avec les données géochimiques du sondage HADES 2001/4 .....</i>	<b>162</b>
4.1.1.3. <i>Effet de la température (80°C) sur la matière organique utilisée pour l'oxydation artificielle .....</i>	<b>164</b>

4.1.1.3.1. Résultats .....	164
4.1.1.3.2. Discussion .....	166
4.1.2. <i>In-situ and experimental investigation of the alteration of Boom Clay (Oligocene) at the air- geological barrier interface within the Mol underground facility (Belgium): consequences on kerogen and bitumen compositions.</i> .....	168
4.1.2.1. Introduction.....	169
4.1.2.2. Experimental .....	170
4.1.2.2.1. Sample collection .....	170
4.1.2.2.2. Artificial oxidation procedure .....	171
4.1.2.2.3. Rock Eval analysis.....	171
4.1.2.2.4. Bitumen extraction by soxhlet.....	171
4.1.2.2.5. Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) .....	171
4.1.2.2.6. Gel Permeation Chromatography-High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC) .....	173
4.1.2.3. Results .....	173
4.1.2.3.1. Rock Eval analysis.....	173
4.1.2.3.2. Gel Permeation Chromatography – High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC) .....	175
4.1.2.3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).....	176
4.1.2.4. Discussion .....	173
4.1.2.4.1. Origin, preservation and thermal maturity of the unaltered samples (P-T0, Gal-1a and Gal-1b) .....	173
4.1.2.4.2. Comparison between <i>in-situ</i> and artificial oxidation of Boom Clay.....	175
4.1.2.4.3. Identification of the major oxidation stages of organic matter in Boom Clay .....	186
4.1.2.5. Conclusions.....	187
4.1.3. <i>Experimental investigation on the role of kerogen and clay minerals in the formation of bitumen during the oxidation of Boom clay.</i> .....	188
4.1.3.1. Introduction.....	189
4.1.3.2. Samples and experimental conditions .....	190
4.1.3.2.1. Samples.....	190
4.1.3.2.2. Air oxidation procedure.....	191
4.1.3.2.3. Extraction-fractionation .....	191
4.1.3.2.3.1. Solvent extraction by soxhlet .....	191
4.1.3.2.3.2. Kerogen extraction by dichloromethane.....	193
4.1.3.2.3.3. Fractionation .....	193
4.1.3.2.4. Gas Chromatography-mass spectrometry and derivatization.....	193
4.1.3.2.5. Thermally assisted hydrolysis and methylation (THM-GC-MS) .....	194
4.1.3.2.6. Gel Permeation Chromatography – High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC) .....	195
4.1.3.3. Results .....	195
4.1.3.3.1. Air oxidation of the kerogen concentrate of Boom Clay.....	195
4.1.3.3.1.1. Evolution of the kerogen .....	195
4.1.3.3.1.2. Evolution of the bitumen extracted from oxidized kerogen.....	197
4.1.3.3.2. Air oxidation of the pre-extracted Boom Clay .....	198
4.1.3.4. Discussion .....	202
4.1.3.4.1. Effects of air oxidation on the composition of kerogen.....	202
4.1.3.4.2. Influence of minerals on the air oxidation process.....	203

4.1.3.4.3. Production of low molecular weight compounds .....	204
4.1.3.5. Conclusion .....	204
<b>4.2. ETUDE DE L'IMPACT DE L'OXYDATION SUR LA FRACTION ORGANIQUE HYDROSOLUBLE DE LA FORMATION DE BOOM .....</b>	<b>206</b>
4.2.1. Comparaison d'une série d'altération naturelle et d'une série d'oxydation artificielle.....	206
4.2.1.1. Protocole analytique et échantillons .....	206
4.2.1.2. Résultats .....	208
4.2.1.2.1. Analyses quantitatives .....	208
4.2.1.2.2. Etude de la distribution des masses moléculaires .....	210
4.2.1.2.3. Etude de la MOD par pyrolyse flash GCMS.....	213
4.2.1.2.4. Analyses spectroscopiques .....	216
4.2.1.3. Discussion .....	224
4.2.1.3.1. Nature de la MOD des échantillons initiaux .....	224
4.2.1.3.2. Evolution de la MOD avec l'oxydation .....	226
4.2.1.3.3. Conclusion.....	230
4.2.2. Conséquences de l'oxydation du kérogène sur la nature de la matière organique hydrosoluble.....	232
4.2.2.1. Echantillons et protocole .....	232
4.2.2.2. Résultats .....	234
4.2.2.3. Discussion .....	243
<b>4.3. CONCLUSIONS GENERALES DES EXPERIENCES D'OXYDATION .....</b>	<b>245</b>
<b>4.4. REFERENCES .....</b>	<b>250</b>

## **Chapitre 5: Etude des conséquences de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de la formation de Boom à Mol.....259**

<b>5.1. PROTOCOLE DE BIODEGRADATION.....</b>	<b>264</b>
5.1.1. L'argile.....	264
5.1.2. L'inoculum .....	264
5.1.3. L'eau .....	264
5.1.4. Condition de biodégradation et durée expérimentale .....	265
5.1.4.1. Le temps initial, T0 .....	266
5.1.4.2. T1, T2, T3, T4 .....	267
5.1.4.3. Ajout de lactate .....	267
<b>5.2. PROTOCOLE ET RESULTATS .....</b>	<b>268</b>
5.2.1. Protocole d'étude de la matière organique .....	268
5.2.2. Test d'activité bactérienne .....	269
5.2.3. Analyse de l'eau.....	270
5.2.3.1. Analyse du carbone organique dissous.....	270
5.2.3.2. Evolution de la chimie du milieu aqueux .....	271
5.2.3.3. Evolution de la distribution des masses dans la fraction hydrosoluble .....	272

5.2.4.	<i>Extrait organique</i> .....	277
5.2.4.1.	Taux d'extrait.....	277
5.2.4.2.	Analyse moléculaire en GC-MS .....	277
5.2.4.3.	Evolution de la distribution des masses par HPLC-SEC .....	280
<b>5.3.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>282</b>
5.3.1.	<i>Activité bactérienne</i> .....	282
5.3.2.	<i>Evolution de la phase aqueuse</i> .....	283
5.3.2.1.	Le carbone organique dissous.....	283
5.3.2.2.	Evolution de la composition de l'eau .....	283
5.3.2.2.1.	<b>Expérience sans lactate</b> .....	<b>283</b>
5.3.2.2.2.	<b>Expérience avec lactate</b> .....	<b>284</b>
5.3.3.	<i>Evolution de l'extrait organique</i> .....	285
5.3.3.1.	Taux d'extrait.....	285
5.3.3.2.	Evolution moléculaire .....	285
<b>5.4.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>286</b>
<b>5.5.</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>289</b>
	<b>Conclusions Générales</b> .....	<b>293</b>
	<b>Annexes</b> .....	<b>307</b>

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

## INTRODUCTION GENERALE

### Liste des figures :

- Figure 0-1** : Evolution du COD dans les différents filtres du piézomètre Morphéus en fonction du temps (Van Geet, 2004). ..... **02**
- Figure 0-2** : Schéma conceptuel de l'altération de la matière organique lors de la phase (i) d'excavation de la galerie, (ii) d'exploitation et (iii) de veille après fermeture de la galerie (mise en place des colis). ..... **03**

## CHAPITRE 1. LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE ; DEFINITIONS, DESCRIPTION ET EVOLUTION.

### Liste des figures :

- Figure 1-1** : Fractionnement de la matière organique. .... **14**
- Figure 1-2** : Position de différents kérogènes étudiés dans le diagramme de van Krevelen H/C at. versus O/C at. d'après Vandembroucke, (1993). .... **16**
- Figure 1-3** : Schéma de formation simplifiée du phytane et du pristane à partir du phytol. .... **18**
- Figure 1-4** : **A**) Structure de l'unité isoprène, **B**) Exemples de monoterpénoïdes, **C**) Exemples de biomarqueurs de la famille des sesquiterpénoïdes, **D**) Exemples de biomarqueurs de la famille des diterpénoïdes. .... **20**
- Figure 1-5** : Exemple de sesterterpénoïdes acycliques observés dans des cultures de diatomées d'après Belt *et al.* (2001). .... **21**
- Figure 1-6** : **A**) Représentation du squelette hydrocarboné des hopanoïdes, **B**) Explication de la configuration  $\beta$  et  $\alpha$  des hopanes avec, pour exemple, le  $17\beta(H)$ ,  $21\alpha(H)$ -norhopane, **C**) Diverses configurations des hopanes. .... **22**
- Figure 1-7** : Disposition des substituants sur le carbone 22 conduisant aux deux isomères R et S. .... **23**
- Figure 1-8** : Exemples d'hopanoïdes. .... **23**
- Figure 1-9** : Squelette hydrocarboné des familles des Oléanoïdes, Ursanoïdes et Lupanoïdes. ... **24**
- Figure 1-10** : Représentation du squelette hydrocarboné des stéroïdes sans insaturation (stanol) et avec une insaturation (stenol). .... **25**
- Figure 1-11** : Exemples de stérols et leurs sources majeures d'après Killips et Killips (2005). .. **25**
- Figure 1-12** : Relation entre la composition en stérol  $C_{27}$ ,  $C_{28}$  et  $C_{29}$  et les environnements de dépôts d'après Huang *et al.* (1979) et Killips et Killips (2005). .... **26**
- Figure 1-13** : Exemples de stéranes. .... **27**
- Figure 1-14** : **A**) Formule semi développée des alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique, **B**) Structure des unités p-hydroxyphényles (H), guaiacyles (G) et syringyles (S), **C**) Modèle de lignine tridimensionnelle avec les liaisons  $\beta$ -O-4 et biphényles, d'après Kogel-Knabner (2002). .... **30**
- Figure 1-15** : Exemple de glucide : **A**. monosaccharide, **B**. polysaccharide d'après Kogel-Knabner (2002). .... **32**
- Figure 1-16** : Modèle d'acides humiques et fulviques : **A**) modèle de Schnitzer et Khan **B**) Acide humique et **C**) Acide fulvique d'après Schnitzer et Khan (1972). .... **36**

<b>Figure 1-17 : A)</b> Représentation schématique du modèle micellaire des substances humiques de Wershaw (Wershaw, 1986) adapté par Von Wandruszka <i>et al.</i> (1999), <b>B)</b> modèle d'acide humique abritant un ions $Mg^{2+}$ proposé par Engebretson et Von Wandruszka (1994), adapté par Von Wandruszka <i>et al.</i> (1999).	<b>37</b>
<b>Figure 1-18 :</b> Modèle simplifié de formation du kérogène et des substances humiques, lors de la diagenèse, d'après Killops et Killops (2005).	<b>39</b>
<b>Figure 1-19 :</b> Chromatogramme d'huile de plus en plus biodégradée d'après Wenger <i>et al.</i> (2002).	<b>41</b>
<b>Figure 1-20 :</b> Evolution des rapports Pristane/ $nC_{17}$ et Phytane/ $nC_{18}$ en fonction des processus de biodégradation et de maturation d'après Lijmbach (1975).	<b>41</b>
<b>Figure 1-21 :</b> Modèle de biodégradation/sorption de la matière organique lors de la diagenèse d'après Hedges et Keil, (1999).	<b>44</b>
<b>Figure 1-22 :</b> Succession des réactions de minéralisation de la matière organique dans les sédiments lors de la diagenèse précoce d'après Froelich <i>et al.</i> (1979).	<b>46</b>
<b>Figure 1-23 :</b> Evolution des rapports atomiques H/C et O/C des kérogènes de type I, II, III, des acides humiques et acides fulviques et zones de formation des différents produits lors de la diagenèse, catagenèse et métagenèse présentées sur un diagramme de van Krevelen, d'après Tissot and Welte (1978) et Rice et MacCarthy (1991).	<b>48</b>
<b>Figure 1-24 :</b> Chromatogrammes totaux de la fraction saturée d'un échantillon de référence de l'argile du Callovo-Oxfordien, d'échantillons stockés à l'air, à température ambiante pendant 3 ans et 10 ans et de l'échantillon de référence oxydé artificiellement d'après Elie <i>et al.</i> (2000).	<b>50</b>
<b>Figure 1-25 :</b> Réactions d'auto-oxydation des <i>n</i> -alcanes en présence de smectite à basse température d'après Faure <i>et al.</i> (2003).	<b>51</b>

### Liste des tableaux :

<b>Tableau 1-1 :</b> Distribution des acides gras chez quelques organismes.	<b>28</b>
<b>Tableau 1-2 :</b> Proportion des produits d'oxydation de la lignine dans différentes taxons de plante (proportion exprimée en Wt% de carbone) d'après Hedges <i>et al.</i> (1979).	<b>31</b>
<b>Tableau 1-3 :</b> Composition élémentaire des substances humiques d'après Steelink (1985) et Rice et MacCarthy (1991).	<b>35</b>
<b>Tableau 1-4 :</b> Comparaison de la biodégradabilité de différentes molécules (hydrocarbures $C_6$ - $C_{15}$ , $C_{16}$ - $C_{35}$ et biomarqueurs) d'après Wenger <i>et al.</i> (2002).	<b>40</b>

### Liste des équations :

<b>Équation 1-1 :</b> Réaction de décarboxylation enzymatique des acides gras.	<b>17</b>
<b>Équation 1-2 :</b> Formule du CPI d'après Bray <i>et al.</i> (1961).	<b>18</b>
<b>Équation 1-3 :</b> Réaction de réduction enzymatique des acides <i>n</i> -alcanoïques.	<b>29</b>

## **CHAPITRE 2. METHODES ANALYTIQUES.**

### Liste des figures :

<b>Figure 2-1:</b> Schéma du montage expérimental d'un soxhlet.	<b>72</b>
<b>Figure 2-2 :</b> Schéma du montage expérimental du système d'extraction sur phase solide.	<b>75</b>
<b>Figure 2-3 :</b> Représentation schématique du fractionnement sur alumine.	<b>77</b>
<b>Figure 2-4 :</b> Représentation schématique du fractionnement sur silice.	<b>78</b>
<b>Figure 2-5 :</b> Protocole d'isolation des fractions « <i>fulvic like</i> » et « <i>humic like</i> ».	<b>79</b>

<b>Figure 2-6</b> : Principe de la diffusion. ....	<b>79</b>
<b>Figure 2-7</b> : Principe du couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse. ....	<b>81</b>
<b>Figure 2-8</b> : Principe de la silylation avec du BSTFA et du TMCS. ....	<b>82</b>
<b>Figure 2-9</b> : Principe du couplage Pyrolyse flash-Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse. ....	<b>83</b>
<b>Figure 2-10</b> : Réaction de méthylation des fonctions carboxyle et hydroxyle en présence de TMAH. ....	<b>84</b>
<b>Figure 2-11</b> : Schéma de l'appareillage de l' HPLC-exclusion stérique. ....	<b>86</b>
<b>Figure 2-12</b> : Principe de la chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique. ....	<b>87</b>
<b>Figure 2-13</b> : Champ d'utilisation des sources APPI, APCI et ESI. ....	<b>89</b>
<b>Figure 2-14</b> : Schéma de principe d'un spectromètre hybride quadripôle-temps de vol (QqTof) équipé d'une source à photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI). ....	<b>90</b>
<b>Figure 2-15</b> : Principe de la photo-ionisation à l'aide d'une source APPI. A- Cas d'une photo-ionisation directe, B- Cas d'une photo-ionisation à l'aide d'un dopant. ....	<b>91</b>
<b>Figure 2-16</b> : Diagramme énergétique d'une molécule avec les trois niveaux énergétiques ; $S_i$ niveau électronique, $V_i$ niveau vibrationnel et $J_i$ niveau rotationnel. ....	<b>92</b>
<b>Figure 2-17</b> : Spectre électromagnétique. ....	<b>93</b>
<b>Figure 2-18</b> : Vibrations d'élongation symétriques et asymétriques : exemple de la liaison $CH_2$ . ....	<b>94</b>
<b>Figure 2-19</b> : Vibrations de déformation angulaire dans le plan de la molécule : exemple de la liaison $CH_2$ . ....	<b>95</b>
<b>Figure 2-20</b> : Vibrations de déformation angulaire hors du plan de la molécule : exemple de la liaison $CH_2$ . ....	<b>95</b>
<b>Figure 2-21</b> : Diagramme énergétique simplifié de Jablonski. ....	<b>98</b>
<b>Figure 2-22</b> : Schéma de principe d'un spectrofluorimètre. ....	<b>100</b>
<b>Figure 2-23</b> : EEM (A) d'un échantillon d'eau prélevé dans la rivière Duwamish à 4m de profondeur et (B) dans la baie de Dabob à 15m de profondeur (Coble, 1996). ....	<b>103</b>
<b>Figure 2-24</b> : Localisation des indices de fluorescence. ....	<b>104</b>
<b>Figure 2-25</b> : Schéma de principe de l'analyse Rock-Eval 6. ....	<b>106</b>

### **Liste des tableaux :**

<b>Tableau 2-1</b> : Composition chimique de l'eau SBCW (Synthetic Boom Clay Water). ....	<b>73</b>
<b>Tableau 2-2</b> : Attribution des principales bandes infrarouges observées dans le cadre de l'étude de la matière organique. ....	<b>97</b>
<b>Tableau 2-3</b> : Principaux pôles de fluorescence observés dans la littérature. ....	<b>102</b>

### **Liste des équations :**

<b>Équation 2-1</b> : Equation de variation d'énergie moléculaire. ....	<b>93</b>
<b>Équation 2-2</b> : Formule de l'intensité de fluorescence. ....	<b>104</b>
<b>Équation 2-3</b> : Formule de l'indice biologique. ....	<b>104</b>
<b>Équation 2-4</b> : Formule de l'indice d'humification. ....	<b>105</b>
<b>Équation 2-5</b> : Calcul de la masse de carbone (mg) de $CO_2$ par gramme du carbone organique ( $C_{CO_2}$ , %). ....	<b>107</b>

### CHAPITRE 3. PRESENTATION DU SITE DE MOL ET DE ECHANTILLONS SOLIDES DE ROCHES – CARACTERISATION DES EAUX DE PIEZOMETRE.

#### Liste des figures :

<b>Figure 3-1:</b> Log stratigraphique des formations Eocène, Oligocène, Miocène, Pliocène et Quaternaire dans la région de Mol (d'après Vandenberghe, 1978) .....	<b>118</b>
<b>Figure 3-2:</b> Log stratigraphique détaillé des Argiles de Boom et localisation de l'URL HADES à Mol (d'après Vandenberghe, 1978 Wouters et Vandenberghe, 1994; Van Keer et De Craen, 2001; Mertens et Wouters, 2003; Van Simaey, 2004; Abels <i>et al.</i> , 2007; Belgian Subcommission of Tertiary Stratigraphy, 2011) .....	<b>118</b>
<b>Figure 3-3 :</b> Schéma conceptuel des alternances rythmiques argiles-silts (d'après Vandenberghe <i>et al.</i> , (1997) et Laenen, (1997))......	<b>120</b>
<b>Figure 3-4 :</b> Données Rock Eval du sondage HADES 2001/4 positionnées dans le graphe S2 en fonction du TOC (Van Geet, 2002). .....	<b>121</b>
<b>Figure 3-5 :</b> Plan du laboratoire souterrain HADES de Mol (De Craen <i>et al.</i> , 2004 ; De Craen <i>et al.</i> , 2008).....	<b>122</b>
<b>Figure 3-6 :</b> Bloc d'argile de Boom prélevé lors de l'excavation de la galerie PRACLAY en octobre 2007 .....	<b>123</b>
<b>Figure 3-7 :</b> <b>A_</b> Diffractogramme de l'échantillon P-T0, fraction totale sèche, <b>B_</b> Diffractogramme de la fraction <2µm saturée à l'éthylène glycol vapeur pendant 24h. Les données ont été collectées avec un diffractomètre D8 Bruker (Co-Kalpha_1 radiation (λ=1.7902Å)). Les conditions expérimentales sont : voltage = 35kV, I=45mA, pas= 0,0035° (2 theta), 3 sec counting time. ..	<b>124</b>
<b>Figure 3-8 :</b> Echantillons prélevés dans la galerie HADES, au niveau de la fenêtre URL R16W en octobre 2007 .....	<b>125</b>
<b>Figure 3-9:</b> Localisation des quatre piézomètres étudiés et organisation des piézomètres Spring 116 et EGBS dans le laboratoire HADES (d'après De Craen <i>et al.</i> , 2004 ; De Craen <i>et al.</i> , 2008) .....	<b>127</b>
<b>Figure 3-10 :</b> Protocole d'étude des échantillons d'eau de piézomètre, avec HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.), IRTF = microscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. paragraphe 2.4.2.), APPI-QTOF= source de photo ionisation à pression atmosphérique couplée à un spectromètre de masse haute résolution (cf. paragraphe 2.3.4.) .....	<b>129</b>
<b>Figure 3-11 :</b> Signal normalisé du DAD à 254 nm en fonction du temps pour les échantillons EGBS, N2CG-F1, N2TD-F1 et Spring 116 F1, eaux brutes, fractions « fulvic like » et « humic like ». .....	<b>132</b>
<b>Figure 3-12 :</b> Spectres de masse APPI (mode positif) Qtof de l'eau brute des piézomètres N2CG-F1 et N2TD-F1.....	<b>133</b>
<b>Figure 3-13 :</b> Matrice d'Emission-Excitation des échantillons des piézomètres Spring-F1 et N2CG-F1 pour les eaux brutes, et des fractions « fulvic like » et « humic like ». .....	<b>135</b>
<b>Figure 3-14 :</b> Matrice d'Emission-Excitation des échantillons des piézomètres N2TD-F1 et EGBS pour les eaux brutes et des fractions « fulvic like » et « humic like ». .....	<b>136</b>
<b>Figure 3-15 :</b> Spectres infrarouges des eaux brutes EGBS, N2TD-F1, N2CG-F1 et Spring-116 F1. .....	<b>137</b>
<b>Figure 3-16 :</b> Pyrogramme de l'échantillon d'eau brute EGBS, identification des pics Tableau 3-8. .....	<b>139</b>

**Figure 3-17** : Résultats de l'analyse de l'eau brute EGBS en THM-GC-MS, Abondance relative **A\_** de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, **B\_** des différentes familles aliphatiques, **C\_** des différentes familles de molécules aromatiques. .... **140**

**Liste des tableaux :**

**Tableau 3-1**: Composition minéralogique moyenne de l'Argile de Boom (wt. %) (d'après Zeelmaekers *et al.*, 2010)..... **117**

**Tableau 3-2** : Tableau récapitulatif des données Rock Eval de la formation de Boom..... **121**

**Tableau 3-3** : Pourcentage des espèces argileuses de l'échantillon P-T0, calculé par la méthode d'Holtzapffel (1985). .... **124**

**Tableau 3-4**: Valeur de COD des quatre échantillons d'eaux brutes des piézomètres EGBS, N2TD-F1, N2CG-F1 et Spring 116-F1. .... **130**

**Tableau 3-5** : Proportion des fractions « fulvic like » et « humic like » dans l'eau de piézomètre EGBS..... **131**

**Tableau 3-6** : Pourcentage du COD de taille inférieure à 3.5 kDa par rapport au COD de l'eau brute, isolé par dialyse pour l'eau du piézomètre EGBS (eau brute, fraction « fulvic like » et « humic like »), avec  $\%COD_{<3.5kDa} = ((COD_{total} - COD_{>3.5kDa}) / COD_{total}) * 100$ . .... **131**

**Tableau 3-7** : Valeur du rapport  $\nu C=O / \nu C=C$  pour les échantillons EGBS, N2TD-F1, N2CG-F1 et Spring 116 F1..... **138**

**Tableau 3-8** : Identification des composés de la Figure 3-16. .... **139**

**CHAPITRE 4. ETUDE DES CONSEQUENCES DE L'OXYDATION SUR LA MATIERE ORGANIQUE DE LA FORMATION DE BOOM A MOL.**

**Liste des figures :**

**Figure 4-1** : Schéma conceptuel de l'altération de la matière organique lors de la phase (i) d'excavation de la galerie, (ii) d'exploitation et (iii) de veille après fermeture de la galerie (mise en place des colis)..... **155**

**Figure 4-2** : Protocole général d'étude des échantillons oxydé artificiellement à 80°C, avec GC-MS = Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.1), HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.). .... **158**

**Figure 4-3** : Protocole général d'étude des échantillons d'argile et d cf. paragraphe 2.3.3.)e kérogène oxydé artificiellement à 130°C, avec GC-MS = Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.1.), HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.). ... **159**

**Figure 4-4** : Schéma de principe de l'expérience de pré extraction de l'argile de Boom..... **160**

**Figure 4-5** : Protocole général d'étude des échantillons de la série naturelle avec GC-MS = Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.1.), HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.). .... **161**

**Figure 4-6** : Positions des échantillons naturels non altérés Gal-1, P-T0 et des échantillons du sondage HADES 2001/4 dans le graphe\_A. Indice d'hydrogène en fonction de l'Indice Oxygène, B.

S2 en fonction du COT. Valeurs Rock Eval du sondage HADES 2001/4 présentées en Annexe 2.

.....	<b>163</b>
<b>Figure 4-7</b> : Evolution de l'abondance relative des <i>n</i> -alcanes ( $m/z=57$ ), des 2-alcanols ( $m/z=117$ ), des alcanones ( $m/z=58$ ), des acides alcanoniques ( $m/z =117$ ), des 1-alcanols ( $m/z=75$ ) et des alcanals ( $m/z=82$ ) pour les échantillons P-T0 et P-Arg-12mois.....	<b>165</b>
<b>Figure 4-8</b> : Distribution des masses de l'extrait total des échantillons P-T0 et P-Arg-12mois obtenu par HPLC-SEC (exclusion stérique). .....	<b>166</b>
<b>Figure 4-9</b> : Scheme of the extrusion of clay cores through observation windows in the HADES galleries at the mol underground facility (Belgium). <u>Example for the URL natural series</u> : numbers refer to the relative position (and thus air exposure times) of samples along an extruded core. Maximum air exposure time for the core studied is approximately of 2 years.....	<b>171</b>
<b>Figure 4-10</b> : Evolution of Rock-Eval Hydrogen Index versus Oxygen Index for natural and artificial series of Boom Clay. As unaltered samples of both series are not exactly the same due to lithology variations within the HADES gallery, values were normalized to those of the initial unaltered samples ( $H_{I_0}$ , $O_{I_0}$ ) of each series respectively. ....	<b>175</b>
<b>Figure 4-11</b> : Mass distribution profiles of artificial (P-T0, P-6 months and P-9 months) and URL natural oxidation series (Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a) of Boom Clay obtained by Gel Permeation Chromatography.....	<b>176</b>
<b>Figure 4-12</b> : <b>a</b> - Chromatograms of unaltered sample P-T0 and P-9 months artificially oxidized for months at 80°C (* $nC_i = n$ -alcanes, $\bullet C_i = 1$ -alcanols, $\blacktriangledown C_i =$ alcanoic acids with $i =$ carbon number, $\square = 6,10,14$ -trimethyl-2-pentadecanone), <b>b</b> - Relative abundance of <i>n</i> -alcanes ( $\sum (nC_{12}-nC_{37})$ ), alcanoic acids ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), 1-alcanols ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), alcanals ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), 2-alcanones ( $\sum (C_8-C_{34})$ ) for P-T0, P-6 months and P-9 months oxidation times. Identification of peaks is given in Table 4-6.....	<b>177</b>
<b>Figure 4-13</b> : <b>a</b> - Chromatograms of samples Gal-1a and Gal-6a (* $nC_i = n$ -alcanes, $\bullet C_i = 1$ -alcanols, $\blacktriangledown C_i =$ alcanoic acids with $i =$ carbon number, $\square = 6,10,14$ -trimethyl-2-pentadecanone, $O =$ PAHs), <b>b</b> - Relative abundance of <i>n</i> -alcanes ( $\sum (nC_{12}-nC_{37})$ ), alcanoic acids ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), 1-alcanols ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), alcanals ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\sum (C_8-C_{34})$ ), 2-alcanones ( $\sum (C_8-C_{34})$ ) for Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a. Identification of peaks is given in Table 4-6.....	<b>178</b>
<b>Figure 4-14</b> : Evolution of relative abundances of <i>n</i> -alcanes ( $m/z 57$ ), 2-alcanols ( $m/z 117$ ) and alcanones ( $m/z 58$ ) for the artificial oxidation series at 80°C (samples P-T0, P-3 months, P-9 months) and the URL natural air exposed series of Boom Clay (samples Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a). .....	<b>181</b>
<b>Figure 4-15</b> : Evolution of relative abundance of alcanoic acids ( $m/z 117$ ), alcanals ( $m/z 82$ ) and 1-alcanols ( $m/z 75$ ) for the artificial oxidation series of Boom Clay at 80°C (samples P-T0, P-3 months, P-9 months) and the URL natural air exposed series of Boom Clay (samples Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a) .....	<b>182</b>
<b>Figure 4-16</b> : Evolution of low molecular weight vs high molecular weight (LMW/HMW) for <i>n</i> -alcanes ( $\sum (nC_{12}-nC_{20}) / \sum (nC_{21}-nC_{37})$ ), alcanoic acids ( $\sum (C_8-C_{20}) / \sum (C_{21}-C_{32})$ ), 1-alcanols ( $\sum (C_8-C_{20}) / \sum (C_{21}-C_{34})$ ), alcanals ( $\sum (C_8-C_{20}) / \sum (C_{21}-C_{24})$ ), 2-alcanones ( $\sum (C_8-C_{20}) / \sum (C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\sum (C_8-C_{20}) / \sum (C_{21}-C_{34})$ ) and the ratio of $\sum(\text{hopane}/\text{hopene})$ for artificial oxidation (80°C) and <i>in situ</i> air exposed samples of Boom Clay (URL natural series). .....	<b>183</b>
<b>Figure 4-17</b> : Scheme of oxidation procedure for: <b>a</b> ) Kerogen of Boom Clay, <b>b</b> ) Praclay Boom Clay .....	<b>192</b>
<b>Figure 4-18</b> : <b>a</b> ) Proportion of aliphatic and aromatic compounds, <b>b</b> ) Evolution of the proportions of alcanoic acids $\sum(C_6-C_{34})$ , unsaturated alcanoic acids $\sum(C_6-C_{25})$ , alkanedioic acids $\sum(C_7-C_{30})$ , <i>n</i> -alcanes $\sum(nC_9-nC_{32})$ , <i>n</i> -alcanes $\sum(nC_9-nC_{32})$ , for initial kerogen of Boom Clay (K-0), and three steps of oxidation 62, 114 and 139 days, <b>c</b> ) Evolution of proportion of alkyl benzenes, benzoic acids,	

methoxybenzenes, methoxy benzoic acids, furan carboxylic acids, PAH and alkyl PAHs for initial kerogen of Boom Clay (K-0), and three steps of oxidation 62, 114 and 139 days ..... **195**

**Figure 4-19** : Chromatograms of pyrolyzates of initial kerogen of Boom Clay (K-0) and three steps of oxidation: 62, 114 and 139 days. (  $\circ$  = *n*-alkanes,  $\bullet$  = *n*-alkenes,  $\nabla$   $C_i$  = alkanolic acids with *i* = carbon number,  $\blacktriangledown$  = unsaturated alkanolic acids,  $\blacklozenge$  = alkanedioic acids,  $\Omega_{i,j,k}$ - $\Phi_{l,m}$  = methoxy-benzene carboxylic acid with *i,j,k* = location of methoxy function and *l,m* = location of acid function,  $\Phi_{l,m,n,o}$  = benzene carboxylic acid methyl ester with *l,m,n,o* = location of acid function,  $g,h$   $\alpha$ - $\Omega_{i,j}$ - $\square$  = alkyl methoxy benzene with *g,h* = location of alkyl group and *i,j* = location of methoxy function,  $g,h$   $\alpha$ - $\Phi_{l,m}$  = alkyl benzene carboxylic acid with *g,h* = location of alkyl group and *l,m* = location of acid function)..... **196**

**Figure 4-20** : **a)** Evolution of relative abundance of alkanolic acids (*m/z* 117) for EK-62, EK-114 and EK-139. **b)** Evolution of the proportions of *n*-alkanes  $\Sigma(nC_{16}$ - $nC_{38})$ , alkanolic acids  $\Sigma(C_9$ - $C_{26})$ , unsaturated alkanolic acids  $\Sigma(C_{14}$ - $C_{18})$ , alkyl alkanolic acids  $\Sigma(C_{12}$ - $C_{16})$  and 1-alkanols  $\Sigma(C_{12}$ - $C_{20})$  for EK-62, EK-114 and EK-139. **c)** Evolution of relative abundance of 1-alkanols (*m/z* 75) for EK-62, EK-114 and EK-139..... **197**

**Figure 4-21** : Evolution of relative abundance of *n*-alkanes (*m/z* 57) for EK-62, EK-114, EK-139 and EC-62, EC-114, EC-139..... **198**

**Figure 4-22** : **a)** Evolution of proportion of *n*-alkanes  $\Sigma(nC_{15}$ - $nC_{38})$ , alkanolic acids  $\Sigma(C_8$ - $C_{32})$  (*m/z* 117), 1-alkanols  $\Sigma(C_8$ - $C_{32})$  (*m/z* 75), 2-alkanones  $\Sigma(C_{12}$ - $C_{30})$  (*m/z* 58) and alkanals  $\Sigma(C_{10}$ - $C_{27})$  (*m/z* 82), for EC-62, EC-114, EC-139 and evolution of relative abundance of **b)** alkanolic acids (*m/z* 117), **c)** 1-alkanols (*m/z* 75), **d)** 2-alkanones (*m/z* 58) and **e)** alkanals (*m/z* 82), for EC-62, EC-114, EC-139 and Praclay original clay. .... **200**

**Figure 4-23** : Evolution of low molecular weight on high molecular weight (LMW/HMW) of polar fraction of EC-62 to EC-139 for alkanolic acids ( $\Sigma(C_8$ - $C_{20})/\Sigma(C_{21}$ - $C_{32})$ ), 1-alkanols ( $\Sigma(C_8$ - $C_{20})/\Sigma(C_{21}$ - $C_{32})$ ), alkanals ( $\Sigma(C_{10}$ - $C_{20})/\Sigma(C_{21}$ - $C_{27})$ ) and 2-alkanones ( $\Sigma(C_{12}$ - $C_{20})/\Sigma(C_{21}$ - $C_{30})$ ). .... **201**

**Figure 4-24** : Molecular weight distributions of polar fractions of EC-62, EC-114 and EC-139 obtained by GPC-HPLC..... **201**

**Figure 4-25** : Protocole d'étude des échantillons d'eaux de la série d'oxydation artificielle et naturelle avec HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.), IRTF = microscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. paragraphe 2.4.2.), APPI-QTOF= source de photo ionisation à pression atmosphérique couplée à un spectromètre de masse haute résolution (cf. paragraphe 2.3.4.). .... **207**

**Figure 4-26** : Signal normalisé du DAD à 254 nm des eaux brutes en fonction du temps pour les échantillons de la série naturelle et artificielle. .... **211**

**Figure 4-27** : Spectres de masse APPI (mode positif) de la MOD des eaux brutes extraite au soxhlet des échantillons Gal-1, Gal-6, P-T0, P-6 mois et P- 18mois. .... **212**

**Figure 4-28** : Résultats de l'analyse des échantillons Gal-1, Gal-4 et Gal-6 en THM-GC-MS, Abondance relative **A\_** de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, **B\_** des différentes familles linéaires, **C\_** des différentes familles de molécules aromatiques. Composés méthylés par TMAH. .... **214**

**Figure 4-29** : Résultats de l'analyse des échantillons P-T0, P-6 mois, P-9mois et P-18 mois en THM-GC-MS, Abondance relative : **A\_** de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, **B\_** des différentes familles linéaires, **C\_** des différentes familles de molécules aromatiques. Composés méthylés par TMAH. .... **215**

<b>Figure 4-30</b> : Matrice d'Emission-Excitation des échantillons P-T0, P-6 mois, P-9mois, P-18mois, Gal-1, Gal-4 et Gal-6 pour les eaux brutes, vue 2D et vue 3D. Intensité de fluorescence normalisée en %.	<b>217</b>
<b>Figure 4-31</b> : Matrice d'Emission-Excitation des échantillons P-T0, P-9 mois, Gal-1, pour les fractions « <i>fluvic like</i> » et « <i>humic like</i> », vue 2D et vue 3D. Intensité de fluorescence normalisée en %.	<b>218</b>
<b>Figure 4-32</b> : Isoplot et vue 3D du signal d'excitation obtenu par le FLD à $\lambda_{em}=424$ nm, pour les eaux brutes des échantillons P-T0 et Gal-1.	<b>219</b>
<b>Figure 4-33</b> : Spectres infrarouges des eaux brutes traitées par SPE des échantillons Gal-1, Gal-4 et Gal-6.	<b>222</b>
<b>Figure 4-34</b> : Spectres infrarouges des eaux brutes traitées par SPE des échantillons P-T0, P-6 mois, P-18 mois.	<b>223</b>
<b>Figure 4-35</b> : Spectre d'excitation à $\lambda_{em}=424$ nm pour l'eau brute et la fraction « <i>fulvic like</i> » de l'échantillon P-18mois.	<b>228</b>
<b>Figure 4-36</b> : Formules des indices $I_1$ et $I_2$ défini sur l'eau brute.	<b>229</b>
<b>Figure 4-37</b> : Position des différents échantillons d'eaux brutes de la série naturelle et artificielle dans le diagramme $I_1$ en fonction d' $I_2$ .	<b>230</b>
<b>Figure 4-38</b> : Protocole d'analyse des échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4 avec HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.), IRTF = microscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. paragraphe 2.4.2.).	<b>233</b>
<b>Figure 4-39</b> : Signal normalisé du DAD à 254 nm en fonction du temps pour les échantillons P-T0, B-T1, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.	<b>235</b>
<b>Figure 4-40</b> : Résultats de l'analyse des eaux brutes des échantillons E-T1 à E-T4 en THM-GC-MS. Abondance relative : <b>A</b> _ de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, <b>B</b> _ des différentes familles linéaires, <b>C</b> _ des différentes familles de molécules aromatiques. Composés méthylés par TMAH.	<b>237</b>
<b>Figure 4-41</b> : Spectres infrarouges de la matière organique des eaux brutes de lixiviation des échantillons P-T0, E-T1 et E-T4 (kérogène seul + minéraux oxydé à 130°C pendant 62 et 151 jours respectivement).	<b>238</b>
<b>Figure 4-42</b> : Matrices excitation et d'émission des eaux brutes des échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4, vue 2D et vue 3D. Intensité de fluorescence normalisée en %.	<b>240</b>
<b>Figure 4-43</b> : Signal normalisé du FLD à $\lambda_{ex}=310$ nm et $\lambda_{em}=424$ nm en fonction du temps des échantillons P-T0, E-T1, E-T2, E-T3, E-T4 et B-T1.	<b>241</b>
<b>Figure 4-44</b> : Isoplot du signal d'excitation obtenu par le FLD à $\lambda_{em}=424$ nm, pour l'eau brute de l'échantillon E-T1, Rapport d'intensités maximales des fluorophores a/c, à $\lambda_{ex} = 252$ nm, et b/d, à $\lambda_{ex} = 310$ nm pour les échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.	<b>242</b>
<b>Figure 4-45</b> : Signal du FLD à $\lambda_{ex}=310$ nm et $\lambda_{em}=424$ nm normalisé en fonction du temps des échantillons B-T1 et E-T1.	<b>242</b>
<b>Figure 4-46</b> : Diagramme $I_1$ en fonction d' $I_2$ pour l'ensemble des échantillons aqueux des séries naturelles et artificielles.	<b>245</b>
<b>Figure 4-47</b> : Schéma conceptuel de l'oxydation de la matière organique de la formation de Boom.	<b>247</b>
<b>Figure 4-48</b> : Graphique $I_1$ en fonction d' $I_2$ pour l'ensemble des échantillons aqueux, piézomètres, séries naturelles et artificielles.	<b>248</b>

### Liste des tableaux :

<b>Tableau 4-1</b> : Pourcentage d'humidité des échantillons de la galerie (avec un temps d'exposition à l'air croissant de Gal-1 à Gal-6).....	<b>161</b>
<b>Tableau 4-2</b> : Résultats de l'analyse Rock Eval des échantillons P-T0 et Gal-1.....	<b>162</b>
<b>Tableau 4-3</b> : Valeur calculée de la masse de carbone (mg) du CO <sub>2</sub> par gramme du carbone organique (C <sub>CO2</sub> , ‰).....	<b>164</b>
<b>Tableau 4-4</b> : Données Rock Eval des échantillons P-T0, P-Arg-12mois et P-1 mois (erreur analyse : COT ~+/-0.1%, et IH~+/- 10 mg HC/g TOC).....	<b>164</b>
<b>Tableau 4-5</b> : Rock-Eval parameters obtained for artificial oxidation experiments and natural air exposed samples of Boom Clay. TOC = Total organic carbon, HI= Hydrogen Index, OI = Oxygen Index.....	<b>174</b>
<b>Tableau 4-6</b> : Identification of the different compounds in Figure 4-12 and Figure 4-13.....	<b>179</b>
<b>Tableau 4-7</b> : Elemental composition results for Praclay kerogen (K-0) and Rock Eval results for original Praclay Boom Clay (TOC = Total organic carbon, HI= Hydrogen Index, OI = Oxygen Index). .....	<b>190</b>
<b>Tableau 4-8</b> : Proportion du carbone extrait à l'eau par rapport au COT obtenu lors des extractions en « leaching » et au soxhlet des échantillons de la série d'oxydation artificielle et de la série naturelle de la galerie. ....	<b>209</b>
<b>Tableau 4-9</b> : Proportion de carbone présent dans la fraction « fulvic like » et « humic like » pour les échantillons non altérés P-T0 et Gal-1. ....	<b>210</b>
<b>Tableau 4-10</b> : Pourcentage de carbone organique dissous des eaux brutes, de taille inférieure à 3.5 kDa, isolé par dialyse pour les échantillons P-T0, P-6mois, P-18mois, Gal-1, Gal-4 et Gal-6, avec $\%COD_{<3.5kDa} = ((COD_{total} - COD_{>3.5kDa}) / COD_{total}) * 100$ . ....	<b>210</b>
<b>Tableau 4-11</b> : Formules et valeur des rapports a/c, à $\lambda_{ex} = 252 \text{ nm}$ , et b/d, à $\lambda_{ex} = 310 \text{ nm}$ pour les eaux brutes des échantillons de la série artificielle et naturelle. ....	<b>220</b>
<b>Tableau 4-12</b> : Valeur du rapport $vC=O/vC=C$ pour les eaux brutes traitées par SPE des échantillons Gal-1, Gal-4, Gal-6, P-T0, P-6mois et P-18mois. ....	<b>221</b>
<b>Tableau 4-13</b> : Valeur des rapports I <sub>1</sub> et I <sub>2</sub> pour les eaux brutes des différents échantillons de la série naturelle et artificielle. ....	<b>229</b>
<b>Tableau 4-14</b> : Taux de COD =masse de carbone extrait à l'eau (mg C)/gr d'échantillon des échantillons P-T0, B-T1, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.....	<b>234</b>
<b>Tableau 4-15</b> : Pourcentage de carbone organique dissout total, de taille inférieure à 3.5 kDa, isolé par dialyse, pour les eaux brutes des échantillons P-T0, B-T1, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4 avec $\%COD_{<3.5kDa} = ((COD_{total} - COD_{>3.5kDa}) / COD_{total}) * 100$ . ....	<b>235</b>
<b>Tableau 4-16</b> : Valeur des rapports I <sub>1</sub> et I <sub>2</sub> pour les eaux brutes des échantillons P-T0, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4. ....	<b>239</b>

## **CHAPITRE 5. ETUDE DES CONSEQUENCES DE LA BIODEGRADATION ANAEROBIE SUR LA MATIERE ORGANIQUE DE LA FORMATION DE BOOM A MOL.**

### Liste des figures :

<b>Figure 5-1</b> : Schéma conceptuel de l'altération de la matière organique lors de la phase (i) d'excavation de la galerie, (ii) d'exploitation et (iii) de veille après fermeture de la galerie (mise en place des colis).....	<b>265</b>
<b>Figure 5-2</b> : Protocole expérimental des conditions Pristine Clay, Control Experiments et Oxidized Clay. ....	<b>266</b>

<b>Figure 5-3</b> : Exemple d'association des réacteurs pour le temps T1 pour les conditions PC, CE et OC. ....	<b>267</b>
<b>Figure 5-4</b> : Association des réacteurs pour le temps T3 pour les conditions PC, CE et OC. ....	<b>268</b>
<b>Figure 5-5</b> : Protocole d'étude des échantillons de biodégradation. ....	<b>269</b>
<b>Figure 5-6</b> : Concentration en ion sulfure H <sub>2</sub> S dans les réacteurs PC+L et CE+L 28j et 130j après ajout de lactate. ....	<b>270</b>
<b>Figure 5-7</b> : Signal normalisé du DAD à 254 nm entre 9 et 16 min pour la MOD des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate. ....	<b>273</b>
<b>Figure 5-8</b> : Isoplot de fluorescence entre 8 et 15 min de la MOD des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate. ....	<b>274</b>
<b>Figure 5-9</b> : Isoplot de fluorescence de la MOD pour l'échantillon CE+lactate. ....	<b>275</b>
<b>Figure 5-10</b> : Signal normalisé du DAD à 230 nm entre 9 et 16 min de la MOD des échantillons PC pour les temps T0, T4, et avec lactate. ....	<b>275</b>
<b>Figure 5-11</b> : Signal normalisé du DAD à 230 nm entre 9 et 16 min de la MOD des échantillons CE pour les temps T0, T4, et avec lactate. ....	<b>276</b>
<b>Figure 5-12</b> : Signal normalisé du DAD à 230 nm entre 9 et 16 min de la MOD des échantillons OC pour les temps T0, T4, et avec lactate. ....	<b>276</b>
<b>Figure 5-13</b> : Taux d'extrait calculé pour les extraits organiques pour les échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate. ....	<b>277</b>
<b>Figure 5-14</b> : Chromatogramme de la fraction totale des échantillons PC-T0 et PC+ lactate (identification Tableau 5-5). ....	<b>278</b>
<b>Figure 5-15</b> : Chromatogramme de la fraction totale des échantillons CE-T0 et CE+ lactate (identification Tableau 5-5). ....	<b>278</b>
<b>Figure 5-16</b> : Distribution des <i>n</i> -alcanes des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate. ....	<b>279</b>
<b>Figure 5-17</b> : CPI et rapport LMW/HMW des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate. Avec : $LMW/HMW = \frac{\sum (nC_{12}-nC_{20})}{\sum (nC_{21}-nC_{33})}$ . ....	<b>280</b>
<b>Figure 5-18</b> : Distribution des masses de la MOE des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, avec lactate. ....	<b>281</b>
<b>Figure 5-19</b> : Masse moyenne calculée à partir du signal du DAD à 254 nm pour les échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, avec lactate. ....	<b>282</b>

### **Liste des tableaux :**

<b>Tableau 5-1</b> : Composition chimique initiale de l'eau artificielle utilisée pour les expériences de biodégradation déterminée par ICP-AES/IC. ....	<b>265</b>
<b>Tableau 5-2</b> : Résultats du test d'activité bactérienne pour T0, T1, T2, T3, T4 et les échantillons avec du lactate. ....	<b>269</b>
<b>Tableau 5-3</b> : Résultats des analyses en carbone organique dissous en mgC/L, pour les trois conditions, aux temps T0, T1, T2, T3, T4 et SBCW. ....	<b>270</b>
<b>Tableau 5-4</b> : Résultats de l'analyse des eaux par ICP-AES pour les échantillons PC, CE, OC pour les temps T0, T1, T2, T4, T3+L. ....	<b>271</b>
<b>Tableau 5-5</b> : Tableau d'identification des composés des Figure 5-14 et Figure 5-15. ....	<b>277</b>

**Liste des équations :**

**Équation 5-1:** Réduction du sulfate lors de la respiration cellulaire chez les bactéries sulfato-réductrices, avec APS= adénosine phosphosulfate, ATP= adénosine triphosphate et ADP= adénosine diphosphate. .... **264**

**Équation 5-2 :** Oxydation de la pyrite..... **283**

**Équation 5-3 :** Précipitation des hydroxydes de fer ..... **283**

**Équation 5-4 :** Dissolution de la calcite ..... **283**





# **Introduction Générale**



## Introduction Générale

Depuis les années 60, la production d'électricité à partir d'énergie nucléaire s'est largement développée dans de nombreux pays. Ainsi, en Europe, des pays comme la France ou la Belgique produisent la majeure partie de leur électricité à partir de cette énergie (75.2% et 51.7 % respectivement, chiffres 2009 de l'Agence pour l'Energie Nucléaire). Si l'énergie nucléaire présente des avantages (pas de rejet de CO<sub>2</sub>, indépendance vis-à-vis des énergies fossiles), elle génère des déchets radioactifs susceptibles d'avoir des conséquences environnementales et sanitaires. Ces déchets sont classés en fonction de leur durée de vie et leur activité.

**La durée de vie** correspond à la durée pendant laquelle ils émettent des rayonnements.

**L'activité** est la quantité d'énergie libérée par la radioactivité, les déchets peuvent être très faiblement, faiblement (<100 Bq/g), moyennement (10<sup>6</sup>Bq/g) ou hautement radioactifs (10<sup>12</sup>Bq/g). En France, le traitement et le stockage des déchets vont dépendre de ses deux paramètres :

- Les déchets à vie courte, de faible à moyenne activité, sont conditionnés dans des fûts de métal ou de béton, puis stockés dans des centres en surface, ils représentent près de 70% des déchets radioactifs en France ;
- Les déchets à vie longue, de moyenne à haute activité, sont actuellement entreposés de manière provisoire en surface. Des études sont en cours pour étudier différentes possibilités de gestion de ces déchets : transmutation, stockage en surface, stockage en milieu géologique profond. Actuellement, l'évaluation de la faisabilité d'un stockage en milieu géologique fait l'objet de nombreux travaux en prenant, notamment, appui sur des laboratoires souterrains existants (Tournemire) ou creusés spécifiquement pour ces travaux (laboratoire de Bure, en France, et de Mol, en Belgique).

Le stockage en couches géologiques profondes est considéré, actuellement, comme l'un des meilleurs choix pour gérer le stockage des déchets à vie longue, de moyenne à haute activité.

En Belgique, des recherches ont été faites depuis les années 80 autour du site de Mol (Belgique). Le laboratoire souterrain HADES (High Activity Disposal Experimental Site), situé au sein des argiles de la formation de Boom, est le centre de nombreuses études effectuées par le SCK-CEN (Studiecentrum voor Kernenergie - Centre d'Etude de l'énergie Nucléaire) et

## Introduction Générale.

l'ONDRAF/NIRAS (Organisme National belge des Déchets RadioActifs et des matières Fissiles enrichies/ Nationale Instelling voor Radioactief afval verrijkte spijstoffen) afin d'étudier la faisabilité d'un stockage de déchets radioactifs en couche géologique profonde.

Ce type de stockage est basé sur le principe des multi-barrières ; la première barrière est le **colis** contenant le déchet radioactif, la deuxième est la **barrière ouvragée** qui scelle le colis et la troisième correspond à la **roche encaissante**. Avant la mise en place de ce type de stockage, de nombreuses études doivent être menées sur ces trois barrières, et une partie de ces études porte sur les conséquences du changement des conditions *in situ* de la roche encaissante. En effet, l'excavation de la roche encaissante, lors de la construction et la ventilation des galeries du site de stockage va avoir des conséquences sur les différents paramètres minéralogiques, physiques et chimiques de la roche. La formation de Boom à Mol est caractérisée par la présence de pyrite et de matière organique. Une des principales conséquences importantes de la construction des galeries est l'altération de ces deux constituants. En effet, l'eau interstitielle de la roche contient des quantités significatives de Carbone Organique Dissous (COD) et de sulfates (Van Geet *et al.*, 2003). Par exemple, l'étude de la concentration en COD dans le piézomètre Morphéus montre, tout d'abord, de fortes variations du COD comprises entre 80 et 425 mgC/L (Figure 0-1), puis une diminution et une stabilisation de ce dernier au bout d'un an (De Craen *et al.*, 2004). L'origine et le contrôle bio-physicochimiques de ces variations sont actuellement inconnus, mais, les perturbations des conditions *in-situ* de l'argile peuvent être une raison possible à ces observations.

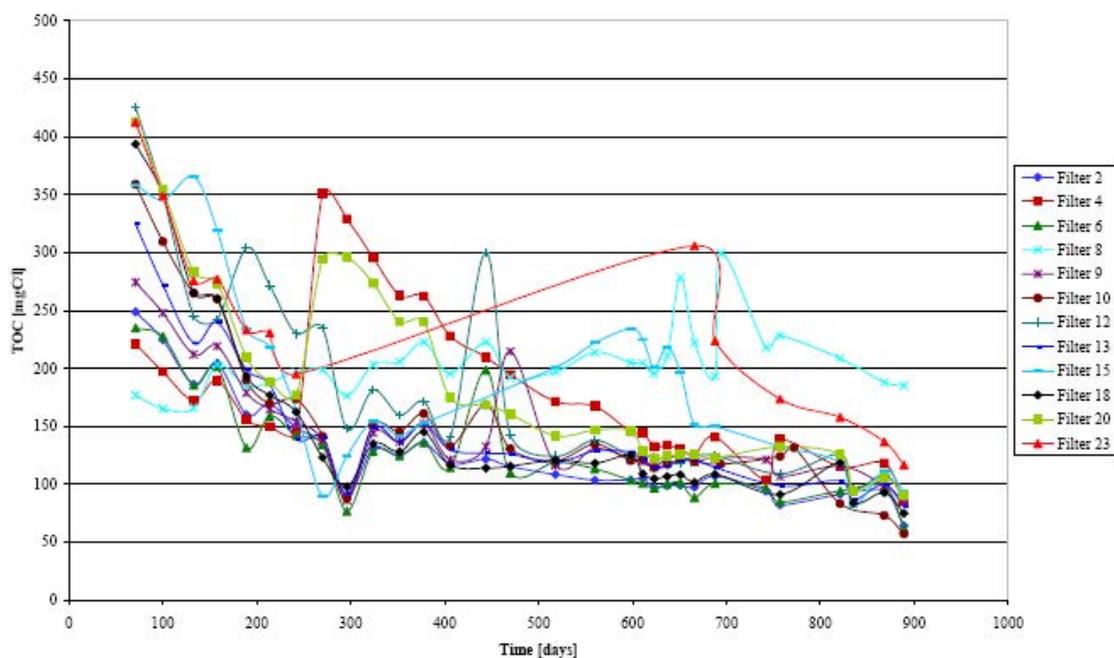


Figure 0-1 : Evolution du COD dans les différents filtres du piézomètre Morphéus en fonction du temps (Van Geet, 2004).

## Introduction Générale.

Une altération de la matière organique par une perturbation oxydante est une voie envisagée par les équipes du SCK-CEN afin d'expliquer ces variations (De Craen *et al.*, 2008).

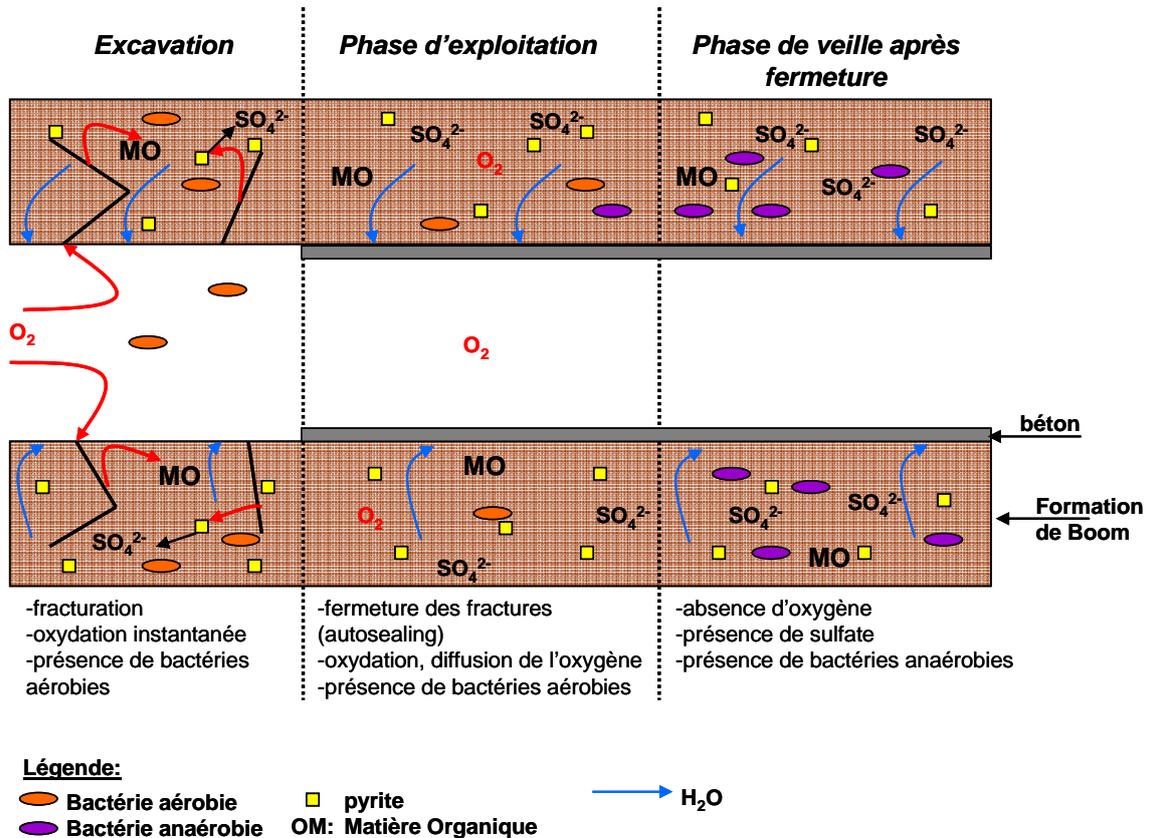


Figure 0-2 : Schéma conceptuel de l'altération de la matière organique lors de la phase (i) d'excavation de la galerie, (ii) d'exploitation et (iii) de veille après fermeture de la galerie (mise en place des colis).

Les processus envisagés peuvent être décrits en trois étapes :

**(i)** Lors du creusement des galeries, la roche encaissante va subir des fracturations et l'oxygène de l'air va entrer en contact avec l'argile (Figure 0-2) (Bastiaens *et al.*, 2007; Van Marcke et Bastiaens, 2010). L'oxygène va entraîner, d'une part, l'oxydation de la pyrite et la production de sulfate et, d'autre part, l'oxydation de la matière organique. De plus, cet environnement va favoriser le développement de bactéries aérobies.

**(ii)** La plasticité de l'argile va permettre la fermeture des fractures (autosealing) et la mise en place de parois en béton va piéger les produits d'oxydation. Cependant, le flux de l'eau vers la galerie va limiter une diffusion des produits oxygénés dans la barrière géologique (Bastiaens *et al.*, 2007; Van Marcke et Bastiaens, 2010). Les bactéries de type aérobies dominent toujours le système bien que quelques bactéries de type anaérobies apparaissent (Figure 0-2).

**(iii)** Les nouvelles conditions anaérobies et la présence de sulfates vont, alors, favoriser le développement de bactéries anaérobies de type sulfato-réductrices qui peuvent avoir des effets sur la matière organique (Figure 0-2).

## Introduction Générale.

La première étape (perturbation oxydante) peut modifier et affecter les propriétés de confinement de la barrière géologique. Des modifications de la matière organique et la pyrite peuvent avoir un effet sur le comportement et la migration des radionucléides au sein de la couche géologique (Bruggeman *et al.*, 2005; Warwick *et al.*, 2005; Bruggeman *et al.*, 2007). C'est pourquoi, il est important d'évaluer l'influence des perturbations telles que l'oxydation à l'air et la biodégradation anaérobie sulfato-réductrice sur la matière organique et, notamment, sur la production d'espèces organiques hydrosolubles.

L'objectif de ce travail de thèse est de contribuer à répondre à ces questions.

Pour cela, quatre types d'échantillons ont été étudiés :

- **Des échantillons de roche naturelles**, prélevés directement dans les galeries du laboratoire du site de Mol et ayant subi des altérations, *in situ*, en conditions réelles ;
- **Des eaux de piézomètres** du site de HADES ;
- **Des échantillons oxydés artificiellement** en laboratoire ;
- **Des échantillons biodégradés** artificiellement en condition anaérobie en laboratoire.

Ainsi, les objectifs de ce travail de thèse ont consisté à :

- (i) Décrire la matière organique hydrosoluble de la formation de Boom à Mol ;
- (ii) Reproduire expérimentalement des séries artificielles d'oxydation à l'air et de biodégradation anaérobie (sulfato-réduction) de l'argile de Boom ;
- (iii) Comparer les séries d'altération naturelle et artificielle de l'argile de Boom ;
- (iv) Etudier les relations entre le degré d'oxydation et/ou de biodégradation de la matière organique de l'argile de Boom et sa capacité à générer des produits organiques hydrosolubles.

Ce travail s'articule en cinq parties :

**Le chapitre 1** est une synthèse bibliographique exposant les principes fondamentaux de la matière organique sédimentaire et de la matière organique hydrosoluble.

## Introduction Générale.

**Le chapitre 2** décrit l'ensemble de techniques utilisées pour étudier la matière organique dans le cadre de ce travail de thèse.

**Le chapitre 3** présente le site de Mol et les échantillons naturels étudiés, et décrit la matière organique hydrosoluble des eaux de piézomètres collectées au laboratoire souterrain de HADES. Ces résultats sont comparés avec les données obtenues lors des expériences présentées dans les parties suivantes.

**Le chapitre 4** traite de la première partie de la problématique, c'est-à-dire de l'impact de l'oxydation sur la matière organique de la formation de Boom et son influence sur la production d'espèces organiques hydrosolubles. Il s'articule en deux sous parties :

- La première partie concerne l'impact de l'oxydation sur la matière organique sédimentaire de la formation de Boom, en comparant, dans un premier temps, une série d'altération naturelle et une série d'oxydation artificielle, puis en étudiant, plus spécifiquement, le rôle du kérogène lors d'une oxydation artificielle ;
- La deuxième partie compare, tout d'abord, le comportement de la fraction hydrosoluble lors d'une oxydation artificielle et d'une altération naturelle, puis, plus en détail, le rôle du kérogène dans la production d'hydrosoluble.

**Le chapitre 5** traite de la deuxième partie de la problématique, c'est-à-dire de l'impact d'une **biodégradation anaérobie** en condition sulfato-réductrice sur la matière organique de la formation de Boom et son influence sur la production d'espèces organiques hydrosolubles.

Enfin, l'ensemble de ces résultats permettront de hiérarchiser le rôle respectif des processus d'altération envisagés dans le cadre de cette thèse (oxydation à l'air / biodégradation anaérobie) et de les replacer dans le contexte du site par comparaison avec les données sur la matière organique hydrosoluble prélevées par les piézomètres installés dans les galeries du site de Mol. Il sera, alors, possible d'affiner les scénarii envisagés par les équipes de recherche du SKC-CEN et de proposer des voies de travaux futurs pour compléter notre compréhension des processus d'altération de la barrière géologique du laboratoire souterrain de Mol.

## Références

- Bastiaens, W., F. Bernier and X. L. Li (2007).** "SEIFRAC: Experiments and conclusions on fracturing, self-healing and self-sealing processes in clays." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32(8-14): 600-615.
- Bruggeman, C., A. Maes and J. Vancluysen (2007).** "The identification of FeS<sub>2</sub> as a sorption sink for Tc(IV)." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 32(8-14): 573-580.
- Bruggeman, C., A. Maes, J. Vancluysen and P. Vandemussele (2005).** "Selenite reduction in Boom clay: Effect of FeS<sub>2</sub>, clay minerals and dissolved organic matter." *Environmental Pollution* 137(2): 209-221.
- De Craen, M., M. V. Geet, M. Honty, E. Weetjens and X. Sillen (2008).** "Extent of oxidation in Boom Clay as a result of excavation and ventilation of the HADES URF: Experimental and modelling assessments." *Physics and Chemistry of the Earth* 33(SUPPL. 1): S350-S362.
- De Craen, M., M. Van Geet, L. Wang and M. Put (2004).** "High sulphate concentrations in squeezed Boom Clay pore water: evidence of oxidation of clay cores." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 29(1): 91-103.
- Van Geet, M. (2004)** "Characterisation of Boom Clay organic matter: mobile and immobile fraction" SCK-CEN-R-3884. p.
- Van Geet, M., N. Maes and A. Dierckx (2003).** "Characteristics of the Boom Clay organic matter, a review. ." *Geological Survey of Belgium, Professional Paper 2003/1* Nr. 298.
- Van Marcke, P. and W. Bastiaens (2010).** "Excavation induced fractures in a plastic clay formation: Observations at the HADES URF." *Journal of Structural Geology* 32(11): 1677-1684.
- Warwick, P., N. Evans, A. Hall, G. Walker and E. Steigleder (2005).** "Stability constants of U(VI) and U(IV)-humic acid complexes." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 266(2): 179-190.





# **Chapitre 1 :**

**La matière organique sédimentaire :  
définitions, description et évolution.**



**SOMMAIRE DU CHAPITRE 1: LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE :  
DEFINITIONS, DESCRIPTION ET EVOLUTION.**

<b>1.1.</b>	<b>LE KEROGENE.....</b>	<b>15</b>
1.1.1.	<i>Définitions .....</i>	<b>15</b>
1.1.2.	<i>Classification du kérogène.....</i>	<b>16</b>
<b>1.2.</b>	<b>LES DIFFERENTS BIOMARQUEURS DE LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE .....</b>	<b>17</b>
1.2.1.	<i>Les hydrocarbures .....</i>	<b>17</b>
1.2.1.1.	Les <i>n</i> -alcane.....	<b>17</b>
1.2.1.2.	Les iso-alcane.....	<b>18</b>
1.2.1.3.	Les terpénoïdes .....	<b>19</b>
1.2.1.3.1.	Les monoterpénoïdes .....	<b>19</b>
1.2.1.3.2.	Les sesquiterpénoïdes .....	<b>19</b>
1.2.1.3.3.	Les diterpénoïdes .....	<b>20</b>
1.2.1.3.4.	Les sesterterpénoïdes .....	<b>20</b>
1.2.1.3.5.	Les triterpénoïdes .....	<b>21</b>
1.2.1.3.5.1.	Les hopanoïdes .....	<b>21</b>
1.2.1.3.5.2.	Autres triterpénoïdes pentacycliques .....	<b>24</b>
1.2.2.	Les stéroïdes .....	<b>25</b>
1.2.3.	Les biomarqueurs aromatiques.....	<b>27</b>
1.2.4.	Les lipides acycliques.....	<b>27</b>
1.2.4.1.	Les acides gras .....	<b>28</b>
1.2.4.2.	Les alcanols.....	<b>28</b>
1.2.5.	La lignine et ses dérivés.....	<b>29</b>
<b>1.3.</b>	<b>LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE .....</b>	<b>31</b>
1.3.1.	<i>Définitions .....</i>	<b>31</b>
1.3.2.	<i>Les substances non humiques .....</i>	<b>32</b>
1.3.2.1.	Les glucides.....	<b>32</b>
1.3.2.2.	Les acides aminés et les protéines .....	<b>33</b>
1.3.2.3.	Les tanins.....	<b>33</b>
1.3.3.	<i>Les substances humiques .....</i>	<b>33</b>
1.3.3.1.	Définitions .....	<b>33</b>
1.3.3.2.	Compositions élémentaires.....	<b>35</b>
1.3.3.3.	Les modèles structuraux .....	<b>36</b>
1.3.3.3.1.	Le modèle polymérique.....	<b>36</b>
1.3.3.3.2.	Le modèle micellaire .....	<b>37</b>
1.3.3.3.3.	Le modèle supramoléculaire.....	<b>37</b>
1.3.3.4.	Propriétés .....	<b>38</b>
<b>1.4.</b>	<b>EVOLUTION DE LA MATIERE ORGANIQUE FOSSILE.....</b>	<b>38</b>
1.4.1.	<i>La biodégradation de la matière organique fossile .....</i>	<b>39</b>
1.4.1.1.	La biodégradation de la MOE.....	<b>39</b>
1.4.1.2.	La biodégradation de la matière organique dissoute fossile .....	<b>42</b>
1.4.1.3.	Contrôle de la biodégradation de la matière organique fossile .....	<b>42</b>
1.4.1.3.1.	Contrôle de la biodisponibilité de la MO .....	<b>43</b>
1.4.1.3.2.	Contrôle de la biodégradabilité de la MO.....	<b>44</b>
1.4.1.3.2.1.	Les paramètres intrinsèques de la MO.....	<b>44</b>

**Chapitre 1. La matière organique sédimentaire: définitions, description et évolution.**

1.4.1.3.2.2. <i>Les propriétés du sol, du sédiment ou du réservoir et de la solution de culture</i> .....	45
1.4.2. <i>Evolution de la matière organique dans les bassins sédimentaires</i> .....	45
1.4.2.1. La diagenèse précoce .....	46
1.4.2.2. Les phases de la maturation thermique.....	47
1.4.3. <i>L'oxydation de la matière organique fossile</i> .....	49
1.4.3.1. L'oxydation naturelle ou « weathering » .....	49
1.4.3.2. L'oxydation artificielle .....	50
1.4.3.3. Rôle des phases minérales .....	51
<b>1.5. CONCLUSION</b> .....	<b>52</b>
<b>1.6. REFERENCES</b> .....	<b>53</b>

## 1. La matière organique sédimentaire : définitions, description et évolution

La matière organique est un constituant des roches sédimentaires, des sédiments et des sols, mais, à l'inverse de la phase minérale, elle n'est présente en règle générale qu'en faible proportion. Elle dérive des organismes vivants tels que les bactéries, le phytoplancton, le zooplancton ou, encore, les végétaux supérieurs (Tissot et Welte, 1978). Les constituants majeurs de ces organismes vivants (lipides, protéines, glucides etc.) sont décomposés, puis dégradés et transformés par différents processus tels que l'oxydation, la biodégradation ou la maturation thermique. L'étude de cette matière organique permet d'apporter des informations sur ses origines, l'environnement dans lequel elle s'est déposée ainsi que son évolution diagénétique.

La matière organique est composée de trois fractions qui se distinguent par leur solubilité dans différents solvants (Figure 1-1):

- **La matière organique extractible** par les solvants organiques usuels (MOE) ;
- **La matière organique dissoute**, extractible à l'eau (MOD);
- **Le kérogène** qui est la fraction insoluble dans les solvants usuels.

La frontière entre la MOD et la MOE n'est pas absolue ; certains composants peuvent être présents dans les deux fractions comme, par exemple, certains acides organiques.

La matière extractible aux solvants organiques peut être, aussi, fractionnée en familles principales (Figure 1-1):

- **Les hydrocarbures** dans lesquels se trouvent :
  - Les hydrocarbures saturés et insaturés, ramifiés et cycliques (*n*-alcane, *n*-alcènes, iso-alcane, iso-alcènes, cyclo-alcane, cyclo-alcènes) ;
  - Les hydrocarbures aromatiques.
- **Les molécules polaires** qui comprennent :
  - Les résines, qui sont des molécules polycycliques contenant des hétéroatomes (N, S, O) dont les masses moléculaires sont comprises entre 300 et 1000 Da ;
  - Les asphaltènes qui comportent un nombre de noyaux aromatiques polycondensés plus important que celui des résines et dont les masses moléculaires s'échelonnent entre 1000 à 10000 Da ou plus.

La matière organique dissoute est, elle aussi, divisée en familles de molécules (Figure 1-1):

- **Les substances non humiques**, dans lesquelles se trouvent les glucides, les protéines, les acides aminés, les lipides, les tanins, la lignine, et les acides gras ;
- **Les substances humiques** solubles dans l'eau qui comprennent :
  - Les acides humiques qui sont les composés insolubles dans l'eau à pH inférieur à 2;
  - Les acides fulviques qui sont les composés solubles dans l'eau quelque soit le pH.

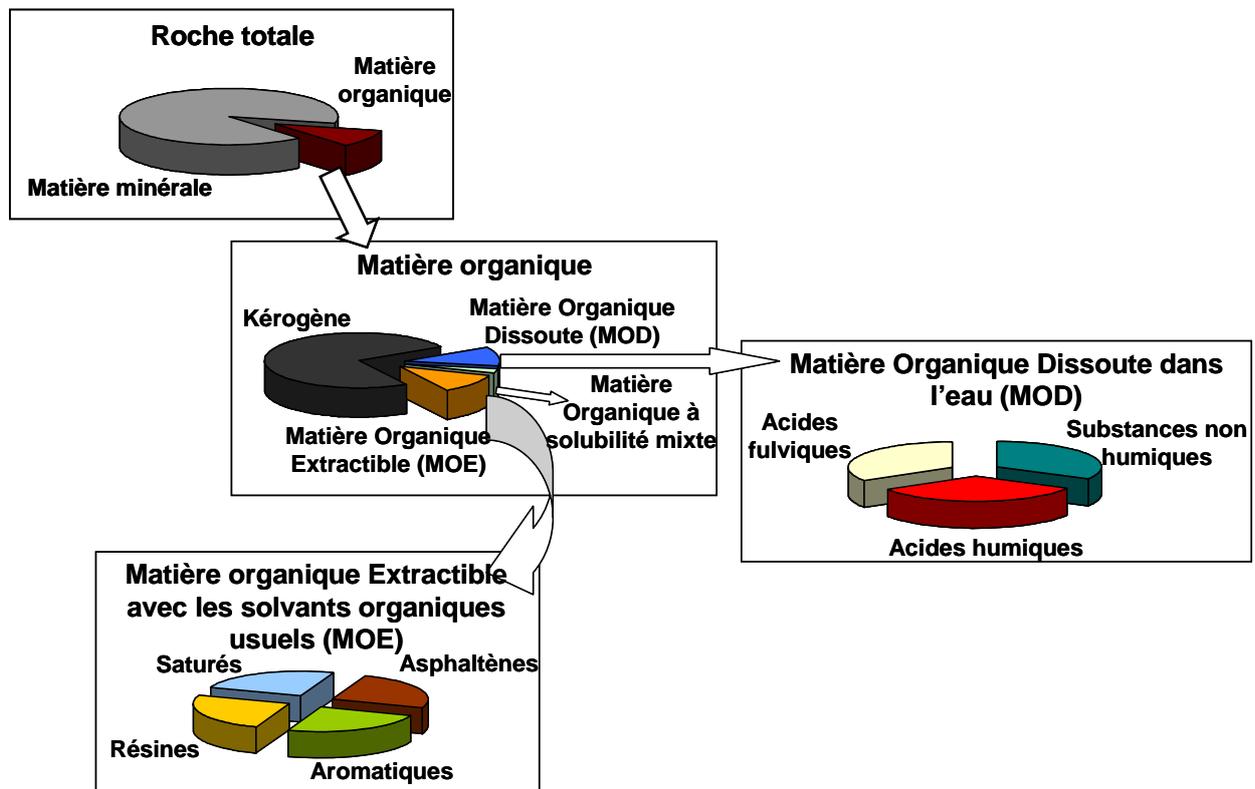


Figure 1-1 : Fractionnement de la matière organique.

Dans le cas des roches sédimentaires, les fractions de la matière organique traditionnellement étudiées sont, d'une part, le kérogène et, d'autre part, la matière organique extractible aux solvants organiques (MOE).

- L'étude du kérogène donne accès à de nombreuses informations telles que le type de matière organique (MO continentale, marine ou lacustre), son degré de maturité thermique en lien avec le potentiel pétrolier ;
- La MOE, quant à elle, contient de nombreux biomarqueurs : ce sont des composés moléculaires organiques dont la structure et la composition chimique

restent similaires ou proches des biomolécules synthétisées par les organismes vivants dont elles dérivent. Ces biomarqueurs sont particulièrement résistants aux processus d'altération (biodégradation – oxydation – maturation thermique). Ils sont progressivement transformés de biomolécules en géomolécules au cours des étapes de diagenèse et catagenèse. Ces biomarqueurs ont été et sont encore, de nos jours, beaucoup étudiés et utilisés en géochimie organique, car ils peuvent fournir des informations précieuses sur (i) les conditions de dépôt et de préservation de la matière organique, (ii) les sources de matières organiques, (iii) les altérations subies au cours des processus de diagenèse et de catagenèse (maturation thermique).

Actuellement, la matière organique dissoute est majoritairement étudiée dans les environnements aquatiques contemporains (lac, rivière, marin) ou les sols. Dans le cadre de roche sédimentaire, il existe beaucoup moins d'études. Ces dernières portent, en général, sur la matière organique dissoute issue d'expérience de lixiviation (Courdouan *et al.*, 2007b; Courdouan *et al.*, 2007a) ou sur ce que l'on appelle l'eau porale extraite par des expériences de compression (De Craen *et al.*, 2004).

## **1.1. Le kérogène**

### **1.1.1. Définitions**

La définition du *kérogène* a évolué depuis que Carruthers *et al.* (1912) ont utilisé, pour la première fois, ce terme. En effet, il a, tout d'abord, été utilisé pour décrire la matière organique dans les roches sédimentaires présentes en faible concentration et capable de produire de l'huile par pyrolyse artificielle ou par chauffage pendant un certain laps de temps (White, 1915). Puis, cette définition a été étendue à l'ensemble de la matière organique capable de générer de l'huile (Trager, 1924). En 1958, Forsman et Hunt (1958) proposent une définition basée sur la procédure expérimentale d'isolation du kérogène : le kérogène est défini, alors, comme toute matière organique dispersée dans les sédiments anciens et insoluble dans les solvants organiques usuels. Cette définition a été étendue à l'ensemble de la matière organique insoluble dans les solvants organiques usuels par Durand et Nicaise (1980), ce qui permet d'inclure les dépôts de matières organiques pures tels que les charbons algaïres (Durand, 1980). Durand et Nicaise (1980) ont, d'ailleurs, mis en place un protocole d'isolation du kérogène qui est toujours utilisé.

### 1.1.2. Classification du kérogène

La structure globale et la composition du kérogène dépendent de la nature des précurseurs biologiques ; ainsi, trois types de kérogène ont été définis à partir de séries de référence (Tissot et Welte, 1978). Les séries ont été placées dans un diagramme similaire à celui utilisé par van Krevelen (H/C at. Versus O/C at.) pour classer les charbons (Van Krevelen, 1961) (Figure 1-2).

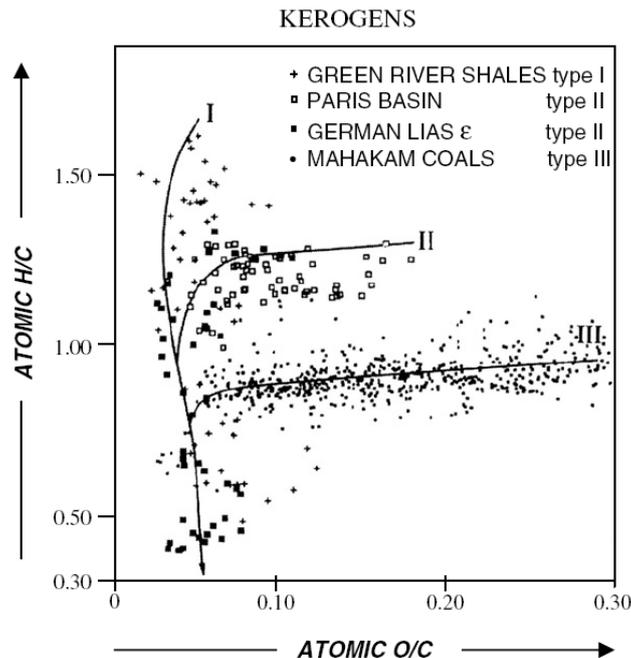


Figure 1-2 : Position de différents kérogènes étudiés dans le diagramme de van Krevelen H/C at. versus O/C at. d'après Vandembroucke, (1993).

- **Les kérogènes de type I** sont représentés par les « Green River Shales » du tertiaire de l'Utah (Etats-Unis). Ils se caractérisent par des rapports atomiques H/C élevés (>1.5) et une faible teneur en oxygène (O/C at. varie de 0.03 à 0.1). Leurs principales origines sont les accumulations algaires en milieu lacustre ou dans certains milieux marins fermés.
- **Les kérogènes de type II** sont représentés par les schistes du Toarcien inférieur du bassin de Paris (France). Ils présentent des rapports atomiques H/C plus faibles et O/C plus forts que les kérogènes du type I. Leur composition chimique est plus aromatique, mais les composés aliphatiques restent encore abondants (Behar et Vandembroucke, 1987). Ces kérogènes dérivent de zooplanctons, phytoplanctons et de microflore bactériennes (Tissot et Welte, 1978).
- **Les kérogènes de type III** sont représentés par les shales du Crétacé supérieur du bassin de Douala (Cameroun). Ils se caractérisent par des rapports atomiques H/C faibles (<1) et une teneur en oxygène importante (Albrecht *et al.*, 1976). Leur

structure est plus aromatique et comprend de nombreux groupements fonctionnels oxygénés. Les précurseurs de ces kérogènes sont dérivés des végétaux supérieurs d'origine continentale, sédimentés dans un environnement fluvial ou deltaïque.

## **1.2. Les différents biomarqueurs de la matière organique sédimentaire**

La MOE contient de nombreux biomarqueurs, parmi lesquels peuvent être cités :

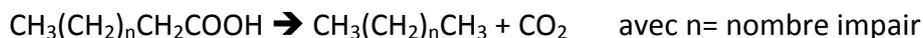
- Les hydrocarbures qui comprennent les *n*-alcanes, les *iso*-alcanes, les terpénoïdes ;
- Les stéroïdes ;
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques ;
- Les lipides acycliques ;
- Des biomolécules tels que la lignine et ses dérivés.

### **1.2.1. Les hydrocarbures**

#### **1.2.1.1. Les *n*-alcanes**

Les *n*-alcanes sont constitués d'une chaîne carbonée linéaire sans aucune ramification. La distribution des *n*-alcanes peut apporter des informations sur les sources de la matière organique, notamment en mettant en relief les contributions marines et continentales.

La cire cuticulaire des végétaux supérieurs contient des *n*-alcanes provenant de la décarboxylation enzymatique des acides gras selon l'équation suivante (Équation 1-1):



**Équation 1-1 : Réaction de décarboxylation enzymatique des acides gras.**

Cette réaction provoque la perte de l'atome de carbone portant le groupement acide carboxylique ; c'est pourquoi, les *n*-alcanes présents dans les végétaux supérieurs ont un nombre de carbone impair (Killops et Killops, 2005). Le Carbone Preference Index (CPI) est un rapport, défini par Bray et Evans (1961), permettant de déterminer, de manière quantitative, l'importance de la prédominance des *n*-alcanes au nombre de carbone impair sur les *n*-alcanes au nombre de carbone pair. Ce rapport est calculé pour les *n*-alcanes ayant un nombre de carbone compris entre 24 et 34. Le CPI se calcule de la manière suivante (Équation 1-2):



La proportion relative du phytane et du pristane dépend des conditions rédox des milieux de dépôts sédimentaires. En effet, un milieu réducteur/anoxique va favoriser la réduction de la chaîne phytol en phytane, alors qu'un milieu oxydant va conduire à la transformation du phytol en pristane (Johns, 1986, Peters et Moldowan, 1993). Le rapport pristane/phytane (Pr/Ph) est souvent utilisé comme traceur des conditions redox du milieu de sédimentation : des valeurs inférieures à 1 indiquent un milieu plutôt réducteur et des valeurs supérieures à 1 un milieu oxydant.

### **1.2.1.3. Les terpénoïdes**

Les terpénoïdes ou géoterpénoïdes sont issus de la diagénèse des bioterpénoïdes. Ces derniers sont des lipides avec une grande diversité de structures (linéaires ou cycliques), de fonctionnalités chimiques (alcool, aldéhydes, cétones etc.) et de fonctionnalités biologiques. Ces molécules proviennent de l'assemblage d'unités isoprènes (Figure 1-4-A) et sont classées selon le nombre d'unité qu'elles contiennent. Au cours de la diagénèse, les groupements fonctionnels sont progressivement éliminés et les cycles sont soit aromatisés, soit hydrogénés.

#### **1.2.1.3.1. Les monoterpénoïdes**

Les monoterpénoïdes sont formés de deux unités isoprènes (Figure 1-4-B) ; ils sont particulièrement abondants dans les algues et les plantes. Ils sont très volatiles ; de ce fait, ils sont très mal fossilisés dans les sédiments.

#### **1.2.1.3.2. Les sesquiterpénoïdes**

Ils sont constitués de trois unités isoprènes et sont, essentiellement, présents dans la nature au sein des huiles essentielles. La plupart des sesquiterpénoïdes sont synthétisés par les plantes (Killops et Killops, 2005) et les précurseurs des géosesquiterpénoïdes sont, en général, les résines des plantes supérieures (Simoneit *et al.*, 1986). Cependant, seules quelques classes de sesquiterpénoïdes sont observées dans les sédiments et les roches sédimentaires : on peut citer les drimanes, les eudesmanes, les bisabolanes et les cadinanes (Figure 1-4-C).

### 1.2.1.3.3. Les diterpénoïdes

Ils sont constitués de quatre unités isoprènes et proviennent, principalement, de la résine des conifères. Ils possèdent, en général, deux à trois cycles, mais certains, comme le phytol, sont acycliques. Les principales classes observées dans les sédiments sont les labdanes, les podocarpanes, les adiétones, les pimaranes, les bényranes, les phyllocladanes et les kauranes (Simoneit et al., 1986) (Figure 1-4-D).

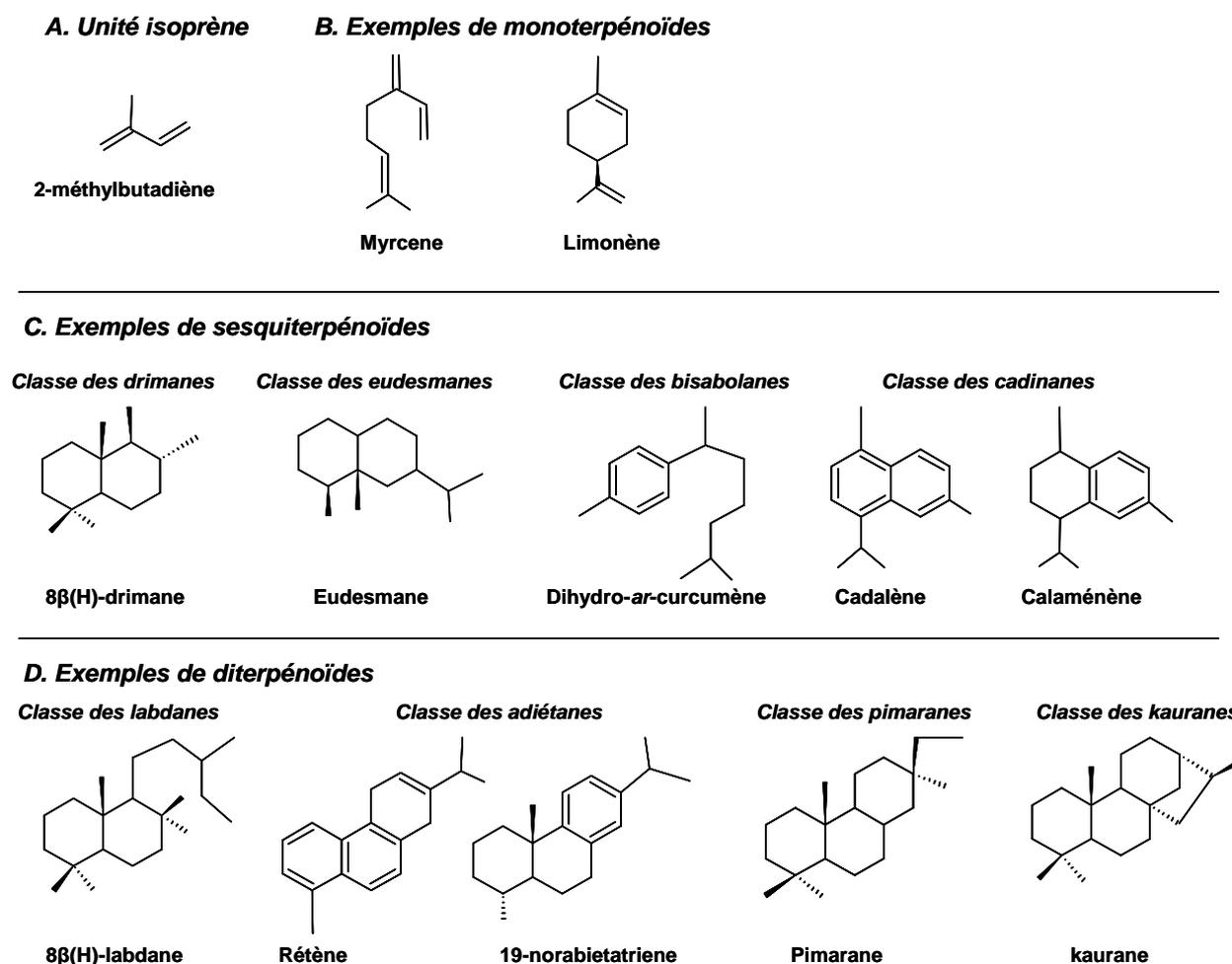


Figure 1-4 : A) Structure de l'unité isoprène, B) Exemples de monoterpénoïdes, C) Exemples de biomarqueurs de la famille des sesquiterpénoïdes, D) Exemples de biomarqueurs de la famille des diterpénoïdes.

### 1.2.1.3.4. Les sesterterpénoïdes

Les sesterterpénoïdes cycliques sont très peu synthétisés par les êtres vivants et, par conséquent, sont très peu observés dans la matière organique sédimentaire. Quelques sesterterpénoïdes linéaires ont été observés, dans des cultures de diatomées, sous la forme

d'alcènes branchés acycliques contenant entre trois et cinq doubles liaisons (Volkman et al., 1994, Belt et al., 2001) (Figure 1-5).

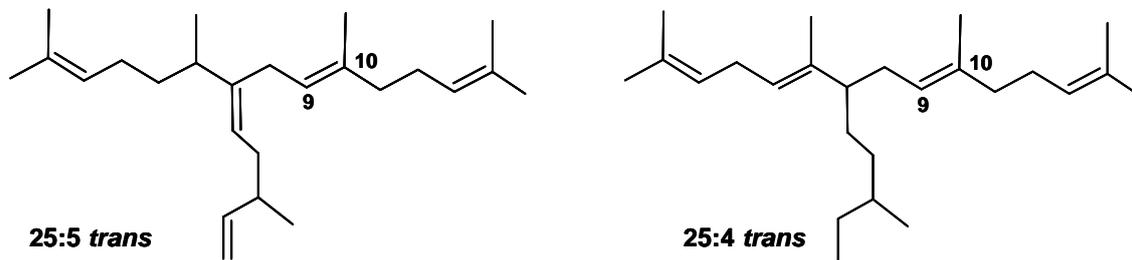


Figure 1-5 : Exemple de sesterterpénoïdes acycliques observés dans des cultures de diatomées d'après Belt et al. (2001).

#### 1.2.1.3.5. Les triterpénoïdes

Les triterpénoïdes contiennent six unités isoprènes et dérivent du squalène (isoprénoïde acyclique,  $C_{30}H_{50}$ ). Ils peuvent être composés de quatre ou cinq cycles. Parmi les triterpénoïdes à cinq cycles, les plus communs sont : les hopanoïdes, les oléanoïdes, les ursanoïdes et les lupanoïdes.

##### 1.2.1.3.5.1. *Les hopanoïdes*

Les hopanoïdes possèdent cinq cycles hydrocarbonés (Figure 1-6A) et leur cycle E contient cinq atomes de carbone. Les hopanoïdes se distinguent, entre eux, par leurs nombres de carbone, leurs différentes configurations dans l'espace des carbones  $C_{17}$ ,  $C_{21}$ ,  $C_{22}$  et la présence ou non d'insaturation.

Les carbones  $C_{17}$  et  $C_{21}$  portent des hydrogènes et le carbone n°21 peut être lié à une chaîne hydrocarbonée. Si leurs hydrogènes respectifs se situent au-dessus du plan de projection 3D de la molécule, ils seront dits en position  $\beta$ . En revanche, s'ils se situent en-dessous du plan de projection 3D de la molécule, ils seront dits en position  $\alpha$  (Figure 1-6B). De cette façon, il est possible d'obtenir quatre configurations dites :  $17\beta(H)$ ,  $21\alpha(H)-$ ,  $17\beta(H)$ ,  $21\beta(H)-$ ,  $17\alpha(H)$ ,  $21\alpha(H)-$ ,  $17\alpha(H)$ ,  $21\beta(H)-$  (Figure 1-6C).

Le carbone n°22 est un carbone dit asymétrique, ce qui permet d'obtenir deux stéréoisomères (molécules images l'une de l'autre dans un miroir, mais non superposables) avec une configuration dite 22R et une configuration dite 22S (Figure 1-7).

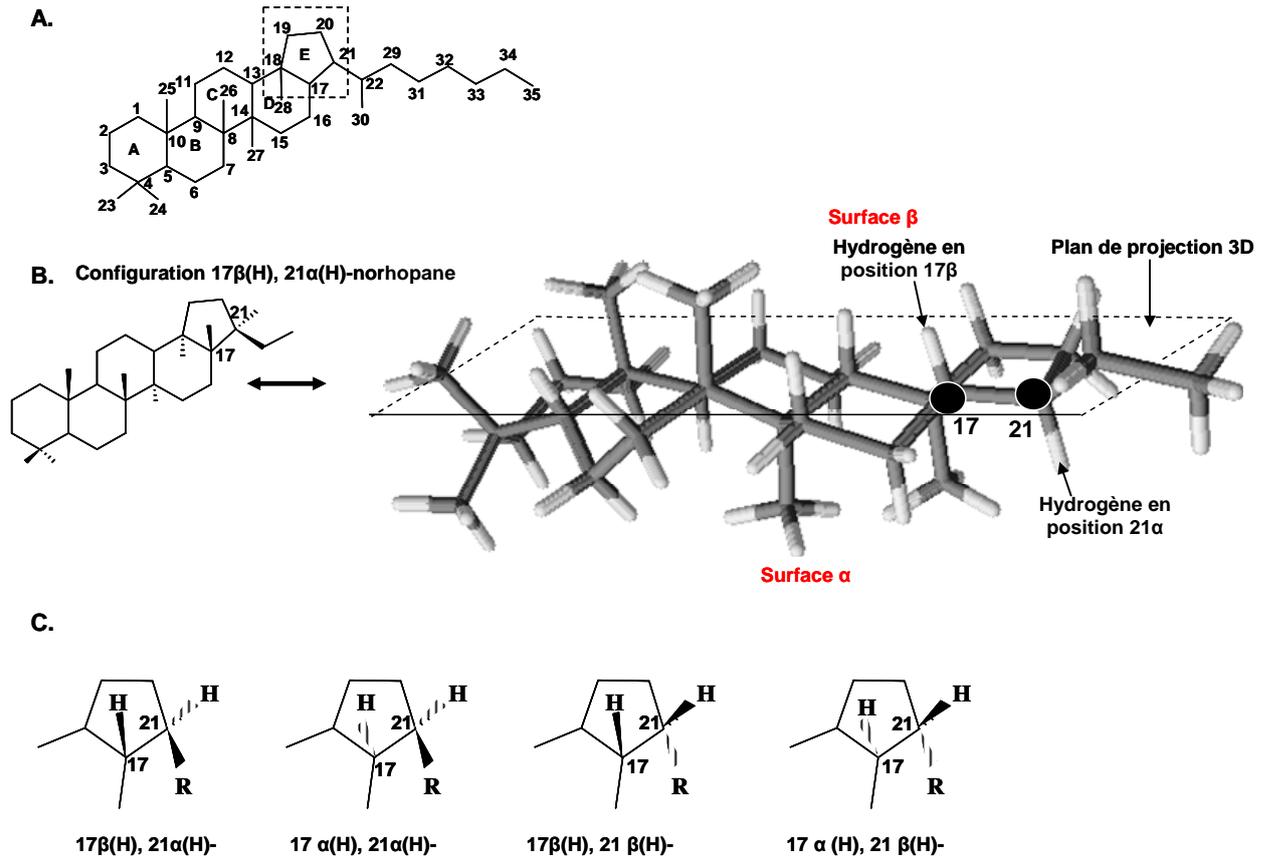


Figure 1-6 : A) Représentation du squelette hydrocarboné des hopanoïdes, B) Explication de la configuration  $\beta$  et  $\alpha$  des hopanes avec, pour exemple, le 17 $\beta$ (H), 21 $\alpha$ (H)-norhopane , C) Diverses configurations des hopanes.

Les hopanoïdes possédant une insaturation sont appelés hopènes ; les carbones portant l'insaturation sont rappelés dans l'énoncé du nom de la molécule. Ainsi, pour le hop-17(21)-ène (Figure 1-8), l'insaturation se trouve entre le carbone n°17 et 21.

Les géohopanes dérivent, essentiellement, des bactériohopanepolyols synthétisés par les bactéries comme, par exemple, le bactériohopanetetrol (Figure 1-8). Le diploptène et le diploptérol (Figure 1-8) peuvent, aussi, être des précurseurs des hopanoïdes. Ces molécules participent à la rigidité de la paroi cellulaire bactérienne et sont présentes dans toutes les cellules de type procaryote (bactérie, algue verte, algue bleue etc.). Quelques plantes synthétisent des hopanoïdes comme les fougères ou les lichens (Ourisson *et al.*, 1982), mais elles ne constituent qu'une source mineure par rapport à la source bactérienne.

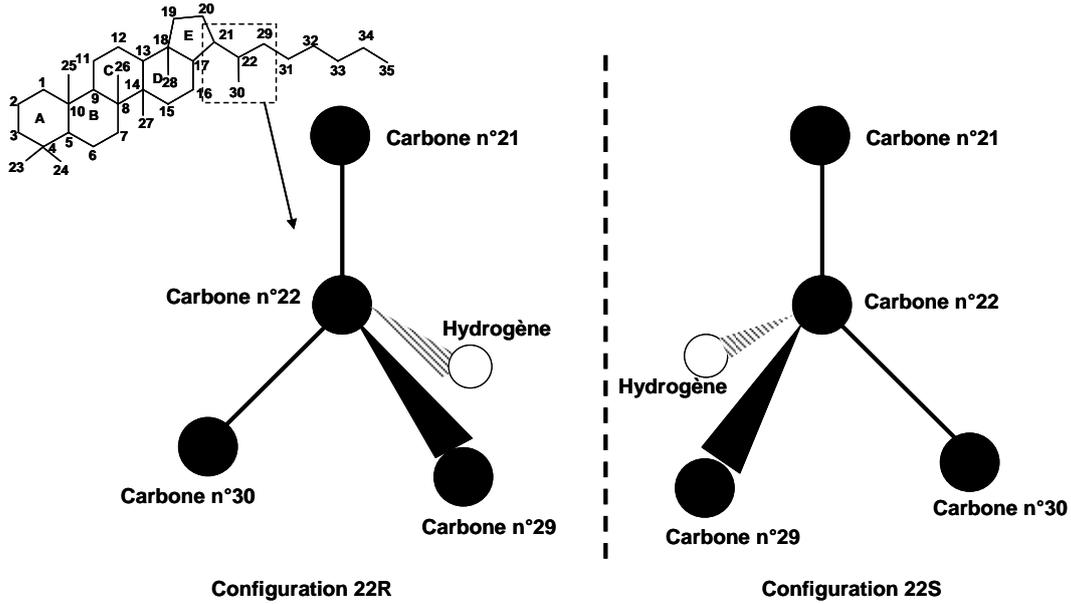


Figure 1-7 : Disposition des substituants sur le carbone 22 conduisant aux deux isomères R et S.

Au cours de la diagénèse, les hopanes perdent leurs groupements fonctionnels en gardant, toutefois, la structure pentacyclique et la chaîne latérale dont la longueur peut varier. La préservation de la chaîne latérale serait fonction des conditions réductrices du milieu ; de ce fait, la prédominance des C<sub>35</sub>-hopanes sur les C<sub>34</sub>-hopanes serait un indicateur d'un milieu réducteur (Peters et Moldowan, 1993, Philp et Mansuy, 1997).

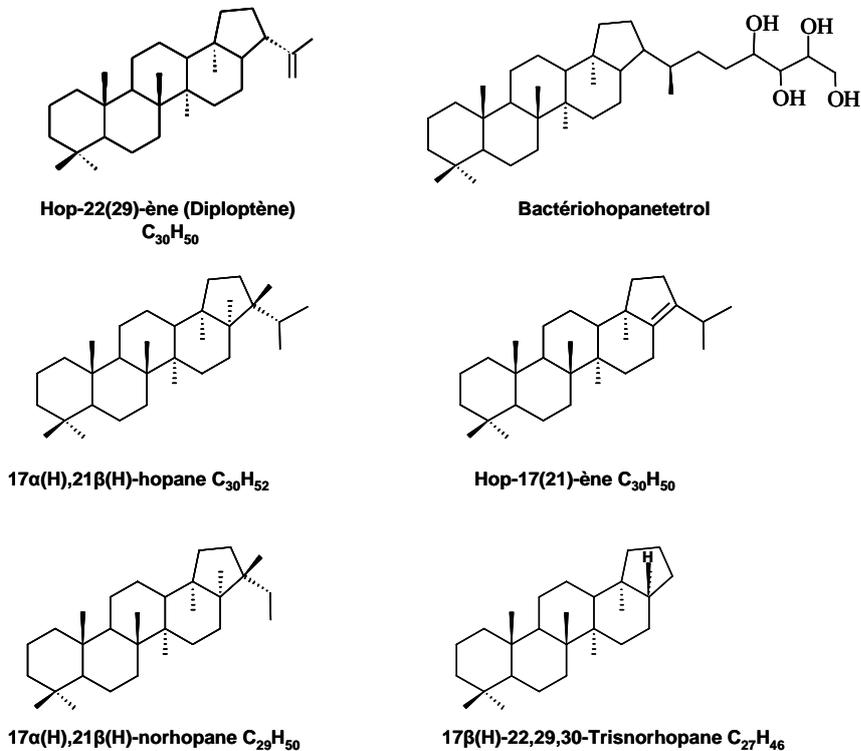


Figure 1-8 : Exemples d'hopanoïdes.

Les hopanoïdes sont, essentiellement, des marqueurs bactériens. Cependant, leur configuration évolue, au cours de la diagénèse, ce qui permet de définir la maturité de la matière organique (Seifert et Moldowan, 1981, Tissot et Welte, 1978, Peters et Moldowan, 1993). En effet, immédiatement après leur dépôt, les hopanoïdes présentent une configuration dite biologique correspondant à la configuration 22R-17 $\beta$ (H), 21 $\beta$ (H). Cette configuration est thermodynamiquement instable et elle est convertie en configuration dite géologique et correspond à la configuration 22R-17  $\alpha$ (H), 21  $\beta$ (H). La configuration 22R-17 $\beta$ (H), 21 $\alpha$ (H) est intermédiaire et les hopanes, présentant cette configuration, sont appelés morétane. La maturation thermique favorise l'apparition de l'isomère 22S au détriment de l'isomère 22R moins stable thermiquement.

#### 1.2.1.3.5.2. Autres triterpénoïdes pentacycliques

Les autres principaux triterpénoïdes appartiennent aux oléanoïdes, ursanoïdes et lupanoïdes (Figure 1-9). Ils dérivent de biotriterpénoïdes synthétisés par les angiospermes et, plus accessoirement, par certaines fougères. On les trouve dans les sédiments d'âge inférieur au Crétacé supérieur (Henderson *et al.*, 1969).

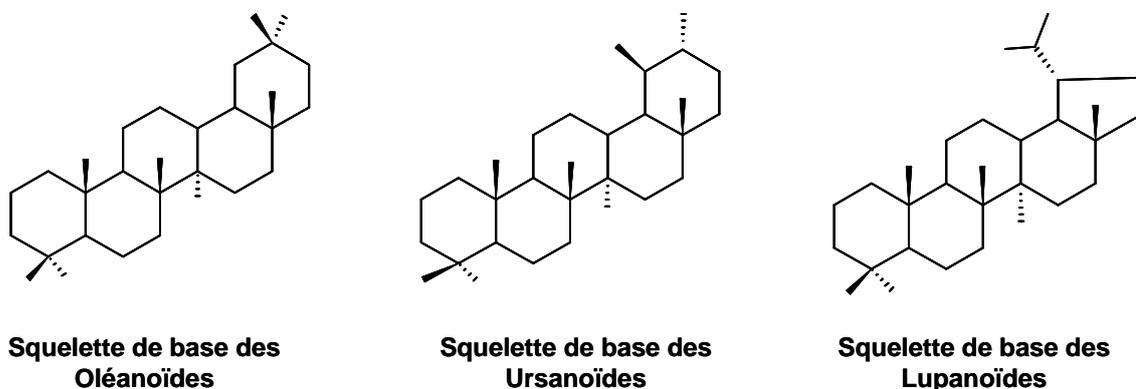


Figure 1-9 : Squelette hydrocarboné des familles des Oléanoïdes, Ursanoïdes et Lupanoïdes.

Un autre triterpénoïde pentacyclique important est le Gammacérane. Il dérive du tetrahymanol qui est synthétisé par certains ciliés lorsqu'ils se nourrissent de bactéries telles que les *Chlorobiaceae* (Haven *et al.*, 1989, Harvey et McManus, 1991). Cette molécule est très résistante à la biodégradation et on la trouve dans de nombreuses roches mères (Seifert *et al.*, 1984). Le Gammacérane est, souvent, présent dans les dépôts évaporitiques déposés en milieu hypersalin (Philp et Zhaoan, 1987, Jiamo *et al.*, 1986).

### 1.2.2. Les stéroïdes

Les stéroïdes dérivent de l'oxydation enzymatique du squalène suivie d'une cyclisation. Ils sont constitués de 26 à 30 atomes de carbone et présentent une grande diversité de structure : cette dernière reflète, d'une part, la multitude des sources biologiques (algues, plantes, zooplancton etc.) et, d'autre part, la diversité des modifications structurales s'opérant au cours de la diagénèse.

Les stérols sont des stéroïdes qui sont  $\beta$ -hydroxylés en C3 et qui possèdent une chaîne aliphatique branchée sur le cycle D (Figure 1-10) ; de plus, s'ils possèdent une insaturation sur les carbones C5 et C6, il s'agit de sténols, sinon, il s'agit de stanols.

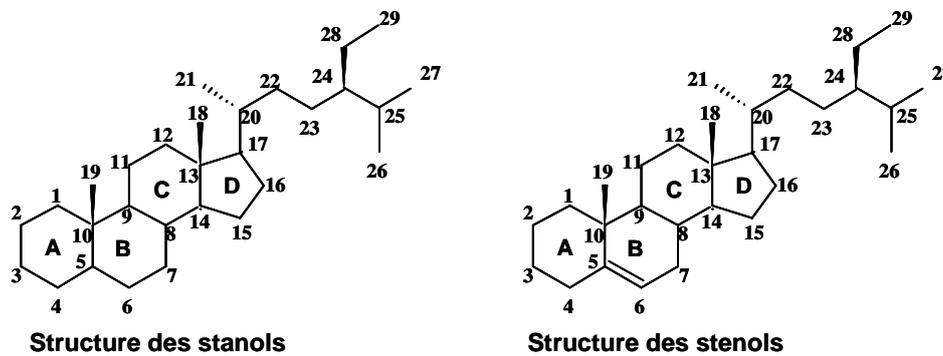


Figure 1-10 : Représentation du squelette hydrocarboné des stéroïdes sans insaturation (stanol) et avec une insaturation (sténol).

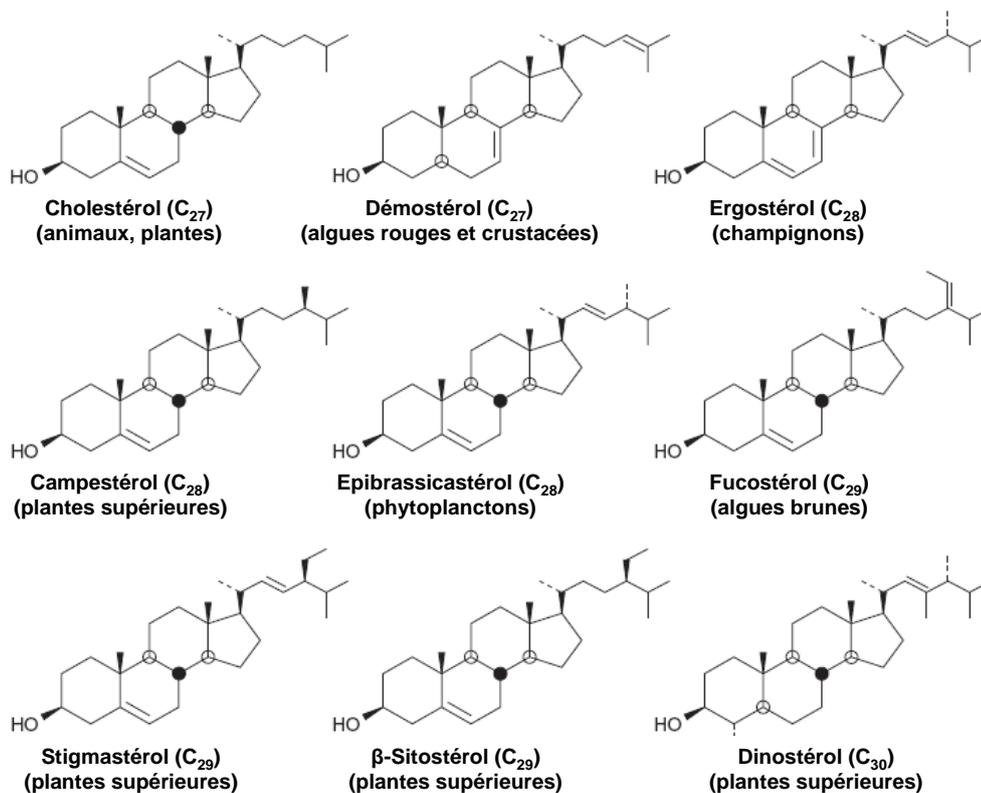


Figure 1-11 : Exemples de stérols et leurs sources majeures d'après Killops et Killops (2005).

Les stérols sont abondants dans les plantes et les animaux (Figure 1-11) ; ils participent à la rigidité des membranes cellulaires et à leur perméabilité. Le nombre de carbone peut donner des informations sur leurs sources (Huang et Meinschein, 1979): les plantes supérieures sont riches en stérols en C<sub>29</sub>, mais peuvent contenir quelques stérols en C<sub>28</sub>; les animaux et les algues, pour leur part, contiennent plutôt des stérols avec 27 carbones. Huang *et al.* (1979) ont tracé un diagramme ternaire C<sub>27</sub>:C<sub>28</sub>:C<sub>29</sub> stérols qui permet de discriminer les environnements de dépôts en fonction de la composition en stérols (Figure 1-12).

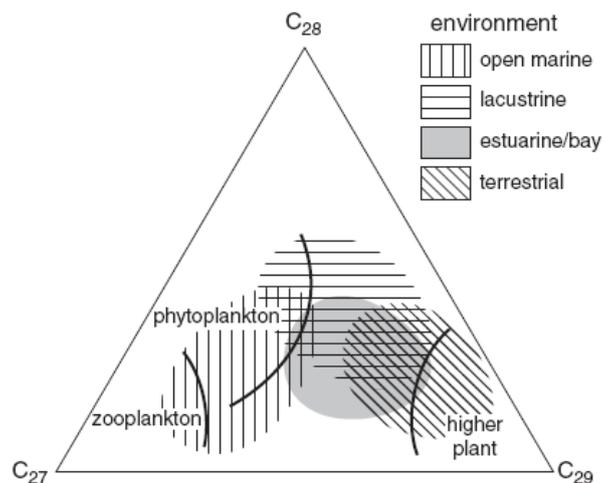


Figure 1-12 : Relation entre la composition en stérol C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub> et C<sub>29</sub> et les environnements de dépôts d'après Huang *et al.* (1979) et Killips et Killips (2005).

Au cours de la diagénèse, les stérols subissent différentes modifications sans, pour autant, perdre de carbones: la principale modification est la perte du groupement hydroxyle qui permet la formation d'hydrocarbures saturés ou aromatiques. Ces transformations donnent, tout d'abord, des stérènes par déhydroxylation, puis par hydrogénation, des stéranes (Wolff *et al.*, 1986; Wakeham, 1987). Les stérènes et les stéranes sont, donc, des marqueurs de la diagénèse précoce. Ces derniers peuvent, ensuite, subir des réarrangements catalysés par les argiles pour donner des diastérènes. Enfin, au cours de la diagénèse tardive, ces molécules donnent des diastéranes (Rubinstein *et al.*, 1975; Sieskind *et al.*, 1979).

Comme pour leurs précurseurs, les stérènes, les stéranes, les diastérènes et les diastéranes permettent de décrire les environnements de dépôts (Huang et Meinschein, 1979) :

- Les molécules en C<sub>27</sub>, comme, par exemple, le cholestane (Figure 1-13), dérivent, essentiellement, du cholestérol et leur origine est essentiellement marine (algues et planctons) ;

## Chapitre 1. La matière organique sédimentaire: définitions, description et évolution.

- L'origine des molécules en C<sub>28</sub> (Figure 1-13) est assez diversifiée (champignons, plancton, algues). Elles sont présentes dans les sédiments dont l'environnement de dépôts est de type lacustre ;
- Les molécules en C<sub>29</sub> dérivent des C<sub>29</sub>-stérols (Figure 1-13) et ont, essentiellement, pour origine les plantes supérieures ;
- Certaines molécules en C<sub>30</sub> tels que le 24-*n*-propylcholestane et le 24-*iso*-propylcholestane sont des marqueurs spécifiques de certaines éponges et algues marines (McCaffrey *et al.*, 1994) ;
- Le dinostérane (Figure 1-13) ainsi que les C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> et C<sub>30</sub> 4-méthylstéranes sont des marqueurs typiques des dinoflagellés (Robinson *et al.*, 1984, Summons *et al.*, 1987).

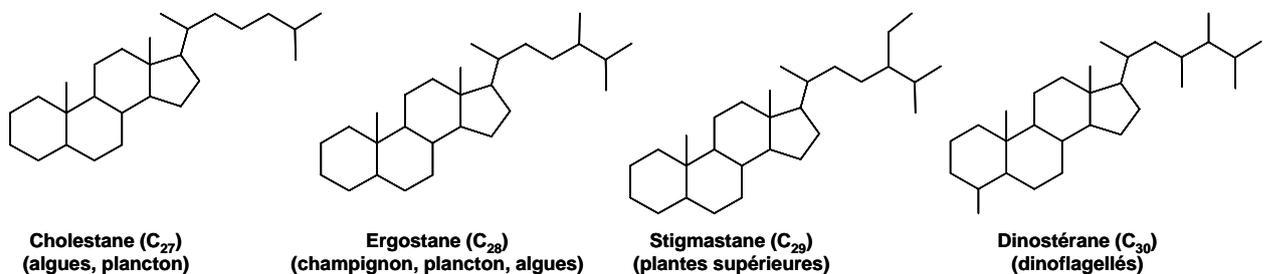


Figure 1-13 : Exemples de stéranes.

### 1.2.3. Les biomarqueurs aromatiques

Les biomarqueurs aromatiques proviennent de la réorganisation de biomolécules non aromatiques (Moldowan et Fago, 1986). Ces molécules peuvent conserver les signatures caractéristiques des organismes précurseurs et, ainsi, donner des informations sur leurs sources comme, par exemple, les hopanoïdes aromatiques (précurseurs bactériens) ou certains composés aromatiques tétra ou pentacycliques (contribution des végétaux supérieurs) (Loureiro et Cardoso, 1990).

### 1.2.4. Les lipides acycliques

Les lipides sont des composés définis par leur caractère hydrophobe ; ils sont non extractibles à l'eau et extractibles aux solvants organiques tels que le chloroforme, l'hexane, le toluène ou l'acétone.

### 1.2.4.1. Les acides gras

Les acides gras sont des molécules amphiphiles possédant une tête hydrophile (groupement acide carboxylique) et une queue hydrophobe (la chaîne carbonée). De manière générale, la chaîne hydrocarbonée est formée de 12 à 36 atomes de carbone et peut contenir une à plusieurs insaturations chez les plantes (on les nomme, alors, les acides *n*-alcénoïques). Chez les animaux, la chaîne hydrocarbonée est saturée ; les acides gras sont nommés acides *n*-alcanoïques. Ils possèdent une nomenclature particulière : le nom de l'acide gras comprend, ainsi, le nombre de carbone qu'il possède, le signe « : » et le nombre d'insaturation qu'il comporte. Le degré d'insaturation est suivi de la notation *w**x*, dans laquelle *x* est la position de l'insaturation par rapport au carbone aliphatique terminal. Les préfixes « *a* » et « *i* » indiquent la présence d'un substituant méthyle en position *anteisio* (troisième carbone à partir du carbone aliphatique terminal) et *iso* (deuxième carbone à partir du carbone aliphatique terminal) (Killops et Killops, 2005).

Chez les animaux, les acides gras majoritaires sont les acides *n*-alcanoïques en C<sub>16</sub> et C<sub>18</sub> alors que, chez les végétaux, la distribution est dominée par l'acide *n*-alcénoïque en C<sub>18</sub> portant une à plusieurs insaturations. Les végétaux supérieurs possèdent une distribution des acides *n*-alcanoïques caractéristique, dominée par une forte abondance du C<sub>16</sub> et une prédominance des acides *n*-alcanoïques à carbone pair entre le C<sub>20</sub> et le C<sub>30</sub> (Rielley et al., 1991, Eglinton et Hamilton, 1967). Selon les organismes, les acides gras dominants seront différents. Quelques distributions sont présentées ci-dessous (Tableau 1-1):

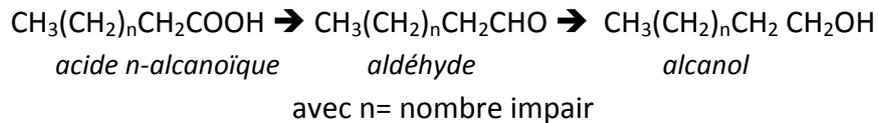
Organismes	Acides gras dominants	Références
<b>Cyanobactérie</b>	C <sub>16:0</sub> , C <sub>16:1w7</sub> , C <sub>18:1w9</sub> , C <sub>18:2w9</sub> , C <sub>18:3</sub> , C <sub>18:4</sub>	Kenyon (1972), Kenyon <i>et al.</i> (1972), Cohen <i>et al.</i> (1995)
<b>Bactérie marine Gram-négative</b>	C <sub>18:1w7</sub>	Oliver et Colwell (1973)
<b>Actinomycètes, Bactérie halophile</b>	Acide 10-méthylotadécanoïque	Jakobsen <i>et al.</i> (2006), Sorokin <i>et al.</i> (2006)
<b>Bactérie Gram-positive</b>	<i>α</i> -C <sub>15:0</sub> , <i>i</i> -C <sub>15:0</sub>	Kates (1964)
<b>Bactérie sulfato-reductrice</b>	Acide 10-méthylhexadécanoïque, <i>i</i> - C <sub>17:1w7</sub>	Boon <i>et al.</i> (1977), Orphan <i>et al.</i> (2001), Londry <i>et al.</i> (2004)
<b>Diatomée</b>	C <sub>16:4</sub>	Volkman <i>et al.</i> (1998)
<b>Végétaux supérieurs</b>	C <sub>16</sub> , acides <i>n</i> -alcanoïques paires n>20	Eglinton et Hamilton (1967), Rielley <i>et al.</i> (1991)

Tableau 1-1 : Distribution des acides gras chez quelques organismes.

### 1.2.4.2. Les alcanols

Les alcanols sont des composés amphiphiles dont la tête hydrophile est constituée d'un groupement alcool et la queue hydrophobe d'une chaîne hydrocarbonée. Les alcanols sont

biosynthétisés dans les cires des végétaux par réduction enzymatique des acides gras, selon la réaction ci-dessous (Killops et Killops, 2005)(Équation 1-3):



Équation 1-3 : Réaction de réduction enzymatique des acides *n*-alcanoïques.

Cette réaction conduit à une prédominance des alcanols pairs sur les alcanols impairs comme pour les acides gras. Les longueurs des chaînes hydrocarbonées varient selon les sources. En effet, la cire des spores contient des alcanols ayant entre 18 et 20 atomes de carbone (Albro, 1976), alors que les chaînes des alcanols des cires des organismes aquatiques sont plus courtes (moins de 22 atomes de carbone)(Weete, 1976; Bradshaw et Eglinton, 1993). Par exemple, les alcanols comportant 16 et 18 atomes de carbones sont majoritaires chez les algues (Bradshaw *et al.*, 1989). La cire cuticulaire des végétaux supérieurs contient des alcanols ayant entre 22 et 32 atomes de carbone (Rielley *et al.*, 1991; Rommerskirchen *et al.*, 2006).

### 1.2.5. La lignine et ses dérivés

La lignine est un biopolymère synthétisé par les plantes qui participe à la rigidité de la paroi cellulaire. C'est une molécule de haut poids moléculaire formée par des réactions de condensation entre les polyphénols suivants : l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Alder, 1977) (Figure 1-14-A). La lignine peut, alors, être divisée en trois sous-unités : l'unité *p*-hydroxyphényle (H), l'unité guaïacyle (G) et l'unité syringyle (S). Elles sont issues, respectivement, de l'alcool *p*-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique (Figure 1-14-B). La lignine résulte d'une polymérisation entre ses trois sous-unités, liées entre elles par deux types de liaison : les liaisons  $\beta$ -O-4 et les liaisons biphényles (Figure 1-14-C). Si l'ensemble des auteurs s'accordent sur les sous-unités de base de la lignine, sa structure générale n'est, actuellement, pas encore déterminée et fait encore débat (Kogel-Knabner, 2002, Banoub et Delmas, 2003).

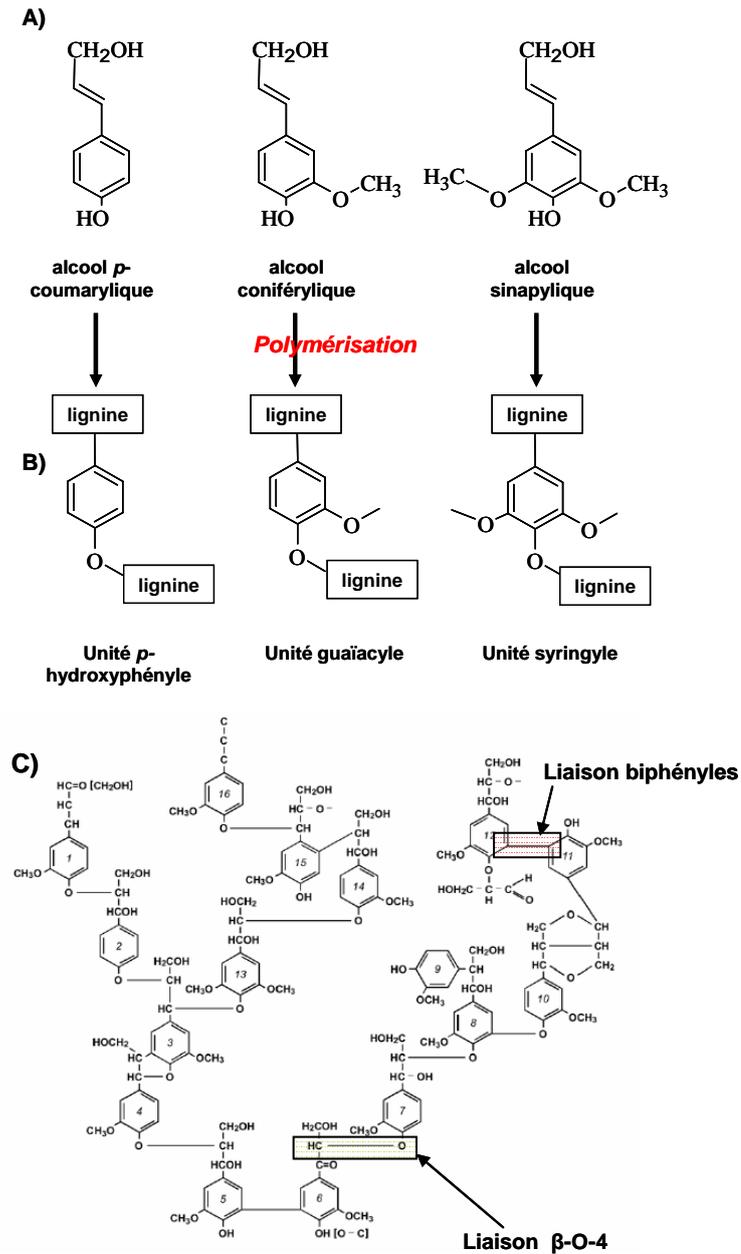


Figure 1-14 :A) Formule semi développée des alcools *p*-coumarylique, coniférylique et sinapylrique, B) Structure des unités *p*-hydroxyphényles (H), guaiacyles (G) et syringyles (S), C) Modèle de lignine tridimensionnelle avec les liaisons β-O-4 et biphenyles, d'après Kogel-Knabner (2002).

La lignine se minéralise lentement et les sous-unités de base de cette biomolécule sont bien conservées dans la matière organique (Hatcher *et al.*, 1995). Les produits d'oxydation des constituants de la lignine issue de pyrolyse peuvent être de bon indicateurs du type de plantes à l'origine de ces molécules. Différents auteurs ont utilisé les rapports d'abondance relative de ses composés, calculés lors d'analyse de la matière organique par pyrolyse flash en présence de TMAH (tétraméthyl ammonium hydroxyde), pour déterminer le type de plantes à l'origine de ces molécules (Hedges et Mann, 1979; Morrison et Mulder, 1994;

Clifford *et al.*, 1995; Chefetz *et al.*, 2000; Challinor, 2001). En effet, selon les taxons de plante, la proportion des produits d'oxydation des composés ligneux varie (Tableau 1-2):

Plante	Unité syringyle	Unité <i>p</i> -hydroxyphényle	Unité guaïacyle
plante non vasculaire	0	0	0
angiosperme non ligneux	1.0-3.0	0.4-3.1	0.6-3.0
angiosperme ligneux	7.0-18.0	0	2.7-8.0
gymnosperme non ligneux	0	0.8-1.2	1.9-2.1
gymnosperme ligneux	0	0	4.0-13.0

Tableau 1-2 : Proportion des produits d'oxydation de la lignine dans différents taxons de plante (proportion exprimée en Wt% de carbone) d'après Hedges *et al.* (1979).

Les gymnospermes ligneux présenteront une forte proportion de composés dérivant, uniquement, des unités guaïacyles alors que des unités syringyles et guaïacyles se trouveront dans les angiospermes ligneux (Clifford *et al.*, 1995; Challinor, 2001).

### 1.3. La matière organique dissoute

La majorité des travaux sur la matière organique dissoute (MOD) porte sur les environnements naturels et actuels (lacs, rivières, sols, mers). De nombreuses études ont permis de définir, qualifier et quantifier la matière organique dissoute récente ; cependant, il existe peu d'informations sur la matière organique hydrosoluble fossile extraite de roches sédimentaires. C'est pourquoi, cette étude bibliographique a été réalisée à partir de travaux portant sur la MOD récente et les informations obtenues ont été adaptées à la MOD de la formation de Boom dans le cadre de ce travail de recherche.

#### 1.3.1. Définitions

La matière organique hydrosoluble totale (MOT) des environnements terrestres et aquatiques peut être divisée en deux parties : la matière organique particulaire (MOP) et la matière organique dissoute (MOD). La matière organique dissoute est définie, selon un consensus international, par la maille de filtration à 0.45µm (Thurman, 1985; Dafner et Wangersky, 2002; Zsolnay, 2003). La matière organique particulaire représente, en général, une fraction minoritaire de la matière organique totale (~10% (Thurman, 1985)). La MOD est composée de substances non humiques et de substances humiques, ces derniers représentant 40 à 60% de la MOD (Senesi, 1993).

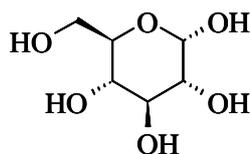
### 1.3.2. Les substances non humiques

Les substances non humiques sont constituées de molécules facilement dégradables et dérivant de la dégradation de constituants cellulaires (animal ou végétal) ou de la synthèse microbienne. Il s'agit des glucides, des protéines, des acides aminés, des lipides, des tanins, de la lignine, et des acides gras (Thurman, 1985). Les glucides, les acides aminés, les protéines et les tanins sont décrits ci-dessous ; les autres biomolécules ont été décrites dans le paragraphe précédent (paragraphe 1.2).

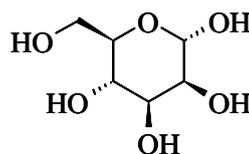
#### 1.3.2.1. Les glucides

Les glucides sont des molécules constituées de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils comportent un groupement cétone, aldéhyde ou polyhydroxyle. Les glucides les plus simples (exemple le D-glucose) sont les monosaccharides possédant une structure cyclique à cinq ou six carbones (Figure 1-15-A). Les monosaccharides peuvent se condenser à l'aide de liaison glycosidique et former des polysaccharides. Si le polymère est constitué d'un même type de monosaccharide, il porte le nom de homopolysaccharide : un des plus importants biopolymères du monde végétal est la cellulose constituée de  $\beta$ -D-glucopyranose. Si le polymère est formé de plusieurs types de monosaccharide, il porte le nom de hétéropolysaccharide ; c'est le cas, par exemple, des hémicelluloses (Figure 1-15-B).

##### A. Exemple de monosaccharide

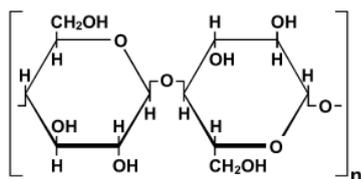


D-glucose

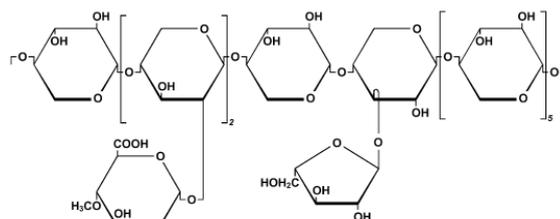


D-mannose

##### B. Exemple de polysaccharide



Cellulose



Unité d'hémicellulose (Arabinose-4-O-méthylglucurono-xylane)

Figure 1-15 : Exemple de glucide : A. monosaccharide, B. polysaccharide d'après Kogel-Knabner (2002).

Ces molécules sont les principaux intermédiaires biologiques de stockage (glycogène chez les animaux, l'amidon chez les plantes) et de consommation d'énergie des êtres vivants. Ils sont, aussi, des composants essentiels des membranes cellulaires et permettent de rigidifier la structure des membranes chez les plantes.

### **1.3.2.2. Les acides aminés et les protéines**

Les acides aminés sont des molécules contenant, à la fois, une fonction amine et une fonction acide. Ce sont les molécules de bases entrant dans la biosynthèse de macromolécule : les protéines. Les acides aminés se condensent via une liaison entre la fonction acide d'un acide aminé et la fonction amine d'un autre acide aminé. Cette liaison est appelée liaison peptidique. Les protéines ont des rôles extrêmement importants et très divers dans le monde vivant (transport, hormone, enzyme etc.) et constituent, en général, plus de la moitié du poids sec des cellules.

### **1.3.2.3. Les tanins**

Les tanins sont des biopolymères constituant les défenses immunitaires des végétaux supérieurs. Ils possèdent une structure polyphénolique et peuvent être divisés en deux catégories : les tanins hydrolysables constitués d'un glucide (le D-glucose majoritairement) et des acides phénoliques et les tanins non hydrolysables ou condensés, qui sont des polymères de polyhydroxy-flavan-3-ol.

## **1.3.3. Les substances humiques**

### **1.3.3.1. Définitions**

Les substances humiques ont été définies comme des structures complexes ne pouvant être rattachées à aucune des classes biochimiques habituelles (Stevenson, 1982). Elles ont été, pendant longtemps, considérées comme des molécules polymériques de haut poids moléculaire (Schnitzer et Khan, 1972; Aiken *et al.*, 1985; Malcolm, 1990; Stevenson, 1994). Cependant, MacCarthy (2001) a tenté de donner une vision plus claire des substances humiques en établissant les deux principes suivants :

- Les substances humiques sont des mélanges complexes et hétérogènes de molécules réactives, mais résistantes. Elles sont le produit de la décomposition de la biomasse pendant la diagénèse et elles se forment, partout, dans

## Chapitre 1. La matière organique sédimentaire: définitions, description et évolution.

l'environnement, via des réactions chimiques aléatoires entre des molécules diverses.

- L'hétérogénéité moléculaire des substances humiques en fait des matériaux résistants à la dégradation, ce qui leur confère un rôle important dans le fonctionnement de l'écosystème terrestre.

Du premier principe découle les cinq corollaires suivants :

- Les substances humiques sont dépourvues d'un motif chimique de base se répétant de manière régulière ;
- Les substances humiques ne peuvent pas faire l'objet d'une purification comme les composés chimiques définis ;
- La nature des substances humiques réside, à la fois, dans leur hétérogénéité et leur grande réactivité ;
- Les substances humiques provenant de différentes sources présentent une grande uniformité de leurs principales propriétés ;
- Il n'est pas possible d'envisager la structure moléculaire ou un ensemble de structure moléculaire décrivant l'ensemble des liaisons dans une molécule d'une substance humique.

De ce qui précède, il en résulte que les substances humiques apparaissent comme très hétérogènes chimiquement.

Le second principe insiste sur la résistance des substances humiques à la dégradation, ce qui les distingue des biopolymères, comme la lignine, qui se dégradent plus rapidement (Tuomela *et al.*, 2000). Certains auteurs préfèrent décrire leurs propriétés de base, à partir des informations chimiques et physiques simples (données RMN, IRTF etc.) sans pour autant fournir de structure moléculaire (Abbt-Braun *et al.*, 2004; Navalon *et al.*, 2010).

Les substances humiques sont, par ailleurs, traditionnellement divisées en trois fractions définies par leur solubilité à différents pH (Aiken, 1985, Hayes *et al.*, 1989; MacCarthy, 1989; Stevenson, 1994) et non selon une frontière chimique:

- Les acides humiques sont insolubles dans l'eau à pH inférieur à 2 ;
- Les acides fulviques sont solubles dans l'eau quelque soit le pH ;
- Les humines sont insolubles dans l'eau quelque soit le pH. Ces dernières ne sont, donc, pas présentes dans la fraction MOD.

Ces fractions ont été définies dans des environnements superficiels récents (sols, sédiments de rivière notamment). Le même fractionnement des constituants organiques hydrosolubles, basé sur la différence de solubilité en fonction du pH, peut être appliqué à la

MOD fossile. Dans ce contexte, l'utilisation des termes acides humiques et fulviques ne peut être rigoureusement utilisé, puisque ces fractions proviennent d'une matière organique fossile. Pour éviter toute erreur d'interprétation (et un éventuel amalgame avec la matière organique actuelle), nous avons choisi d'utiliser les termes « humic like » et « fulvic like » lorsque ces fractions sont issues de MO fossile.

### 1.3.3.2. Compositions élémentaires

Les acides humiques et fulviques sont, essentiellement, composés de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. L'azote et le soufre sont présents en très faible proportion. Steelink (1985) et, plus récemment, Rice *et al.* (1991) ont proposé une composition élémentaire moyenne pour les différentes fractions des substances humiques (Tableau 1-3) :

<b>Steelink (1985)</b>					
	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>S (%)</b>
<b>Acide humique</b>	53.8-58.7	3.2-6.2	32.8-38.3	0.8-4.3	0.1-1.5
<b>Acide fulvique</b>	40.7-50.6	3.8-7	39.7-49.8	0.9-3.3	0.1-3.6
<b>Rice et al. (1991)</b>					
<b>Acide humique</b>	55.1 ± 5.0	5.0 ± 1.1	35.6 ± 5.8	3.5 ± 1.5	/
<b>Acide fulvique</b>	46.2 ± 5.4	4.9 ± 1.0	45.6 ± 5.5	2.5 ± 1.6	/

Tableau 1-3 : Composition élémentaire des substances humiques d'après Steelink (1985) et Rice et MacCarthy (1991).

Les acides humiques sont, globalement, plus riches en carbone alors que les acides fulviques sont plus riches en oxygène. Rice *et al.* (1991) ont, aussi, montré que la composition élémentaire varie en fonction de l'origine de l'échantillon, du climat et de la géographie. L'avancée des techniques de RMN et infra rouge ont permis d'obtenir quelques informations sur les groupements fonctionnels présents chez les acides humiques et fulviques ; il apparaît que les acides fulviques sont plus riches en groupement carboxylique et phénol que les acides humiques, ce qui induit un pourcentage d'oxygène plus élevé chez les acides fulviques (Senesi, 1989; Schulten et Schnitzer, 1997; Leenheer *et al.*, 2003).

### 1.3.3.3. Les modèles structuraux

#### 1.3.3.3.1. Le modèle polymérique

Les substances humiques ont, tout d'abord, été décrites comme des polymères (Thurman, 1985, Aiken et al., 1985). En effet, selon ce modèle, les différentes fractions sont bâties sur le même canevas de base ; seules changent la taille des molécules et l'abondance relative des différents groupements fonctionnels. Ce modèle a été, notamment, décrit par Schnitzer et Khan (1972) (Figure 1-16-A); chaque monomère de base comprend un élément de nature aromatique sur lequel sont greffés différents groupements fonctionnels.

Les substances humiques acquièrent cette structure suite à l'assemblage de ces monomères par polymérisation aléatoire (Figure 1-16-B, Figure 1-16-C). Ces derniers sont, alors, liés par des liaisons hydrogènes de Van der Waals et des interactions  $\pi$ - $\pi$ . La différence essentielle entre les acides humiques et les acides fulviques porte sur le nombre de cycle aromatique ; les acides humiques sont plus riches en composés cycliques que les acides fulviques.

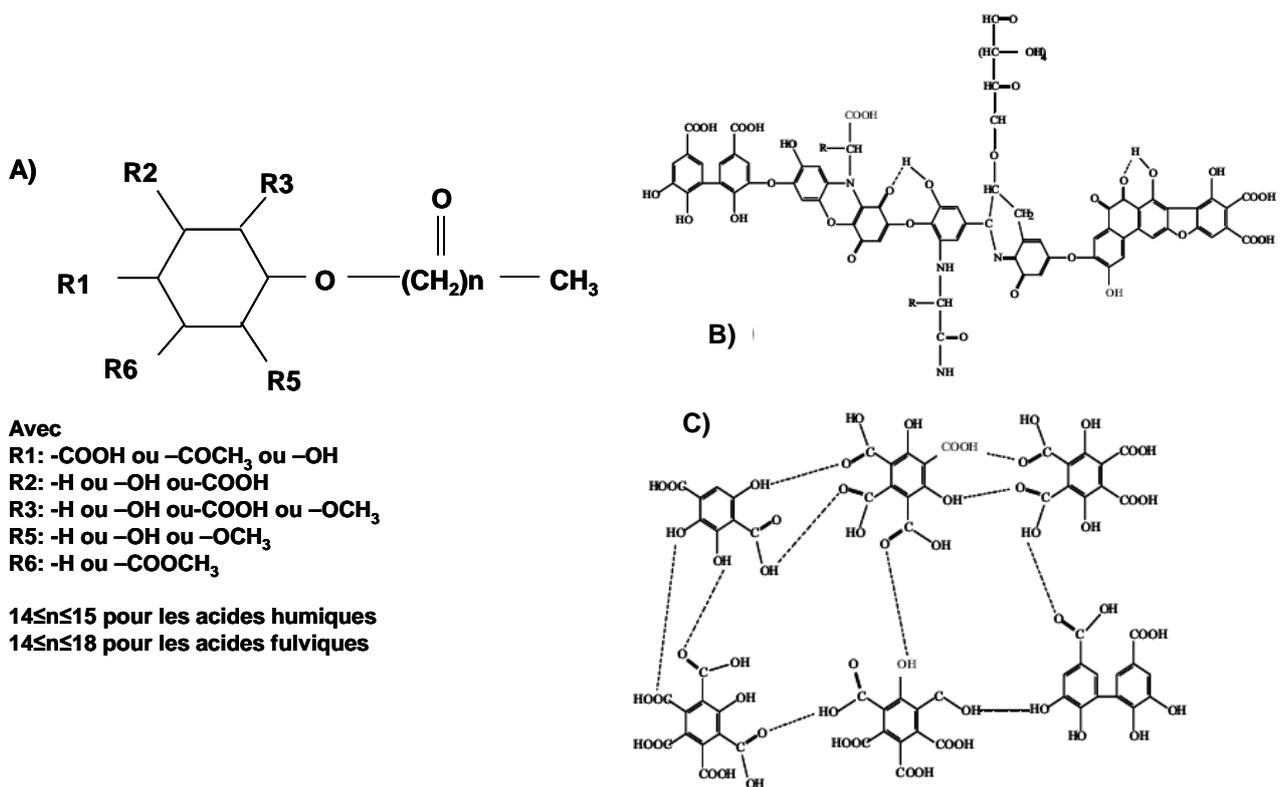


Figure 1-16 : Modèle d'acides humiques et fulviques : A) modèle de Schnitzer et Khan B) Acide humique et C) Acide fulvique d'après Schnitzer et Khan (1972).

### 1.3.3.3.2. Le modèle micellaire

Le modèle micellaire a été développé par Wershaw (1986) et von Wandruszka *et al.* (1999); ces derniers proposent qu'en plus de liaisons faibles proposées par le modèle polymérique, les molécules soient retenues par des interactions de types hydrophobe/hydrophiles. Ces interactions permettraient la mise en place de structures 3D de type micellaire (Figure 1-17) avec une région hydrophobe vers l'intérieur des micelles et une zone hydrophile à l'extérieur avec des composés chargés ou polaires.

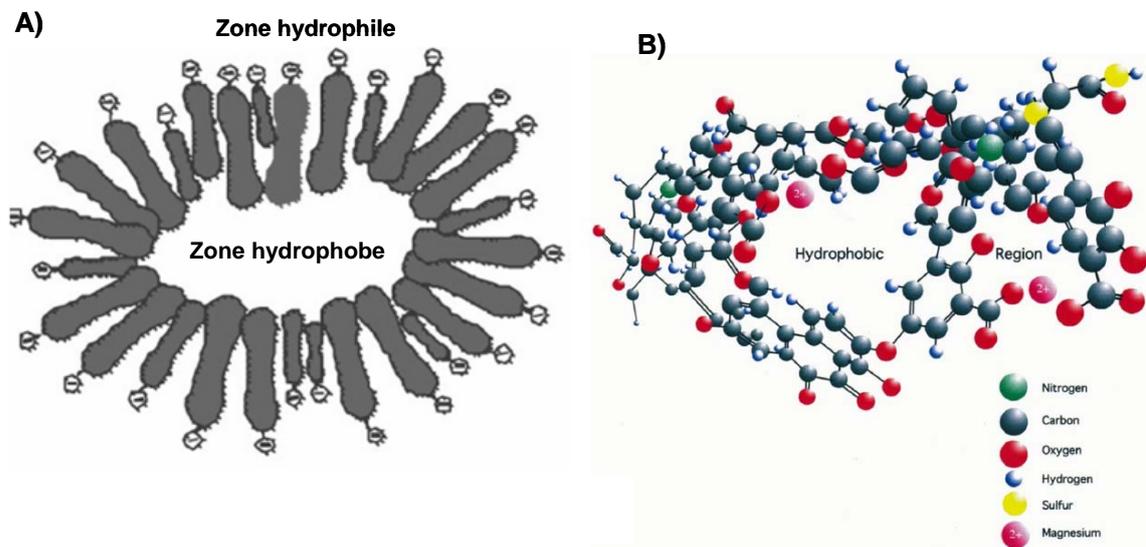


Figure 1-17 : A) Représentation schématique du modèle micellaire des substances humiques de Wershaw (Wershaw, 1986) adapté par Von Wandruszka *et al.* (1999), B) modèle d'acide humique abritant un ions  $Mg^{2+}$  proposé par Engebretson et Von Wandruszka (1994), adapté par Von Wandruszka *et al.* (1999).

### 1.3.3.3.3. Le modèle supramoléculaire

Depuis quelques années, certains auteurs décrivent les substances humiques comme un assemblage non polymérique, mais supramoléculaire (Piccolo et Conte, 2000; Burdon, 2001; Piccolo, 2001; Piccolo, 2002). Pour ces auteurs, les substances humiques sont des associations de différentes petites molécules, chimiquement différentes, liées entre elles par des liaisons faibles (liaisons hydrogènes, interactions  $\pi$ - $\pi$  et  $\pi$ -CH). Les acides fulviques sont définis par une association de molécules hydrophiles, riches en groupement carboxylique, à l'inverse, les acides humiques sont définis par une association de molécules plus hydrophobes, possédant des chaînes aliphatiques.

#### **1.3.3.4. Propriétés**

Les substances humiques jouent un rôle important dans l'équilibre des sols ; en effet, elles ont un pouvoir tensioactif et structurent le sol grâce au complexe argilo-humique qui le cimente (Duchaufour, 2001). Les substances humiques possèdent un pouvoir chélatant sur les cations tels que le  $\text{Cu}^{2+}$  ou le  $\text{Pb}^{2+}$  (Senesi, 1992) ou encore sur les lanthanides (ex : Néodyme, Europium) et les actinides (ex : Thorium, Uranium, Plutonium) (Pourret *et al.*, 2007; Reiller *et al.*, 2008). Elles peuvent, aussi, se combiner avec des molécules organiques hydrophobes comme les HAPs (Yates *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2009) ou certains pesticides (Lee et Farmer, 1989). L'ensemble de ces propriétés donne un rôle important aux substances humiques dans la solubilisation, la dégradabilité et le transport de composés polluant dans les sols, les eaux et les sédiments.

### **1.4. Evolution de la matière organique fossile**

La matière organique présente dans les sols ou sédimentaire peut subir différents processus de dégradation. Ils peuvent être d'origine biologique (**biodégradation**) ou chimique (**oxydation, maturation thermique**, etc.). En effet, après la mort des organismes vivants, les composés organiques, dont ils sont constitués, sont, majoritairement, recyclés via la chaîne trophique. La matière organique est dégradée, puis minéralisée par les microorganismes grâce à des réactions de respiration et de fermentation (Figure 1-18). Les biomolécules vont soit être préservées, soit subir différents processus d'altération et de condensation pour donner des substances humiques.

Une faible proportion de matière organique est exportée vers des bassins sédimentaires (Tissot et Welte, 1978) où elle va également commencer à se dégrader. La matière organique va, alors, subir différentes modifications structurales et chimiques. Ces modifications sont le fait, tout d'abord, de la dégradation bactérienne à l'interface eau-sédiment (diagenèse précoce), puis de la température (maturation thermique). La matière organique fossile peut être, également, altérée par différents processus d'oxydation découlant de son exposition à l'oxygène (zone aérobie) et de biodégradation, notamment lors de circulation d'eau favorisant l'apport de micro-organisme.

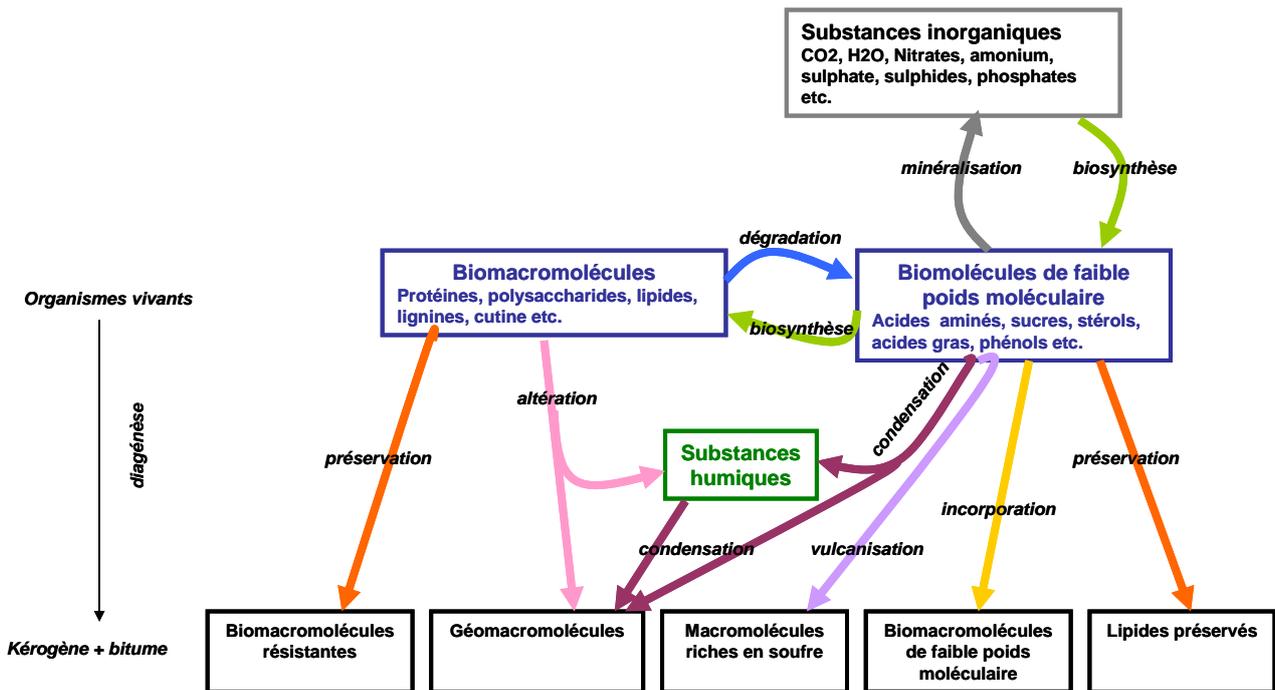


Figure 1-18 : Modèle simplifié de formation du kérogène et des substances humiques, lors de la diagenèse, d'après Killips et Killips (2005).

### 1.4.1. La biodégradation de la matière organique fossile

La biodégradation de la matière organique fossile a beaucoup été étudiée dans le cadre de l'exploration pétrolière. Ces études portent essentiellement sur la fraction extractible au solvant (MOE) et sur le kérogène. En revanche, la biodégradation de la matière organique dissoute reste généralement étudiée dans les sols, car elle représente la plus importante source de carbone pour les microorganismes (Metting, 1993). Ainsi, très peu d'études ont été réalisées sur la matière organique dissoute fossile. C'est pourquoi, le processus de biodégradation de la MOD fossile sera décrit en s'appuyant essentiellement sur des travaux ciblant la MOD récente.

#### 1.4.1.1. La biodégradation de la MOE

La biodégradation de la matière organique fossile a beaucoup été étudiée dans le cadre de l'exploration pétrolière. En effet, les processus de biodégradation peuvent aussi bien apparaître dans les roches réservoirs que dans les unités de stockage. Ce phénomène est un important problème pour les pétroliers, car il diminue la qualité du pétrole (Connan, 1987, Hunt, 1996). Cette diminution de qualité est, notamment, mesurée par le biais de l'indice

API (American Petroleum Institute gravity). Plus cet indice est faible, plus la qualité de l'huile sera médiocre (Figure 1-19). Le Tableau 1-4 présente la biodégradabilité des différentes molécules rencontrées dans les pétroles.

Les microorganismes consomment, préférentiellement, les hydrocarbures saturés et aromatiques, soit par des processus d'oxydation aérobie (Prince, 2002, Fritsche et Hofrichter, 2000), soit par des processus de type anaérobie (Kuhn *et al.*, 1985; Aeckersberg *et al.*, 1991) produisant, ainsi, du CO<sub>2</sub> et des composés oxygénés. Ainsi, les *n*-alcane à chaînes courtes seront consommés en premier, alors que certains biomarqueurs comme les hopanes ou les diastéranes seront plus résistants (Wenger et Isaksen, 2002, Peters et Moldowan, 1993). La distribution moléculaire va, donc, évoluer au cours de la biodégradation (Figure 1-19). Par exemple, les rapports Pr/*n*C<sub>17</sub> et Ph/*n*C<sub>18</sub>, diminuent avec la biodégradation, le pristane (Pr) et le phytane (Ph) étant plus réfractaires à la biodégradation que les *n*-alcane (Tableau 1-4, Figure 1-20). Ces deux rapports évoluent de façon opposée lors de la maturation thermique (Figure 1-20).

		niveau de biodégradation				
		très légers	légers	modéré	fort	sévère
Hydrocarbures C <sub>6</sub> -C <sub>15</sub>	<i>n</i> -alcane	.....	—————	—————	—————	—————
	iso-alcane		.....	—————	—————	—————
	isoprénoïdes		.....	—————	—————	—————
	benzène, toluène, éthylbenzène, xylène aromatiques		.....	—————	—————	—————
	alkyl cyclohexane			.....	—————	—————
Hydrocarbures C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub>	<i>n</i> -alcane, iso-alcane	.....	—————	—————	—————	—————
	isoprénoïdes			.....	—————	—————
	naphtalènes		.....	—————	—————	—————
	phénanthrènes, dibenzothiophènes			.....	—————	—————
	chrysènes				.....	—————
Biomarqueurs C <sub>15</sub> -C <sub>35</sub>	stéranes réguliers				.....	—————
	C <sub>30</sub> -C <sub>35</sub> hopanes				.....	—————
	C <sub>27</sub> -C <sub>29</sub> hopanes				.....	—————
	triaromatique stéranes				.....	—————
	monoaromatique stéranes				.....	—————
	gammacérane				.....	—————
	oléane				.....	—————
	C <sub>21</sub> -C <sub>22</sub> stéranes				.....	—————
	terpanes tricycliques				.....	—————
	diastéranes				.....	—————
	diahopanes				.....	—————
	25-norhopanes				.....	—————
	seco-hopanes				.....	—————

Tableau 1-4 : Comparaison de la biodégradabilité de différentes molécules (hydrocarbures C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>-C<sub>35</sub> et biomarqueurs) d'après Wenger *et al.* (2002).

Les molécules aromatiques, telles que les hydrocarbures aromatiques (HAP), peuvent, également, être biodégradées. Cette biodégradation a, notamment, été étudiée dans le cadre de la bioremédiation de sols pollués (usines à gaz, cokeries...). Une grande variété d'organismes (bactéries, champignons, algues) a la capacité de métaboliser les HAPs, de manière aérobie ou anaérobie et de manière partielle ou complète (Kelley *et al.*, 1990; Coates *et al.*, 1996; Corgié *et al.*, 2003).

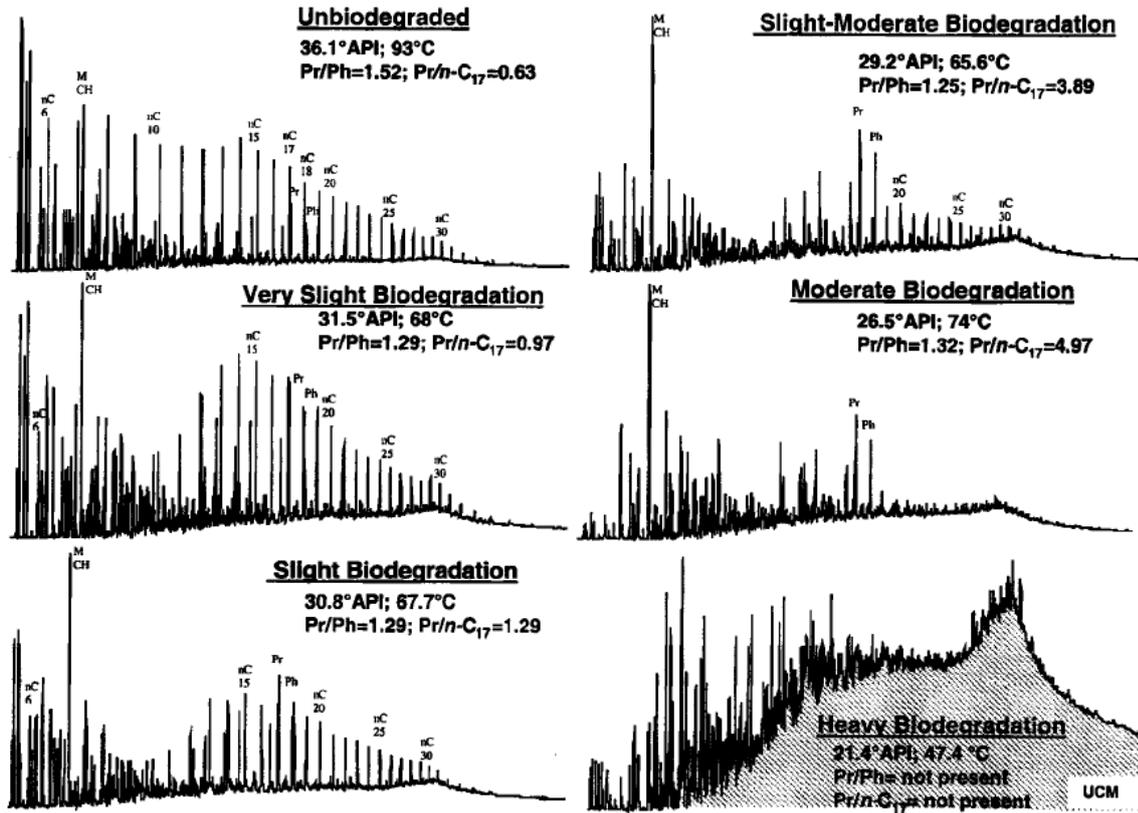


Figure 1-19 : Chromatogramme d'huile de plus en plus biodégradée d'après Wenger *et al.* (2002).

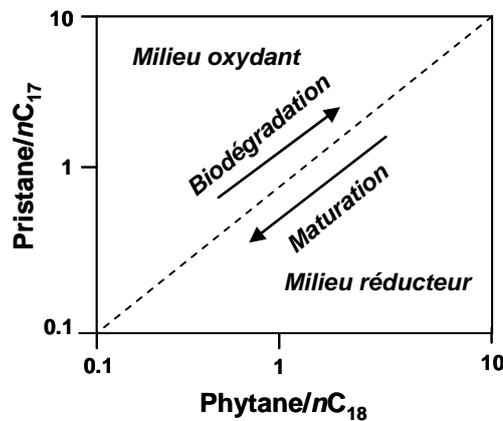


Figure 1-20 : Evolution des rapports Pristane/nC<sub>17</sub> et Phytane/nC<sub>18</sub> en fonction des processus de biodégradation et de maturation d'après Lijmbach (1975)

La biodégradation de composés hydrocarbonés simples ( $nC_{16}$  et  $nC_{17}$ ) par des bactéries anaérobies de type sulfato-réductrices a été démontrée, en laboratoire, par Aeckersberg *et al.* (1991). Puis Rueter *et al.* (1994) ont mis en évidence la capacité de ces bactéries à dégrader les *n*-alcanes (compris entre  $nC_8$  et  $nC_{34}$ ) et les benzènes méthylés présents dans du pétrole. Ces résultats ont été confortés par des études plus récentes sur les bactéries sulfato-réductrices, notamment dans le cadre de bioremédiation d'aquifères pollués par des produits pétroliers (Knöller *et al.*, 2008; Berlendis *et al.*, 2010). Cependant, il s'avère que la biodégradation anaérobie est beaucoup plus lente que la biodégradation aérobie (Yamane *et al.*, 1997; Larter *et al.*, 2003).

#### **1.4.1.2. La biodégradation de la matière organique dissoute fossile**

Les travaux sur la biodégradation de la MOD fossile sont peu nombreux. De manière générale, l'étude de la MOD fossile est couplée aux études sur la biodégradation de la fraction MOE ou du kérogène (Littke *et al.*, 1991; Wengel *et al.*, 2006; Schillawski et Petsch, 2008). Dans ces études, l'évolution de la fraction organique dissoute est, généralement, considérée comme une conséquence de l'altération de la MOE et du kérogène et non étudiée comme une phase organique réactive.

Les processus de biodégradation de la MOD fossile ou récente sont essentiellement suivis par des mesures de  $CO_2$ , de COD ou encore de TOC (Kalbitz *et al.*, 2003; McDowell *et al.*, 2006; Schillawski et Petsch, 2008). Ces mesures permettent de quantifier la minéralisation du carbone par les bactéries. D'autres techniques, couramment utilisées dans les expériences sur les MOD récentes, telles que la spectroscopie UV (absorbance à 280 nm) ou la fluorescence 3D (mesure de l'indice d'humification) permettent de suivre, d'une part, l'aromaticité de la MO et, d'autre part, la condensation des molécules (Kalbitz *et al.*, 2003). Ces deux paramètres augmentent avec la biodégradation.

#### **1.4.1.3. Contrôle de la biodégradation de la matière organique fossile**

Les contrôles de la biodégradation de la MOE et de la MOD des sols superficiels sont très bien documentés. Dans ces deux cas, la biodégradation est contrôlée par des paramètres communs : la biodisponibilité et la biodégradabilité de la MO. Le paragraphe suivant va

présenter ces deux phénomènes en s'appuyant, à la fois, sur les études de la MOE et sur la MOD des sols.

#### **1.4.1.3.1. Contrôle de la biodisponibilité de la MO**

La fraction biodisponible est la fraction présente dans un compartiment spécifique de l'environnement qui, dans une période donnée, est disponible ou peut être rendue disponible pour les organismes, les microorganismes et les plantes (Van den Berg *et al.*, 2007). La biodisponibilité de la MO est contrôlée par différents facteurs :

- **La taille des pores et la perméabilité de la matrice solide** : la granulométrie, la lithologie, la porosité ainsi que la perméabilité ont une influence sur l'activité microbienne. Ainsi, la MO se trouvant dans les pores de taille inférieure à  $0.2\mu\text{m}$  devient inaccessible pour les microorganismes (Mayer, 1994; Zsolnay, 1997). Dans les sédiments, la roche doit permettre la diffusion des nutriments ainsi que la mobilité des bactéries (Krumholz, 2000);
- **L'eau** : l'absence d'eau réduit la disponibilité de la MO pour les microorganismes, car l'activité biologique et les processus de diffusion diminuent lorsque les sols /sédiments sont dépourvus d'eau ;
- **L'adsorption de la matière organique sur les phases minérales**: la MO adsorbée sur les phases minérales est très stable, ce qui diminue sa biodisponibilité (Sollins *et al.*, 1996) et, ainsi, préserve la MO lors de la diagenèse précoce, par exemple (Henrichs, 1995; Sollins *et al.*, 1996; Kaiser et Guggenberger, 2000). Cependant, cette adsorption n'est pas irréversible, la MO peut redevenir disponible pour les microorganismes. Ainsi, Hedges *et al.* (1999) proposent un modèle de biodégradation/sorption expliquant qu'au cours de la phase de diagenèse précoce, la sorption d'une partie des biopolymères et des intermédiaires réactionnels permet de fractionner la matière organique, lors de l'exportation de la MO du sol vers les rivières (Figure 1-21). La désorption est fonction du composé sorbé, de l'adsorbant, et de la composition de la solution aqueuse (Kaiser et Guggenberger, 2000) ;

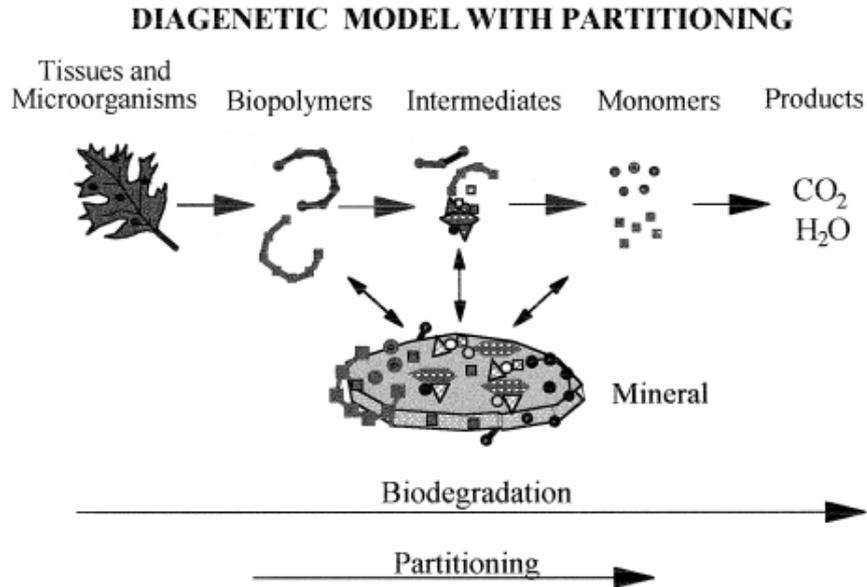


Figure 1-21 : Modèle de biodégradation/sorption de la matière organique lors de la diagenèse (d'après Hedges et Keil, 1999)

#### 1.4.1.3.2. Contrôle de la biodégradabilité de la MO

La biodégradabilité est la capacité d'une molécule à être dégradée biologiquement. La molécule est dégradée selon deux phases successives : la première phase est celle de l'assimilation ou de la dégradation de la molécule de départ qui est, ensuite, utilisée pour la biosynthèse de matériels cellulaires ; lors de la seconde phase, la molécule se minéralise complètement pour produire de l'énergie et des nutriments inorganiques. La biodégradabilité de la MO est contrôlée par de nombreux facteurs qui peuvent être classés en trois catégories (Peters et Moldowan, 1993; Marschner et Kalbitz, 2003):

- Les paramètres intrinsèques de la MO ;
- Les propriétés du sol, du sédiment ou du réservoir et de la solution de culture ;
- Les facteurs externes.

Les facteurs externes (température, précipitations, végétation etc.) sont des paramètres propres à la biodégradabilité de la MOD récente et ne seront, donc, pas traités ici.

##### 1.4.1.3.2.1. *Les paramètres intrinsèques de la MO*

La composition chimique de la MO est un des paramètres importants contrôlant la biodégradabilité. En effet, les huiles contenant principalement des chaînes aliphatiques et peu de structures aromatiques hydrocarbonées sont préférentiellement biodégradées (Yemashova *et al.*, 2007). En revanche, les structures fortement condensées comme les

asphaltènes sont plus résistants à la biodégradation (Rubinstein *et al.*, 1979; Behar et Pelet, 1984; Thouand *et al.*, 1999), ce qui explique notamment la faible biodégradation des revêtements routiers (asphaltes).

Dans le cas de la MOD récente, les molécules, telles que les glucides et les acides aminés, servent de principal substrat durant la biodégradation. Kalbitz *et al.* (2003) ont montré que l'intensité de la biodégradabilité de la MOD était corrélée avec la concentration en solution de ces molécules. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que, comme pour les huiles, les structures aromatiques fortement condensées étaient peu biodégradées, alors que la MOD contenant un faible degré de condensation (structures aliphatiques) et de conjugaison l'était beaucoup plus (Guggenberger *et al.*, 1994; Wershaw et Kennedy, 1998; Glatzel *et al.*, 2003; Kalbitz *et al.*, 2003). Ces résultats sont en accord avec les observations de Schillawski et Petsch, 2008 sur les lixivats de kérogènes. Ces derniers ont montré que la MOD fossile était fortement aliphatique et, de ce fait, rapidement assimilée à la biomasse.

#### **1.4.1.3.2.2. Les propriétés du sol, du sédiment ou du réservoir et de la solution de culture**

Les propriétés du sédiment telles que la pression, la température, l'absence d'oxygène, le pH, les gaz et la salinité vont jouer un rôle sur la biodégradation. Ces paramètres vont permettre le développement de certaines communautés bactériennes : par exemple, l'absence d'oxygène va favoriser le développement de bactérie anaérobie. Une trop forte salinité (>150g/L) ou encore une forte concentration en H<sub>2</sub>S va limiter le développement des bactéries dans les réservoirs pétroliers (Peters et Moldowan, 1993; Wenger *et al.*, 2002).

En contexte expérimental, la communauté bactérienne utilisée, lors des essais de biodégradation, est primordiale. En effet, Block *et al.* (1992) ont montré que les communautés autochtones étaient les mieux adaptées pour mesurer la biodégradabilité de la MOD récente.

### **1.4.2. Evolution de la matière organique dans les bassins sédimentaires**

La matière organique superficielle est incorporée dans les sédiments lors de la diagenèse précoce qui est essentiellement contrôlée par la biodégradation. Ensuite, cette matière

organique est progressivement transformée par maturation thermique lors de son enfouissement.

#### 1.4.2.1. La diagenèse précoce

La diagenèse précoce est un processus qui fait intervenir une succession de microorganismes à l'interface eau-sédiment. La matière organique va être dégradée par des processus d'oxydation utilisant des oxydants tels que l'oxygène, les nitrates, les hydroxydes de fer et de manganèse et les sulfates (Figure 1-22). Ces réactions se succèdent le long d'un gradient vertical d'oxydoréduction (Froelich *et al.*, 1979). Les produits de ces réactions d'oxydoréduction peuvent être, ensuite, transformés à leur tour. Ces réactions permettent, notamment, la formation des pyrites framboïdales (Berner, 1984; Morse *et al.*, 1987).

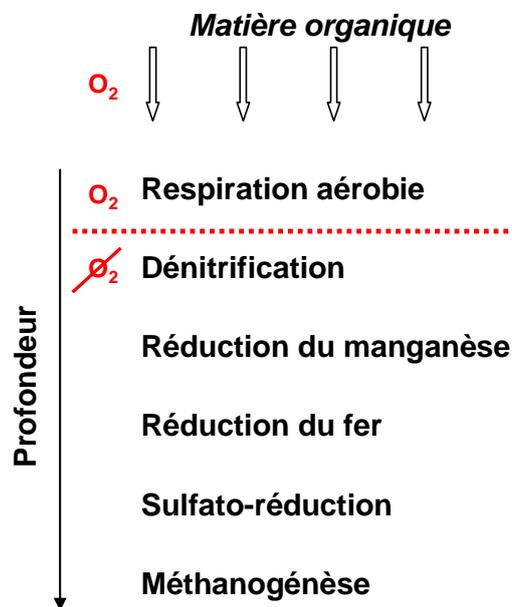


Figure 1-22 : Succession des réactions de minéralisation de la matière organique dans les sédiments lors de la diagenèse précoce (d'après Froelich *et al.*, 1979)

Différents paramètres peuvent contrôler cette biodégradation : en plus de ceux présentés dans les paragraphes précédents (paragraphe 1.4.1.3.1 et 1.4.1.3.2), le taux de sédimentation en environnement marin et l'apport en carbone organique jouent, aussi, un rôle (Mayer, 1995).

#### 1.4.2.2. Les phases de la maturation thermique

La maturation thermique succède à la diagenèse précoce et est scindée en trois phases successives (Figure 1-23) (Tissot et Welte, 1978):

- **La diagenèse** : dans cette phase, des transformations physico-chimiques ont lieu à basse température. Au moment du dépôt, le sédiment est constitué d'eau, de minéraux, de matière organique et d'organismes vivants. Ce mélange est, particulièrement, instable et diverses transformations interviennent (Figure 1-18) :
  - **Les réactions de dégradation/recondensation (Larter et Douglas, 1980)** : les biomacromolécules sont dégradées par les microorganismes en monomère, puis, une partie de ces derniers se condense de manière aléatoire (réaction de Maillard) ;
  - **La vulcanisation naturelle** : la réaction de vulcanisation naturelle peut se produire de deux manières, soit par incorporation intramoléculaire conduisant à la formation de molécules cycliques soufrées (Sinninghe Damsté *et al.*, 1989), soit par incorporation intermoléculaire conduisant à la formation de macromolécules très résistantes à la biodégradation (Sinninghe Damsté *et al.*, 1988) ;
  - **La préservation sélective** : certaines molécules sont très résistantes aux processus de sédimentation ; ces molécules sont constituées de chaînes polyméthyléniques d'origine algale ou de structures aliphatiques de cuticules de plantes (Tegelaar *et al.*, 1989; Tegelaar *et al.*, 1995).

La teneur en oxygène du matériel initial va diminuer par élimination de groupement fonctionnels hydroxyles, carbonyles, ou carboxyles sous forme de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. La nature de ces transformations dépend directement des conditions physico-chimiques de la diagenèse (pH, Eh, oxygénation du milieu interstitiel, nature de la matrice minérale et des fluides interstitiels). La défonctionnalisation du kérogène au cours de la diagenèse s'accompagne de la formation d'un bitume, essentiellement constitué de composés polaires et d'une faible quantité d'hydrocarbure.

- **La catagenèse** : au cours de cette phase, le kérogène va subir une déshydrogénation intense, puis une aromatisation de sa structure. Le kérogène va générer des composés de bas poids moléculaire à l'origine de la formation du pétrole. Si la température continue à augmenter, l'huile peut être craquée et générer des composés encore plus légers, les gaz humides ;
- **La métagenèse** : elle est caractérisée par la production de gaz ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{N}_2$ ) provenant de la rupture des liaisons stables au sein du kérogène et par la libération de groupement résiduel de plus petite taille. Le kérogène résiduel va s'appauvrir en hydrogène et sa composition tend progressivement vers celle du graphite.

La nature chimique de la matière organique extractible et du kérogène dépend des facteurs suivants:

- des organismes vivants qui ont contribué à leur formation ;
- des processus de dégradation qu'ils ont subis (maturation thermique, biodégradation et l'oxydation).

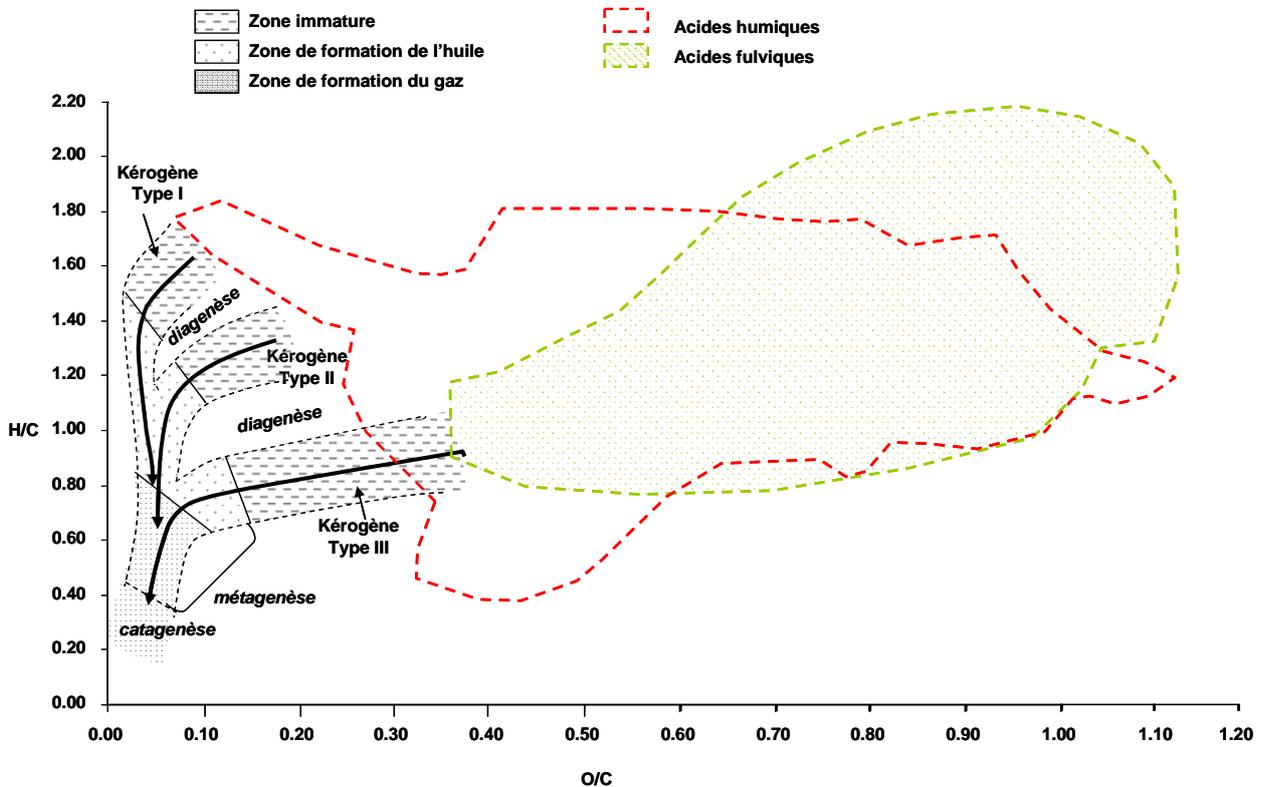


Figure 1-23 : Evolution des rapports atomiques H/C et O/C des kérogènes de type I, II, III, des acides humiques et acides fulviques et zones de formation des différents produits lors de la diagenèse, catagenèse et métagenèse présentées sur un diagramme de van Krevelen, d'après Tissot and Welte (1978) et Rice et MacCarthy (1991).

La maturité de la MO peut être suivie grâce à l'étude de différents paramètres géochimiques (données Rock Eval) et des distributions moléculaires (distribution des biomarqueurs cycliques ou acycliques) (Espitalié *et al.*, 1985a; Espitalié *et al.*, 1985b ; Tissot et Welte, 1978; Mackenzie *et al.*, 1980; Peters et Moldowan, 1993).

### **1.4.3. L'oxydation de la matière organique fossile**

#### **1.4.3.1. L'oxydation naturelle ou « weathering »**

L'altération de surface ou *weathering* est un des processus majeurs de dégradation de la matière organique sédimentaire. Lorsque cette dernière est exposée aux conditions atmosphériques et climatiques de surface (eaux météoriques, les variations de température etc.), les propriétés physico-chimiques de la matière organique vont changer. Un des processus majeurs de cette dégradation est l'oxydation généralement associée à la biodégradation aérobie.

L'étude de cette altération par oxydation a, tout d'abord, été menée sur les charbons dont l'exposition à l'air libre altère ses propriétés physiques et chimiques (Van Krevelen, 1961; Senftle et Davis, 1984; Huggins et Huffman, 1989; Nelson, 1989). Des études de profils d'altération naturelle sur différents affleurements ont été conduites par Nicaise (1977), Petsch *et al.* (2000) et Petsch *et al.* (2001). Ils ont montré que le COT diminuait et que la matière organique s'enrichissait en fonctions oxygénées et aromatiques (études par spectroscopie infrarouge). Dans le cadre de l'évaluation de la faisabilité d'un stockage des déchets radioactifs en formation géologique profonde à Bure (France), des échantillons de carottes stockés pendant plusieurs années à température ambiante ont été étudiés (Elie *et al.*, 2000). Cette étude a montré que l'oxydation avait eu des effets sur la minéralogie (transformation de la pyrite en sulfate) et sur la composition en matière organique : disparition des hopènes et des biomarqueurs (hopanes, stéranes) en configuration biologique et une diminution des longueurs de chaîne des *n*-alcane (Figure 1-24).

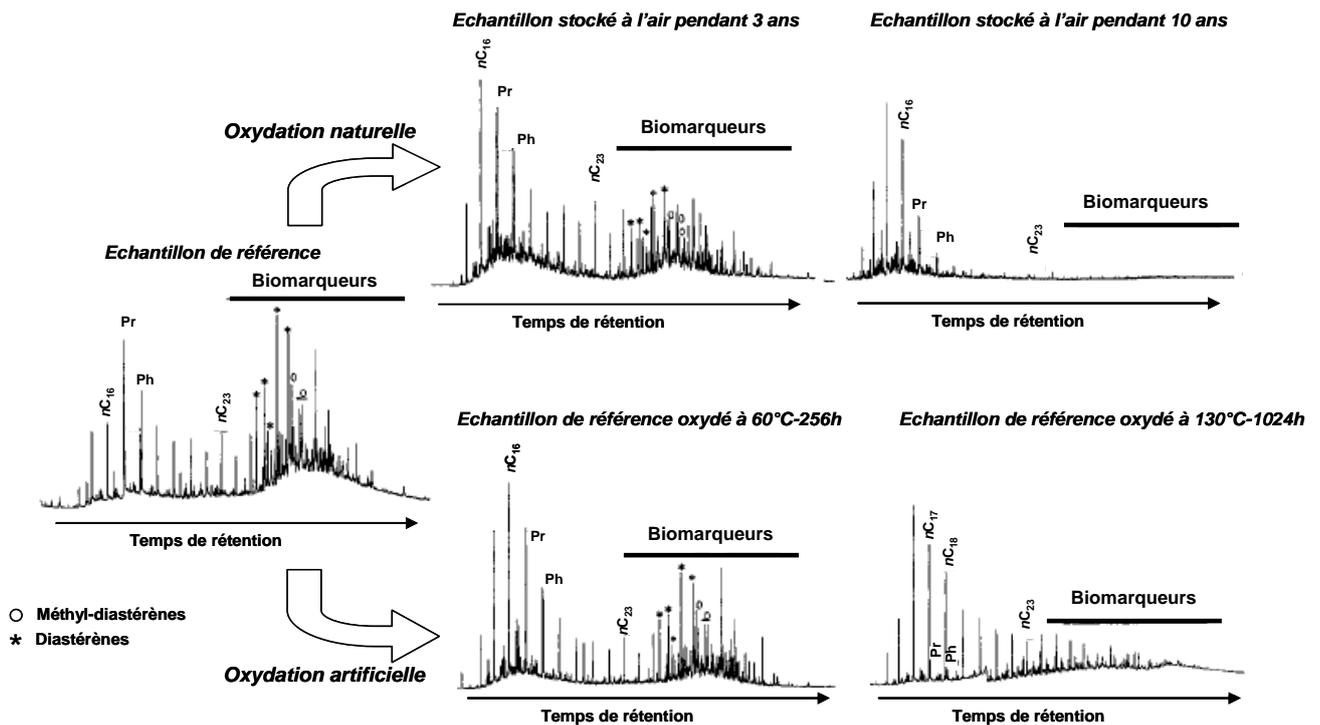


Figure 1-24 : Chromatogrammes totaux de la fraction saturée d'un échantillon de référence de l'argile du Callovo-Oxfordien, d'échantillons stockés à l'air, à température ambiante pendant 3ans et 10ans et de l'échantillon de référence oxydé artificiellement d'après Elie *et al.* (2000).

Des expériences de lixiviation à l'eau d'échantillons altérés naturellement ont montré que le carbone organique dissout était, aussi, affecté et qu'il augmentait avec le degré d'altération (Faure et Peiffert, 2007).

#### 1.4.3.2. L'oxydation artificielle

Les phénomènes d'oxydation naturelle sont des processus importants à prendre en compte lors d'excavation de galerie. Toutefois, il est généralement difficile d'avoir accès à des échantillons naturels ayant subi spécifiquement des processus d'oxydation. Elie *et al.* (2000) ont démontré qu'il était possible de simuler l'oxydation naturelle à partir d'expériences d'oxydation artificielle en étuve à basse température (80°C à 130°C) (Figure 1-24). Ces expériences en laboratoire peuvent permettre (i) d'obtenir des échantillons oxydés dans des conditions maîtrisées mais représentatives des processus naturels, (ii) de hiérarchiser l'importance de l'oxydation par rapport à d'autres processus d'altération (biodégradation, lessivage) et (iii) de décrire, plus précisément, les processus d'oxydation au niveau moléculaire en travaillant sur des matrices simplifiées, voire des composés modèles.



### **1.5. Conclusion**

Cette synthèse bibliographique montre qu'il existe un grand nombre d'études sur la matière organique ainsi que sur les trois fractions qui la composent. Le kérogène, la MOE et la MOD se distinguent par leur solubilité dans différents solvants et non selon une réelle frontière chimique. Cette définition peut poser problème, notamment pour décrire précisément la structure moléculaire de ces fractions.

Cependant, les fractions kérogène et MOE sont relativement bien connues et décrites par la géochimie organique. L'analyse du kérogène par pyrolyse Rock Eval ainsi que l'étude de biomarqueurs permettent de déterminer l'origine et l'environnement de dépôt de la matière organique fossile. De plus, l'étude précise des biomarqueurs peut donner des informations supplémentaires sur les différents processus d'altérations (maturation thermique, « weathering », biodégradation).

L'étude de la fraction dissoute de la matière organique fossile est plus complexe. En effet, si de nombreuses études portent sur la matière organique dissoute superficielle des sols et des environnements aquatiques récents, très peu concernent la MOD fossile. Dans le cadre des études sur la MOD, la composition et la structure de cette dernière ne sont pas encore déterminées ; seules sont caractérisées certaines propriétés chimiques de base.

Le chapitre suivant va présenter l'ensemble des techniques utilisées, au cours de ce travail de thèse, afin de caractériser la matière organique fossile de la formation de Boom.

## 1.6. Références

- Abbt-Braun, G., U. Lankes and F. H. Frimmel (2004).** "Structural characterization of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach." *Aquatic Sciences* 66(2): 151-170.
- Aeckersberg, F., F. Bak and F. Widdel (1991).** "Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO<sub>2</sub> by a new type of sulfate-reducing bacterium." *Archives of Microbiology* 156(1): 5-14.
- Aiken, G. R. (1985).** "An introduction to humic substances in soil, sediment and water." *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*: 203.
- Aiken, G. R., D. M. McKnight, R. L. Wershaw and P. MacCarthy (1985).** *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation, and Characterization*, John Wiley & Sons, New York.
- Albrecht, P., M. Vandenbroucke and M. Mandengué (1976).** "Geochemical studies on the organic matter from the Douala Basin (Cameroon)--I. Evolution of the extractable organic matter and the formation of petroleum." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 40(7): 791-799.
- Albro, P. W. (1976).** "Bacterial waxes. Chemistry and biochemistry of natural waxes. Elsevier, Amsterdam, *Kolattukudy P.E.*
- Alder, E. (1977).** "Lignin chemistry-Past, present and future." *Wood Science and Technology* 11: 69-218.
- Banoub, J. H. and M. Delmas (2003).** "Structural elucidation of the wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 38: 900-903.
- Behar, F. and R. Pelet (1984).** "Characterization of asphaltenes by pyrolysis and chromatography." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 7(1-2): 121-135.
- Behar, F. and M. Vandenbroucke (1987).** "Chemical modelling of kerogens." *Organic Geochemistry* 11(1): 15-24.
- Belt, S. T., G. Massé, W. G. Allard, J. M. Robert and S. J. Rowland (2001).** "C<sub>25</sub> highly branched isoprenoid alkenes in planktonic diatoms of the *Pleurosigma* genus." *Organic Geochemistry* 32(10): 1271-1275.
- Berlendis, S., J.-F. o. Lascourreges, B. Schraauwers, P. Sivadon and M. Magot (2010).** "Anaerobic Biodegradation of BTEX by Original Bacterial Communities from an Underground Gas Storage Aquifer." *Environmental Science & Technology* 44(9): 3621-3628.

- Berner, R. A. (1984).** "Sedimentary pyrite formation: An update." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48(4): 605-615.
- Block, J. C., L. Mathieu, P. Servais, D. Fontvieille and P. Werner (1992).** "Indigenous bacterial inocula for measuring the biodegradable dissolved organic carbon (BDOC) in waters." *Water Research* 26(4): 481-486.
- Blumer, M., R. R. L. Guillard and T. Chase (1971).** "Hydrocarbons of marine phytoplankton." *Marine Biology* 8(3): 183-189.
- Boon, J. J., J. W. De Leeuw, G. J. Van De Hoek and J. H. Vosjan (1977).** "Significance and taxonomic value of iso and anteiso monoenoic fatty acids and branched beta hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*." *Journal of Bacteriology* 129(3): 1183-1191.
- Bradshaw, S. A. and G. Eglinton (1993).** "Marine invertebrate feeding and the sedimentary lipid record. Series", E. M. H. M. S.A. New York, *Organic geochemistry, Plenum Press*.
- Bradshaw, S. A., S. C. M. O'Hara, E. D. S. Corner and G. Eglinton (1989).** "Assimilation of dietary sterols and faecal contribution of lipids by invertebrates *Neomysis integer*, *Scrobicularia plana* and *Nereis diversicolor*." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 69: 891-911.
- Bray, E. E. and E. D. Evans (1961).** "Distribution of n-paraffins as a clue to recognition of source beds." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 22: 13.
- Burdon, J. (2001).** "Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic?" *Soil Science* 166(11): 752-769.
- Carruthers, R. G., W. Caldwell and D. R. Steuart (1912).** "The Oil Shales of the Lothians." *HMSO, Edinburgh*: 201.
- Challinor, J. M. (2001).** "Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61(1-2): 3-34.
- Chefetz, B., Y. Chen, C. E. Clapp and P. G. Hatcher (2000).** "Characterization of Organic Matter in Soils by Thermochemolysis Using Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH)." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64(2): 583-589.
- Clifford, D. J., D. M. Carson, D. E. McKinney, J. M. Bortiatynski and P. G. Hatcher (1995).** "A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH)." *Organic Geochemistry* 23(2): 169-175.
- Coates, J. D., R. T. Anderson and D. R. Lovley (1996).** "Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions." *Applied and Environmental Microbiology* 62(3): 1099-1101.
- Cohen, Z., M. C. Margheri and L. Tomaselli (1995).** "Chemotaxonomy of cyanobacteria." *Phytochemistry* 40(4): 1155-1158.

- Connan, J. (1987).** Regard sur la géochimie organique pétrolière d'aujourd'hui., *Soc. Nat. Elf Aquitaine Explor.Prod.*
- Corgié, S. C., E. J. Joner and C. Leyval (2003).** "Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots." *Plant and Soil* 257(1): 143-150.
- Courdouan, A., I. Christl, S. Meylan, P. Wersin and R. Kretzschmar (2007a).** "Characterization of dissolved organic matter in anoxic rock extracts and in situ pore water of the Opalinus Clay." *Applied Geochemistry* 22(12): 2926-2939.
- Courdouan, A., I. Christl, S. Meylan, P. Wersin and R. Kretzschmar (2007b).** "Isolation and characterization of dissolved organic matter from the Callovo-Oxfordian formation." *Applied Geochemistry* 22(7): 1537-1548.
- Dafner, E. V. and P. J. Wangersky (2002).** "A brief overview of modern directions in marine DOC studies part I. - Methodological aspects." *Journal of Environmental Monitoring* 4(1): 48-54.
- De Craen, M., M. Van Geet, L. Wang and M. Put (2004).** "High sulphate concentrations in squeezed Boom Clay pore water: evidence of oxidation of clay cores." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 29(1): 91-103.
- Duchaufour, P. (2001).** Introduction à la science du sol; Sol, végétation, environnement, *Dunod.*
- Durand, B. (1980).** "Sedimentary organic matter and kerogen. Definition and quantitative importance of kerogen." *Kerogen: insoluble organic matter from sedimentary rocks:* 13-34.
- Durand, B. and G. Nicaise (1980).** "Procedures for kerogen isolation." *Kerogen: insoluble organic matter from sedimentary rocks:* 35-53.
- Eglinton, G. and R. J. Hamilton (1967).** "Leaf epicuticular waxes." *Science* 156(3780): 1322-1335.
- Elie, M., P. Faure, R. Michels, P. Landais and L. Griffault (2000).** "Natural and laboratory oxidation of low-organic-carbon-content sediments: Comparison of chemical changes in hydrocarbons." *Energy and Fuels* 14(4): 854-861.
- Engebretson, R. R. and R. Von Wandruszka (1994).** "Microorganization in dissolved humic acids." *Environmental Science and Technology* 28(11): 1934-1941.
- Espitalié, J., G. Deroo and F. Marquis (1985a).** "La pyrolyse Rock-Eval et ses applications." *Revue de l'institut français du pétrole* 40(5): 563-579.
- Espitalié, J., G. Deroo and F. Marquis (1985b).** "La pyrolyse Rock-Eval et ses applications- Deuxieme partie." *Revue de l'institut français du pétrole* 40(6): 29.
- Faure, P. and C. Peiffert (2007).** "Lixiviation of argillaceous rocks: Impact of oxidation degree states on organic compound mobilization." *Fuel* 86(3): 426-433.

- Faure, P., L. Schlepp, V. Burkle-Vitzthum and M. Elie (2003).** "Low temperature air oxidation of n-alkanes in the presence of Na-smectite." *Fuel* 82(14): 1751-1762.
- Forsman, J. P. and J. M. Hunt (1958).** "Insoluble organic matter (kerogen) in sedimentary rocks." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 15(3): 170-182.
- Fritsche, W. and M. Hofrichter (2000).** "Aerobic degradation by microorganisms. Biotechnology.Series", N. Y. John Wiley & Sons. 11b: 146-164.
- Froelich, P. N., G. P. Klinkhammer, M. L. Bender, N. A. Luedtke, G. R. Heath, D. Cullen, P. Dauphin, D. Hammond, B. Hartman and V. Maynard (1979).** "Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43(7): 1075-1090.
- Gillan, F. T. and R. B. Johns (1980).** "Input and early diagenesis of chlorophylls in a temperate intertidal sediment ( Corner Inlet, Victoria)." *Marine Chemistry* 9(4): 243-253.
- Glatzel, S., K. Kalbitz, M. Dalva and T. Moore (2003).** "Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs." *Geoderma* 113(3-4): 397-411.
- Guggenberger, G., W. Zech and H. R. Schulten (1994).** "Formation and mobilization pathways of dissolved organic matter: Evidence from chemical structural studies of organic matter fractions in acid forest floor solutions." *Organic Geochemistry* 21(1): 51-66.
- Harvey, H. R. and G. B. McManus (1991).** "Marine ciliates as a widespread source of tetrahymanol and hopan-3beta-ol in sediments." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55(11): 3387-3390.
- Hatcher, P. G., M. A. Nanny, R. D. Minard, S. D. Dible and D. M. Carson (1995).** "Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH)." *Organic Geochemistry* 23(10): 881-888.
- Haven, H. L. T., M. Rohmer, J. Rullkötter and P. Bisseret (1989).** "Tetrahymanol, the most likely precursor of gammacerane, occurs ubiquitously in marine sediments." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53(11): 3073-3079.
- Hayes, M. H., P. MacCarthy, R. L. Malcolm and R. S. Swift (1989).** Humic Substances II: In search of structure., John Wiley & Sons: New York.
- Hedges, J. I. and R. G. Keil (1999).** "Organic geochemical perspectives on estuarine processes: sorption reactions and consequences." *Marine Chemistry* 65(1-2): 55-65.
- Hedges, J. I. and D. C. Mann (1979).** "The characterisation of plant tissues by their lignin oxidation products." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43: 1803-1807.

- Henderson, W., V. Wollra and G. Eglinton (1969).** "Identification of steranes and triterpanes from a geological source by capillary gas liquid chromatography and mass spectrometry. *Advances in organic geochemistry.Series*", P. Press. Oxford, P.A. Schenk and I. Havennaar.
- Henrichs, S. M. (1995).** "Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis-a comment." *Marine Chemistry* 49(2-3): 127-136.
- Huang, W. Y. and W. G. Meinschein (1979).** "Sterols as ecological indicators." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43(5): 739-745.
- Huggins, F. E. and G. P. Huffman (1989).** "Coal weathering and oxidation: the early stages. *Chemistry of coal weathering.Series*", C. R. Nelson. Amsterdam, Elsevier: 33-51.
- Hunt, J. M. (1996).** *Petroleum geochemistry and geology*, Ed. James Gilluly. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Jakobsen, T. F., K. U. Kjeldsen and K. Ingvorsen (2006).** "Desulfohalobium utahense sp. nov., moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from Great Salt Lake." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(9): 2063-2069.
- Jiamo, F., S. Guoying, P. Pingan, S. C. Brassell, G. Eglinton and J. Jigang (1986).** "Peculiarities of salt lake sediments as potential source rocks in China." *Organic Geochemistry* 10(1-3): 119-126.
- Johns, R. B. (1986).** "Biological markers in sedimentary record." *Methods in Geochemistry and Geophysics*, Elsevier, New York 24: 364.
- Johns, R. B., F. T. Gillan and J. K. Volkman (1980).** "Early diagenesis of phytol esters in a contemporary temperate intertidal sediment." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44(2): 183-188.
- Kaiser, K. and G. Guggenberger (2000).** "The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils." *Organic Geochemistry* 31(7-8): 711-725.
- Kalbitz, K., J. Schmerwitz, D. Schwesig and E. Matzner (2003).** "Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties." *Geoderma* 113(3-4): 273-291.
- Kates, M. (1964).** "Bacterial lipids." *Advances in lipid research* 2: 17-90.
- Kelley, I., J. P. Freeman and C. E. Cerniglia (1990).** "Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a Mycobacterium sp." *Biodegradation* 1(4): 283-290.
- Kenyon, C. N. (1972).** "Fatty acid composition of unicellular strains of blue-green algae." *Journal of Bacteriology* 109(2): 827-834.
- Kenyon, C. N., R. Rippka and R. Y. Stanier (1972).** "Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae." *Archiv fur Mikrobiologie* 83(3): 216-236.

- Killops, S. D. and V. J. Killops (2005).** "Introduction to organic geochemistry, 2nd edition." *Blackwell, Oxford*: 30-70.
- Knöller, K., C. Vogt, S. Feisthauer, S. M. Weise, H. Weiss and H.-H. Richnow (2008).** "Sulfur Cycling and Biodegradation in Contaminated Aquifers: Insights from Stable Isotope Investigations." *Environmental Science & Technology* 42(21): 7807-7812.
- Kogel-Knabner, I. (2002).** "The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter." *Soil Biology and Biochemistry* 34: 139-162.
- Krumholz, L. R. (2000).** "Microbial communities in the deep subsurface." *Hydrogeology Journal* 8(1): 4-10.
- Kuhn, E. P., P. J. Colberg, J. L. Schnoor, O. Wanner, A. J. B. Zehnder and R. P. Schwarzenbach (1985).** "Microbial transformations of substituted benzenes during infiltration of river water to groundwater: Laboratory column studies." *Environmental Science and Technology* 19(10): 961-968.
- Larter, S., A. Wilhelms, I. Head, M. Koopmans, A. Aplin, R. Di Primio, C. Zwach, M. Erdmann and N. Telnaes (2003).** "The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface--part 1: biodegradation rates in petroleum reservoirs." *Organic Geochemistry* 34(4): 601-613.
- Larter, S. R. and A. G. Douglas (1980).** "Melanoidins-kerogen precursors and geochemical lipid sinks: a study using pyrolysis gas chromatography (PGC)." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44(12): 2087-2095.
- Lee, D. Y. and W. J. Farmer (1989).** "Dissolved organic matter interaction with napropamide and four other nonionic pesticides." *Journal of Environmental Quality* 18(4): 468-474.
- Leenheer, J. A., R. L. Wershaw, G. K. Brown and M. M. Reddy (2003).** "Characterization and diagenesis of strong-acid carboxyl groups in humic substances." *Applied Geochemistry* 18(3): 471-482.
- Lijmbach, G. W. (1975).** On the origin of petroleum. Proceedings of the 9th world petroleum congress. A. S. publishers. London: 357-369.
- Littke, R., U. Klussmann, B. Krooss and D. Leythaeuser (1991).** "Quantification of loss of calcite, pyrite, and organic matter due to weathering of Toarcian black shales and effects on kerogen and bitumen characteristics." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 55(11): 3369-3378.
- Londry, K. L., L. L. Jahnke and D. J. Des Marais (2004).** "Stable Carbon Isotope Ratios of Lipid Biomarkers of Sulfate-Reducing Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 70(2): 745-751.
- Loureiro, M. R. B. and J. N. Cardoso (1990).** "Aromatic hydrocarbons in the Paraiba Valley oil shale." *Organic Geochemistry* 15(4): 351-359.

- MacCarthy, P. (1989).** "Aquatic Humic Substances: Influence in Fate and Treatment of Pollutants. *Advances in Chemistry*. Washington, DC, *American Chemical Society*.
- MacCarthy, P. (2001).** "The Principles of Humic Substances." *Soil Science* 166(11): 738-751.
- Mackenzie, A. S., R. L. Patience, J. R. Maxwell, M. Vandenbroucke and B. Durand (1980).** "Molecular parameters of maturation in the Toarcian shales, Paris Basin, France. I. Changes in the configurations of acyclic isoprenoid alkanes, steranes and triterpanes ( organic geochemistry)." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44(11): 1709-1721.
- Malcolm, R. L. (1990).** "The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments." *Analytica Chimica Acta* 232: 19-30.
- Marschner, B. and K. Kalbitz (2003).** "Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils." *Geoderma* 113(3-4): 211-235.
- Mayer, L. M. (1994).** "Surface area control of organic carbon accumulation in continental shelf sediments." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58(4): 1271-1284.
- Mayer, L. M. (1995).** "Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis-a comment." *Marine Chemistry* 49(2-3): 123-126.
- McCaffrey, M. A., J. Michael Moldowan, P. A. Lipton, R. E. Summons, K. E. Peters, A. Jeganathan and D. S. Watt (1994).** "Paleoenvironmental implications of novel C30 steranes in Precambrian to Cenozoic Age petroleum and bitumen." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58(1): 529-532.
- McDowell, W. H., A. Zsolnay, J. A. Aitkenhead-Peterson, E. G. Gregorich, D. L. Jones, D. Jandemmann, K. Kalbitz, B. Marschner and D. Schwesig (2006).** "A comparison of methods to determine the biodegradable dissolved organic carbon from different terrestrial sources." *Soil Biology and Biochemistry* 38(7): 1933-1942.
- Metting, F. B. (1993).** Structure and physiological ecology of soil microbial communities. Marcel Dekker, New York, *Soil Microbia Ecology*.
- Moldowan, J. M. and F. J. Fago (1986).** "Structure and significance of a novel rearranged monoaromatic steroid hydrocarbon in petroleum." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50(3): 343-351.
- Morrison, W. H. I. I. and M. M. Mulder (1994).** "Pyrolysis mass spectrometry and pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of ester- and ether-linked phenolic acids in coastal bermudagrass cell walls." *Phytochemistry* 35(5): 1143-1151.
- Morse, J. W., F. J. Millero, J. C. Cornwell and D. Rickard (1987).** "The chemistry of the hydrogen sulfide and iron sulfide systems in natural waters." *Earth Science Reviews* 24(1): 1-42.
- Navalon, S., M. Alvaro, I. Alcaina and H. Garcia (2010).** "Multi-method characterization of DOM from the Turia river (Spain)." *Applied Geochemistry* 25(11): 1632-1643.

- Nelson, C. R. (1989).** "Coal weathering: Chemical processes and pathways. Chemistry of Coal Weathering. Series", C. R. Nelson. Amsterdam, *Elsevier*: 1-26.
- Nicaise, G. (1977).** "Etude d'un phénomène d'altération naturelle en surface sur des échantillons prélevés à Frcocourt." *Institut Français du pétrole*.
- Oliver, J. D. and R. R. Colwell (1973).** "Extractable lipids of gram negative marine bacteria: Fatty acid composition." *International Journal of Systematic Bacteriology* 23(4): 442-458.
- Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan and E. F. DeLong (2001).** "Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis." *Science* 293(5529): 484-487.
- Ourisson, G., P. Albrecht and M. Rohmer (1982).** "Predictive microbial biochemistry - from molecular fossils to procaryotic membranes." *Trends in Biochemical Sciences* 7(7): 236-239.
- Peters, K. E. and J. M. Moldowan (1993).** The biomarker Guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Cambridge, *Cambridge University Press*.
- Petsch, S. T., R. A. Berner and T. I. Eglinton (2000).** "A field study of the chemical weathering of ancient sedimentary organic matter." *Organic Geochemistry* 31(5): 475-487.
- Petsch, S. T., R. J. Smernik, T. I. Eglinton and J. M. Oades (2001).** "A solid state <sup>13</sup>C-NMR study of kerogen degradation during black shale weathering." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(12): 1867-1882.
- Philp, R. P. and L. Mansuy (1997).** "Petroleum geochemistry: Concepts, applications, and results." *Energy and Fuels* 11(4).
- Philp, R. P. and F. Zhaoan (1987).** "Geochemical investigation of oils and source rocks from Qianjiang depression of Jiangnan basin, a terrigenous saline basin, China." *Organic Geochemistry* 11(6): 549-562.
- Piccolo, A. (2001).** "The supramolecular structure of humic substances." *Soil Science* 166(11): 810-832.
- Piccolo, A. (2002).** "The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science." *Advances in agronomy* 75: 57-134.
- Piccolo, A. and P. Conte (2000).** "Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers." *Advances in environmental research* 3(4): 508-521.
- Pourret, O., M. Davranche, G. Gruau and A. Dia (2007).** "Rare earth elements complexation with humic acid." *Chemical Geology* 243(1-2): 128-141.
- Prince, R. C. (2002).** Petroleum and other hydrocarbons biodegradation, *In: Encyclopedia of Environmental microbiology*, John Wiley & Sons, New York.

- Reiller, P. E., N. D. M. Evans and G. Szabo (2008).** "Complexation parameters for the actinides(IV)-humic acid system: A search for consistency and application to laboratory and field observations." *Radiochimica Acta* 96(6): 345-358.
- Rice, J. A. and P. MacCarthy (1991).** "Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances." *Organic Geochemistry* 17(5): 635-648.
- Rielley, G., R. J. Collier, D. M. Jones and G. Eglinton (1991).** "The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K.--I: source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record." *Organic Geochemistry* 17(6): 901-912.
- Robinson, N., G. Eglinton, S. C. Brassell and P. A. Cranwell (1984).** "Dinoflagellate origin for sedimentary  $4\beta$ -methylsteroids and  $5\alpha$ (H)-stanols." *Nature* 308(5958): 439-442.
- Rommerskirchen, F., A. Plader, G. Eglinton, Y. Chikaraishi and J. Rullkötter (2006).** "Chemotaxonomic significance of distribution and stable carbon isotopic composition of long-chain alkanes and alkan-1-ols in C4 grass waxes." *Organic Geochemistry* 37(10): 1303-1332.
- Rubinstein, I., O. Sieskind and P. Albrecht (1975).** "Rearranged sterenes in a shale: Occurrence and simulated formation." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1(19): 1833-1836.
- Rubinstein, I., C. Spyckerelle and O. P. Strausz (1979).** "Pyrolysis of asphaltenes: a source of geochemical information." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43(1): 1-6.
- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkest, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch and F. Widdel (1994).** "Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria." *Nature* 372(6505): 455-458.
- Schillawski, S. and S. Petsch (2008).** "Release of biodegradable dissolved organic matter from ancient sedimentary rocks." *Global Biogeochemical Cycles* 22(3).
- Schnitzer, M. and S. U. Khan (1972).** Humic substances in the environment. New York, M. Dekker.
- Schulten, H.-R. and M. Schnitzer (1997).** "Chemical Model Structures for Soil Organic Matter and Soils." *Soil Science* 162(2): 115-130.
- Seifert, W. K., J. Michael Moldowan and G. J. Demaison (1984).** "Source correlation of biodegraded oils." *Organic Geochemistry* 6(C): 633-643.
- Seifert, W. K. and J. M. Moldowan (1981).** "Paleoreconstruction by biological markers." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45(6): 783-794.
- Senesi, N. (1989).** "Composted materials as organic fertilizers." *Science of The Total Environment* 81-82: 521-542.

- Senesi, N. (1992).** "Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistic aspects by multiple spectroscopic approach." *Biogeochemistry of Trace Metals*: 429-496.
- Senesi, N. (1993).** *Organic Substances in Soil and Water: Natural Constituents and Their Influences on Contaminant Behavior*. Cambridge, *The Royal Society of Chemistry*.
- Senftle, J. T. and A. Davis (1984).** "Effect of oxidative weathering on the thermoplastic and liquefaction behaviors of four coals." *International Journal of Coal Geology* 3(4): 375-381.
- Sieskind, O., G. Joly and P. Albrecht (1979).** "Simulation of the geochemical transformations of sterols: superacid effect of clay minerals." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43(10): 1675-1679.
- Simoneit, B. R. T., J. O. Grimalt, T. G. Wang, R. E. Cox, P. G. Hatcher and A. Nissenbaum (1986).** "Cyclic terpenoids of contemporary resinous plant detritus and of fossil woods, ambers and coals." *Organic Geochemistry* 10(4-6): 877-889.
- Sinninghe Damsté, J. S., T. I. Eglinton, J. W. De Leeuw and P. A. Schenck (1989).** "Organic sulphur in macromolecular sedimentary organic matter: I. Structure and origin of sulphur-containing moieties in kerogen, asphaltenes and coal as revealed by flash pyrolysis." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53(4): 873-889.
- Sinninghe Damsté, J. S., W. Irene, C. Rijpstra, J. W. de Leeuw and P. A. Schenck (1988).** "Origin of organic sulphur compounds and sulphur-containing high molecular weight substances in sediments and immature crude oils." *Organic Geochemistry* 13(4-6): 593-606.
- Smith, K. E. C., M. Thullner, L. Y. Wick and H. Harms (2009).** "Sorption to Humic Acids Enhances Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation." *Environmental Science & Technology* 43(19): 7205-7211.
- Sollins, P., P. Homann and B. A. Caldwell (1996).** "Stabilization and destabilization of soil organic matter: Mechanisms and controls." *Geoderma* 74(1-2): 65-105.
- Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, E. A. Galinski, C. Belloch and B. J. Tindall (2006).** "Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes, *Halovibrio denitrificans* sp. nov. and *Halospina denitrificans* gen. nov., sp. nov., and evidence that the genus name *Halovibrio* Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(2): 379-388.
- Steelink, C. (1985).** *Humic substances in soil, sediment and water*. New York, *John Wiley & Sons*.
- Stevenson, F. J. (1982).** "Extraction, fraction and general chemical composition of soil organic matter. Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions. New York, *John Wiley & Sons*.

- Stevenson, F. J. (1994).** Humus Chemistry: Genesis, Compositions, Reactions., *John Wiley and Sons, Inc, New York.*
- Summons, R. E., J. K. Volkman and C. J. Boreham (1987).** "Dinosterane and other steroidal hydrocarbons of dinoflagellate origin in sediments and petroleum." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51(11): 3075-3082.
- Sun, M. Y., S. G. Wakeham, R. C. Aller and C. Lee (1998).** "Impact of seasonal hypoxia on diagenesis of phytol and its derivatives in Long Island Sound." *Marine Chemistry* 62(1-2): 157-173.
- Tegelaar, E. W., J. W. de Leeuw, S. Derenne and C. Largeau (1989).** "A reappraisal of kerogen formation." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 53(11): 3103-3106.
- Tegelaar, E. W., G. Hollman, P. Van Der Vegt, J. W. De Leeuw and P. J. Holloway (1995).** "Chemical characterization of the periderm tissue of some angiosperm species: recognition of an insoluble, non-hydrolyzable, aliphatic biomacromolecule (Suberan)." *Organic Geochemistry* 23(3): 239-251.
- Thouand, G., P. Bauda, J. Oudot, G. Kirsch, C. Sutton and J. F. Vidalie (1999).** "Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula." *Canadian Journal of Microbiology* 45(2): 106-115.
- Thurman, E. M. (1985).** "Organic Geochemistry of Natural Waters." *Martinus Nijhoff/Dr W Junk, Dordrecht, The Netherlands.*
- Tissot, B. P. and D. H. Welte (1978).** "Petroleum formation and occurrence." *Springer Verlag.*
- Trager, E. A. (1924).** "Kerogen and its relation to the origin of oil." *American Association of Petroleum Geologists Bulletin* 8: 301-311.
- Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka and M. Itavaara (2000).** "Biodegradation of lignin in a compost environment: A review." *Bioresource Technology* 72(2): 169-183.
- Van den Berg, M., D. Van de Meent, W. J. G. M. Peijnenburg, D. T. M. Sijm, J. Struijs and J. W. Tas (2007).** Transport, accumulation and transformation processes. Risk assessment of chemicals: An introduction. Dordrecht, Netherlands, *Springer.*
- Van Krevelen, D. W. (1961).** "Coal: Typology, Chemistry, Physics, Constitution." *Elsevier Amsterdam.*
- Vandenbroucke, M. (1993).** " Transformation of organic matter with increasing burial of sediments and the formation of petroleum in source rocks." *In: M.L. Bordenave, Editor, Applied Petroleum Geochemistry, Editions Technip, Paris:* 101-122.
- Volkman, J. K., S. M. Barrett, S. I. Blackburn, M. P. Mansour, E. L. Sikes and F. Gelin (1998).** "Microalgal biomarkers: A review of recent research developments." *Organic Geochemistry* 29(5-7 -7 pt 2): 1163-1179.

- Volkman, J. K., S. M. Barrett and G. A. Dunstan (1994).** "C<sub>25</sub> and C<sub>30</sub> highly branched isoprenoid alkenes in laboratory cultures of two marine diatoms." *Organic Geochemistry* 21(3-4): 407-414.
- Von Wandruszka, R., R. R. Engebretson and L. M. Yates (1999).** "Humic acid pseudomicelles in dilute aqueous solution: Fluorescence and surface tension measurements." *Understanding Humic Substances: Advanced Methods, Properties and Applications*: 79-85.
- Wakeham, S. G. (1987).** "Steroid geochemistry in the oxygen minimum zone of the eastern tropical North Pacific Ocean." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51(11): 3051-3069.
- Weete, J. D. (1976).** "Algal and fungal waxes. Chemistry and biochemistry of natural waxes. Series", K. P.E. Amsterdam, *Elsevier*.
- Wengel, M., E. Kothe, C. M. Schmidt, K. Heide and G. Gleixner (2006).** "Degradation of organic matter from black shales and charcoal by the wood-rotting fungus *Schizophyllum commune* and release of DOC and heavy metals in the aqueous phase." *Science of The Total Environment* 367(1): 383-393.
- Wenger, L. M., C. L. Davis and G. H. Isaksen (2002).** "Multiple controls on petroleum biodegradation and impact on oil quality." *SPE Reservoir Evaluation and Engineering* 5(5): 375-383.
- Wenger, L. M. and G. H. Isaksen (2002).** "Control of hydrocarbon seepage intensity on level of biodegradation in sea bottom sediments." *Organic Geochemistry* 33(12): 1277-1292.
- Wershaw, R. L. (1986).** "New model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems." *Journal of Contaminant Hydrology* 1(1-2): 29-45.
- Wershaw, R. L. and K. R. Kennedy (1998).** Use of <sup>13</sup>C-NMR and FTIR for elucidation of degradation pathways during natural litter decomposition and composting: IV. Characterization of humic and fulvic acids extracted from senescent leaves. Cambridge, *Royal Society of Chemistry*.
- White, W. D. (1915).** "White, Some relations in origin between coal and petroleum." *Journal of the Washington Academy of Science* 5: 189-212.
- Wolff, G. A., N. A. Lamb and J. R. Maxwell (1986).** "The origin and fate of 4-methyl steroids-II. Dehydration of stanols and occurrence of C<sub>30</sub> 4-methyl steranes." *Organic Geochemistry* 10(4-6): 965-974.
- Yamane, A., K. Sakakibara, M. Hosomi and A. Murakami (1997).** "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in estuarine sediment of tama river in Tokyo urban area." *Water Science and Technology* 35(8): 69-76.

- Yates, L. M., R. R. Engebretson, T. J. Haakenson and R. von Wandruszka (1997).** "Immobilization of aqueous pyrene by dissolved humic acid." *Analytica Chimica Acta* 356(2-3): 295-300.
- Yemashova, N. A., V. P. Murygina, D. V. Zhukov, A. A. Zakharyantz, M. A. Gladchenko, V. Appanna and S. V. Kalyuzhnyi (2007).** "Biodeterioration of crude oil and oil derived products: A review." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 6(4): 315-337.
- Youngblood, W. W. and M. Blumer (1973).** "Alkanes and alkenes in marine benthic algae." *Marine Biology* 21(3): 163-172.
- Youngblood, W. W., M. Blumer, R. L. Guillard and F. Fiore (1971).** "Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae." *Marine Biology* 8(3): 190-201.
- Zsolnay, A. (1997).** The development of tests to quantify the potential ecological relevance of the water soluble humus. Wroclaw, *Polish Society of Humic Substances*.
- Zsolnay, Á. (2003).** "Dissolved organic matter: artefacts, definitions, and functions." *Geoderma* 113(3-4): 187-209.



**Chapitre 2 :**  
**Méthodes analytiques.**



## **SOMMAIRE DU CHAPITRE 2 : METHODES ANALYTIQUES.**

<b>2.1. PRETRAITEMENT ET EXTRACTION</b> .....	<b>71</b>
2.1.1. <i>Conditionnement, lyophilisation, broyage</i> .....	<b>71</b>
2.1.2. <i>Extraction de la MOE et la MOD</i> .....	<b>72</b>
2.1.2.1. <i>Extraction aux soxhlets</i> .....	<b>72</b>
2.1.2.2. <i>Extraction de la matière organique dissoute par leaching</i> .....	<b>73</b>
2.1.3. <i>Extraction de la matière organique dissoute sur phase solide</i> .....	<b>74</b>
2.1.3.1. <i>Principe</i> .....	<b>74</b>
2.1.3.2. <i>Protocole</i> .....	<b>74</b>
<b>2.2. TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT DE LA MATIERE ORGANIQUE</b> .....	<b>75</b>
2.2.1. <i>Technique de fractionnement de la MOE par chromatographie liquide sur phase solide</i> .....	<b>75</b>
2.2.1.1. <i>Principe</i> .....	<b>76</b>
2.2.1.2. <i>Fractionnement sur alumine</i> .....	<b>76</b>
2.2.1.3. <i>Fractionnement sur silice</i> .....	<b>77</b>
2.2.2. <i>Fractionnement de la MOD à pH acide</i> .....	<b>78</b>
2.2.2.1. <i>Définitions</i> .....	<b>78</b>
2.2.2.2. <i>Protocole de séparation</i> .....	<b>78</b>
2.2.3. <i>Fractionnement de la MOD par dialyse</i> .....	<b>79</b>
<b>2.3. ANALYSES MOLECULAIRES</b> .....	<b>80</b>
2.3.1. <i>Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse</i> .....	<b>80</b>
2.3.1.1. <i>Appareillage</i> .....	<b>80</b>
2.3.1.2. <i>Principe</i> .....	<b>81</b>
2.3.1.3. <i>Méthode d'analyse</i> .....	<b>82</b>
2.3.2. <i>Pyrolyse flash-Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (PyGC-MS)</i> .....	<b>83</b>
2.3.2.1. <i>Principe et appareillage</i> .....	<b>83</b>
2.3.2.2. <i>Méthodes d'analyse</i> .....	<b>84</b>
2.3.3. <i>Chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) - exclusion stérique</i> .....	<b>86</b>
2.3.3.1. <i>Appareillage du montage HPLC-exclusion stérique</i> .....	<b>86</b>
2.3.3.2. <i>Principe</i> .....	<b>86</b>
2.3.3.3. <i>Méthode d'analyse des extraits organiques</i> .....	<b>87</b>
2.3.3.4. <i>Méthode d'analyse des extraits aqueux</i> .....	<b>88</b>
2.3.4. <i>Spectromètre hybride quadripôle-temps de vol (Qtof)</i> .....	<b>89</b>
2.3.4.1. <i>Principe et appareillage</i> .....	<b>89</b>
2.3.4.2. <i>Méthode d'analyse</i> .....	<b>91</b>
<b>2.4. TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES</b> .....	<b>92</b>
2.4.1. <i>Généralité sur les méthodes spectroscopiques</i> .....	<b>92</b>
2.4.2. <i>Spectroscopie IRTF en mode transmission</i> .....	<b>93</b>
2.4.2.1. <i>Principe</i> .....	<b>93</b>
2.4.2.2. <i>Appareillage, conditions opératoires et préparation des échantillons</i> ...	<b>95</b>
2.4.2.3. <i>Utilisation des données de microspectroscopie IRTF</i> .....	<b>96</b>
2.4.3. <i>La spectroscopie de fluorescence</i> .....	<b>97</b>
2.4.3.1. <i>Définitions et principe</i> .....	<b>97</b>

## Chapitre 2. Méthodes analytiques.

2.4.3.2. Facteurs influençant la fluorescence .....	98
<b>2.4.3.2.1. Influence de la concentration-Relations fondamentales .....</b>	<b>99</b>
<b>2.4.3.2.2. Les phénomènes de <i>quenching</i> .....</b>	<b>99</b>
<b>2.4.3.2.3. Les diffusions de Rayleigh, Tyndall et Raman .....</b>	<b>99</b>
<b>2.4.3.2.4. Autres facteurs .....</b>	<b>100</b>
2.4.3.3. Appareillage.....	100
2.4.3.4. Spectres de fluorescence .....	101
2.4.3.5. Méthode d'analyse.....	101
2.4.3.6. La fluorescence des eaux naturelles .....	102
<b>2.4.3.6.1. Bibliographie .....</b>	<b>102</b>
<b>2.4.3.6.2. Indices de fluorescence .....</b>	<b>103</b>
2.4.3.6.2.1. <i>L'intensité de fluorescence (FI)</i> .....	104
2.4.3.6.2.2. <i>L'indice Biologique (BIX)</i> .....	104
2.4.3.6.2.3. <i>L'indice d'humification (HIX)</i> .....	105
<b>2.5. ANALYSE ROCK EVAL .....</b>	<b>105</b>
2.5.1. <i>Principe</i> .....	105
2.5.2. <i>Indices Rock Eval</i> .....	106
<b>2.6. DOSAGE DU CO<sub>2</sub> .....</b>	<b>107</b>
<b>2.7. REFERENCES .....</b>	<b>108</b>

## 2. Méthodes analytiques

La matière organique de la formation de Boom est relativement complexe puisqu'elle contient trois compartiments : la matière organique extractible au solvant organique (MOE), la matière organique extractible à l'eau (MOD) et le kérogène. Différentes expériences ainsi que la caractérisation et le traitement des échantillons ont été menés en laboratoire : les expériences d'oxydation seront présentées de manière plus exhaustive dans le chapitre 4 et les expériences de biodégradation seront détaillées dans le chapitre 5. Les échantillons utilisés et les plans des expériences réalisées seront détaillés dans les parties concernées (expériences d'oxydation, chapitre 4 et expériences de biodégradation, chapitre 5). L'objectif de ce chapitre est de présenter l'ensemble des techniques utilisées pour caractériser la MOE, la MOD et le kérogène dans les expériences d'oxydation et de biodégradation.

### 2.1. *Prétraitement et extraction*

#### 2.1.1. **Conditionnement, lyophilisation, broyage**

Les échantillons solides ont été conservés sous argon dans des sacs scellés avant prétraitement afin de s'assurer que ces derniers ne soient pas altérés. Les échantillons d'eau ont été conservés aux congélateurs.

L'ensemble des échantillons solides ainsi qu'une partie des eaux analysées, par la suite, par pyrolyse flash couplée à une chromatographie gazeuse ont été lyophilisés. La lyophilisation permet l'élimination de l'eau contenue dans un échantillon par sublimation. Le calcul de la teneur en eau des échantillons solides se fait par différence de masse des échantillons avant et après lyophilisation.

Les échantillons lyophilisés ont été broyés à 250  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un broyeur en acier (porphyrisation) afin d'homogénéiser les échantillons et d'augmenter la surface de contact entre les échantillons et le solvant lors de l'étape suivante : l'extraction.

### 2.1.2. Extraction de la MOE et la MOD

Les échantillons de roche contiennent une fraction extractible aux solvants organiques (MOE) et une fraction extractible à l'eau (MOD). Pour étudier ces deux fractions, deux techniques d'extraction ont été utilisées :

- **L'extraction aux soxhlets de la MOE et de la MOD:** cette technique permet d'extraire de grande quantité de roche et d'obtenir de grand volume de MOD ;
- **L'extraction de la MOD de type leaching en boîte à gants :** cette technique permet de contrôler un maximum de paramètre lors de l'extraction comme, par exemple, l'atmosphère dépourvu d'oxygène et la composition de l'eau de lixiviation.

#### 2.1.2.1. Extraction aux soxhlets

Les échantillons solides ont été extraits par un système de soxhlet qui permet d'extraire une grande quantité de roche. Ce système permet l'extraction, par des solvants, de composés à partir d'une matrice solide. Le type de composés extraits dépend de la nature du solvant : le chloroforme pour les composés organiques (MOE) et l'eau milliQ pour les composés solubles dans l'eau (MOD). Les durées d'extraction varient selon les expériences ; elles sont indiquées lors de la présentation des protocoles d'oxydation et de biodégradation, dans les chapitres 4 et 5 (paragraphe 4.1.1, 4.2.1.1., 4.2.2.1. et 5.2.).

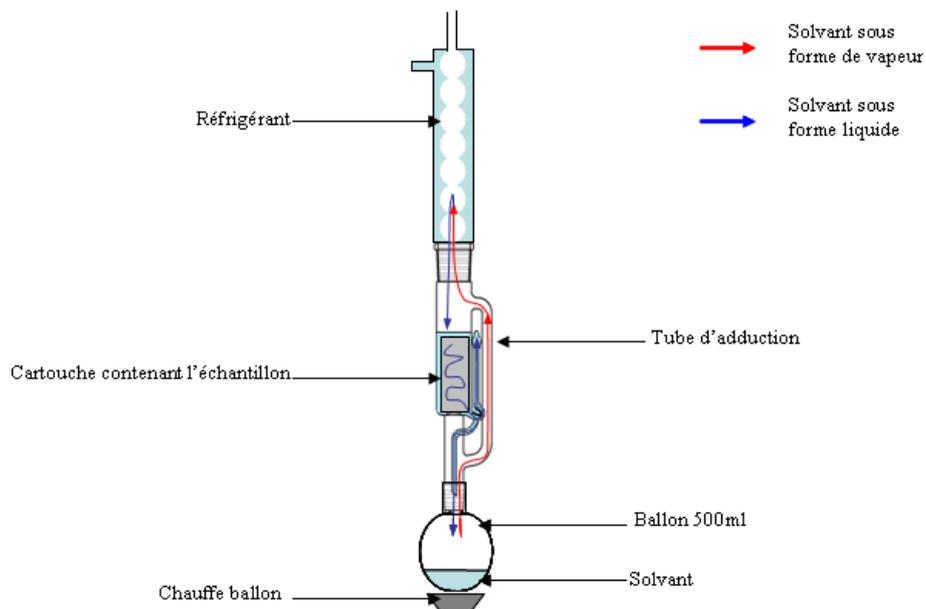


Figure 2-1: Schéma du montage expérimental d'un soxhlet.

## Chapitre 2. Méthodes analytiques.

Lors d'une extraction au soxhlet, le solvant est porté à ébullition, puis est maintenu à température constante ; les vapeurs de solvant montent par le tube d'adduction et se condensent au niveau du réfrigérant (Figure 2-1). Le solvant liquide retombe, ensuite, dans le soxhlet au niveau de la cartouche contenant l'échantillon et les composés d'intérêts se solubilisent, alors, dans le solvant. Lorsque le niveau de solvant atteint le sommet du siphon, celui-ci retourne dans le ballon.

L'extrait obtenu est, ensuite, filtré :

- A 0.2 $\mu\text{m}$  pour l'extrait organique afin d'enlever les particules argileuses ;
- A 0.7 $\mu\text{m}$  puis 0.45 $\mu\text{m}$  pour l'extrait aqueux pour obtenir la fraction dissoute.

### 2.1.2.2. Extraction de la matière organique dissoute par leaching

Cette extraction a été effectuée dans les laboratoires du SCK-CEN en Belgique. Cette technique a été mise au point afin de préserver l'équilibre chimique entre l'eau de leaching et la roche durant l'extraction (De Craen *et al.*, 2004b). Les échantillons sont agités pendant 4 jours en atmosphère anaérobie, avec une eau appelée Synthetic Boom Clay Water (SBCW) de composition chimique connue (Tableau 2-1). Cette composition chimique a été mise au point par les équipes du SCK-CEN à partir de l'étude des eaux des piézomètres du laboratoire souterrain. Pour nos expériences, le ratio eau/roche est de 6 (30ml de SBCW, 5g d'échantillon). Après extraction, les échantillons sont filtrés à 0.45 $\mu\text{m}$  pour ne garder que la fraction dissoute.

Élément	Concentration (mg/L)
<b>B<sup>3+</sup></b>	7.5
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	saturé
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	1.3
<b>K<sup>+</sup></b>	13.1
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	2.6
<b>Na<sup>+</sup></b>	330
<b>Cl<sup>-</sup></b>	27.3
<b>F<sup>-</sup></b>	4.9
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	0.2
<b>TIC</b>	848

Tableau 2-1 : Composition chimique de l'eau SBCW (Synthetic Boom Clay Water).

### 2.1.3. Extraction de la matière organique dissoute sur phase solide

La fraction hydrosoluble de la formation de Boom est riche en sel, notamment les eaux issues de la lixiviation d'échantillons oxydés (De Craen *et al.*, 2004a). Ces sels peuvent poser des problèmes lors de certaines analyses telles que la microscopie infra rouge (IRTF). C'est pourquoi, une partie des échantillons ont été traités par Extraction sur Phase Solide (SPE) afin d'éliminer les sels des échantillons.

#### 2.1.3.1. Principe

La SPE est une méthode d'extraction liquide/solide ; la phase solide est un disque en silice sur lequel ont été greffé des octadécyls (C<sub>18</sub>). Ils forment une phase hydrophobe permettant de piéger, préférentiellement, les composés organiques hydrophobes présents dans une solution aqueuse. Ces composés pourront être, ensuite, récupérés par percolation d'un solvant organique adapté traversant le disque.

Les disques C<sub>18</sub> ont, tout d'abord, été utilisés pour extraire des composés non polaires ou modérément polaires, tels que des pesticides (Ferrer *et al.*, 1999), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Brown et Peake, 2003), des complexes organo-métalliques (Mills *et al.*, 1989) ou encore des phtalates (Fatoki et Noma, 2002) présents dans des échantillons d'eau. Cependant, d'autres auteurs ont, récemment, utilisés cette technique pour extraire, reconcentrer la MOD (Roubeuf *et al.*, 2000) et enlever les ions des échantillons aqueux (Kim *et al.*, 2003, Simjouw *et al.*, 2005). Dans ces études, l'élution de la MOD fixée sur le disque se fait à l'aide d'un mélange méthanol/eau (Roubeuf *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003 ).

#### 2.1.3.2. Protocole

Le montage expérimental de la SPE est composé d'un flacon collecteur de 1L, d'un repose-disque, muni d'un système permettant d'aspirer sous vide, et d'un vase de 350ml. Le disque est déposé entre le repose-disque et le vase sur une grille métallique ; un joint en téflon assure l'étanchéité (Figure 2-2).

Chaque échantillon est, préalablement, filtré à 0.45 µm, puis dilué avec de l'eau milliQ (50 :50) afin d'éviter la saturation du disque. Le pH de la solution est fixé à 1 avec une solution d'acide chlorhydrique et l'ensemble est agité pendant 10 min. Le disque, est tout d'abord, conditionné avec 15 ml de méthanol, puis 30 ml d'eau ; l'échantillon est, ensuite,

ajouté. Le filtrat contient tout ce qui n'a pas été fixé par le filtre, correspondant dans le cas présent, essentiellement aux sels. Le filtre est élué avec un mélange méthanol : eau milliQ (90% :10%) ; la MOD obtenue est séchée afin d'être analysée en IRTF. Cette procédure a été validée sur des eaux naturelles de rivière (Kim *et al.*, 2003 et Roubeuf *et al.*, 2000).

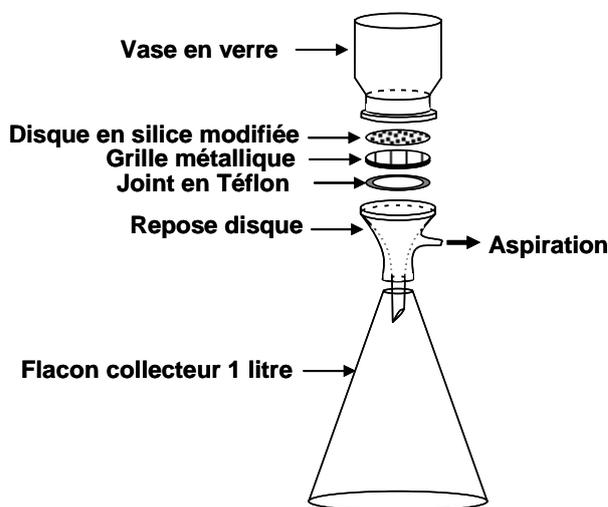


Figure 2-2 : Schéma du montage expérimental du système d'extraction sur phase solide.

## 2.2. Technique de fractionnement de la matière organique

Trois types de fractionnement ont été utilisés ; le fractionnement de la MOE par chromatographie liquide sur phase solide, le fractionnement de la MOD par différence de solubilité à pH acide et le fractionnement de la MOD par dialyse à 3 500 Da.

### 2.2.1. Technique de fractionnement de la MOE par chromatographie liquide sur phase solide

L'extrait organique total (MOE) peut être fractionné en trois parties par chromatographie liquide sur phase solide :

- **La fraction aliphatique** qui contient les composés les moins polaires. Elle contient les hydrocarbures sans noyaux aromatiques, saturés et insaturés ;
- **La fraction aromatique** qui contient les composés de polarité intermédiaire. Elle contient les hydrocarbures aromatiques et quelques composés soufrés et oxygénés ;

- **Les résines** qui contiennent les composés fonctionnalisés (acides, alcools, cétones...) de forte polarité.

Une partie des composés organiques présents dans la MOE peut rester piégée dans les phases stationnaires des colonnes. Ces composés sont assimilés aux asphaltènes.

#### **2.2.1.1. Principe**

La chromatographie liquide sur phase solide est une technique de séparation des composés organiques selon leur polarité. L'extrait organique total est dissous dans un solvant de faible polarité (DCM, pentane). Cette solution, appelée phase liquide ou mobile, est injectée au sommet de la colonne chromatographique verticale et remplie d'une phase perméable appelée phase solide ou stationnaire. Cette phase stationnaire est une fine poudre à forte surface spécifique dont la fonction est d'adsorber les composés organiques. Les forces d'adsorption entre une molécule organique et la phase stationnaire sont d'autant plus fortes que la polarité de la molécule est grande. En outre, la phase mobile migre vers la sortie de la colonne sous l'effet de la gravité et entraîne, avec elle, les composés organiques qui y sont dissous.

La chromatographie liquide est basée sur l'affinité des composés organiques avec les phases mobiles et stationnaires. Plus une molécule est polaire et plus la phase mobile doit avoir une forte polarité pour la désorber et l'entraîner, avec elle, en sortie de colonne. Ainsi, des éluions successives par des solvants de polarité croissante permettent de récupérer des fractions organiques contenant des composés de polarité également croissante.

La séparation est effectuée à l'aide de deux phases solides différentes :

- L'alumine pour séparer une partie des résines (macromolécules polaires) de la fraction aliphatique, aromatique et des résines de polarité plus limitée ;
- La silice pour séparer la fraction aliphatique, la fraction aromatique et des résines de polarité limitée.

#### **2.2.1.2. Fractionnement sur alumine**

Les colonnes sont dimensionnées pour traiter des aliquotes d'extrait inférieures à 30 mg ; au-delà la colonne est saturée et la séparation n'est plus assurée. L'alumine est préalablement rincée au cyclohexane, au méthanol et, enfin, au dichlorométhane (DCM) ; elle est, ensuite, activée toute une nuit à 125°C. Enfin, elle est introduite dans une pipette pasteur bouchée par un coton, le tout nettoyé au DCM.

L'extrait dilué dans du DCM est, alors, introduit en tête de la pipette pasteur ; puis 4ml de DCM sont ajoutés : la fraction aliphatique, aromatique et les résines de faible polarité sont récupérés (Figure 2-3-A). Ensuite, un mélange de DCM et de méthanol (1 :1, v:v) est ajouté, ce qui permet d'éluer les résines de plus forte polarité (Figure 2-3-B).

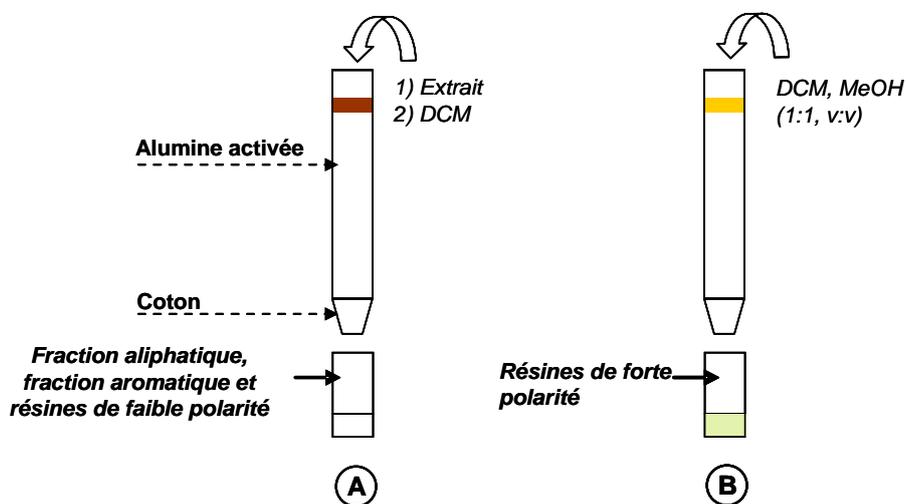


Figure 2-3 : Représentation schématique du fractionnement sur alumine.

Les deux flacons sont séchés sous flux d'azote, puis pesés pour effectuer un bilan de masse: les pertes éventuelles peuvent, également, être évaluées. Ces composés, piégés dans la colonne, correspondent à des macromolécules très polaires considérées dans le cadre de ce travail, comme des asphaltènes.

### 2.2.1.3. Fractionnement sur silice

La silice est préparée selon le même protocole que l'alumine. Les fractions aliphatiques, aromatiques et les résines peu polaires sont dilués avec du *n*-pentane et introduits en tête de colonne ; puis 3.5 ml de *n*-pentane sont ajoutés, ce qui permet d'éluer la fraction aliphatique (Figure 2-4-A).

Ensuite, un mélange de *n*-pentane/DCM (65 :35, v :v) est ajouté, ce qui permet d'éluer la fraction aromatique (Figure 2-4-B). Pour finir, un mélange méthanol/DCM (50 :50, v :v) permet de récupérer les résines de faible polarité qui sont regroupées avec les résines de forte polarité pour obtenir la fraction résine (Figure 2-4-C).

Les trois fractions sont séchées, puis pesées afin d'obtenir un bilan de masse.

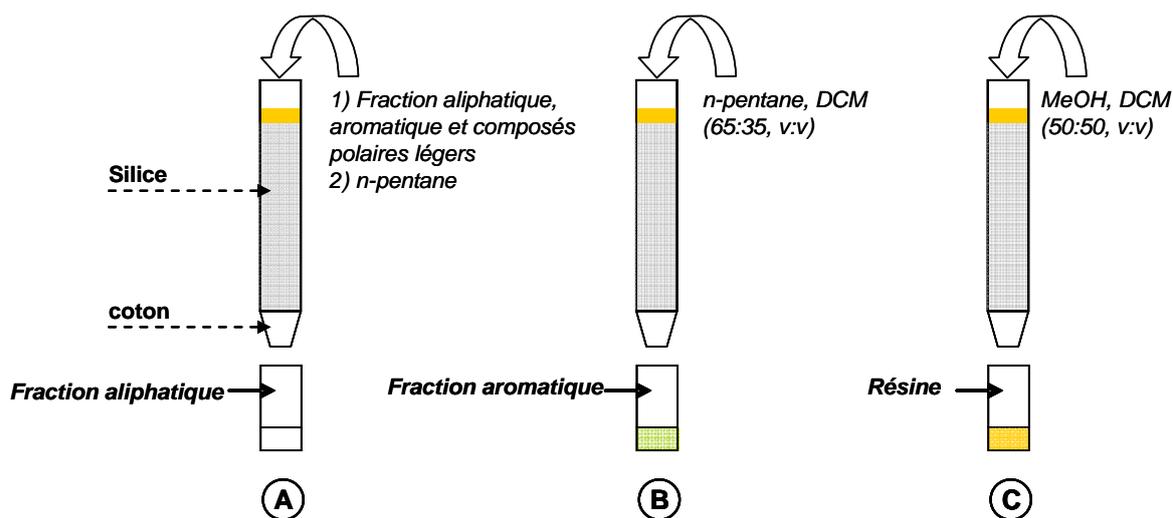


Figure 2-4 : Représentation schématique du fractionnement sur silice.

## 2.2.2. Fractionnement de la MOD à pH acide

### 2.2.2.1. Définitions

La MOD a été divisée en deux fractions, dont la solubilité diffère à pH acide :

- **La fraction « humic like »** contient les composés insolubles dans l'eau à pH < 2 ;
- **La fraction « fulvic like »** comprend les composés solubles dans l'eau quelque soit le pH.

Nous avons appelé ces deux fractions « *humic like* » et « *fulvic like* », puisque cette séparation (i) ne suit pas le protocole classique de séparation des acides humiques et fulviques établi par la société internationale des substances humiques (IHSS) ; ensuite, (ii) elle est appliquée à de la matière organique fossile et non pas à de la matière organique de sol.

### 2.2.2.2. Protocole de séparation

Le pH de la fraction hydrosoluble, préalablement filtrée à 0.45µm, est baissé à 2 avec une solution d'acide chlorhydrique. La solution est, ensuite, laissée au repos (5°C) pendant 1h, puis elle est centrifugée pendant 15 min à 10 000 tours/min (Figure 2-5).

Suite à la centrifugation, un précipité marron apparaît : le surnageant est mis de côté et correspond à la fraction « fulvic like ». Le précipité marron est dissous par ajout d'eau milliQ et d'hydroxyde de sodium. L'opération précédente est réitérée une seconde fois. A la fin de

la centrifugation, le surnageant est ajouté à la fraction « fulvic like » obtenue précédemment et le précipité marron recueilli correspond à la fraction « humic like ».

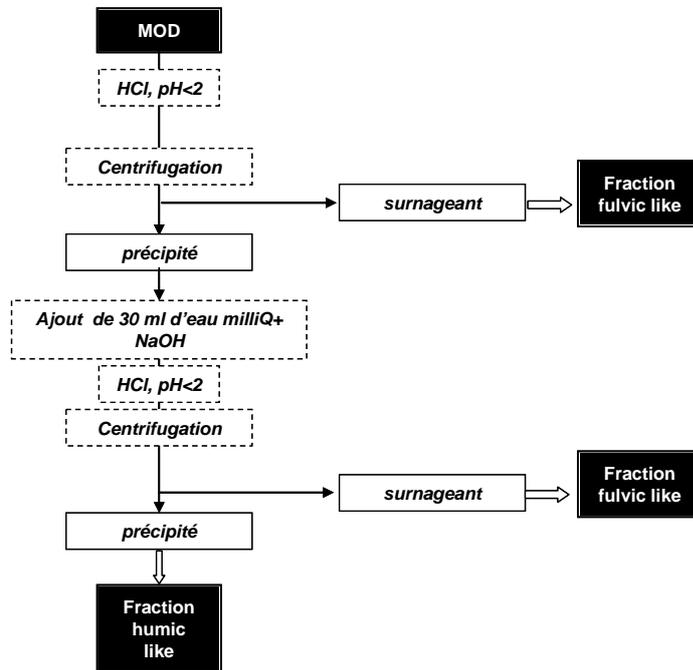


Figure 2-5 : Protocole d'isolation des fractions « fulvic like » et « humic like ».

### 2.2.3. Fractionnement de la MOD par dialyse

La MOD a été fractionnée par dialyse à 3 500 Da afin d'estimer et d'étudier l'évolution de la fraction inférieure à 3 500 Da lors des expériences effectuées dans le cadre de cette thèse. La dialyse est une technique de séparation se basant sur la diffusion des molécules à travers une membrane semi-perméable (Figure 2-6). Il s'agit d'un transfert passif des molécules d'un compartiment A vers un compartiment B, selon un gradient de concentration (du plus concentré vers le moins concentré) (Pastor et Pauli, 1995).

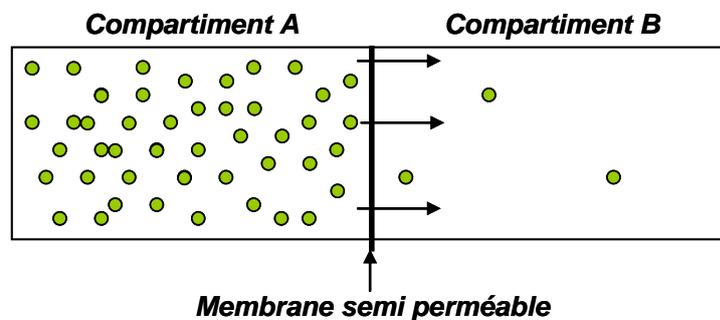


Figure 2-6 : Principe de la diffusion.

La membrane à dialyse utilisée est une membrane Spectra/Por® Dialysis, 3 500 Da. Les échantillons, filtrés à 0.45µm, sont placés dans les sacs à dialyse préalablement rincés pendant 24h dans de l'eau distillée et plongés dans de l'eau milliQ (dialysat) avec un ratio volume échantillon/volume dialysat de 100. Le dialysat est changé toute les 24h et l'expérience de dialyse dure 5 jours.

La teneur en COD, dans les différentes solutions aqueuses, a été mesurée en utilisant un analyseur de TOC-V-CSH series Shimadzu.

## **2.3. Analyses moléculaires**

La MOE et la MOD sont des mélanges complexes qui nécessitent l'utilisation de différentes méthodes chromatographiques pour séparer, à l'échelle moléculaire les différents composés constituant la matière organique. Les différentes techniques chromatographiques utilisées dans le cadre de ce travail de recherche ont été les suivantes :

- Le couplage de chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse (GC-MS) ;
- Le couplage Pyrolyse flash - Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (Py-GC-MS) ;
- La chromatographie en phase liquide à haute pression (HPLC) – perméation de gel.

### **2.3.1. Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse**

#### **2.3.1.1. Appareillage**

Les extraits organiques ont été analysés grâce à un couplage de chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (GC-MS). Ce couplage permet de séparer les différents composés de l'extrait organique et de les analyser, ensuite, par spectrométrie de masse.

Le couplage utilisé correspond à un chromatographe Agilent 6890N GC, équipé d'un injecteur split-splitless et d'un spectromètre de masse Agilent 5973 Inert. La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne capillaire en silice fondue DB-5 J&W

Scientific (longueur : 60 m ; diamètre : 0,25 mm ; épaisseur de film : 0,1  $\mu\text{m}$ ) à phase non polaire (5% phénylméthylpolysiloxane).

### 2.3.1.2. Principe

La chromatographie en phase gazeuse permet la séparation des composés à l'échelle moléculaire grâce à une phase mobile (gaz, ici l'hélium) et une phase statique (phase de la colonne). Le mélange à analyser est introduit dans l'injecteur (Figure 2-7). Les composés organiques du mélange se vaporisent peu à peu avec l'élévation de la température du four chromatographique ; le gaz vecteur va entraîner progressivement les molécules à séparer, via la colonne, vers le détecteur (spectromètre de masse).

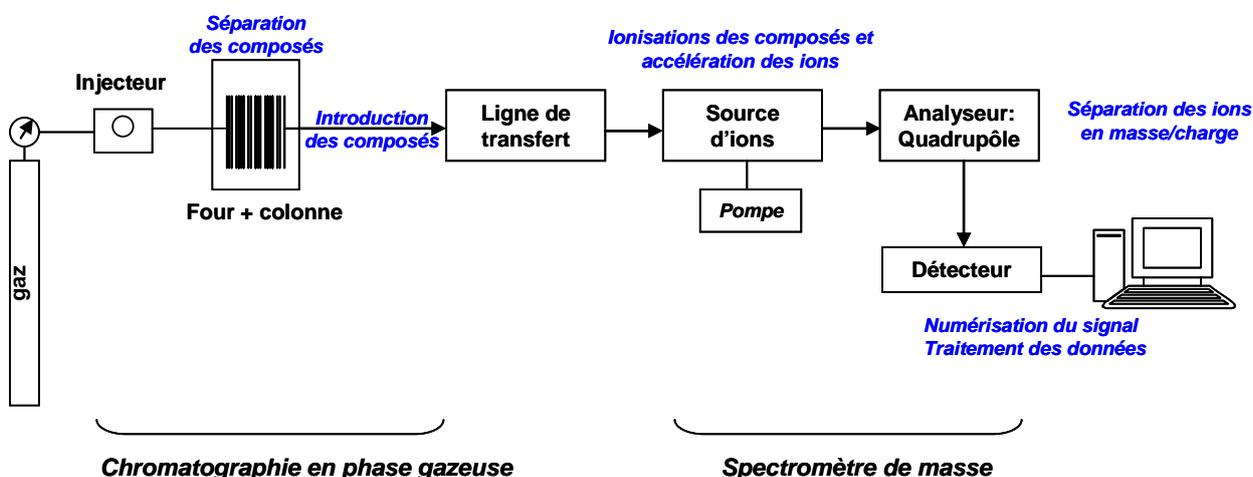


Figure 2-7 : Principe du couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse.

Le chromatographe est couplé au spectromètre de masse par une ligne de transfert chauffée à 320°C. Le gaz vecteur est, alors, éliminé par pompage (le vide dans le spectromètre de masse est inférieur à  $10^{-5}$  Torr) et les molécules totalement ou partiellement résolues, lors de l'analyse chromatographique, sont amenées dans la source d'ionisation du spectromètre de masse. Elles y sont bombardées par un faisceau d'électrons de 70 eV et sont fragmentées en espèces (ions positifs ou molécules neutres) de plus petites tailles.

Les ions sont, ensuite, accélérés par une forte différence de potentiel, puis concentrés en un faisceau grâce à une série de lentilles utilisant des champs électriques ; ils sont, enfin, envoyés à travers le spectromètre de masse. Il s'agit d'un quadripôle constitué de deux pôles positifs et de deux pôles négatifs. Les ions sont sélectionnés selon leur rapport masse/charge

(m/z). Ils sont, ensuite, détectés par un multiplicateur d'électrons et un amplificateur connectés à un système informatique d'acquisition.

### 2.3.1.3. Méthode d'analyse

Les extraits peuvent contenir des molécules très polaires telles que les acides alcanoïques qui sont mal séparés par les colonnes chromatographiques. C'est pourquoi, afin d'améliorer la résolution chromatographique, une technique de silylation est utilisée. Cette dernière protège les fonctions OH en remplaçant l'hydrogène actif par un groupe triméthylsilyle. Le réactif employé est un mélange de BSTFA et de TMCS (99/1) (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide et trimethylchlorosilane) qui agissent selon le mécanisme suivant (Figure 2-8):

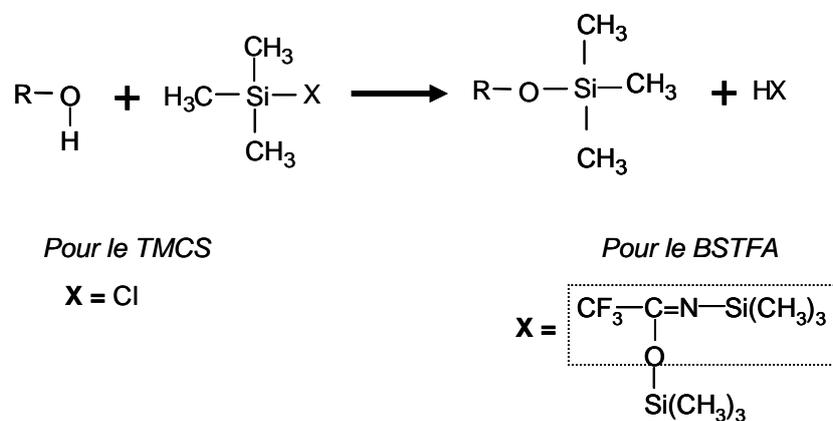


Figure 2-8 : Principe de la silylation avec du BSTFA et du TMCS.

Les extraits organiques totaux et les fractions polaires sont dilués dans du dichlorométhane à une concentration de 8mg/ml ; 50µl d'extrait sont, alors, dilués avec 50µl de BSTFA + TMCS (99/1) dans un flacon. Pour accélérer la cinétique de la réaction, les flacons passeurs sont placés à l'étuve pendant 15 minutes à 60 °C. Les fractions aliphatiques et aromatiques sont diluées dans de l'hexane à une concentration de 4mg/ml.

Une faible quantité d'échantillons (1µl) est injectée dans l'injecteur du chromatographe en phase gazeuse. Le programme de température du four est le suivant : 60°C-130°C à 15°C/min, 130°C-315°C à 3°C/min, palier de 15 min à 315°C, le débit d'hélium étant constant à 1.4 ml/min.

## 2.3.2. Pyrolyse flash-Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (PyGC-MS)

### 2.3.2.1. Principe et appareillage

Cette technique permet d'analyser des résidus organiques insolubles dans les solvants organiques qui ne peuvent pas être analysés directement en GC-M (kérogène ou eau lyophilisée). La pyrolyse est une méthode de craquage thermique en atmosphère inerte : l'échantillon est pyrolysé à 620°C pendant 15 secondes et les molécules générées sont, ensuite, analysées en GC-MS.

L'appareil utilisé correspond à un chromatographe Agilent 6890N équipé d'un injecteur split-splitless et couplé à un spectromètre de masse HP 5972. L'injecteur est relié à l'interface du pyrolyseur CDS Pyroprobe 2000. Le pyrolyseur est constitué d'une interface et d'une canne chauffante contenant un filament de tungstène. L'échantillon est placé dans un tube en quartz, ensuite, il est introduit dans le filament. L'intensité du courant qui traverse ce filament est contrôlée via un boîtier électronique et est calibrée par CDS analytical.

La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne capillaire en silice fondue DB-5 J&W Scientific (longueur : 60 m ; diamètre : 0,25 mm ; épaisseur de film : 0,1 µm) à phase non polaire (5% phénylméthylpolysiloxane).

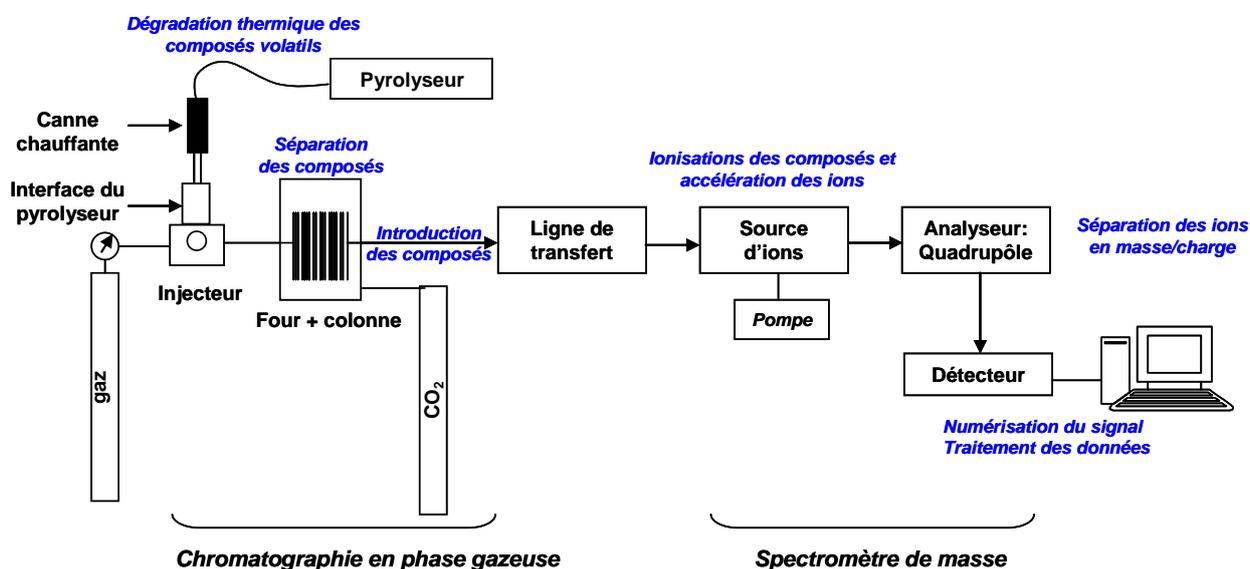


Figure 2-9 : Principe du couplage Pyrolyse flash-Chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse.

Le couplage GC-MS est le même que celui présenté précédemment (paragraphe 2.3.1) ; seule la méthode d'injection change. Le tube en quartz contenant l'échantillon est introduit au niveau du filament en tungstène de la canne chauffante ; puis, cette dernière est introduite dans l'interface du pyrolyseur (Figure 2-9). L'échantillon est, ensuite, chauffé et

les composés générés sont transférés, via l'injecteur, dans la colonne où sont séparés les divers composés.

### 2.3.2.2. Méthodes d'analyse

Deux méthodes peuvent être utilisées en PyGC-MS :

- **La pyrolyse directe** : les échantillons sont simplement placés sous forme de poudre dans un tube en quartz. Le tube est, ensuite, introduit au cœur du filament de la canne du pyrolyseur ;
- **La pyrolyse après méthylation in situ (THM-GC-MS)** : lors de la pyrolyse, de nombreuses molécules sont générées. Cependant, une partie de ces molécules ne sont pas assez volatiles ou trop polaires pour traverser la colonne chromatographique. Dans ce cas, seules les molécules de faible polarité sont détectées alors que celles plus polaires se condensent dans le four de pyrolyse ou restent bloquées en tête de colonne, ce qui biaise les résultats (Hatcher et Clifford, 1994). Cette erreur d'analyse est d'autant plus importante que l'échantillon est riche en composés polaires. Pour palier ce problème, une méthode de dérivation a été mise en œuvre en utilisant du tetra-méthyl-ammonium hydroxyde (TMAH) (Challinor, 1989; Hatcher et Clifford, 1994; Martin *et al.*, 1994). L'échantillon est mélangé avec du TMAH (échantillon :TMAH , 1:5) afin de protéger les fonctions carboxyles et hydroxyles à haute température. Cette méthylation crée des liaisons ester-méthyle et éther-méthyle (Figure 2-10), ce qui permet d'améliorer la résolution chromatographique de la colonne pour les composés polaires. Le mélange est, ensuite, introduit dans un tube en quartz, puis placé dans la canne chauffante.

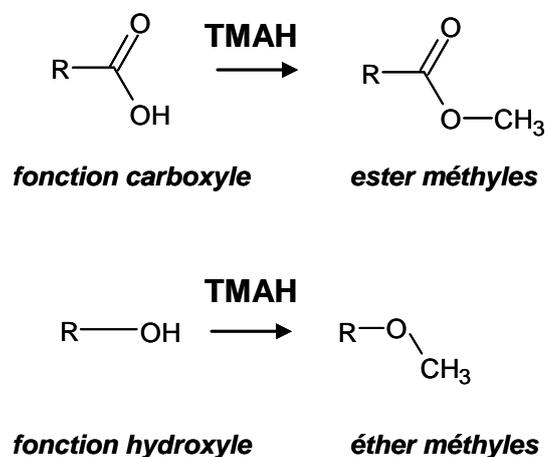


Figure 2-10 : Réaction de méthylation des fonctions carboxyle et hydroxyle en présence de TMAH.

## Chapitre 2. Méthodes analytiques.

Finalement, la canne est placée dans l'interface chauffée en continu à 200°C. Le programme de température est : 1 sec à 25°C puis montée en température de 25°C à 620 °C, à 200°C/ms, enfin un palier de 15 sec à 620°C. Les programmes de température du four sont les suivants :

- **La pyrolyse directe** : -30°C à 40°C à 10°C/min, 40°C à 300°C à 5°C/min, palier de 15 min à 300°C, le débit d'hélium étant constant à 1.4 ml/min ;
- **Pour la pyrolyse après méthylation *in situ*** : 0°C à 40°C à 40°C/min, palier de 10 min à 40°C, 40°C à 315°C à 5°C/min, palier de 15 min à 315°C, le débit d'hélium étant constant à 1.4 ml/min.

Les composés générés par la pyrolyse sont très divers et le temps de pyrolyse est relativement long (15 sec) ; c'est pourquoi, il est nécessaire de refroidir l'enceinte du chromatographe en utilisant du CO<sub>2</sub> avant de lancer la pyrolyse afin que tous les composés commencent leur transfert au même moment. Pour la pyrolyse directe, le chromatographe sera refroidi à -30°C alors que, pour la pyrolyse après méthylation, il sera refroidi à 0°C.

Les données de PyGC-MS et de GC-MS sont traitées à l'aide du logiciel MSD ChemStation (Agilent). Les pyrogrammes (PyGC-MS) et les chromatogrammes (GC-MS) représentent l'intensité, c'est-à-dire la quantité de fragments enregistrés, en fonction du temps de rétention de la colonne chromatographique. Des fragments de m/z d'intérêts peuvent être sélectionnés afin de ne visualiser que certains composés (par exemple m/z 57 correspond aux *n*-alcanes).

Les chromatogrammes et les pyrogrammes seront exploités de la manière suivantes : i) sélection de valeur m/z connue, ii) intégration des aires des familles de molécules d'intérêt, iii) sommation des aires des molécules d'une même famille et calcul de l'abondance relative (en %) de chaque composé. Les distributions des familles de molécules sont ainsi données en abondance relatives (en %).

### 2.3.3. Chromatographie en phase liquide haute pression (HPLC) - exclusion stérique

La chromatographie en phase liquide à haute pression - exclusion stérique (HPLC-SEC) est une technique qui permet d'étudier la distribution en masse d'échantillons solubilisés dans un solvant.

#### 2.3.3.1. Appareillage du montage HPLC-exclusion stérique

Le circuit de chromatographie en phase liquide-exclusion stérique a été utilisé pour l'étude des distributions des masses des extraits organiques et aqueux. Il est constitué d'une pompe binaire (HP 1100 series), d'une colonne et de deux détecteurs (Figure 2-11). Les colonnes utilisées sont une PLgel Mixed-E Agilent (300 x 7.5 mm id, taille des pores ; 3µm) pour l'étude des extraits organiques et une colonne PLaquagel-OH Agilent (300 x 7.5 mm id, taille des pores ; 8µm) pour l'étude des extraits aqueux. Les détecteurs utilisés sont un détecteur à barrette de diode (DAD- HP 1100 series) et un détecteur de fluorescence (FLD- HP series 1200).

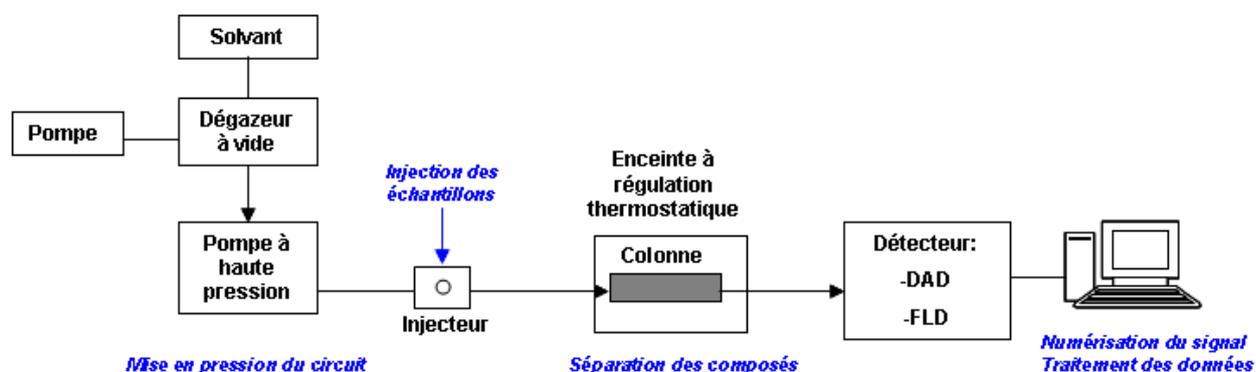


Figure 2-11 : Schéma de l'appareillage de l' HPLC-exclusion stérique.

#### 2.3.3.2. Principe

La chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange liquide. Il s'agit d'une méthode de séparation basée sur la taille des molécules en solution (plus précisément leur volume hydrodynamique).

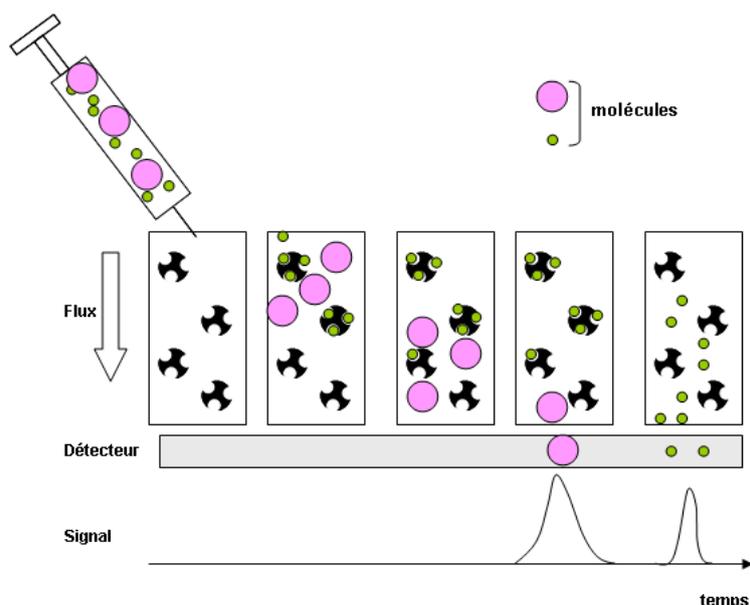


Figure 2-12 : Principe de la chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique.

Le solvant d'éluion est poussé à haute pression à l'aide d'une pompe afin d'assurer un débit constant et d'éviter toute perte de charge au cours de l'analyse (Figure 2-11). Les échantillons sont, ensuite, injectés dans le circuit à haute pression et introduit dans la colonne où va s'effectuer la séparation par chromatographie. La colonne se situe dans une enceinte thermostatée qui optimise la reproductivité des mesures. Le DAD permet de mesurer l'absorption des molécules pour des longueurs d'onde variant de 190 à 950 nm et le FLD mesure la fluorescence de l'échantillon pour des longueurs d'onde d'excitation et d'émission choisies.

Les molécules vont plus ou moins pénétrer dans les pores de la phase stationnaire (Figure 2-12) : les molécules les plus grosses seront éluées en premier tandis que les molécules les plus petites le seront en dernier. Les détecteurs placés après la colonne vont, ensuite, fournir des informations sur les molécules éluées.

### 2.3.3.3. Méthode d'analyse des extraits organiques

Les extraits organiques sont dilués à la concentration de 1mg/ml dans du Tetrahydrofuran (THF). Le solvant d'éluion (THF), dans le circuit HPLC, circule à 1ml/min soit une pression dans le système d'environ 65bars. 50µl d'échantillon sont injectés et la colonne est maintenue à une température constante de 25°C. La colonne est calibrée avec des solutions de polystyrène standard (Mp 162-40 000 Da) à partir de l'absorption 254 nm mesurée par le DAD.

#### 2.3.3.4. *Méthode d'analyse des extraits aqueux*

L'analyse de la MOD par HPLC-SEC est couramment utilisée et de nombreux travaux ont été réalisés sur cette technique de séparation. Swift *et al.* (1971) ont, notamment, étudié la distribution de substance humique en HPLC-SEC avec de l'eau distillée pour solvant d'élution. Ils ont montré qu'une augmentation de la concentration en substances humiques provoquait un décalage des pics vers les temps de rétention les plus élevés. Ce décalage a été attribué à des interactions hydrophobes entre la colonne et les substances humiques. Afin de supprimer ce phénomène, de nombreux auteurs recommandent l'utilisation d'un tampon ionique comme solvant d'élution (Swift et Posner, 1971; De Nobili *et al.*, 1989; Swift, 1989). C'est pourquoi, le solvant d'élution utilisé est une solution constituée d'un tampon phosphate et d'une solution de NaCl dans les proportions suivante : 0.01 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 0.1 M de NaCl. La force ionique de l'éluant est de 0.14 M et le pH est de 6.8.

Le solvant d'élution circule à 1 ml/min, sous une pression de 70bars. 50 $\mu\text{l}$  d'échantillon sont injectés pour chaque échantillon et la colonne est maintenue à une température constante de 25°C. Les longueurs d'onde d'absorption mesurée par le DAD sont : 195 nm, 230nm, 254nm, 280nm et 324nm. Selon les échantillons étudiés, le FLD fonctionne soit en multi-excitation soit en multi-émission :

- Pour les échantillons issus des expériences d'oxydation, le FLD fonctionne en multi-excitation (252 nm, 310nm, 324nm) à une longueur d'onde d'émission fixée à 424nm ;
- Pour les échantillons issus des expériences de biodégradation, le FLD fonctionne en multi-émission (305 nm, 350 nm, 400 nm, 450 nm) à une longueur d'onde d'excitation fixée à 270 nm.

Le choix des longueurs d'onde sera explicité lors de la présentation des résultats correspondants.

Il a été fait choix de ne pas réaliser de calibration de la colonne chromatographique pour l'étude des échantillons aqueux, car les standards disponibles sur le marché ne sont pas adaptés à la matière organique naturelle. Pour éviter d'éventuelles erreurs d'interprétation, l'étude des signaux obtenus s'est faite en distribution relative, en se basant sur les temps d'élution inversement proportionnels à la masse des molécules.

### 2.3.4. Spectromètre hybride quadripôle-temps de vol (Qtof)

La MOD a été caractérisée par un spectromètre de masse haute résolution (Qtof) pour compléter les analyses d'exclusion stériques et spectroscopiques. Cette technique permet d'obtenir la distribution de la masse réelle de la MOD, ionisable par la source, avec une résolution importante ; elle rend possible l'observation de son évolution au cours des expériences.

#### 2.3.4.1. Principe et appareillage

Trois sources peuvent, généralement, être utilisées lors d'analyses par QToF : une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), une source d'ionisation par ElectroSpray (ESI) ou une source de photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI).

Dans les études de MOD en spectrométrie de masse haute résolution, la source utilisée de manière la plus courante est l'ESI. Elle ionise uniquement les molécules polaires (Figure 2-13), mais elle est sensible à la présence d'ions en solution et peut produire des adduits, notamment avec les ions potassium et sodium (Cech et Enke, 2000; D'Andrilli *et al.*, 2010). Depuis quelques années, une autre source est utilisée pour étudier la MOD, l'APPI. Cette source est capable d'ioniser des molécules polaires ; elle peut aussi ioniser des molécules moins polaires présentes dans la MOD grâce à l'ajout d'un dopant (Mopper *et al.*, 2007; Purcell *et al.*, 2007). De plus, cette ionisation n'a pas d'influence sur les ions présents en solution (Hanold, 2004). Dans le cas des eaux de la formation de Boom, les eaux de lixiviat et de piézomètre contiennent une concentration élevée d'ion et, en particulier, en sodium (De Craen *et al.*, 2004b) ; c'est pourquoi, la source APPI a été choisie pour cette étude.

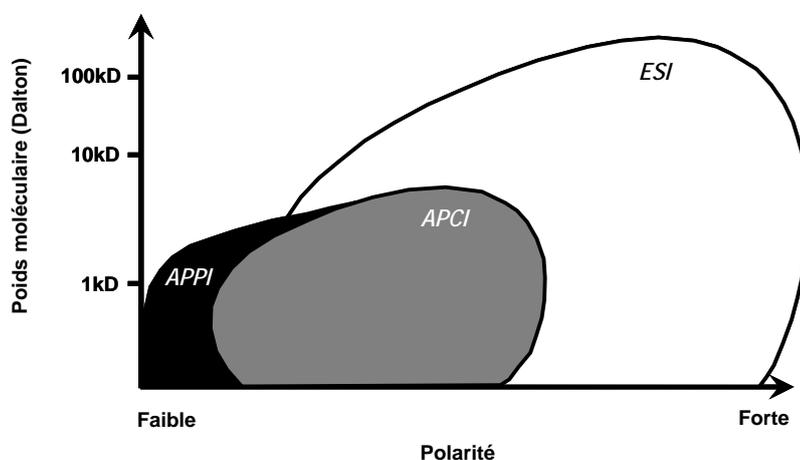


Figure 2-13 : Champ d'utilisation des sources APPI, APCI et ESI.

Les échantillons d'eau ont, ainsi, été analysés sur un spectromètre de masse hybride quadripôle-temps de vol couplé (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne), équipé d'une source de photo-ionisation à pression atmosphérique Syangen (APPI, Syagen Technology Inc., Tustin, CA).

La source APPI contient une lampe à Krypton produisant un faisceau de photon à 10eV. L'échantillon est introduit dans le nébuliseur qui va permettre son évaporation (Figure 2-14).

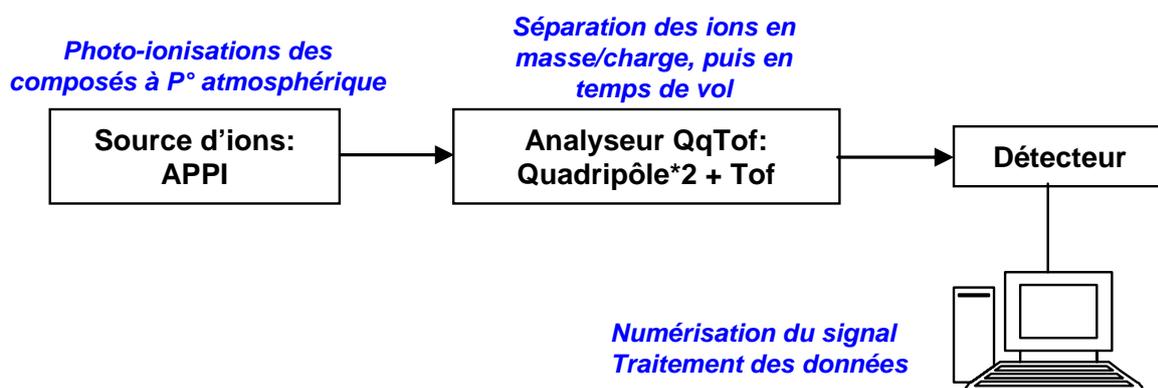


Figure 2-14 : Schéma de principe d'un spectromètre hybride quadripôle-temps de vol (QqTof) équipé d'une source à photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI).

Les gouttelettes d'échantillon vont être ionisées à l'aide de photons UV (photo-ionisation) et les ions, ainsi, formés, sont, ensuite, sélectionnés en fonction de leur ratio masse sur charge ( $m/z$ ) et de leur temps de vol. Les ions avec le ratio  $m/z$  le plus petit parviendront au détecteur en premier.

Durant le processus de photo-ionisation, différents cas peuvent se présenter (Figure 2-15) :

- **Photo-ionisation directe** : les molécules ayant une énergie inférieure à celle des photons vont être ionisées directement ;
- **Photo-ionisation à l'aide d'un dopant** : dans la majorité des cas, les échantillons doivent être mélangés avec un dopant afin de faciliter l'ionisation des composés d'intérêt. Les molécules de dopant vont être ionisées en premier, puis, par transfert de charge ou transfert de protons, les molécules d'intérêts vont être, à leur tour, ionisées.

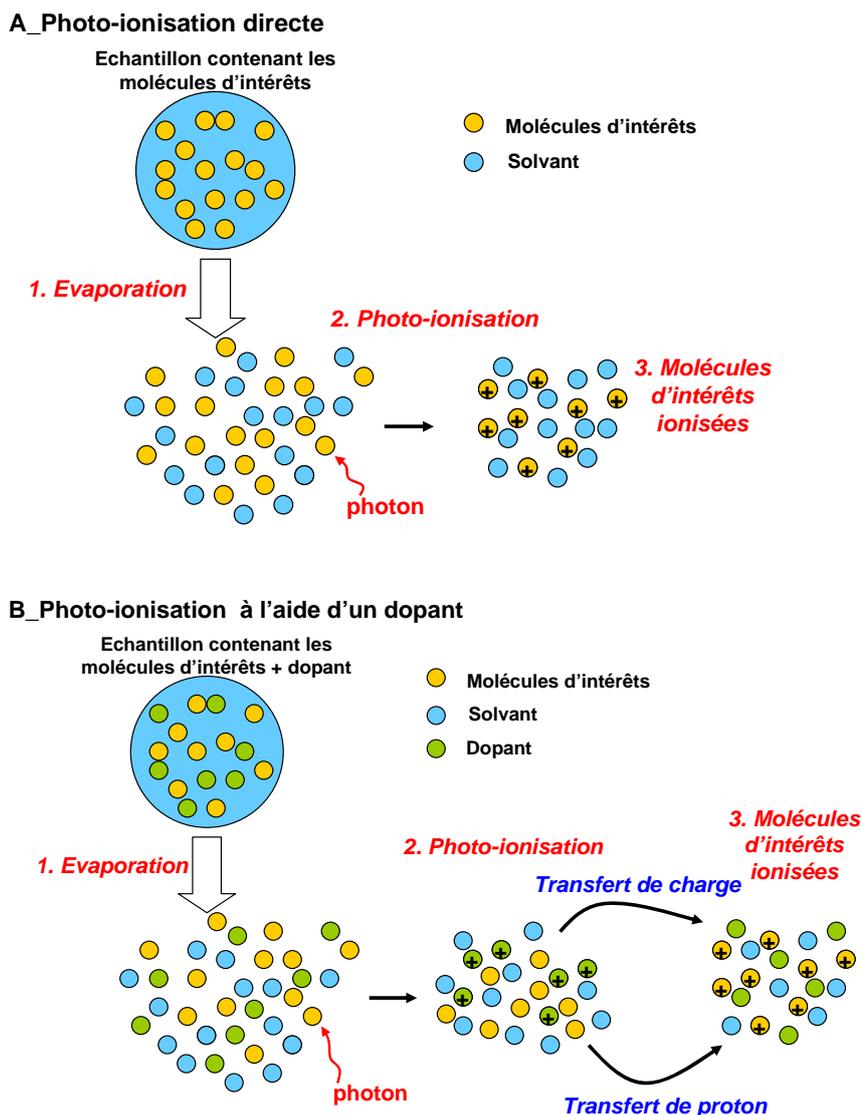


Figure 2-15 : Principe de la photo-ionisation à l'aide d'une source APPI. A- Cas d'une photo-ionisation directe, B- Cas d'une photo-ionisation à l'aide d'un dopant.

### 2.3.4.2. Méthode d'analyse

Les échantillons d'eaux, préalablement filtrés à 0.45  $\mu\text{m}$ , ont été mélangés avec un dopant, le benzène (échantillon : benzène, 90 : 10, v : v), avant l'injection en QToF. Le benzène permet de faciliter l'ionisation des molécules (Ghislain, 2011).

Les paramètres de la source sont :

- Mode positif ;
- Tension sur le capillaire -1000V, différence de tension sur le bouclier -500V ;
- La pression de l'azote est maintenue à 3 bars pour la nébulisation ; le débit est constant à 7 L/min et 250°C pour la désolvatation et la température de vaporisation est de 450°C.

L'acquisition des données est effectuée, pendant 1min, à 1 spectre/sec après la stabilisation du courant ionique total (TIC).

## 2.4. Techniques spectroscopiques

### 2.4.1. Généralité sur les méthodes spectroscopiques

Les analyses spectroscopiques utilisent les radiations électromagnétiques pour étudier les molécules organiques et, en particulier, la fonctionnalisation de ces molécules. En effet, une molécule possède différents niveaux énergétiques : un état électronique stable (de plus basse énergie)  $S_0$  et des états électroniques excités  $S_i$  (de plus haute énergie que  $S_0$ ) (Figure 2-17).

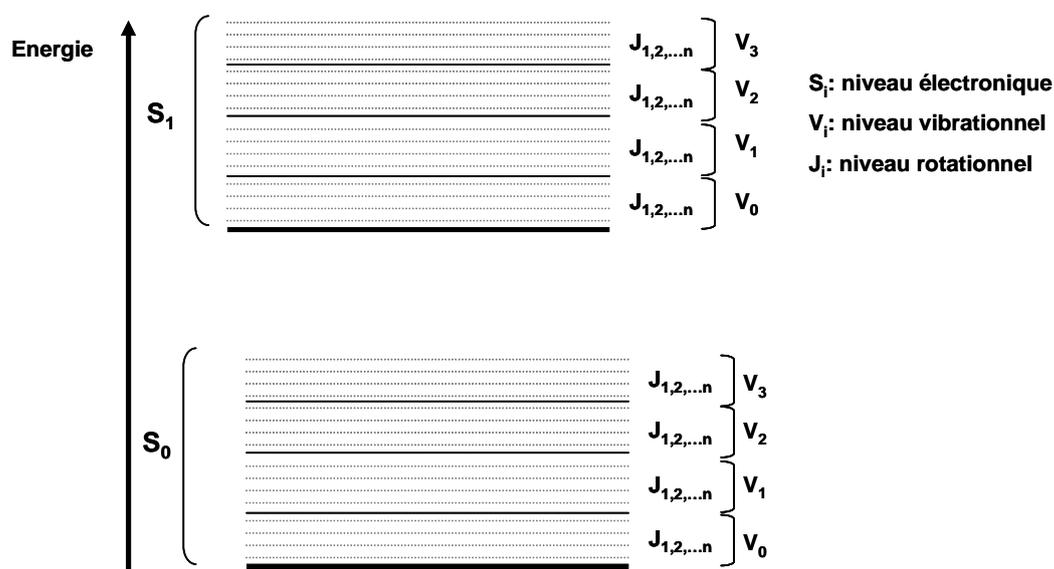


Figure 2-16 : Diagramme énergétique d'une molécule avec les trois niveaux énergétiques ;  $S_i$  niveau électronique,  $V_i$  niveau vibrationnel et  $J_i$  niveau rotationnel.

Chaque niveau électronique est divisé en sous-niveaux vibrationnels, eux-mêmes subdivisés en sous-niveaux rotationnels (Figure 2-16). L'absorption de certaines radiations du spectre électromagnétique, notamment les radiations UV-visible, infrarouge ou microonde (Figure 2-17), va entraîner des modifications de son énergie interne. L'énergie interne d'une molécule est la somme des quatre termes suivants :

- $E_e$  : l'énergie électronique ;
- $E_t$  : l'énergie de translation de la molécule ;
- $E_v$  : l'énergie de vibration de la molécule ;
- $E_r$  : l'énergie de rotation de la molécule autour de son centre de masse.

## Chapitre 2. Méthodes analytiques.

Le champ électromagnétique ne provoque pas de variation notable de l'énergie de translation qui est régie par la température. C'est pourquoi, la variation d'énergie moléculaire  $\Delta E$ , suite à l'absorption d'une radiation de fréquence  $\nu$ , s'exprime selon la formule suivante (Équation 2-1):

$$\Delta E = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$$

$$\text{Avec } \Delta E_e \gg \Delta E_v \gg \Delta E_r$$

Équation 2-1 : Equation de variation d'énergie moléculaire.

Selon l'énergie apportée par la radiation, divers types de transitions et de spectres sont observés :

- Les spectres UV-visible correspondent aux transitions entre deux niveaux électroniques avec des modifications des sous-niveaux vibrationnels ;
- Les spectres infrarouges correspondent aux transitions entre deux sous-niveaux vibrationnels avec des modifications des sous-niveaux rotationnels ;
- La spectrométrie micro-onde correspond aux transitions entre deux sous-niveaux rotationnels.

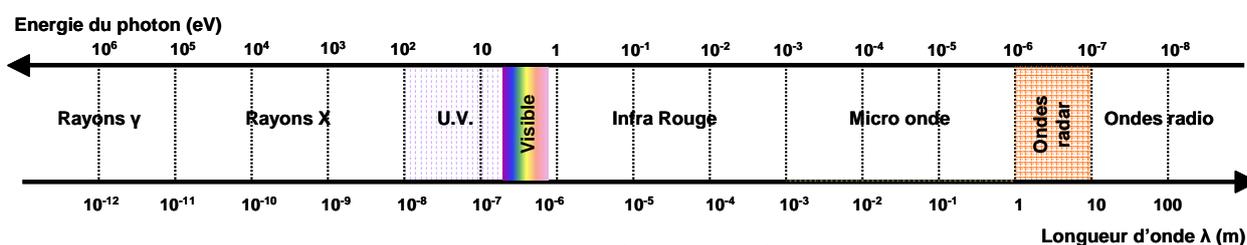


Figure 2-17 : Spectre électromagnétique.

Pour ce travail, les techniques spectroscopiques utiliseront la spectroscopie moyen - infrarouge ainsi qu'à la spectroscopie de fluorescence dans le domaine 250-600 nm.

### 2.4.2. Spectroscopie IRTF en mode transmission

#### 2.4.2.1. Principe

Les atomes, situés aux extrémités d'une liaison chimique, sont animés d'un mouvement de vibration, l'un par rapport à l'autre, à une fréquence qui dépend de la nature des atomes et, donc, de la liaison chimique.

Les radiations infrarouges intéressantes pour l'étude de composés organiques se situent dans le moyen infra rouge, c'est-à-dire à des longueurs d'ondes comprises entre 2.5 et 25  $\mu\text{m}$  ou un nombre d'onde  $\sigma$  compris entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  (avec  $\sigma=1/\lambda$ ) (Figure 2-17).

Il existe deux types de vibrations moléculaires : les élongations et les déformations angulaires. Ces vibrations sont présentées ci dessous en prenant l'exemple de la liaison  $\text{CH}_2$  (Figure 2-18, Figure 2-19, Figure 2-20).

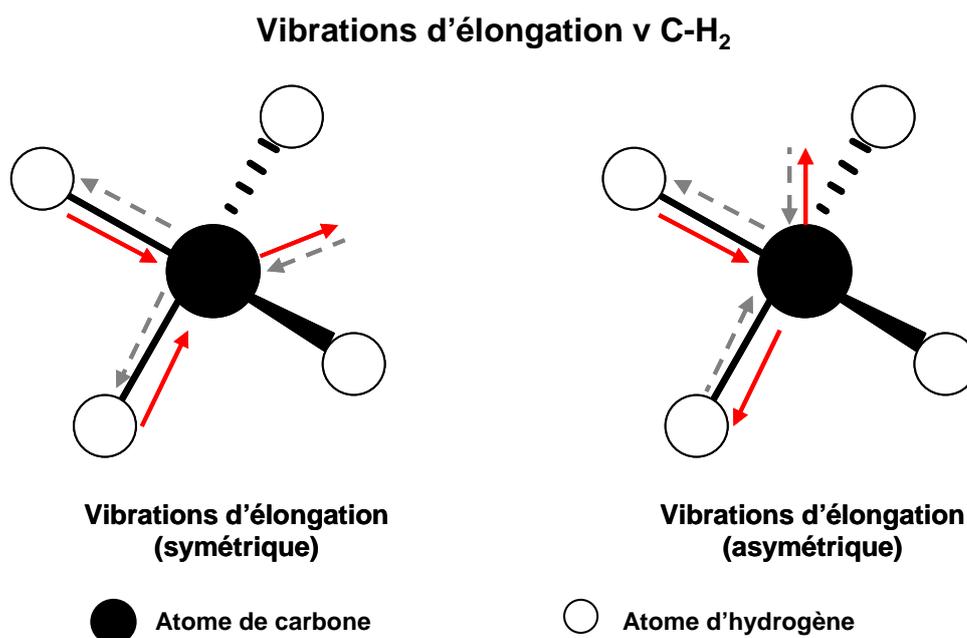


Figure 2-18 : Vibrations d'élongation symétriques et asymétriques : exemple de la liaison  $\text{CH}_2$ .

Une élongation est un mouvement rythmique le long de l'axe de la liaison de sorte que la distance interatomique croisse et décroisse. Les vibrations d'élongation (stretching), notées avec la lettre  $\nu$ , peuvent être symétriques ou asymétriques (Figure 2-18).

Une déformation angulaire consiste en une variation de l'angle formé entre deux liaisons successives. Les vibrations de déformation angulaire, dans le plan de la molécule, sont notées avec la lettre  $\delta$  (Figure 2-19) ; elles sont dites de cisaillement ou de rotation. Les vibrations de déformation angulaire hors du plan de la molécule sont notées avec la lettre  $\gamma$  (Figure 2-19) ; elles peuvent être de « balancement » ou de « torsion ».

### Vibrations de déformation angulaire dans le plan de la molécule $\delta$ C-H<sub>2</sub>

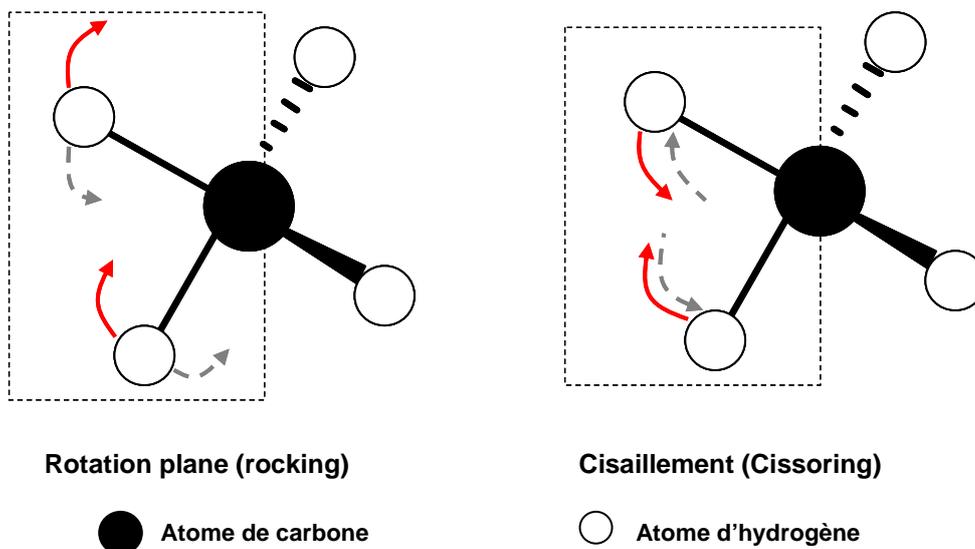


Figure 2-19 : Vibrations de déformation angulaire dans le plan de la molécule : exemple de la liaison CH<sub>2</sub>.

### Vibrations de déformation angulaire hors du plan de la molécule $\gamma$ C-H<sub>2</sub>

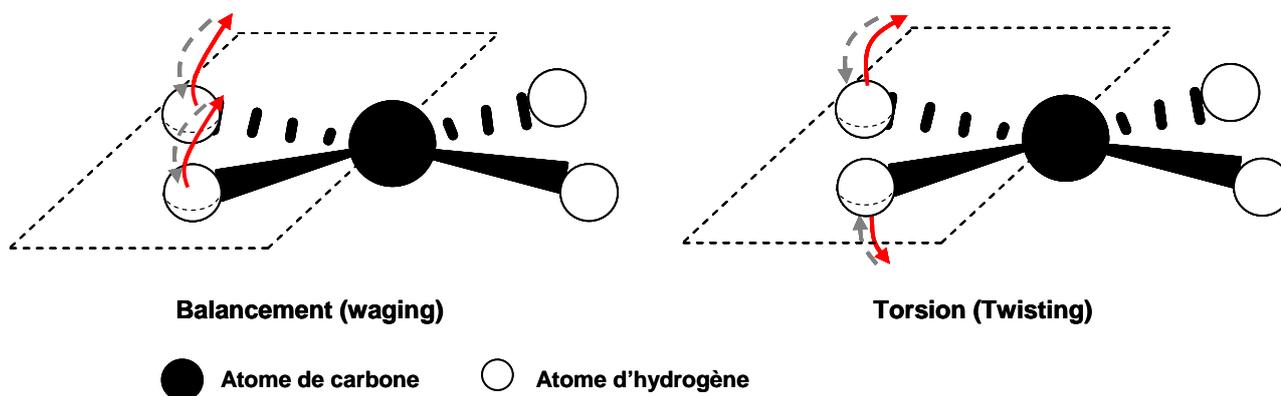


Figure 2-20 : Vibrations de déformation angulaire hors du plan de la molécule : exemple de la liaison CH<sub>2</sub>.

Un spectre infrarouge comprend différentes bandes d'absorption correspondant aux modes de vibration de la molécule.

#### 2.4.2.2. Appareillage, conditions opératoires et préparation des échantillons

L'appareillage est constitué par un spectromètre infrarouge *Brücker IFS 55* couplé à un microscope *Multipurpose Brücker IR microscope* doté d'un détecteur MCT (Mercure

Cadmium Tellure) refroidi à l'azote liquide. L'objectif utilisé pour les analyses est un objectif *Reflachromat* de grossissement x15. Les spectres sont enregistrés dans les conditions suivantes :

- Taille de la zone analysée : 60x60  $\mu\text{m}$  ;
- 64 accumulations (32sec) ;
- Résolution spectrales 4  $\text{cm}^{-1}$  ;
- Gain=4.

Une faible quantité d'échantillon est déposée et étalée à l'aide d'une spatule sur une fenêtre de diamant (*Spectra-Tch. Inc*). Le diamant est un minéral qui absorbe très peu dans le domaine de l'infrarouge. De plus, il ne réagit pas avec les solvants organiques et ne fixe pas la vapeur d'eau : c'est, donc, un matériau de choix pour servir de support lors d'analyses infrarouges. Les spectres obtenus sont corrigés par rapport à un spectre de référence enregistré dans les mêmes conditions analytiques sur une fenêtre de diamant propre.

### **2.4.2.3. Utilisation des données de microspectroscopie IRTF**

Les surfaces des bandes infrarouges d'intérêts (Tableau 2-2) sont mesurées à l'aide du logiciel OMNIC (logiciel Nicolet). Pour un même échantillon, plusieurs spectres sont enregistrés, puis intégrés et les résultats obtenus sont moyennés. Le calcul des aires des bandes infrarouge permet de déterminer des rapports d'abondance relative, utilisés afin de caractériser la fonctionnalisation des échantillons étudiés. L'abondance relative de chacune des bandes est calculée par rapport à la somme des bandes organiques intégrées.

Position (cm <sup>-1</sup> )	Groupe	Type de vibration	Symbole
3700-3100	O-H	Elongation	v O-H
3100-3000	C-H aromatiques	Elongation	v C-H aro
3000-2800	C-H aliphatiques	Elongation	v C-H ali
~2960	CH <sub>3</sub>	Elongation asymétrique	v as CH <sub>3</sub>
~2920	CH <sub>2</sub>	Elongation asymétrique	v as CH <sub>2</sub>
~2890	CH	Elongation	v C-H
~2870	CH <sub>3</sub>	Elongation symétrique	v s CH <sub>3</sub>
~2850	CH <sub>2</sub>	Elongation symétrique	v s CH <sub>2</sub>
1790-1760	C=O (anhydrides et phényles esters)	Elongation	v C=O
1745-1730	C=O (aldéhydes et alkyls esters)	Elongation	v C=O
1710-1705	C=O (cétones et acides carboxyliques)	Elongation	v C=O
~1670	C=O (quinones)	Elongation	v C=O
1650-1590	C=C	Elongation	v C=C
1470-1440	CH <sub>3</sub> +CH <sub>2</sub>	Déformation dans le plan	δ CH <sub>3</sub> +CH <sub>2</sub>
1390-1360	CH <sub>3</sub>	Déformation dans le plan	δ CH <sub>3</sub> +CH <sub>2</sub>
1290-1000	C-O (ether, esters, alcanols)	Elongation	v C-O
	O-H	Déformation dans le plan	δ O-H
900-700	C-H aromatiques	Déformation hors du plan	γ C-H aro
~875	1H	Déformation hors du plan	γ 1H
~830	2H adjacents	Déformation hors du plan	γ 2H
~750	4H adjacents	Déformation hors du plan	γ 4H
~720	(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> n>4	Rotation	τ CH <sub>2</sub>

Tableau 2-2 : Attribution des principales bandes infrarouges observées dans le cadre de l'étude de la matière organique.

### 2.4.3. La spectroscopie de fluorescence

#### 2.4.3.1. Définitions et principe

La **fluorescence** est la capacité pour une molécule, d'un atome ou d'un ensemble d'atome à émettre un photon, suite à l'excitation par un autre photon. Une molécule, un atome ou un ensemble d'atomes fluorescents est appelé **fluorophore**.

Le phénomène de fluorescence peut se décrire en deux étapes : 1) l'absorption d'un photon et 2) l'émission d'un photon de fluorescence (Figure 2-21).

- **Etape 1 :** l'absorption d'un photon par une molécule entraîne une augmentation de l'énergie de la molécule, ce qui est susceptible de faire passer un de ses électrons de son niveau d'énergie fondamentale (état stable singulet, S<sub>0</sub>) à un état dit excité (S<sub>1</sub>) de plus haute énergie. Chaque état énergétique (S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> ...) est subdivisé en niveaux vibrationnels (V<sub>i</sub>). Le passage d'un niveau vibrationnel à un

autre niveau vibrationnel de plus basse énergie (ex :  $S_1, V_2$  à  $S_1, V_1$ ) se fait par dissipation d'énergie mécanique appelée relaxation vibrationnelle. Cette dernière est non radiative. Suite à l'excitation, l'électron va se placer dans un des niveaux vibrationnels de  $S_1$ ; puis, par relaxation vibrationnelle, il va se retrouver dans le niveau  $V_0$  de  $S_1$ .

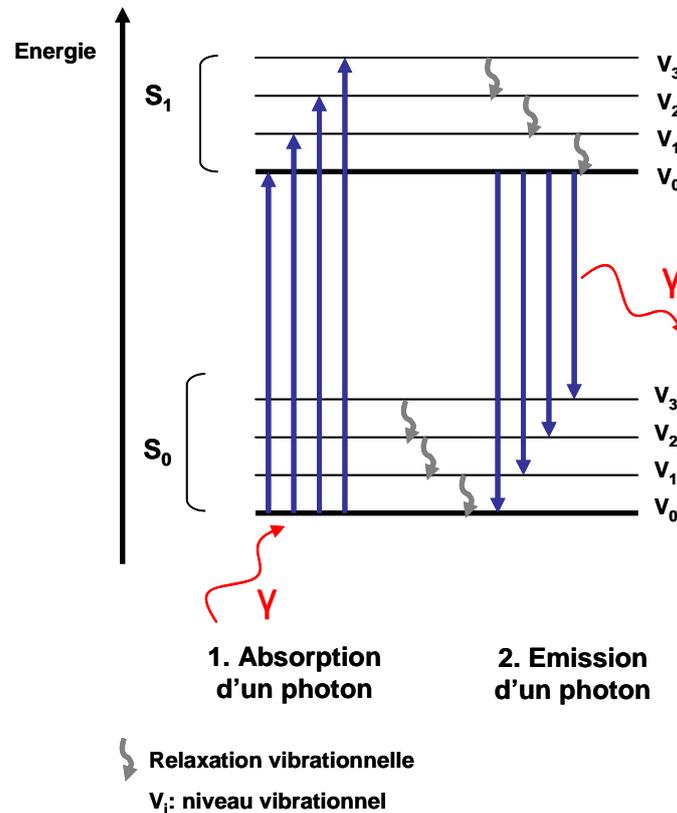


Figure 2-21 : Diagramme énergétique simplifié de Jablonski.

- **Etape 2, le retour à l'état stable  $S_0$**  : l'électron se trouvant en  $S_1, V_0$  repasse à l'état  $S_0, V_i$  et perd son excédant d'énergie par émission d'un photon (processus dit radiatif). Il peut, ensuite, retourner à un niveau vibrationnel inférieur par relaxation vibrationnelle.

### 2.4.3.2. Facteurs influençant la fluorescence

De nombreux facteurs influencent l'intensité de fluorescence ; parmi eux, la concentration, les phénomènes de *quenching* et les diffusions de Rayleigh, Tyndall et Raman.

### 2.4.3.2.1. Influence de la concentration-Relations fondamentales

La mesure de la fluorescence est soumise à deux relations fondamentales :

- **La loi de Beer-Lambert :**

$$Abs = \log(I_0 / I) = \varepsilon.C.L$$

Avec : Abs = L'absorbance,  $I_0$  = Intensité incidente, I = Intensité transmise,  $\varepsilon$  = Le coefficient d'absorption molaire ( $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ), C = La concentration du soluté ( $mol.L^{-1}$ ), L = Le chemin optique (cm).

- **Relation intensité de fluorescence et concentration :**

$$I_f = K.I_a.\phi_F$$

Avec :  $I_f$  = L'intensité de fluorescence, K = Le facteur d'appareillage,  $\Phi_F$  = Le rendement quantique de la fluorescence,  $\Phi_F$  = nombre de photons émis par sec/nombre de photons absorbés par sec,  $I_a = I_0.2,3$ .  $\varepsilon.C.L$  relation valable quand Abs < 0.

La relation entre  $I_f$  et C n'est linéaire que pour les absorbances inférieures à 0,1 ; il est, donc, nécessaire de diluer les solutions étudiées.

### 2.4.3.2.2. Les phénomènes de quenching

Le *quenching* est un phénomène d'extinction de la fluorescence par l'interaction avec un autre composé (le quencher). Il existe trois types d'extinction de la fluorescence :

- **Le quenching statique** résulte de la formation d'un complexe non fluorescent entre la molécule fluorescente et le quencher ;
- **Le quenching dynamique** découle d'une collision entre la molécule fluorescente et le quencher. Si cette collision a lieu pendant l'état excité du fluorophore, ce dernier se désexcite sans émission d'un photon ;
- **Le quenching apparent** est un effet de filtre interne à la solution. Elle correspond à une atténuation du signal due à l'augmentation, en concentration, d'une molécule qui absorbe fortement le rayonnement.

### 2.4.3.2.3. Les diffusions de Rayleigh, Tyndall et Raman

Les diffusions de Rayleigh, Tyndall et Raman sont des phénomènes de diffusion de la lumière. Les diffusions de Rayleigh et Tyndall sont des diffusions de la lumière dite élastique, c'est-à-dire sans changement de l'énergie des photons : la longueur d'onde incidente est égale à la longueur d'onde d'émission. La diffusion de Rayleigh est essentiellement due à la

matrice ou le solvant dans lequel se trouve l'échantillon. La diffusion de Tyndall, quant à elle, est due à la réflexion de la lumière sur des molécules de tailles colloïdales (0.05 à 0.2  $\mu\text{m}$ ). La diffusion de Raman est dite inélastique ; il s'agit de la diffusion de la lumière incidente par les molécules de solvant. La position des longueurs d'onde d'émission dépend de la nature du solvant utilisé.

#### 2.4.3.2.4. Autres facteurs

**Influence du pH :** le pH va affecter les interactions solvant-solutés dans les solutions contenant des molécules avec des groupements acides ou basiques, ce qui va influencer le signal de fluorescence.

**Influence de la température :** l'augmentation de la température va augmenter la probabilité de collision entre les molécules à l'état excité, ce qui diminue l'intensité de fluorescence.

#### 2.4.3.3. *Appareillage*

Les données de fluorescence sont obtenues à partir d'un spectrofluorimètre Jobin Yvon Fluorolog Spex 3 (groupe Horiba) équipé d'une lampe à xénon 450W émettant un rayonnement polychromatique entre 250 et 800nm (Figure 2-22). Il est équipé de deux monochromateurs (excitation et émission) comportant chacun un réseau. Le détecteur est un photomultiplicateur. Les échantillons sont placés dans une cuve en quartz de 1cm de chemin optique.

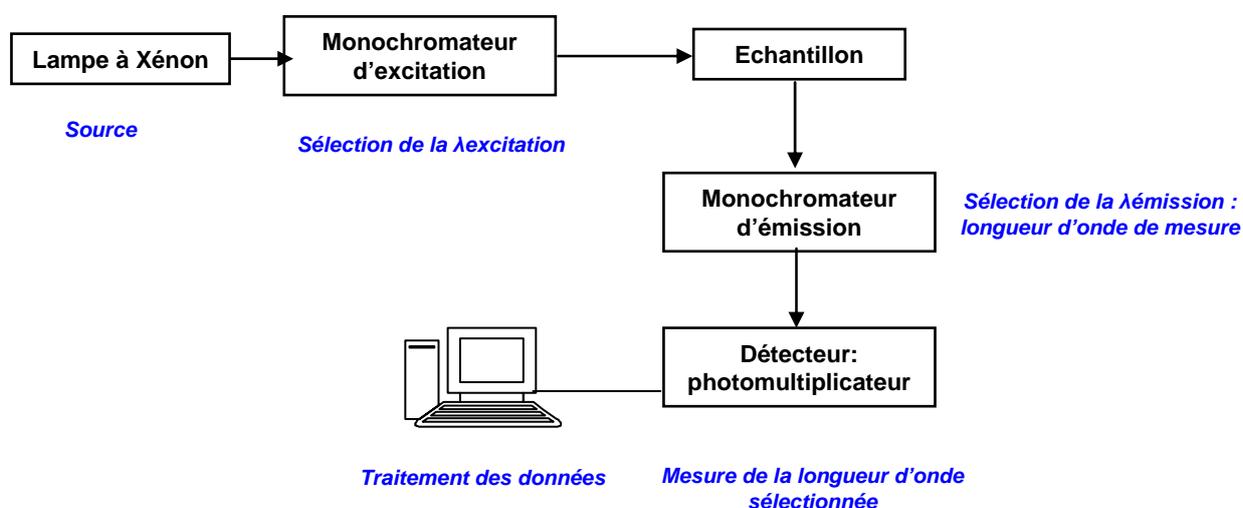


Figure 2-22 : Schéma de principe d'un spectrofluorimètre.

La source de lumière polychromatique est la lampe à xénon ; le faisceau lumineux traverse le monochromateur d'excitation où la longueur d'onde d'excitation va être sélectionnée. La longueur d'onde excitatrice est, alors, dirigée vers la cuve à échantillon et l'émission de fluorescence est observée à 90°C par rapport à la lumière incidente. Cela permet d'éliminer les interférences entre la lumière émise par l'échantillon et la lumière excitatrice. L'intensité lumineuse, pour chaque longueur d'onde d'émission, est mesurée par un photomultiplicateur et les données sont enregistrées et traitées grâce au logiciel FluorEssence.

### 2.4.3.4. Spectres de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence permet d'obtenir différents types de spectres :

- **Les spectres d'émission** : il s'agit de l'étude de l'intensité de fluorescence pour chaque longueur d'onde d'émission à une longueur d'onde d'excitation donnée ;
- **Les spectres d'excitation** : il s'agit de l'étude de l'intensité de fluorescence pour chaque longueur d'onde d'excitation à une longueur d'onde d'émission donnée ;
- **Les spectres de fluorescence synchrones** : ces spectres présentent un décalage de longueur d'onde constant entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ;
- **Les matrices d'excitation et d'émission (EEM)** : il s'agit d'un spectre en 3 dimensions qui relie d'une part les longueurs d'onde d'excitation et d'émission (x,y) et, d'autre part, l'intensité de fluorescence (z). Ces matrices contiennent, à la fois, les spectres d'excitation, d'émission et synchrones, ce qui permet d'obtenir une carte de l'ensemble des fluorophores d'une solution.

### 2.4.3.5. Méthode d'analyse

Les échantillons d'eaux sont, tout d'abord, filtrés à 0.45µm ; puis, le spectre de l'absorbance de chaque échantillon est mesuré à l'aide d'un spectromètre UV-Vis (Hélios, Thermoscientific). Si l'absorbance est supérieure à 0,1 (pour  $\lambda=250$  nm), l'échantillon est, alors, dilué avec de l'eau MilliQ. Ceci permet, à la fois, d'être dans le domaine de validité de la relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration et de s'affranchir des effets de filtre interne. Le pH des solutions analysées est neutre.

## Chapitre 2. Méthodes analytiques.

Les paramètres d'enregistrement des matrices EEM sont les suivants :

- La résolution en excitation et en émission est de 3 nm ;
- Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission vont, respectivement, de 231 à 501 nm (incrémentations de 3 nm) et de 250 à 600 nm (incrémentations de 2 nm) ;
- Le signal de fluorescence est corrigé afin de prendre en compte les usures des détecteurs et de la lampe d'une analyse à une autre ;
- Le temps d'intégration au niveau du détecteur est de 0.5 sec.

L'ensemble des matrices ont été traitées grâce au logiciel Origin (OriginLab®).

### 2.4.3.6. La fluorescence des eaux naturelles

#### 2.4.3.6.1. Bibliographie

La spectroscopie de fluorescence présente divers avantages : tout d'abord, cette technique ne dégrade pas l'échantillon ; elle permet, en outre, d'observer la fluorescence d'une grande partie du spectre visible sans prétraitement préalable. Les matrices d'excitation-émission présentent des pôles de coordonnées et d'intensités différentes, selon les échantillons et le type de fluorophore présents dans les eaux. Différents pôles de fluorescence ont été observés et sont cités dans la littérature (Tableau 2-3).

Pôle	Auteurs				Type de composés
	Coble (1996) $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Mounier <i>et al.</i> (1999) $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Birdwell et Engel (2010) $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	Parlanti <i>et al.</i> (2000) $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	
A $\alpha'$	260/380-460	240/445	240-260/400-460	250-260/380-480	Substances humiques
B $\gamma$	275/310		270-280/300-315	270-280/300-320	Type Tyrosine, protéine
C $\alpha$	350/420-480	320/445	320-360/420-460	330-350/420-480	Substances humiques
M $\beta$	312/380-420		290-310/370-410	310-320/380-420	Substances humiques marines
T $\delta$	275/340		270-280/345-360	270-280/320-350	Type Tryptophane, protéine

Tableau 2-3 : Principaux pôles de fluorescence observés dans la littérature.

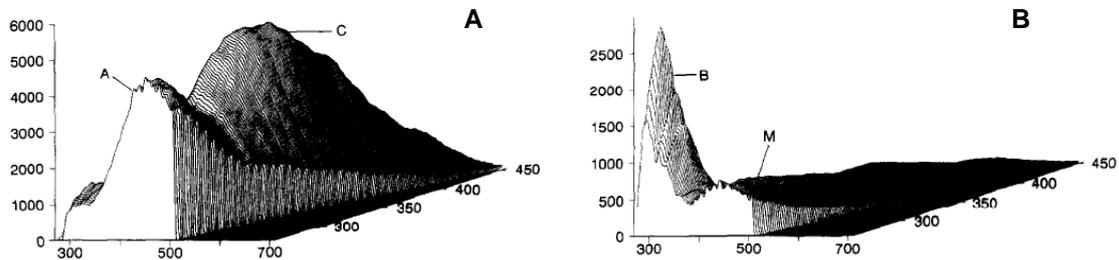


Figure 2-23 : EEM (A) d'un échantillon d'eau prélevé dans la rivière Duwamish à 4m de profondeur et (B) dans la baie de Dabob à 15m de profondeur (Coble, 1996).

Ces pôles ont été mis en place par Coble (1996) afin de départager la MOD selon les sources (terrestre, marin, biologique). Les fluorophores peuvent être divisés en deux catégories : ceux de types substances humiques (A, C, M) et ceux de type protéique (T et B). Les premiers émettent à hautes longueurs d'onde (400-500nm), ce qui traduit la présence de structure de type quinone dérivant de la dégradation de matériel terrestre tel que la lignine (Cory et McKnight, 2005). Les seconds émettent à plus courtes longueurs d'onde et sont attribués à des structures proches du tryptophane et de la tyrosine (Yamashita et Tanoue, 2003). Cependant, il est difficile d'identifier, de manière précise, les composés présents dans les eaux naturelles. Des études, toutefois, ont montré des différences notables en fonction de la nature des eaux (Figure 2-23), de leur origine géographique (lacs, mers, estuaires, rivières) (Coble, 1996, Mopper et Schultz, 1993) ainsi que des évolutions des maxima (intensité/position) lors des processus de transformation ou de mélange de masse d'eau (de Souza Sierra *et al.*, 1997). Ainsi, le pôle M est principalement observé dans les eaux de mer ou d'estuaire et il est, généralement, associé avec le chromophore de type T (Parlanti *et al.*, 2000). Les pôles T et B résulteraient de l'activité biologique (Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000; Cammack *et al.*, 2004).

#### 2.4.3.6.2. Indices de fluorescence

Suite à l'observation de ces phénomènes, différents indices ont été mis au point afin de décrire la matière organique soluble et son évolution. Il existe trois indices communément utilisés dans la littérature (Figure 2-24) :

- L'intensité de fluorescence (FI) ;
- L'indice biologique (BIX) ;
- L'indice d'humification (HIX).

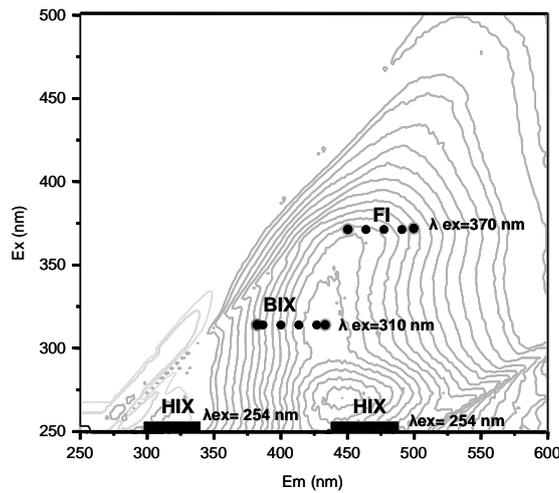


Figure 2-24 : Localisation des indices de fluorescence.

#### 2.4.3.6.2.1. L'intensité de fluorescence (FI)

Il a été défini par McKnight *et al.* (2001) il est calculé à l'aide de la formule suivante (Équation 2-2):

$$FI = \frac{I_{\lambda_{em} 450}}{I_{\lambda_{em} 500}} \quad \text{pour } \lambda_{ex} = 370 \text{ nm}$$

avec I = intensité de fluorescence

Équation 2-2: Formule de l'intensité de fluorescence.

Il s'agit d'un indicateur d'une origine, terrestre ou biologique, de la matière organique dissoute. Il est inversement proportionnel à l'aromaticité de la matière organique : si FI est inférieur à 1.4, la matière organique est d'origine terrestre et est très aromatique ; si FI est supérieur à 1.9, la matière organique est d'origine bactérienne et peu aromatique.

#### 2.4.3.6.2.2. L'indice Biologique (BIX)

Il a été établi par Huguet *et al.* (2009). Il permet de déterminer la présence du fluorophore M (ou  $\beta$ ) qui caractérise l'activité biologique autochtone. Il est calculé à partir de la formule suivante (Équation 2-3):

$$BIX = \frac{I_{\lambda_{em} 380}}{I_{\lambda_{em} 430}} \quad \text{pour } \lambda_{ex} = 310 \text{ nm}$$

avec I = intensité de fluorescence

Équation 2-3 : Formule de l'indice biologique

Une faible valeur de l'indice BIX (<0.6-0.7) révèle une faible proportion de matière organique d'origine biologique ; à l'opposé un BIX élevé (>1) caractérise les DOM d'origine bactérienne ou biologique.

#### 2.4.3.6.2.3. L'indice d'humification (HIX)

Il a été déterminé par Zsolnay *et al.* (1999). Il permet d'estimer le degré d'humification de la DOM et est défini de la manière suivante (Équation 2-4):

$$HIX = \frac{\int_{\lambda_{em480}}^{\lambda_{em435}} I}{\int_{\lambda_{em345}}^{\lambda_{em300}} I} \quad \text{pour } \lambda_{ex} = 254 \text{ nm}$$

avec I = intensité de fluorescence

Équation 2-4 : Formule de l'indice d'humification.

L'HIX est proportionnel à l'aromaticité de la DOM et augmente avec le degré de décomposition de la matière organique: en effet, quand la biomasse se décompose cette dernière a tendance à s'aromatiser (Hunt et Ohno, 2007).

## 2.5. Analyse Rock Eval

### 2.5.1. Principe

Les analyses Rock-Eval ont été faites à partir d'un model RE6 pyrolyzer (Vinci Technologie). Cette technique permet d'évaluer le potentiel pétrolier et la maturité d'une roche mère (Espitalié *et al.*, 1985, Lafargue *et al.*, 1998; Behar *et al.*, 2001). L'analyse Rock-Eval est une technique de pyrolyse sous atmosphère inerte (Figure 2-25) suivie d'une oxydation. L'échantillon est tout d'abord chauffé à 300°C pendant 3 min ; puis, la température monte progressivement jusqu'à 650°C (30°C/min) ; enfin, le résidu est oxydé. Le Rock-Eval 6 est équipé de deux détecteurs : un détecteur à ionisation de flamme (FID) qui va permettre de mesurer la quantité de composés hydrocarbonés libérés pendant la pyrolyse et un détecteur infrarouge qui va mesurer, de manière continue, la quantité de CO<sub>2</sub> et de CO produite lors de la pyrolyse et de l'oxydation.

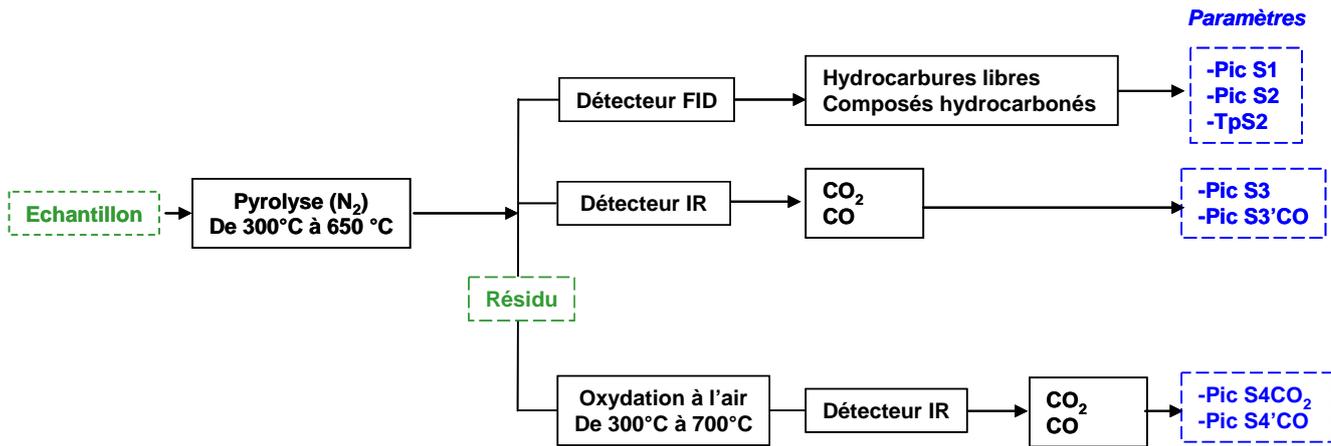


Figure 2-25 : Schéma de principe de l'analyse Rock-Eval 6.

Différents paramètres sont mesurés à partir des spectres obtenus :

- **Le pic S1** correspond aux hydrocarbures libres (gaz, huile) qui se sont volatilisés pendant le palier isotherme à 300°C ;
- **Le pic S2** correspond aux composés hydrocarbonés provenant du craquage du kérogène et des composés extractibles lourds entre 300°C et 650°C ; le paramètre TpS2 (température maximale au pic S2, en °C) est mesuré au sommet du pic S2 ;
- **Les pics S3 et S3'CO** représentent la quantité de CO<sub>2</sub> et de CO respectivement produite pendant la pyrolyse de 300°C à 400°C pour le CO<sub>2</sub> et 500°C pour le CO ;
- **Les pics S4CO<sub>2</sub> et S4'CO** représentent la quantité de CO<sub>2</sub> et de CO respectivement produite pendant l'oxydation.

### 2.5.2. Indices Rock Eval

Plusieurs indices sont calculés à partir de ces paramètres (Behar *et al.*, 2001):

- **La teneur en carbone organique total** (COT, en % massique) est la somme pondérée du carbone organique pyrolysé (S1, S2, S3 et S3'CO) et du carbone résiduel (S4CO<sub>2</sub> et S4'CO) ;
- **L'indice d'hydrogène** (IH, en mg d'hydrocarbure/g COT) représente le potentiel pétrolier résiduel d'une roche et il est calculé à partir du pic S2 ((S2\*100)/COT) ;
- **L'indice d'oxygène** (IO, mg de CO<sub>2</sub>/g COT) donne la richesse en oxygène de la roche et il est calculé à partir du pic S3 ((S3\*100)/COT) ;

- **Le Tmax** est un indicateur de la maturité de la roche analysée ; il est représentatif de la thermostabilité du kérogène résiduel. Il est calculé à partir du TpS2 corrigé par les données du standard.

## 2.6. Dosage du CO<sub>2</sub>

Le CO<sub>2</sub> généré dans le flacon témoin, durant les expériences d'oxydation, a été mesuré à l'aide d'un analyseur infrarouge BINOS 1004. Il permet de déterminer la concentration d'un gaz, dans un mélangeur gazeux, par mesure photométrique de l'absorption, par ce gaz, d'une radiation spécifique. Pour le CO<sub>2</sub>, elle est de 2325 cm<sup>-1</sup> dans l'infrarouge.

La valeur obtenue est en parties par millions en volume (ppmv) ; cette valeur a été convertie en masse de carbone (mg) de CO<sub>2</sub> par gramme du carbone organique (C<sub>CO<sub>2</sub></sub>, ‰) à partir de la formule suivante (Équation 2-5):

$$C_{CO_2} (\text{‰ de Corg}) = ((X * Mm * V / 22,4.103) / Corg) * F$$

Avec:

X: valeur lue en ppmv

Mm : masse molaire du carbone : 12g/mol

V : volume atmosphérique du flacon (ml) : ici 198 ml

Corg : masse de carbone organique de l'échantillon (avec COT en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  ou en  $\text{mg.kg}^{-1}$  de roche)

F : facteur de dilution : 42,86 (déduit du volume de la boucle d'injection)

**Équation 2-5: Calcul de la masse de carbone (mg) de CO<sub>2</sub> par gramme du carbone organique (C<sub>CO<sub>2</sub></sub>, ‰).**

## 2.7. Références

- Behar, F., V. Beaumont and H. L. De Penteadó (2001).** "Rock-Eval 6 Technology: Performances and developments." *Oil & Gas Science and Technology* 56: 111-134.
- Birdwell, J. E. and A. S. Engel (2010).** "Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy." *Organic Geochemistry* 41(3): 270-280.
- Brown, J. N. and B. M. Peake (2003).** "Determination of colloiddally-associated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fresh water using C18 solid phase extraction disks." *Analytica Chimica Acta* 486(2): 159-169.
- Cammack, W. K. L., J. Kalff, Y. T. Prairie and E. M. Smith (2004).** "Fluorescent dissolved organic matter in lakes: Relationships with heterotrophic metabolism." *Limnology and Oceanography* 49(6): 2034-2045.
- Cech, N. B. and C. G. Enke (2000).** "Relating Electrospray Ionization Response to Nonpolar Character of Small Peptides." *Analytical Chemistry* 72(13): 2717-2723.
- Challinor, J. M. (1989).** "A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 16(4): 323-333.
- Coble, P. G. (1996).** "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy." *Marine Chemistry* 51(4): 325-346.
- Cory, R. M. and D. M. McKnight (2005).** "Fluorescence Spectroscopy Reveals Ubiquitous Presence of Oxidized and Reduced Quinones in Dissolved Organic Matter." *Environmental Science & Technology* 39(21): 8142-8149.
- D'Andrilli, J., T. Dittmar, B. P. Koch, J. M. Purcell, A. G. Marshall and W. T. Cooper (2010).** "Comprehensive characterization of marine dissolved organic matter by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24(5): 643-650.
- De Craen, M., M. Van Geet, L. Wang and M. Put (2004a).** "High sulphate concentrations in squeezed Boom Clay pore water: evidence of oxidation of clay cores." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 29(1): 91-103.
- De Craen, M., L. Wang, M. Van Geet and H. Moors (2004b)** "The geochemistry of Boom Clay pore water at the Mol site", status 2004, SCK\*CEN Scientific Report-BLG 990, 180p.

- De Nobili, M., E. Gjessing and P. Sequi (1989).** "Sizes and shapes of humic substances by gel chromatography. Humic substances II. In search of structure.Series", M. H. Hayes, MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. New York, *John Wiley & Sons*: 562-587.
- de Souza Sierra, M. M., O. F. X. Donard and M. Lamotte (1997).** "Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes." *Marine Chemistry* 58(1-2): 51-58.
- Espitalié, J., G. Deroo and F. Marquis (1985).** "La pyrolyse Rock-Eval et ses applications." *Revue de l'institut français du pétrole* 40(5): 563-579.
- Fatoki, O. S. and A. Noma (2002).** "Solid Phase Extraction Method for Selective Determination of Phthalate Esters in the Aquatic Environment." *Water, Air, & Soil Pollution* 140(1): 85-98.
- Ferrer, I., D. Barcelo and E. M. Thurman (1999).** "Double-Disk Solid-Phase Extraction: Simultaneous Cleanup and Trace Enrichment of Herbicides and Metabolites from Environmental Samples." *Analytical Chemistry* 71(5): 1009-1015.
- Ghislain, T., (2011).** "Nature, origine et réactivité de la matière organique fossile dans les sols et les sédiments. Développements et applications de la photo-ionisation (APPI)-spectrométrie de masse (Q-Tof) et couplage avec la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)".PhD-dissertation, INPL, Nancy.
- Hanold, K. A. (2004).** "Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS." *Analytical Chemistry* 76(10): 2842-2851.
- Hatcher, P. G. and D. J. Clifford (1994).** "Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil." *Organic Geochemistry* 21(10-11): 1081-1092.
- Hunt, J. F. and T. Ohno (2007).** "Characterization of Fresh and Decomposed Dissolved Organic Matter Using Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy and Multiway Analysis." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(6): 2121-2128.
- Kim, S., A. J. Simpson, E. B. Kujawinski, M. A. Freitas and P. G. Hatcher (2003).** "High resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2D solution NMR for the analysis of DOM extracted by C18 solid phase disk." *Organic Geochemistry* 34(9): 1325-1335.
- Lafargue, E., F. Marquis and D. Pilot (1998).** "Rock-Eval 6 Applications in hydrocarbon exploration, production, and soil contamination studies." *Revue de l'institut français du pétrole* 53(4): 421-437.
- Martin, F., F. J. Gonzalez-Vila, J. C. del Rio and T. Verdejo (1994).** "Pyrolysis derivatization of humic substances 1. Pyrolysis of fulvic acids in the presence of

tetramethylammonium hydroxide." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 28(1): 71-80.

**McKnight, D. M., E. W. Boyer, P. K. Westerhoff, P. T. Doran, T. Kulbe and D. T. Andersen (2001).** "Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity." *Limnology and Oceanography* 46(1): 38-48.

**Mills, G. L., G. S. Douglas and J. G. Quinn (1989).** "Dissolved organic copper isolated by C18 reverse-phase extraction in an anoxic basin located in the Pettaquamscutt River Estuary." *Marine Chemistry* 26(3): 277-288.

**Mopper, K. and C. A. Schultz (1993).** "Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components." *Marine Chemistry* 41(1-3): 229-238.

**Mopper, K., A. Stubbins, J. D. Ritchie, H. M. Bialk and P. G. Hatcher (2007).** "Advanced instrumental approaches for characterization of marine dissolved organic matter: Extraction techniques, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Chemical Reviews* 107(2): 419-442.

**Mounier, S., R. Braucher and J. Y. Benamou (1999).** "Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro basin by crossflow ultra-filtration and UV-spectrofluorescence." *Water Research* 33(10): 2363-2373.

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

**Pastor, J. and A.-M. Pauli (1995).** "Dialyse." *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation* PE 1 525.

**Purcell, J. M., P. Juyal, D.-G. Kim, R. P. Rodgers, C. L. Hendrickson and A. G. Marshall (2007).** "Sulfur Speciation in Petroleum: Atmospheric Pressure Photoionization or Chemical Derivatization and Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry." *Energy & Fuels* 21(5): 2869-2874.

**Roubeuf, V., S. Mounier and J. Y. Benaim (2000).** "Solid phase extraction applied to natural waters: efficiency and selectivity." *Organic Geochemistry* 31(1): 127-131.

**Simjouw, J.-P., E. C. Minor and K. Mopper (2005).** "Isolation and characterization of estuarine dissolved organic matter: Comparison of ultrafiltration and C18 solid-phase extraction techniques." *Marine Chemistry* 96(3-4): 219-235.

## Chapitre 2. Méthodes analytiques.

**Swift, R. S. (1989).** "Molecular weight, shape, and size of humic substances by ultracentrifugation. Humic substances II. In search of structure. Series", M. H. Hayes, MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. New York, *John Wiley & Sons*: 449-466.

**Swift, R. S. and A. M. Posner (1971).** "Gel chromatography of humic acid." *Soil science* 22: 237-249.

**Yamashita, Y. and E. Tanoue (2003).** "Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids." *Marine Chemistry* 82(3-4): 255-271.

**Zsolnay, A., E. Baigar, M. Jimenez, B. Steinweg and F. Saccomandi (1999).** "Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying." *Chemosphere* 38(1): 45-50.



**Chapitre 3 :**

**Présentation du site de Mol et des  
échantillons solides de roches –  
Caractérisation des eaux de  
piézomètres.**



## **SOMMAIRE DU CHAPITRE 3 : PRESENTATION DU SITE DE MOL ET DES ECHANTILLONS SOLIDES DE ROCHES – CARACTERISATION DES EAUX DE PIEZOMETRES.**

<b>3.1. GEOLOGIE GENERALE .....</b>	<b>117</b>
<b>3.2. LE LABORATOIRE SOUTERRAIN HADES .....</b>	<b>122</b>
<b>3.3. LES ECHANTILLONS DE ROCHES.....</b>	<b>123</b>
3.3.1. <i>Description de l'échantillon de référence, P-T0.....</i>	<b>123</b>
3.3.1.1. Lieu d'échantillonnage .....	<b>123</b>
3.3.1.2. Caractéristiques minéralogiques de l'échantillon P-T0.....	<b>123</b>
3.3.2. <i>Description des échantillons naturels.....</i>	<b>125</b>
<b>3.4. DESCRIPTION DE LA MATIERE ORGANIQUE HYDROSOLUBLE DES EAUX DE PIEZOMETRES DU LABORATOIRE SOUTERRAIN HADES .....</b>	<b>126</b>
3.4.1. <i>Echantillons et protocole.....</i>	<b>126</b>
3.4.1.1. Le piézomètre vertical EGBS .....	<b>127</b>
3.4.1.2. Les piézomètres horizontaux Spring 116, N2TD et N2CG.....	<b>127</b>
3.4.1.3. Protocole d'étude.....	<b>128</b>
3.4.2. <i>Résultats.....</i>	<b>130</b>
3.4.2.1. Analyse quantitative et distribution des masses moléculaires.....	<b>130</b>
3.4.2.2. Analyses spectroscopiques .....	<b>133</b>
<b>3.4.2.2.1. Fluorescence 3D .....</b>	<b>133</b>
<b>3.4.2.2.2. IRTF .....</b>	<b>137</b>
3.4.2.3. Analyse moléculaire de l'eau EGBS .....	<b>138</b>
3.4.3. <i>Discussion .....</i>	<b>141</b>
3.4.3.1. Etude de la distribution des tailles moléculaires des eaux de piézomètre .....	<b>141</b>
3.4.3.2. Caractéristiques spectroscopiques et moléculaires des eaux des piézomètres de HADES.....	<b>142</b>
3.4.4. <i>Conclusion .....</i>	<b>144</b>
<b>3.5. REFERENCES .....</b>	<b>145</b>



### 3. Présentation du site de Mol et des échantillons solides de roches - Caractérisation des eaux de piézomètres

Cette partie présente le contexte géologique de la formation de Boom ainsi que les échantillons de roche et d’eaux de piézomètres étudiés durant cette étude. Les eaux des piézomètres du site de Mol seront caractérisées grâce à différentes techniques complémentaires usuellement utilisées lors d’analyses de matières organiques dissoutes (MOD) naturelles. Ces résultats permettront, d’une part, de déterminer l’empreinte moléculaire et spectroscopique de la MOD issue des piézomètres du laboratoire souterrain de Mol et, d’autre part, de comparer ces empreintes avec celles des eaux issues de lixiviats de roches oxydées étudiées dans le chapitre 4.

#### 3.1. Géologie générale

Le laboratoire HADES (High Activity Disposal Experimental Site) est situé à 225m BDT (depth Below Drilling Table) sous le site de Mol (Belgique) au sein de la formation de l’Argile de Boom (Figure 3-1, Figure 3-2). La formation des Argiles de Boom, d’âge Oligocène (Rupélien 32.5 Ma à 28.5Ma), possède un pendage de 1% vers l’Est et présente une épaisseur variant de 50 à 200m d’Ouest en Est. A Mol, son épaisseur est de 100m et elle se situe à 190 m de profondeur.

La formation des Argiles de Boom est constituée d’argiles plus ou moins silteuses contenant des niveaux à Septaria. La composition générale est présentée ci-dessous (Tableau 3-1):

Composition minéralogique moyenne (en wt. %)			
Quartz	21	<b>Minéraux argileux</b>	
K-feldspath	3.9	Kaolinite	8.3
Plagioclase	0.4	Illite/Smectite/Vermiculite	37.9
Calcite	4.2	Illite/Muscovite	7.2
Siderite	0.3	Smectite/Vermiculite	9.1
Pyrite	1.9	Vermiculite/Chlorite	3.9
Anatase	0.8		
Apatite	0.2		
Matière organique	0.8		

Tableau 3-1: Composition minéralogique moyenne de l’Argile de Boom (wt. %) (d’après Zeelmaekers *et al.*, 2010).

La formation de Boom est divisée en quatre membres: le « *Boeretang member* », le « *Putte member* », le « *Terhagen member* » et le « *Belsele-Wass member* » (Figure 3-1, Figure 3-2). Elle est encadrée par deux formations sableuses : les sables de Voort/Eigenbilzen (toit) et les sables de Ruisbroek (base).

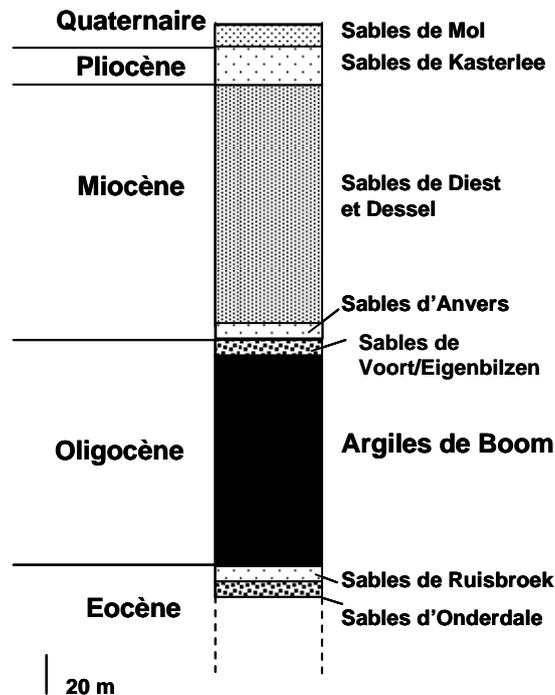


Figure 3-1 : Log stratigraphique des formations Eocène, Oligocène, Miocène, Pliocène et Quaternaire dans la région de Mol (d'après Vandenberghe, 1978)

### Environnement de dépôt

La formation des Argiles de Boom s'est déposée dans un environnement de type mer ouverte à la bordure sud du bassin épicontinental de la Mer du Nord (Vandenberghe, 1978; Vandenberghe et Van Echelpoel, 1987). Des observations de la microfaune, notamment des foraminifères (Laenen, 1997), ainsi que divers débris - vertébrés terrestres, fragments de bois, insectes- (Vandenberghe, 1976; Hovestadt et Hovestadt-Euler, 1995) ont permis de compléter les observations sédimentologiques et de proposer une succession d'environnement de dépôt. A 32.7 Ma, une transgression marine a permis le dépôt de la formation de Boom (Berggren et al., 1995). L'augmentation progressive du niveau marin se traduit par une proportion de silts de plus en plus fins du *Belsele-Waas member* vers le *Putte member* (Figure 3-2). Deux niveaux remarquables appelés « le double banc » résultent d'une petite régression, suivie d'une nouvelle transgression (Figure 3-2).

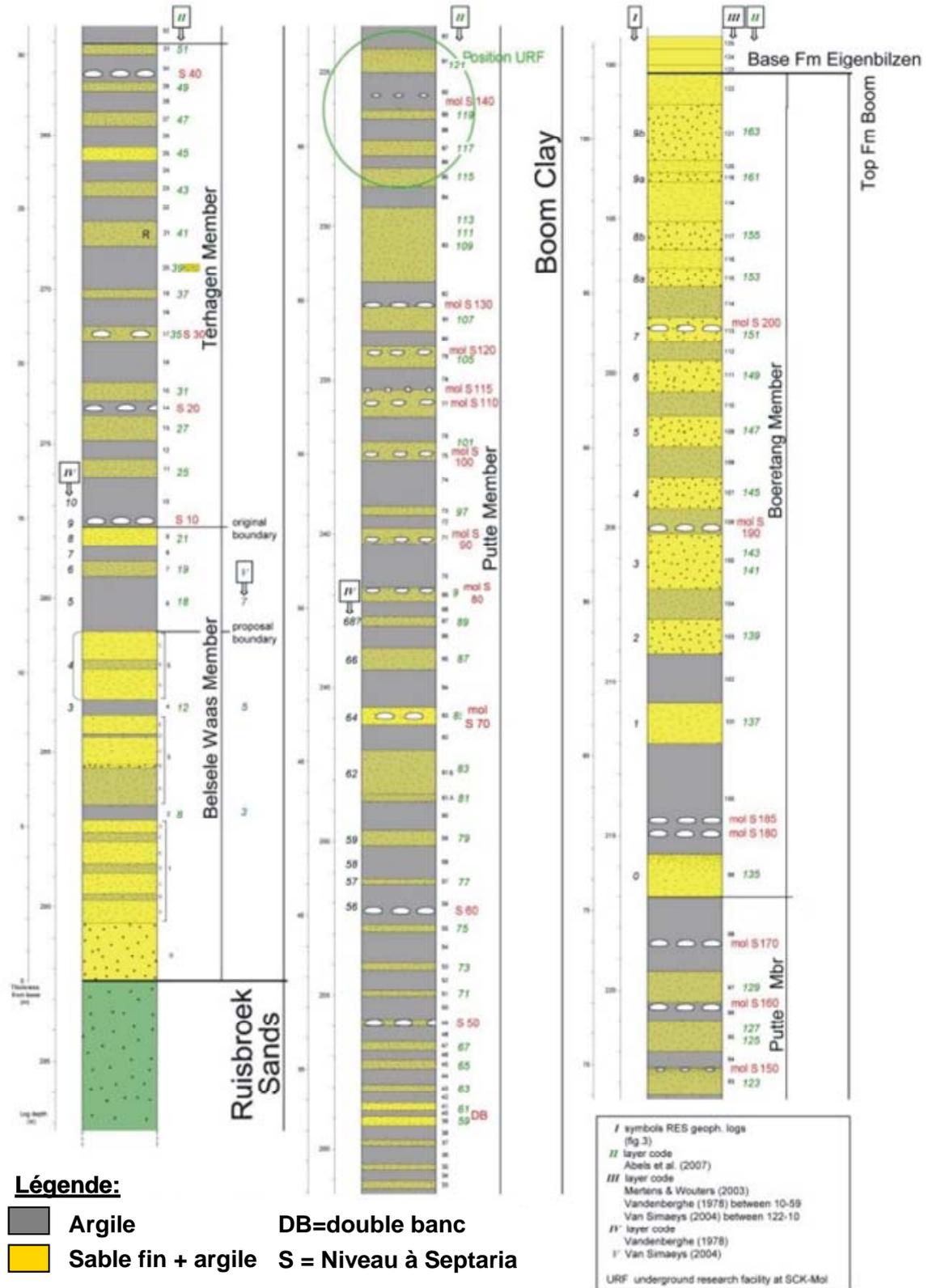


Figure 3-2: Log stratigraphique détaillé des Argiles de Boom et localisation de l'URL HADES à Mol (d'après Vandenberghe, 1978; Wouters et Vandenberghe, 1994; Van Keer et De Craen, 2001; Mertens et Wouters, 2003; Van Simaëys, 2004; Abels *et al.*, 2007; Belgian Subcommittee of Tertiary Stratigraphy, 2011).



formation de Boom est classé en type II, III ou IV (Van Geet, 2002, Laenen, 1997; Deniau et al., 2001) (Tableau 3-2, Figure 3-4).

Etude	Tmax (°C)	TOC (%)	IH (mg HC/g TOC)	IO (mg CO <sub>2</sub> /g TOC)
Laenen (1997)	358-429	0.5-3.2	19-181	54-175
Deniau et al. (2001)	425	1.5	120	/
Van Geet (2002)	418-428	0.92-4.13	50-283	23-232

Tableau 3-2 : Tableau récapitulatif des données Rock Eval de la formation de Boom.

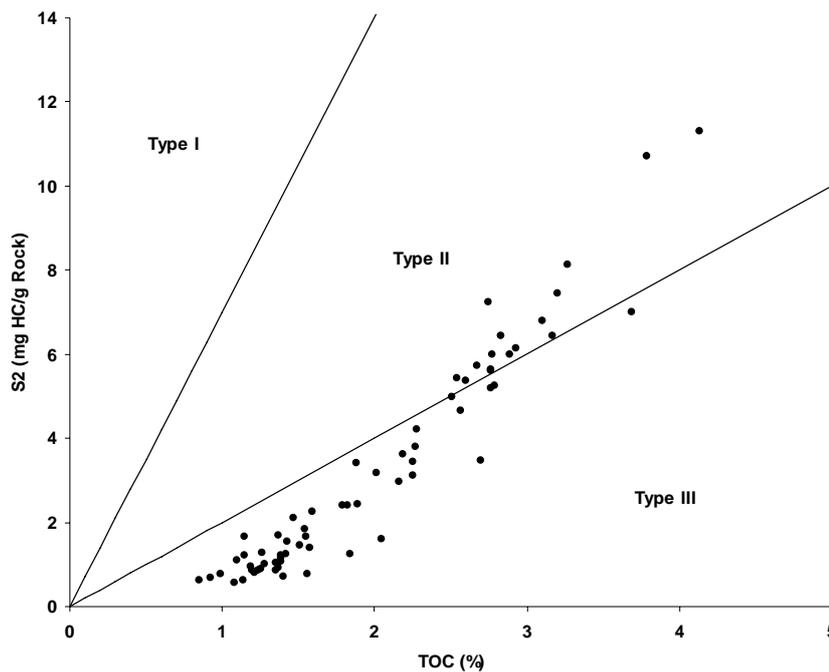


Figure 3-4 : Données Rock Eval du sondage HADES 2001/4 positionnées dans le graphe S2 en fonction du TOC (Van Geet, 2002).

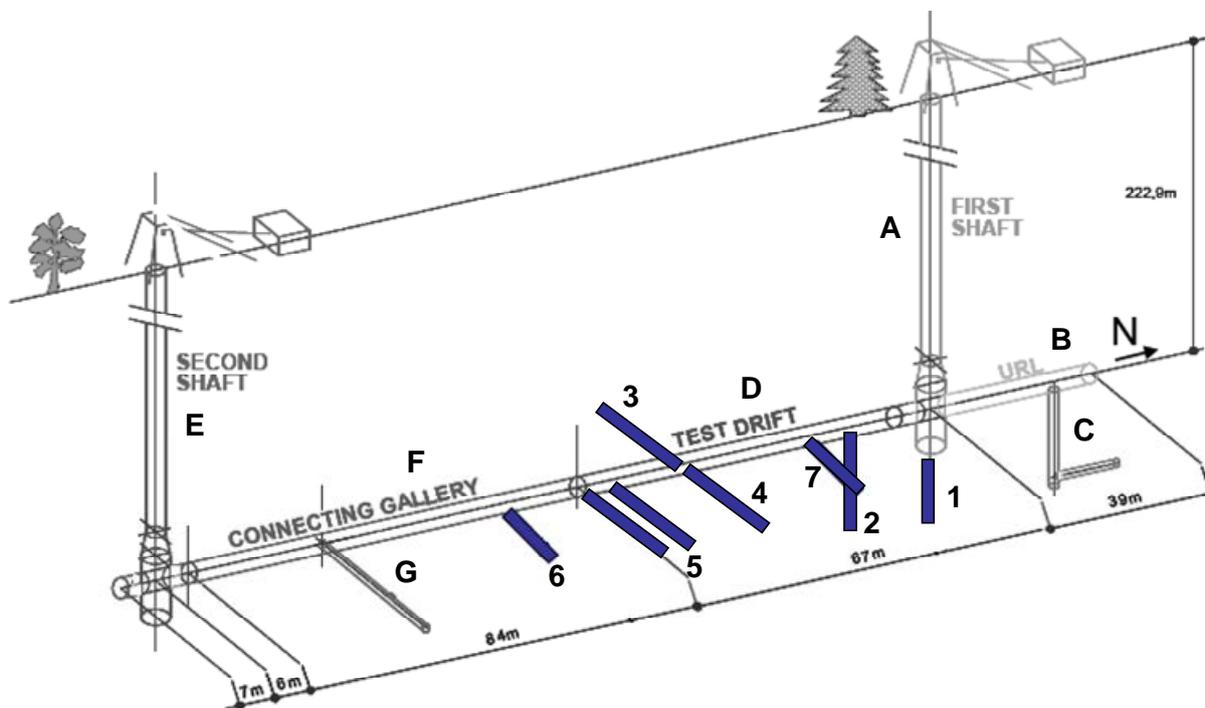
### La diagenèse de la formation de Boom

Vandenberghé (1978), Laenen (1997) et De Craen (1998) décrivent une roche peu diagenétisée (principalement stade de sulfato-réduction et début du stade de méthanogenèse de la diagenèse précoce). Cette caractéristique est, notamment, déduite de l'étude des concrétions à *Septaria*, de l'observation de précipitations de glauconite, de sidérite et de pyrites framboïdales. Cette hypothèse est en accord avec De Craen *et al.* (1999) qui ont mis en évidence la présence de bactéries de type anaérobies sulfato-réductrices et d'archéobactéries méthanogènes dans la formation, durant la diagenèse. De plus, l'étude des propriétés physiques de la formation de Boom permet de la décrire comme une argile peu compacte (Vandenberghé, 1978). La formation de Boom a été enfouie à faible

profondeur (300m) et n'a donc pas été soumise à une diagenèse thermique (Van Keer et De Craen, 2001).

### 3.2. Le laboratoire souterrain HADES

Le laboratoire HADES se situe plus précisément dans le Putte Member. Sa construction a commencé dans les années 80 et continue actuellement. La galerie URL (Figure 3-5) constitue la plus ancienne partie du laboratoire (1983-84), la galerie PRACLAY (Preliminary demonstration test for CLAY disposal of highly radioactive waste) la plus récente (2007). L'ensemble du laboratoire est équipé de piézomètres verticaux (EG/BS, Morphéus) et horizontaux (SPRING, Orphéus ...) afin de prélever régulièrement des échantillons d'eaux de la roche encaissante (Figure 3-5).



**Galeries:**

- A: Premier puits (1980-1982)
- B: Première galerie-URL (1983-1984)
- C: Puits expérimental et galerie expérimentale (1984)
- D: Deuxième galerie-Test Drift (1987)
- E: Second puits (1997-1999)
- F: Galerie de liaison (2001-2002)
- G: Galerie PRACLAY (2007)

**Piézomètre:**

- 1: EG/BS
- 2: Morphéus
- 3: Orphéus
- 4: SPRING 116
- 5: Archimède
- 6: N2-CG
- 7: N2-TD

Figure 3-5 : Plan du laboratoire souterrain HADES de Mol (De Craen *et al.*, 2004; De Craen *et al.*, 2008 ).

### **3.3. Les échantillons de roches**

#### **3.3.1. Description de l'échantillon de référence, P-T0**

##### **3.3.1.1. Lieu d'échantillonnage**

Lors de l'excavation de la galerie PRACLAY en octobre 2007 (Figure 3-6), des blocs ont été échantillonnés entre 3,5 et 4,5m de la galerie principale et ont été immédiatement conditionnés sous atmosphère neutre (azote) dans des sacs en aluminium thermo-soudés afin qu'ils ne soient pas altérés.



**Figure 3-6 : Bloc d'argile de Boom prélevé lors de l'excavation de la galerie PRACLAY en octobre 2007**

L'échantillon P-T0 a été prélevé parmi ceux-ci ; considéré comme non-altéré, il représente un échantillon de référence. La série d'oxydation artificielle a été construite à partir de cet échantillon.

##### **3.3.1.2. Caractéristiques minéralogiques de l'échantillon P-T0**

L'échantillon a été analysé en diffractométrie de rayon X (DRX) afin de connaître ses caractéristiques minéralogiques. La fraction totale et la fraction fine saturée à l'éthylène glycol (<2 $\mu$ m) ont été analysées (Figure 3-7). L'échantillon est composé de minéraux argileux (smectite, illite, smectite + chlorite et kaolinite + chlorite), de quartz, de pyrite, de carbonate (dolomite et calcite) et de feldspaths.

Une détermination semi-quantitative de l'abondance relative des minéraux argileux a été faite sur la fraction fine saturée à l'éthylène glycol (Figure 3-7B). Pour chaque espèce argileuse présente sur le diffractogramme B, la hauteur de chaque pic a été affectée d'un coefficient spécifique prenant en compte un certain nombre de paramètres, dont l'état de cristallisation du minéral et la surface du pic (Holtzapffel, 1985). La somme des valeurs obtenues pour l'ensemble des espèces argileuses est ramenée à 100% (Tableau 3-3).

L'échantillon P-T0 présente des proportions un peu plus élevées en kaolinite+chlorite que la composition générale présentée par Zeelmaekers et al. (2010).

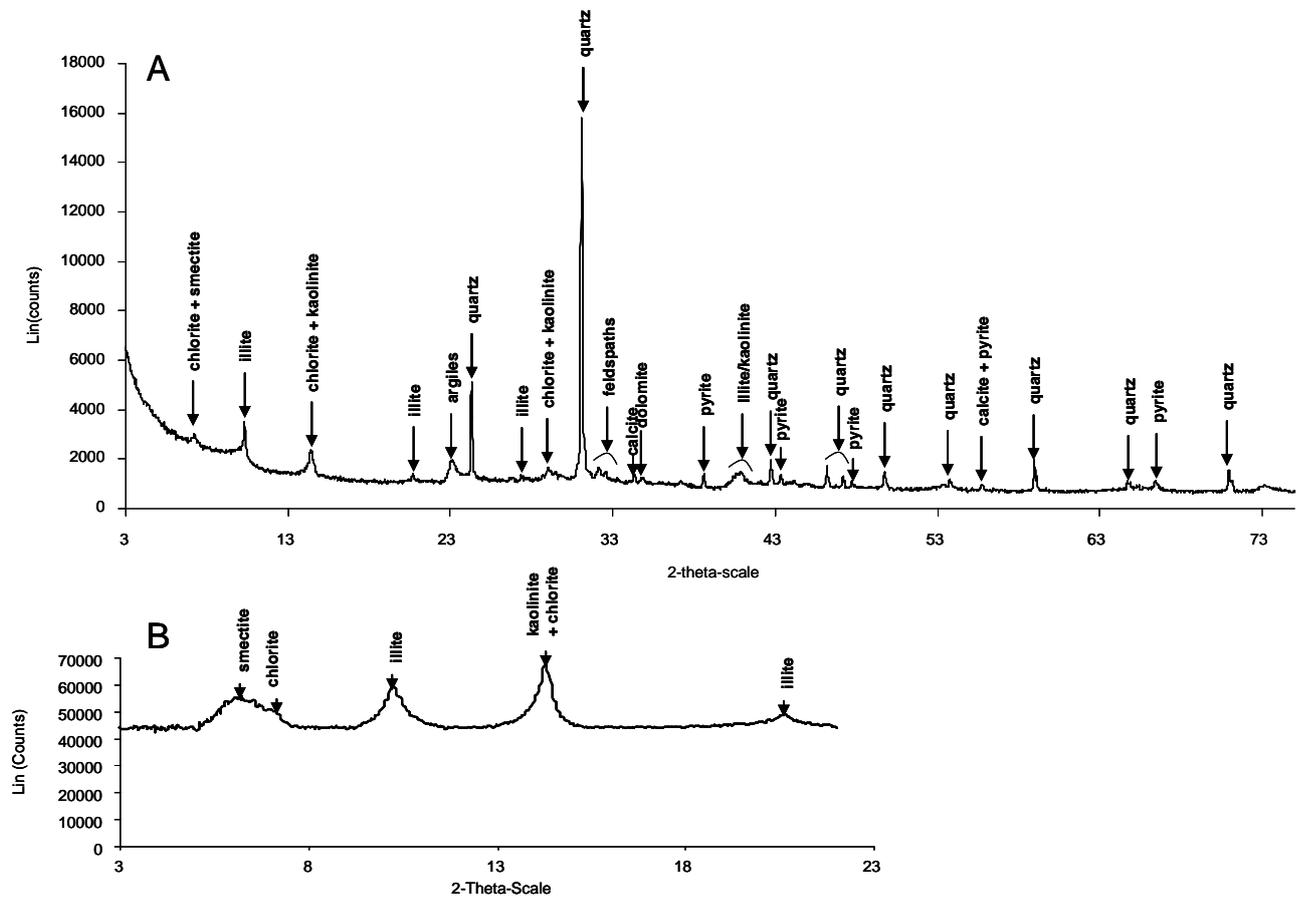


Figure 3-7 : A\_ Diffractogramme de l'échantillon P-T0, fraction totale sèche, B\_ Diffractogramme de la fraction <math><2\mu\text{m}</math> saturée à l'éthylène glycol vapeur pendant 24h. Les données ont été collectées avec un diffractomètre D8 Bruker (Co-Kalpha\_1 radiation ( $\lambda=1.7902\text{\AA}$ )). Les conditions expérimentales sont : voltage = 35kV, I=45mA, pas= 0,0035° (2 theta), 3 sec counting time.

Minéraux argileux	%
smectite	24,45
chlorite	8,35
illite	36,47
kaolinite+chlorite	30,73

Tableau 3-3 : Pourcentage des espèces argileuses de l'échantillon P-T0, calculé par la méthode d'Holtzapffel (1985).

### 3.3.2. Description des échantillons naturels

Des échantillons naturels ont été prélevés afin d'obtenir des points de comparaison entre ceux oxydés artificiellement en laboratoire et ceux altérés dans les conditions de galerie.

Le laboratoire souterrain HADES est équipé de fenêtres d'où sortent des tuyaux. Sous la pression, l'argile de Boom s'écoule naturellement à travers ces derniers. L'argile sort alors dans la galerie sous forme de « boudin » dont les sections sont progressivement exposées à l'air (temps d'exposition estimé à 2 ans pour ces échantillons). Six échantillons ont été prélevés, en octobre 2007, dans la galerie du laboratoire souterrain HADES dans la fenêtre URL R16W (Figure 3-8).



Figure 3-8 : Échantillons prélevés dans la galerie HADES, au niveau de la fenêtre URL R16W en octobre 2007

Il s'agit des échantillons Gal-1 à Gal-6. La numérotation, déterminée suivant l'état visuel d'altération de surface des échantillons, classe ces derniers des mieux préservés (Gal-1) au plus altérés (Gal-6). Cette série correspond à la série d'altération naturelle en galerie.

### **3.4. Description de la matière organique hydrosoluble des eaux de piézomètres du laboratoire souterrain HADES**

Le laboratoire souterrain HADES possède de nombreux piézomètres permettant d'étudier l'impact de l'excavation de la galerie sur l'eau de la formation de Boom. Ces piézomètres drainent différents faciès de la formation de Boom et sont équipés de filtres qui permettent de sélectionner les niveaux échantillonnés. De plus, certains de ces piézomètres ont été excavés sous azote afin de ne pas oxyder la roche encaissante et ainsi préserver le signal naturel de la matière organique hydrosoluble. Dans ce paragraphe, des échantillons d'eau de quatre piézomètres ont été étudiés : ces échantillons proviennent de piézomètres verticaux et horizontaux (faciès échantillonnés différents) ainsi que de piézomètres excavés ou non à l'azote (faciès échantillonnés potentiellement altérés). Ces échantillons nous donneront, d'une part, une vue générale des caractéristiques de la matière organique hydrosoluble des eaux de la formation de Boom et, d'autre part, la possibilité de distinguer les différences éventuelles entre les piézomètres. Il s'agit de la première étude exhaustive de la comparaison de la MOD du site de Mol. Cette étude permettra de comparer ultérieurement la MOD des piézomètres avec les lixiviats des différentes expériences d'oxydation et de biodégradation.

#### **3.4.1. Echantillons et protocole**

Différents piézomètres du laboratoire souterrain HADES ont été échantillonnés en janvier 2010 afin d'étudier la variabilité de composition de l'eau de la formation de Boom autour du laboratoire. Quatre piézomètres ont été étudiés (Figure 3-5):

- EGBS (**E**xtension **G**allery **B**ottom **S**haft);
- Spring 116 (**S**ource **P**iezonest at **R**ING **116** of the Test Drift gallery);
- Le piézomètre N2TD (forage à l'azote – N2 Test Drift) ;
- Le piézomètre N2CG (forage à l'azote – N2 Connecting Gallery).

### 3.4.1.1. Le piézomètre vertical EGBS

Le piézomètre EGBS est le plus ancien des piézomètres du laboratoire souterrain (1983). C'est un piézomètre vertical se situant en dessous du premier puits d'accès (Figure 3-9). EGBS draine les eaux se situant entre les niveaux à Septaria S40 et S60 et la chimie des eaux de ce piézomètre est potentiellement plus influencée par celle du double banc, qui est un niveau beaucoup plus poreux que le reste de la formation (De Craen et al., 2004).

### 3.4.1.2. Les piézomètres horizontaux Spring 116, N2TD et N2CG

Le piézomètre Spring 116 est un piézomètre horizontal construit en 1999 qui possède quatre grands filtres (Figure 3-9). Il draine de grande quantité d'eau permettant de réaliser des analyses poussées au laboratoire. L'eau échantillonnée dans le cadre de ce travail provient du filtre le plus éloigné de la galerie (le filtre 1).

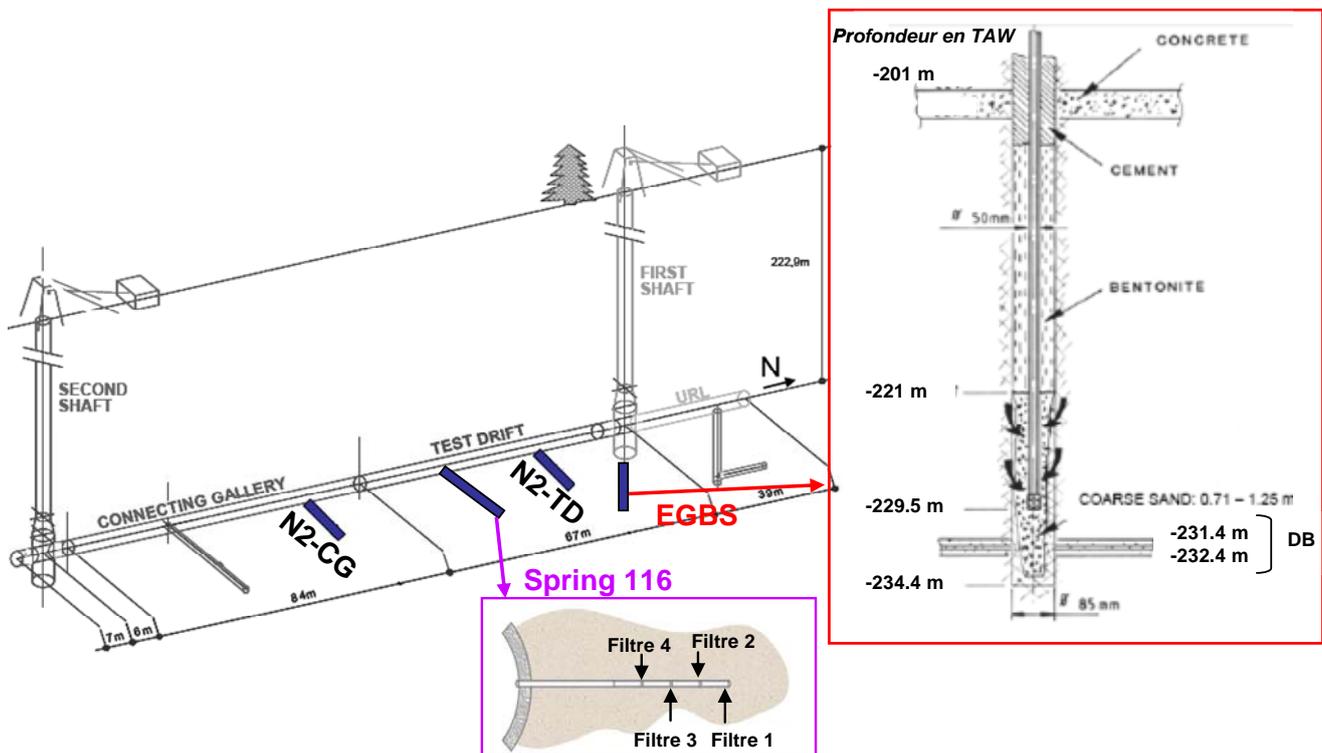


Figure 3-9: Localisation des quatre piézomètres étudiés et organisation des piézomètres Spring 116 et EGBS dans le laboratoire HADES (d'après De Craen et al., 2004; De Craen et al., 2008)

Les piézomètres N2TD et N2CG ont été creusés à l'azote, en décembre 2004, afin de collecter de l'eau non perturbée par l'excavation des piézomètres. Ils contiennent tous les deux des filtres pour effectuer des échantillonnages à différente distance de la galerie. N2TD

se situe dans la galerie appelée Test Drift et N2CG dans la galerie de liaison (Connecting Gallery) (Figure 3-9). Ce sont des piézomètres « jumeaux » : ils ont la même orientation (Est), la même longueur et les filtres prélèvent le même faciès (De Craen *et al.*, 2008). Les eaux étudiées dans ce travail proviennent toutes les deux du filtre 1 correspondant au filtre le plus éloigné de la paroi de la galerie (distance galerie/filtre = 8,2 m).

### **3.4.1.3.      *Protocole d'étude***

Dans cette partie, la matière organique dissoute des eaux de piézomètre a fait l'objet d'une étude multi technique. La MOD est une fraction relativement difficile à analyser dans sa globalité (présence de sels inorganiques, problème de concentration etc.) et différentes techniques doivent être combinées pour la caractériser dans son ensemble (Baigorri *et al.*, 2009; Dalzell *et al.*, 2009). L'objectif de cette partie est, donc, de décrire les empreintes moléculaires et spectroscopiques des eaux issues des piézomètres afin de pouvoir les comparer avec les eaux de lixiviats obtenues lors des expériences d'oxydation (chapitre 4).

La matière organique dissoute des quatre échantillons d'eau de piézomètre a été, tout d'abord, quantifiée (dosage du carbone organique dissous - COD). Elle a, ensuite, fait l'objet de caractérisations (i) spectroscopiques par fluorescence 3D et microscopie infrarouge à transformée de Fourier et (ii) moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC) et par pyrolyse flash -chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (PyGCMS). Par ailleurs, des tests de dialyse ont été conduits (Figure 3-10).

Les différentes eaux ont fait également l'objet d'un fractionnement acide humique / acide fulvique selon le protocole décrit dans le chapitre 2 paragraphe 2.2.2. Les deux fractions obtenues (« fulvic like » et « humic like ») ont été étudiées par fluorescence 3D, leur distribution massique étudiée par chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC) et par dialyse.

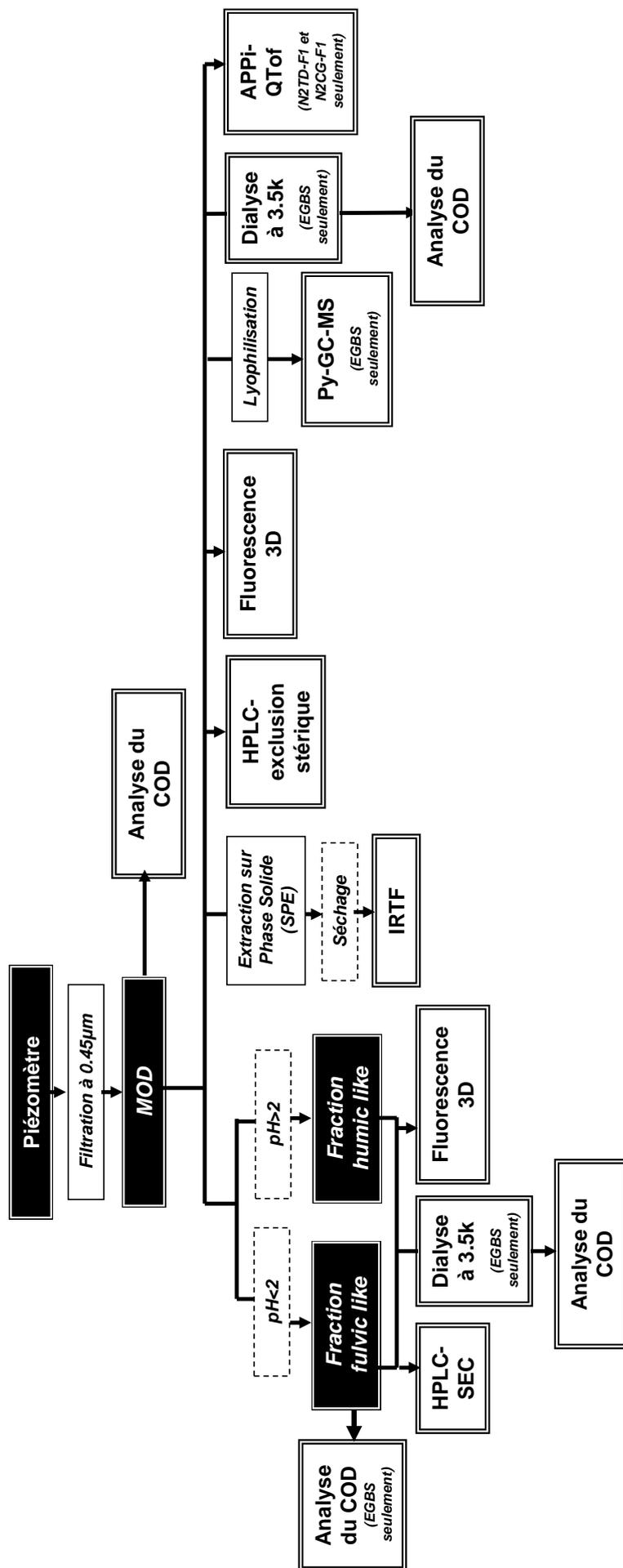


Figure 3-10 : Protocole d'étude des échantillons d'eau de piézomètre, avec HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.), IRTF = microscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. paragraphe 2.4.2.), APPI-QTOF= source de photo ionisation à pression atmosphérique couplée à un spectromètre de masse haute résolution (cf. paragraphe 2.3.4.)

Les analyses n'ont pas été effectuées sur l'ensemble des eaux issues des 4 piézomètres, car le volume des eaux des piézomètres Spring 116, N2TD et N2CG était insuffisant (50ml). Toutefois, les analyses globales, notamment la distribution massique (HPLC-SEC), ou encore les spectres de fluorescence 3D ont montré que la signature des eaux de ces quatre piézomètres étaient très proches ; c'est pourquoi, seule l'eau du piézomètre EGBS a été utilisée pour les analyses complémentaires nécessitant de plus grands volumes d'eau (dialyse, PyGCMS). Pour les analyses de spectrométrie de masse haute résolution (APPI-Qtof), le choix s'est porté sur les piézomètres mis en place plus récemment excavé, sous azote (N2TD et N2CG).

Dans cette partie, la MOD filtrée à 0.45µm (filtre GF/F Wathman) portera le nom d'eau brute alors que les fractions organiques obtenues par fractionnement à pH=2 porteront les noms de fraction « fulvic like » (soluble) et « humic like » (insoluble).

### 3.4.2. Résultats

#### 3.4.2.1. Analyse quantitative et distribution des masses moléculaires

Les valeurs du COD des quatre eaux de piézomètres sont comprises entre 60 et 129 mgC/L (Tableau 3-4). Les valeurs obtenues pour le piézomètre EGBS sont semblables aux valeurs mesurées dans les études précédentes et effectuées par le SCK-CEN (valeur comprise entre 96 et 160 mgC/L, De Craen *et al.*, 2004 ). Les filtres F1 des piézomètres N2TD et N2CG prélèvent l'eau de formation d'un même faciès ce qui explique la valeur de COD assez proche pour ces deux piézomètres (De Craen *et al.*, 2008).

	COD mgC/L
<b>EGBS</b>	<b>129</b>
<b>N2TD F1</b>	<b>60</b>
<b>N2CG F1</b>	<b>72</b>
<b>Spring 116 F1</b>	<b>100</b>

Tableau 3-4: Valeur de COD des quatre échantillons d'eaux brutes des piézomètres EGBS, N2TD-F1, N2CG-F1 et Spring 116.

La fraction « fulvic like » représente 57.7% de la MOD de l'eau brute du piézomètre EGBS (Tableau 3-5).

	<b>% du COD total</b>
<b>EGBS-fraction "fulvic like"</b>	57.7
<b>EGBS-fraction "humic like"</b>	42.3

Tableau 3-5 : Proportion des fractions « fulvic like » et « humic like » dans l'eau de piézomètre EGBS.

Les distributions des masses des eaux brutes (après filtration à 0,45µm) obtenues par chromatographie d'exclusion stérique des différents échantillons sont semblables (Figure 3-11).

De plus, les maxima d'absorbance des fractions « fulvic like » ont des temps d'élution plus élevés que les fractions « humic like » et les eaux brutes dont elles sont issues, ce qui suggère la présence de molécules de plus petit poids moléculaire.

Une dialyse à 3 500 Da a été réalisée uniquement pour l'eau issue du piézomètre EGBS sur l'eau brute, la fraction « fulvic like » et la fraction « humic like » (Tableau 3-6). La fraction « fulvic like » contient essentiellement des molécules de taille inférieure à 3 500 Da alors que la fraction « humic like » comporte 24% de molécules de taille supérieure à 3 500 Da.

	<b>% du COD total inférieur à 3.5kDa</b>
<b>EGBS-eau brute</b>	85.08
<b>EGBS-fraction « fulvic like »</b>	98.06
<b>EGBS-fraction « humic-like »</b>	76.31

Tableau 3-6 : Pourcentage du COD de taille inférieure à 3.5 kDa par rapport au COD de l'eau brute, isolé par dialyse pour l'eau du piézomètre EGBS (eau brute, fraction « fulvic like » et « humic like »), avec  $\% \text{COD}_{<3.5\text{kDa}} = ((\text{COD}_{\text{total}} - \text{COD}_{>3.5\text{kDa}}) / \text{COD}_{\text{total}}) * 100$ .

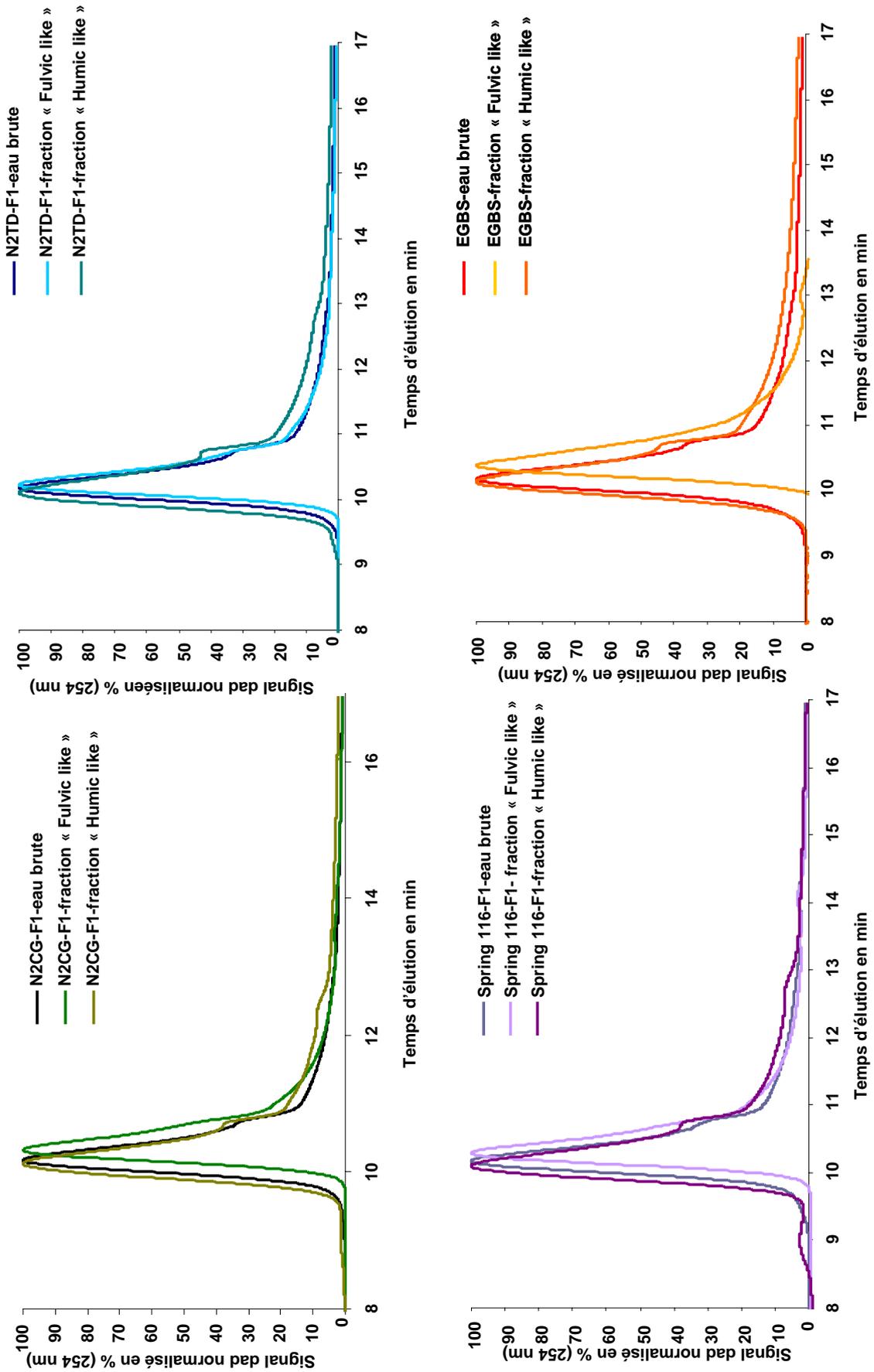


Figure 3-11 : Signal normalisé du DAD à 254 nm en fonction du temps pour les échantillons EGBS, N2CG-F1, N2TD-F1 et Spring 116 F1, eaux brutes, fractions « fulvic like » et « humic like ».

Par ailleurs, les eaux des piézomètres (eaux brutes) N2CG-F1 et N2TD-F1 ont été analysées par APPI-QToF (Figure 3-12). La source d'ionisation douce (APPI) a, pour avantage, de donner le ratio masse/charge exact des molécules détectées, mais elle permet d'observer uniquement les composés ionisables. Elle permet, par ailleurs, de limiter les effets de la présence de sels (notamment sulfate) qui sont difficilement ionisables avec une telle source. La distribution moléculaire de la MOD des eaux de ces deux piézomètres est similaire, comprise entre 100 et 600 m/z, unimodale et centrée sur 160 m/z.

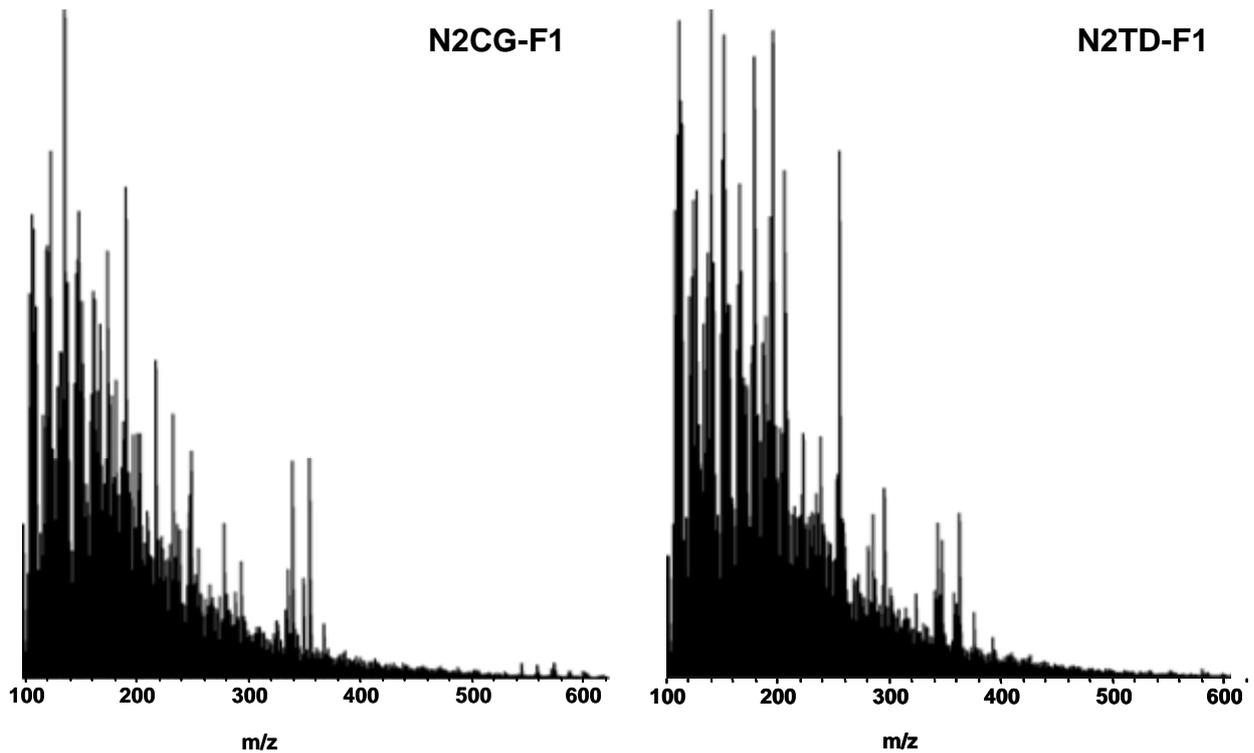


Figure 3-12 : Spectres de masse APPI (mode positif) Qtof de l'eau brute du piézomètre N2CG-F1 et N2TD-F1.

### 3.4.2.2. *Analyses spectroscopiques*

#### 3.4.2.2.1. Fluorescence 3D

L'analyse en fluorescence 3D de la matière organique dissoute est une technique non destructive, permettant d'obtenir une « carte » de l'ensemble des fluorophores de la solution analysée et de définir, ainsi, une empreinte spectroscopique.

Les matrices d'excitation et d'émission (EEM) des eaux brutes pour les quatre échantillons ne présentent pas de différences majeures (Figure 3-13, Figure 3-14) ; elles possèdent, toutes, un massif principal aux longueurs d'ondes (424 nm: 252 nm, Em : Ex), nommé Massif n°1. En revanche, les matrices d'excitation et d'émission des fractions « fulvic like » présentent deux massifs (Figure 3-13, Figure 3-14): le premier, massif F1, se situe aux

longueurs d'ondes (424 nm: 252 nm, Em : Ex) et le deuxième massif, massif F2, aux longueurs d'ondes (424 nm: 324 nm, Em : Ex). Les matrices d'excitation et d'émission des fractions « humic like » sont très voisines de celles des eaux brutes (Figure 3-13, Figure 3-14) : elles possèdent un seul massif principal, massif H1, aux longueurs d'ondes (440 nm: 267 nm, Em : Ex).

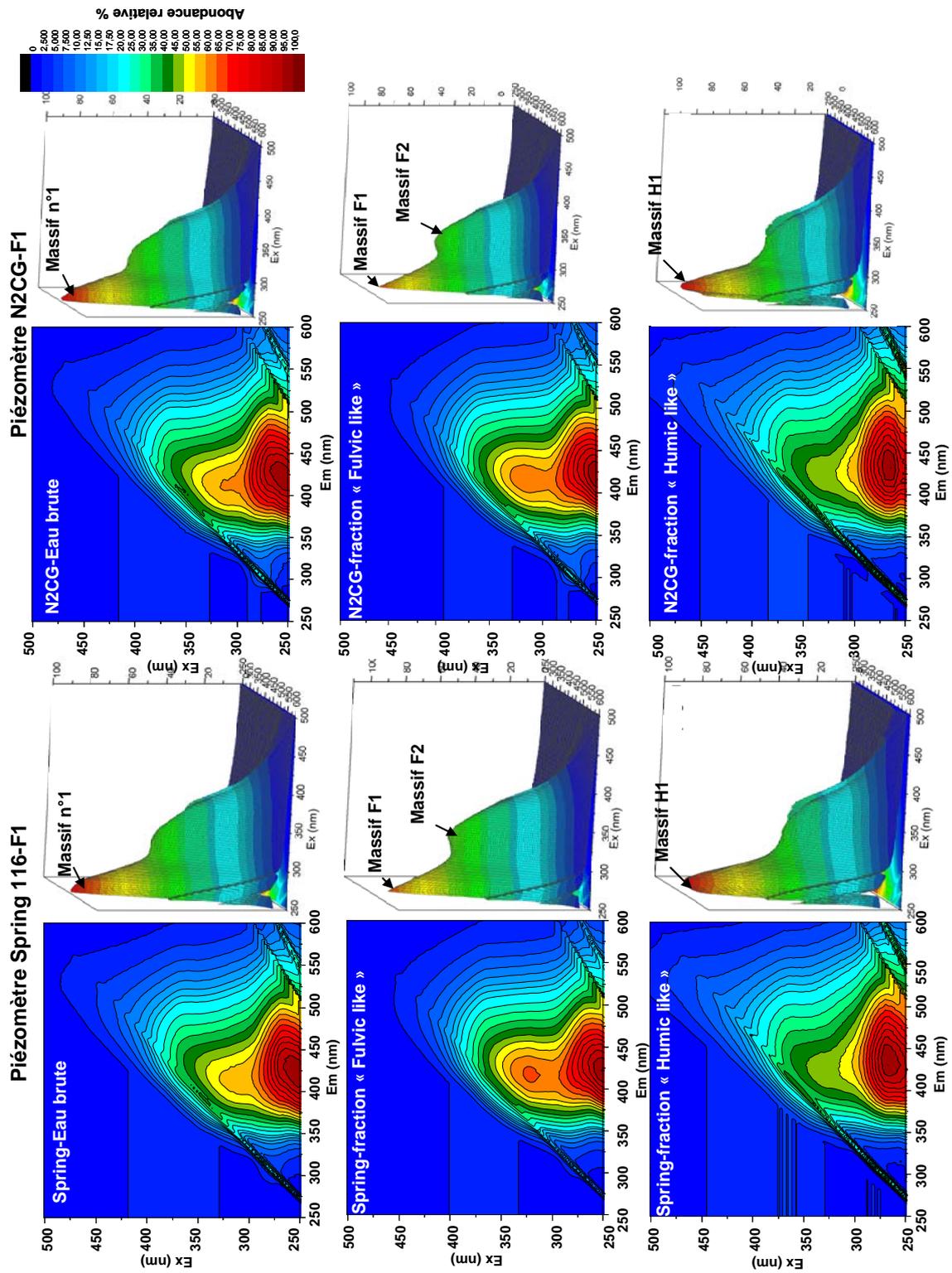


Figure 3-13 : Matrice d'Emission-Excitation des échantillons des piézomètres Spring-F1 et N2CG-F1 pour les eaux brutes, et des fractions « fulvic like » et « humic like ».

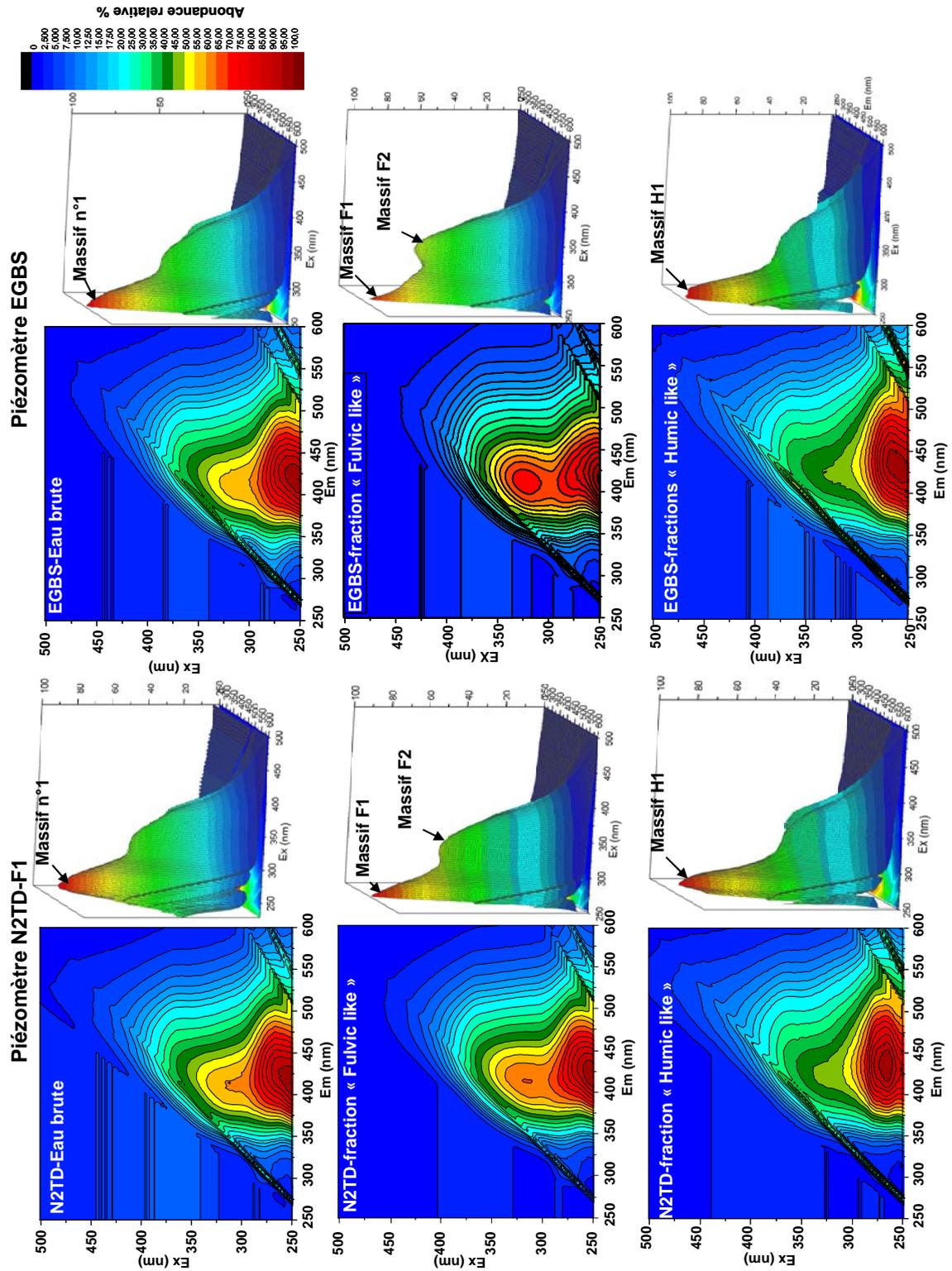


Figure 3-14 : Matrice d'Emission-Excitation des échantillons des piézomètres N2TD-F1 et EGBS pour les eaux brutes et des fractions « fulvic like » et « humic like ».

### 3.4.2.2.2. IRTF

Les eaux brutes ont été également analysées par microscopie infrarouge à transformée de Fourier (Figure 3-15). Ces échantillons ont été préalablement traités par SPE (Solid Phase Extraction), selon la procédure décrite par Kim *et al.* (2003) afin d'éliminer les sels de la solution. Toutefois, ce traitement par SPE n'a pas permis d'éliminer la totalité des sels (trop forte teneur initiale en sel, notamment les sulfates) ; c'est pourquoi, les spectres infrarouges sont partiellement masqués par la présence de plusieurs bandes inorganiques (sulfates et carbonates). Cependant, il est possible d'observer les bandes correspondant aux vibrations d'élongations aliphatiques ( $\nu_{\text{CH ali}}$  -2960\_2850  $\text{cm}^{-1}$ ), aromatiques ( $\nu_{\text{C=C}}$  : 1650-1590  $\text{cm}^{-1}$ ) et aux fonctions oxygénées ( $\nu_{\text{C=O}}$  : 1790-1670  $\text{cm}^{-1}$ ). Seule la zone 1800-1600  $\text{cm}^{-1}$  a été étudiée afin de limiter l'influence des bandes inorganiques. Pour l'ensemble des échantillons, la bande  $\nu_{\text{C=O}}$  est plus intense que la bande  $\nu_{\text{C=C}}$  et le rapport  $\nu_{\text{C=O}}$  sur  $\nu_{\text{C=C}}$  est compris entre 1.48 et 1.86 (Tableau 3-7).

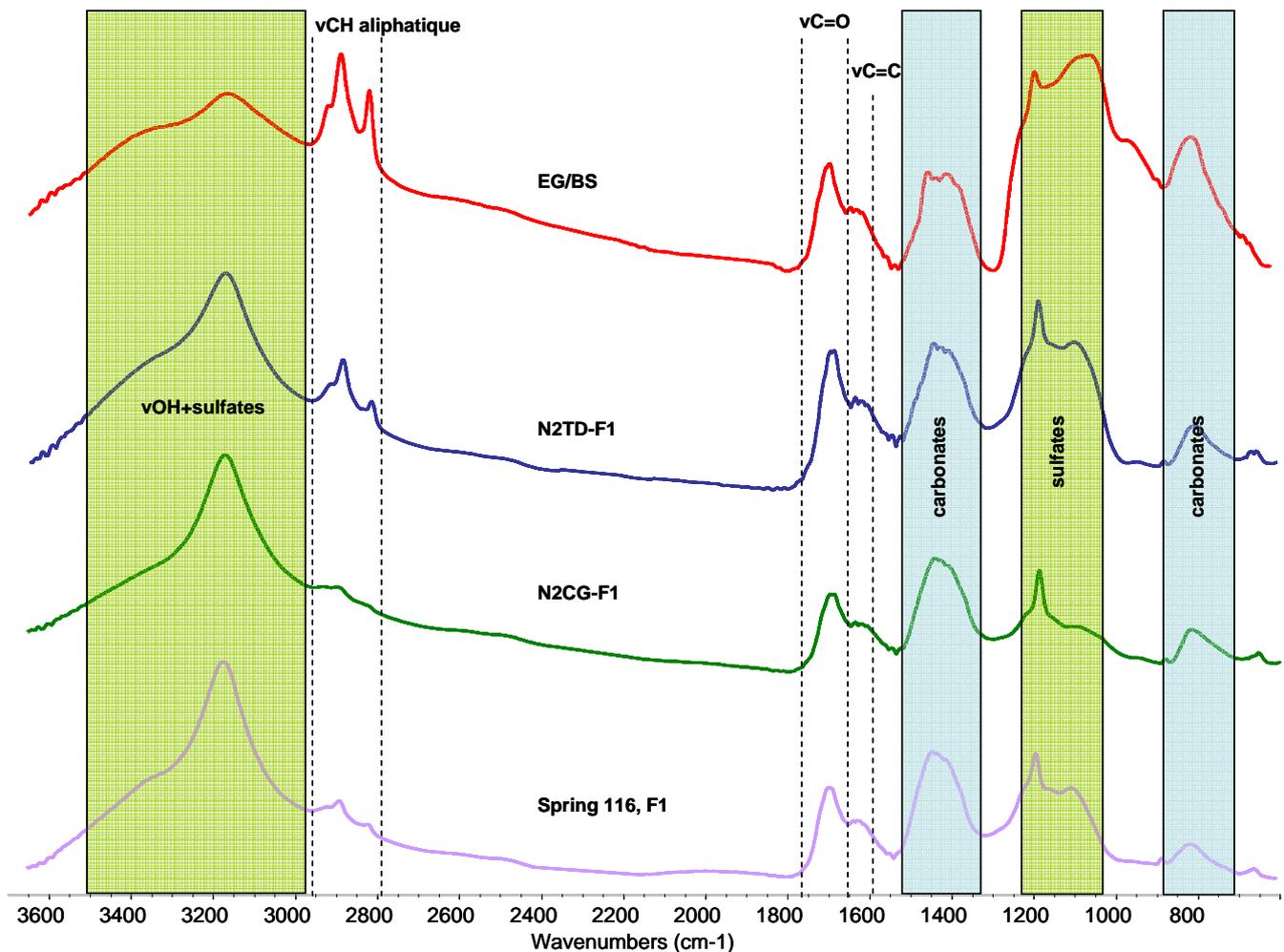


Figure 3-15 : Spectres infrarouges des eaux brutes EGBS, N2TD-F1, N2CG-F1 et Spring 116 F1.

	Aire v C=O /Aire v C=C
<b>EGBS</b>	1.48
<b>N2CG-F1</b>	1.86
<b>N2TD-F1</b>	1.80
<b>Spring 116 F1</b>	1.64

Tableau 3-7 : Valeur du rapport vC=O/vC=C pour les échantillons EGBS, N2TD-F1, N2CG-F1 et Spring 116 F1.

### 3.4.2.3. Analyse moléculaire de l'eau EGBS

Le couplage de pyrolyse flash - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (PyGCMS) permet d'analyser les résidus organiques insolubles dans les solvants organiques qui ne peuvent pas être directement analysés en GC-MS. Cette technique permet d'obtenir des informations sur les molécules organiques constituant la fraction organique des échantillons. Cependant, seules les molécules générées à 620°C (par vaporisation ou « craking ») sont analysées.

L'échantillon d'eau brute du piézomètre EGBS, préalablement lyophilisé, a été dérivatisé (méthylation) afin de protéger les fonctions carboxyles et hydroxyles. Le pyrogramme (Figure 3-16) montre une forte abondance des composés linéaires de la famille des acides alcanoïques et des *n*-alcanes ainsi que la présence de molécules dérivant de la lignine (structure *p*-hydroxyphenyle et guaiacyle) (Figure 3-17). Les composés aromatiques sont tous monocycliques et portent majoritairement une à plusieurs fonctions oxygénées de types acides et/ou methoxy.

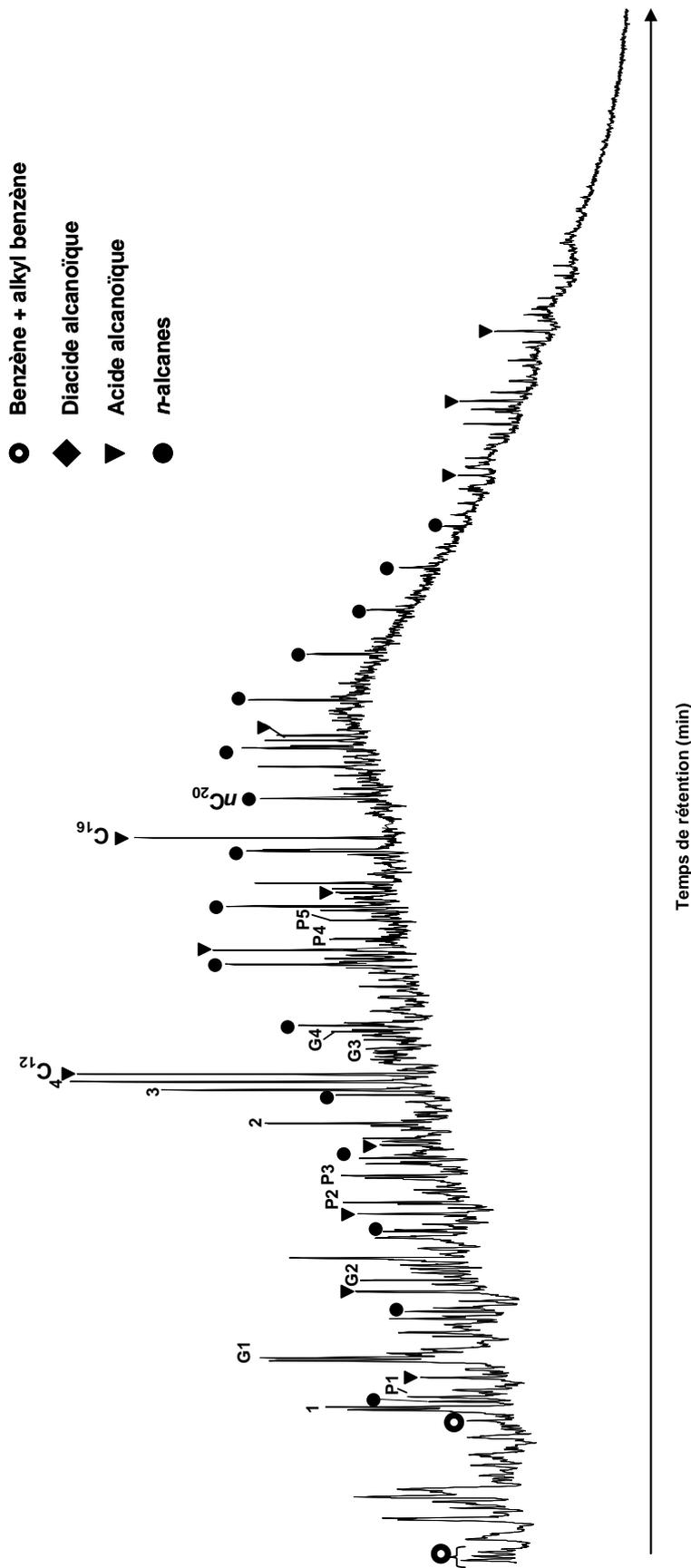


Figure 3-16 : Pyrogramme de l'échantillon d'eau brute EGGS, identification des pics Tableau 3-8.

Compound derived from p-hydroxyphenyl structures		Compound derived from guaiacyl structures		Other compounds	
P1	dimethyl-methoxy benzene	G1	1,2-dimethoxybenzene	1	benzoic acid, methyl ester
P2	3-methoxybenzoic acid, methyl ester	G2	methyl-dimethoxybenzene	2	1,3-benzene dicarboxylic acid, dimethyl ester
P3	4-methoxybenzoic acid, methyl ester	G3	3,5-dimethoxybenzoic acid, methyl ester	3	1,5-benzene dicarboxylic acid, dimethyl ester
P4	4-methoxy-1,2-benzene dicarboxylic acid, methyl ester	G4	3,4-dimethoxybenzoic acid, methyl ester	4	methyl-1,2-benzene dicarboxylic acid, dimethyl ester
P5	4-methoxy-1,3-benzene dicarboxylic acid, methyl ester				

Tableau 3-8 : Identification des composés de la Figure 3-16.

**Eau brute EGBS**

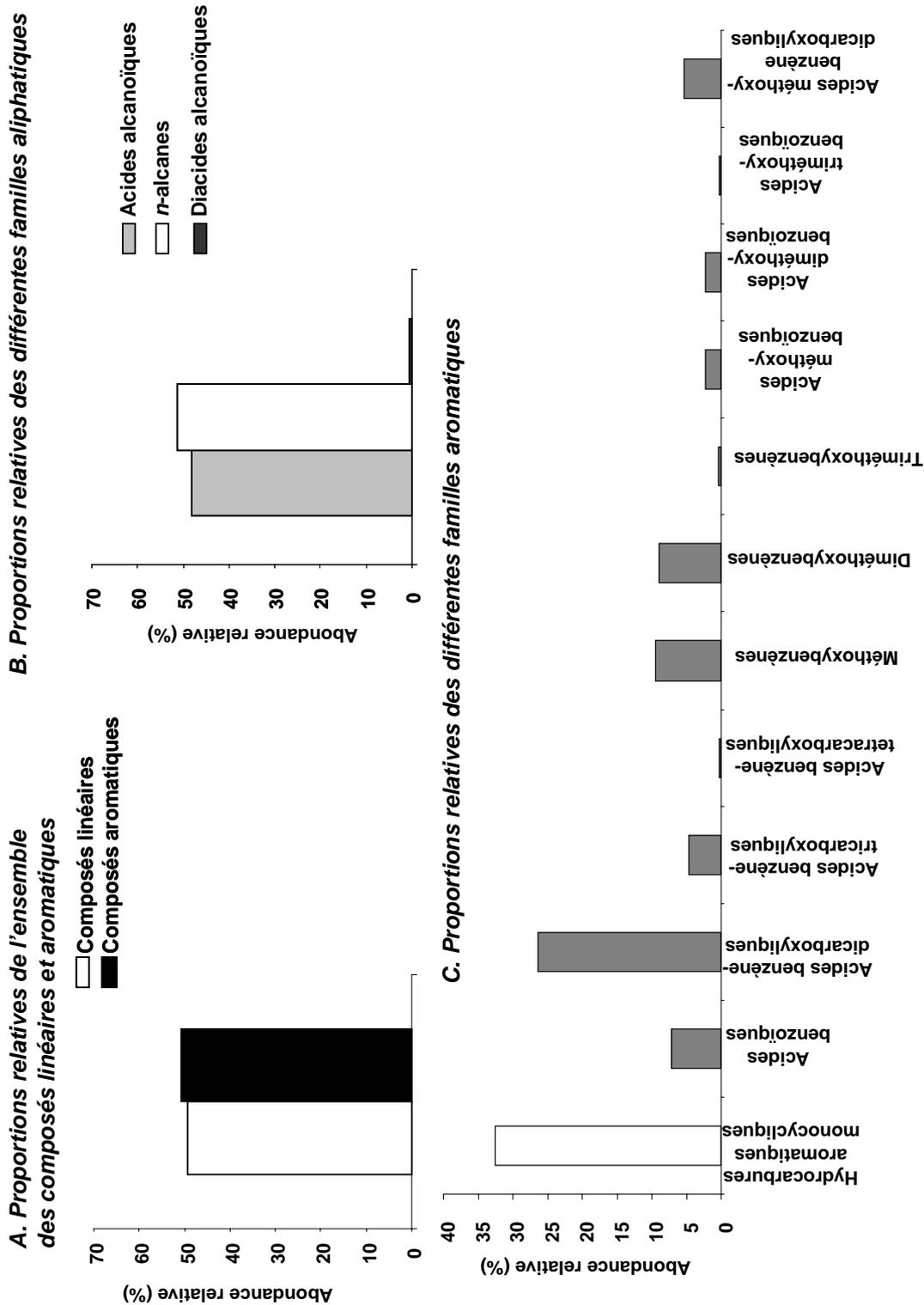


Figure 3-17 : Résultats de l'analyse de l'eau brute EGBS en THM-GC-MS, Abondance relative A\_ de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, B\_ des différentes familles aliphatiques, C\_ des différentes familles de molécules aromatiques.

### 3.4.3. Discussion

#### 3.4.3.1. *Etude de la distribution des tailles moléculaires des eaux de piézomètre*

La distribution des tailles moléculaires de la MOD des formations du Rupélien à Mol a été étudiée, précédemment, à l'aide de différentes techniques (Esi-QTof, ultrafiltration et couplage Flux-Force\_Flow Field Fractionation, Manh Thang *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2001; Plancque *et al.*, 2001; Van Geet *et al.*, 2003). La masse moyenne et la distribution des tailles moléculaires diffèrent selon les études et les techniques utilisées. Cependant, il est possible de distinguer deux tendances. Une première tendance décrit une matière organique divisée en trois fractions : une inférieure à 1000 Da (~45%), une comprise entre 10kDa et 50kDa (~10%) et la dernière supérieure à 50 kDa (~45%) (Van Geet *et al.*, 2003). Cette distribution de masse a été obtenue par ultrafiltration d'eaux du piézomètre Morphéus. La deuxième tendance décrit une MOD de plus petite taille moléculaire, majoritairement inférieure à 4 kDa, avec une masse moyenne égale à 1.8 kDa (Etude de la MOD par couplage Flux-Force, Manh Thang *et al.*, 2001). Cette dernière étude est en accord avec l'analyse d'acides fulviques de l'aquifère de Ruplien (aquifère confiné par la formation de Boom, Gedeon *et al.*, 2007 ) par ESI-QTof, qui décrit, aussi, une MOD de bas poids moléculaire (Moulin *et al.*, 2001; Plancque *et al.*, 2001).

Les résultats de dialyse proposés dans ce chapitre, quant à eux, décrivent une matière organique majoritairement inférieure à 3.5kDa. Les molécules de la fraction « fulvic like » sont globalement de plus petites masses moléculaires que celles de la fraction « humic like » (résultats dialyse, résultats HPLC-SEC, Tableau 3-6, Figure 3-11). Ces résultats seraient, donc, plus en accord avec les données obtenues par le couplage Flux-Force et l'ESI-QTof. Plancque *et al.* (2001) proposent un modèle de formule et de structure pour les acides fulviques étudiés, en se basant sur des molécules possédant une à deux charges suite à l'ionisation par la source. Ces observations ont été confirmées par Moulin *et al.* (2001) lors d'une étude de la réactivité entre ces acides fulviques et l'iode. Si l'on applique ces hypothèses aux résultats obtenus en APPI-QTof pour les eaux N2CG et N2TD (Figure 3-12), l'échelle des masses des molécules de bases de la MOD des eaux de piézomètres est, alors, comprise entre 100 Da ( $z=1$ , limite inférieure) et 1200 Da ( $z=2$ , limite supérieure).

Les résultats présentés ici sont en désaccord avec ceux obtenus par ultrafiltration (Van Geet *et al.*, 2003). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences. D'une part, les

paramètres physico-chimiques de l'eau comme la force ionique ou la teneur en COD (Buffle *et al.*, 1992; Ross et Sherrell, 1999; Zhao *et al.*, 2000) peuvent augmenter l'adsorption de la MO sur les membranes d'ultrafiltration et diminuer l'efficacité de la séparation. Ce phénomène d'adsorption pourrait expliquer la différence de distribution observée. D'autre part, les études récentes de Piccolo (2001) ont montré que les substances humiques possédaient une structure supramoléculaire, composée de petites molécules liées entre elles par des interactions de types Van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  ou CH- $\pi$ . Ainsi, cet assemblage moléculaire peut donner l'impression de molécule de haut poids moléculaire (Ultrafiltration) alors que l'APPI-QToF donne le ratio masse/charge des molécules de base et non de l'assemblage supramoléculaire. Cette dernière hypothèse peut aussi expliquer la présence d'une fraction supérieure à 3.5 kDa dans l'eau brute EGBS (~15 % du COD, Tableau 3-6) alors que l'APPI-QToF ne décrit pas une MOD de haut poids moléculaire. En effet, la dialyse est une méthode de séparation « douce » qui joue uniquement sur la différence de concentration des assemblages moléculaires de part et d'autre de la membrane sans faire intervenir des processus de rupture des interactions hydrophobes (Pastor et Pauli, 1995).

Ainsi, la combinaison des analyses portant sur la taille des composés organiques hydrosolubles révèle une distribution homogène pour l'ensemble des eaux de piézomètres du laboratoire souterrain HADES. Cette matière organique semble organisée sous forme de structures supramoléculaires de taille principalement inférieure à 3500 Da (~85% du COD) et constituée d'unités de base comprise entre 100 et 600 Da. Les fractions « humic like » sont enrichies en structure supérieure à 3500 Da et les fractions « fulvic like » en structure inférieure à 3500 Da.

#### **3.4.3.2. Caractéristiques spectroscopiques et moléculaires des eaux des piézomètres de HADES**

La matrice d'Excitation-Emission (EEM) des eaux brutes révèlent la présence d'un fluorophore principal (Massif n°1, Figure 3-13 et Figure 3-14) correspondant à des substances proches des acides humiques (pôle A ou  $\alpha'$ , Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000). Les échantillons ne présentent pas de massif dans les zones de fluorescence des composés de type protéique (pôle T, B ou  $\gamma$ ,  $\delta$ , Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000), lesquels traduisent généralement une origine biologique des fluorophores. L'absence de signal de type protéique est compatible avec une matière organique fossile ayant subi les effets de la diagenèse précoce.

Les fluorophores des massif H1 et F1 des fractions « humic like » et « fulvic like » fluorescent dans les mêmes gammes de longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ils participent probablement au signal global de fluorescence du Massif n°1 de l'eau brute (Figure 3-13 et Figure 3-14). Les matrices d'Excitation-Emission de la fraction « fulvic like » présentent un deuxième massif qui fluoresce dans les plus hautes longueurs d'ondes d'excitation ( $\lambda_{ex}=324$  nm, Massif F2, Figure 3-13 et Figure 3-14). Il est, généralement, relié aux substances humiques (pôle C ou  $\alpha$ , Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000). Ce deuxième massif n'est pas visible dans les EEM des eaux brutes et des fractions « humic like » ; son signal est probablement masqué (ou dilué) par le signal global de fluorescence dans les eaux brutes.

Dans cette étude, la technique de SPE a été utilisée pour enlever les sels présents dans les eaux afin de pouvoir réaliser des analyses par infrarouge. Avant et après traitement par SPE, des tests d'absorbance, décrits par Kim *et al.* (2003), ont été effectués afin de vérifier que les pertes en MOD lors de l'extraction sur le disque SPE étaient limitées (ici~15%, Annexe A1). Cependant, ce traitement par SPE s'est avéré insuffisant pour éliminer l'intégralité des sels des eaux de piézomètres. Le protocole proposé par Kim *et al.* (2003) ciblait des eaux moins concentrées en COD (<20 mgC/L) et en sel notamment pour les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$  (concentration~100 fois supérieure dans le cas des eaux de piézomètres, Newbold *et al.*, 1995; De Craen *et al.*, 2004). Ces fortes teneurs ont, probablement, impliqué une saturation des filtres SPE expliquant la différence d'efficacité de la technique. Cependant, les bandes  $\nu\text{C}=\text{C}$  et  $\nu\text{C}=\text{O}$  ne sont pas affectées par la présence des bandes inorganiques (Figure 3-15) et peuvent être exploitées. Les valeurs du rapport de l'aire des bandes  $\nu\text{C}=\text{O}$  sur  $\nu\text{C}=\text{C}$  sont des indicateurs importants pour suivre les conséquences de l'oxydation. En effet, de nombreux auteurs ont montré que l'oxydation induisait une modification de l'intensité des fonctions oxygénées de la MO (Faure et al, 1999, Petsch et al., 2000; Petsch et al., 2001). Il est, donc, nécessaire d'avoir une référence pour les eaux de piézomètres.

L'analyse par PyGCMS de l'eau EGBS, montre qu'elle comporte une proportion relativement forte de molécules aromatiques oxygénées (Figure 3-17), de molécules linéaires (acides *n*-alcanoïques et *n*-alcanes) et aromatiques (Figure 3-17). Les fonctions chimiques observées sont en accord avec la présence des bandes  $\nu\text{CH}_{ali}$ ,  $\nu\text{C}=\text{C}$  et  $\nu\text{C}=\text{O}$  observées en IRTF (Figure 3-15). Une partie des molécules aromatiques est apparentée à la lignine (famille des methoxy-benzènes, Hatcher et Minard, 1995) ; la MOD aurait, donc, une

origine essentiellement terrestre. Cette observation est en accord avec l'absence de pôle de fluorescence de type M ou  $\beta$  (substances humiques marines, Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000).

Ainsi, les **signatures spectroscopiques et moléculaires** des différentes eaux de piézomètres sont très proches et compatibles avec une **MOD d'origine principalement terrestre**.

#### 3.4.4. Conclusion

L'étude multi-technique de la MOD de la formation de Boom a permis d'obtenir des informations à l'échelle moléculaire et de définir des signatures spectroscopiques. Il apparaît que les empreintes moléculaires et spectroscopiques des quatre eaux de piézomètres sont semblables bien que la concentration en carbone organique dissous varie d'un piézomètre à un autre. La MOD est constituée de molécules de faible poids moléculaire (100 à 1200 Da) dont l'association est majoritairement inférieure à 3.5 kDa. Ces molécules de base sont, en partie, constituées de molécules aromatiques oxygénées, typiques de produits dérivant de la lignine. Les eaux brutes présentent un fluorophore principal correspondant à un domaine généralement attribué aux acides humiques. Cette signature est compatible avec les données moléculaires qui décrivent une origine majoritairement terrestre de la MOD.

L'ensemble de ces données constitue une base de référence pour l'étude des conséquences de l'oxydation sur la matière organique hydrosoluble de la formation de Boom. Ces données seront ultérieurement comparées aux résultats obtenus sur la matière organique des eaux de lixiviation obtenues à partir des échantillons sains, oxydés ou biodégradés en laboratoire ou altérés en galerie.

### 3.5. Références

- Abels, H. A., S. Van Simaey, F. J. Hilgen, E. De Man and N. Vandenberghe (2007).** "Obliquity-dominated glacio-eustatic sea level change in the early Oligocene: Evidence from the shallow marine siliciclastic Rupelian stratotype (Boom Formation, Belgium)." *Terra Nova* 19(1): 65-73.
- Baigorri, R., M. Fuentes, G. González-Gaitano, J. M. García-Mina, G. Almendros and F. J. González-Vila (2009).** "Complementary Multianalytical Approach To Study the Distinctive Structural Features of the Main Humic Fractions in Solution: Gray Humic Acid, Brown Humic Acid, and Fulvic Acid." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(8): 3266-3272.
- Belgian Subcommission of Tertiary Stratigraphy. (2011).** "The Rupel Group." National Commission for Stratigraphy.
- Berggren, W. A., C. C. Swisher and M. P. Aubry (1995).** "A revised Cenozoic Geochronology and Chronostratigraphy. Geochronology, Time scales and global stratigraphic correlation. ." *Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Special Edition Publication* 54: 129-212.
- Buffle, J., D. Perret and M. Newman (1992).** "The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids and macromolecules. Environmental Particles, IUPAC Series on Environmental Analytical and Physical Chemistry, Vol1. Chelsea, *Lewis Publishers*: 171-230.
- Coble, P. G. (1996).** "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy." *Marine Chemistry* 51(4): 325-346.
- Dalzell, B. J., E. C. Minor and K. M. Mopper (2009).** "Photodegradation of estuarine dissolved organic matter: a multi-method assessment of DOM transformation." *Organic Geochemistry* 40(2): 243-257.
- De Craen, M., (1998).** "The formation of septarian carbonate concretions in organic-rich argillaceous sediments". PhD-dissertation, K.U. Leuven,
- De Craen, M., M. V. Geet, M. Honty, E. Weetjens and X. Sillen (2008).** "Extent of oxidation in Boom Clay as a result of excavation and ventilation of the HADES URF: Experimental and modelling assessments." *Physics and Chemistry of the Earth* 33(SUPPL. 1): S350-S362.
- De Craen, M., R. Swennen, E. M. Keppens, C. I. Macaulay and K. Kiriakoulakis (1999).** "Bacterially mediated formation of carbonate concretions in the Oligocene Boom Clay of Northern Belgium." *Journal of Sedimentary Research* 69(5): 1098-1106.
- De Craen, M., L. Wang, M. Van Geet and H. Moors (2004)** "The geochemistry of Boom Clay pore water at the Mol site", status 2004, SCK\*CEN Scientific Report-BLG 990, 180p.

- Deniau, I., S. Derenne, C. Beaucaire, H. Pitsch and C. Largeau (2001).** "Morphological and chemical features of a kerogen from the underground Mol laboratory (Boom Clay Formation, Oligocene, Belgium): structure, source organisms and formation pathways." *Organic Geochemistry* 32(11): 1343-1356.
- Gedeon, M., I. Wemaere and J. Marivoet (2007).** "Regional groundwater model of north-east Belgium." *Journal of Hydrology* 335(1-2): 133-139.
- Hatcher, P. G. and R. D. Minard (1995).** "Comment on the origin of benzenecarboxylic acids in pyrolysis methylation studies." *Organic Geochemistry* 23(10): 991-994.
- Holtzapffel, T. (1985).** "Les minéraux argileux. Préparation. Analyse diffractométrique et détermination." *Société Géologique du Nord* 12: 1-136.
- Hovestadt, D. C. and M. Hovestadt-Euler (1995).** "Additions to the fauna of the Boom Clay Formation of Belgium (Rupelian, Oligocene). Taxonomic adjustments on the Scyliorhinidae and Rajoidei, discovery of a dasytid species (Pisces, Chondrichthyes) and a curculionid species (Insecta, Cleoptera)." *Belgian Geological Survey Professional Paper* 278: 261-282.
- Kim, S., A. J. Simpson, E. B. Kujawinski, M. A. Freitas and P. G. Hatcher (2003).** "High resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2D solution NMR for the analysis of DOM extracted by C18 solid phase disk." *Organic Geochemistry* 34(9): 1325-1335.
- Laenen, B. (1997).** "The geochemical signature of relative sea-level cycles recognized in the Boom Clay." *PhD-dissertation, K.U. Leuven, Leuven, Belgium.*
- Manh Thang, N., H. Geckeis, J. I. Kim and H. P. Beck (2001).** "Application of the flow field flow fractionation (FFFF) to the characterization of aquatic humic colloids: evaluation and optimization of the method." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 181(1-3): 289-301.
- Mertens, J. and L. Wouters (2003)** "3D Model of the Boom Clay around the HADES-URF" NIROND. 2003-02,
- Moulin, V., P. Reiller, B. Amekraz and C. Moulin (2001).** "Direct characterization of iodine covalently bound to fulvic acids by electrospray mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(24): 2488-2496.
- Newbold, J. D., B. W. Sweeney, J. K. Jackson and L. A. Kaplan (1995).** "Concentrations and export of solutes from six mountain streams in northwestern Costa Rica." *Journal of the North American Benthological Society* 14(1): 21-37.
- Parlanti, E., K. Wörz, L. Geoffroy and M. Lamotte (2000).** "Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs." *Organic Geochemistry* 31(12): 1765-1781.

- Pastor, J. and A.-M. Pauli (1995).** "Dialyse." *Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation* PE 1 525.
- Petsch, S. T., R. A. Berner and T. I. Eglinton (2000).** "A field study of the chemical weathering of ancient sedimentary organic matter." *Organic Geochemistry* 31(5): 475-487.
- Petsch, S. T., R. J. Smernik, T. I. Eglinton and J. M. Oades (2001).** "A solid state <sup>13</sup>C-NMR study of kerogen degradation during black shale weathering." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(12): 1867-1882.
- Piccolo, A. (2001).** "The supramolecular structure of humic substances." *Soil Science* 166(11): 810-832.
- Plancque, G., B. Amekraz, V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2001).** "Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(10): 827-835.
- Ross, J. M. and R. M. Sherrell (1999).** "The role of colloids in trace metal transport and adsorption behavior in New Jersey Pinelands streams." *Limnology and Oceanography* 44(4): 1019-1034.
- Van Echelpoel, E., (1991).** "Kwantitatieve Cyclostratigraphie van de Formatie van Boom (Rupeliaan, België) - De Methodologie van het onderzoek van Sedimentaire Cycli via Walsh analyse." PhD-dissertation, Doctorate Dissertation, K.U.Leuven,
- Van Geet, M. (2002).** "Interpretation of Rock-eval data on samples of core HADES 2001/4." *SCK.CEN report, R-3605, Mol, Belgium, 12pp.*
- Van Geet, M., N. Maes and A. Dierckx (2003).** "Characteristics of the Boom Clay organic matter, a review. ." *Geological Survey of Belgium, Professional Paper 2003/1* Nr. 298.
- Van Keer, I. and M. De Craen (2001).** "Sedimentology and diagenetic evolution of the Boom Clay: State of the art." *Report to NIRAS/ONDRAF R-3483.*
- Van Simaey, S., (2004).** "Stratigraphic and Paleoenvironmental Analysis of the Rupelian and Chattian in their type regions : implications for Global Oligocene Chronostratigraphy". PhD-dissertation, Doctoral thesis Geology K.U. Leuven 201p,
- Vandenbergh, N. (1976).** "Phytoclasts as provenance indicators in the Belgian septaria clay of Boom (Rupelian age)." *Sedimentology* 23: 141-145.
- Vandenbergh, N. (1978).** "Sedimentology of the Boom Clay (Rupelian) in Belgium." *Verhandeling Koninklijke Academie voor Wetenschappen, Letteren en Schone Kunsten van België, Klasse Wetenschappen XL*: 147.
- Vandenbergh, N., B. Laenen, E. Van Echelpoel and D. Lagrou (1997).** "Cyclostratigraphy and climatic eustasy. Example of the rupelian stratotype." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 325(5): 305-315.

**Vandenberghe, N. and E. Van Echelpoel (1987).** "Field guide to the Rupelian stratotype." *Bulletin de la Société belge de Géologie* 96(4): 325-337.

**Wouters, L. and N. Vandenberghe (1994).** "Géologie de la Campine essai de synthèse." *Bruxelles, ONDRAF*: 208.

**Zeelmaekers, E., M. Honty, A. Derkowski, M. De Craen, N. Vandenberghe and M. Van Geet (2010).** "A new and improved methodology for qualitative and quantitative mineralogical analysis of the Boom Clay." *International Meeting on Clays in Natural and Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement. Book of Abstracts, Nantes, ANDRA, 2010.*

**Zhao, Y. J., K. F. Wu, L. Wang, L. Zhao and S. S. Li (2000).** "Fouling and cleaning of membrane: a literature review." *Environmental Science* 12: 241-251.





**Chapitre 4 :**

**Etude des conséquences de**

**l'oxydation sur la matière organique**

**de la formation de Boom à Mol.**



## **Sommaire du chapitre 4: Etude des conséquences de l'oxydation sur la matière organique de la formation de Boom à Mol.**

<b>4.1. IMPACT DE L'OXYDATION SUR LA MATIERE ORGANIQUE SEDIMENTAIRE DE LA FORMATION DE BOOM</b> .....	<b>157</b>
4.1.1. <i>Méthodologie utilisée et représentativité</i> .....	<b>157</b>
4.1.1.1. Protocole expérimental et analytique des échantillons .....	<b>157</b>
4.1.1.2. <i>Représentativité des échantillons utilisés : comparaison avec les données géochimiques du sondage HADES 2001/4</i> .....	<b>162</b>
4.1.1.3. <i>Effet de la température (80°C) sur la matière organique utilisée pour l'oxydation artificielle</i> .....	<b>164</b>
<b>4.1.1.3.1. Résultats</b> .....	<b>164</b>
<b>4.1.1.3.2. Discussion</b> .....	<b>166</b>
4.1.2. <i>In-situ and experimental investigation of the alteration of Boom Clay (Oligocene) at the air- geological barrier interface within the Mol underground facility (Belgium): consequences on kerogen and bitumen compositions.</i> .....	<b>168</b>
4.1.2.1. Introduction.....	<b>169</b>
4.1.2.2. Experimental .....	<b>170</b>
<b>4.1.2.2.1. Sample collection</b> .....	<b>170</b>
<b>4.1.2.2.2. Artificial oxidation procedure</b> .....	<b>171</b>
<b>4.1.2.2.3. Rock Eval analysis</b> .....	<b>171</b>
<b>4.1.2.2.4. Bitumen extraction by soxhlet</b> .....	<b>171</b>
<b>4.1.2.2.5. Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS)</b> .....	<b>171</b>
<b>4.1.2.2.6. Gel Permeation Chromatography-High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC)</b> .....	<b>173</b>
4.1.2.3. Results .....	<b>173</b>
<b>4.1.2.3.1. Rock Eval analysis</b> .....	<b>173</b>
<b>4.1.2.3.2. Gel Permeation Chromatography – High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC)</b> .....	<b>175</b>
<b>4.1.2.3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)</b> .....	<b>176</b>
4.1.2.4. Discussion .....	<b>173</b>
<b>4.1.2.4.1. Origin, preservation and thermal maturity of the unaltered samples (P-T0, Gal-1a and Gal-1b)</b> .....	<b>173</b>
<b>4.1.2.4.2. Comparison between <i>in-situ</i> and artificial oxidation of Boom Clay</b> .....	<b>175</b>
<b>4.1.2.4.3. Identification of the major oxidation stages of organic matter in Boom Clay</b> .....	<b>186</b>
4.1.2.5. Conclusions.....	<b>187</b>
4.1.3. <i>Experimental investigation on the role of kerogen and clay minerals in the formation of bitumen during the oxidation of Boom clay</i> .....	<b>188</b>
4.1.3.1. Introduction.....	<b>189</b>
4.1.3.2. Samples and experimental conditions .....	<b>190</b>
<b>4.1.3.2.1. Samples</b> .....	<b>190</b>
<b>4.1.3.2.2. Air oxidation procedure</b> .....	<b>191</b>
<b>4.1.3.2.3. Extraction-fractionation</b> .....	<b>191</b>
4.1.3.2.3.1. <i>Solvent extraction by soxhlet</i> .....	<b>191</b>
4.1.3.2.3.2. <i>Kerogen extraction by dichloromethane</i> .....	<b>193</b>
4.1.3.2.3.3. <i>Fractionation</i> .....	<b>193</b>

4.1.3.2.4. Gas Chromatography-mass spectrometry and derivatization .....	193
4.1.3.2.5. Thermally assisted hydrolysis and methylation (THM-GC-MS) .....	194
4.1.3.2.6. Gel Permeation Chromatography – High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC) .....	195
4.1.3.3. Results .....	195
4.1.3.3.1. Air oxidation of the kerogen concentrate of Boom Clay .....	195
4.1.3.3.1.1. Evolution of the kerogen .....	195
4.1.3.3.1.2. Evolution of the bitumen extracted from oxidized kerogen.....	197
4.1.3.3.2. Air oxidation of the pre-extracted Boom Clay .....	198
4.1.3.4. Discussion .....	202
4.1.3.4.1. Effects of air oxidation on the composition of kerogen .....	202
4.1.3.4.2. Influence of minerals on the air oxidation process .....	203
4.1.3.4.3. Production of low molecular weight compounds .....	204
4.1.3.5. Conclusion .....	204
<b>4.2. ETUDE DE L'IMPACT DE L'OXYDATION SUR LA FRACTION ORGANIQUE HYDROSOLUBLE DE LA FORMATION DE BOOM .....</b>	<b>206</b>
4.2.1. Comparaison d'une série d'altération naturelle et d'une série d'oxydation artificielle.....	206
4.2.1.1. Protocole analytique et échantillons .....	206
4.2.1.2. Résultats .....	208
4.2.1.2.1. Analyses quantitatives .....	208
4.2.1.2.2. Etude de la distribution des masses moléculaires .....	210
4.2.1.2.3. Etude de la MOD par pyrolyse flash GCMS.....	213
4.2.1.2.4. Analyses spectroscopiques .....	216
4.2.1.3. Discussion .....	224
4.2.1.3.1. Nature de la MOD des échantillons initiaux .....	224
4.2.1.3.2. Evolution de la MOD avec l'oxydation .....	226
4.2.1.3.3. Conclusion.....	230
4.2.2. Conséquences de l'oxydation du kérogène sur la nature de la matière organique hydrosoluble.....	232
4.2.2.1. Echantillons et protocole .....	232
4.2.2.2. Résultats .....	234
4.2.2.3. Discussion .....	243
<b>4.3. CONCLUSIONS GENERALES DES EXPERIENCES D'OXYDATION .....</b>	<b>245</b>
<b>4.4. REFERENCES .....</b>	<b>250</b>

## 4. Etude des conséquences de l'oxydation sur la matière organique de la formation de Boom à Mol

Ce chapitre se positionne dans le contexte de la mise en place d'un site de stockage de déchets dans une formation géologique argileuse (formation de Boom). Un tel site de stockage va connaître trois phases successives (Figure 4-1) : (i) une phase d'excavation des galeries et, donc, d'exposition à l'air, (ii) une phase d'exploitation du site avec la mise en place de structures bétonnées et le stockage de déchets et (iii) une phase de veille, une fois l'exploitation achevée, avec un comblement des galeries.

Ce chapitre 4 analyse spécifiquement les effets de la phase d'excavation sur la matière organique et, plus précisément, l'impact de **l'oxydation à l'air** sur la matière organique de la formation des Argiles de Boom. Pour cela, la réactivité des trois différentes fractions de la matière organique va être abordée successivement : la MOE (matière organique extractible au solvant organique), le kérogène et la MOD (matière organique dissoute, c'est-à-dire la matière organique hydrosoluble). Ce travail s'appuie sur des échantillons prélevés directement dans les galeries du laboratoire souterrain de Mol et sur des oxydations artificielles.

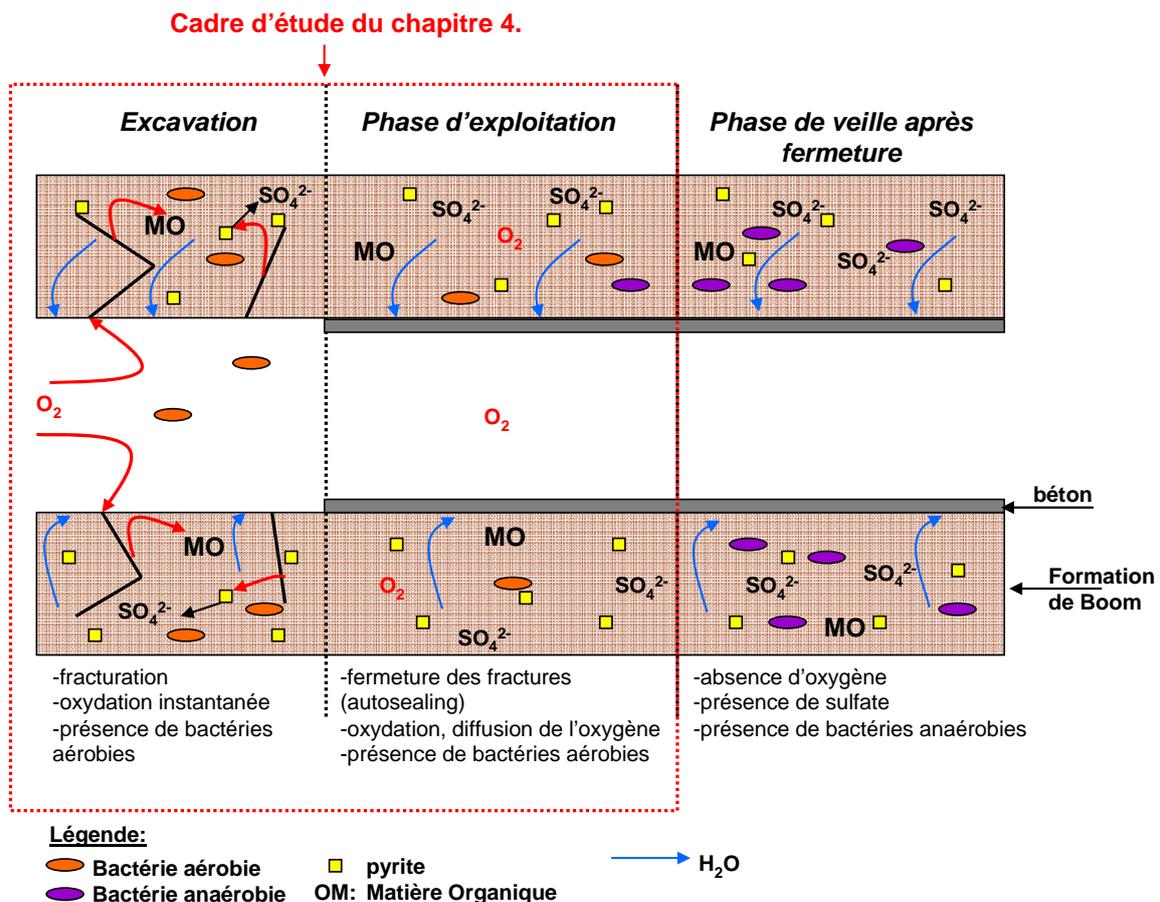


Figure 4-1 : Schéma conceptuel de l'altération de la matière organique lors de la phase (i) d'excavation de la galerie, (ii) d'exploitation et (iii) de veille après fermeture de la galerie (mise en place des colis).

Ce chapitre s'articule en trois parties :

- La première partie présente l'approche expérimentale et analytique utilisée. Elle discute également de la représentativité des échantillons utilisés par rapport à la connaissance générale de la formation de Boom. Enfin, les effets éventuels de la température d'oxydation utilisée (80°C) sont évalués par le biais d'une expérimentation sous gaz inerte.
- La deuxième partie compare, tout d'abord, l'évolution de la MOE d'échantillons, prélevés *in situ* dans une galerie, avec une série d'oxydation artificielle, réalisée sur un échantillon d'argile initialement non-altéré. Cette première phase est présentée sous forme d'un article scientifique soumis à *Applied Geochemistry*. Ensuite, la réactivité du kérogène face à l'oxydation, associé ou non à la fraction minérale, sera plus spécifiquement abordée et présentée sous forme d'un article soumis à *Fuel* ;
- La dernière partie cible l'évolution de la fraction organique hydrosoluble au cours de l'oxydation. Cette partie compare la MOD, issue des expériences d'oxydation artificielle, avec celle provenant des échantillons prélevés *in situ* dans la galerie. Par ailleurs, une série d'oxydation artificielle réalisée sur un échantillon préalablement dépourvu de MOE et de MOD permettra d'observer, plus précisément, le rôle du kérogène sur la formation de MOD lors d'une oxydation. Enfin, la MOD des échantillons frais ou altérés étudiée dans ce chapitre sera comparée à la MOD issue des piézomètres, préalablement caractérisée dans le chapitre 3.

## **4.1. Impact de l'oxydation sur la matière organique sédimentaire de la formation de Boom**

### **4.1.1. Méthodologie utilisée et représentativité.**

#### **4.1.1.1. Protocole expérimental et analytique des échantillons**

##### Série d'oxydation artificielle.

Des travaux d'oxydation artificielle ont été réalisés en laboratoire sur des échantillons du Callovo-Oxfordien prélevés à Bure (France) par Faure *et al.* (1999) et Elie *et al.* (2000). Ils ont montré qu'il était possible de simuler une oxydation naturelle par une oxydation thermique (température égale à 60°C et 130°C). Ce processus d'oxydation thermique en étuve ouverte permet d'accélérer les processus d'oxydation ; il rend possible, ainsi, l'observation des évolutions de la matière organique sur une échelle de temps plus courte que dans le cadre naturel. Dans ce travail, deux températures ont été choisies :

- **80°C** afin de simuler une altération sur une période relativement courte (quelques années). Cette série a été comparée avec les échantillons altérés en galerie pendant 2 ans environ;
- **130°C** afin de simuler l'oxydation de la matière organique à plus long terme (Elie *et al.*, 2000) et d'observer plus précisément la réactivité du kérogène.

##### Série d'oxydation artificielle à 80°C.

La série d'oxydation artificielle à 80°C a été réalisée à partir d'un bloc d'argile prélevé en 2007 dans la galerie PARCLAY (cf. paragraphe 3.3.1.) et conditionné sous azote. La teneur en eau de l'échantillon d'argile P-T0 provenant de la galerie PRACLAY a été déterminée par différence de masse avant et après lyophilisation. La teneur en eau, ainsi mesurée, est de 18,8% (Figure 4-2).

L'échantillon a, ensuite, été broyé à 250µm et séparé en aliquote de 100g par la technique de quartage, afin d'assurer une prise d'échantillon homogène. Pour chaque expérience d'oxydation, 100g d'argile ont été étalés dans des plats en verre, afin d'optimiser la surface de contact argile/air. Ces plats ont été déposés dans une étuve à 80°C pour des durées de 1, 3, 6, 9 mois.

Une expérience témoin sans oxygène a été conduite en parallèle, pendant 1 an, afin de s'assurer de l'effet de la température (80°C) sur l'évolution de la matière organique au cours

de l'expérience d'oxydation artificielle. Un échantillon d'argile (100g) a été placé dans des flacons Schott, sous une atmosphère inerte (Argon), puis mis à l'étuve à 80°C pendant 12 mois (Figure 4-2). Après ce séjour d'un an, une mesure de CO<sub>2</sub> a été faite, avant l'ouverture du flacon, afin de s'assurer que la matière organique et les carbonates n'avaient pas été altérés, compte tenu de la température expérimentale.

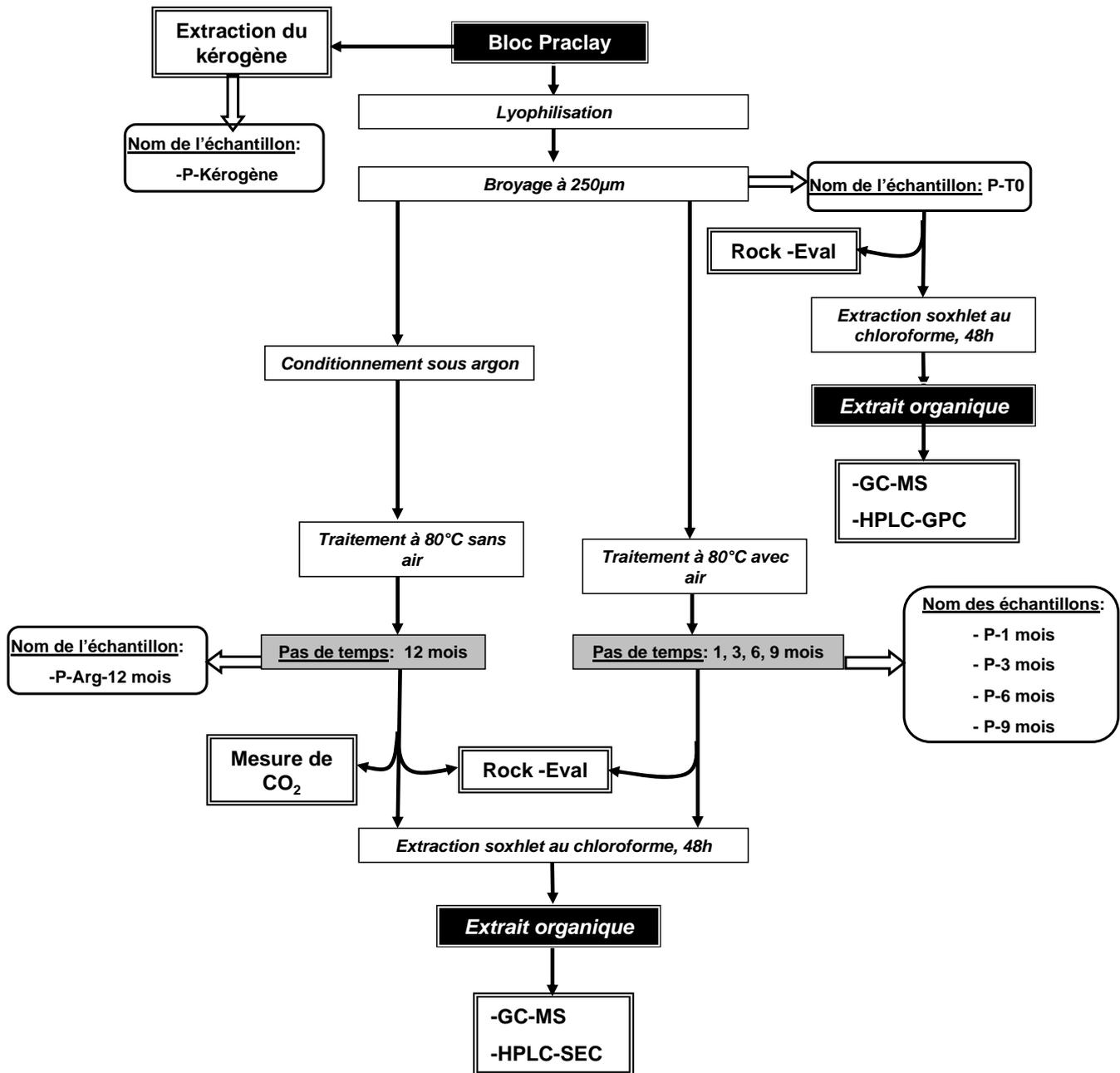


Figure 4-2 : Protocole général d'étude des échantillons oxydé artificiellement à 80°C, avec GC-MS = Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.1), HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.).

**Série d'oxydation artificielle à 130°C.**

La série d'oxydation à 130°C a été construite afin d'observer la réactivité du kérogène face à l'oxydation associé ou non à la fraction minérale. Deux échantillons ont été oxydés pendant 62, 114, 139 et 151 jours (Figure 4-3):

- Un échantillon d'argile provenant de la galerie PARCLAY, préalablement extrait 48h au chloroforme et 96h à l'eau. Cet échantillon a été lyophilisé et broyé à 250µm et étalé dans un plat en verre, afin d'optimiser la surface de contact argile/air;
- Un échantillon de kérogène isolé.

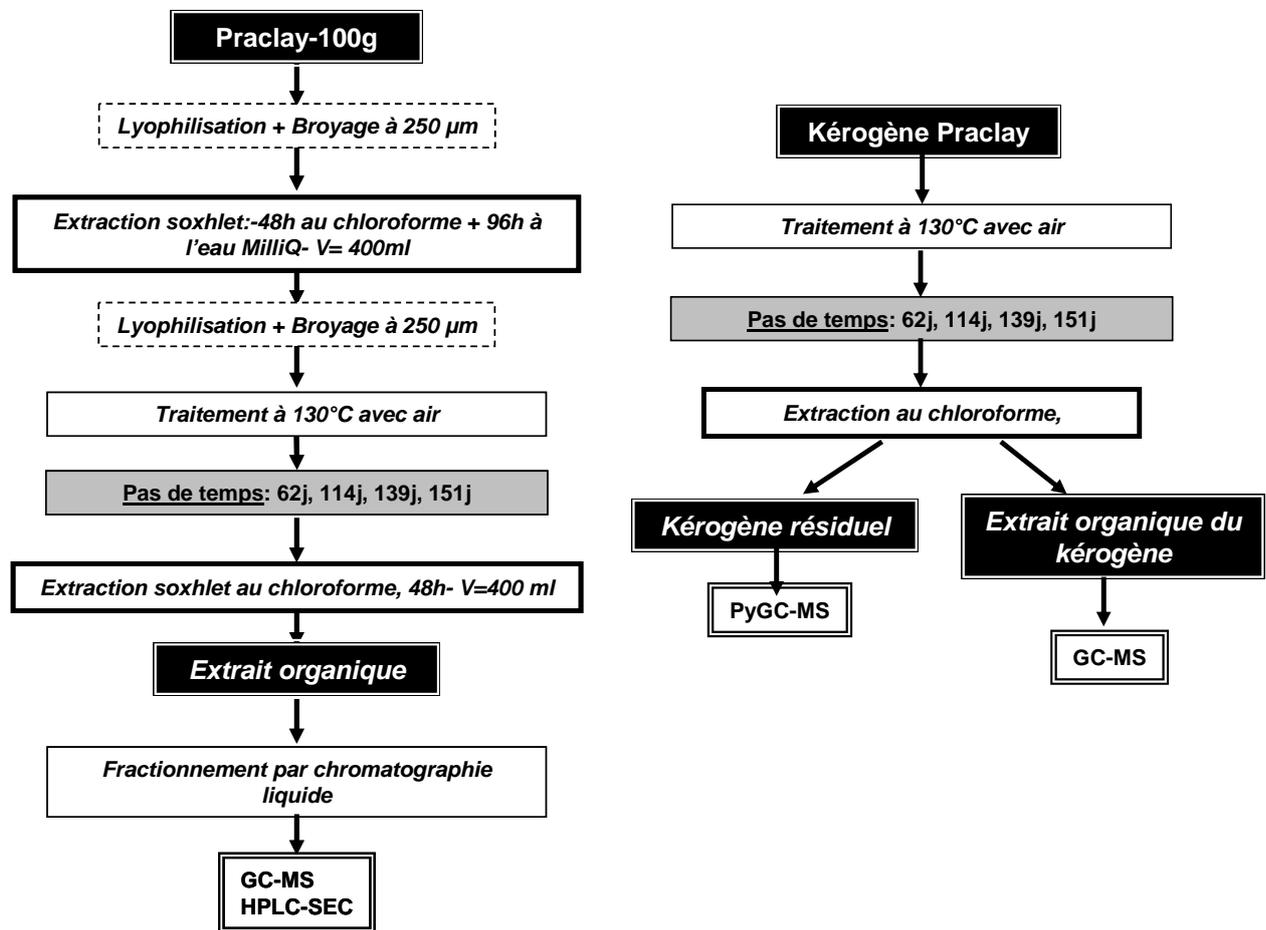


Figure 4-3 : Protocole général d'étude des échantillons d'argile et d cf. paragraphe 2.3.3.)e kérogène oxydé artificiellement à 130°C, avec GC-MS = Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.1.), HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.).

L'étape de pré-extraction de la matière organique (MOE+MOD) a eu, pour objectif, d'enlever un maximum de la matière organique extractible aux solvants organiques et à l'eau, afin de pouvoir déterminer plus précisément le rôle du kérogène lors de l'oxydation (Figure 4-4).

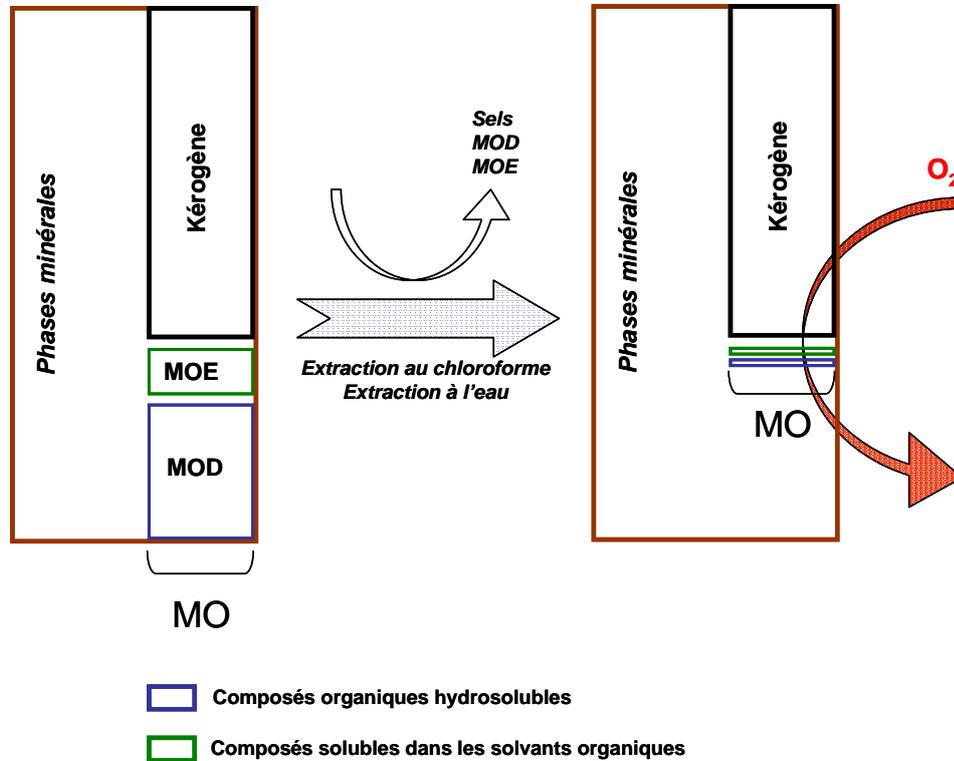


Figure 4-4 : Schéma de principe de l'expérience de pré extraction de l'Argile de Boom

### Série naturelle.

Les échantillons de la série naturelle prélevés en galerie (Gal-1 à Gal -6 –paragraphe 3.3.2.) ont, tout d'abord, été lyophilisés (Figure 4-5) et le pourcentage d'humidité de chaque échantillon a été calculé (Tableau 4-1). Ensuite, les échantillons ont été broyés à 250  $\mu\text{m}$ , avant extraction, par des solvants organiques.

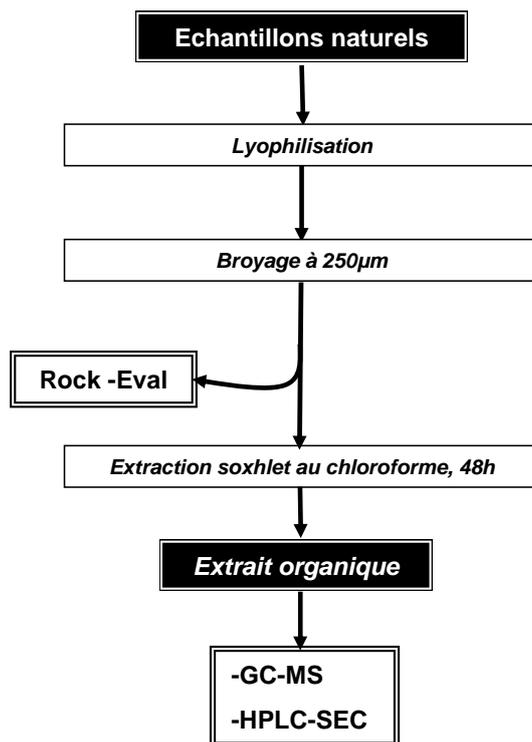


Figure 4-5 : Protocole général d'étude des échantillons de la série naturelle avec GC-MS = Couplage chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.1.), HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.).

Le pourcentage d'humidité des échantillons de la série naturelle est compris entre 28 et 2 % (Tableau 4-1). La galerie étant ventilée en continue avec une humidité contrôlée de 60-70%, un assèchement progressif des échantillons en fonction de leur temps d'exposition à l'air doit probablement se produire.

Echantillon de la galerie	
Echantillon	% d'humidité
Gal-1	28.26
Gal-2	16.16
Gal-3	10.72
Gal-4	1.86
Gal-5	2.17
Gal-6	4.12

Tableau 4-1 : Pourcentage d'humidité des échantillons de la galerie (avec un temps d'exposition à l'air croissant de Gal-1 à Gal-6).

L'échantillon P-T0 (Praclay initial correspondant à notre référence non altérée) a fait l'objet d'une isolation de kérogène (nommé P-Kérogène), suivant le protocole défini par Durand et Nicaise (1980). Des analyses élémentaires ainsi que des analyses par pyrolyse Rock-Eval ont été réalisées sur le kérogène obtenu.

Les échantillons des séries, artificielle à 80°C et naturelle, ont été caractérisés par pyrolyse Rock-Eval. Les extraits organiques (MOE) des échantillons des trois séries ont été isolés (soxhlet) et caractérisés par GC-MS et HPLC-SEC. L'extrait organique de la série à 130°C a été fractionné par chromatographie liquide sur phase solide avant caractérisation. Le kérogène oxydé a été extrait au chloroforme dans un bain aux ultrasons avant d'être caractérisé par PyGC-MS (résidu) et GC-MS (extrait organique).

#### 4.1.1.2. *Représentativité des échantillons utilisés : comparaison avec les données géochimiques du sondage HADES 2001/4*

Les paramètres géochimiques des échantillons P-T0 et Gal-1 (Tableau 4-2), obtenus par pyrolyse Rock Eval sur la roche totale, ont été comparés avec ceux obtenus sur des échantillons prélevés sur le sondage HADES 2001/4 dans le *Putte member* et *Terhagen member* effectué à partir de la galerie HADES en 2001 (Van Geet, 2002).

	COT [%]	IH [mg HC/g TOC]	IO [mg CO <sub>2</sub> /g TOC]	Tmax [°C]	S2 [mg HC/g]
<b>P-T0</b>	0.99	87	87	419	0.87
<b>Gal-1</b>	1.72	150	71	426	2.59

Tableau 4-2 : Résultats de l'analyse Rock Eval des échantillons P-T0 et Gal-1.

Pour les échantillons du sondage HADES 2001/4, les analyses Rock Eval ont été effectuées sur la roche totale. Le carbone organique total (COT) moyen est de 1,99% et les résultats des analyses Rock Eval des 67 échantillons ont été reportés sur les graphiques IH = f(IO) et S2 = f(COT) (Figure 4-6 A et B).

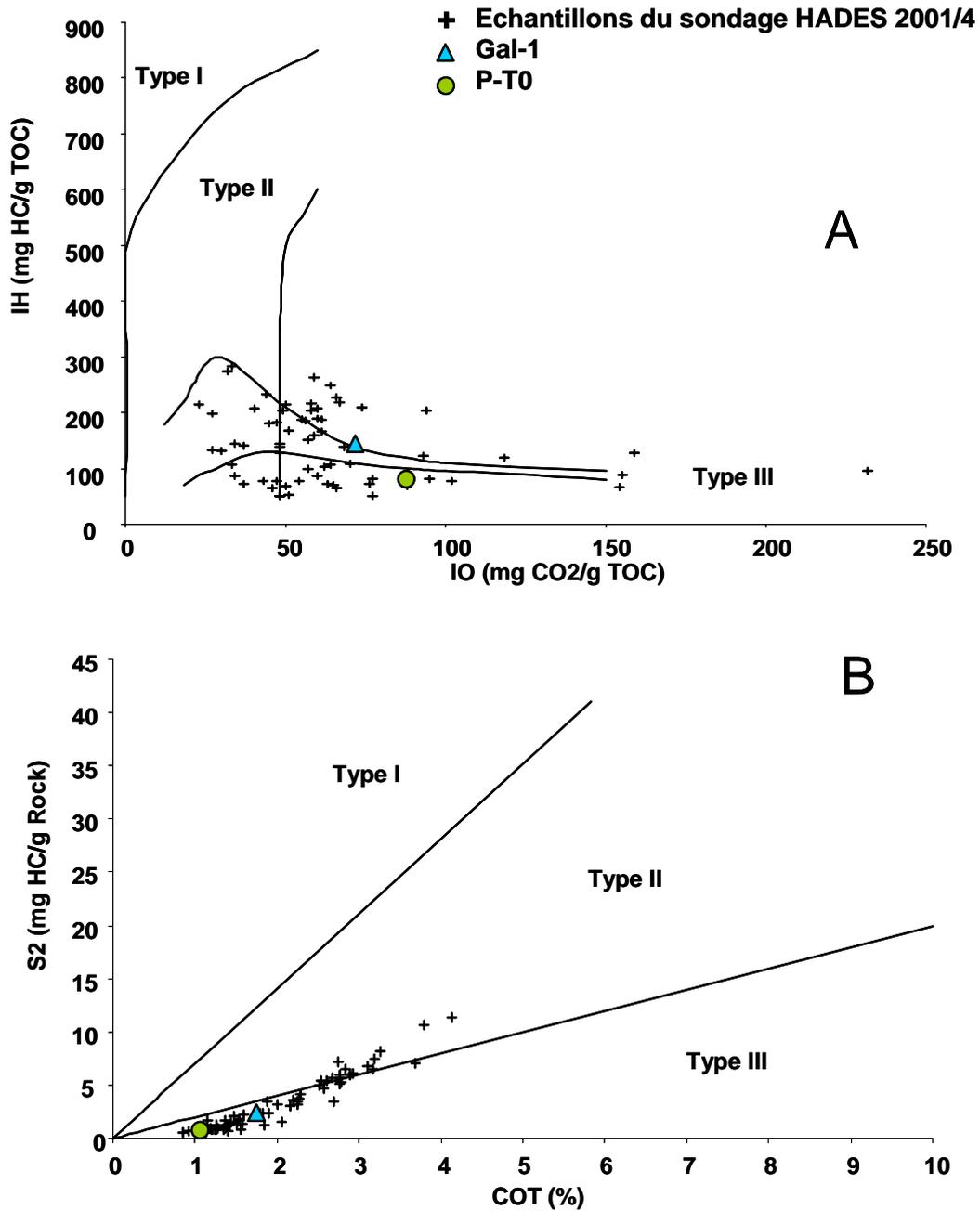


Figure 4-6 : Positions des échantillons naturels non altérés Gal-1, P-T0 et des échantillons du sondage HADES 2001/4 dans le graphe\_A. Indice d'hydrogène en fonction de l'Indice Oxygène, B. S<sub>2</sub> en fonction du COT. Valeurs Rock Eval du sondage HADES 2001/4 présentées en Annexe 2.

Deux familles d'échantillons sont observées : ceux prédominés par du kérogène de type II et associés à un COT élevé (>2.5%) et ceux prédominés par du kérogène de type III avec un COT<2.5%. Nos échantillons se situent au sein de la population prédominée par du kérogène de type III (70% de la population d'échantillons présentés ici). Les paramètres géochimiques des deux échantillons Gal-1 et P-T0, s'insèrent bien dans le trend général (*Membre Putte* et *Terhagen*). Par ailleurs, ces échantillons sont inclus dans le groupe caractérisé par une matière organique de type III (forte contribution continentale).

#### 4.1.1.3. Effet de la température (80°C) sur la matière organique utilisée pour l'oxydation artificielle

Afin de s'assurer que la température (80°C) utilisée dans les expériences d'oxydation n'induit pas d'altération de la matière organique (~1%) et des carbonates (~4%) (Zeelmaekers *et al.*, 2010), un échantillon de roche issu de la galerie PRACLAY (P-Arg-12mois) a été placé dans un flacon hermétique pendant un an à 80°C sous atmosphère inerte (argon). Différentes analyses ont été effectuées dont une mesure de CO<sub>2</sub>, des analyses Rock Eval, ainsi que des analyses moléculaires (GC-MS et HPLC-SEC) après extraction au soxhlet. L'extrait organique n'a pas été séparé par chromatographie liquide car la quantité d'extrait obtenue était insuffisante (taux d'extrait P-T0 = 0.2 mg/g d'échantillon ~2%COT).

##### 4.1.1.3.1. Résultats

La quantité de CO<sub>2</sub> produite après un an a été mesurée (Tableau 4-3). Le CO<sub>2</sub> produit a été ramené à la quantité de carbone organique total (COT de P-Arg-12mois = 1.1 %, Tableau 4-4).

	C <sub>CO2</sub> [‰]
<b>P-Arg-12 mois</b>	3.42

Tableau 4-3 : Valeur calculée de la masse de carbone (mg) du CO<sub>2</sub> par gramme du carbone organique (C<sub>CO2</sub>, ‰).

Les valeurs de COT, IH, Tmax et S2 des échantillons P-Arg-12mois et de P-T0 sont sensiblement les mêmes (Tableau 4-4). Seule la valeur de l'IO est un peu supérieure pour l'échantillon témoin, mais cette dernière reste inférieure à la valeur de l'IO pour 1 mois d'oxydation (127 mg CO<sub>2</sub>/g COT).

	COT [%]	IH [mg HC/g TOC]	IO [mg CO <sub>2</sub> /g TOC]	Tmax [°C]	S2 [mg HC/g]
<b>P-T0</b>	0.99	87	87	419	0.87
<b>P-Arg-12mois</b>	1.10	83	106	424	0.91
<b>P-1 mois</b>	0.92	65	127	415	0.59

Tableau 4-4 : Données Rock Eval des échantillons P-T0, P-Arg-12mois et P-1 mois (erreur analyse : COT ~+/- 0.1%, et IH~+/- 10 mg HC/g TOC).

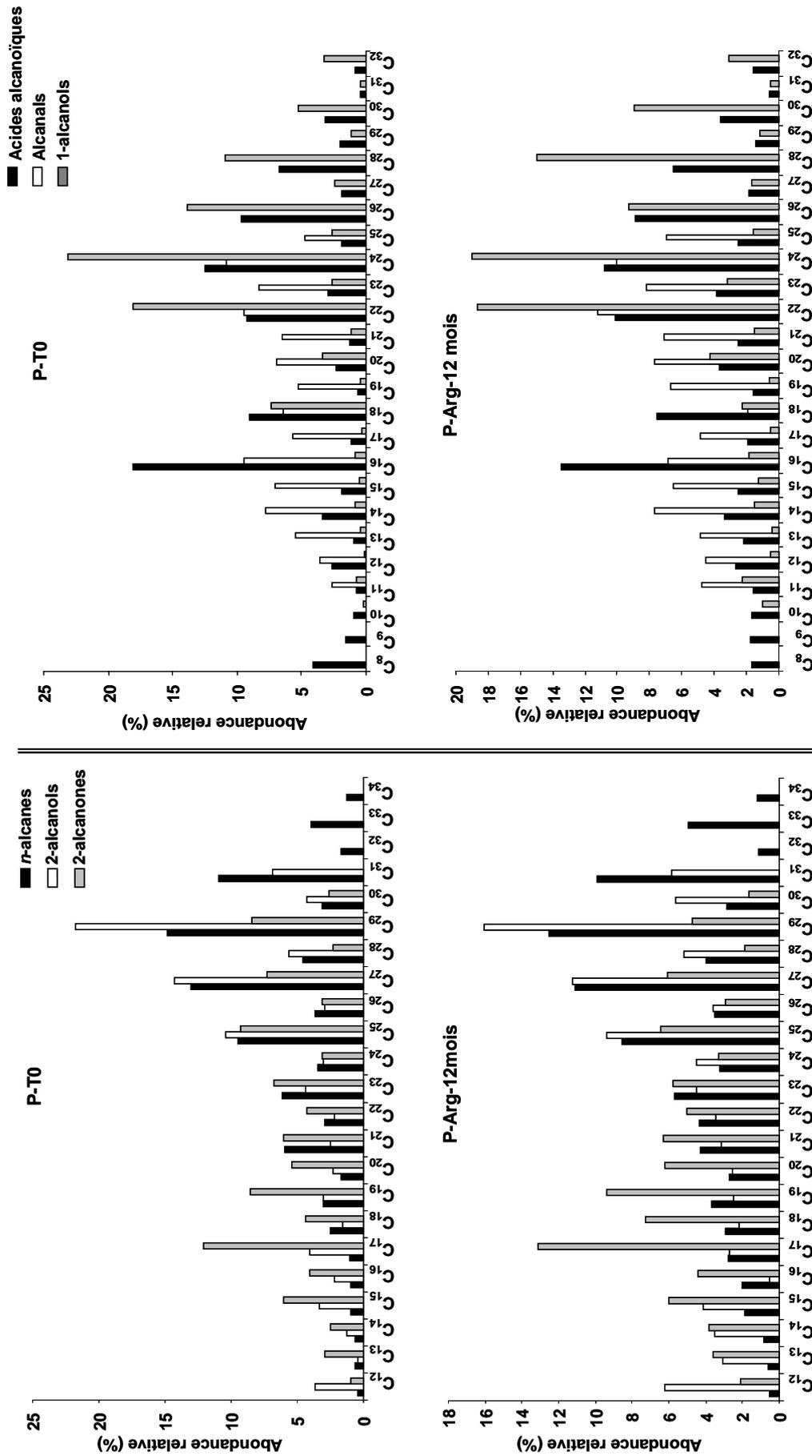


Figure 4-7 : Evolution de l'abondance relative des *n*-alcane (m/z=57), des 2-alkanols (m/z=58), des alcanones (m/z=117), des acides alcanoïques (m/z=117), des 1-alkanols (m/z=75) et des alcanols (m/z=82) pour les échantillons P-T0 et P-Arg-12mois.

La distribution moléculaire des familles moléculaires dominantes (*n*-alcanes, 2-alcanols, alcanals, 2-alcanones, acides alcanoïques et 1-alcanols) dans les échantillons P-Arg-12mois et P-T0 a été étudiée (Figure 4-7). Le rapport des Hopanes sur les Hopènes a également été calculé pour ces deux échantillons. Les Hopènes sont des molécules particulièrement sensibles à l'oxydation (Faure *et al.*, 1999; Elie *et al.*, 2000) et sont, donc, des bons marqueurs de l'oxydation de la matière organique.

Pour les deux échantillons, la nature des familles observées et la distribution des molécules sont similaires, notamment les distributions des *n*-alcanes, des acides alcanoïques et des 1-alcanols. (Figure 4-5). Le rapport des Hopanes sur les Hopènes est égal à 2.6 pour l'échantillon P-Arg-12 mois et à 2.7 pour P-T0.

Les distributions moléculaires des échantillons P-T0 et P-Arg-12mois obtenues par HPLC-SEC sont semblables avec une masse moyenne de 584 Da pour P-T0 et 510 Da pour P-Arg-12 mois (Figure 4-8).

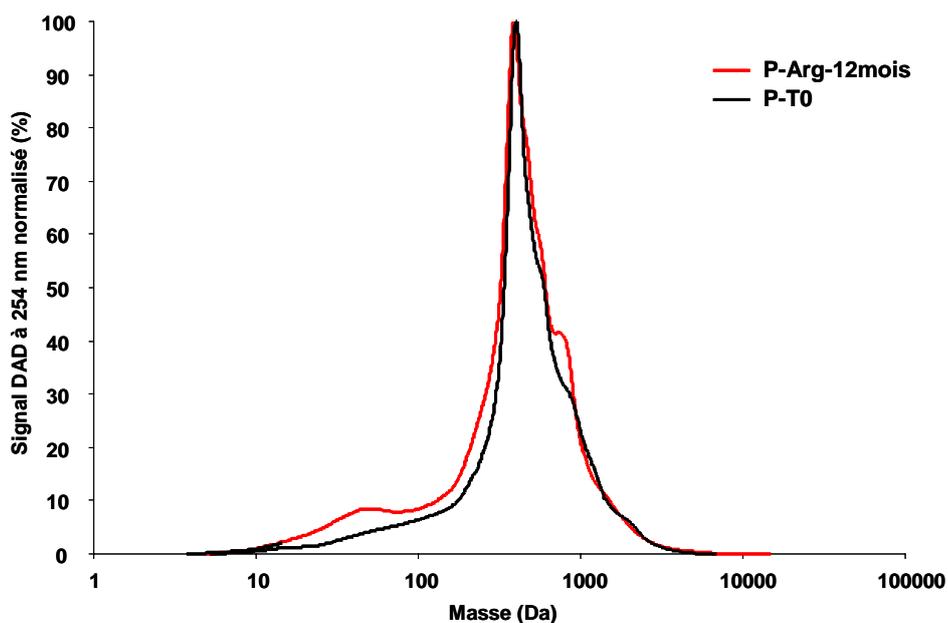


Figure 4-8 : Distribution des masses de l'extrait total des échantillons P-T0 et P-Arg-12mois obtenu par HPLC-SEC (exclusion stérique).

#### 4.1.1.3.2. Discussion

La quantité de CO<sub>2</sub> générée après un séjour de un an à 80°C sous argon est très faible (~3,5 ‰ du COT initial). De plus, ce CO<sub>2</sub> peut être en partie hérité de l'altération des carbonates même si la dissolution des carbonates nécessite de l'eau et que cette expérience s'est déroulée à sec (lyophilisation des échantillons avant expérience). Ainsi, que le CO<sub>2</sub> soit

intégralement ou non hérité de l'altération de la fraction organique, sa faible production révèle que l'altération de la MO conduisant à une minéralisation est très limitée.

L'ensemble des paramètres géochimiques des échantillons P-T0 et P-Arg-12 mois sont, relativement, semblables. La nature et les distributions moléculaires des échantillons ainsi que le rapport des Hopanes sur les Hopènes sont ainsi très voisins. Seuls quelques paramètres issus de la pyrolyse Rock-Eval présentent une légère différence après un séjour d'un an à 80°C sous argon. Ainsi, IO augmente de 9% (de 87 à 106 mg CO<sub>2</sub>/g COT) par rapport à P-T0 et IH diminue de 2% (de 87 à 83 mg HC/g COT). Cependant, ces modifications sont mineures, si on les compare à l'intensité des modifications observée pour des échantillons soumis à l'oxydation en étuve (cf. partie 4.1.2).

**Ainsi, une température de 80°C n'influence pas les paramètres géochimiques de la matière organique des Argiles de Boom, au moins sur une durée d'un an. Cette température a, donc, été utilisée pour réaliser la série expérimentale d'oxydation.**

**4.1.2. *In-situ* and experimental investigation of the alteration of Boom Clay (Oligocene) at the air- geological barrier interface within the Mol underground facility (Belgium): consequences on kerogen and bitumen compositions.**

Cette partie présentée sous la forme d'un article scientifique a, pour objectif, de comparer les paramètres géochimiques de deux séries d'altération (naturelle, prélevée *in situ* dans les galeries, et artificielle, provenant d'une oxydation expérimentale réalisée à 80°C en étuve ventilée). Cet article est en cours d'évaluation dans le journal *Applied Geochemistry*.

***In-situ* and experimental investigation of the alteration of Boom Clay (Oligocene) at the air- geological barrier interface within the Mol underground facility (Belgium): consequences on kerogen and bitumen compositions.**

Blanchart P.<sup>1</sup>, Faure P.<sup>1</sup>, Bruggeman C.<sup>2</sup>, De Craen M.<sup>2</sup>, Michels R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR CNRS 7566 G2R, Nancy-Université, CNRS, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

<sup>2</sup>Expert Group Waste & Disposal, SCK-CEN, Boeretang 200, B-2400 Mol, Belgium.

**Abstract:**

The Boom Clay formation (Oligocene) is studied as a reference host rock for methodological studies on deep geological disposal of radioactive waste. During excavation of galleries within the Clay formation (HADES underground research facility, Mol, Belgium), the physico-chemical conditions are significantly modified as an air-clay interface is created. In order to study the long-term impact of the air-clay contact onto the organic matter contained in the Boom Clay, two types of samples were studied 1) references series of clay samples having been in contact with the atmosphere of the HADES gallery for increasing times up to several years 2) unaltered clay samples submitted to artificial oxidation in a ventilated oven at 80°C. The evolution of geochemical data of the two series was compared using Rock-Eval pyrolysis, GC-MS and size exclusion chromatography analysis.

The organic matter of the unaltered clays sampled in the HADES galleries corresponds to a mixed contribution dominated by type III kerogen (terrestrial) with some contribution of type II (marine) and is thermally immature. The evolutions of geochemical parameters

during air alteration for the two series are very close. They show progressive oxidation of kerogen accompanied by the release of bitumen enriched in low molecular weight constituents. Molecular analysis evidences the presence of a complex mixture of aliphatic and aromatic oxygen bearing compounds, inherited from the degradation of kerogen as well as from the clay catalyzed oxidation of the bitumen. These results show that 1) air oxidation is a major process in the in situ alteration of the organic matter of Boom Clay within the HADES galleries 2) laboratory oxidation experiments at 80°C yield similar results as in situ air alteration of Boom Clay 3) artificial air oxidation may be used to assess the long term exposure of the organic matter to air.

**Keywords:** Boom Clay; geological barrier; Mol; oxidation; organic matter; kerogen; experimentation.

**Highlights:**

- >Comparison of in situ and experimental air oxidation consequences on organic matter
- >The major alteration process of organic matter in the gallery is air oxidation
- >Artificial air oxidation at 80°C in a ventilated oven simulate the natural oxidation
- >These experiments can be used to assess the long term evolution of the organic matter

**4.1.2.1. Introduction**

The Boom Clay formation (Lower-Oligocene) is studied as a reference host rock for methodological studies on the geological disposal of high level and long lived radioactive waste in Belgium. The HADES underground research facility (Mol, Belgium) was built (~200 m in depth) in order to evaluate the possibility of a geological disposal at depth. Excavations within the geological barrier induce perturbations of in situ conditions which may lead to modifications of the clay composition and properties. Boom Clay may contain up to 5% of organic matter which must be taken into consideration together with the minerals in the assessment of the clay properties. Especially the role of organic matter must be evaluated in the stability of the clay barrier as well as in the radionuclide retention capabilities

Sedimentary organic matter is known to be sensitive to alteration processes. Especially air oxidation may be significant as excavation leads to direct contact between the reducing host rock and the oxidizing atmosphere of the galleries. It is thus necessary to understand how air oxidation may affect the composition of the organic matter (De Craen *et al.*, 2004a; De Craen *et al.*, 2008).

The effect of air oxidation on organic matter may be inferred from weathered clay sediments collected on outcrops (Leythaeuser, 1973; Nicaise, 1977; Clayton et Swetland, 1978; Ingram et Rimstidt, 1984; Fredericks et Moxon, 1986; Petsch *et al.*, 2000; Petsch *et al.*, 2001; Copard *et al.*, 2004; Fischer et Gaupp, 2005). Yet, it is difficult to constrain the different stages of the oxidation process and to follow organic matter transformation when data are solely based on natural sample sets since many parameters are uncontrolled and reaction products dispersed or lost.

Experimental investigation of air oxidation is another way to address the issue (Anderson et Johns, 1986; Saxby *et al.*, 1986; Kalema et Gavalas, 1987; Saxby *et al.*, 1987; Saxby et Stephenson, 1987; Calemma *et al.*, 1988; Banerjee *et al.*, 1989; Faure *et al.*, 1999). As time is often a major limit, experiments are conducted at higher temperatures than those operating in natural conditions. It is thus necessary to demonstrate that the experimental reaction products obtained are similar if not identical to those encountered in the natural sample set. Such demonstration was for instance published by Elie *et al.* (2000) for Callovo-Oxfordian argillite. These authors show that artificial air oxidation leads to the same reaction products as those encountered in samples exposed to air at ambient over several years.

In the present work, a first sample set of Boom Clay exposed for various durations to air in the in situ conditions of the underground laboratory of Mol is studied in detail. In parallel, artificial oxidation at 80°C was carried out on a second sample set, consisting of aliquots of a non altered-block of Boom Clay collected during the excavation of PRACLAY (Preliminary demonstration test for CLAY disposal of highly radioactive waste) gallery. Evolutions of geochemical parameters as a function of oxidation are compared between the in situ and the artificially oxidized sample sets. The objectives are to obtain a comprehensive geochemical investigation on kerogen as well as on organic extracts allowing identification of the major oxidation processes relevant to the underground laboratory conditions. This comparison will allow further investigations relevant for the impact of excavation on the properties of the geological barrier

#### **4.1.2.2. *Experimental***

##### **4.1.2.2.1. Sample collection**

The Boom Clay consists of about 30-60% of clay minerals (kaolinite, smectite, mixed-layer illite-smectite, illite and chlorites) and the other constituents are quartz, carbonates, pyrite and organic carbon (Wouters et Vandenberghe, 1994; Volckaert *et al.*, 1997; De Craen *et al.*, 2000; Van Keer et De Craen, 2001; Zeelmaekers *et al.*, 2010). In October 2007, fresh samples of Boom Clay were collected during the excavation of the PRACLAY gallery. These

blocks were stored in sealed aluminium bags under nitrogen immediately after collection in order to avoid any further alteration.

In the nearby URL and Test Drift (TD) parts of the HADES laboratory, excavated respectively in 1983 and 1987, observation holes present in the concrete sealing of the galleries allows Boom Clay to be permanently and progressively extruded out of the clay formation. This is due to the high plasticity of the Boom Clay and is naturally driven by the high pressure gradient between the Clay formation and the gallery. The length of the core collected in the URL gallery was of about 1 meter<sup>1</sup> and the length of the core collected in the TD gallery was of about 0.5 meter<sup>2</sup>. As the cores were gradually extruded from the Clay formation, they were progressively exposed to air (Figure 4-9). The oxidation state of the clay therefore increases from the wall towards the tip of the core. It is estimated that the tip of the core was exposed to air for about 2 years in the case URL gallery and 1 year for TD gallery. For URL gallery, six samples were selected along the core (Gal-1a, the unaltered sample, to Gal-6a) and for TD gallery, five samples were selected along the core (Gal-1b, the unaltered sample, to Gal-5b). They represent the reference series for natural air oxidation conditions. These samples were freeze dried and crushed to a size of 250µm before further treatment. In this study, the samples of TD and URL series were analysed by Rock Eval but only the URL series was studied for the molecular analysis.

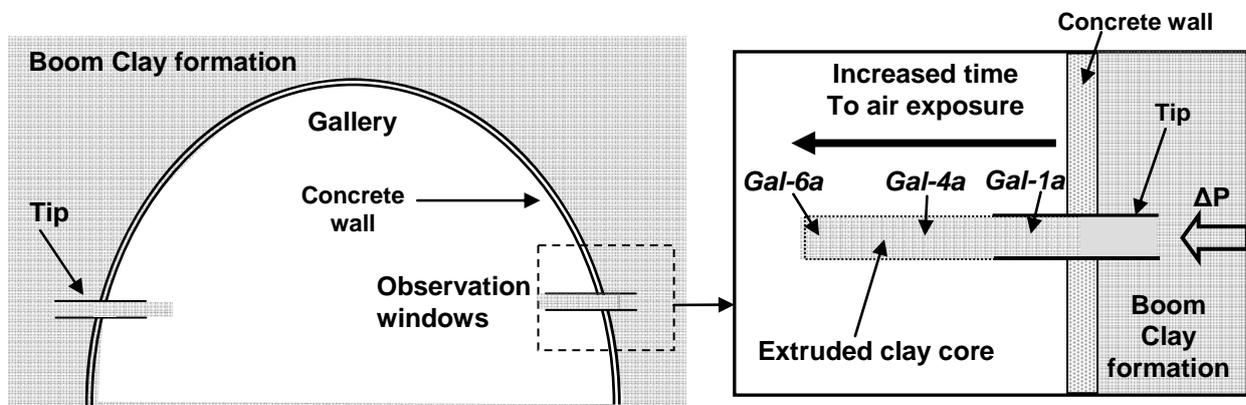


Figure 4-9 : Scheme of the extrusion of clay cores through observation windows in the HADES galleries at the mol underground facility (Belgium). Example for the URL natural series: numbers refer to the relative position (and thus air exposure times) of samples along an extruded core. Maximum air exposure time for the core studied is approximately of 2 years.

<sup>1</sup> La série URL correspond aux échantillons décrits dans le § 3.3.2. , les échantillons ont été renommés Gal-1a à Gal-6a uniquement pour cet article.

<sup>2</sup> La zone d'échantillonnage de la série TD est plus précisément décrite en Annexe 5

#### **4.1.2.2.2. Artificial oxidation procedure**

Unaltered Boom Clay collected from the PRACLAY gallery was freeze dried and powdered to a size of 250µm (sample P-T0). 100g aliquots were spread on glass plates in order to maximize the sample surface in contact with air and placed into a ventilated oven at 80°C for 1, 3, 6, and 9 months (samples P-1month, P-3months, P-6months and P-9months). The artificial oxidation was carried out in dry condition and avoids pyrite alteration.

#### **4.1.2.2.3. Rock Eval analysis**

Analyses were carried out with a Rock Eval 6 analyser (Vinci Technologies). The basic operating principles are described elsewhere (Espitalié *et al.*, 1985a; Espitalié *et al.*, 1985b). The geochemical parameters obtained are Total Organic Carbon content (TOC, in weight % of rock), Tmax (°C), Hydrogen Index (HI in mg hydrocarbons/g of Total Organic Carbon), and Oxygen Index (OI in mg CO<sub>2</sub>/g of Total Organic Carbon).

#### **4.1.2.2.4. Bitumen extraction by soxhlet**

The samples from the artificial oxidation series and those selected from URL gallery core (natural series) were extracted during 48h by soxhlet reflux using chloroform. The obtained bitumen extract was concentrated using a Turbovap Zymark (T=35°C; Pressure of nitrogen =7psi) and then transferred to a pre-weighted vial. The residual solvent was eliminated by nitrogen flow. Because of the very low amount of bitumen (less 0.4 per gram of rock), no further fractionation was carried out.

#### **4.1.2.2.5. Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS)**

Bitumen was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (Agilent 6890N GC coupled to an Agilent 5973 mass spectrometer), using a split-splitless injector, a 60m DB-5MS, 0.25mm i.d., 0.1mm film fused silica column. The temperature program was 60-130°C at 15°C/min, then 130-315°C at 3°C/min followed by an isothermal stage at 315°C for 15min (constant helium flow of 1.4ml/min). Because of the presence of polar compounds in the total organic extracts, silylation using BSTFA +TMCS (99/1) was carried out in order to improve the chromatographic resolution. A small aliquot of sample was dissolved with the derivative solution at 8 mg/ml concentration and was treated for 15 min at 60°C. One microliter of solution was then directly injected into the gas chromatograph.

Integration of mass chromatograms with relevant “m/z” values was performed and the peak areas obtained were multiplied by a correction factor, which takes into account differences in mass spectrometric responses for various compounds. The correction factor was calculated from the mass spectrum of each authentic compound by taking the inverse of the percentage of the total ion current of the relevant “m/z” value and multiplying it by 100 (Hartgers *et al.*, 1992; Faure *et al.*, 2004). As a result of this mathematical procedure, distribution patterns were obtained showing the relative concentrations of the different compounds.

#### **4.1.2.2.6. Gel Permeation Chromatography-High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC)**

Aliquots of bitumen were dissolved in tetrahydrofuran at 1mg/ml concentration and 50  $\mu$ l were injected into an Agilent HPLC (HP-1100 series). The analytical column used was a PLgel Mixed-E, 300 x 7.5 mm id, 3 $\mu$ m particle size. A DAD (diode array detection– HP 1100 series) detector was used at a wavelength of 254nm. All GPC-HPLC analyses were carried out under isocratic conditions and flow rate was fixed at 1.0 ml/min, pressure at 67 bars and temperature at 25°C. Relative molecular size was calibrated using a polystyrene standard solution (Mp 162-40 000 Da) as reference.

### **4.1.2.3. Results**

#### **4.1.2.3.1. Rock Eval analysis**

TOC from the natural as well as the artificial oxidation series is low (Tableau 4-5), ranging from 1.78% to 0.88% and decreasing with oxidation for the two series. Tmax remains between 415°C and 421°C for the artificial series whereas the values for the natural series decreases from 429°C to 394°C for URL series and from 422°C to 407°C for TD series with increasing air exposure time. Whatever the series, the OI increases with alteration duration (from 87 to 155 mg CO<sub>2</sub>/g of TOC for the artificial series, from 71 to 182 mg CO<sub>2</sub>/g of TOC for the URL natural series and from 62 to 121 mg CO<sub>2</sub>/g of TOC for the TD natural series). On the contrary, HI decreases from 87 to 57 mg of HC/g of TOC for the artificial series, from 150 to 37 mg of HC/g of TOC for the URL natural series and from 73 to 42 mg of HC/g of TOC for the TD natural series. Such evolution suggests that the oxygen content of kerogen increases while carbon and hydrogen are lost with increasing oxidation time.

	<b>TOC</b> [%]	<b>HI</b> [mgHC/gTOC]	<b>OI</b> [mgCO <sub>2</sub> /gTOC]	<b>Tmax</b> [°C]
<b>Artificial series of Boom Clay</b>				
<b>P-T0</b>	0.99	87	87	419
<b>P-1 month</b>	0.92	65	127	415
<b>P-3 months</b>	0.94	62	134	417
<b>P-6 months</b>	0.92	58	148	419
<b>P-9 months</b>	0.88	57	155	421
<b>Natural series of Boom Clay</b>				
<b>URL Gallery</b>				
<b>Gal-1a</b>	1.72	150	71	426
<b>Gal-2a</b>	1.78	150	69	429
<b>Gal-3a</b>	1.38	90	157	420
<b>Gal-4a</b>	1.32	87	136	422
<b>Gal-5a</b>	1.07	37	208	405
<b>Gal-6a</b>	1.03	48	182	394
<b>Test Drift Gallery</b>				
<b>Gal-1b</b>	1.24	73	62	422
<b>Gal-2b</b>	1.22	62	81	409
<b>Gal-3b</b>	1.22	49	97	410
<b>Gal-4b</b>	1.17	44	121	407
<b>Gal-5b</b>	1.20	42	120	410

Tableau 4-5 : Rock-Eval parameters obtained for artificial oxidation experiments and natural air exposed samples of Boom Clay. TOC = Total organic carbon, HI= Hydrogen Index, OI = Oxygen Index.

In order to allow a comparison of the OI and HI evolution for both artificial and natural oxidation series (Figure 4-10), values were normalized to the unaltered member of each series (P-T0 for artificial series and Gal-1a and Gal-1b for natural series). Indeed, the unaltered samples were collected from three different locations (Praclay, URL and TD galleries), and do not have similar initial absolute values for these Rock-Eval parameters especially for HI values. Figure 4-10 shows that all samples plot along the same evolutionary trend. However, samples from the URL natural series (Gal-3a to Gal-6a) exhibit a higher OI/OI<sub>0</sub> and a lower HI/HI<sub>0</sub> values than the artificial and TD natural series.

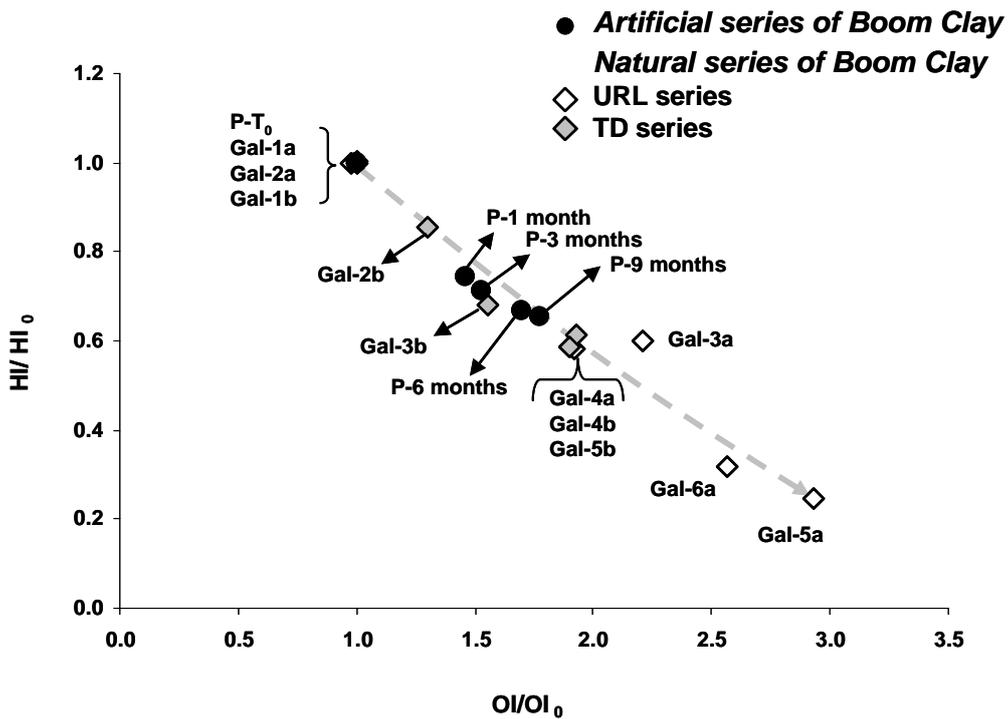


Figure 4-10 : Evolution of Rock-Eval Hydrogen Index versus Oxygen Index for natural and artificial series of Boom Clay. As unaltered samples of both series are not exactly the same due to lithology variations within the HADES gallery, values were normalized to those of the initial unaltered samples ( $HI_0$ ,  $OI_0$ ) of each series respectively.

#### 4.1.2.3.2. Gel Permeation Chromatography – High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC)

The very low bitumen extract contents (less than 0.4 mg/gram of dry sample) and the presence of sulfate induced too large analytical errors to study the quantitative evolution of the bitumen extracts. Gel Permeation Chromatography was performed on the bitumen extracts in order to follow the changes in molecular weight distribution (Figure 4-11).

The molecular distributions of the unaltered samples P-T0 (Praclay gallery) and Gal-1a (URL gallery) are similar and range from 10 to 6000 Da with a mode at 500 Da. The mode evolves from 500 Da to 350 Da for the artificial oxidation series and from 500 Da to 340 Da for the natural series. With oxidation, the global mass distribution of the bitumen extracts shifts to lower molecular weight compounds.

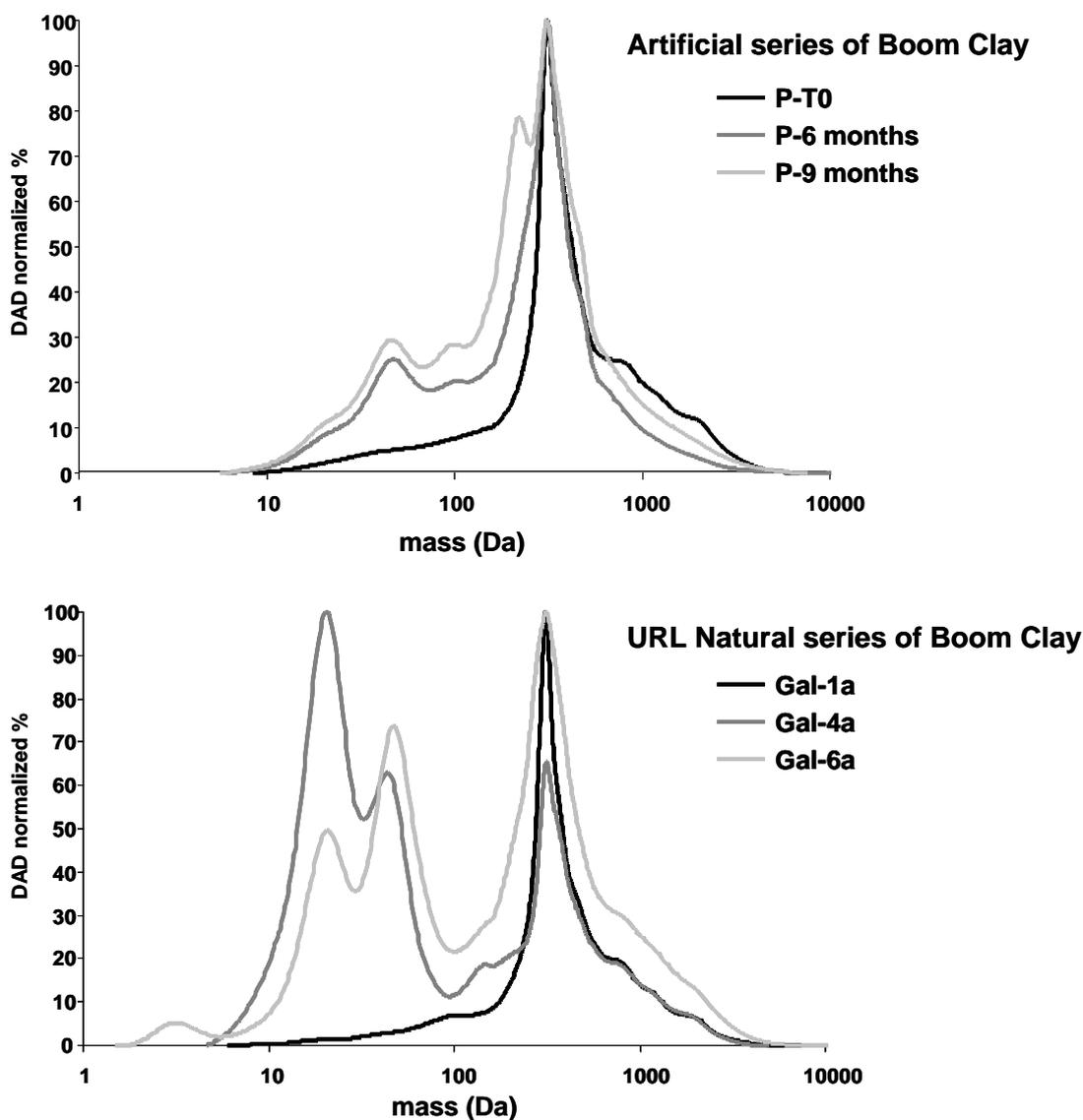


Figure 4-11 : Mass distribution profiles of artificial (P-T0, P-6 months and P-9 months) and URL natural oxidation series (Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a) of Boom Clay obtained by Gel Permeation Chromatography.

#### 4.1.2.3.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

The bitumen extracts were analyzed by GC-MS in order to follow the evolution of the major molecular families (Figure 4-12-a and Figure 4-13-a). Major compounds correspond to alkanolic acids, 1-alkanols, *n*-alkanes, in a lesser abundance 2-alkanols, 2-alkanones, alkanals (Figure 4-12-b and Figure 4-13-b).

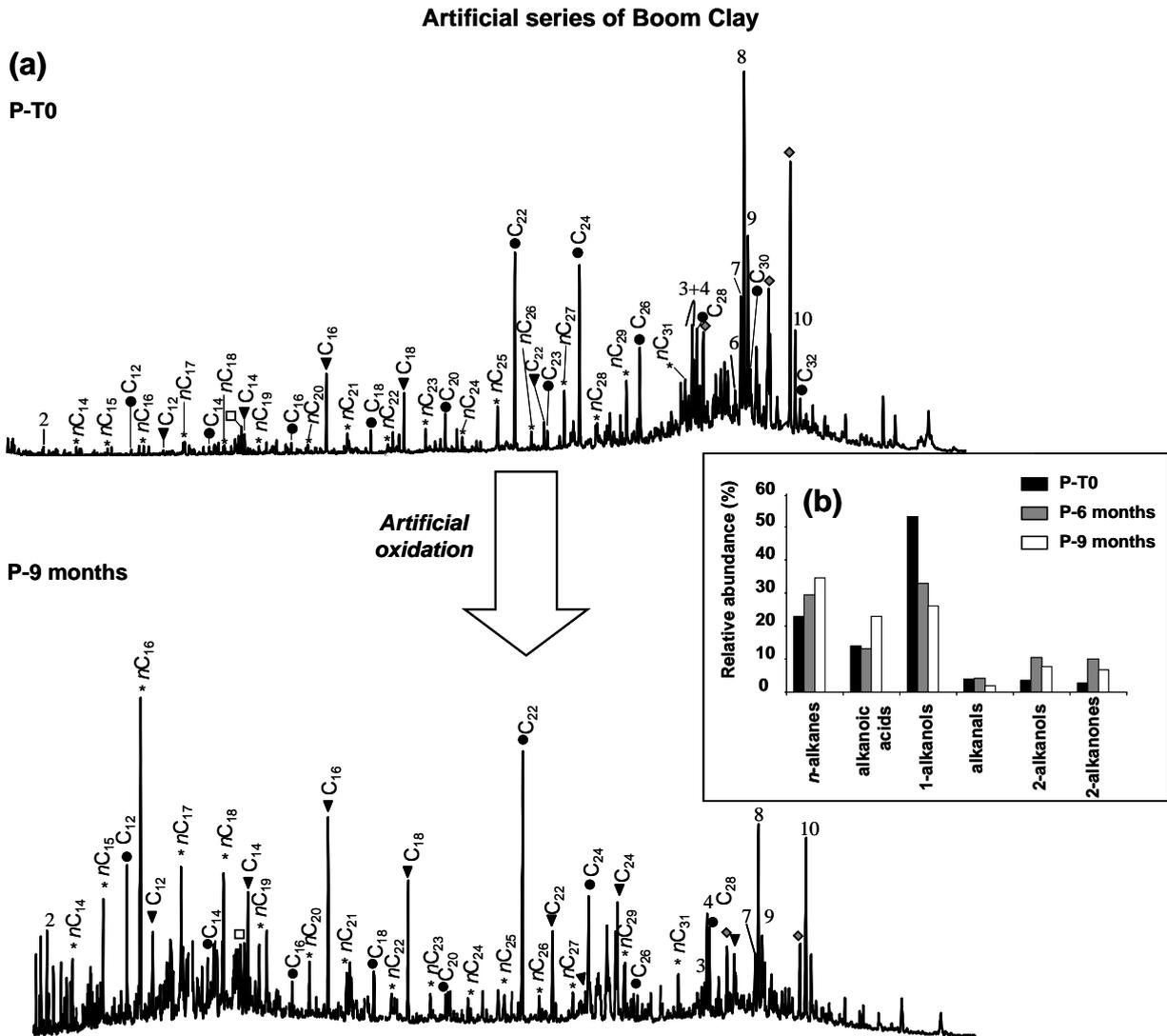


Figure 4-12: a- Chromatograms of unaltered sample P-T0 and P-9 months artificially oxidized for months at 80°C (\*nC<sub>i</sub> = n-alkanes, ●C<sub>i</sub> = 1-alkanols, ▼C<sub>i</sub> = alkanolic acids with i = carbon number, □ = 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone), b- Relative abundance of n-alkanes ( $\Sigma$  (nC<sub>12</sub>-nC<sub>37</sub>)), alkanolic acids ( $\Sigma$  (C<sub>8</sub>-C<sub>34</sub>)), 1-alkanols ( $\Sigma$  (C<sub>8</sub>-C<sub>34</sub>)), alkanals ( $\Sigma$  (C<sub>8</sub>-C<sub>34</sub>)), 2-alkanols ( $\Sigma$  (C<sub>8</sub>-C<sub>34</sub>)), 2-alkanones ( $\Sigma$  (C<sub>8</sub>-C<sub>34</sub>)) for P-T0, P-6 months and P-9 months oxidation times. Identification of peaks is given in Table 4-6.

Major biomarker types are (Figure 4-12-a and Figure 4-13-a):

- Maleimides (1(H)-pyrrole-2,5-diones), represented by methyl maleimide and methyl-ethyl maleimide;
- C<sub>27</sub> sterols (cholesterol, 5 $\alpha$ -cholestanol, dinosterol, ergosta-7,22-dien-3 $\beta$ -ol), C<sub>29</sub> sterols ( $\beta$ -sitosterol and stigmastanol) and C<sub>30</sub> sterols (dinosterol). Moreover, the stanols (cholestanol and stigmastanol) are predominant over the sterols (cholesterol and  $\beta$ -sitosterol);

- Triterpenoids (olean-12-ene and friedelan-3-one) and pentacyclic triterpanes (hopenes and hopanes);
- Some polyaromatic compounds were observed in oxidized samples: benzophenone, fluorenone, phenanthrene, fluoranthene and pyrene.

The distribution of each molecular family was studied for all samples (Figure 4-14 and Figure 4-15).

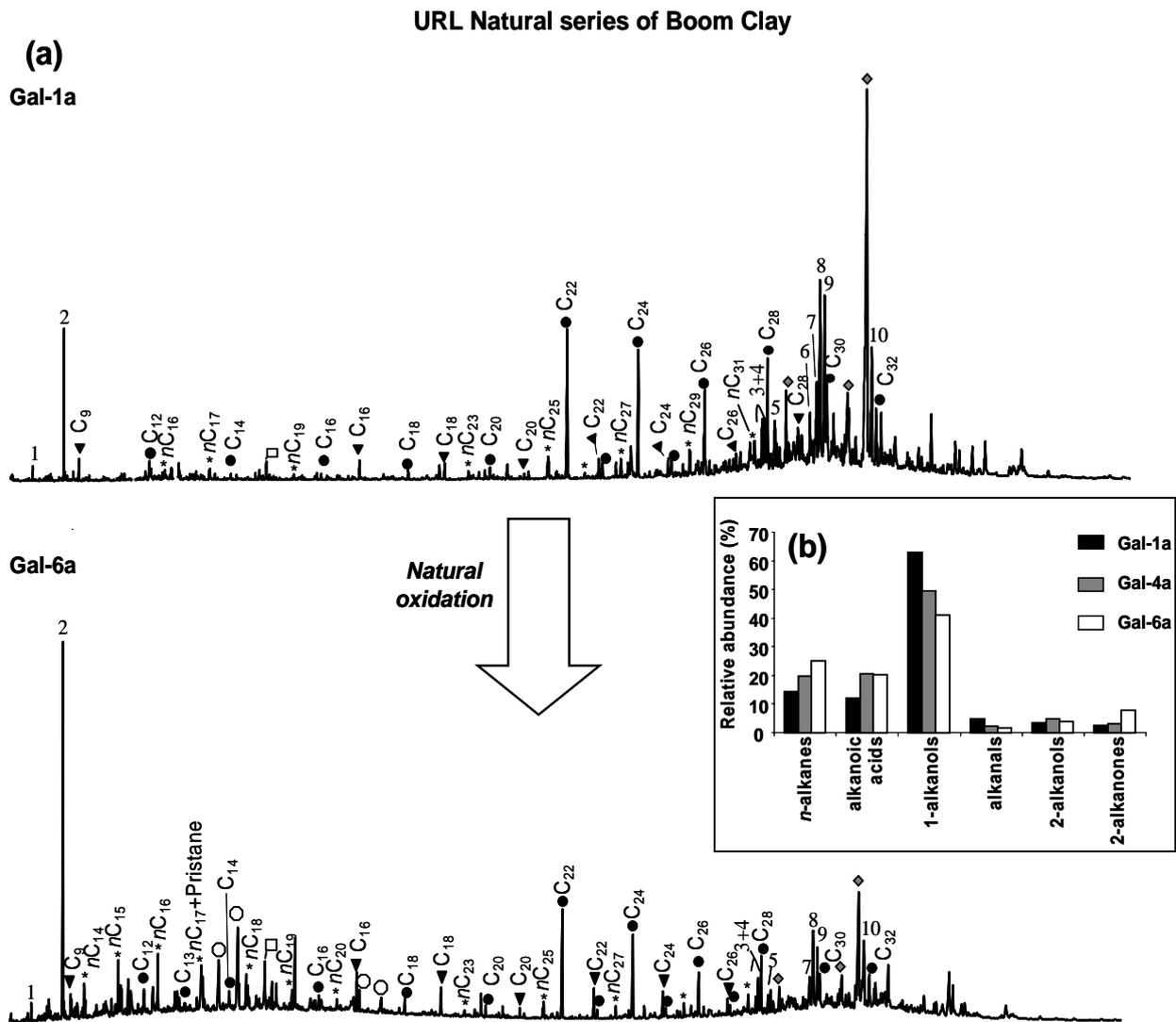


Figure 4-13 : a- Chromatograms of samples Gal-1a and Gal-6a (\*nCi = n-alkanes, ●Ci = 1-alkanols, ▼ Ci = alkanolic acids with i = carbon number, □ = 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone, = PHAs), b- Relative abundance of n-alkanes ( $\Sigma (nC_{12}-nC_{37})$ ), alkanolic acids ( $\Sigma (C_8-C_{34})$ ), 1-alkanols ( $\Sigma (C_8-C_{34})$ ), alkanals ( $\Sigma (C_8-C_{34})$ ), 2-alkanols ( $\Sigma (C_8-C_{34})$ ), 2-alkanones ( $\Sigma (C_8-C_{34})$ ) for Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a. Identification of peaks is given in Table 4-6.

Peak	Biomarker
1	Methyl maleimide
2	Methyl-Ethyl, maleimide
3	Cholesterol
4	Cholestanol
5	Ergosta-7,22-dien-3- $\beta$ -ol
6	Olean-12-ene
7	$\beta$ -sitosterol
8	Stigmastanol
9	Dinosterol
10	Friedelan-3-one
◆	Unknown biomarker

Tableau 4-6: Identification of the different compounds in Figure 4-12 and Figure 4-13.

### Initial samples

The distribution of *n*-alkanes of P-T0 and Gal-1a samples is characterised by an odd over even carbon number predominance centred on  $nC_{29}$  with a Carbon Preference Index (CPI) (Bray and Evans, 1961) of 3.49 and 3.96 respectively. The distribution of 2-alkanols and 2-alkanones is also characterised by an odd carbon number predominance, but the distribution of 2-alkanones is bimodal (centred on  $C_{17}$  and  $C_{31}$ ) whereas the distribution of 2-alkanols is monomodal and centred on  $C_{31}$  (Figure 4-14). The distributions of alkanolic acids and 1-alkanols for P-T0 and Gal-1a samples are characterised by an even over odd carbon number predominance (Figure 4-15). The relative abundance of long aliphatic chain molecules ( $>C_{20}$ ) is important for these two families (maximum for  $C_{22}$ ), and hexadecanoic and octadecanoic acid predominate low molecular weight alkanolic acids particularly in the case of P-T0 sample. The distribution of alkanals is bimodal, centred at  $C_{15}$  and  $C_{23}$  without carbon number predominance. The similar molecular distribution between P-T0 and Gal-1a suggests that Gal-1a is not affected by oxidation and validate the use of this sample as reference for the URL natural series.

### Natural and artificial alteration series

With oxidation, the proportions of the different molecular families are modified (Figure 4-12b and Figure 4-13b): relative abundance of *n*-alkanes, alkanolic acids, 2-alkanols and 2-alkanones increase whereas proportions of 1-alkanols and alkanals decrease. During the alteration, the molecular distribution of *n*-alkanes, 2-alkanols and 2-alkanones are affected with an increase in the relative proportion of lower molecular weight, centred at  $nC_{16}$  (Figure 4-14). With oxidation, the 1-alkanols, alkanolic acids and alkanals distributions are weakly affected in the case of the natural series with only a slight decrease in the high molecular weight compounds proportion (Figure 4-15). For the artificial series, alkanolic acids and alkanals distributions show the same trend. On the contrary, 1-alkanols distributions seem to be more affected with the decrease in heavy molecular weight proportion and the apparition of the 1-dodecanol in high proportion.

In order to follow the evolution of the molecular weight distributions, the ratio of the relative abundance of the low molecular weight compounds (up to 20 carbon atoms) to heavy molecular weight compounds (from 21 carbon atoms) (LMW/HMW) was measured (Figure 4-16) for each family. The LMW/HMW ratio increases during the natural as well as artificial alteration for all molecular families studied with however a more intense increase in the ratio values in the case of the natural series. This suggests enrichment in lower molecular weight molecules during alteration coherent with GPC analyses (§ 4.1.2.3.2.). The evolution of the pentacyclic triterpanes distribution is also noticeable: the initial distribution, similar for Gal-1a and P-T0, is characterized by the predominance of hopenes and hopanes in biological configuration ( $\beta\beta$ ) (not shown). With increasing oxidation, the proportion of hopenes decreases (Figure 4-16) compared to hopanes. Such evolution is consistent with results obtained by Elie *et al.* (2000) and Faure *et al.* (1999).

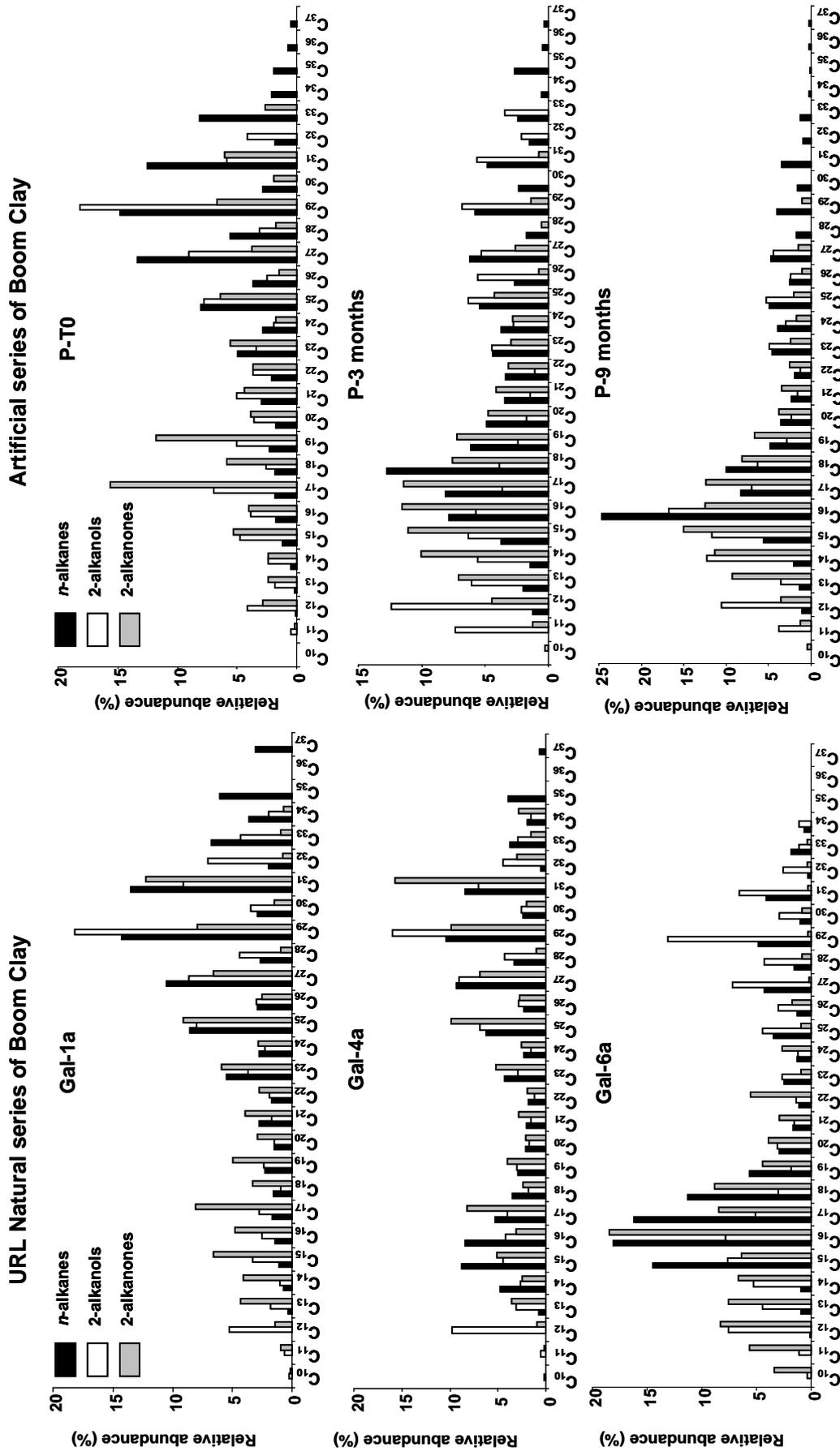


Figure 4-14: Evolution of relative abundances of *n*-alkanes (*m/z* 57), 2-alkanols (*m/z* 58) and alkanones (*m/z* 59) for the artificial oxidation series at 80°C (samples P-T0, P-3 months, P-9 months) and the URL natural air exposed series of Boom Clay (samples Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a).

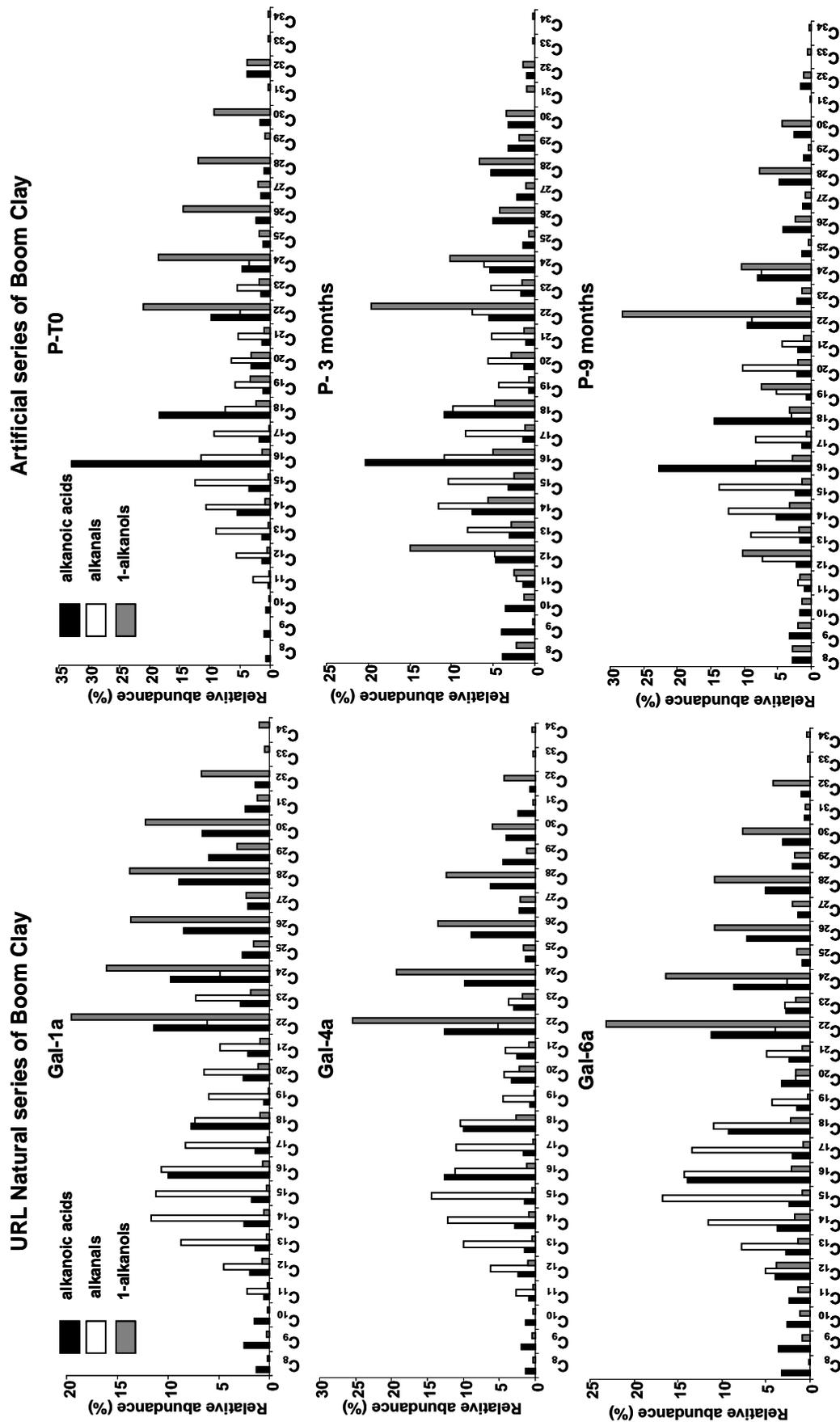


Figure 4-15: Evolution of relative abundance of alkanoids (m/z 117), alkanals (m/z 82) and 1-alkanols (m/z 75) for the artificial oxidation series of Boom Clay at 80°C (samples P-T0, P-3 months, P-9 months) and the URL natural air exposed series of Boom Clay (samples Gal-1a, Gal-4a and Gal-6a)

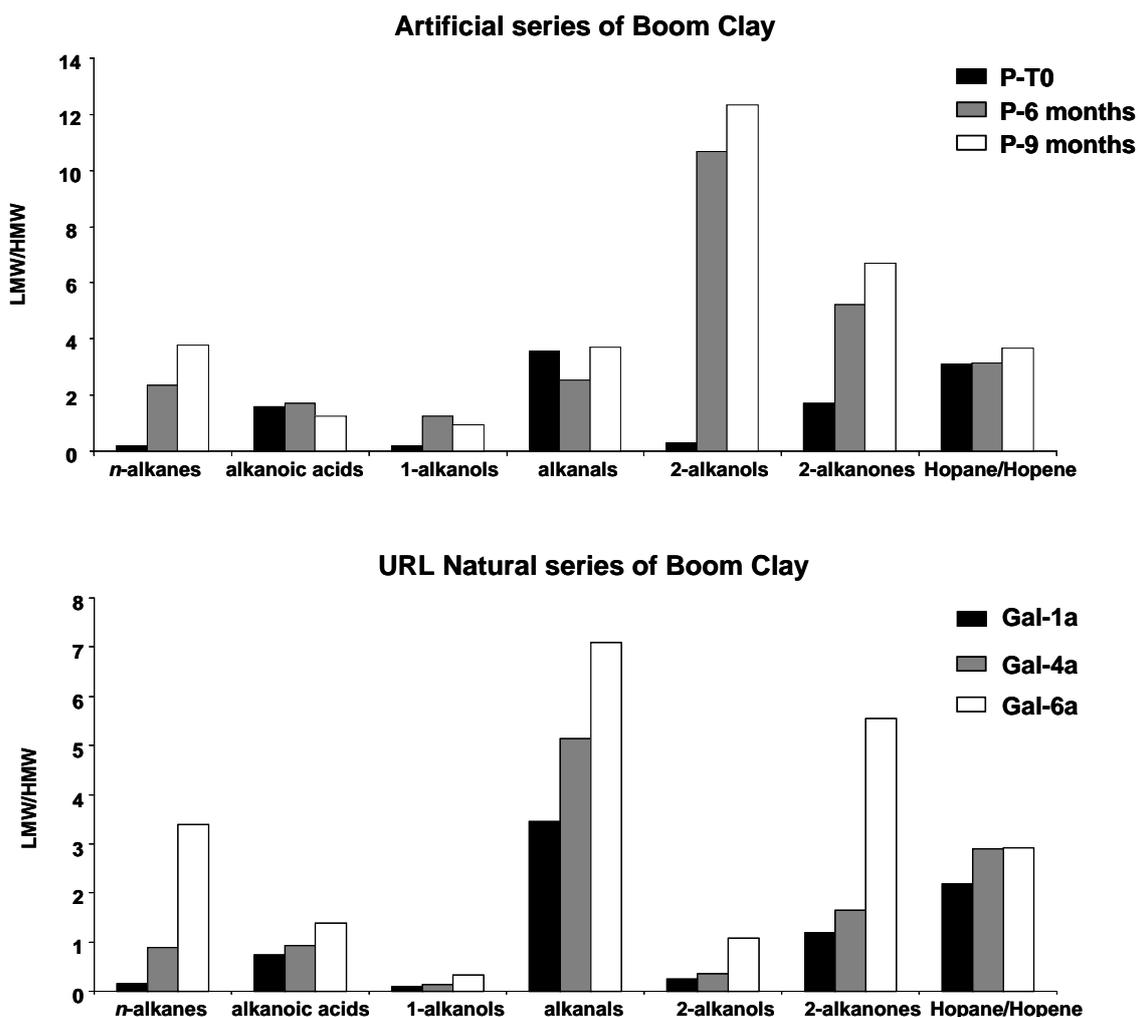


Figure 4-16 : Evolution of low molecular weight vs high molecular weight (LMW/HMW) for *n*-alkanes ( $\Sigma (nC_{12}-nC_{20}) / \Sigma (nC_{21}-nC_{37})$ ), alkanolic acids ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma (C_{21}-C_{32})$ ), 1-alkanols ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma (C_{21}-C_{34})$ ), alkanals ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma (C_{21}-C_{24})$ ), 2-alkanones ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma (C_{21}-C_{34})$ ), 2-alkanols ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma (C_{21}-C_{34})$ ) and the ratio of  $\Sigma(\text{hopane}/\text{hopene})$  for artificial oxidation (80°C) and in situ air exposed samples of Boom Clay (URL natural series).

#### 4.1.2.4. Discussion

##### 4.1.2.4.1. Origin, preservation and thermal maturity of the unaltered samples (P-T0, Gal-1a and Gal-1b)

Rock-Eval Hydrogen Index and Oxygen Index values from the unaltered Boom Clay samples (P-T0, Gal-1a and Gal-1b) are characteristic of a dominated type III organic matter (Espitalié *et al.*, 1985b). Moreover, the odd over even carbon number predominance for *n*-alkanes, 2-alkanols and 2-alkanones distribution in the range  $C_{25} - C_{33}$  (P-T0 and Gal-1a, Figure 4-14), the even over odd predominance for alkanolic acids and 1-alkanols in the range  $C_{22} - C_{32}$  (P-T0 and Gal-1a, Figure 4-15) and the occurrence of specific biomarkers ( $\beta$ -

sitosterol, stigmastanol, olean-12-ene and friedelan-3-one) are consistent with a major higher plants contribution to the Boom Clay organic matter (Bray et Evans, 1961; Eglinton, 1973; Volkman, 1986; Rielley *et al.*, 1991; Abe *et al.*, 1993; Killips et Killips, 2005; Volkman, 2005). However, the relative distributions of C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub>, C<sub>30</sub> sterols and especially the presence of C<sub>27</sub> sterols and dinosterol suggest an additional contribution of marine organic matter (Huang et Meinschein, 1979; Volkman, 1986; Volkman *et al.*, 1993). Also, the maleimides detected in the samples are inherited from degradation of chlorophyll, especially chlorophyll-*a* for methyl-ethyl maleimide (Grice *et al.*, 1996). These compounds are generally attributed to bacteria or phytoplankton.

The geochemical data thus indicate that the organic matter contained in the unaltered Boom Clay samples is of mixed marine and dominated terrestrial origin. This is in agreement with different studies on the organic matter of Boom Clay (Griffault *et al.*, 1996; Laenen *et al.*, 1997; Deniau *et al.*, 2001; Van Geet, 2002; Van Geet *et al.*, 2003) which identified contributions of gymnosperm, angiosperm as well as marine biomass. Laenen (1997) demonstrated that the marine vs terrestrial contributions varied within the sedimentary column of the Boom Clay in relationship to depositional conditions. Especially TOC values ranging from 2 to 5% were measured on the facies dominated by Type II organic matter, while lower TOC values (<2%) were characteristic of the type III dominated facies (Wouters and Vandenberghe, 1994; Laenen, 1997; Van Keer and De Craen, 2001). The unaltered facies collected in the underground laboratory galleries of Mol (P-T0, Gal-1a and Gal-1b) have low organic carbon content (TOC<2%) and exhibit geochemical characteristics consistent with a dominant contribution of type III organic matter.

Thus, the unaltered samples were collected within the same sedimentological facies, at two locations not far apart in terms of vertical and lateral distances. However, slight geochemical variations could be noticed: for instance, Gal-1a has greater TOC and Hydrogen Index than P-T0 and Gal-1b (Tableau 4-5). This reveals an organic facies variability within the Boom Clay at the scale of the galleries.

P-T0, Gal-1a and Gal-1b exhibit a low T<sub>max</sub> value, 419°C, 426°C and 422°C respectively (Tableau 4-5). The molecular composition of the organic extracts are dominated by oxygenated compounds (P-T0 and Gal-1a, Figure 4-12-a and Figure 4-13-a), such as 1-alkanols, 2-alkanols, alkanolic acids and 2-alkanones. Moreover the pentacyclic triterpanes distribution is characterised by a high proportion of hopanes preferentially degraded during the first stage of thermal maturation (Seifert and Moldowan, 1981; Peters and Moldowan, 1993). All these geochemical data indicate that the organic matter contained in the unaltered Boom Clay samples is thermally immature (Tissot and Welte, 1978; Seifert et Moldowan, 1981; Peters et Moldowan, 1993).

#### **4.1.2.4.2. Comparison between *in-situ* and artificial oxidation of Boom Clay.**

##### Artificial series

Compared to natural alteration, the artificial oxidation allows following the evolution of geochemical parameters without any other additional perturbations (especially biodegradation). In this artificial series, TOC content and Rock-Eval HI decrease (Tableau 4-5) and a progressive increase in Rock-Eval OI is observed (Tableau 4-5) revealing oxygen enrichment in the organic matter. Molecular analyses indicate a decrease in the global molecular weight of the global organic extract (Figure 4-11) as well as of specific molecular families detected by GC-MS (Figure 4-14, Figure 4-15, Figure 4-16): *n*-alkanes, 2-alkanols and 2-alkanones. Moreover, the proportion of hopenes decreases (Figure 4-16) with the oxidation duration. All these geochemical parameters are consistent with results obtained in previously published artificial oxidation experiments on model compounds as well as fossil organic matter in claystones (Faure, 1999; Faure *et al.*, 1999; Elie *et al.*, 2000; Faure et Landais, 2000).

##### Natural series

The natural samples altered *in situ* in the HADES galleries show the same evolutions for these parameters (Rock-Eval HI and OI, TOC, molecular distributions and molecular weight). This suggests that the major reactions affecting the organic matter are similar in both systems despite different time-temperature conditions. Extent in the variation of some geochemical parameters (mainly Rock-Eval HI and TOC) may be different (Tableau 4-5, Figure 4-10 and Figure 4-11), yet evolution pathways are similar. For instance, Hydrogen Index and TOC for the unaltered sample collected *in situ* Gal-1a are higher than those of the sample used in the experiments (P-T0). This implies that the initial potential of labile constituents in the kerogen is higher, which permits a greater extent of evolution of geochemical parameters during oxidation. The difference in extent of reaction is mainly due to the initial characteristics of the organic matter which are not exactly identical (formation heterogeneity) rather than other alteration processes (for example aerobic biodegradation). Indeed, such supplementary alteration processes would have impact on all geochemical parameters and molecular distributions. Another difference between natural series and artificial series is behaviour of Tmax for URL and TD series (Tableau 4-5). Contrary to the coals which have the Tmax stabilized or increased with air oxidation or weathering (Lo and Cardott, 1995; Copard *et al.*, 2004), the natural series of Boom Clay show a decrease in Tmax

and was already observed by Elie *et al.* (2004). The main difference between natural and artificial series is the evolution of mineralogy and the formation of sulphates in natural series: pyrite oxidation may have favoured the formation of low energy oxygen bridging groups.

The previous section demonstrated that the geochemical characteristics and evolutions of the organic matter contained in Boom Clay were similar in the experimental as well as in the *in situ* oxidation conditions. We may thus infer that experiments reproduce the major alteration stages of the organic matter prevailing during air oxidation at natural temperature. As experimental conditions are fully controlled, we may assume that no important reaction products were lost, so that geochemical investigations may be more thorough-full than if solely based on samples collected *in situ*. It may thus be possible to use experimental oxidation as a means thus understand the major stages of oxidation in the natural system.

#### **4.1.2.4.3. Identification of the major oxidation stages of organic matter in Boom Clay**

In this paper, whatever the oxidation conditions (natural or artificial), evolution trends for kerogen, bitumen and hydrocarbons compositions were described. However, respective implications of each organic fraction needed to be elucidated in order to understand the major steps in the oxidation process and the respective status of each organic fraction (kerogen, bitumen, hydrocarbons). Blanchart *et al.* (2012), have compared the artificial oxidation of the organic matter in three different systems: 1) untreated Boom Clay (minerals+kerogen+bitumen) 2) solvent extracted Boom Clay (kerogen+minerals) 3) kerogen isolate. These experiments were performed to decipher the role of kerogen, bitumen and clay in the oxidation process. Several stages of oxidation could be identified: (i) the kerogen becomes more aromatic and oxygen enriched as oxidation proceeds; (ii) meanwhile the kerogen releases an aliphatic enriched bitumen containing specific oxygenated molecular families (alkanoic acid, 1-alkanol) inherited from the burial history of its biological precursors (derived from higher plants remains transported and sedimented in a marine environment); (iii) clay catalyzed oxidation of the bitumen (either present in the genuine Boom Clay or newly formed by oxidation) leads to the formation of new oxygenated molecular families (2-alkanones, alkanals) which are not present in unaltered samples.

The demonstration of newly formed bitumen upon kerogen oxidation as well as the involvement of clay catalysis during bitumen oxidation could only be revealed by the proper

set of experiments and could not have been inferred from the analysis of the in situ collected Boom Clay samples. This underlines the importance of the choice in experimental strategy as well as its validation by comparison to the naturally oxidized samples.

#### **4.1.2.5. Conclusions**

In order to understand the alteration of the organic matter of Boom Clay during air exposure within the underground HADES laboratory, samples exposed to air for increasing time was collected in situ and compared to clay experimentally oxidized in a ventilated oven at 80°C. The bulk organic geochemical parameters as well as molecular compositions of the two series are very similar in terms of evolutionary trends and compositions. Hydrogen Index and TOC decrease while the oxygen index increases, indicating hydrogen and carbon loss as well as oxygen uptake of the kerogen. New bitumen is released with an average molecular weight lower than the initial. The distribution of molecular families, such as *n*-alkanes, 2-alkanols and 2-alkanones, is shifted to lower molecular weights. The bitumen undergoes clay catalysed oxidation leading to the formation of new oxygenated compounds (2-alkanones, alkanals).

The results allow us to conclude that 1) air oxidation is a major process responsible for the alteration of the Boom Clay organic matter at the clay-atmosphere interface of the HADES galleries during exploitation phase, 2) artificial air oxidation of Boom Clay at 80°C yields similar organic geochemical results as samples air oxidized at much lower temperature within the atmosphere of the galleries, 3) as defined, the oxidation experiments can be used to evaluate the long term impact of air on the alteration of the organic matter in Boom Clay. This paper also validates the representativeness of previous work focusing on the specific role of kerogen during the oxidation and confirms the major role played by kerogen and clay minerals on the products generated during oxidation in natural systems (Saxby *et al.*, 1992; Faure *et al.*, 1999; Faure et Landais, 2000; Blanchart et al. 2012). This work may serve as reference to further investigations, like for instance the impact of air oxidation on the formation of water soluble organics.

#### **Acknowledgements:**

This work has been commissioned by SCK•CEN on behalf of ONDRAF/NIRAS in the frame of the Safety and Feasibility Case 1 (SFC1). SCK•CEN is acknowledged for providing Boom

### 4.1.3. Experimental investigation on the role of kerogen and clay minerals in the formation of bitumen during the oxidation of Boom clay

Cette partie est présentée sous la forme d'un article scientifique soumis à *Fuel*. Il présente et discute les résultats d'oxydations artificielles à 130°C réalisées sur le kérogène isolé de la formation de Boom, seul ou en présence de la fraction minérale (notamment les argiles). Cet article a été accepté en mars 2012.

#### Experimental investigation on the role of kerogen and clay minerals in the formation of bitumen during the oxidation of Boom Clay.

Blanchart P.<sup>1</sup>, Faure P.<sup>1</sup>, De Craen M.<sup>2</sup>, Bruggeman C.<sup>2</sup>, Michels R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR CNRS 7566 G2R, Nancy-Université, CNRS, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

<sup>2</sup>Expert Group Waste & Disposal, SCK-CEN, Boeretang 200, B-2400 Mol, Belgium.

#### **Abstract:**

Experiments were conducted on bulk Boom Clay and Boom Clay kerogen concentrate in order to study bitumen formation during air oxidation. Samples were collected in the HADES underground facility of Mol (Belgium) during excavation of the PRACLAY gallery. Rock-Eval and elemental analyses show that the organic matter is immature and primarily of type III. Air oxidation experiments were carried out during 62, 114 and 139 days at 130°C. These experimental conditions were used to simulate natural oxidation occurring during the excavation and operation of an underground disposal facility.

Molecular and spectroscopic characterizations show that during air oxidation, the kerogen is enriched in oxygenated aromatics while it releases an aliphatic rich bitumen. The clay minerals, in their turn, catalyze the air oxidation of the released bitumen constituents (e.g. *n*-alkanes). The consequence is that air oxidation of Boom Clay leads to the release of oxygen functionalized organic matter likely to be mobilized by water.

**Keywords:** kerogen, Mol, Boom Clay, oxidation, clay minerals

#### **Highlights:**

>Natural oxidation is simulated by artificial oxidation in oven at 130°C

- >Artificial oxidation are carried out on kerogen from Boom Clay
- >Effects of air oxidation are investigated on bulk clay and concentrate kerogen
- >Kerogen oxidation leads to oxygenated aromatics enrichment and aliphatic release
- >Clay minerals catalyze the oxidation of aliphatic hydrocarbons released by kerogen

#### 4.1.3.1. Introduction

The Boom Clay is an organic-rich marine sediment which is mainly composed of clay minerals (kaolinite, smectite, mixed-layer illite-smectite, illite and chlorites), quartz and feldspar, and minor amounts of carbonates and pyrite (Wouters et Vandenberghe, 1994; Volckaert *et al.*, 1997; De Craen *et al.*, 2000; Van Keer et De Craen, 2001; Zeelmaekers *et al.*, 2010). Its fine pore structure, low hydraulic conductivity and large retention capacity makes Boom Clay interesting to consider as a reference host rock for methodological studies on the geological disposal of high-level and long-lived radioactive waste in Belgium (ONDRAF/NIRAS, 2001). An underground laboratory facility (HADES URF) was therefore built at 225 m depth at the Mol site (Belgium) in order to conduct measurements and experiments in Boom Clay.

Gallery construction inevitably induces perturbations in the host rock, leading to modifications of the initial in situ hydro-mechanical and chemical conditions. Previous studies evidenced oxidation of pyrite in the Boom Clay and release of sulphates in the pore water (De Craen *et al.*, 2004a). Moreover, records of the Dissolved Organic Carbon (DOC) concentrations in the formation waters showed variations through time in piezometers (Van Geet, 2004a): a decrease was observed from circa 250 mgC/L to 100 mgC/L over two years time. These piezometers were drilled in ambient air allowing the immediate vicinity of the piezometer to become oxidised. Considering these observations, it may be suggested that air oxidation of the organic matter present in the Boom Clay may influence DOC values. The Boom Clay contains up to 5% of organic carbon, which may be sensitive to oxidative perturbations (Faure *et al.*, 1999; Elie *et al.*, 2000). Indeed it is known that fossil organic matter is particularly sensitive to natural alteration (heat, weathering, biodegradation, air oxidation, Leythaeuser, 1973; Clayton and Swetland, 1978; Clayton and King, 1987; Charrié-Duhaut *et al.*, 2000). For instance, alteration of kerogen may lead to modification in physical (Senftle et Davis, 1984) as well as chemical properties (Van Krevelen, 1961; Dereppe *et al.*, 1987). Especially air oxidation has a significant impact on the molecular composition of kerogen (Landais *et al.*, 1991; Petsch *et al.*, 2000; Petsch *et al.*, 2001). Elie *et al.* (2000), as well as Faure *et al.* (1999) conducted experiments allowing to follow up the detailed chemical modifications induced by air oxidation on kerogen in claystones. Comparison with

geochemical data obtained from naturally oxidized claystones validated their methodology. Faure and Landais (2000) also demonstrated the role of clay minerals in the oxidation process of organic matter.

The aim of this study is to evaluate the consequences of air oxidation on the kerogen contained in the Boom Clay. Rock aliquots as well as isolated kerogen were submitted to artificial air oxidation in order to (i) monitor the molecular composition of the kerogen as well as the organic compounds released, and to (ii) evaluate the influence of the mineral phase on the oxidation process.

#### 4.1.3.2. *Samples and experimental conditions*

##### 4.1.3.2.1. Samples

Fresh/pristine Boom Clay (original clay) samples were collected in the HADES URF (Mol, Belgium) during excavation of the PRACLAY gallery in October 2007. The samples were collected shortly after excavation and immediately stored under inert atmosphere in aluminium bags. The Total Organic Carbon content in Boom Clay samples from the PRACLAY gallery is about 1% (Tableau 4-7).

<b>Elemental composition of Praclay kerogen (K-0)</b>	
<b>C %</b>	31.85
<b>H %</b>	2.54
<b>O %</b>	9.81
<b>Pyrite %</b>	55.8
<b>H/C</b>	0.96
<b>O/C</b>	0.23
<b>Rock Eval data of Praclay Boom Clay (original clay)</b>	
<b>HI [mg HC/g TOC]</b>	87
<b>OI [mg CO<sub>2</sub>/g TOC]</b>	87
<b>Tmax [°C]</b>	419
<b>TOC (%)</b>	0.99
<b>S2 [mg HC/g of sample]</b>	0.87

Tableau 4-7 : Elemental composition results for Praclay kerogen (K-0) and Rock Eval results for original Praclay Boom Clay (TOC = Total organic carbon, HI= Hydrogen Index, OI = Oxygen Index).

The Boom Clay sample was processed following two procedures (Figure 4-17):

(i) **Pre-extracted clay:** an original clay sample aliquot was freeze-dried and crushed to a size of 250  $\mu\text{m}$ . It was extracted successively by chloroform (during 48h) and water (during 96h) in order to eliminate the extractable organic matter: this sample is called pre-extracted clay (C-0). The pre-extracted sample was freeze-dried again, and then crushed to a size of 250  $\mu\text{m}$  before artificial oxidation.

(ii) **Kerogen concentrate:** kerogen concentrate was obtained following the protocol of Durand and Nicaise (1980). This treatment consists of several steps of solvent (dichloromethane/methanol) extraction and acid (HCl as well as HF) attack. Pyrite was not removed and represents 55 weight% of the kerogen concentrate. Geochemical characteristics are given in Tableau 4-7. The samples were powdered to a size of 250 $\mu\text{m}$  prior to the oxidation experiments.

#### **4.1.3.2.2. Air oxidation procedure**

The kerogen concentrate (K-0) and the pre-extracted clay (C-0) were spread on a glass plate in order to maximize the sample-air contact. The clay is oxidised in dry form to avoid oxidation of pyrite. The plates were then placed in a ventilated oven and heated at 130°C during 62 days, 114 days and 139 days. The sample names for each oxidation time are K-62, K-114 and K-139 for oxidized kerogen and C-62, C-114 and C-139 for the pre-extracted oxidized clay (Figure 4-17).

#### **4.1.3.2.3. Extraction-fractionation**

##### ***4.1.3.2.3.1. Solvent extraction by soxhlet***

The original clay as well as the pre-extracted oxidized clay (C-62, C-114 and C-139) were soxhlet extracted during 48h using chloroform. The organic extract was then concentrated by evaporation under nitrogen using a Turbovap Zymark (T=35°C; nitrogen pressure =7psi). The remaining concentrates were weighted. These samples were named EC-62, EC-114 and EC-139 (Figure 4-17).

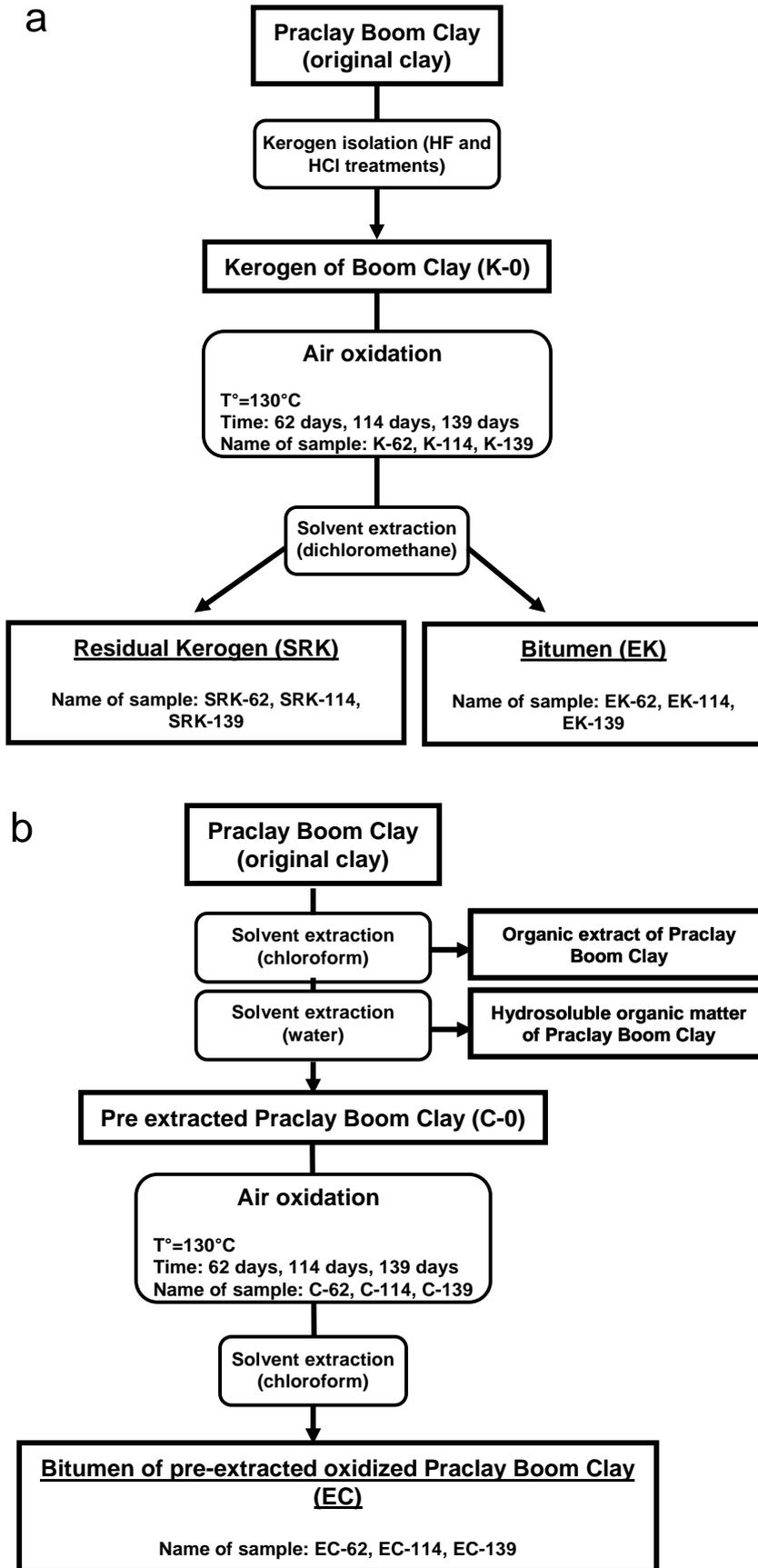


Figure 4-17 : Scheme of oxidation procedure for: a) Kerogen of Boom Clay, b) Praclay Boom Clay

#### **4.1.3.2.3.2. Kerogen extraction by dichloromethane**

After oxidation, 200mg of oxidized kerogen were extracted by dichloromethane (DCM) during 1h using an ultrasonic bath. The organic extract (bitumen) was filtered and concentrated using nitrogen blow-down evaporation. These samples were EK-62, EK-114 and EK-139. Residual kerogen samples remaining after DCM extraction were named SRK-62, SRK-114 and SRK-139 (Figure 4-17).

#### **4.1.3.2.3.3. Fractionation**

The amounts of solvent extract were very low for EK-62, EK-114 and EK-139 samples. Therefore fractionation was not performed for these samples. The organic extracts from clay samples EC-62, EC-114 and EC-139 were fractionated into aliphatic, aromatic and polar compounds by liquid chromatography on alumina and silica columns according to the protocol described by Elie *et al.* (2000).

#### **4.1.3.2.4. Gas Chromatography-mass spectrometry and derivatization.**

The organic fractions (aliphatic, aromatic and polar) were analyzed by gas chromatography (GC)-mass spectrometry (MS) (Agilent 6890N GC coupled to an Agilent 5973 MS), using a split-splitless injector and a 60m DB-5MS, 0.25mm i.d., 0.1mm film fused silica column. The temperature program was 60-130°C at 15°C/min, then 130-315°C at 3°C/min followed by an isothermal stage at 315°C for 15min (constant helium flow of 1.4ml/min).

Aliphatic and aromatic fractions were dissolved at 4mg/ml in *n*-hexane, then injected into the GC-MS. The polar fractions from the initial clay and of EK-62, EK-114 and EK-139 were silylated using BSTFA + Trimethylchlorosilane (99/1) prior to GC-MS analysis in order to improve chromatographic resolution. A small aliquot of sample was dissolved with the derivatization solution at 8 mg/ml concentration in DCM and treated for 15 min at 60°C.

#### **4.1.3.2.5. Thermally assisted hydrolysis and methylation (THM-GC-MS)**

Raw and oxidized kerogen previously extracted by chloroform (cf. § 4.1.3.2.3.2) were analyzed by thermally assisted hydrolysis and methylation (THM-GC-MS). The samples were mixed with tetra-methyl-ammonium hydroxyde (TMAH) based on the method of Challinor (1989), in a 1/5 sample/TMAH ratio. The mixture was placed in a quartz tube and pyrolyzed at 620°C for 20 seconds in a Chemical Data System 2000 pyroprobe. The pyrolysis products were analyzed by GC-MS (Hewlett-Packard HP GPG 6890 coupled to a Hewlett-Packard HP 5972 MSD). The temperature of split/splitless injector was 300°C. The GC was fitted with a 60 m J&W DB-5 ms, 0.25 mm i.d., 0.1mm film fused silica column. The temperature program was 0-40°C at 40°C/min, then 40-315°C at 5°C/min. Contributions of compound families were calculated based on peak integrations using Data Analysis software.

#### **4.1.3.2.6. Gel Permeation Chromatography – High Performance Liquid Chromatography (GPC-HPLC)**

Polar fractions from EC-62, EC-114 and EC-139 were dissolved in tetrahydrofuran (THF) at 1mg/ml concentration and injected into an HPLC in order to carry out gel permeation chromatography. The HPLC unit consisted of a binary pump (HP 1100 series) and a PLgel Mixed-E, 300 x 7.5 mm id, 3 µm particle size (Agilent technologies) analytical column with a diode array detector (DAD – HP 1100 series) at 254 nm. All HPLC analyses were carried out under isocratic conditions using a mobile phase of THF, a flow rate fixed at 1.0ml/min and temperature of 25°C. Relative molecular size was calibrated using a Polystyrene Standards (Mp 162-40 000 Da) solution as reference.

### **4.1.3.3. Results**

#### **4.1.3.3.1. Air oxidation of the kerogen concentrate of Boom Clay**

##### ***4.1.3.3.1.1. Evolution of the kerogen***

In order to follow the evolution of the molecular composition of kerogen with oxidation, the samples K-0, SRK-62 to SRK-139 were analysed by THM-GC-MS. The molecular distribution of the initial kerogen is dominated by aliphatic molecules, such as saturated and

unsaturated alkanolic acids, *n*-alkanes and *n*-alkenes. These molecules account for 64% of total molecules analyzed (Figure 4-18 a).

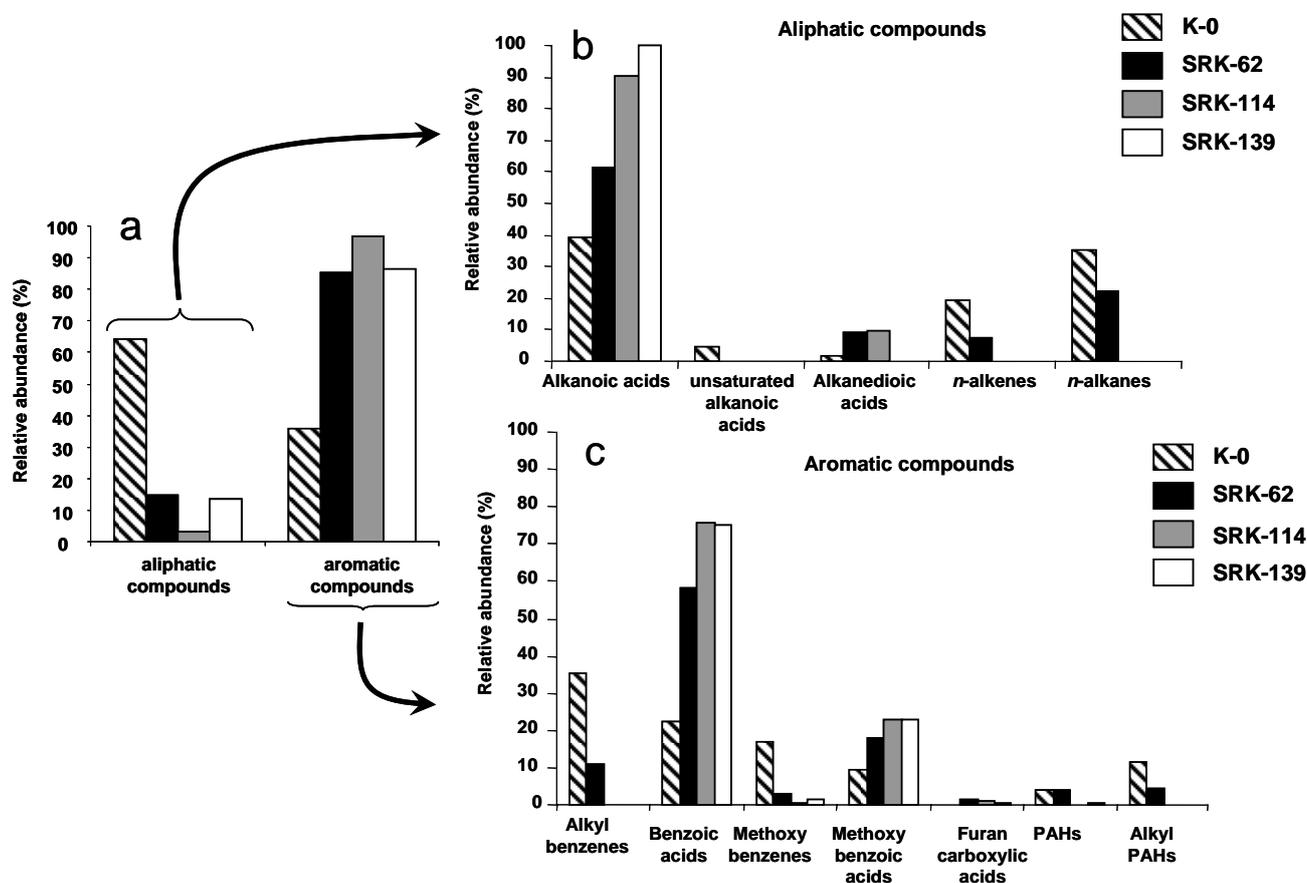


Figure 4-18 : a) Proportion of aliphatic and aromatic compounds, b) Evolution of the proportions of alkanolic acids  $\Sigma(C_6-C_{34})$ , unsaturated alkanolic acids  $\Sigma(C_6-C_{25})$ , alkanedioic acids  $\Sigma(C_7-C_{30})$ , *n*-alkenes  $\Sigma(nC_9-nC_{32})$ , *n*-alkanes  $\Sigma(nC_9-nC_{32})$ , for initial kerogen of Boom Clay (K-0), and three steps of oxidation 62, 114 and 139 days, c) Evolution of proportion of alkyl benzenes, benzoic acids, methoxybenzenes, methoxy benzoic acids, furan carboxylic acids, PAH and alkyl PAHs for initial kerogen of Boom Clay (K-0), and three steps of oxidation 62, 114 and 139 days.

Alkanolic acids have a bimodal distribution centered on hexadecanoic acid ( $C_{16}$ ) and octacosanoic acid ( $C_{28}$ ) and are characterized by the presence of long-chain ( $>C_{20}$ ) even carbon-numbered compounds. Methoxy-benzene accounts for the essential part of the aromatic molecules together with lignin derivatives (p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl structure) (Figure 4-19). The pyrograms of the solvent extracted kerogen obtained after oxidation do not show the long chain aliphatics ( $C_{18}+$ ) detected in the initial kerogen (Figure 4-19). The unsaturated alkanolic acids also disappear after 62 days of oxidation (Figure 4-18 b). After 114 days of oxidation (T2), the kerogen does not generate *n*-alkanes and *n*-alkenes upon flash-pyrolysis (Figure 4-18 b). For the last steps of oxidation (139 days-T3), the long



**4.1.3.3.1.2. Evolution of the bitumen extracted from oxidized kerogen**

The extract of EK-62 (62 days of oxidation) is mainly composed of saturated, unsaturated and alkyl C<sub>12</sub> to C<sub>18</sub> alkanolic acids (Figure 4-20 a and b) with predominance of the C<sub>16</sub> and C<sub>18</sub> classes (Figure 4-20 a). Long chain 1-alkanol and n-alkanes are also present (Figure 4-20 b). With oxidation, the composition of the bitumen does not vary significantly (Figure 4-20 b).

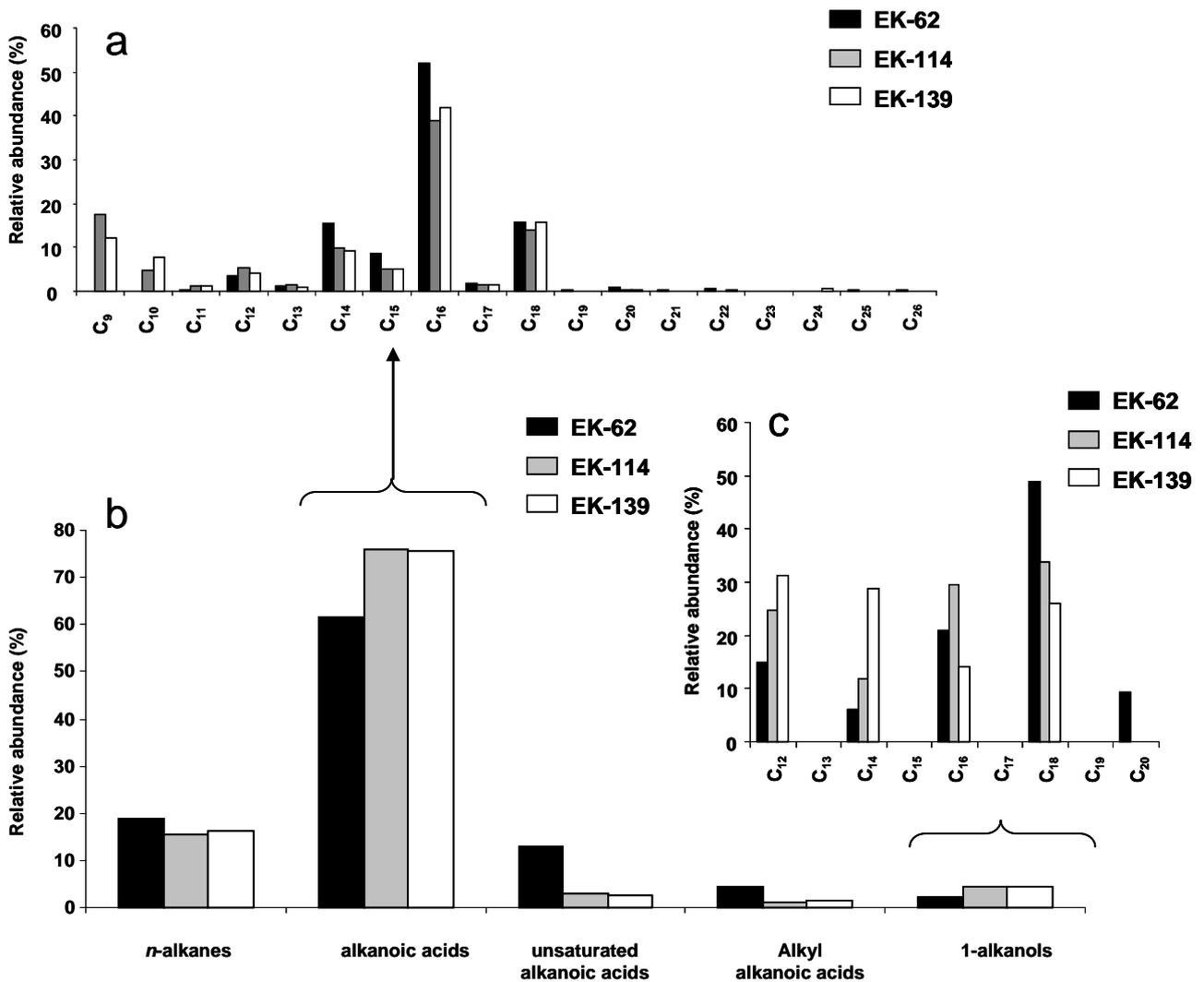


Figure 4-20 : a) Evolution of relative abundance of alkanolic acids (m/z 117) for EK-62, EK-114 and EK-139. b) Evolution of the proportions of n-alkanes  $\Sigma(nC_{16}-nC_{38})$ , alkanolic acids  $\Sigma(C_9-C_{26})$ , unsaturated alkanolic acids  $\Sigma(C_{14}-C_{18})$ , alkyl alkanolic acids  $\Sigma(C_{12}-C_{16})$  and 1-alkanols  $\Sigma(C_{12}-C_{20})$  for EK-62, EK-114 and EK-139. c) Evolution of relative abundance of 1-alkanols (m/z 75) for EK-62, EK-114 and EK-139.

However:

- The proportion of alkyl and unsaturated alkanolic acids decreases with oxidation (Figure 4-20 b);
- With oxidation, C<sub>9</sub> to C<sub>11</sub> alkanolic acids appear (Figure 4-20 a);
- The *n*-alkanes distribution is unimodal for T1 and becomes bimodal (Figure 4-21): with oxidation, short chain length *n*-alkanes appear, yet the proportions of high chains *n*-alkanes remains high;
- The proportion of C<sub>12</sub> to C<sub>14</sub> 1-alkanols increases with oxidation (Figure 4-20 c).

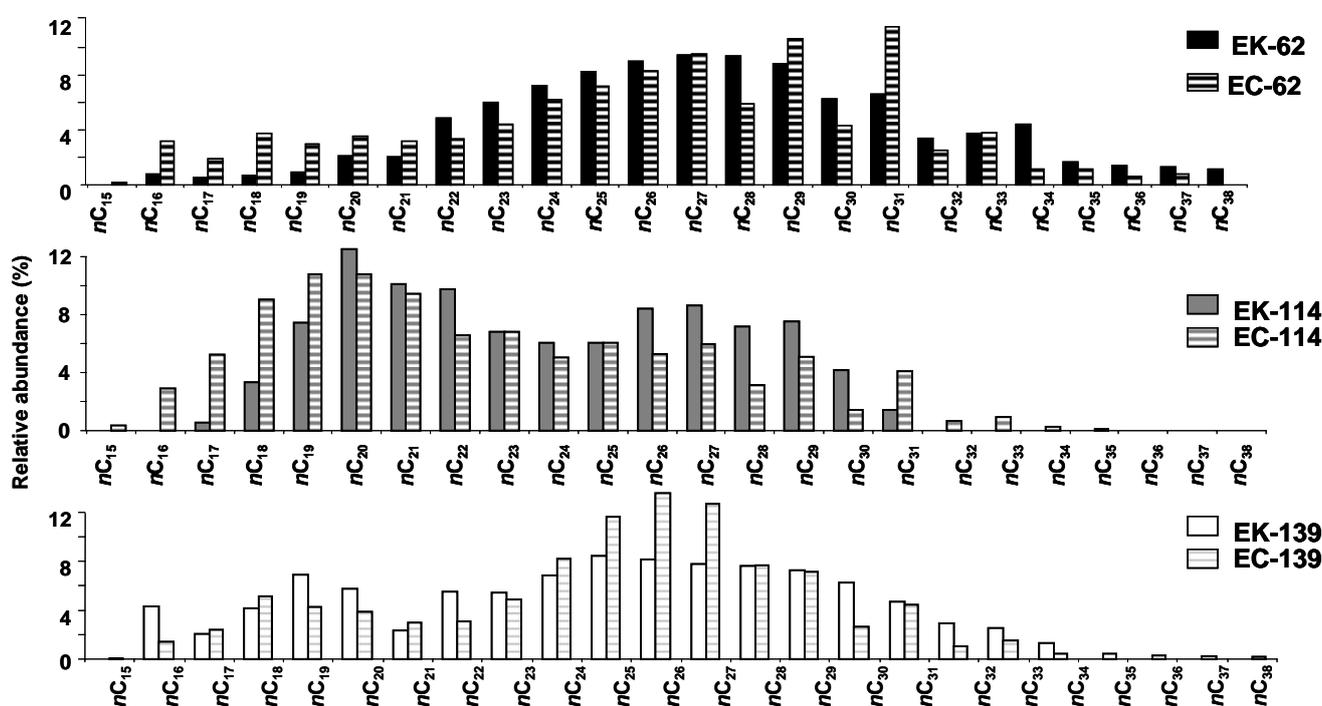


Figure 4-21 : Evolution of relative abundance of *n*-alkanes (*m/z* 57) for EK-62, EK-114, EK-139 and EC-62, EC-114, EC-139.

#### 4.1.3.3.2. Air oxidation of the pre-extracted Boom Clay

The different molecular families detected in the organic extracts (EC-62 to EC-139) obtained after air oxidation of the pre-extracted Boom Clay sample are shown in Figure 4-22 a. EC-62 contains three families of molecules: *n*-alkanes, alkanolic acids and 1-alkanols. Alkanolic acids are always predominant. Alkanals and 2-alkanones appear after 114 days (T2) of oxidation. The *n*-alkanes distribution (Figure 4-21) for EC-62 is unimodal and becomes bimodal with a growth in relative contribution of shorter chain *n*-alkanes after 114 days. A

similar evolution is observed for the extracted *n*-alkanes obtained after kerogen oxidation (EK samples).

After 62 days of oxidation, the polar fraction contains alkanolic acids and 1-alkanols. The alkanolic acids and 1-alkanols distributions are shown in Figure 4-22 b and c. Alkanolic acid distributions are marked by the predominance of the C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> compounds. The 1-alkanols are represented by compounds with even carbon numbers and chain length higher than C<sub>16</sub>. C<sub>22</sub> 1-alkanol is the most predominant.

The polar fractions of EC-114 and EC-139 are different from EC-62; indeed they contain 2-alkanones and alkanals in addition to the previously described molecules. These two families show both bimodal distributions (Figure 4-22 d and e). The alkanolic acids and 1-alkanols distributions change from 114 days to 139 days with a gradual increase of the proportion of short chain compounds (C<sub>9</sub> to C<sub>15</sub> for alkanolic acids; lower than C<sub>20</sub> for 1-alkanols) (Figure 4-22 a and b). The proportions of hexadecanoic and octadecanoic acids remain constant from EC-62 to EC-139.

The 2-alkanones and alkanals distributions are progressively shifted to lower molecular weight compounds with increasing oxidation (Figure 4-22 d and e).

The relative contributions of low molecular weight (<C<sub>20</sub>) versus high molecular weight compounds (>C<sub>20</sub>) was calculated as a function of increasing air oxidation (Figure 4-23). The proportion of lighter molecular weight molecules increases for alkanolic acids, 1-alkanols, alkanones and alkanals.

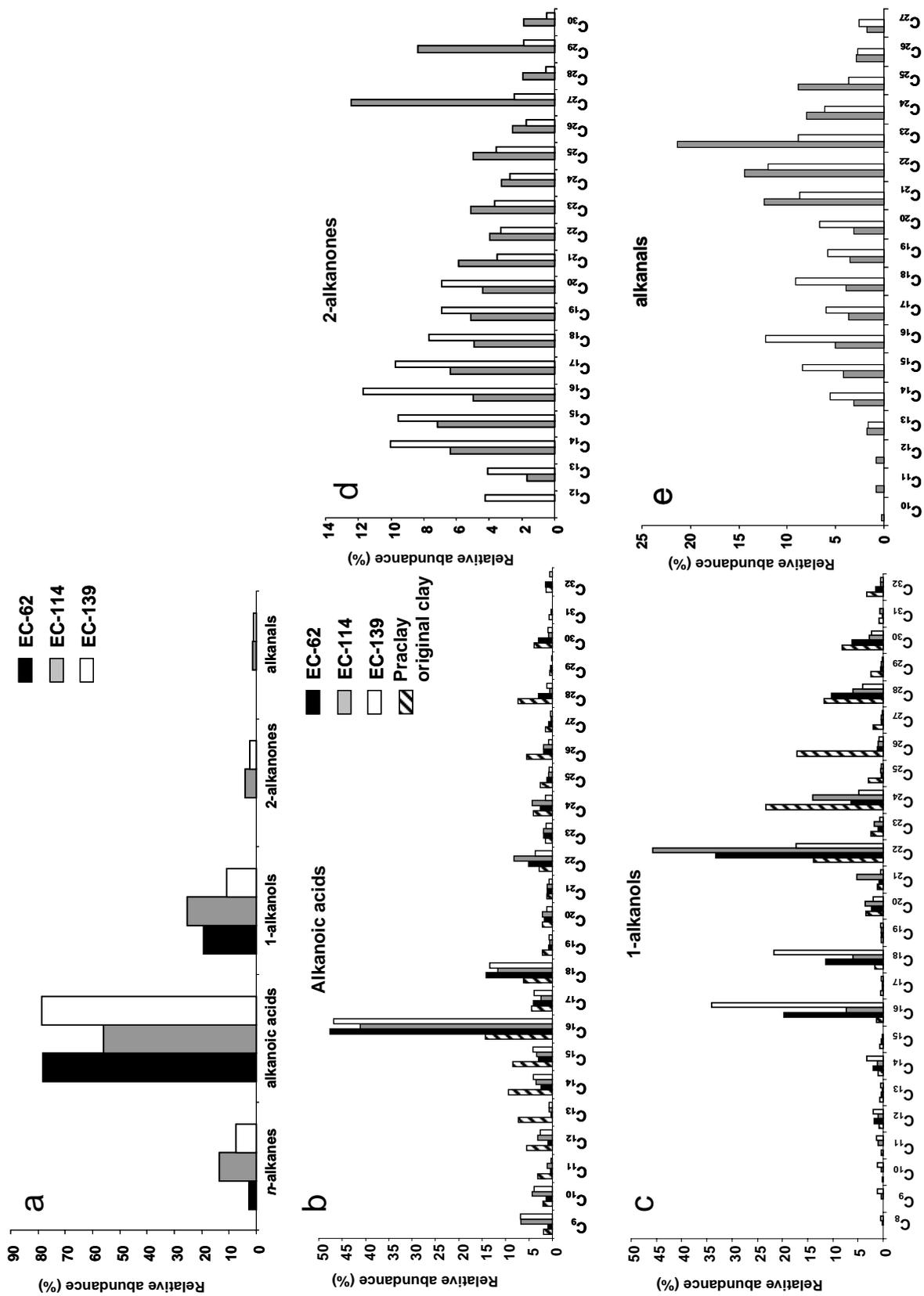


Figure 4-22 : a) Evolution of proportion of n-alkanes  $\Sigma(nC_{15}-nC_{38})$ , alkanols  $\Sigma(C_{8}-C_{32})$  (m/z 117), 1-alkanols  $\Sigma(C_{8}-C_{32})$  (m/z 75), 2-alkanones  $\Sigma(C_{12}-C_{30})$  (m/z 58) and alkanals  $\Sigma(C_{10}-C_{27})$  (m/z 82), for EC-62, EC-114, EC-139 and evolution of relative abundance of b) alkanols (m/z 117), c) 1-alkanols (m/z 75), d) 2-alkanones (m/z 58) and e) alkanals (m/z 82), for EC-62, EC-114, EC-139 and Praclay original clay.

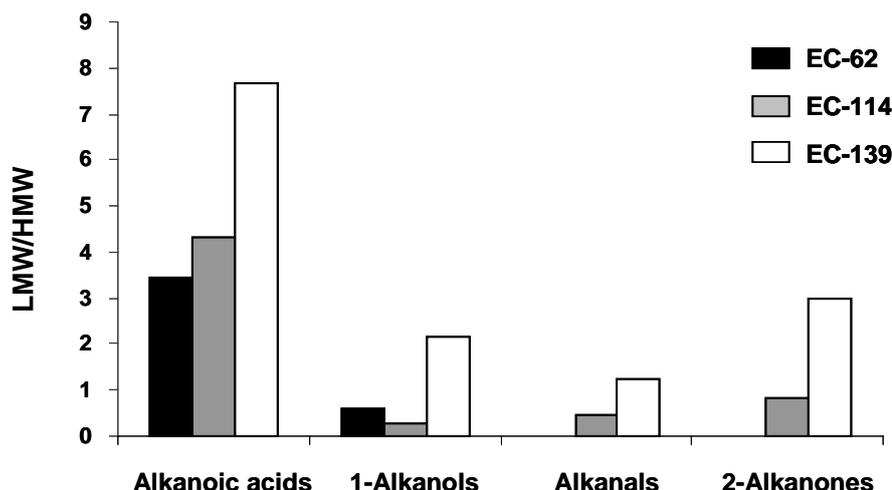


Figure 4-23 : Evolution of low molecular weight on high molecular weight (LMW/HMW) of polar fraction of EC-62 to EC-139 for alkanolic acids ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), 1-alkanols ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), alkanals ( $\Sigma(C_{10}-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{27})$ ) and 2-alkanones ( $\Sigma(C_{12}-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{30})$ ).

It may be noticed in Figure 4-22 that the pre-extracted clay samples contain a higher abundance of higher molecular weight aliphatics ( $C_{20}-C_{32}$ ) compared to the extract obtained from kerogen. In fact, these compounds are also present in the initial Boom Clay extracts (sample Praclay T0) (Figure 4-22 a and c) and were probably not totally removed during the pre-extraction step prior to oxidation. This however, has no implication for/consequence on the appearance of the lower molecular weight compounds during oxidation.

The relative molecular weight distributions of the polar fractions obtained after air oxidation were studied using GPC-HPLC (Figure 4-24). The polar fraction of EC-62 shows a relative mass centered on 500 Da, while the distribution shifts to 450 Da and then 400 Da respectively for EC-114 and EC-139.

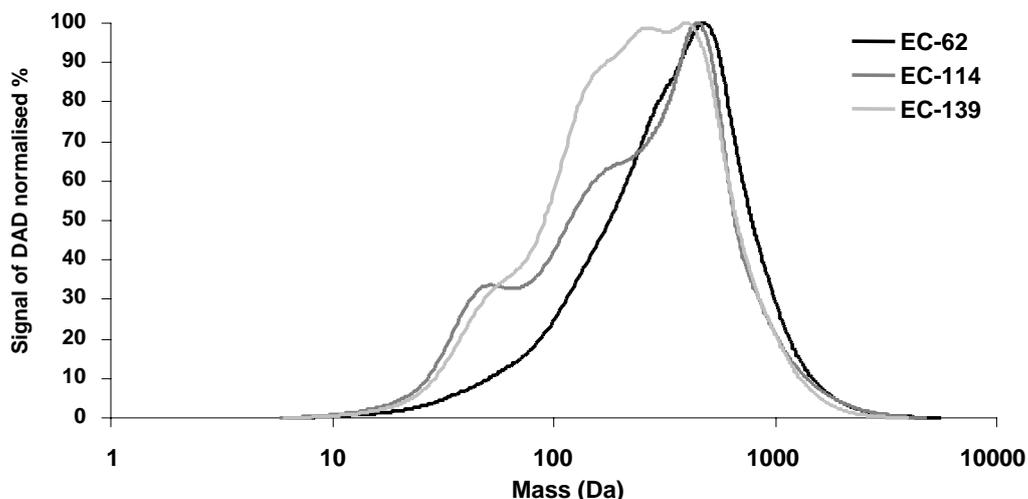


Figure 4-24 : Molecular weight distributions of polar fractions of EC-62, EC-114 and EC-139 obtained by GPC-HPLC.

#### 4.1.3.4. Discussion

Rock-Eval analysis and H/C at. vs O/C at. ratios suggest that the organic matter unaltered Boom Clay is predominantly an immature type III kerogen (Tableau 4-10) (Tissot and Welte, 1978). THM-GC-MS chromatograms (Figure 4-18) of the initial kerogen display a predominance of long chain ( $n > C_{20}$ ) even-numbered alkanolic acids as well as lignin derivatives (p-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl structure). GC-MS of the solvent extracts also allowed the detection of 1-alkanols of even carbon numbers with chain length higher than  $C_{16}$  and the predominance of  $C_{22}$  1-alkanol (Rielley *et al.*, 1991). All these results confirm a significant contribution of higher plants for the kerogen contained in our original Boom Clay sample. These results are different from those described by Deniau *et al.* (2001). Indeed, the kerogen isolated from the Boom Clay sample used by these authors is described as dominated by type II kerogen (Deniau *et al.*, 2001). However, Laenen *et al.* (1997) and Vandenberghe *et al.* (1997) showed that the kerogen in the Boom Clay is of variable composition with mixtures of type II and III in response to changes in the depositional conditions. The kerogen isolated from the Boom Clay sampled in the PRACLAY gallery and used in this work is thus dominated type III.

##### 4.1.3.4.1. Effects of air oxidation on the composition of kerogen

With increasing oxidation, the kerogen is depleted in aliphatic compounds (Figure 4-18 a and Figure 4-19) and is enriched in oxygenated aromatics such as benzoic acids or methoxybenzoic acids (Figure 4-18 c). With oxidation, the chain length of the compounds released by the kerogen is reduced, especially for alkanolic acids.

Conversely, the bitumen extracted from the oxidized kerogen contains only aliphatic compounds such as *n*-alkanes, alkanolic acids and 1-alkanols (Figure 4-20). It suggests that oxidation induces defunctionalisation of the kerogen by preferential loss of aliphatic compounds while the aromatic structure in the organic solid is progressively oxidized. The net result is the release of aliphatic rich bitumen. Such evolution of the kerogen composition is similar to the literature describing the natural alteration of kerogen (Petsch *et al.*, 2000; Petsch *et al.*, 2001) and low temperature air oxidation of coals (Fredericks et Moxon, 1986; Calemma *et al.*, 1988; Kister *et al.*, 1988; Landais and Rochdi, 1993; Martinez and Escobar, 1995; McCutcheon and Wilson, 2003; Mao *et al.*, 2010). These studies based mainly on spectroscopic analyses (NMR, FTIR, UV fluorescence) show that air oxidation of coals lead to

aliphatic CH groups loss and carbonyl and carboxylate groups gain. Our study confirms these observations at a molecular scale.

#### 4.1.3.4.2. Influence of minerals on the air oxidation process

After 62 days of oxidation, the *n*-alkanes distribution is similar for the extracts obtained with the kerogen concentrate (EK-62) or the pre-extracted clay (EC-62). However the proportion of short chain *n*-alkanes ( $nC_{15}$ - $nC_{20}$ ) is lower for kerogen (EK-62) than in whole clay samples (EC-62). Probably clay minerals hinder the evaporation of lighter reaction products through adsorption during the oxidation and sample treatments (Figure 4-21). Solvent extracts from the oxidized kerogen concentrate (EK-62) and pre-extracted clay (EC-62) contain the same type of molecules: 1-alkanol, alkanolic acids and *n*-alkane. But, the distributions of the alkanolic acids as well as the 1-alkanols are different (Figure 4-20 and Figure 4-22). With increasing oxidation time new molecules appear in the extracts of the pre-extracted clay (EC-114 and EC-139): alkanones and alkanals. These compounds are not observed for the oxidation with kerogen. The only difference between the kerogen concentrate and pre-extracted clay samples is the clay content. Faure *et al.* (2000) have demonstrated the role of clay minerals in the oxidation process of organic matter. Clay (Illite-Smectite, present in Boom Clay, (Zeelmaekers *et al.*, 2010) catalyzes the air oxidation of the *n*-alkanes and thus participate to the production of new molecules with the following mechanisms (Faure and Landais, 2000; Faure *et al.*, 2003):

- $\beta$  cleavage of aliphatic chains leads to the production of 1-alkanols and alkanals. The further oxidation of alkanals generates alkanolic acids;
- $\gamma$  cleavage of aliphatic chains forms alkanones and *n*-alkanes. These *n*-alkanes can be oxidized to form again 1-alkanols;
- With preservation of the aliphatic chain length, *n*-alkanes are oxidized into 2-alkanols and then alkanones.

According to the results presented,  $\beta$  cleavage is predominant over  $\gamma$  cleavage in the clay catalysis mechanism, which explains the higher proportions of alkanolic acids and 1-alkanols in comparison to 2-alkanones and alkanals (Faure *et al.*, 2003) and the subsequent formation of 2-alkanones. Moreover 2-alkanols are not present in the pre-extracted clay oxidation series: they are not detected because they are intermediate reaction products which are further oxidized into 2-alkanones. Alkanals are then oxidized into alkanolic acids.

#### **4.1.3.4.3. Production of low molecular weight compounds**

The evolution of the low molecular weight to high molecular weight ratio (LMW/HMW) (Figure 4-23) and the relative molecular weight distribution of the polar fraction (Figure 4-24) extracted from oxidized kerogen (samples EK-62 to EK-139) and pre-extracted clay (samples EC-62 to EC-139) show the formation of low molecular weight compounds.

Their formation may be explained by two mechanisms i) the kerogen which produces low molecular weight molecules as oxidation proceeds ii) the catalytic oxidation by clay of the aliphatic chains released by the kerogen.

#### **4.1.3.5. Conclusion**

The experimental data obtained on kerogen concentrate and pre-extracted clay allows to describe the major stages of air oxidation of the organic matter of the Boom Clay. The molecular composition of the initial kerogen as characterized by THM-GC-MS shows a significant decrease of compounds chain length and molecular weight with increasing oxidation. As a consequence, the oxidation induces first the release of mainly aliphatic compounds as well as alkanolic acids (present as genuine constituents of the initial kerogen), then the enrichment of the residual kerogen in aromatic constituents, which are partly oxidized to benzoic acids. The comparison of the oxidation experiments of isolated kerogen and pre-extracted clay evidences the role of clay minerals. The *n*-alkanes released from the kerogen into the rock matrix undergo oxidation catalyzed by the clay minerals. Reaction products of the *n*-alkanes lead to the formation of new oxygen bearing compounds, following several reaction steps.

Air oxidation of Boom Clay clearly affects the composition of the organic matter. The effects of these changes have consequences on the evaluation of the Boom Clay as a geological barrier. Indeed, digging of the galleries in the Boom Clay and long term exposure to air will significantly modify the initial composition of the organic matter. Increased oxygen content of kerogen by air oxidation must be taken into account in the barrier properties assessments scenarios, e.g. during heat exposure (induced by the presence of nuclear waste) which may lead to increased CO<sub>2</sub> release (Deniau *et al.*, 2005; Lorant *et al.*, 2008). Especially the formation of low molecular weight compounds and changes in functional groups upon oxidation is of importance. Indeed, the formation of new oxygen functionalized compounds may modify the complexation capacity of the organic matter in regards to radionuclides. The formation of smaller organic compounds may increase their mobility in the pore structure of the rock. Such profound chemical changes may also change the aqueous

solubility of the organic matter. Therefore, future work will focus on the influence of air oxidation on the dissolved organic matter fraction.

**Acknowledgements:**

This work has been commissioned by SCK•CEN on behalf of ONDRAF/NIRAS in the frame of the Safety and Feasibility Case 1 (SFC1). SCK•CEN is acknowledged for providing Boom Clay samples and the authors wish to thank Mrs A. Riboulleau (University of Lille) for kerogen isolation.

## **4.2. Etude de l'impact de l'oxydation sur la fraction organique hydrosoluble de la formation de Boom**

La matière organique de la formation de Boom est caractérisée par une importante fraction hydrosoluble. En effet, les eaux de piézomètres, prélevées sur le site de HADES, sont caractérisées par des valeurs de COD élevées (valeurs comprises entre 80 et 425 mgC/L, Van Geet, 2004b). De plus, des prélèvements réguliers d'eau *in situ*, à partir des piézomètres, ont montré que les teneurs en COD variaient, puis diminuaient, de manière significative, au cours du temps (Van Geet, 2004a). Une des hypothèses avancées pour expliquer de telles variations de teneur en COD est l'oxydation de la roche encaissante, lors du forage des piézomètres.

Cette partie sera, tout d'abord, consacrée à la caractérisation de la matière organique hydrosoluble générée par oxydation artificielle. Les caractéristiques de cette MOD seront, ensuite, comparées avec celles déterminées pour les échantillons issus de la série d'altération naturelle *in situ* en galerie. Cette comparaison permettra d'identifier les paramètres spécifiques au phénomène d'oxydation à l'air sur la fraction organique hydrosoluble et, ainsi, de s'assurer de la possibilité de simuler, en laboratoire, les conséquences d'une oxydation sur la matière organique hydrosoluble. Enfin, le rôle spécifique du kérogène, au cours de l'oxydation, sur la nature de la MOD sera plus précisément étudié.

### **4.2.1. Comparaison d'une série d'altération naturelle et d'une série d'oxydation artificielle**

#### **4.2.1.1. Protocole analytique et échantillons**

Les échantillons, étudiés dans cette partie, correspondent aux échantillons de la galerie (Gal-1 à Gal-6) et aux échantillons de la série d'oxydation artificielle à 80°C étudiés dans les paragraphes précédents (cf. paragraphe 4.1.2.). Dans le paragraphe 4.1.2., il a été montré que les expériences d'oxydation artificielle réalisées à 80°C simulaient l'altération de la MOE de la galerie à température ambiante. Un ensemble de caractérisations a été réalisé, en parallèle, sur la fraction organique hydrosoluble de ces mêmes échantillons (Figure 4-25), afin d'évaluer les conséquences de l'oxydation à l'air sur la nature et la quantité de MOD.

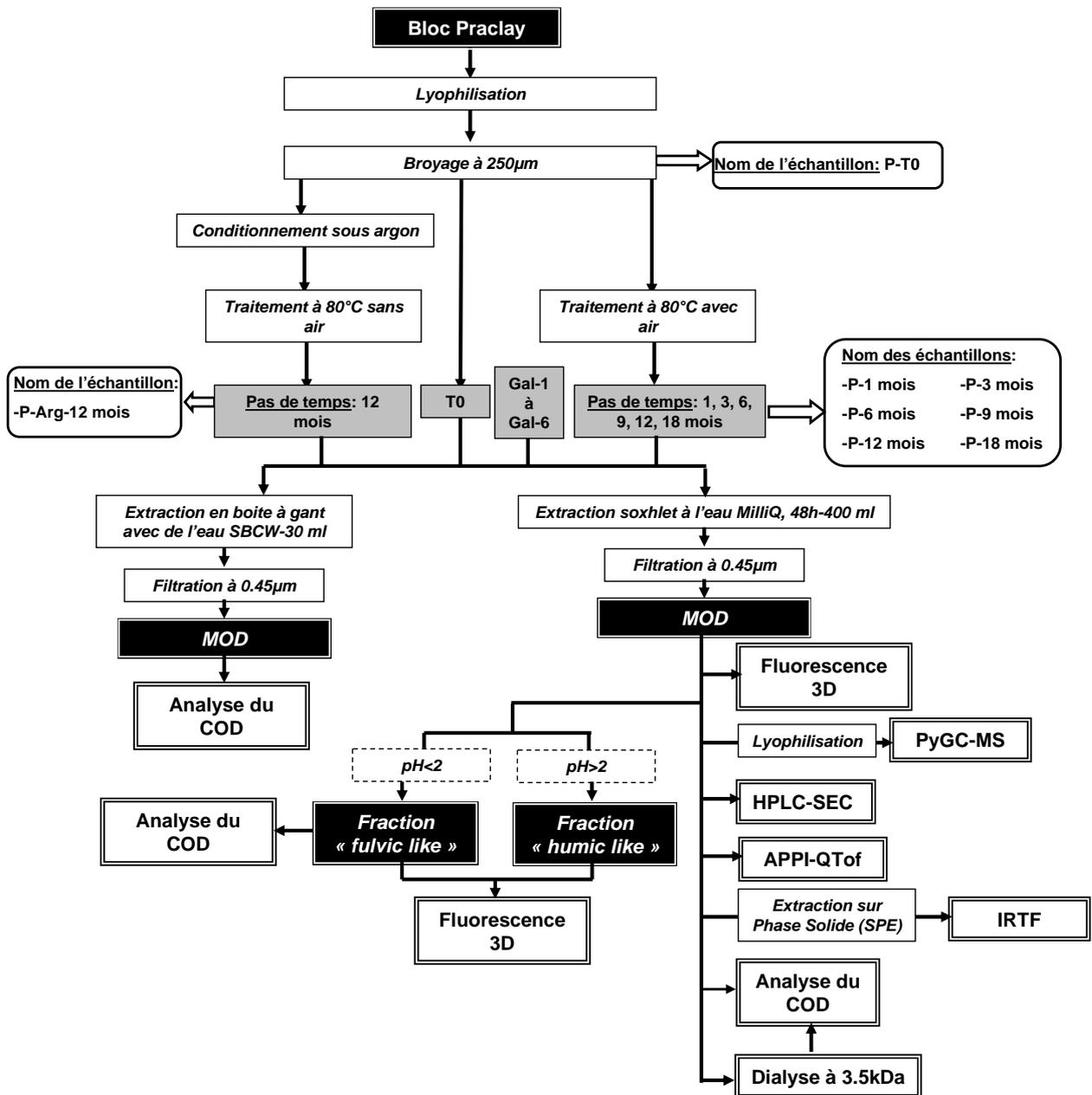


Figure 4-25 : Protocole d'étude des échantillons d'eaux de la série d'oxydation artificielle et naturelle avec HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.), IRTF = microscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. paragraphe 2.4.2.), APPI-QTOF= source de photo ionisation à pression atmosphérique couplée à un spectromètre de masse haute résolution (cf. paragraphe 2.3.4.).

La quantification et l'étude de l'évolution du COD ont été réalisées par le biais d'extraction « leaching » (Figure 4-25). Cette extraction s'effectue en atmosphère contrôlée et avec une eau dont la composition minérale et le pH sont proches de l'eau de la formation géologique (eau SBCW, cf. paragraphe 2.1.2.2.). Cette eau doit permettre de respecter l'équilibre entre l'eau et les minéraux de la roche lors de l'extraction et ainsi d'observer uniquement l'évolution du COD, suivant l'intensité de l'altération naturelle et l'oxydation

artificielle, en limitant les effets de dissolution et de précipitation des minéraux (De Craen *et al.*, 2004b).

La MOD a été caractérisée grâce à des analyses spectroscopiques (fluorescence 3D, microscopie infrarouge à transformée de Fourier) et moléculaires [chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC), spectrométrie de masse haute résolution (APPI-Qtof), pyrolyse flash - chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (Py-GCMS), Figure 4-25]. Ces diverses analyses spectroscopiques et moléculaires nécessitent une grande quantité de MOD. C'est pourquoi, une extraction des échantillons au soxhlet, en parallèle des « leaching », a été effectuée afin d'obtenir un plus grand volume de MOD. La MOD extraite par la technique de soxhlet a été utilisée pour l'ensemble des analyses spectroscopiques et moléculaires (Figure 4-25). Cependant, certaines analyses ont été réalisées, à la fois, sur les échantillons extraits au soxhlet et en « leaching », afin de s'assurer que les deux techniques d'extraction étaient similaires (Analyses en fluorescence 3D, HPLC-SEC, Annexe 3).

Des tests de dialyse ont été conduits sur l'eau brute, c'est-à-dire l'eau filtrée à 0.45µm (Figure 4-25). Les matières organiques hydrosolubles, issues des échantillons initiaux (P-T0 et Gal-1), des expériences d'oxydation menées à 18 mois (P-18mois) ainsi que Gal-6 ont subi un protocole d'isolation des fractions « humic like » et « fulvic like ».

Comme pour l'étude de la MOE, la MOD de l'échantillon témoin P-Arg-12 mois a été étudiée, afin d'évaluer l'impact de la température (80°C) sur la production de matière organique hydrosoluble.

#### **4.2.1.2. Résultats**

##### **4.2.1.2.1. Analyses quantitatives**

###### **Evolution du COD extrait par leaching en atmosphère contrôlée.**

Les valeurs de COD ont été normalisées à la teneur en carbone organique des échantillons extraits (Tableau 4-8). En effet, les teneurs en COT des échantillons des deux séries, artificielle et naturelle, sont différentes (par exemple, 0.99% pour P-T0 et 1.72 % pour Gal-1).

Le pourcentage de carbone organique mobilisé par l'eau est du même ordre de grandeur pour les deux échantillons P-T0 et Gal-1 (6.4% et 5% respectivement). De plus, les deux séries suivent la même évolution : tout d'abord, la proportion de COD augmente (jusqu'à 20% pour l'expérience P-9 mois et 10% pour l'échantillon Gal-3), puis diminue. Pour la série

naturelle, la diminution est beaucoup plus franche que pour la série artificielle : le pourcentage de COD retrouve la valeur de la roche non altérée (Gal-1) pour les échantillons Gal-5 et Gal-6 (soit 5%) alors que, pour la série artificielle, il ne diminue que de 2 à 3% bien que l'expérience d'oxydation ait été menée pendant 18 mois. Le COD de l'échantillon témoin P-Ar-12mois (5 %) reste dans des proportions similaires (5.02 %) à l'échantillon non altéré (P-T0 – 6.48 %).

	% de carbone extrait à l'eau (leaching)	% de carbone extrait à l'eau (soxhlet)
<b>Série d'oxydation artificielle</b>		
<b>P-T0</b>	6.48	6.96
<b>P-1 mois</b>	11.89	nd
<b>P-3 mois</b>	14.94	nd
<b>P-6 mois</b>	17.51	nd
<b>P-9 mois</b>	20.87	17.00
<b>P-12 mois</b>	17.02	15.63
<b>P-18 mois</b>	18.19	24.48
<b>P-Ar-12 mois</b>	5.02	5.34
<b>Série naturelle de la galerie</b>		
<b>Gal-1</b>	5.07	5.40
<b>Gal-2</b>	4.96	3.90
<b>Gal-3</b>	10.37	7.33
<b>Gal-4</b>	9.84	8.23
<b>Gal-5</b>	4.45	4.31
<b>Gal-6</b>	5.59	4.46

Tableau 4-8 : Proportion du carbone extrait à l'eau par rapport au COT obtenu lors des extractions en « leaching » et au soxhlet des échantillons de la série d'oxydation artificielle et de la série naturelle de la galerie.

Les valeurs de COD, normalisées à la teneur en carbone organique pour une partie des extractions au soxhlet, ont été calculées (Tableau 4-8). Les évolutions sont les mêmes que celles observées pour les extractions en « leaching ».

#### Proportion des fractions « humic like » et « fulvic like ».

La fraction « fulvic like » représente 71% et 78.7 % du COD total pour les échantillons P-T0 et Gal-1 (Tableau 4-9). Cette proportion augmente avec l'oxydation : pour P-18 mois et Gal-6, la fraction « humic like » ne précipite plus.

	% du COD total
P-T0-fraction "fulvic like"	71.0
P-T0-fraction "humic like"	29.0
Gal-1-fraction "fulvic like"	78.7
Gal-1-fraction "humic like"	21.3

Tableau 4-9 : Proportion de carbone présente dans la fraction « fulvic like » et « humic like » pour les échantillons non altérés P-T0 et Gal-1.

#### 4.2.1.2.2. Etude de la distribution des masses moléculaires

La distribution des masses moléculaires a été étudiée par différentes techniques complémentaires : dialyse à 3.5 kDa, HPLC-SEC et APPI-QToF (Tableau 4-10, Figure 4-26, Figure 4-27).

La proportion de la fraction inférieure à 3.5 kDa, déduite par dialyse, pour les échantillons P-T0 et Gal-1, est égale respectivement à 74.9% et 61.4% du COD. Cette proportion augmente avec l'oxydation pour atteindre 85.3% du COD pour P-18 mois et 79.8 % du COD pour Gal-6.

	Pourcentage du COD de taille inférieure à 3.5 kDa
P-T0	74.9
P-6 mois	71.7
P-18 mois	85.3
Gal-1	61.5
Gal-4	64.5
Gal-6	79.9

Tableau 4-10 : Pourcentage de carbone organique dissous des eaux brutes, de taille inférieure à 3.5 kDa, isolé par dialyse pour les échantillons P-T0, P-6mois, P-18mois, Gal-1, Gal-4 et Gal-6, avec  $\% \text{COD}_{<3.5\text{kDa}} = ((\text{COD}_{\text{total}} - \text{COD}_{>3.5\text{kDa}}) / \text{COD}_{\text{total}}) * 100$ .

Les distributions des masses moléculaires des eaux brutes, révélées par les chromatogrammes, obtenus par HPLC-SEC, (Figure 4-26) montrent une légère augmentation des temps d'élution avec le degré d'oxydation pour les deux séries (artificielle et naturelle), suggérant ainsi une légère diminution de la masse moléculaire moyenne avec l'avancée de l'altération.

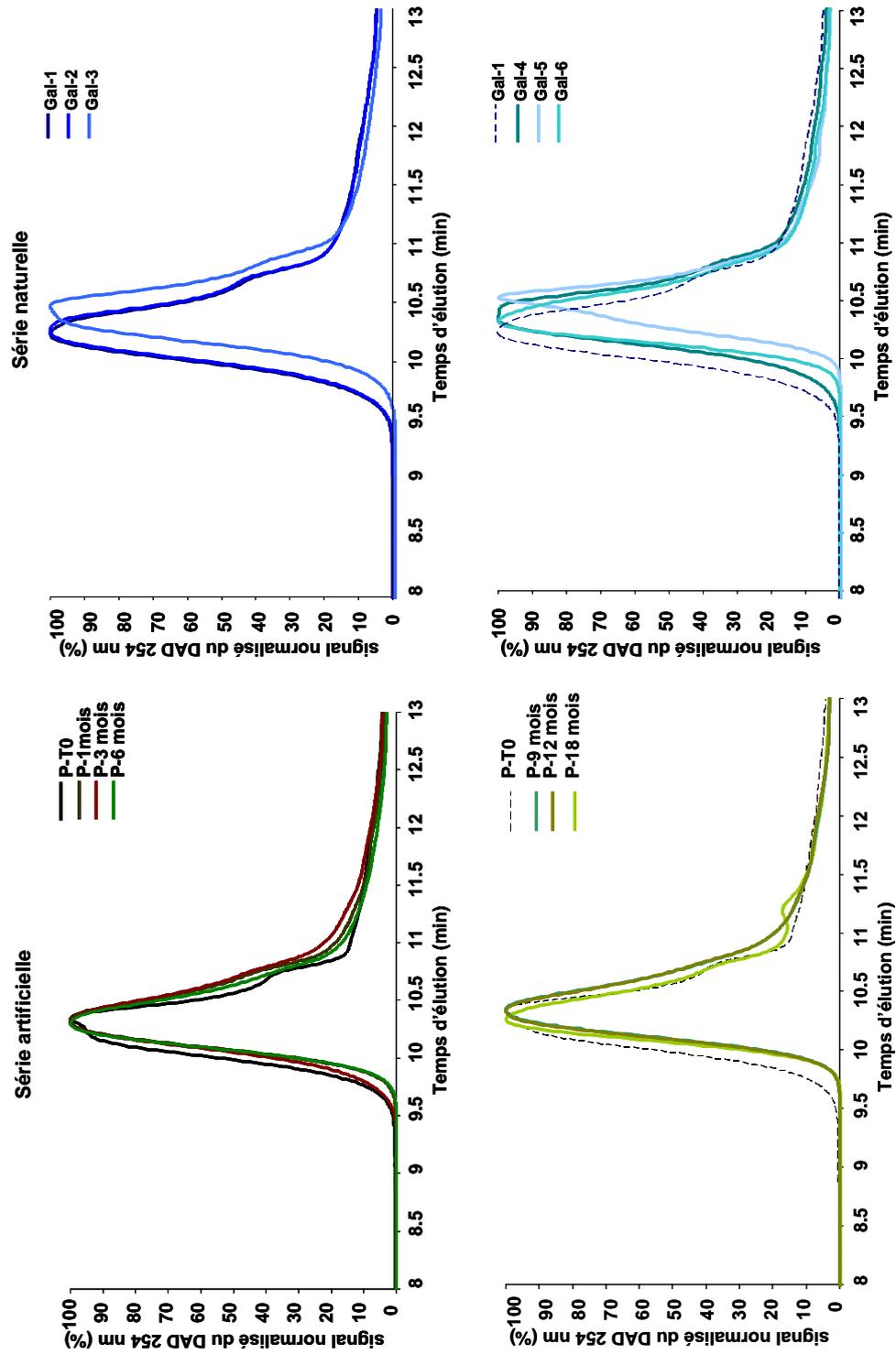


Figure 4-26 : Signal normalisé du DAD à 254 nm des eaux brutes en fonction du temps pour les échantillons de la série naturelle et artificielle.

Les spectres des eaux brutes, obtenus en APPI-QToF, présentent une distribution moléculaire unimodale, comprise entre 100 et 600 m/z et centrée sur 160 m/z (Figure 4-27). Avec un degré d'altération plus important, la distribution moléculaire se décale légèrement vers des m/z plus faibles.

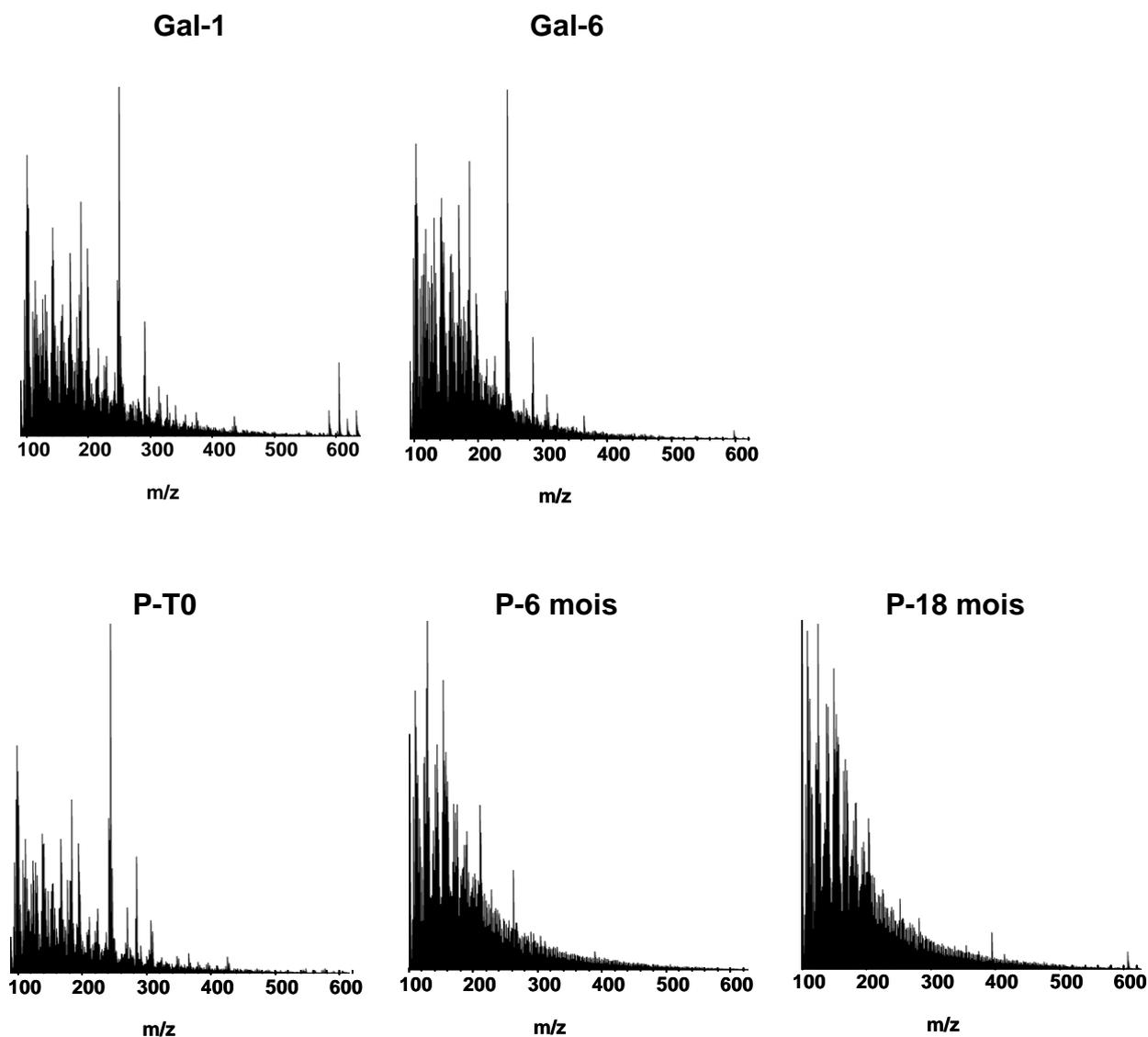


Figure 4-27 : Spectres de masse APPI (mode positif) de la MOD des eaux brutes extraite au soxhlet des échantillons Gal-1, Gal-6, P-T0, P-6 mois et P- 18mois.

#### **4.2.1.2.3. Etude de la MOD par pyrolyse flash GCMS**

Après lyophilisation, la MOD a été caractérisée par pyrolyse flash – GC-MS avec une méthylation *in-situ* (THMS-GC-MS) afin de protéger les fonctions carboxyles et hydroxyles.

Les pyrogrammes sont constitués d'une très grande diversité de composés. Les molécules aromatiques sont monocycliques et majoritairement oxygénées (Figure 4-28, Figure 4-29). La signature moléculaire des eaux des échantillons P-T0 et Gal-1 diffère légèrement avec une plus grande proportion de composés linéaires pour Gal-1 par rapport à P-T0 (Figure 4-28-A et Figure 4-29-A). Les structures linéaires sont composées, majoritairement, d'acides alcanoïques et, en plus faible proportion, de *n*-alcanes et de diacides alcanoïques. Les composés de structures aromatiques peuvent être regroupés en trois familles : les acides benzoïques avec une à quatre fonctions acides, les méthoxybenzènes et les acides méthoxy-benzoïques. Les échantillons initiaux contiennent ainsi, tous les deux, des molécules dérivant de la lignine (familles des méthoxybenzènes).

La proportion des molécules générées par pyrolyse flash évolue avec l'oxydation pour les deux séries (Figure 4-28 et Figure 4-29). La proportion des composés aromatiques augmente. De plus, la proportion des molécules avec plusieurs fonctions acides augmente au dépend des molécules avec un degré d'oxydation plus faible (molécule aromatique avec une ou des fonctions méthoxy). En parallèle, la proportion des molécules linéaires oxygénées augmente au détriment de celle des *n*-alcanes (Figure 4-28-B et Figure 4-29-B).

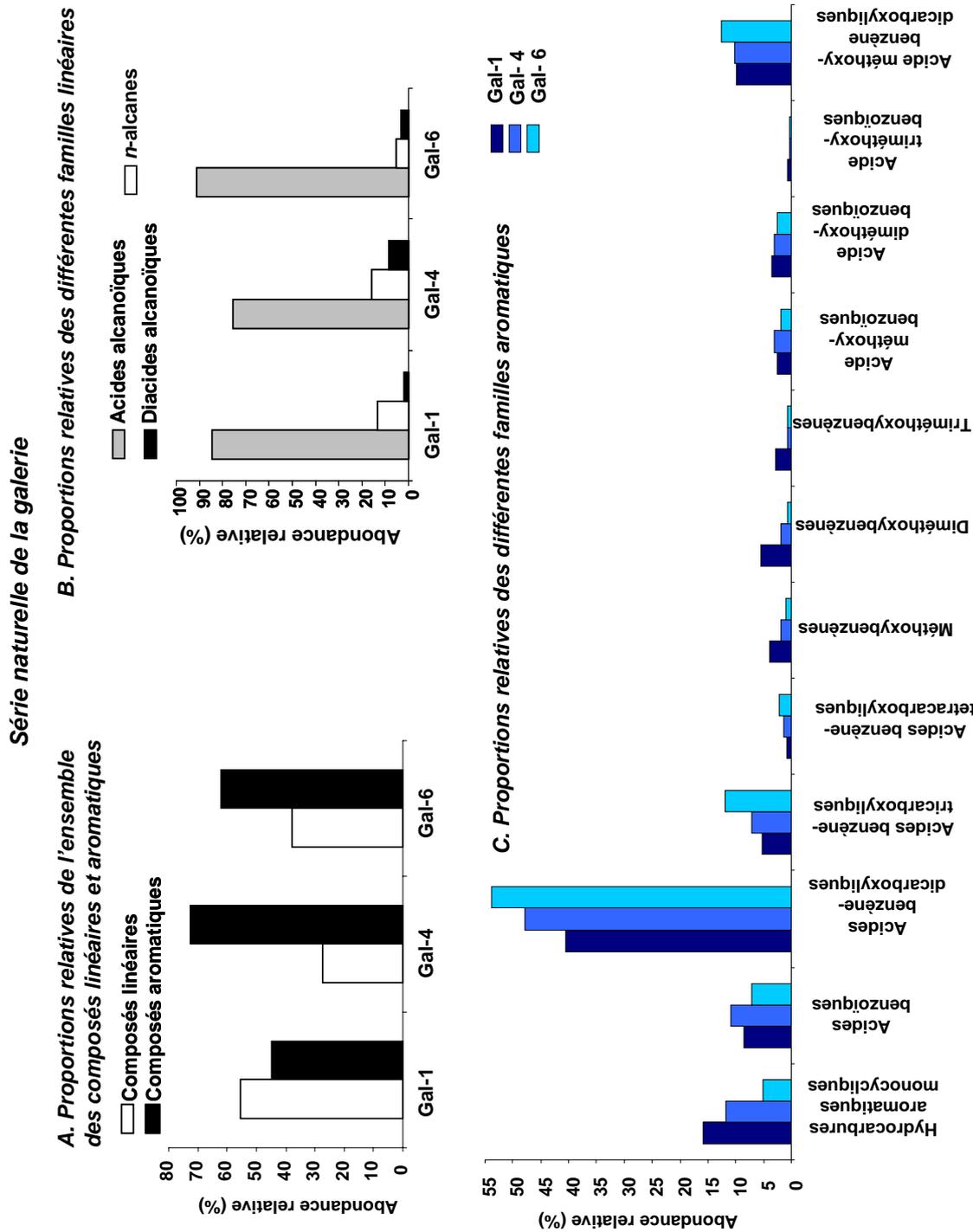


Figure 4-28 : Résultats de l'analyse des échantillons Gal-1, Gal-4 et Gal-6 en THM-GC-MS, Abondance relative A\_ de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, B\_ des différentes familles linéaires, C\_ des différentes familles de molécules aromatiques. Composés méthylés par TMAH.

Série d'oxydation artificielle

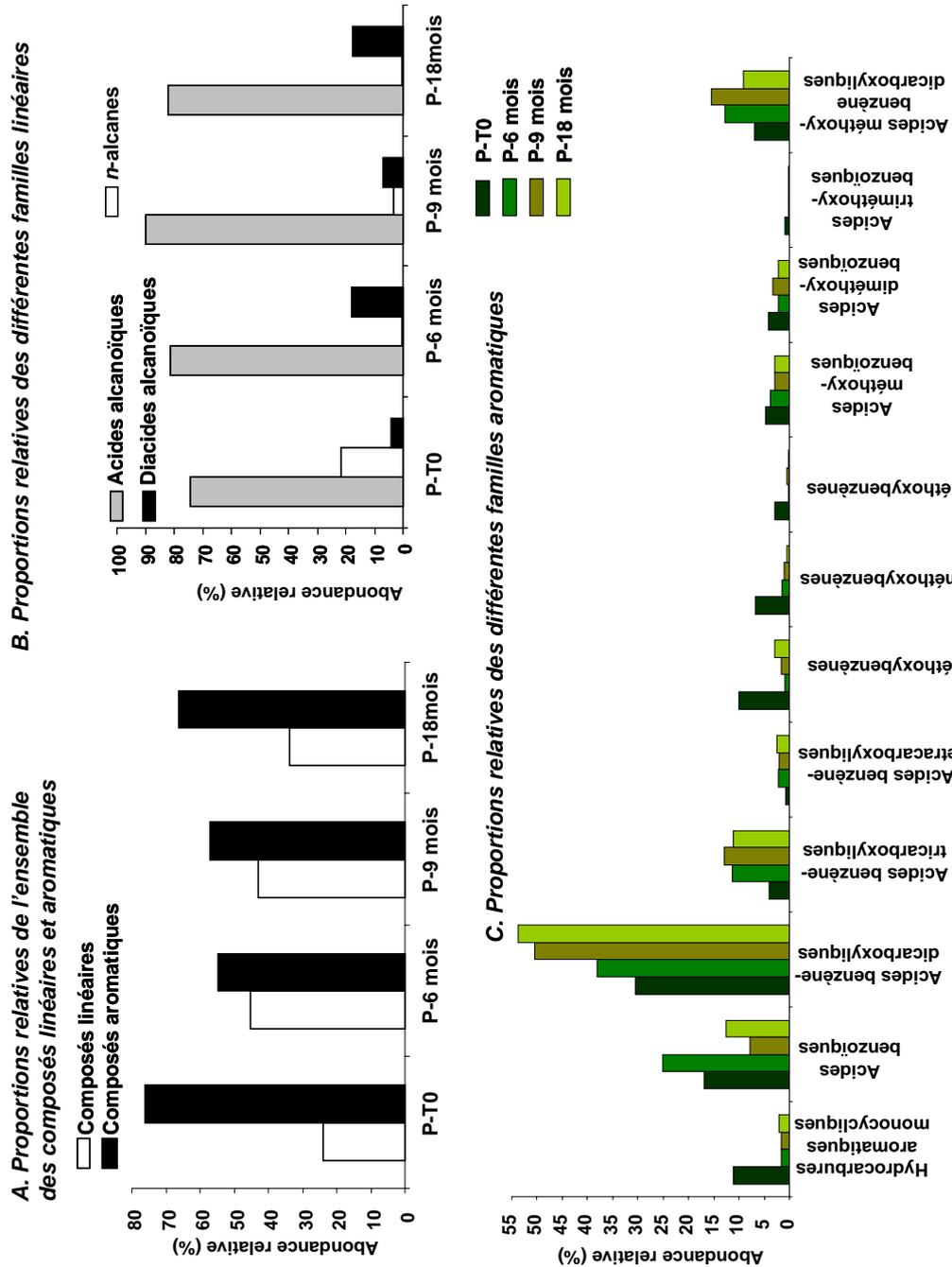


Figure 4-29 : Résultats de l'analyse des échantillons P-T0, P-6 mois, P-9 mois et P-18 mois en THM-GC-MS, Abondance relative : A\_ de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, B\_ des différentes familles linéaires, C\_ des différentes familles de molécules aromatiques. Composés méthylés par TMAH.

#### 4.2.1.2.4. Analyses spectroscopiques

##### Fluorescence 3D.

La fluorescence 3D a été utilisée ici afin d'obtenir des signatures caractéristiques des eaux issues d'échantillons non altérés (Gal-1 et P-T0) et d'échantillons altérés artificiellement et naturellement.

Les matrices d'Emission-Excitation (EEM) des eaux issues des échantillons P-T0 et Gal-1 (eaux brutes extraites au soxhlet) sont semblables (Figure 4-30) : elles présentent, toutes les deux, un massif principal (Massif n°1) ayant un maximum aux longueurs d'ondes (424 nm : 252 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ). Le signal de fluorescence ne semble pas évoluer pour la série naturelle contrairement à la série artificielle (Figure 4-30). En effet, avec l'oxydation, les EEM présentent un deuxième massif (Massif n°2) dont le maximum se situe aux longueurs d'ondes (424 nm : 310 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ). L'intensité de ce deuxième massif augmente de P-6mois à P-18mois.

Pour les fractions «fluvic like» et «humic like», les spectres de fluorescences 3D sont bien distincts (Figure 4-31). La fraction «fluvic like» présente deux massifs : le massif F1 avec un maximum aux longueurs d'ondes (424 nm :252 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ) et le massif F2 dont le maximum se situe aux longueurs d'ondes (424 nm :324 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ). La fraction «humic like» ne possède qu'un seul massif principal (H1), avec un maximum aux longueurs d'ondes (440 nm :267 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ). Les spectres 3D de ces différentes fractions (« humic like » et « fulvic like ») n'évoluent pas pour les deux séries au cours de l'oxydation. Toutefois, il est bon de rappeler que leur proportion évolue : augmentation de la proportion des « fulvic like » jusqu'à disparition totale de la fraction « humic like » pour les échantillons les plus oxydés aussi bien pour la série artificielle que naturelle (Gal-6 et P-18mois).

**Par ailleurs, il est important de noter que des spectres de fluorescences ont été réalisés sur les eaux provenant des deux modes d'extractions « leaching » et soxhlet (Annexe 3). Ces spectres sont similaires et impliquent que le mode d'extraction n'affecte pas le signal.**

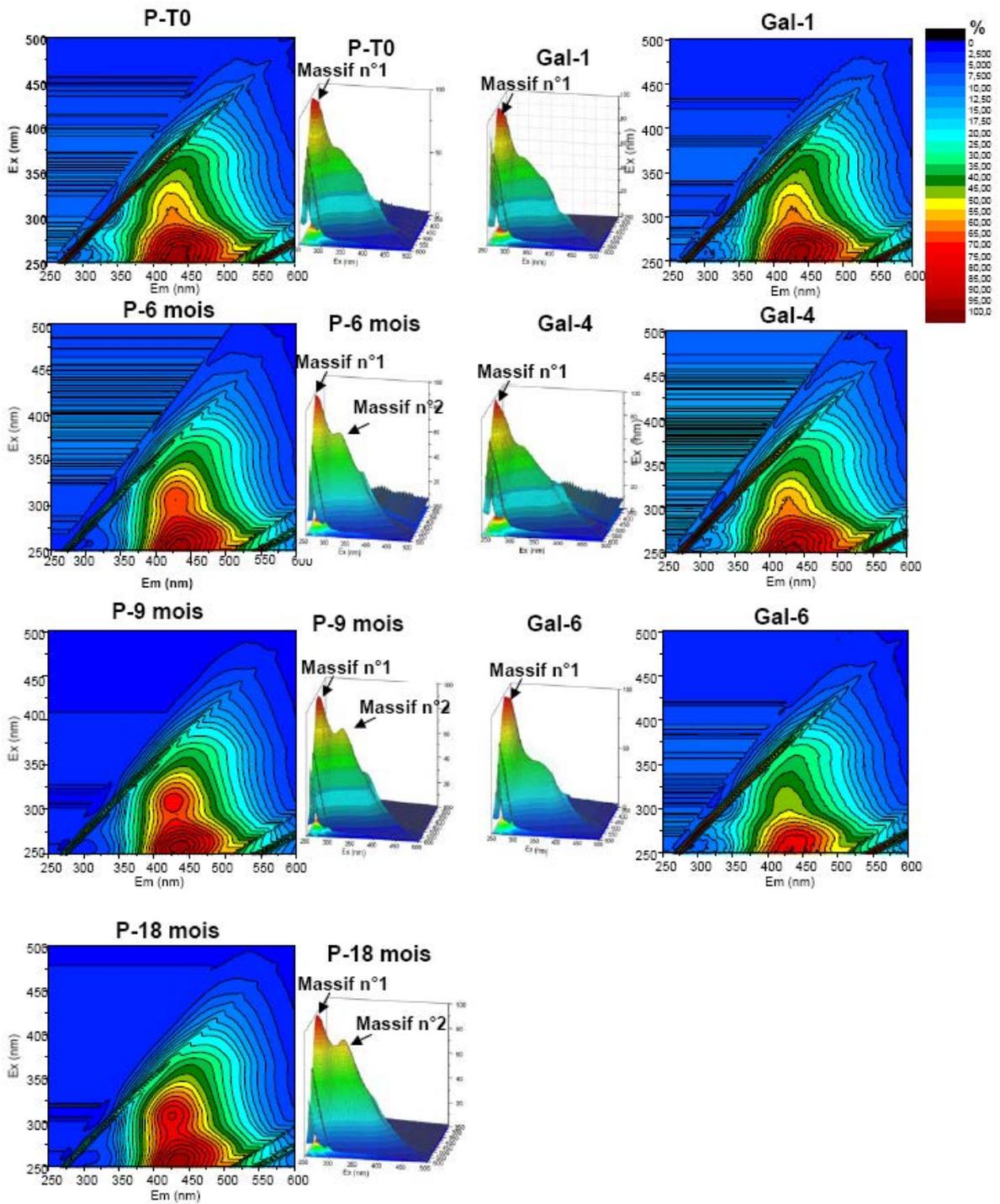


Figure 4-30 : Matrice d'Emission-Excitation des échantillons P-T0, P-6 mois, P-9mois, P-18mois, Gal-1, Gal-4 et Gal-6 pour les eaux brutes, vue 2D et vue 3D. Intensité de fluorescence normalisée en %.

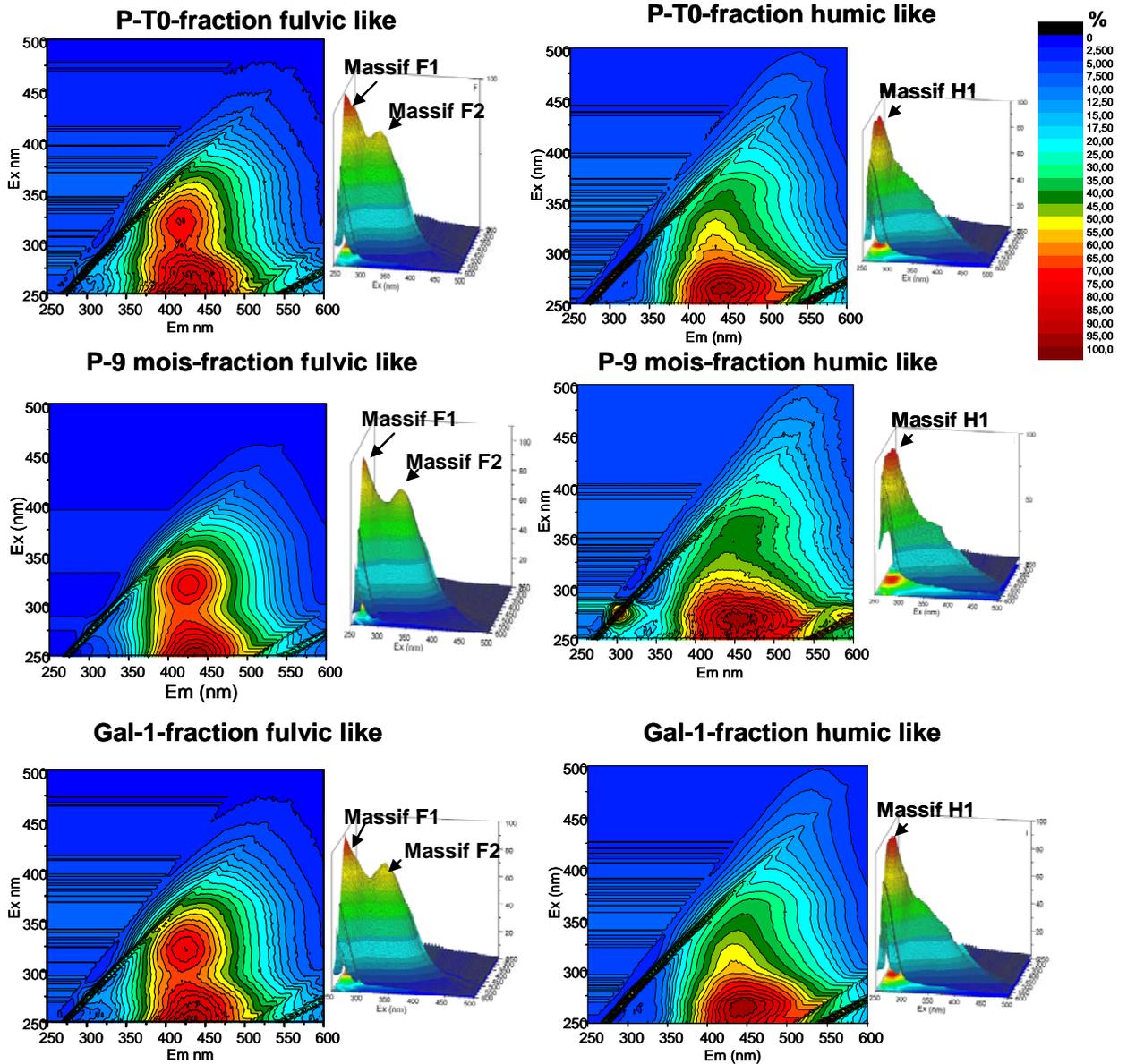


Figure 4-31 : Matrice d'Emission-Excitation des échantillons P-T0, P-9 mois, Gal-1, pour les fractions «fulvic like» et «humic like», vue 2D et vue 3D. Intensité de fluorescence normalisée en %.

Distribution des fluorophores en HPLC-SEC.

Les eaux brutes ont été analysées en HPLC-SEC avec un détecteur de fluorescence (FLD) à la longueur d'onde d'émission 424 nm. Ce détecteur a été, en particulier, utilisé afin d'obtenir une information sur les distributions de masses moléculaires des fluorophores observés en fluorescence 3D. Comme pour la fluorescence 3D, les mesures par HPLC-SEC ont été effectuées sur les eaux issues des deux modes d'extraction (« leaching » et soxhlet). Les résultats sont comparables (Annexe 3).

Les fluorophores peuvent être répartis en deux groupes de masses distinctes (Figure 4-32) : le premier groupe (G1) élué à 10.4 min, et le deuxième à 11.8 min (G2) ; le groupe G2 correspondant, donc, à des composés de masse moléculaire de plus petit poids que ceux du groupe G1. Chaque groupe contient deux fluorophores, un premier (a et c) qui fluoresce à courte longueur d'onde d'excitation (250-290 nm) et un deuxième (b et d) qui fluoresce à plus haute longueur d'onde d'excitation (300-350 nm).

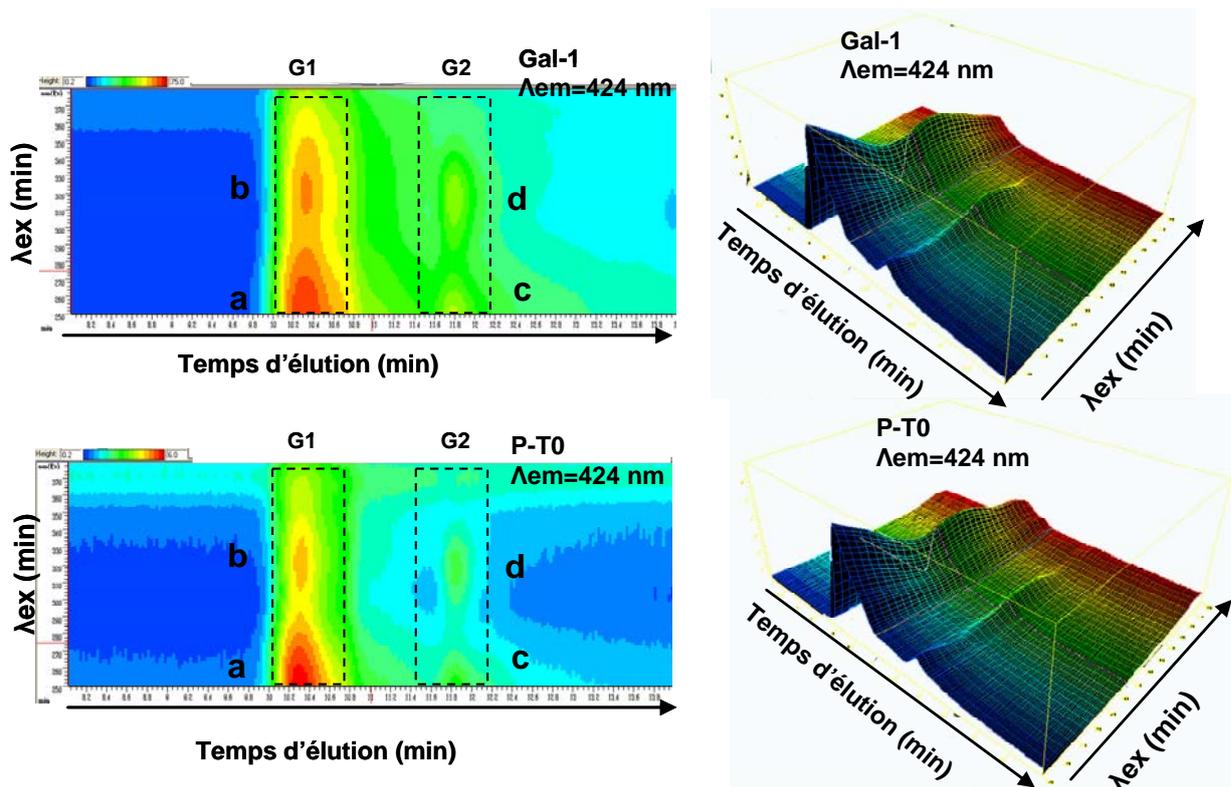


Figure 4-32 : Isoplot et vue 3D du signal d'excitation obtenu par le FLD à  $\lambda_{em}=424$  nm, pour les eaux brutes des échantillons P-T0 et Gal-1.

Les rapports des intensités maximales des fluorophores a/c (avec le maximum compris entre  $t=10$  min-11 min), à  $\lambda_{ex} = 252$  nm, ainsi que b/d (avec le maximum compris entre  $t=11.5$  min-12.5 min), à  $\lambda_{ex} = 310$  nm, ont été calculés (Tableau 4-11). Les deux rapports

diminuent pour les deux séries au cours de l'oxydation, en particulier le rapport b/d, ce qui révèle une augmentation de l'intensité de fluorescence des fluorophores du groupe G2 avec l'altération de la galerie et l'oxydation artificielle.

	a/c	b/d
<b>Série artificielle</b>		
<b>P-T0</b>	3.47	2.72
<b>P- 18 mois</b>	3.36	2.43
<b>Série naturelle</b>		
<b>Gal-1</b>	3.63	2.67
<b>Gal-6</b>	2.90	2.04

$$\frac{a}{c} = \frac{\max \text{ Intensité}(tps10-11 \text{ min}) \quad \lambda_{ex} = 252nm}{\max \text{ Intensité}(tps11.5-12.5 \text{ min}) \quad \lambda_{ex} = 252nm}$$

$$\frac{b}{d} = \frac{\max \text{ Intensité}(tps10-11 \text{ min}) \quad \lambda_{ex} = 310nm}{\max \text{ Intensité}(tps11.5-12.5 \text{ min}) \quad \lambda_{ex} = 310nm}$$

Tableau 4-11 : Formules et valeur des rapports a/c, à  $\lambda_{ex} = 252 \text{ nm}$ , et b/d, à  $\lambda_{ex} = 310 \text{ nm}$  pour les eaux brutes des échantillons de la série artificielle et naturelle.

### Microscopie infrarouge à transformée de Fourier ( IRTF).

Une partie des eaux issues des échantillons des séries naturelle (Gal-1, Gal-4 et Gal-6) et artificielle (P-T0, P-6mois et P-18mois) a été analysée par microscopie infrarouge à transformée de Fourier (Figure 4-33 et Figure 4-34). Les eaux brutes ont été, préalablement, traitées par SPE, afin de retirer les sels des solutions. Cependant, comme cela a déjà été abordé dans le chapitre 3 (cf. paragraphe 3.4.2.2.), il s'avère que cette méthode ne permet pas d'éliminer la totalité des sels. C'est pourquoi, les spectres infrarouges présentent plusieurs bandes inorganiques dues à la présence de sulfates et de carbonates. Malgré cela, il est possible d'observer certaines bandes organiques, notamment les bandes correspondant aux élongations aliphatiques ( $\nu_{CH}$ ,  $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\nu_{C=O}$  et  $\nu_{C=C}$  ( $1800-1600 \text{ cm}^{-1}$ ). Les aires des massifs  $\nu_{C=O}$  ( $1800-1670 \text{ cm}^{-1}$ ) et  $\nu_{C=C}$  ( $1660-1580 \text{ cm}^{-1}$ ) ont été intégrées et le rapport  $\nu_{C=O}/\nu_{C=C}$  calculé (Tableau 4-12). Les bandes des massifs  $\nu_{CH}$  aliphatiques n'ont pas été intégrées ( $\nu_{CH}$ ,  $3000-2800 \text{ cm}^{-1}$ ), car les bandes inorganiques des sulfates, combinées avec la bande  $\nu_{OH}$ , ne permettent pas d'obtenir une ligne de base correcte. Pour tous les échantillons, le massif  $\nu_{C=O}$  domine le massif  $\nu_{C=C}$  ; avec l'oxydation, le rapport  $\nu_{C=O}/\nu_{C=C}$  augmente pour les deux séries. Cette augmentation suggère un enrichissement relatif en oxygène de la MOD avec l'oxydation.

	<b>Aire v C=O /Aire v C=C</b>
<b>P-T0</b>	1.49
<b>P-6 mois</b>	1.57
<b>P-18 mois</b>	1.68
<b>Gal-1</b>	1.10
<b>Gal-4</b>	1.33
<b>Gal-6</b>	2.29

Tableau 4-12 : Valeur du rapport  $vC=O/vC=C$  pour les eaux brutes traitées par SPE des échantillons Gal-1, Gal-4, Gal-6, P-T0, P-6mois et P-18mois.

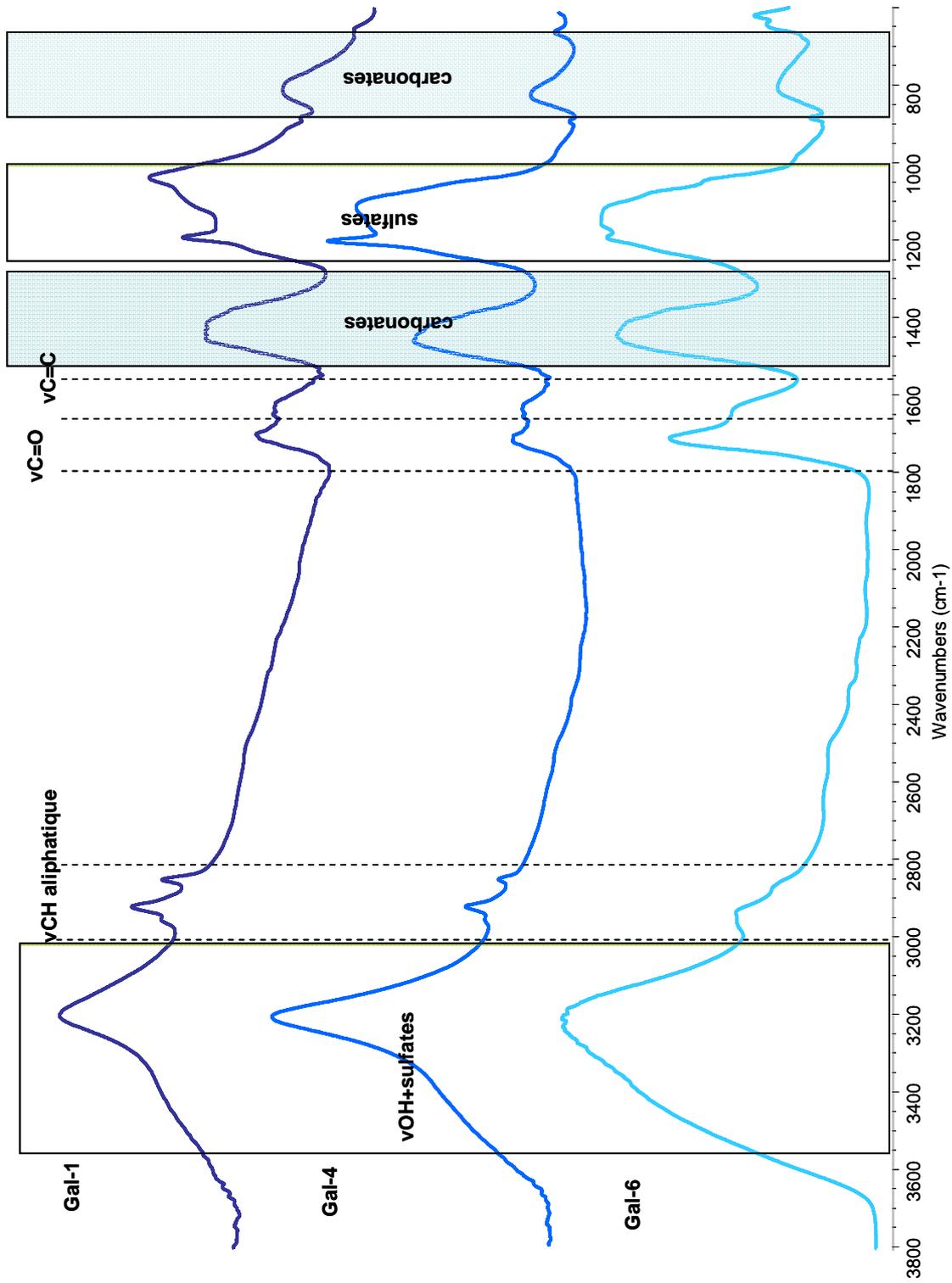


Figure 4-33 : Spectres infrarouges des eaux brutes traitées par SPE des échantillons Gal-1, Gal-4 et Gal-6.

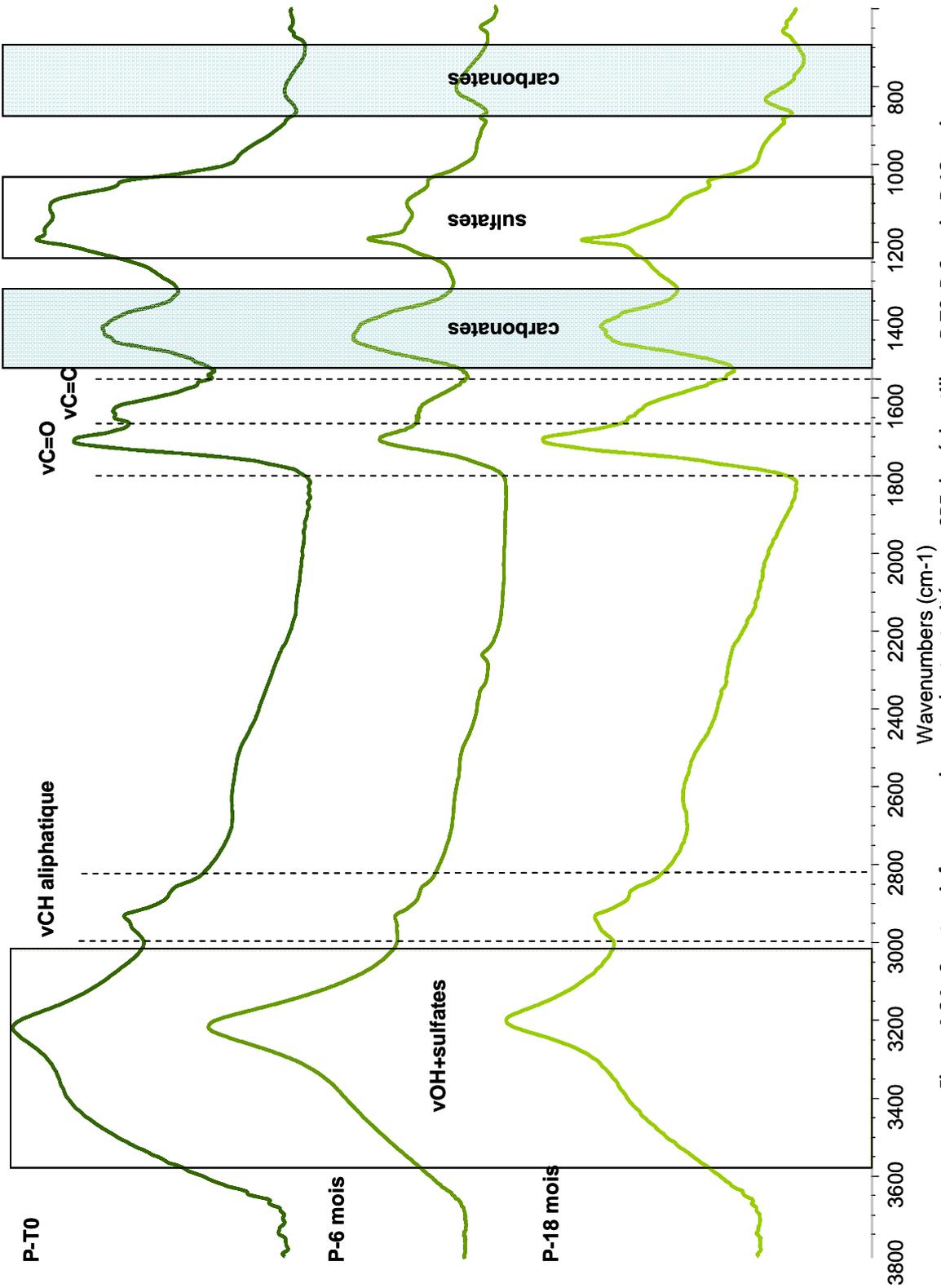


Figure 4-34 : Spectres infrarouges des eaux brutes traitées par SPE des échantillons P-T0, P-6 mois, P-18 mois.

### 4.2.1.3. Discussion

#### 4.2.1.3.1. Nature de la MOD des échantillons initiaux

##### Quantification.

Contrairement à la MOE qui représente seulement 2 % du COT (paragraphe 4.1.1.3.), la MOD des échantillons P-T0 et Gal-1 représente une fraction importante du carbone organique total avec respectivement 6.48% et 5.07% (Tableau 4-8).

##### Taille moléculaire.

Le fractionnement par dialyse permet d'évaluer la distribution massique du COD et révèle que cette fraction est majoritairement constituée de structure de taille inférieure à 3,5 kDa (60 à 75%, Tableau 4-10).

En revanche, les données issues de l'APPI-Qtof montrent des distributions massiques plus limitées, comprises entre 100 et 600 m/z. D'après Moulin *et al.* (2001) et Plancque *et al.* (2001) la matière organique de la formation de Boom est généralement une, voir deux fois, chargée lors de l'ionisation préalable à la spectrométrie de masse haute résolution (ESI-Qtof). Ceci permet de définir une gamme de masse comprise entre 100 (avec m/z=100 et z=1) et 1200 Da (avec m/z=600 et z=2) pour la matière organique s'ionisant en APPI.

Les gammes de masse obtenues avec ces deux approches (dialyse et APPI-Qtof) sont, donc, différentes. Alors que la dialyse permet de préserver au mieux le mode d'organisation des composés organiques (organisation supramoléculaire – cf. 1.3.3.3), les analyses réalisées par APPI-Qtof, et notamment l'étape d'ionisation (même douce), peuvent entraîner des fragmentations. Ainsi, la source APPI peut fortement affecter le mode d'organisation de la MOD, car la température de nébulisation (450°C dans le cadre de ce travail) est élevée (D'Andrilli *et al.*, 2010). Ainsi, les spectres de masse obtenus par APPI-Qtof sont probablement révélateurs des « unités de bases » de la MOD et non pas de son organisation.

Ces deux voies d'approches analytiques sont, donc, complémentaires et font apparaître une MOD constituée d'« unités de base » de masse comprises entre 100 et 1200 Da, alors que la dialyse montre que plus de 25% de cette MOD est organisé en structure supramoléculaire de taille supérieure à 3500 Da.

### Signature spectrale.

La fluorescence 3D des eaux brutes des échantillons initiaux (P-T0 et Gal-1) révèle la présence d'un massif principal (Massif n°1) dont le maximum fluoresce aux longueurs d'ondes (424 nm : 252 nm,  $\lambda_{em}$  :  $\lambda_{ex}$ ). En revanche, l'analyse des fractions «humic like» et «fluvic like» préalablement isolées présente trois massifs H1, F1 et F2 (Figure 4-30 et Figure 4-31). Ces massifs correspondent, dans la littérature traitant des matières organiques récentes, aux substances humiques (Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000). Les EEM ne présentent pas de fluorophores de type protéique ou marin (Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000). Les analyses d'exclusion stérique permettent de décrire plus précisément les fluorophores émettant à  $\lambda_{em} = 424$  nm : ils sont constitués de deux groupes de molécules de masses distinctes (G1 et G2) (Figure 4-32).

### Structure chimique de la MOD.

Les analyses par PyGCMS et IRTF de la MOD des échantillons Gal-1 et P-T0 révèlent une structure aliphatique et aromatique (PyGC-MS, Figure 4-28, Figure 4-29 et IRTF, Figure 4-33, Figure 4-34). Les analyses en PyGC-MS donnent des informations plus précises sur les fonctions chimiques présentes dans les échantillons initiaux. Les structures aliphatiques sont, essentiellement, représentées par des acides alcanoniques, alors que les structures aromatiques sont, essentiellement, monocycliques et présentent des fonctions acides et méthoxy. Une partie de ces molécules aromatiques peut être associée à des dérivés de la lignine (structure syringyle, p-hydroxyphenyle et guaiacyle, Hatcher *et al.*, 1995).

L'ensemble des analyses réalisées sur la MOD de Gal-1 et P-T0 révèle globalement une composition très proche pour les deux échantillons. Les données décrivent une MOD caractérisée par une origine majoritairement terrestre, ce qui est en accord avec les données Rock Eval et géochimiques présentées dans la partie 4.1 de ce chapitre. Certaines différences de caractéristiques observées pour les deux échantillons (notamment dialyse et % de COD par rapport au COT de la roche) sont probablement associées à une différence de concentration du carbone organique dans sa globalité. En effet, il a été montré, dans la partie 4.1, que les deux échantillons initiaux n'étaient pas strictement les mêmes d'un point de vue géochimique (valeurs COT, IH, IO, Tableau 4-2), ce qui peut expliquer ces légères différences observées, mais qui restent, somme toute, mineures.

#### **4.2.1.3.2. Evolution de la MOD avec l'oxydation**

##### **Effet de l'oxydation sur le COD.**

Tout d'abord, il est important de retenir qu'en l'absence d'oxygène de l'air et chauffée à 80°C, pendant un an, la MO ne génère pas de composés organiques hydrosolubles supplémentaires (échantillon témoin P-Arg-12mois, Tableau 4-8). Ceci souligne que la température utilisée pour réaliser les oxydations expérimentales (80°C) n'influence pas le COD. L'oxydation (naturelle et artificielle) de la matière organique de la formation de Boom induit, en revanche, une forte augmentation de la quantité de matière organique dissoute avec, toutefois, pour les altérations en galerie les plus intenses (Gal-5 et Gal-6), un retour à la valeur initiale.

Ainsi, l'expérience en laboratoire reproduit fidèlement les processus affectant la MOD pour des degrés d'altérations modérés (Gal-3 et Gal-4). Pour des degrés plus importants (Gal-5 et Gal-6) un décalage important apparaît par rapport à la série artificielle (P-12 mois et P-18 mois) : on observe ainsi une plus forte production de COD en oxydation artificielle. Cette différence d'évolution peut s'expliquer principalement par la différence d'humidité du milieu au cours de l'altération :

- En oxydation expérimentale, le milieu est dépourvu d'eau (lyophilisation préalable et ventilation à 80°C en continue). Cette absence limite l'altération des phases minérales, notamment de la pyrite, et empêche tout développement de micro-organismes ;
- En conditions de galerie, une ventilation en continue est maintenue avec une humidité moyenne de 60 à 70%. Cette humidité favorise l'altération des phases minérales les plus réactives (pyrites). Les échantillons Gal-5 et Gal-6 contiennent effectivement des produits d'oxydation de la pyrite (gypse, jarosite). L'ensemble de ces réactions d'oxydation libère des protons et acidifie le milieu, ce qui peut favoriser l'oxydation de la matière organique conduisant à une minéralisation plus intense (production de CO<sub>2</sub>). Par ailleurs, cette ventilation continue avec de l'air humide peut favoriser l'apport de micro-organismes allochtones aérobies, leur développement pouvant conduire également à une minéralisation plus forte.

Même si une différence notable de quantité de MOD est observée pour les deux séries (artificielle et naturelle) pour les durées d'altération les plus importantes, nous allons voir que les autres paramètres étudiés (distribution des masses moléculaires, fonctionnalisation

et signatures spectroscopiques) restent très similaires en contexte naturel ou artificiel pour toutes les durées d'altération.

#### Effet de l'oxydation sur la distribution des masses moléculaires.

La distribution des masses observée par APPI-Qtof sur les deux séries artificielle et naturelle reste dans une gamme similaire aux échantillons bruts (P-T0 et Gal-1) comprise entre 100 et 600 m/z. Toutefois, une augmentation relative des molécules de plus faible masse moléculaire (Figure 4-27) apparaît. Ce décalage vers des masses plus faibles est également observé par HPLC-SEC (augmentation du temps de rétention - Figure 4-26). Mais ce décalage reste relativement limité. En revanche, les fractionnements par dialyse montrent des modifications importantes avec une augmentation de la proportion des structures de tailles inférieures à 3500 Da (~+20% pour les deux séries, Tableau 4-10).

Il semble, donc, que même si l'oxydation intervient peu sur la distribution en masse des « unités de base » de la MOD, les conséquences sur leur organisation est importante avec une diminution globale de la taille de leurs structures.

#### Effet de l'oxydation sur la fonctionnalisation de la MOD.

Avec l'avancée de l'oxydation (aussi bien artificielle que naturelle), les spectres infrarouges révèlent une augmentation de la fonctionnalisation de la MOD (augmentation du rapport  $\nu\text{C=O}/\nu\text{C=C}$  - Figure 4-33, Figure 4-34). Par ailleurs, les analyses moléculaires (PyGCMS) révèlent une augmentation de la proportion des molécules à haut degré d'oxydation (fonctions polyacides - Figure 4-28, Figure 4-29).

Ainsi, le décalage de la distribution de masse de la MOD vers des plus petites tailles (dialyse) et l'augmentation de la solubilité de cette MOD, indépendamment du pH (disparition de la fraction « humic like » au cours de l'oxydation), semblent être en lien direct avec la modification de la chimie des composés.

#### Effet de l'oxydation sur la signature spectroscopique (fluorescence).

Les spectres de fluorescence 3D des eaux brutes, au cours de l'oxydation artificielle, montrent l'apparition et l'intensification d'un deuxième massif (Massif n°2 424 nm : 310 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ) aux longueurs d'ondes proches de celles du massif F2 ( $\lambda_{ex}=324$  nm pour F2) observé dans la fraction « fulvic like ». L'échantillon P-18mois ne contient pas de fraction

« humic like » ; sa matrice EEM d'eau brute doit, donc, donner la même distribution des fluorophores que celle de la fraction « fulvic like » avec un massif F2, ce qui n'est pas le cas.

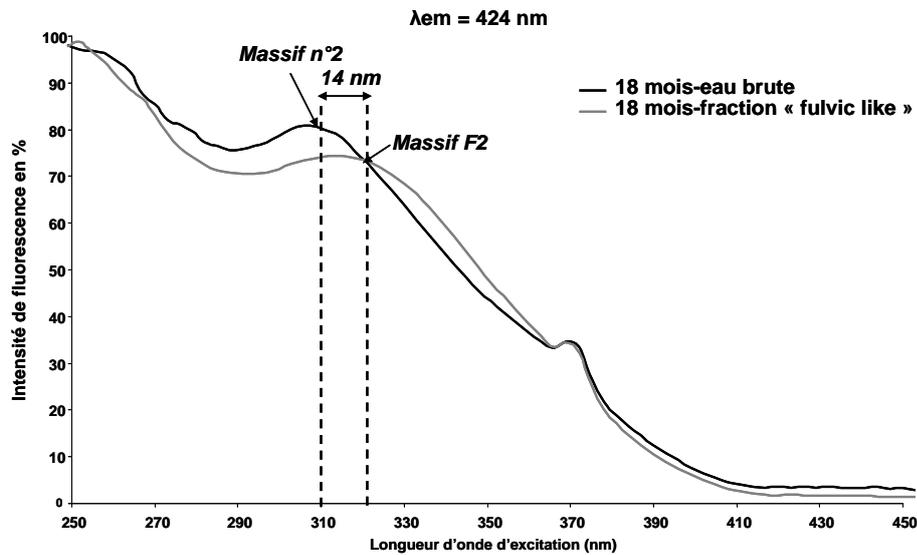


Figure 4-35 : Spectre d'excitation à  $\lambda_{em}=424$  nm pour l'eau brute et la fraction « fulvic like » de l'échantillon P-18mois.

Afin de mieux comprendre cette absence de massif F2 et la présence du Massif n°2, une extraction « humic like »/ « fulvic like » sur l'eau issue de l'échantillon P-18mois a été réalisée. Pour cette eau, aucune fraction « humic like » ne précipite et les valeurs de COD avant et après extraction restent similaires. Le spectre de fluorescence 3D (Figure 4-35) de cette fraction « fulvic like » (qui regroupe donc l'ensemble du COD de la solution initiale), révèle la présence du massif F2 (424 nm : 324 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ) alors que le Massif n°2 était présent sur l'eau brute (424 nm : 310 nm,  $\lambda_{em} : \lambda_{ex}$ ). Il semble, donc, que ce décalage de longueur d'onde d'excitation entre l'eau brute et la fraction « fulvic like » soit lié à la procédure d'isolation (modification du pH, de la force ionique...) et que, finalement, les Massifs n°2 et F2 correspondent aux mêmes fluorophores. Ainsi, les spectres de fluorescence possèdent le potentiel de suivre l'évolution de la proportion relative des fractions « humic like » et « fulvic like »

Le traitement des spectres de fluorescence 3D obtenus sur de la MOD actuelle est généralement abordé via trois indices (cf. Paragraphe 2.4.3.6.2.): l'intensité de fluorescence (McKnight *et al.*, 2001), l'indice d'humification (Zsolnay *et al.*, 1999) et l'indice biologique (Huguet *et al.*, 2009). Ils ont été construits à partir d'études ciblant de la MOD récente et naturelle (eaux de rivières, extraits de sol) et ne sont probablement pas adaptés à nos échantillons (MOD fossile) qui ont subi différentes transformations au cours de la diagénèse

et présentent, donc, une composition et par conséquent des fluorophores différents. C'est pourquoi, dans cette étude, ces indices n'ont pas été utilisés. En revanche, pour rendre compte de l'évolution du signal de fluorescence, nous avons défini deux indices calculés à partir des EEM des eaux brutes (Figure 4-36) :

- $I_1$  : il décrit la proportion en intensité du Massif n°1 (massif correspondant à la signature naturelle) par rapport à la somme des intensités des Massifs n°1 et 2 ;
- $I_2$  : il décrit la proportion en intensité du Massif n°2 par rapport à la somme des intensités des Massifs n°1 et 2. Avec l'oxydation, l'indice  $I_2$  va augmenter.

Les deux indices ont été calculés (Tableau 4-13) et les échantillons ont été placés dans un graphique  $I_1$  en fonction  $I_2$  (Figure 4-37).

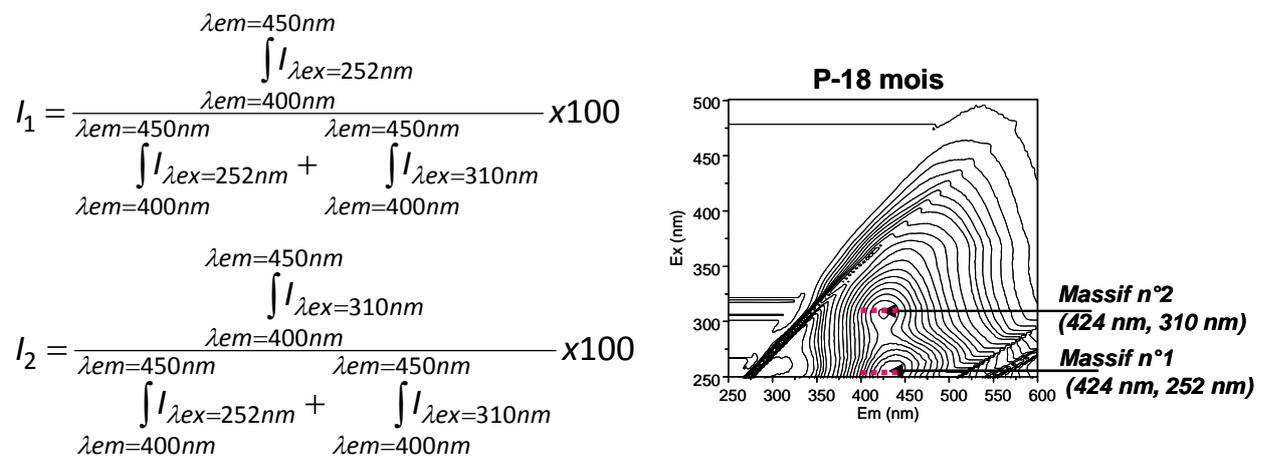


Figure 4-36 : Formules des indices  $I_1$  et  $I_2$  défini sur l'eau brute.

	$I_1$	$I_2$
<b>Série artificielle</b>		
P-T0	62.2	37.8
P-6 mois	58.5	41.5
P-9 mois	57.0	43.0
P-18 mois	55.0	45.0
<b>Série naturelle</b>		
Gal-1	62.0	38.0
Gal-4	61.8	38.2
Gal-6	60.7	39.3

Tableau 4-13 : Valeur des rapports  $I_1$  et  $I_2$  pour les eaux brutes des différents échantillons de la série naturelle et artificielle.

Les échantillons de référence P-T0 et Gal-1 se positionnent ensemble et définissent le pôle non altéré (Figure 4-37). Les échantillons oxydés de la série artificielle s'alignent selon un indice  $I_2$  croissant et un indice  $I_1$  décroissant. Les échantillons de la galerie suivent une évolution similaire, mais de manière moins marquée. De plus, la croissance du rapport  $I_2$  traduit l'augmentation de la proportion de la fraction « fulvic like » et, donc, de la solubilité de la MOD à tout pH (Figure 4-37).

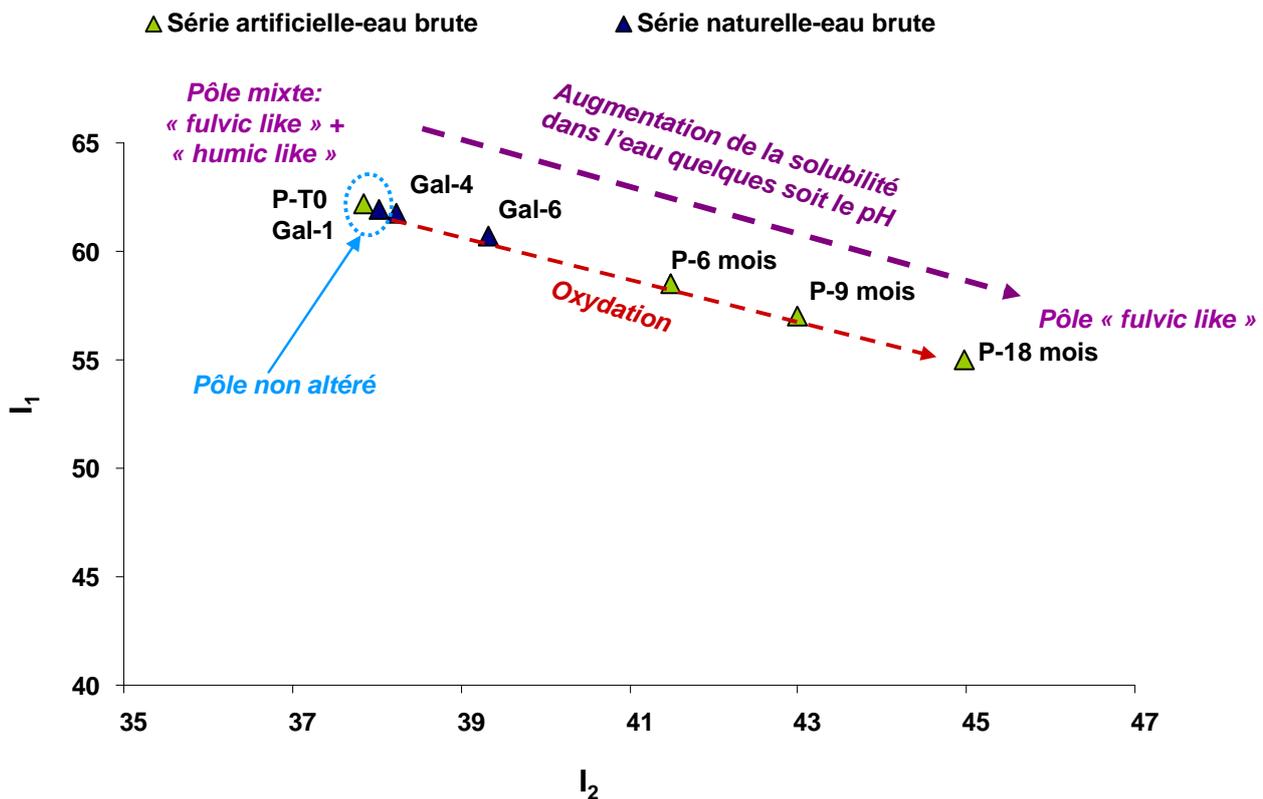


Figure 4-37 : Position des différents échantillons d'eaux brutes de la série naturelle et artificielle dans le diagramme  $I_1$  en fonction d' $I_2$ .

#### 4.2.1.3.3. Conclusion

La MOD des échantillons non altérés (P-T0 et Gal-1) représente entre 5 et 6,5% du COT. Cette MOD est constituée par des « unités de bases » de petites tailles (100 à 1200 Da) et organisées en structures supramoléculaires dont 25 à 40% sont supérieures à 3500 Da. Une signature spectroscopique par Fluorescence 3D a pu être définie pour la MOD issue de ces deux références non-altérées. Par ailleurs, les informations moléculaires révèlent que cette MOD présente des caractéristiques de MO terrestre.

Quelle que soit la série d'altération (artificielle et artificielle), la quantité de MOD augmente pour les degrés d'altération modérée. Ensuite, la teneur en MOD se stabilise pour

la série artificielle ou retourne à des valeurs voisines de celles des échantillons non altérés pour la série naturelle. Cette différence de comportement semble associée à des conditions d'altération différentes (présence d'humidité dans le cas de la série naturelle pouvant favoriser l'altération de minéraux et l'activité biologique aérobie et conduire à une minéralisation plus importante).

Même si les données quantitatives de la MOD, dans le cas des degrés d'altération élevés, sont distinctes pour les deux séries (artificielle et naturelle), les évolutions chimiques sont très proches :

- Faible diminution de taille des « unités de bases », mais diminution importante des structures supramoléculaires de taille supérieure à 3500 Da ;
- Augmentation de la fonctionnalisation de la MOD ;
- Diminution et même disparition de la fraction « humic like » ;

Enfin, les signatures spectroscopiques (fluorescence 3D), identiques pour les deux séries, montrent clairement des modifications avec l'oxydation. Deux indices ( $I_1$  et  $I_2$ ) ont été définis et permettent de classer les MOD selon leur degré d'altération (entre un pôle sain et un pôle altéré).

## 4.2.2. Conséquences de l'oxydation du kérogène sur la nature de la matière organique hydrosoluble

Dans la partie précédente (cf. paragraphe 4.2.1.), il a été démontré que l'oxydation de la MO des Argiles de Boom, incluant les trois fractions (MOE+MOD+kérogène), en présence des phases minérales, conduit à des changements majeurs sur la nature de la MOD. Ce travail a, par ailleurs, montré que même si les quantités de MOD générées au cours des altérations, naturelle et artificielle, différaient, les caractéristiques chimiques étaient très proches.

C'est pourquoi, une série complémentaire d'oxydation expérimentale a été réalisée afin de décrire, plus spécifiquement, la contribution seule du kérogène sur la quantité et la nature de la MOD.

### 4.2.2.1. Echantillons et protocole

Un prélèvement de roche, issu de l'excavation de la galerie PRACLAY (équivalent à P-T0), a été extrait afin d'éliminer à la fois la MOE (matière organique extractible au solvant organique - chloroforme) et la MOD (matière organique extractible à l'eau - MilliQ), (Figure 4-38). Suite à cette étape d'extraction, l'échantillon obtenu est constitué (i) des phases minérales et (ii) de la fraction organique insoluble (le kérogène) (Figure 4-4). Ce mode opératoire, qui diffère d'une isolation de kérogène classique (attaque acide HCl et HF), a, pour principal intérêt de conserver la phase minérale qui joue probablement un rôle majeur dans la réactivité de la MO en contexte d'oxydation (Faure et Landais, 2000; Faure *et al.*, 2003).

L'échantillon, ainsi pré-extrait, a été oxydé à l'air à 130°C pendant 62j, 114j, 139j, et 151j (échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4 respectivement). Cette température a été choisie, afin d'accélérer le processus d'oxydation et, ainsi, obtenir une vision à long terme (plusieurs décennies) des conséquences de l'oxydation du kérogène sur la MOD.

Parallèlement, un échantillon d'argile, non pré-extrait, a été oxydé pendant 62 jours à 130°C (échantillon B-T1) pour servir de référence et, notamment, évaluer les éventuels effets de la température sur la MO. De plus, l'étude de cet échantillon a permis de faciliter la déconvolution des signaux induits par l'oxydation, d'une part, du kérogène seul et, d'autre part, de la MO initialement présente. Cet échantillon B-T1 a subi le même protocole analytique que l'échantillon E-T1.

Les échantillons oxydés ont été extraits à l'aide de soxhlets, tout d'abord au chloroforme pendant 48h, puis, une fois secs, à l'eau MilliQ pendant 96h. L'extrait organique des trois premiers temps a été étudié dans la partie 4.1.3. Différentes analyses quantitatives (analyses du carbone organique dissous-COD), moléculaires (fluorescence 3D, microscopie infrarouge à transformée de Fourier, chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC)) et spectroscopiques [spectrométrie de masse haute résolution (APPI-Qtof), pyrolyse flash couplée à un chromatographe en phase gazeuse et une spectrométrie de masse (Py-GCMS)] ont été effectuées pour caractériser la MOD obtenue (Figure 4-38). Des tests de dialyse ont été conduits sur l'eau brute, c'est-à-dire l'eau filtrée à 0.45µm.

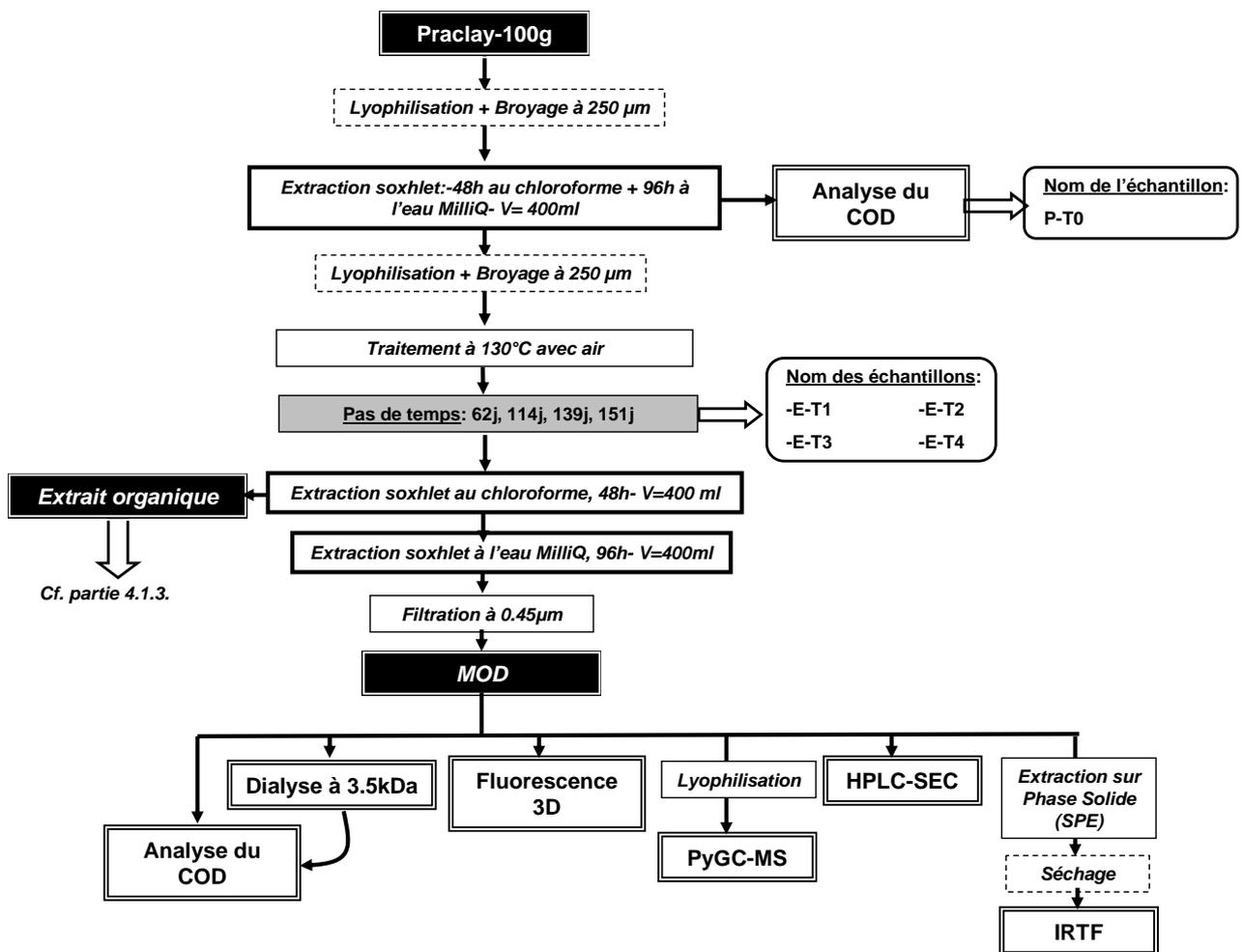


Figure 4-38 : Protocole d'analyse des échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4 avec HPLC-SEC = Chromatographie en phase liquide haute pression-exclusion stérique (cf. paragraphe 2.3.3.), PyGC-MS= Couplage Pyrolyse flash- chromatographie en phase gazeuse- Spectrométrie de masse (cf. paragraphe 2.3.2.), IRTF = microscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. paragraphe 2.4.2.).

Un fractionnement « humic like »/ « fulvic like » a été tenté sur les matières organiques hydrosolubles des échantillons de cette série, sans résultats concluants (absence de précipitation de la fraction « humic like »). C'est pourquoi, seule la fraction dite « eau brute », c'est-à-dire l'eau filtrée à 0.45µm, a été étudiée.

#### 4.2.2.2. Résultats

##### Evolution du COD.

L'échantillon non altéré (P-T0) présente une valeur de taux de COD égale à 0,52 mgC/g d'échantillon. (Tableau 4-14). Cette quantité de carbone hydrosoluble, extraite par soxhlet, correspond à 5.4 % du COT.

Les valeurs du taux de COD des échantillons préalablement extraits (kérogène seul + minéraux), et, ensuite, oxydés sont nettement plus élevées, comprises entre 4,1 et 14,8 mg de C/g d'échantillon (Tableau 4-14), le maximum étant atteint pour l'échantillon E-T2. L'échantillon B-T1, oxydé dans les mêmes conditions sans extraction préalable, montre des taux de COD nettement plus faibles (1,0 mg de C/g d'échantillon), plus proches des valeurs obtenues sur la série d'oxydation artificielle réalisée à 80°C.

<b>Masse de carbone extrait à l'eau (mgC)/gr d'échantillon</b>	
<b>P-T0</b>	0.52
<b>B-T1</b>	1.02
<b>E-T1</b>	6.57
<b>E-T2</b>	14.77
<b>E-T3</b>	5.10
<b>E-T4</b>	4.06

Tableau 4-14 : Taux de COD =masse de carbone extrait à l'eau (mg C)/gr d'échantillon des échantillons P-T0, B-T1, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.

##### Evolution de la distribution des masses moléculaires.

La distribution des masses a été étudiée à l'aide d'expériences de dialyse (seuil de coupure à 3.5 kDa) et par le suivi du signal DAD à 254 nm enregistré en HPLC-SEC (Figure 4-39 et Tableau 4-15).

Alors qu'environ 25% du COD de l'échantillon non altéré (P-T0) présentent une taille supérieure à 3500 Da, les échantillons pré-extraits et oxydés (E-Tx) ou uniquement oxydés

(B-T1) voient une forte diminution de leur proportion de COD, supérieure à 3500Da (entre 0,3 et 5,9 % du COD- Tableau 4-15).

	<b>% du COD total inférieur à 3.5kDa</b>
<b>P-T0</b>	74.93
<b>B-T1</b>	94.10
<b>E-T1</b>	99.73
<b>E-T2</b>	95.71
<b>E-T3</b>	92.87
<b>E-T4</b>	96.27

Tableau 4-15 : Pourcentage de carbone organique dissout total, de taille inférieure à 3.5 kDa, isolé par dialyse, pour les eaux brutes des échantillons P-T0, B-T1, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4 avec  $\%COD_{<3.5kDa} = ((COD_{total} - COD_{>3.5kDa}) / COD_{total}) * 100$ .

Les chromatogrammes, obtenus par chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC), montrent que l'oxydation à 130°C pendant 62 jours affecte fortement la distribution massique (Figure 4-39). Ainsi, les échantillons B-T1 et E-Tx présentent des temps d'élution plus élevés que l'échantillon P-T0, ce qui montre, donc, une diminution des poids moléculaires.

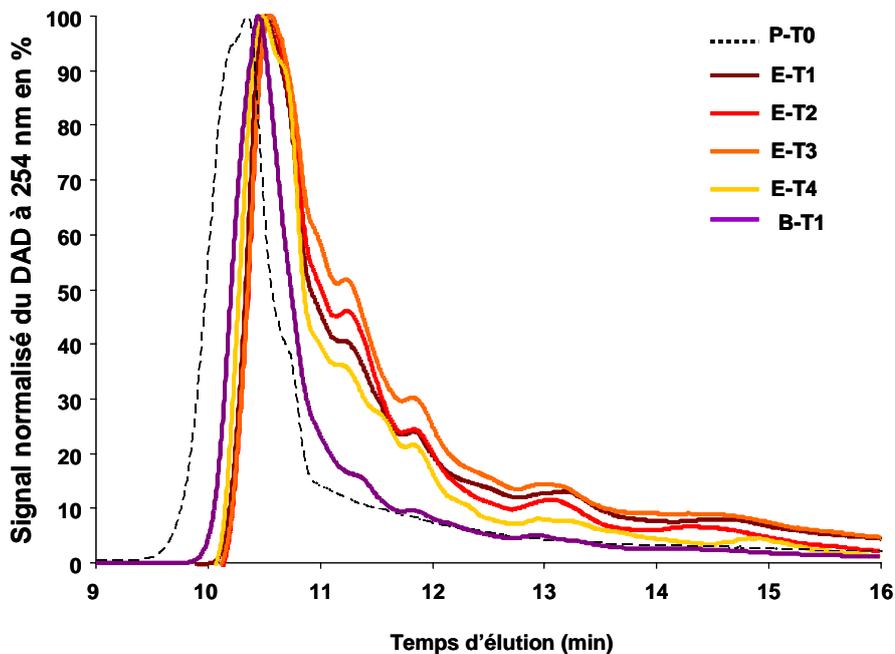


Figure 4-39 : Signal normalisé du DAD à 254 nm en fonction du temps pour les échantillons P-T0, B-T1, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.

### Composition chimique du COD.

#### **Pyrolyse flash-GCMS.**

La composition des composés générés par pyrolyse flash des échantillons P-T0 et B-T1 a été comparée à celle de la série E-Tx (Figure 4-40). Contrairement aux échantillons de la série E-Tx, ces deux échantillons contiennent des *n*-alcanes, des diacides alcanoïques en faible proportion et des hydrocarbures aromatiques non oxygénés (Figure 4-40). Par rapport à l'échantillon P-T0, la proportion des molécules aromatiques avec plusieurs fonctions acides augmente pour B-T1.

La composition des composés générés par pyrolyse flash évolue avec les temps d'oxydation pour la série E-Tx. L'abondance relative des composés aromatiques augmente de 75 à 90% et celle des composés linéaires diminue de 25 à 10% (Figure 4-40-A). La fraction linéaire est composée d'acides alcanoïques (~80%) et de diacides alcanoïques (~20%) (Figure 4-40-B), et ne contient pas de *n*-alcanes. La fraction aromatique est constituée d'une plus grande variété de familles (Figure 4-40-C). Trois groupes prédominent parmi ces molécules : les acides benzoïques, les méthoxy-benzènes et les acides benzoïques - méthoxy. Pour les degrés d'oxydation importants, la proportion des molécules portant plus d'une fonction acide augmente (par exemple les diacides benzoïques ou les diacides benzoïques - méthoxy- (Figure 4-40-C)).

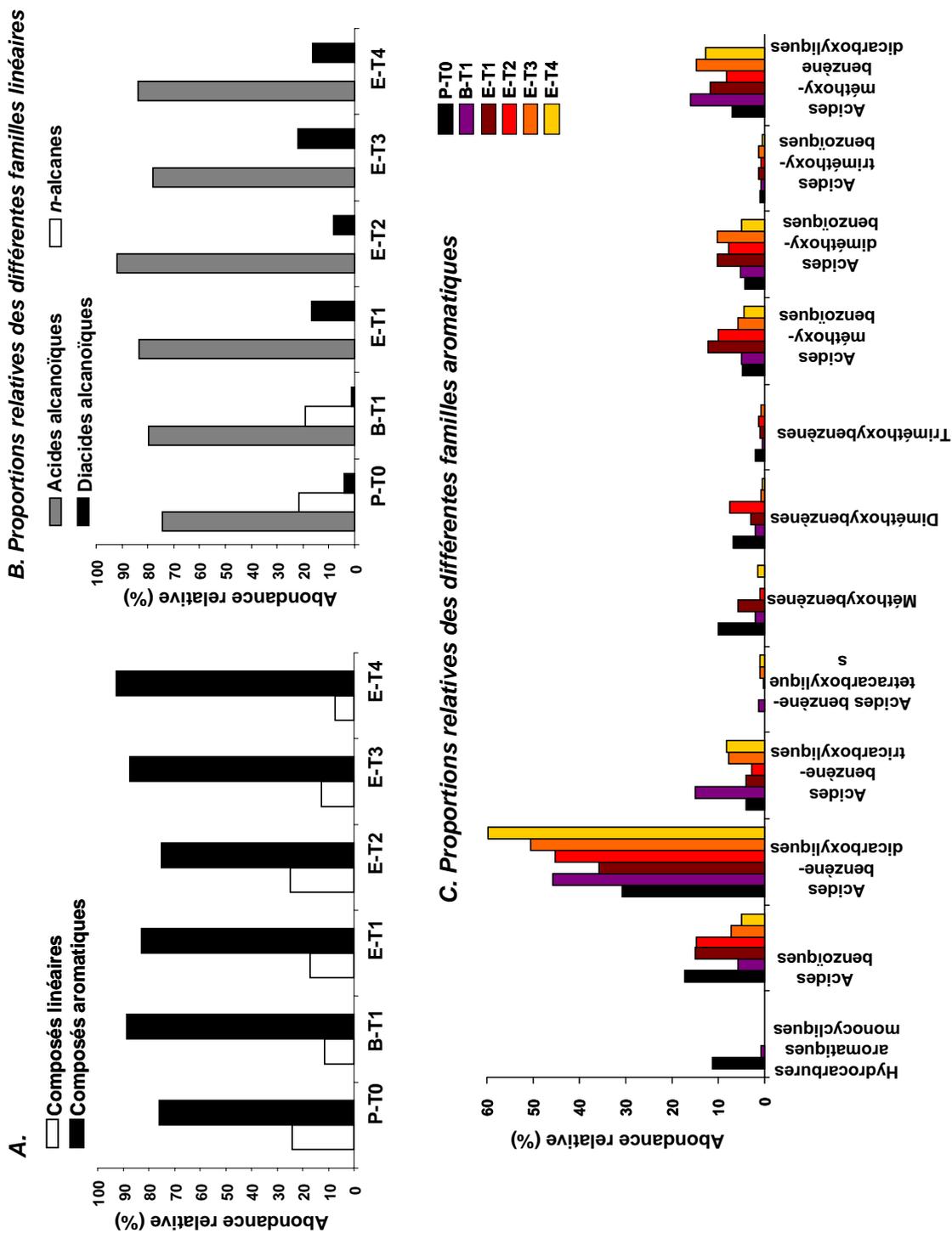


Figure 4-40 : Résultats de l'analyse des eaux brutes des échantillons E-T1 à E-T4 en THM-GC-MS. Abondance relative : A\_ de l'ensemble des composés linéaires et aromatiques, B\_ des différentes familles linéaires, C\_ des différentes familles de molécules aromatiques. Composés méthylés par TMAH.

### Microscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).

Les échantillons E-T1 et E-T4 ont été analysés, par microscopie infrarouge à transformée de Fourier. Comme pour les échantillons précédents (cf. paragraphe 4.2.1.2.4.), les spectres présentent des bandes inorganiques correspondant aux carbonates et aux sulfates (Figure 4-41). Cependant, la zone correspondant aux bandes  $\nu\text{C=O}$  et  $\nu\text{C=C}$  ( $1800\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) reste exploitable : pour l'échantillon P-T0, la bande  $\nu\text{C=O}$  domine la bande  $\nu\text{C=C}$  ; pour E-T1 (kérogène seul + minéraux), la bande  $\nu\text{C=C}$  domine la bande  $\nu\text{C=O}$  ; avec l'oxydation, l'intensité de la bande  $\nu\text{C=O}$  augmente par rapport à la bande  $\nu\text{C=C}$ . Le rapport  $\nu\text{C=O}$  sur  $\nu\text{C=C}$  a été calculé ; il est de 1.49 pour P-T0, de 0.52 pour E-T1 et de 0.95 pour E-T4. Les bandes correspondant aux elongations aliphatiques ( $\nu\text{CH ali}$ ,  $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ ) sont très peu intenses, voire absentes pour les échantillons E-T1 et E-T4.

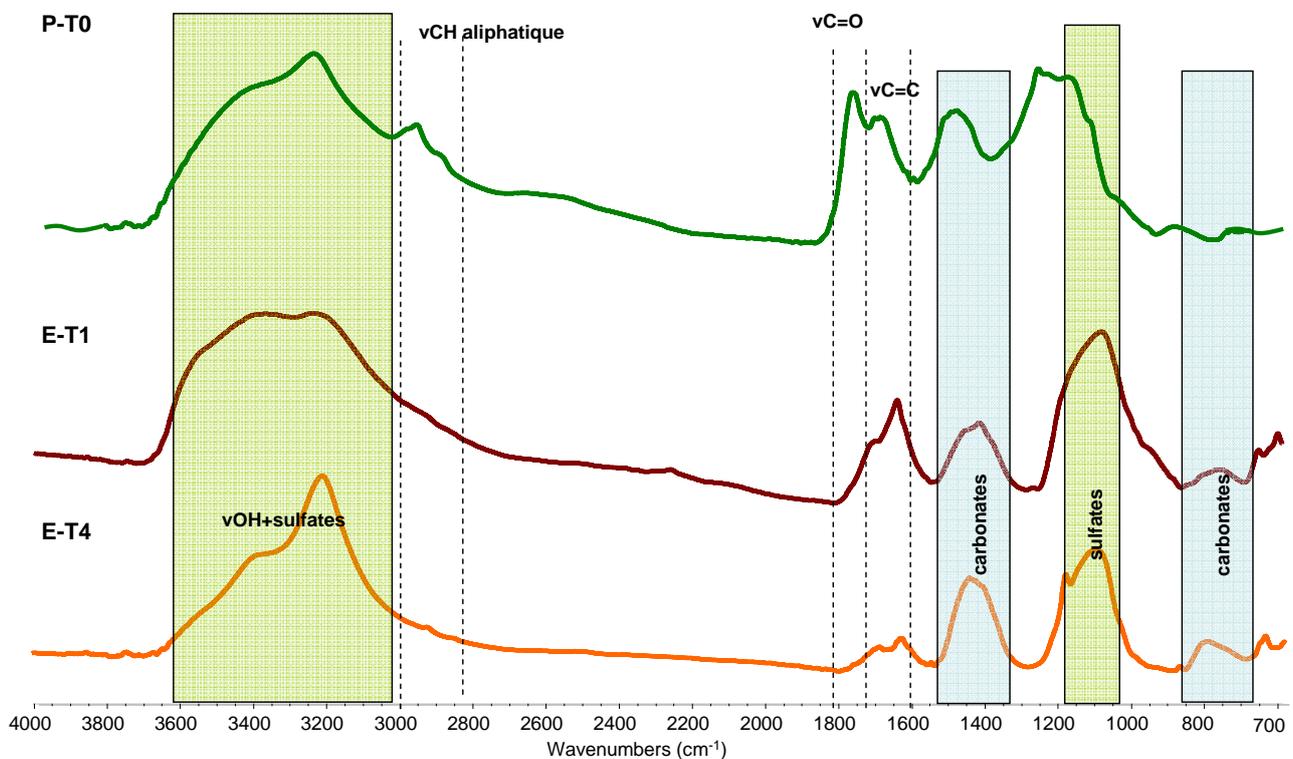


Figure 4-41 : Spectres infrarouges de la matière organique des eaux brutes de lixiviation des échantillons P-T0, E-T1 et E-T4 (kérogène seul + minéraux oxydé à  $130^{\circ}\text{C}$  pendant 62 et 151 jours respectivement).

### Signature de fluorescence.

Seules les eaux brutes ont été analysées en fluorescence 3D (pas de précipitation de fractions « humic like »). Par ailleurs, le spectre de l'eau issu de l'échantillon B-T1 n'a pas pu être réalisé.

Les matrices d'excitation et d'émission (EEM) des quatre échantillons pré-extraits et oxydés (E-Tx) sont semblables (Figure 4-42) et elles présentent deux massifs principaux. Le maximum du premier massif et le maximum du deuxième massif, tels qu'ils ont été définis précédemment (cf. paragraphe 4.2.1.2.4), se situent aux longueurs d'ondes respectivement (424 nm: 252 nm, Em : Ex) et (424 nm: 310 nm, Em : Ex). Les rapports I1 et I2 (cf. § 4.2.1.3.2) ont été calculés (Tableau 4-16) et présentent des valeurs proches de 0.50 pour l'ensemble des échantillons sans évolution notable avec le temps d'oxydation.

	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>
<b>P-T0</b>	62.2	37.8
<b>E-T1</b>	48.9	51.1
<b>E-T2</b>	52.1	47.9
<b>E-T3</b>	50.0	50.0
<b>E-T4</b>	50.3	49.7

**Tableau 4-16 : Valeur des rapports I<sub>1</sub> et I<sub>2</sub> pour les eaux brutes des échantillons P-T0, E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.**

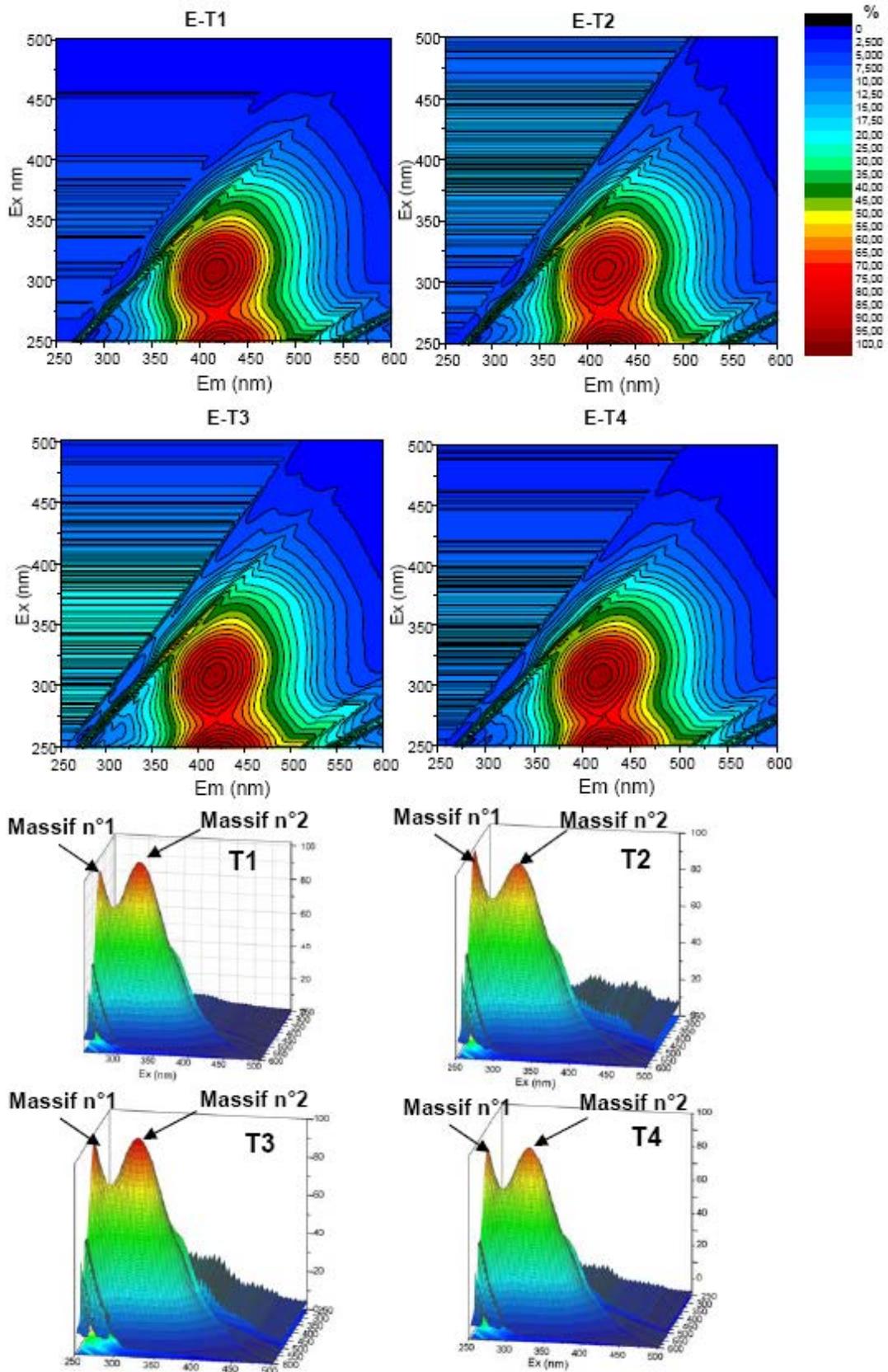


Figure 4-42 : Matrices excitation et d'émission des eaux brutes des échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4, vue 2D et vue 3D. Intensité de fluorescence normalisée en %.

**Distribution massique des fluorophores à ( $\lambda_{em}=424\text{ nm}$ ).**

Comme nous venons de le voir sur les spectres de fluorescence 3D, le Massif n°2 augmente avec l'oxydation. Pour suivre une éventuelle évolution des masses moléculaires des fluorophores correspondant au Massif n°2 en fonction de la durée d'oxydation, les eaux brutes des échantillons P-T0, B-T1, E-T1 à E-T4 ont été étudiées par HPLC-SEC (détecteur de fluorescence) en ciblant le signal à  $\lambda_{ex}=310\text{ nm}$  et  $\lambda_{em}=424\text{ nm}$  (Figure 4-43). Comme pour les résultats d'HPLC-SEC utilisant le détecteur DAD (Figure 4-39), les effets de l'oxydation conduisent à un décalage vers des temps de rétention plus importants (décalage vers des masses plus faibles). Ainsi, le Massif n°2 de l'échantillon B-T1 est principalement lié à la présence de deux familles de composés de fluorophores (temps d'élution à 10,5 et 12 min). En revanche, pour la série E-Tx, le Massif n°2 semble principalement lié à la présence des fluorophores de plus petite masse moléculaire (temps d'élution à 12 min).

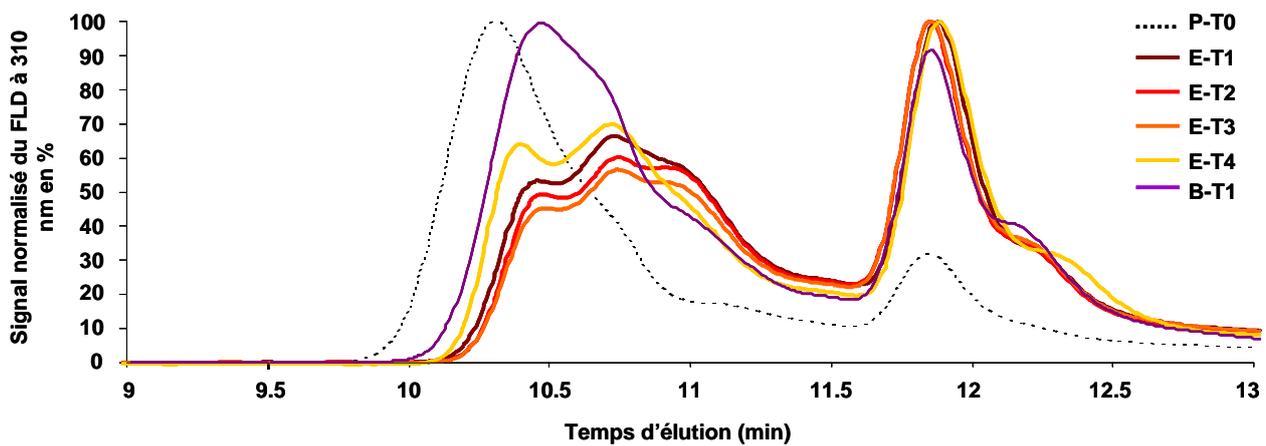


Figure 4-43 : Signal normalisé du FLD à  $\lambda_{ex}=310\text{ nm}$  et  $\lambda_{em}=424\text{ nm}$  en fonction du temps des échantillons P-T0, E-T1, E-T2, E-T3, E-T4 et B-T1.

Les rapports a/c et b/d définis au paragraphe 4.2.1.2.4. ont été calculés (Figure 4-44). L'intensité de fluorescence des fluorophores du groupe G2 est nettement plus élevée que pour les échantillons E-T1 à E-T4, comme le soulignent les rapports a/c et b/c (Figure 4-44).

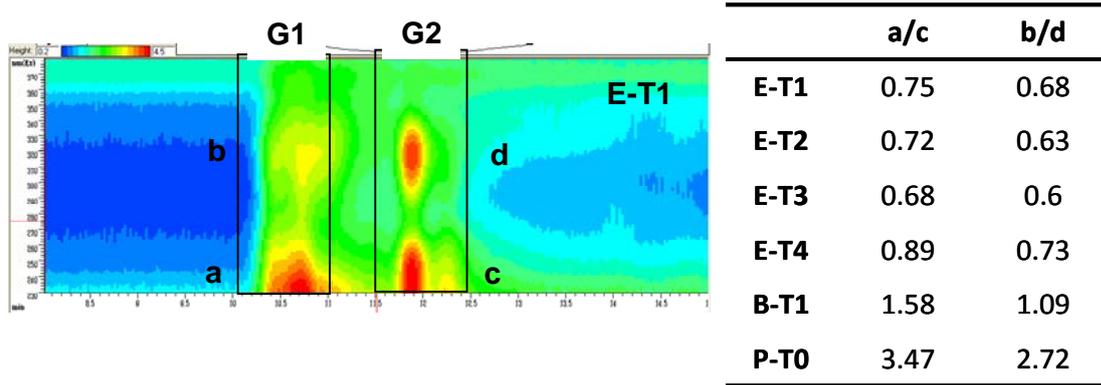


Figure 4-44 : Isoplot du signal d'excitation obtenu par le FLD à  $\lambda_{em}=424$  nm, pour l'eau brute de l'échantillon E-T1, Rapport d'intensités maximales des fluorophores a/c, à  $\lambda_{ex} = 252$  nm, et b/d, à  $\lambda_{ex} = 310$  nm pour les échantillons E-T1, E-T2, E-T3 et E-T4.

Le chromatogramme d'exclusion stérique (HPLC-SEC) obtenu sur le détecteur de fluorescence de B-T1 recouvre globalement ceux des échantillons E-Tx (Figure 4-43). L'échantillon d'eau issu de B-T1 est une combinaison (i) de la matière organique initialement présente dans l'échantillon et oxydée avec l'expérience d'oxydation et (ii) de la matière organique hydrosoluble générée par le kérogène. En revanche, le signal des échantillons E-Tx représente uniquement le signal de la MOD générée par le kérogène. Une superposition des signaux de B-T1 et de E-T1 (oxydés pendant la même durée (62 jours) et à la même température (130°C) - Figure 4-45) permet de montrer que la contribution de la MOD héritée uniquement du kérogène (signal E-T1) domine fortement la MOD obtenue sur l'échantillon incluant toutes les composantes de la MO (signal B-T1).

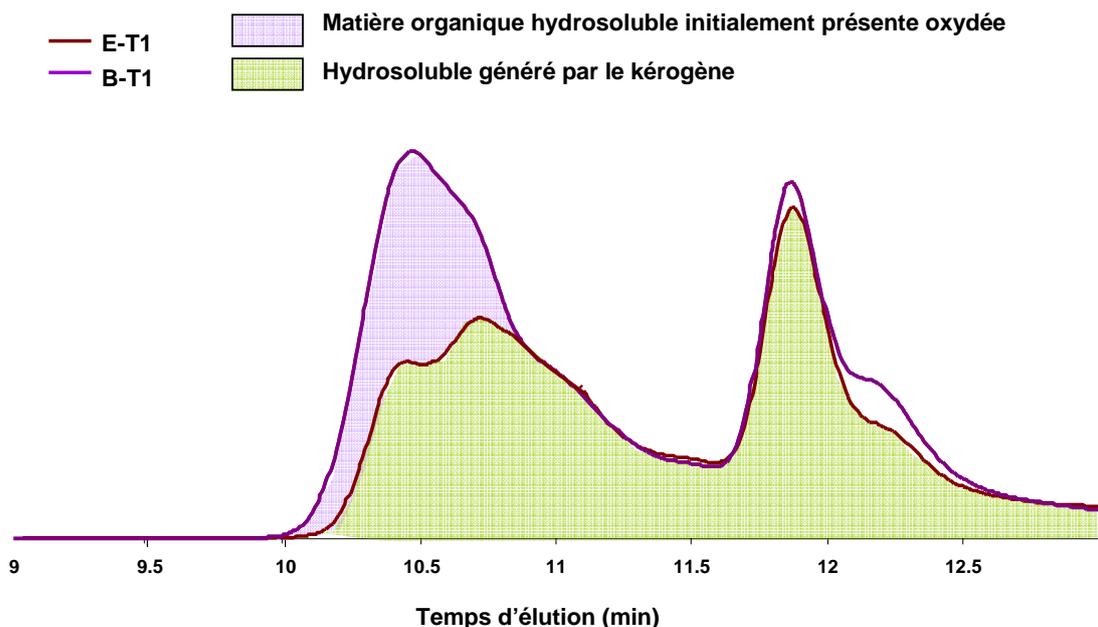


Figure 4-45: Signal du FLD à  $\lambda_{ex}=310$  nm et  $\lambda_{em}=424$  nm normalisé en fonction du temps des échantillons B-T1 et E-T1.

### 4.2.2.3. Discussion

#### Evolution du COD.

La quantité de MOD générée au cours de l'oxydation réalisée à 130°C par les échantillons pré-extraits (chloroforme – eau distillée) est nettement plus importante que celle obtenue pour l'échantillon oxydé dans les mêmes conditions, mais sans extraction préalable (au minimum 4 fois plus). Par ailleurs, la valeur de COD mesurée pour cet échantillon (B-T1) est dans la même gamme que celles de la série oxydation artificielle réalisée à 80°C (paragraphe 4.2.1). Ainsi, cette forte production de MOD de la série pré-extraite ne peut pas être due à un effet température.

Cette hausse de COD suggère une plus forte altérabilité du kérogène après les étapes de pré-extraction. Ces étapes de pré-extraction (solvant organique et eau) peuvent avoir conduit à des modifications des composantes minérales et organiques affectant directement ou indirectement le kérogène.

En effet, Deniau *et al.* (2001) ont montré, à l'aide d'études microscopiques, que la MO de la formation de Boom se trouve intimement liée aux phases minérales, (i) soit sous forme de particules au sein des argiles, (ii) soit en association avec la pyrite framboïdale. La pré-extraction de la roche peut déstabiliser certains de ces minéraux qui « protégeaient » le kérogène. Par exemple, de nombreux auteurs (Bar-On et Shainberg, 1969; Shainberg, 1973) ont montré que la lixiviation d'argiles sodiques par de l'eau distillée avait des conséquences sur leur composition chimique. Les protons de l'eau vont, à la fois, s'échanger avec les ions Na<sup>+</sup> interfoliaires et avec une partie des ions Mg<sup>2+</sup>/Al<sup>3+</sup> des octaèdres (Barshad, 1960). Avec l'altération de ces couches protectrices minérales, le contact oxygène/kérogène peut être facilité et favoriser la production de MOD. Par ailleurs, l'extraction des fractions organiques solubles (dans les solvants organiques et dans l'eau) a, probablement, contribué à libérer ou créer de la porosité au sein du kérogène et, ainsi, augmenter les surfaces d'échange avec l'oxygène de l'air.

#### Evolution de la distribution des tailles moléculaires.

Avec l'oxydation, la taille des molécules diminue. Il reste, en effet, moins de 5% du COD ayant une taille supérieure à 3500 Da avec ou sans pré-extraction. Les chromatogrammes d'exclusion stérique confirment ce décalage vers des composés de plus petites masses avec, toutefois, un décalage plus important pour les échantillons pré-extraits (E-Tx). Les fractions «humic like» des échantillons E-Tx sont inexistantes. Ce phénomène a déjà été observé, pour

les expériences réalisées à 80°C ou pour les échantillons altérés en galerie, mais pour les durées les plus importantes (P-18 mois et Gal-6).

Ainsi, les composés organiques hydrosolubles générés par le kérogène lors de son oxydation, présentent des gammes de masse plus basses que la MOD initialement présente dans la formation de Boom. Ces molécules deviennent, en outre, plus solubles quel que soit le pH du milieu.

### Fonctionnalisation de la matière organique.

La matière organique hydrosoluble libérée par le kérogène est majoritairement aromatique et très peu aliphatique (données PyGC-MS, Figure 4-40 et données IRTF, Figure 4-41). La composition moléculaire tend vers une oxygénation générale des cycles aromatiques, comme le montrent, à la fois, l'augmentation de l'intensité de la bande des  $\nu\text{C}=\text{O}$  et celle de la proportion des molécules avec des fonctions acides en PyGC-MS.

### Signature de fluorescence.

Les données de fluorescence 3D montrent que les échantillons E-Tx présentent deux massifs (Massif n°1 et Massif n°2), comme l'échantillon P-18mois oxydé plus longtemps à 80°C (Figure 4-30 et Figure 4-42). Comme il a été démontré dans le paragraphe 4.2.1.3.2, le Massif n°2, qui fluoresce aux longueurs d'ondes (424 nm: 310 nm,  $E_m : E_x$ ), correspond au massif F2 de la fraction « fulvic like ». Ces résultats confirment que le kérogène oxydé génère uniquement des produits organiques hydrosolubles appartenant au domaine de la fraction « fulvic like ». Les indices  $I_1$  et  $I_2$  calculés à partir des EEM issus des échantillons E-Tx ont été placés dans le diagramme  $I_1$  en fonction de  $I_2$  (Figure 4-46). Ces échantillons E-Tx se placent dans la continuité de la série artificielle d'oxydation réalisée à 80°C, mais dans une position extrême. Ces nouveaux échantillons permettent, ainsi, de définir un pôle caractérisé par une signature dominée par de la matière organique hydrosoluble héritée du kérogène. Ainsi, les échantillons des séries naturelle et artificielle se hiérarchisent selon une droite de mélange se situant entre un pôle non altéré et un pôle correspondant à la signature du kérogène.

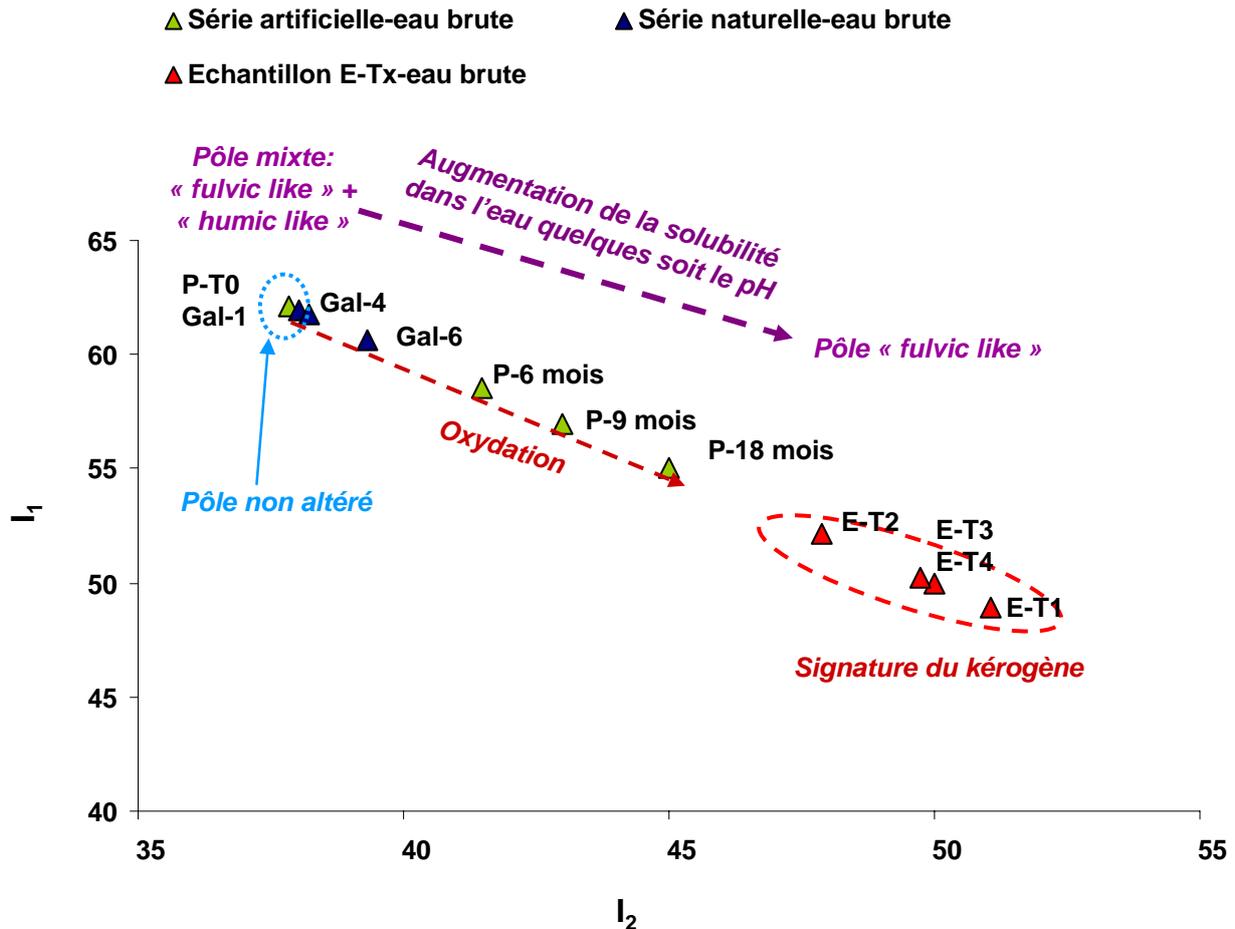


Figure 4-46 : Diagramme I<sub>1</sub> en fonction d'I<sub>2</sub> pour l'ensemble des échantillons aqueux des séries naturelles et artificielles.

### 4.3. Conclusions générales des expériences d'oxydation

L'objectif de cette partie a été d'étudier l'impact de l'oxydation sur la matière organique de la formation de Boom et son influence sur la production d'espèces organiques hydrosolubles. Pour cela, les fractions MOE, kérogène et MOD d'échantillons de la formation de Boom, prélevés dans le laboratoire souterrain de Mol, ont été étudiées. Ces échantillons ont été altérés naturellement *in situ* dans la galerie ou oxydés artificiellement en laboratoire.

#### Matière organique de la formation de Mol au niveau du laboratoire HADES.

La matière organique de l'argile de référence Praclay (P-T0) et de l'échantillon Gal-1 (galerie URL, laboratoire HADES) présente des caractéristiques géochimiques dominées par une contribution de végétaux supérieurs (kérogène de type III) et une contribution mineure de matière organique marine (révélée principalement par l'analyse des biomarqueurs). Ces échantillons appartiennent aux strates pauvres en COT de la formation de Boom (COT~1%).

La fraction organique hydrosoluble (MOD) présente dans ces échantillons représente 6% du COT, environ 3 fois plus élevée que la fraction extractible aux solvants organiques (MOE), qui représente 2% du COT. La MOE initiale est essentiellement dominée par des composés aliphatiques oxygénés alors que la MOD contient des composés aromatiques d'origine ligneux. De plus, les composés hydrosolubles de la formation de Boom sont principalement constitués d'« unités de base » comprises entre 100 et 1200 Da et organisées en structure supramoléculaire essentiellement de taille inférieure à 3.5kDa (~ 75%).

### Conséquences de l'oxydation sur la matière organique de la formation de Mol.

Les expériences d'oxydation, réalisées en laboratoire, reproduisent les effets de l'oxydation identifiés à température ambiante, en condition de galerie, à la fois sur la MOE et MOD. Ces différentes expériences ont permis d'observer le comportement des différents compartiments de la MO et leurs contributions à la production d'espèces organiques hydrosolubles suite aux processus d'oxydation.

Avec l'avancée du degré d'oxydation, le kérogène évolue et produit, d'une part, une fraction extractible au solvant organique (MOE) et, d'autre part, une fraction hydrosoluble (MOD -Figure 4-47). La MOE, générée par le kérogène au cours de l'oxydation, présente une composition essentiellement dominée par des composés aliphatiques. Elle s'ajoute à la MOE initiale qui, sous l'effet catalytique des argiles, va s'enrichir en molécules aliphatiques à chaînes courtes et oxygénées tout en préservant la signature de départ, héritée de la diagénèse. A l'opposé, la MOD générée par le kérogène, au cours de l'oxydation, présente une composition essentiellement dominée par des aromatiques oxygénées. Les propriétés chimiques des matières organiques hydrosolubles évoluent avec l'oxydation (plus de fonctionnalisation) : la MOD devient soluble dans l'eau à tout pH se rapprochant d'un pôle « fulvic like » pur. Par ailleurs, même si les effets de l'oxydation sur la MOD ne semblent pas fortement affecter les « unités de base », l'organisation supramoléculaire est modifiée avec une quasi disparition des structures de tailles supérieures à 3500 Da.

La Figure 4-47 représente, de façon conceptuelle, l'évolution de la MO de l'agile de Boom avec l'oxydation. Elle représente le rôle central du kérogène qui intervient sur les deux autres fractions organiques (MOE et MOD) en lien direct avec les phases minérales (phases argileuses notamment).

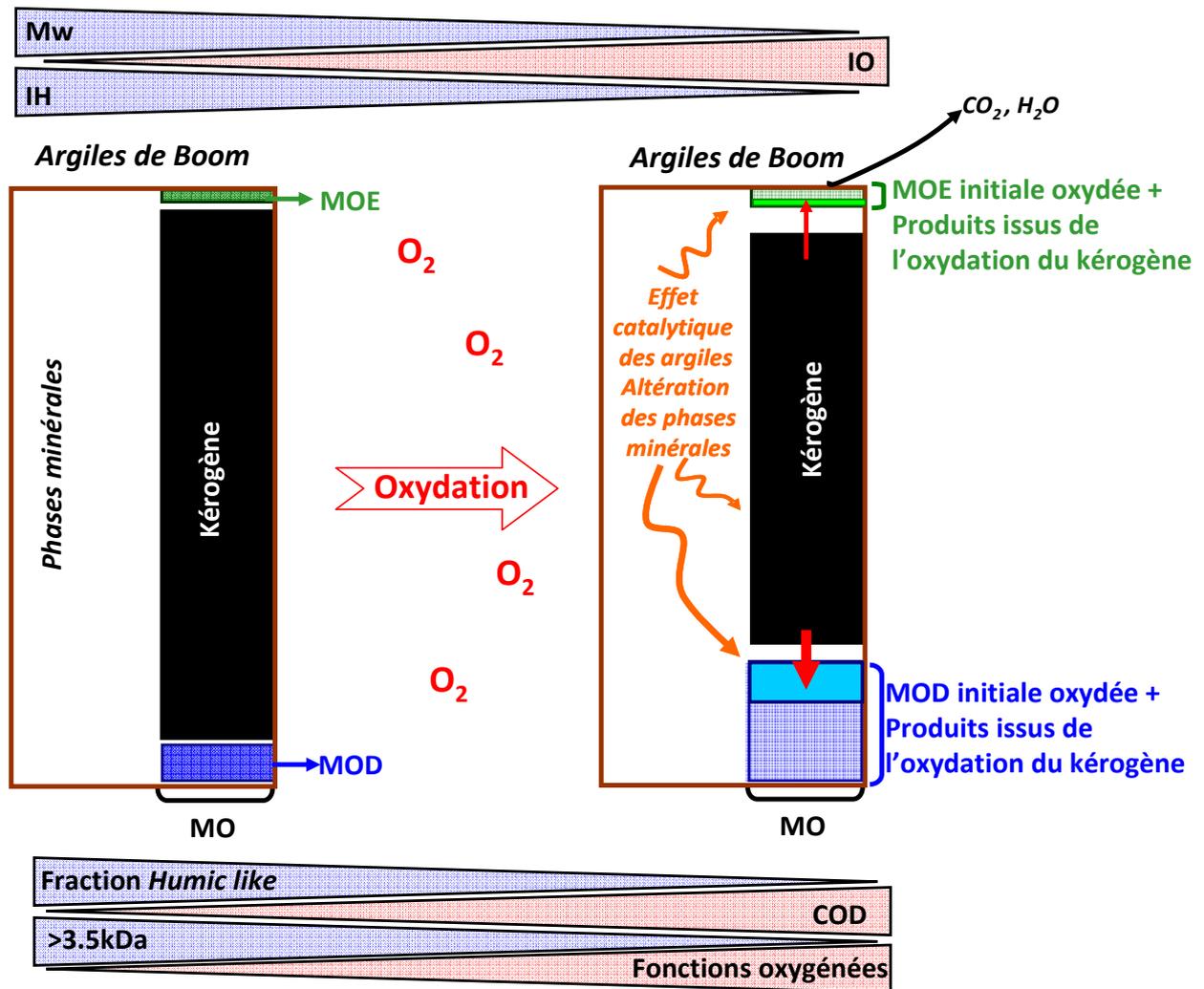


Figure 4-47 : Schéma conceptuel de l'oxydation de la matière organique de la formation de Boom.

L'ensemble des résultats obtenus sur les deux séries d'altération (naturelle *in situ* et expérimentale au laboratoire) sont comparables notamment pour la plupart des données qualitatives. Certaines différences essentiellement quantitatives (quantité de MOD générée) sont probablement dues aux conditions expérimentales utilisées. En effet, nos simulations d'oxydation en laboratoire, compte tenu de l'absence d'eau, ne reproduisent pas l'altération des phases minérales (oxydation de la pyrite et effets associés) et un éventuel rôle des micro-organismes aérobies. Ces facteurs pourraient influencer l'altération de la matière organique et, ainsi, expliquer les différences observées sur les deux séries, notamment sur les échantillons les plus altérés (Gal-5 et Gal-6).

#### Cas de la MOD des piézomètres.

Les caractéristiques moléculaires et spectroscopiques de la MOD des piézomètres (cf. Chapitre 3) sont très voisines de celles des échantillons non altérés P-T0 et Gal-1. Cette MOD

est constituée de composés de tailles limitées, contient des molécules d'origines ligneuses et présente des fluorophores typiques des substances humiques.

Les matrices d'Emission-Excitation des eaux brutes des piézomètres ressemblent à celles des échantillons P-T0 et Gal-1 et présentent un massif principal (Massif n°1). Les indices de fluorescence 3D développés, dans cette partie, ont été appliqués sur les matrices d'Emission-Excitation des échantillons des eaux de piézomètres (valeurs des indices reportés en Annexe 4). Les piézomètres sont caractérisés par un indice  $I_1$  supérieur à 0.6, ce qui les place au niveau du pôle non altéré défini à partir des expériences d'oxydation artificielles (Figure 4-48). De plus, des fractions «humic like» sont présentes dans les eaux de piézomètres, ce qui suggère des eaux, pas ou peu oxydées (les échantillons les plus oxydés sont dépourvus de fraction « humic like »).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que les signatures géochimiques actuelles de la matière organique des eaux issues des piézomètres du laboratoire de Mol ne sont pas compatibles avec une altération à l'air et, par voie de conséquence, que la roche encaissante n'a probablement pas subi d'oxydation liée à l'excavation et à la ventilation continue des galeries.

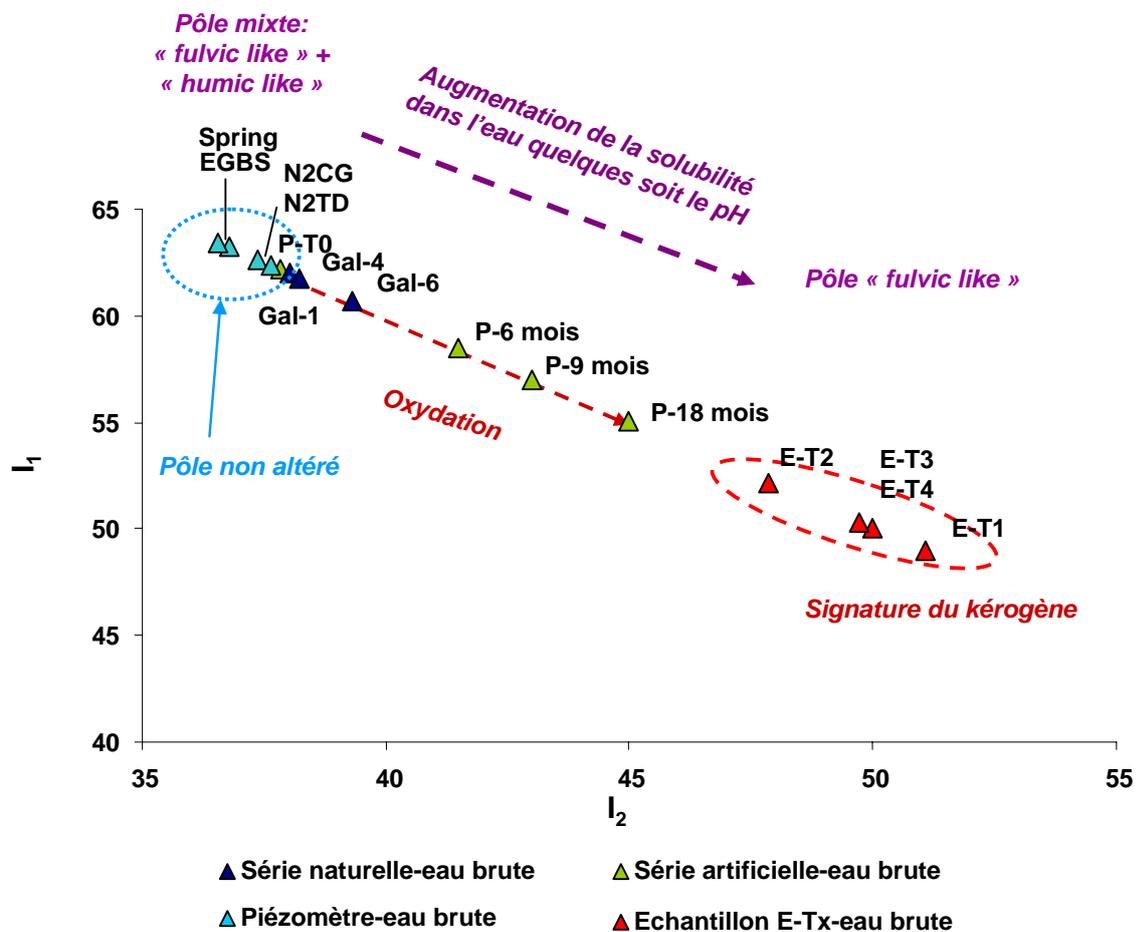


Figure 4-48 : Graphique  $I_1$  en fonction d' $I_2$  pour l'ensemble des échantillons aqueux, piézomètres, séries naturelles et artificielles.

En revanche, des analyses effectuées par le SCK-CEN au niveau des filtres du piézomètre Morphéus ont révélé la présence de bactéries anaérobies de type sulfato-réductrices qui sont, tout à fait viables dans la formation de Boom (Aerts *et al.*, 2007). Ces analyses confirment l'intérêt de réaliser des expériences de biodégradation anaérobie, afin de simuler un environnement sans oxygène dans un contexte de fermeture du système pour évaluer les conséquences d'une telle biodégradation sur la MO de la formation de Boom et, plus précisément, sur la MOD. Ceci est l'objectif du chapitre suivant.

#### 4.4. Références

- Abe, I., M. Rohmer and G. D. Prestwich (1993).** "Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes." *Chemical Reviews* 93(6): 2189-2206.
- Aerts, S., P. boven, M. Van Geet and P. De Boever (2007).** Investigation into the biodiversity of sulfate reducing bacteria in Boom Clay. Clay in natural & engineered barriers for radioactive waste confinement, Lille.
- Anderson, K. B. and R. B. Johns (1986).** "Oxidation studies of Australian coals-I. Aliphatic and aromatic hydrocarbon centres of oxidative attack." *Organic Geochemistry* 9(5): 219-224.
- Banerjee, A. K., D. Choudhury and S. S. Choudhury (1989).** "Chemical changes accompanying oxygenation of coal by air and deoxygenation of oxidized coal by thermal treatment." *Fuel* 68(9): 1129-1133.
- Bar-On, P. and I. Shainberg (1969).** "Hydrolysis and decomposition of Na-Montmorillonite in distilled water." *Soil Science* 109(4): 241-246.
- Barshad, I. (1960).** The effect of the total chemical composition and crystal structure of soil minerals on the nature of exchangeable cations in acidified clays and naturally occurring acid soils. Transactions of 7th International Congress of Soil Science II. Madison: 435-444.
- Blanchart, P., P. Faure, M. De Craen, C. Bruggeman, R. Michels (2012).** "Experimental investigation on the role of kerogen and clay minerals in the formation of bitumen during air oxidation of Boom Clay". *Fuel* in press
- Bray, E. E. and E. D. Evans (1961).** "Distribution of n-paraffins as a clue to recognition of source beds." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 22: 13.
- Calemma, V., R. Rausa, R. Margarit and E. Girardi (1988).** "FT-i.r. study of coal oxidation at low temperature." *Fuel* 67(6): 764-770.
- Challinor, J. M. (1989).** "A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers." *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 16(4): 323-333.
- Charrié-Duhaut, A., S. Lemoine, P. Adam, J. Connan and P. Albrecht (2000).** "Abiotic oxidation of petroleum bitumens under natural conditions." *Organic Geochemistry* 31(10): 977-1003.
- Clayton, J. L. and P. J. Swetland (1978).** "Subaerial weathering of sedimentary organic matter." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42(3): 305-312.
- Clayton, J.L. and J. D. King (1987).** "Effect of weathering on biological marker and aromatic hydrocarbon composition of organic matter in Phosphoria shale outcrop." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51: 2153-2157.

- Coble, P. G. (1996).** "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy." *Marine Chemistry* 51(4): 325-346.
- Copard, Y., J. R. Disnar, J. F. Becq-Giraudon and F. Laggoun-Défarge (2004).** "Erroneous coal maturity assessment caused by low temperature oxidation." *International Journal of Coal Geology* 58(3): 171-180.
- D'Andrilli, J., T. Dittmar, B. P. Koch, J. M. Purcell, A. G. Marshall and W. T. Cooper (2010).** "Comprehensive characterization of marine dissolved organic matter by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24(5): 643-650.
- De Craen, M., D. Delleuze, G. Volckaert, A. Sneyers and M. Put (2000).** "The Boom Clay as natural analogue." *Final report 1997-1999, R-3444, Mol, Belgium*.
- De Craen, M., M. V. Geet, M. Honty, E. Weetjens and X. Sillen (2008).** "Extent of oxidation in Boom Clay as a result of excavation and ventilation of the HADES URF: Experimental and modelling assessments." *Physics and Chemistry of the Earth* 33(SUPPL. 1): S350-S362.
- De Craen, M., M. Van Geet, L. Wang and M. Put (2004a).** "High sulphate concentrations in squeezed Boom Clay pore water: evidence of oxidation of clay cores." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 29(1): 91-103.
- De Craen, M., L. Wang, M. Van Geet and H. Moors (2004b)** "The geochemistry of Boom Clay pore water at the Mol site, status 2004, SCK\*CEN Scientific Report-BLG 990, 180p.
- Deniau, I., F. Behar, C. Largeau, P. De Cannière, C. Beaucaire and H. Pitsch (2005).** "Determination of kinetic parameters and simulation of early CO<sub>2</sub> production from the Boom Clay kerogen under low thermal stress." *Applied Geochemistry* 20(11): 2097-2107.
- Deniau, I., S. Derenne, C. Beaucaire, H. Pitsch and C. Largeau (2001).** "Morphological and chemical features of a kerogen from the underground Mol laboratory (Boom Clay Formation, Oligocene, Belgium): structure, source organisms and formation pathways." *Organic Geochemistry* 32(11): 1343-1356.
- Dereppe, J. M., C. Moreaux, P. Landais and M. Monthieux (1987).** "Study of the artificial oxidation of a humic coal by C<sub>13</sub> CP/MAS nuclear magnetic resonance." *Fuel* 66(5): 594-599.
- Durand, B. and G. Nicaise (1980).** "Procedures for kerogen isolation." *Kerogen: insoluble organic matter from sedimentary rocks*: 35-53.
- Eglinton, G. (1973).** "Chemical fossils: a combined organic geochemical and environmental approach." *Pure and Applied Chemistry* 34: 21.

- Elie, M., P. Faure, R. Michels, P. Landais and L. Griffault (2000).** "Natural and laboratory oxidation of low-organic-carbon-content sediments: Comparison of chemical changes in hydrocarbons." *Energy and Fuels* 14(4): 854-861.
- Elie, M., P. Faure, R. Michels, P. Landais, L. Griffault, L. Mansuy and L. Martinez (2004).** "Effects of water-cement solutions on the composition of organic compounds leached from oxidized Callovo-Oxfordian argillaceous sediment." *Applied Clay Science* 26(1-4): 309-323.
- Espitalié, J., G. Deroo and F. Marquis (1985a).** "La pyrolyse Rock-Eval et ses applications." *Revue de l'institut français du pétrole* 40(5): 563-579.
- Espitalié, J., G. Deroo and F. Marquis (1985b).** "La pyrolyse Rock-Eval et ses applications- Deuxieme partie." *Revue de l'institut français du pétrole* 40(6): 29.
- Faure, P., (1999).** "Application des techniques de géochimie organique pétrolière à l'étude de problèmes environnementaux: polluants organiques, inertage et stockage des déchets." PhD-dissertation, INPL, Nancy.
- Faure, P., M. Elie, L. Mansuy, R. Michels, P. Landais and M. Babut (2004).** "Molecular studies of insoluble organic matter in river sediments from Alsace-Lorraine (France)." *Organic Geochemistry* 35(2): 109-122.
- Faure, P. and P. Landais (2000).** "Evidence for clay minerals catalytic effects during low-temperature air oxidation of n-alkanes." *Fuel* 79(14): 1751-1756.
- Faure, P., P. Landais and L. Griffault (1999).** "Behavior of organic matter from Callovian shales during low-temperature air oxidation." *Fuel* 78(13): 1515-1525.
- Faure, P., L. Schlepp, V. Burkle-Vitzthum and M. Elie (2003).** "Low temperature air oxidation of n-alkanes in the presence of Na-smectite." *Fuel* 82(14): 1751-1762.
- Fischer, C. and R. Gaupp (2005).** "Change of black shale organic material surface area during oxidative weathering: Implications for rock-water surface evolution." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69(5): 1213-1224.
- Fredericks, P. M. and N. T. Moxon (1986).** "Differentiation of in situ oxidized and fresh coal using FT-i.r. techniques." *Fuel* 65(11): 1531-1538.
- Grice, K., R. Gibbison, J. E. Atkinson, L. Schwark, C. B. Eckardt and J. R. Maxwell (1996).** "Maleimides (1H-pyrrole-2,5-diones) as molecular indicators of anoxygenic photosynthesis in ancient water columns." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60(20): 3913-3924.
- Griffault, L., T. Merceron, J. R. Mossmann, B. Neerdael, P. De Cannière, C. Beaucaire, S. Dumas, A. Bianchi and R. Christen (1996).** "Archimede-Argile: Acquisition et Regulation de la chimie des eaux en milieu argileux pour le projet de stockage de déchets radioactifs en formation géologique." *Rapport final, Contrat CCE n°F12W-CT92-0117*: 189.

- Hartgers, W. A., J. S. S. Damste and J. W. Deleeuw (1992).** "Identification of C2-C4 alkylated benzenes in flash pyrolysates of kerogens, coals and asphaltenes." *Journal of Chromatography* 606(2): 211-220.
- Hatcher, P. G., M. A. Nanny, R. D. Minard, S. D. Dible and D. M. Carson (1995).** "Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH)." *Organic Geochemistry* 23(10): 881-888.
- Huang, W. Y. and W. G. Meinschein (1979).** "Sterols as ecological indicators." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43(5): 739-745.
- Huguet, A., L. Vacher, S. Relexans, S. Saubusse, J. M. Froidefond and E. Parlanti (2009).** "Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary." *Organic Geochemistry* 40(6): 706-719.
- Ingram, G. R. and J. D. Rimstidt (1984).** "Natural weathering of coal." *Fuel* 63(3): 292-296.
- Kalema, W. S. and G. R. Gavalas (1987).** "Changes in coal composition during air oxidation at 200-250°C." *Fuel* 66(2): 158-164.
- Killops, S. D. and V. J. Killops (2005).** "Introduction to organic geochemistry, 2nd edition." *Blackwell, Oxford*: 30-70.
- Kister, J., M. Guiliano, G. Mille and H. Dou (1988).** "Changes in the chemical structure of low rank coal after low temperature oxidation or demineralization by acid treatment. Analysis by FT-i.r. and u.v. fluorescence." *Fuel* 67(8): 1076-1082.
- Laenen, B. (1997).** "The geochemical signature of relative sea-level cycles recognized in the Boom Clay." *PhD-dissertation, K.U. Leuven, Leuven, Belgium*.
- Laenen, B., J. Hertogen and N. Vandenberghe (1997).** "The variation of the trace-element content of fossil biogenic apatite through eustatic sea-level cycles." *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 132(1-4): 325-342.
- Landais, P., R. Michels, J. Kister, J. M. Dereppe and Z. Benkhedda (1991).** "Behavior of oxidized type II kerogen during artificial maturation." *Energy and Fuels* 5(6): 860-866.
- Landais, P. and A. c. Rochdi (1993).** "In situ examination of coal macerals oxidation by micro-FT-i.r. spectroscopy." *Fuel* 72(10): 1393-1401.
- Leythaeuser, D. (1973).** "Effects of weathering on organic matter in shales." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 37(1): 113-120.
- Lo, H. B. and B. J. Cardott (1995).** "Detection of natural weathering of Upper McAlester coal and Woodford Shale, Oklahoma, U.S.A." *Organic Geochemistry* 22(1): 73-83.
- Lorant, F., C. Largeau, F. Behar and P. D. Cannière (2008).** "Improved kinetic modeling of the early generation of CO<sub>2</sub> from the Boom Clay kerogen. Implications for simulation of

- CO<sub>2</sub> production upon disposal of high activity nuclear waste." *Organic Geochemistry* 39(9): 1294-1301.
- Mao, J. D., A. Schimmelmann, M. Mastalerz, P. G. Hatcher and Y. Li (2010).** "Structural Features of a Bituminous Coal and Their Changes during Low-Temperature Oxidation and Loss of Volatiles Investigated by Advanced Solid-State NMR Spectroscopy." *Energy & Fuels* 24: 2536-2544.
- Martinez, M. and M. Escobar (1995).** "Effect of coal weathering on some geochemical parameters." *Organic Geochemistry* 23(3): 253-261.
- McCutcheon, A. L. and M. A. Wilson (2003).** "Low-Temperature Oxidation of Bituminous Coal and the Influence of Moisture." *Energy & Fuels* 17(4): 929-933.
- McKnight, D. M., E. W. Boyer, P. K. Westerhoff, P. T. Doran, T. Kulbe and D. T. Andersen (2001).** "Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity." *Limnology and Oceanography* 46(1): 38-48.
- Moulin, V., P. Reiller, B. Amekraz and C. Moulin (2001).** "Direct characterization of iodine covalently bound to fulvic acids by electrospray mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(24): 2488-2496.
- Nicaise, G. (1977).** "Etude d'un phénomène d'alteration naturelle en surface sur des échantillons prélevés à Frcocourt." *Institut Français du pétrole*.
- ONDRAF/NIRAS (2001).** "SAFIR 2: Safety Assessment and Feasibility Interim." *Report 2, NIROND 2001-06 E*.
- Parlanti, E., K. Wörz, L. Geoffroy and M. Lamotte (2000).** "Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs." *Organic Geochemistry* 31(12): 1765-1781.
- Peters, K. E. and J. M. Moldowan (1993).** *The biomarker Guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments.* Cambridge, *Cambridge University Press*.
- Petsch, S. T., R. A. Berner and T. I. Eglinton (2000).** "A field study of the chemical weathering of ancient sedimentary organic matter." *Organic Geochemistry* 31(5): 475-487.
- Petsch, S. T., R. J. Smernik, T. I. Eglinton and J. M. Oades (2001).** "A solid state <sup>13</sup>C-NMR study of kerogen degradation during black shale weathering." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(12): 1867-1882.
- Plancque, G., B. Amekraz, V. Moulin, P. Toulhoat and C. Moulin (2001).** "Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(10): 827-835.
- Rielley, G., R. J. Collier, D. M. Jones and G. Eglinton (1991).** "The biogeochemistry of Ellesmere Lake, U.K.--I: source correlation of leaf wax inputs to the sedimentary lipid record." *Organic Geochemistry* 17(6): 901-912.

- Saxby, J. D., A. J. R. Bennett, J. F. Corcoran, D. E. Lambert and K. W. Riley (1986).** "Petroleum generation: Simulation over six years of hydrocarbon formation from torbanite and brown coal in a subsiding basin." *Organic Geochemistry* 9(2): 69-81.
- Saxby, J. D., P. Chatfield, G. H. Taylor, J. D. Fitz Gerald, I. R. Kaplan and S. T. Lu (1992).** "Effect of clay minerals on products from coal maturation " *Organic Geochemistry* 18(3): 373-383.
- Saxby, J. D., D. E. Lambert and K. W. Riley (1987).** "Simulated weathering of oil shales from Rundle, Julia Creek and Green River. Effects on oil yields and kerogen composition." *Fuel* 66(3): 365-368.
- Saxby, J. D. and L. C. Stephenson (1987).** "Effect of anigneous intrusion on oil shale at Rundle (Australia)." *Chemical Geology* 63(1-2): 1-16.
- Seifert, W. K. and J. M. Moldowan (1981).** "Paleoreconstruction by biological markers." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45(6): 783-794.
- Senftle, J. T. and A. Davis (1984).** "Effect of oxidative weathering on the thermoplastic and liquefaction behaviors of four coals." *International Journal of Coal Geology* 3(4): 375-381.
- Shainberg, I. (1973).** "Rate and mechanism of Na-Montmorillonite hydrolysis in suspensions." *Soil Sci. Soc. Am. J.* 37: 689-697.
- Tissot, B. P. and D. H. Welte (1978).** "Petroleum formation and occurrence." *Springer Verlag*.
- Van Geet, M. (2002).** "Interpretation of Rock-eval data on samples of core HADES 2001/4." *SCK.CEN report, R-3605, Mol, Belgium, 12pp.*
- Van Geet, M. (2004a).** "Characterisation of Boom Clay organic matter: mobile and immobile fraction." *SCK-CEN report R-3884, Mol, Belgium.*
- Van Geet, M. (2004b)** "Characterisation of Boom Clay organic matter: mobile and immobile fraction" *SCK-CEN. R-3884,*
- Van Geet, M., N. Maes and A. Dierckx (2003).** "Characteristics of the Boom Clay organic matter, a review. ." *Geological Survey of Belgium, Professional Paper 2003/1 Nr. 298.*
- Van Keer, I. and M. De Craen (2001).** "Sedimentology and diagenetic evolution of the Boom Clay: State of the art." *Report to NIRAS/ONDRAF R-3483.*
- Van Krevelen, D. W. (1961).** "Coal: Typology, Chemistry, Physics, Constitution." *Elsevier Amsterdam.*
- Vandenbergh, N., B. Laenen, E. Van Echelpoel and D. Lagrou (1997).** "Cyclostratigraphy and climatic eustasy. Example of the rupelian stratotype." *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIA - Earth and Planetary Science* 325(5): 305-315.

- Volckaert, G., B. Neerdael, P. Manfroy, P. Lalieux, P. De Cannière and V. Labiouse (1997).** "Characteristics of Argillaceous Rocks: A Catalogue of the Characteristics of Argillaceous Rocks Studied with respect to Radioactive Waste Disposal Issues: Belgium, Canada, France, Germany, Italy, Japan, Spain, Switzerland, United Kingdom, and United States-Boom Clay." *Revision number 2-05/5/1997*.
- Volkman, J. K. (1986).** "A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter." *Organic Geochemistry* 9(2): 83-99.
- Volkman, J. K. (2005).** "Sterols and other triterpenoids: Source specificity and evolution of biosynthetic pathways." *Organic Geochemistry* 36(2): 139-159.
- Volkman, J. K., S. M. Barrett, G. A. Dunstan and S. W. Jeffrey (1993).** "Geochemical significance of the occurrence of dinosterol and other 4-methyl sterols in a marine diatom." *Organic Geochemistry* 20(1): 7-15.
- Wouters, L. and N. Vandenberghe (1994).** "Géologie de la Campine essai de synthèse." *Bruxelles, ONDRAF*: 208.
- Zeelmaekers, E., M. Honty, A. Derkowski, M. De Craen, N. Vandenberghe and M. Van Geet (2010).** "A new and improved methodology for qualitative and quantitative mineralogical analysis of the Boom Clay." *International Meeting on Clays in Natural and Engineered Barriers for Radioactive Waste Confinement. Book of Abstracts, Nantes, ANDRA, 2010*.
- Zsolnay, A., E. Baigar, M. Jimenez, B. Steinweg and F. Saccomandi (1999).** "Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying." *Chemosphere* 38(1): 45-50.





**Chapitre 5 :**

**Etude des conséquences de la**

**biodégradation anaérobie sur la**

**matière organique de la formation de**

**Boom à Mol.**



## **Sommaire du chapitre 5 : Etude des conséquences de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de la formation de Boom à Mol.**

<b>5.1. PROTOCOLE DE BIODEGRADATION.....</b>	<b>264</b>
5.1.1. <i>L'argile.....</i>	<b>264</b>
5.1.2. <i>L'inoculum.....</i>	<b>264</b>
5.1.3. <i>L'eau.....</i>	<b>264</b>
5.1.4. <i>Condition de biodégradation et durée expérimentale.....</i>	<b>265</b>
5.1.4.1. Le temps initial, T0 .....	<b>266</b>
5.1.4.2. T1, T2, T3, T4 .....	<b>267</b>
5.1.4.3. Ajout de lactate .....	<b>267</b>
<b>5.2. PROTOCOLE ET RESULTATS.....</b>	<b>268</b>
5.2.1. <i>Protocole d'étude de la matière organique.....</i>	<b>268</b>
5.2.2. <i>Test d'activité bactérienne.....</i>	<b>269</b>
5.2.3. <i>Analyse de l'eau.....</i>	<b>270</b>
5.2.3.1. Analyse du carbone organique dissous.....	<b>270</b>
5.2.3.2. Evolution de la chimie du milieu aqueux .....	<b>271</b>
5.2.3.3. Evolution de la distribution des masses dans la fraction hydrosoluble .....	<b>272</b>
5.2.4. <i>Extrait organique.....</i>	<b>277</b>
5.2.4.1. Taux d'extrait.....	<b>277</b>
5.2.4.2. Analyse moléculaire en GC-MS .....	<b>277</b>
5.2.4.3. Evolution de la distribution des masses par HPLC-SEC.....	<b>280</b>
<b>5.3. DISCUSSION.....</b>	<b>282</b>
5.3.1. <i>Activité bactérienne.....</i>	<b>282</b>
5.3.2. <i>Evolution de la phase aqueuse.....</i>	<b>283</b>
5.3.2.1. Le carbone organique dissous.....	<b>283</b>
5.3.2.2. Evolution de la composition de l'eau .....	<b>283</b>
5.3.2.2.1. <b>Expérience sans lactate .....</b>	<b>283</b>
5.3.2.2.2. <b>Expérience avec lactate .....</b>	<b>284</b>
5.3.3. <i>Evolution de l'extrait organique.....</i>	<b>285</b>
5.3.3.1. Taux d'extrait.....	<b>285</b>
5.3.3.2. Evolution moléculaire .....	<b>285</b>
<b>5.4. CONCLUSION.....</b>	<b>286</b>
<b>5.5. REFERENCES.....</b>	<b>289</b>



## 5. Etude des conséquences de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de la formation de Boom à Mol

Lors de l'excavation de la galerie du laboratoire souterrain, différents processus successifs sont mis en jeu. Tout d'abord, l'excavation de la roche va mettre en place des fractures qui vont permettre l'interaction entre l'oxygène et les composants de la formation de Boom, telles que la matière organique et la pyrite (Figure 5-1, Excavation). L'excavation de la galerie va, aussi, favoriser la présence de bactérie aérobie. Les fractures vont, ensuite, se refermer sous l'effet de la plasticité de l'argile et la pose de la paroi en béton va limiter l'accès de l'oxygène à l'argile (auto-sealing)(Figure 5-1, Phase d'exploitation). Enfin, le système devient complètement dépourvu d'oxygène et les sulfates (produit d'oxydation de la pyrite) vont favoriser le développement de bactérie anaérobie de type sulfato-réductrice (Figure 5-1, Phase de veille après fermeture).

Actuellement, le laboratoire se trouve en phase d'étude ; cependant, il est nécessaire de connaître l'action des bactéries sulfato-réductrices sur la matière organique une fois le système complètement fermé et leur rôle éventuel sur la production d'espèces hydrosolubles.

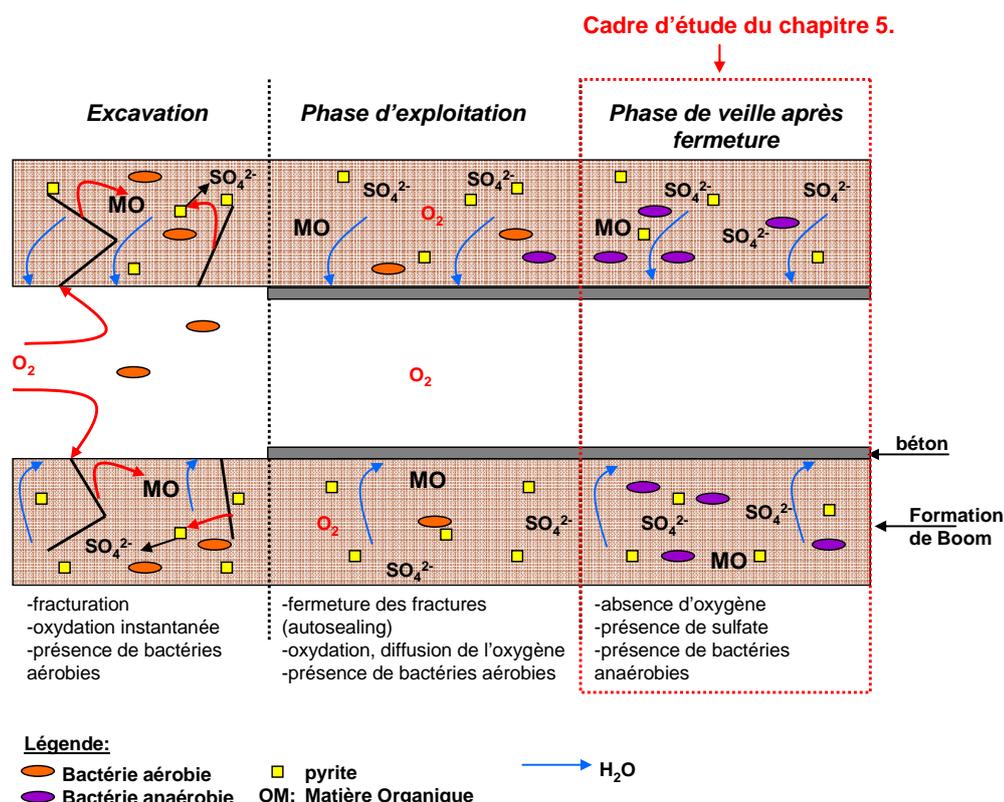


Figure 5-1 : Schéma conceptuel de l'altération de la matière organique lors de la phase (i) d'excavation de la galerie, (ii) d'exploitation et (iii) de veille après fermeture de la galerie (mise en place des colis).

Dans ce chapitre, deux argiles vont être étudiées : une argile oxydée artificiellement en laboratoire afin de simuler une barrière oxydée suite à l'excavation et une argile non altérée afin de simuler le cas d'une argile se situant hors de la zone d'altération.

## 5.1. Protocole de biodégradation

### 5.1.1. L'argile

Deux sortes d'argiles ont été utilisées pour les expériences de biodégradation :

- l'argile de Boom issue de la galerie Praclay ;
- l'argile de Boom issue de la galerie Praclay oxydée en étuve ventilée à 130°C.

L'argile de Boom, avant étape d'oxydation et/ou de biodégradation, a été, préalablement, lyophilisée et broyée à 250 µm.

### 5.1.2. L'inoculum

L'inoculum utilisé est composé de bactéries extraites du filtre F-20 du piézomètre Morphéus. Le développement des bactéries de type sulfato-réductrices a été favorisé par un milieu de culture anaérobie et riche en sulfate. En effet, ce type de bactérie utilise l'ion  $\text{SO}_4^{2-}$ , comme accepteur d'électron, lors de la respiration cellulaire : le sulfate est, tout d'abord, réduit en sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), puis en sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Équation 5-1).



Équation 5-1: Réduction du sulfate lors de la respiration cellulaire chez les bactéries sulfato-réductrices, avec APS= adénosine phosphosulfate, ATP= adénosine triphosphate et ADP= adénosine diphosphate.

### 5.1.3. L'eau

L'eau utilisée pour les expériences de biodégradation est appelée Synthetic Boom Clay Water (SBCW). Il s'agit d'une eau comportant des ions à concentration connue, dont la composition se rapproche de l'eau des piézomètres (Tableau 5-1). Pour les expériences de

biodégradation, l'eau SBCW a été enrichie en  $\text{SO}_4^{2-}$  afin de faciliter le développement des bactéries de type sulfato-réductrices dans les réacteurs.

Elément	Concentration (mg/L)
$\text{B}^{3+}$	5.1
$\text{Ca}^{2+}$	1.00
$\text{Fe}^{2+}$	0.12
$\text{K}^+$	15.8
$\text{Mg}^{2+}$	2.56
$\text{Na}^+$	640
$\text{Si}^{4+}$	0.46
$\text{Cl}^-$	26.3
$\text{Br}^-$	0.96
$\text{SO}_4^{2-}$	671

Tableau 5-1: Composition chimique initiale de l'eau artificielle utilisée pour les expériences de biodégradation déterminée par ICP-AES/IC.

Cette eau est dépourvue de source de carbone, l'objectif de l'expérience étant d'inciter les bactéries à consommer le carbone organique présent dans l'argile de Boom.

#### 5.1.4. Condition de biodégradation et durée expérimentale

Les expériences de biodégradation comportent trois conditions expérimentales (Figure 5-2):

- Pristine Clay ou PC ;
- Control Experiment ou CE ;
- Oxidized Clay ou OC.

Les réacteurs de la condition expérimentale Pristine Clay sont constitués d'argile de Boom issue de la galerie Praclay non altérée, d'eau SBCW et d'inoculum (Figure 5-2). La condition CE diffère de PC seulement par l'ajout d'un biocide, le triclosan, qui annihile l'inoculum : cette condition est un contrôle expérimental. La condition OC est constituée d'argile de Boom issue de la galerie Praclay, préalablement oxydée en étuve pendant deux mois à  $130^\circ\text{C}$ , d'eau SBCW et d'inoculum (Figure 5-2). La mise en place des réacteurs s'est faite en boîte à gant en atmosphère anaérobie.

Plusieurs pas de temps ont été choisis : 2 mois (T1), 4 mois (T2), 6 mois (T3) et 1 an (T4).

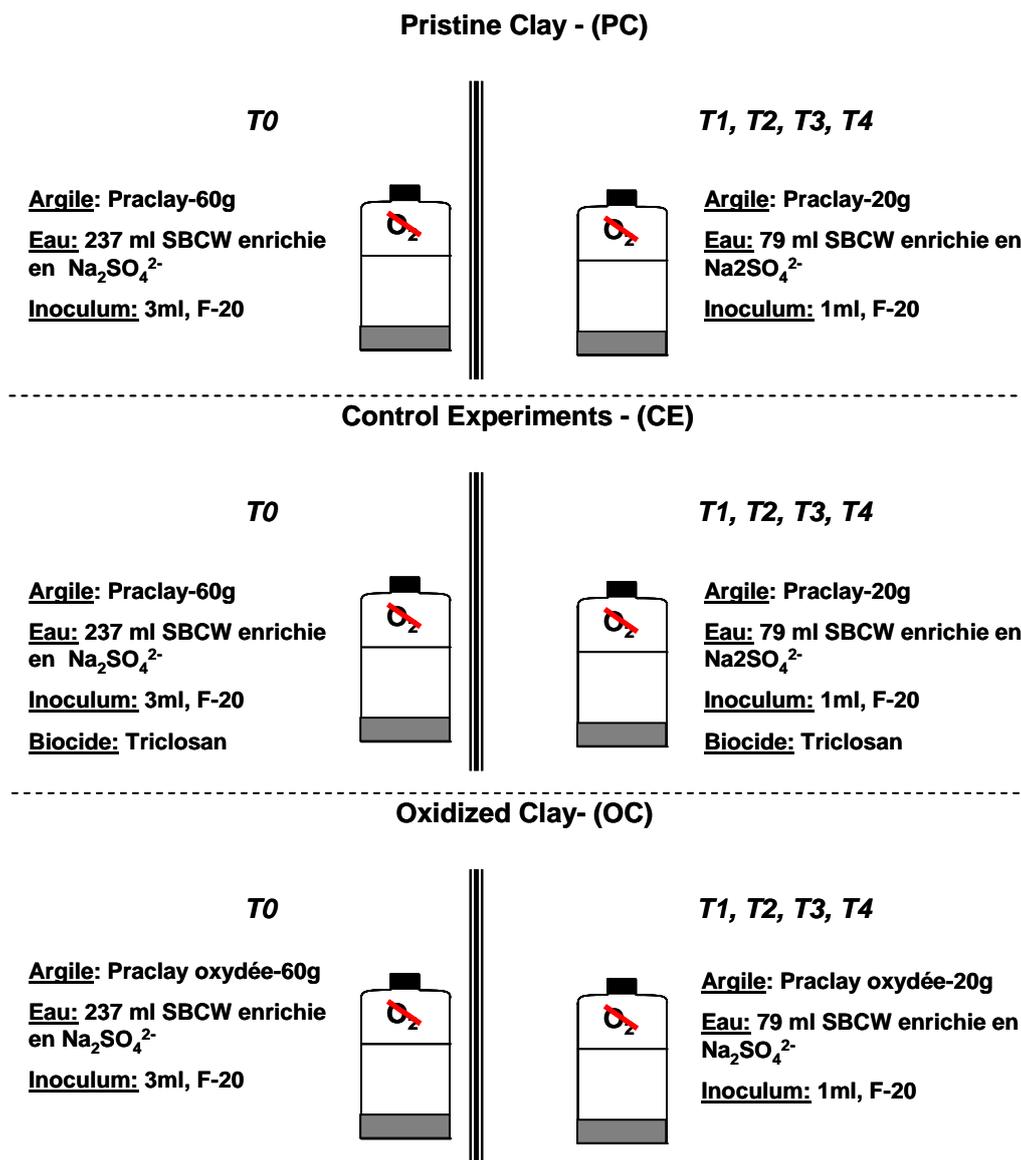


Figure 5-2: Protocole expérimental des conditions Pristine Clay, Control Experiments et Oxidized Clay.

#### 5.1.4.1. Le temps initial, T0

Les réacteurs du temps initial T0 sont composés d'un flacon de 500 ml contenant 60g d'argile, 237ml de SBCW et 3ml d'inoculum. La condition CE contient du triclosan (Figure 5-2). Chaque condition possède trois réplicas. L'argile est mise au contact de l'eau pendant 24h, à 3°C, ce qui limite l'activité bactérienne.

### 5.1.4.2. T1, T2, T3, T4

Les réacteurs des autres pas de temps (T1 à T4) sont composés de flacons de 100ml contenant 20g d'argile, 79ml de SBCW et 1ml d'inoculum (Figure 5-2). Les réacteurs sont placés à 24°C, durant toute l'expérience, afin d'optimiser les conditions de développement des bactéries. Pour chaque pas de temps, chaque condition comprend 9 réacteurs (Figure 5-3); à la fin de chaque pas de temps, les réacteurs sont associés, 3 par 3, afin de former un échantillon (trois réplicas par condition).

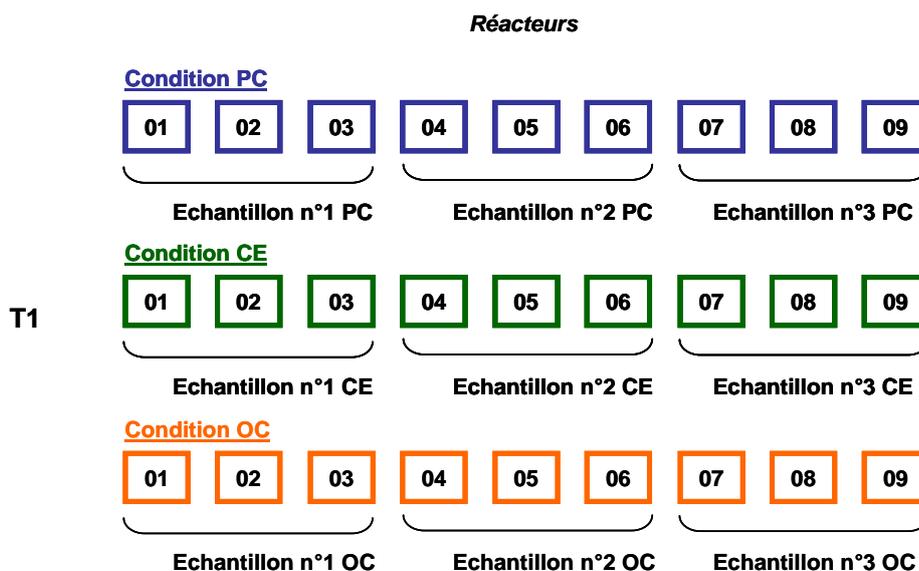


Figure 5-3 : Exemple d'association des réacteurs pour le temps T1 pour les conditions PC, CE et OC.

### 5.1.4.3. Ajout de lactate

Au bout de 6 mois d'expérience, les tests d'activité bactérienne se sont révélés négatifs. C'est pourquoi, pour le dernier pas de temps, du Na-lactate à 2g/L a été introduit dans une partie des réacteurs T3 (Figure 5-4) afin d'essayer d'obtenir une réaction de type co-métabolisme entre la matière organique et le lactate. Le lactate doit servir de co-substrat à la croissance des bactéries afin qu'elles puissent, éventuellement, apporter des modifications structurales à la matière organique qui semble, dans nos expériences, ne pas pouvoir lui servir de source de carbone.

Les réacteurs du pas de temps T3 ont été, alors, associés deux par deux afin d'obtenir les trois réplicas et les neuf réacteurs ayant reçu du lactate sont stoppés en même temps que le pas de temps T4.

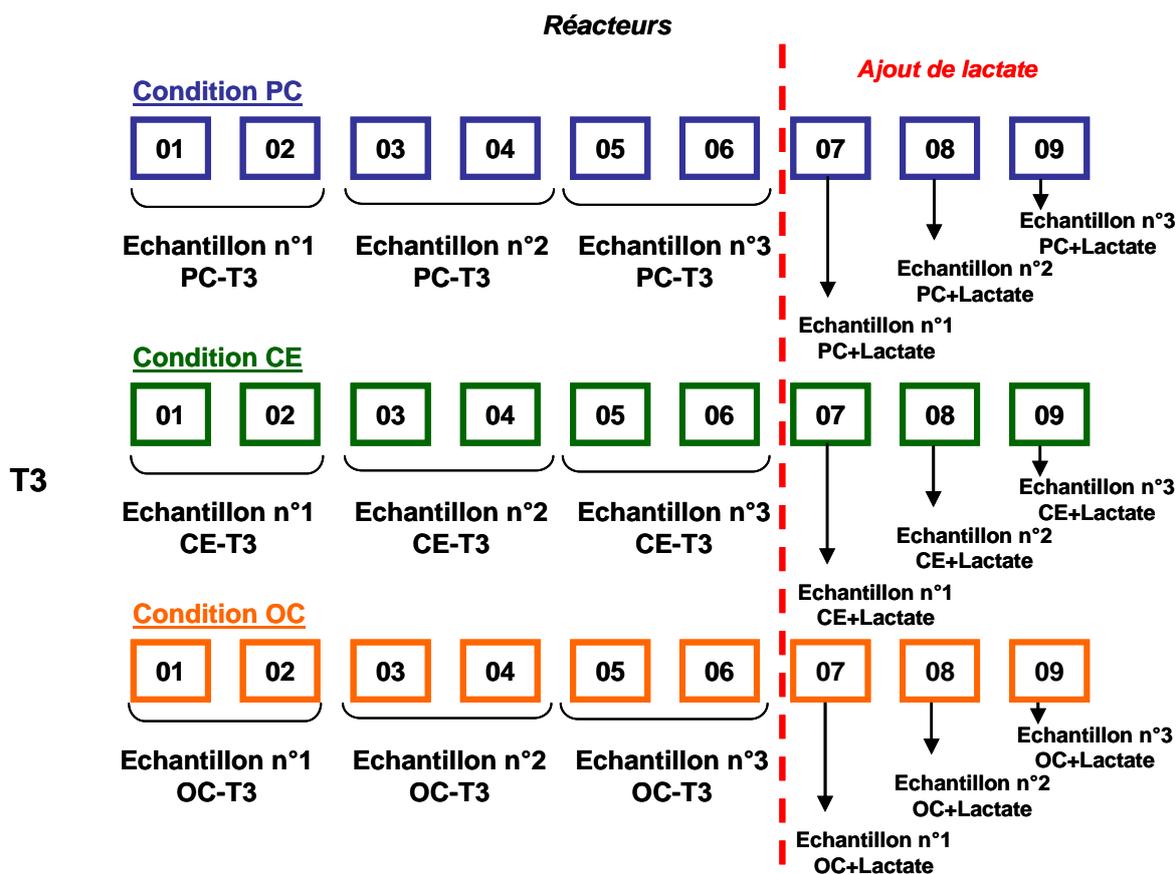


Figure 5-4: Association des réacteurs pour le temps T3 pour les conditions PC, CE et OC.

## 5.2. Protocole et résultats

### 5.2.1. Protocole d'étude de la matière organique

Pour chaque condition et chaque pas de temps, un test d'activité bactérienne est effectué sur les réacteurs ; puis, pour chaque condition l'eau est prélevée et filtrée à 0.45µm afin d'obtenir un échantillon moyen. Sur cette eau, des analyses ICP, HPLC-SEC et de carbone organique dissous (COD) ont été effectuées afin de suivre, d'une part, les éventuelles évolutions de concentration des ions et du carbone en solution et, d'autre part, l'évolution de la distribution de masse.

Les échantillons solides ont été congelés, puis lyophilisés et broyés à 250µm avant d'être extraits au soxhlet avec du chloroforme pendant 48h. Les extraits organiques totaux ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire par spectroscopie de masse couplée à un chromatographe en phase gazeuse (GC-MS) et par chromatographie d'exclusion stérique (HPLC-SEC).

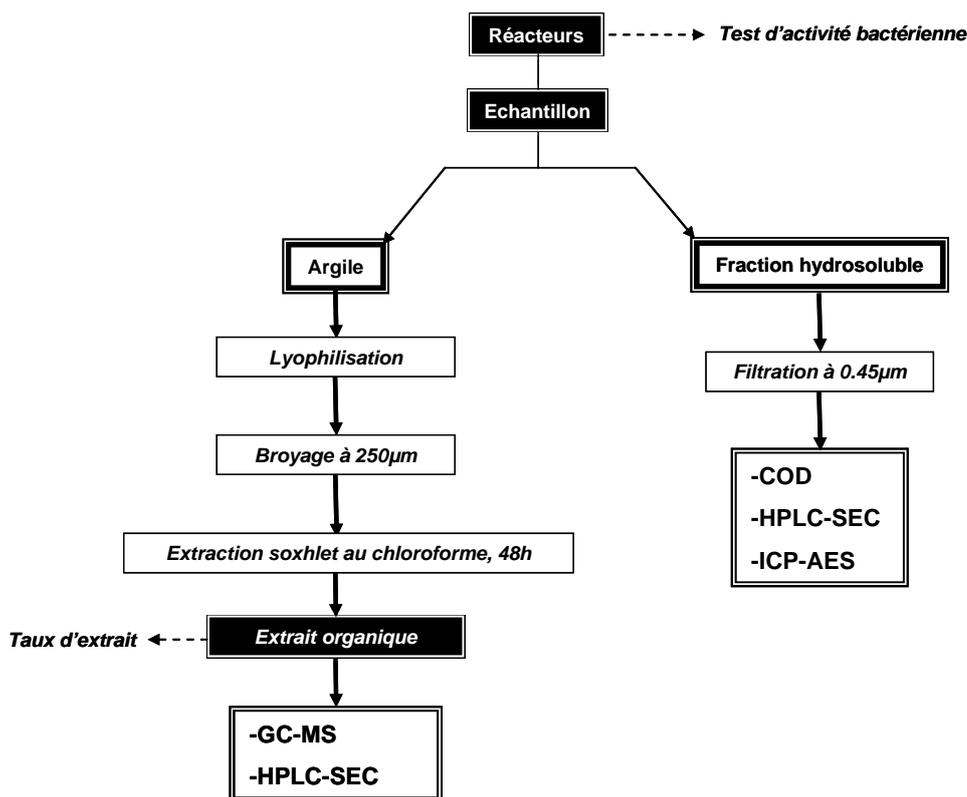


Figure 5-5: Protocole d'étude des échantillons de biodégradation.

### 5.2.2. Test d'activité bactérienne

L'activité bactérienne est mesurée à l'aide d'un kit Spectroquant® (Merck) : il s'agit d'une méthode colorimétrique se basant sur la production de méthylène bleu en présence de H<sub>2</sub>S. L'absorbance est mesurée à 612 nm et la concentration en H<sub>2</sub>S en solution est donnée par la relation Absorbance ( $\lambda=612\text{nm}$ ) = 0.363\*H<sub>2</sub>S. La limite inférieure de détection est de 0.01 ppm et la limite supérieure de 3.5 ppm.

Les résultats du test, pour chaque pas de temps et condition, sont présentés ci-dessous (Tableau 5-2) :

	T0	T1	T2	T3	T4	avec lactate
PC	-	-	-	-	-	+
CE	-	-	-	-	-	+
OC	-	-	-	-	-	-

Tableau 5-2: Résultats du test d'activité bactérienne pour T0, T1, T2, T3, T4 et les échantillons avec du lactate.

Seuls les réacteurs PC et CE avec du lactate sont positifs au test. Sans lactate, les bactéries sulfato-réductrices ne présentent aucune activité pour la condition PC et CE. Les réacteurs de la condition OC sont négatifs quels que soient les pas de temps : pour cette condition, même en présence de lactate, les bactéries sulfato-réductrices ne présentent aucune activité. La condition CE présente une activité bactérienne en présence de lactate alors que du Triclosan a été ajouté, en début d'expérience, afin de tuer les bactéries.

Pour les réacteurs avec le lactate, la concentration en H<sub>2</sub>S a été suivie avec l'aide de prélèvements à 28j et 130j après l'ajout du lactate (Figure 5-6).

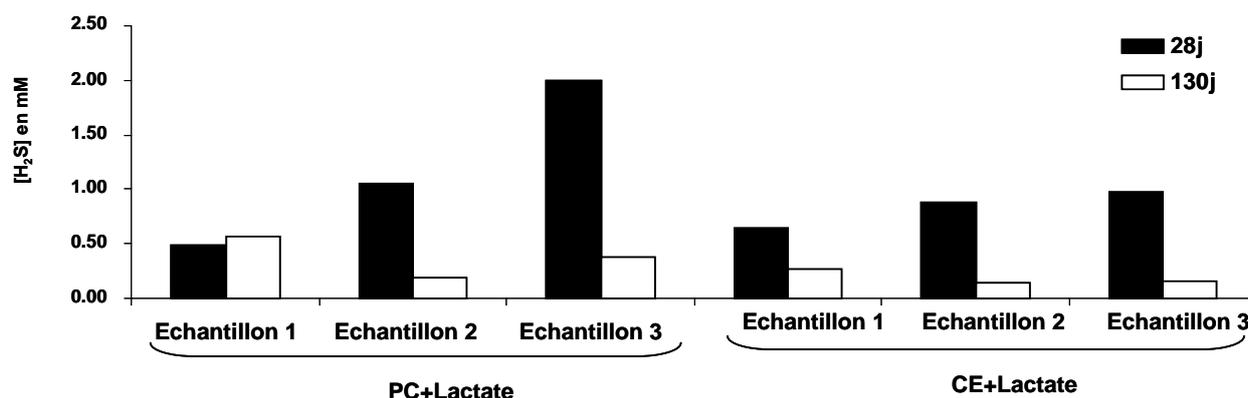


Figure 5-6: Concentration en ion sulfure H<sub>2</sub>S dans les réacteurs PC+L et CE+L 28j et 130j après ajout de lactate.

Sauf pour l'échantillon PC+Lactate-n°1 des réacteurs positifs au test, la concentration en H<sub>2</sub>S diminue avec le temps.

### 5.2.3. Analyse de l'eau

#### 5.2.3.1. Analyse du carbone organique dissous

Les résultats de l'analyse du carbone organique dissous sont présentés ci-dessous (Tableau 5-3). En revanche, les résultats des analyses, pour la condition avec lactate, ne sont pas présentés, car l'ajout de lactate (= ajout de carbone) augmente artificiellement les résultats.

	T0	T1	T2	T3	T4
PC	50.18	54.04	34.92	33.77	30.44
CE	52.90	70.66	45.20	54.39	42.68
OC	124.92	188.12	168.77	181.46	175.31
SBCW	9.15	/	/	/	/

Tableau 5-3: Résultats des analyses en carbone organique dissous en mgC/L, pour les trois conditions, aux temps T0, T1, T2, T3, T4 et SBCW.

A T0, les valeurs de COD pour les échantillons PC et CE sont très proche : 50 mgC/L pour l'un et 52 mgC/L pour l'autre. Pour la condition CE, elle se stabilise autour de cette valeur. Pour la condition PC, elle diminue à partir de T2 pour se stabiliser autour de 30 mgC/L.

La valeur du COD de la condition OC est nettement supérieure à celles des conditions PC et CE. A T0, elle est de 124 mgC/L, puis elle se stabilise autour de 180 mgC/L.

### 5.2.3.2. Evolution de la chimie du milieu aqueux

Pour chaque eau, une analyse ICP-AES a été effectuée au service d'analyse du SCK-CEN à Mol (Tableau 5-4). La composition chimique des eaux des réacteurs PC et CE à T0 est différente de celle des réacteurs OC. Elles diffèrent, notamment, au niveau de la composition en ions  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Na^+$  et  $Si^{4+}$ . L'eau de la condition OC est 2 à 20 fois plus concentrée en ions  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Na^+$  et  $Si^{4+}$  que les eaux des conditions PC et CE (Tableau 5-4).

Elément	Al <sup>3+</sup> (mg/L)	B <sup>3+</sup> (mg/L)	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	K <sup>+</sup> (mg/L)	Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	Na <sup>+</sup> (mg/L)	Si <sup>4+</sup> (mg/L)	Cl <sup>-</sup> (ppm)	Br <sup>-</sup> (ppm)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (ppm)	HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (ppm)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)
SBCW	0	5.1	1	0.12	15.8	2.56	640	0.46	26.3	0.96	671	<0.25	<1	0
OC-T0	0.087	9.9	450	0.66	125	142	1030	13.9	35	1.68	3750	2.18	<1	<0.5
OC-T1	0.4	11.9	490	6.1	149	181	1050	19.4	660	2.15	3820	1.66	<1	<0.5
OC-T2	<0.02	11.2	490	0.181	144	205	1100	16.9	35.5	9.7	3840	5.23	<1	<0.5
OC-T3	<0.02	11.8	480	0.041	154	193	1110	16.9	37.5	2.87	4080	8.5	<1	0.56
OC-T4	<0.02	11.6	480	0.108	153	194	1110	14.5	35.6	1.28	3810	8.4	<1	0.64
OC+L	0.331	12	650	17.6	162	219	1910	15.9	38.4	1.21	4190	9.9	<1	0.88
PC-T0	<0.02	6.2	21	0.047	48	19	750	4.6	36.4	0.36	930	11.2	<1	<0.5
PC-T1	0.5	9.8	22.7	0.096	58	23.9	760	9.5	650	1.76	990	0.46	<1	<0.5
PC-T2	0.031	9.1	24.6	0.026	58	22.5	810	7.9	38	0.98	802	<0.5	<1	<0.5
PC-T3	<0.02	9.6	24.4	<0.02	58	22.3	800	7.8	40.9	0.65	813	<0.5	<1	<0.5
PC-T4	<0.02	9.2	26.6	<0.02	54	22.7	810	7.7	42	<0.5	802	<0.5	<1	<0.5
PC+L	<0.02	8.7	50	0.048	46	41	1410	20.7	49.5	<0.5	12.6	8.6	<1	<0.5
CE-T0	<0.02	6.3	22.2	0.081	53	19.7	750	4.6	36.7	0.34	950	11.3	<1	<0.5
CE-T1	0.56	9.8	23.5	0.162	56	26	760	9.8	700	2.08	980	<0.25	<1	<0.5
CE-T2	0.02	9	24.9	0.056	52	22.3	800	7.8	39.6	0.84	813	<0.5	<1	<0.5
CE-T3	<0.02	9.9	26.4	0.033	58	23.3	810	8.8	42.5	0.78	807	<0.5	<1	0.65
CE-T4	<0.02	9.3	26.5	<0.02	56	23.2	810	7.2	42.3	<0.5	810	<0.5	<1	0.62
CE+L	<0.02	9.1	52	0.033	48	45	1540	21.3	42.5	0.78	0.68	3.33	<1	<0.5

Tableau 5-4: Résultats de l'analyse des eaux par ICP-AES pour les échantillons PC, CE, OC pour les temps T0, T1, T2, T4, T3+L.

La chimie des eaux est relativement constante pour les temps suivant T1, T2, T3 et T4 et la différence de composition entre les conditions CE/PC et OC reste toujours marquée.

Avec l'ajout de Na-lactate, les concentrations des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Si}^{4+}$  évoluent (Tableau 5-4):

- le sodium, le calcium et le magnésium augmentent pour les trois conditions ;
- la concentration en sulfate diminue pour les conditions PC et CE ;
- la concentration en silicium augmente pour les deux conditions PC et CE.

### 5.2.3.3. Evolution de la distribution des masses dans la fraction hydrosoluble

Les eaux, filtrées à  $0.45\mu\text{m}$ , de chaque condition et chaque temps, ont été analysées en HPLC-SEC. Deux détecteurs ont été utilisés : le DAD réglé sur l'absorbance à 254 nm et 230 nm (Figure 5-7 et Figure 5-12) et le FLD en mode multi-émission (Figure 5-8). Pour cette série d'analyse, le FLD a été réglé en multi-émission : c'est-à-dire qu'il fonctionne à longueur d'onde d'excitation constante, ici 270 nm, et qu'il balaye les longueurs d'onde d'émission comprises entre 300 et 500 nm. Ce mode et cette longueur d'onde d'excitation ont été choisis en raison du fait que, selon la bibliographie (Coble, 1996; Parlanti *et al.*, 2000; Birdwell et Engel, 2010), des fluorophores, spécifiques à l'activité biologique, émettent à cette longueur d'onde d'excitation (pics B, tyrosine-like, et T, tryptophane-like).

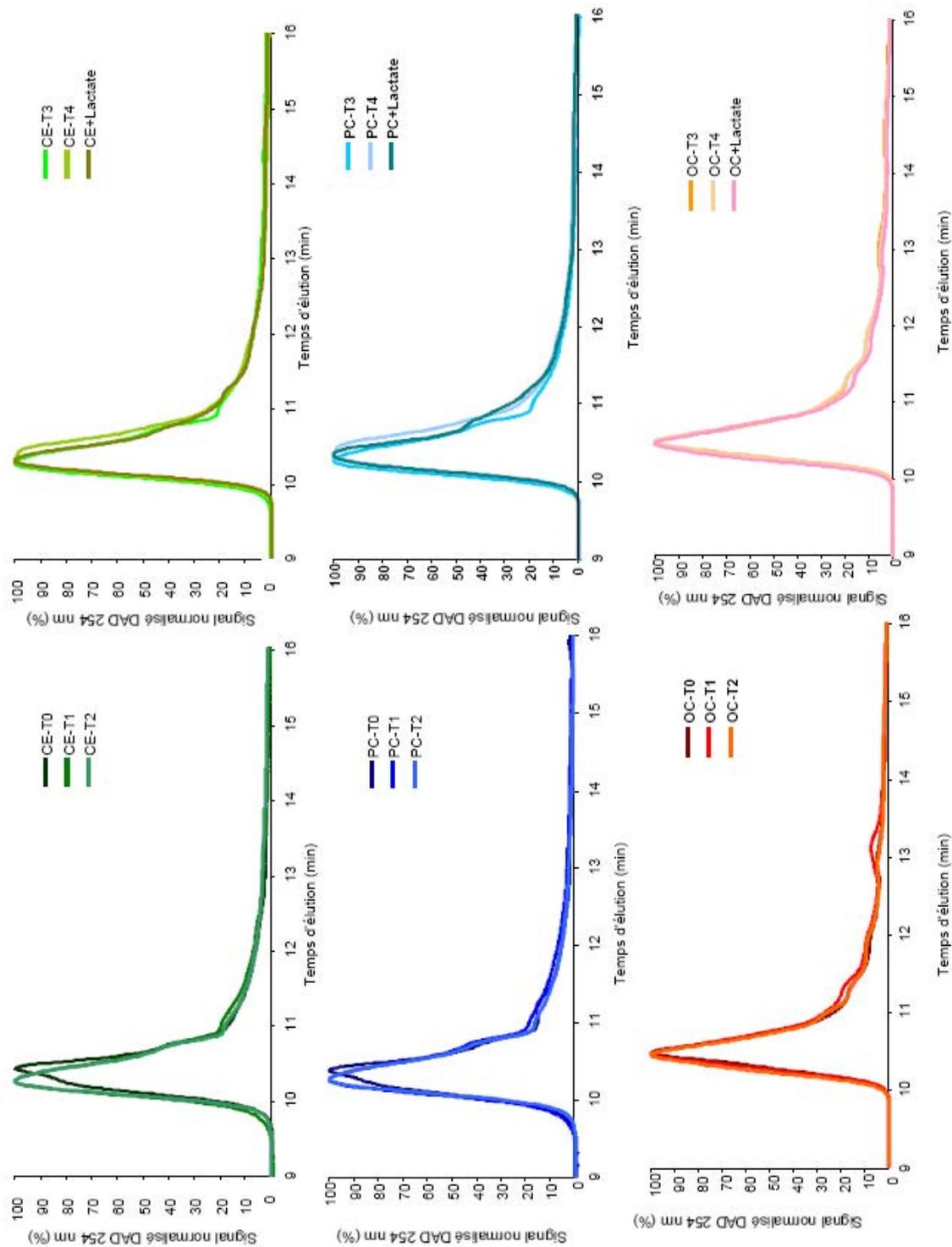


Figure 5-7: Signal normalisé du DAD à 254 nm entre 9 et 16 min pour la MOD des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate.

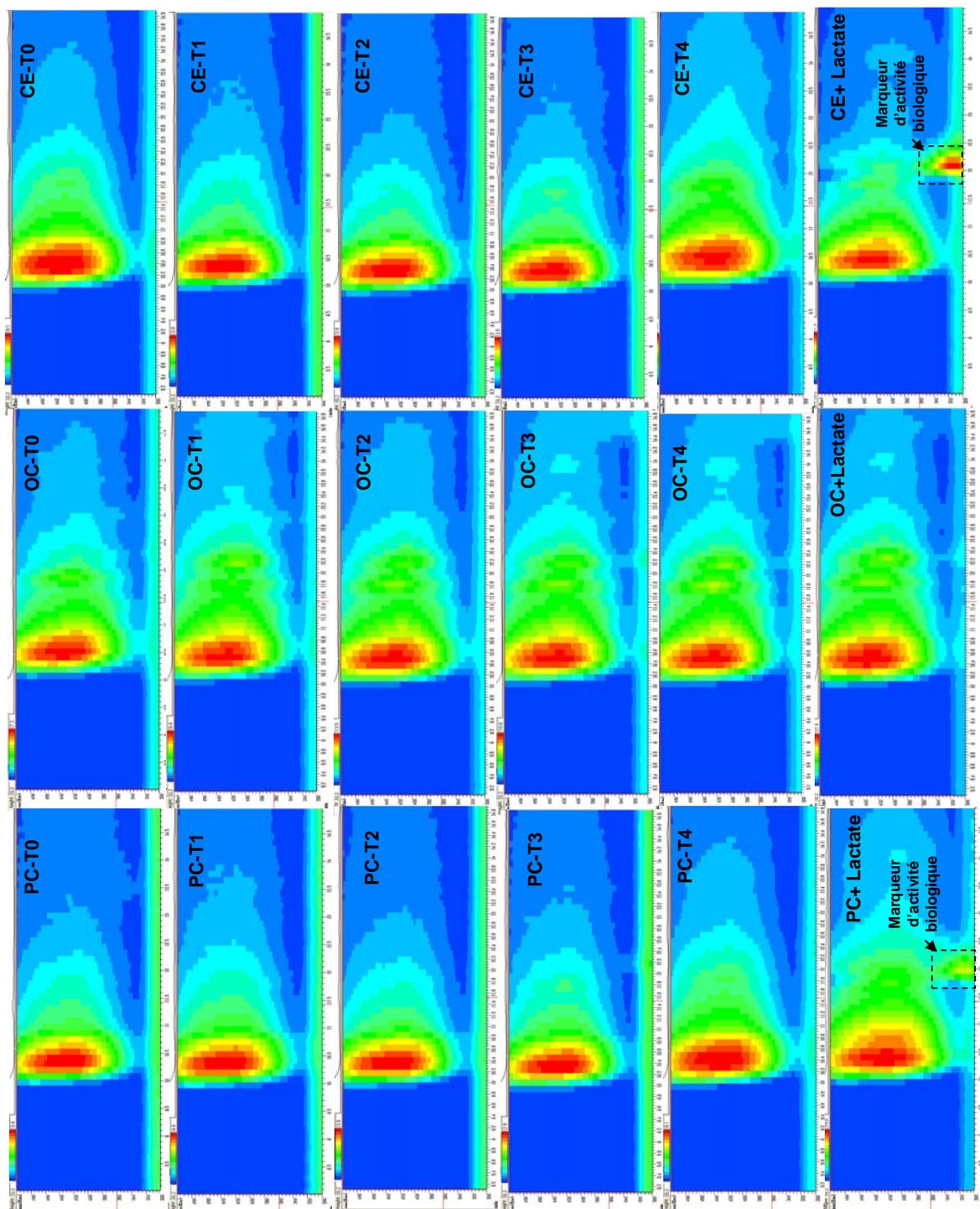


Figure 5-8: Isoplot de fluorescence entre 8 et 15 min de la MOD des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate.

Pour l'ensemble des échantillons, le signal obtenu par le DAD à 254 nm semble ne pas évoluer quels que soient les conditions et les pas de temps (Figure 5-7). Les trois conditions présentent un massif important, sur les isoplots de fluorescence, entre les longueurs d'onde d'émission 370 et 500 nm (Figure 5-8).

Les isoplots des échantillons PC et CE avec lactate, présentent un massif à 12.1min (Figure 5-8): il s'agit d'un fluorophore émettant à des longueurs d'ondes, comprises entre 300 et 340 nm, pour une longueur d'onde d'excitation égale à 270 nm (Figure 5-9). Ce massif est absent pour la condition OC+ Lactate.

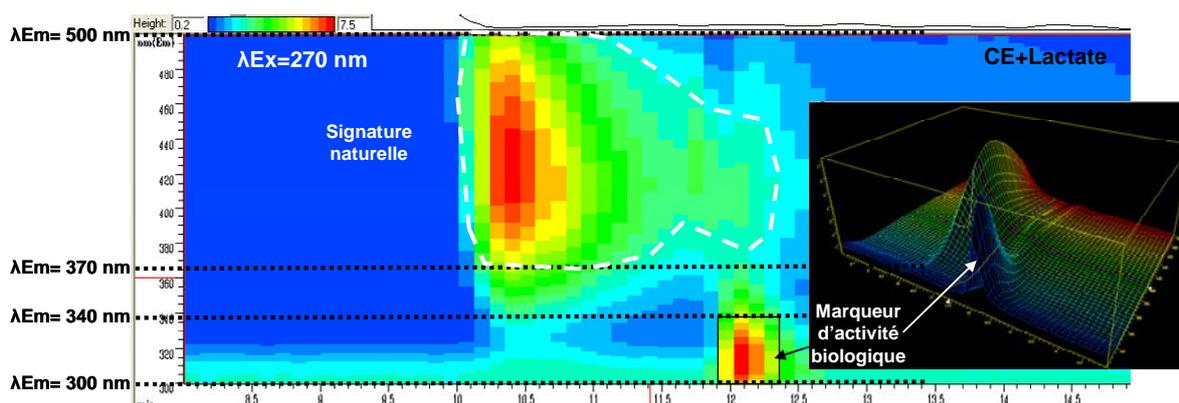


Figure 5-9: Isoplot de fluorescence de la MOD pour l'échantillon CE+lactate.

Si l'on observe le signal du DAD pour une longueur d'onde plus courte (230 nm) (Figure 5-12, Figure 5-11 et Figure 5-12), on observe la présence d'un massif supplémentaire à 12.1 min correspondant au marqueur biologique observé en FLD. Les échantillons CE+Lactate et PC+Lactate présentent, également, un épaulement supplémentaire à 10.7 min.

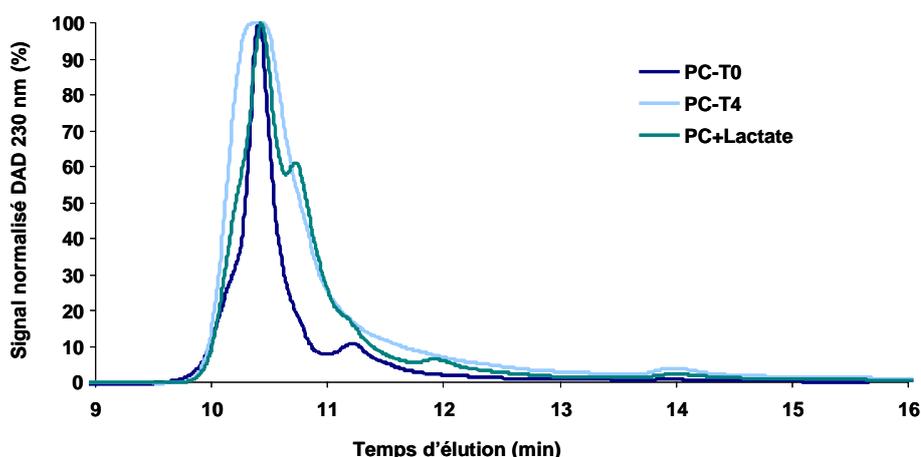


Figure 5-10 : Signal normalisé du DAD à 230 nm entre 9 et 16 min de la MOD des échantillons PC pour les temps T0, T4, et avec lactate.

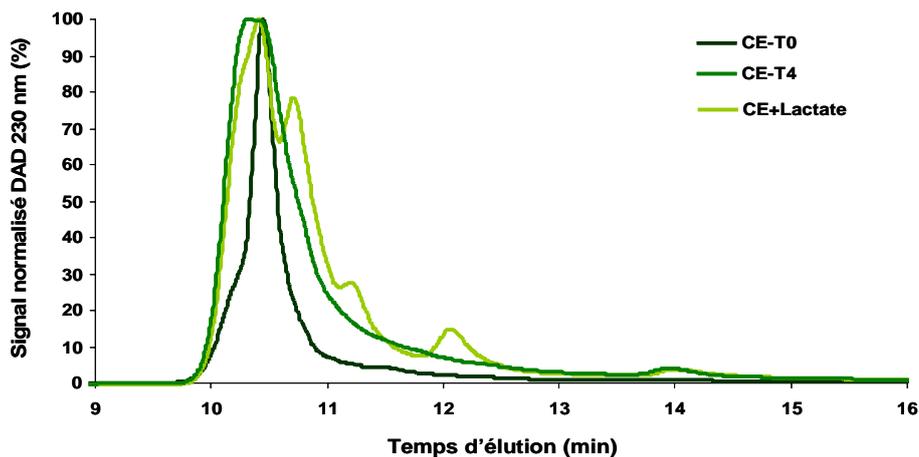


Figure 5-11 : Signal normalisé du DAD à 230 nm entre 9 et 16 min de la MOD des échantillons CE pour les temps T0, T4, et avec lactate.

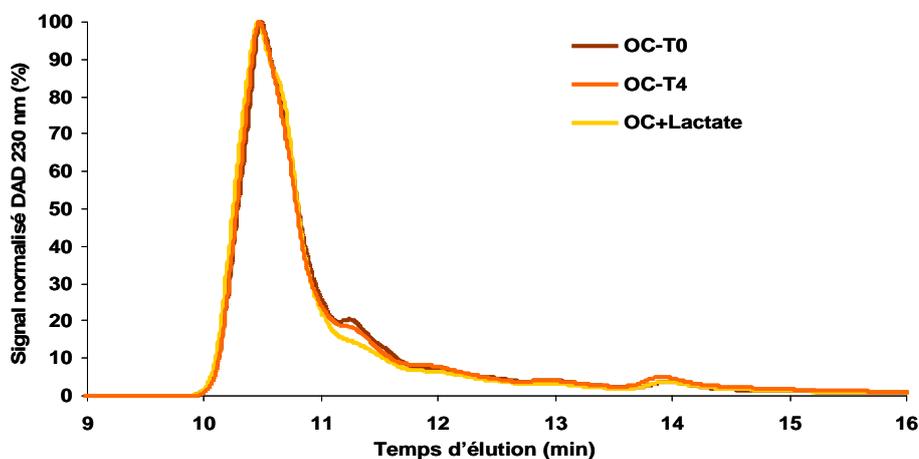


Figure 5-12: Signal normalisé du DAD à 230 nm entre 9 et 16 min de la MOD des échantillons OC pour les temps T0, T4, et avec lactate.

### 5.2.4. Extrait organique

#### 5.2.4.1. Taux d'extrait

Le taux d'extrait pour les conditions CE et PC sans lactate est, en moyenne, de 0.30 mg d'extrait par gramme d'échantillons alors que, pour la condition OC, il est de 0.20 mg d'extrait par gramme d'échantillons (Figure 5-13).

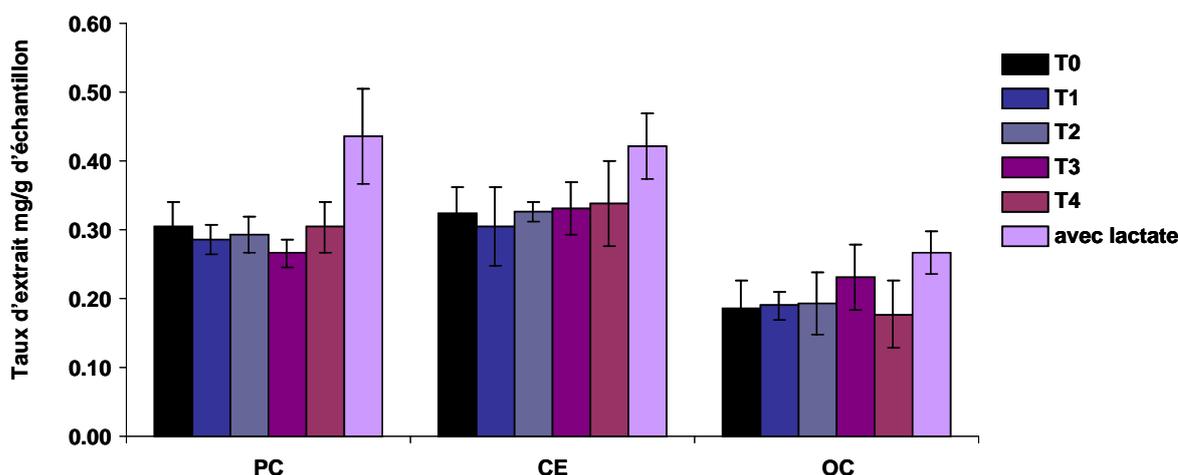


Figure 5-13: Taux d'extrait calculé pour les extraits organiques pour les échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate.

Le taux d'extrait augmente avec l'ajout de lactate pour les trois conditions : il passe de 0.30 en moyenne pour PC et CE à 0.40 mg d'extrait par gramme d'échantillons et de 0.20 à 0.30 mg d'extrait par gramme d'échantillons.

#### 5.2.4.2. Analyse moléculaire en GC-MS

Les extraits organiques totaux silylés ont été analysés par GC-MS. Seuls les échantillons PC+Lactate et CE+Lactate présentent des modifications importantes. Les chromatogrammes des réacteurs PC+Lactate et CE+Lactate ainsi que les échantillons T0 sont présentés ci-dessous (Figure 5-14 et Figure 5-15).

Symbole	Composés	Symbole	Biomarqueurs
●	<i>n</i> -alcanes	1	Méthyle-Ethyle, maléimide
✕	1-alcanols	2	β-sitostérol
▼	Acides alcanoïques	3	Stigmastanol
▽	Acides alcanoïques méthylés	□	6,10,14-triméthyl-2-pentadécane
▽	Acides alcanoïques insaturés	◇	Biomarqueurs inconnus

Tableau 5-5: Tableau d'identification des composés des Figure 5-14 et Figure 5-15.

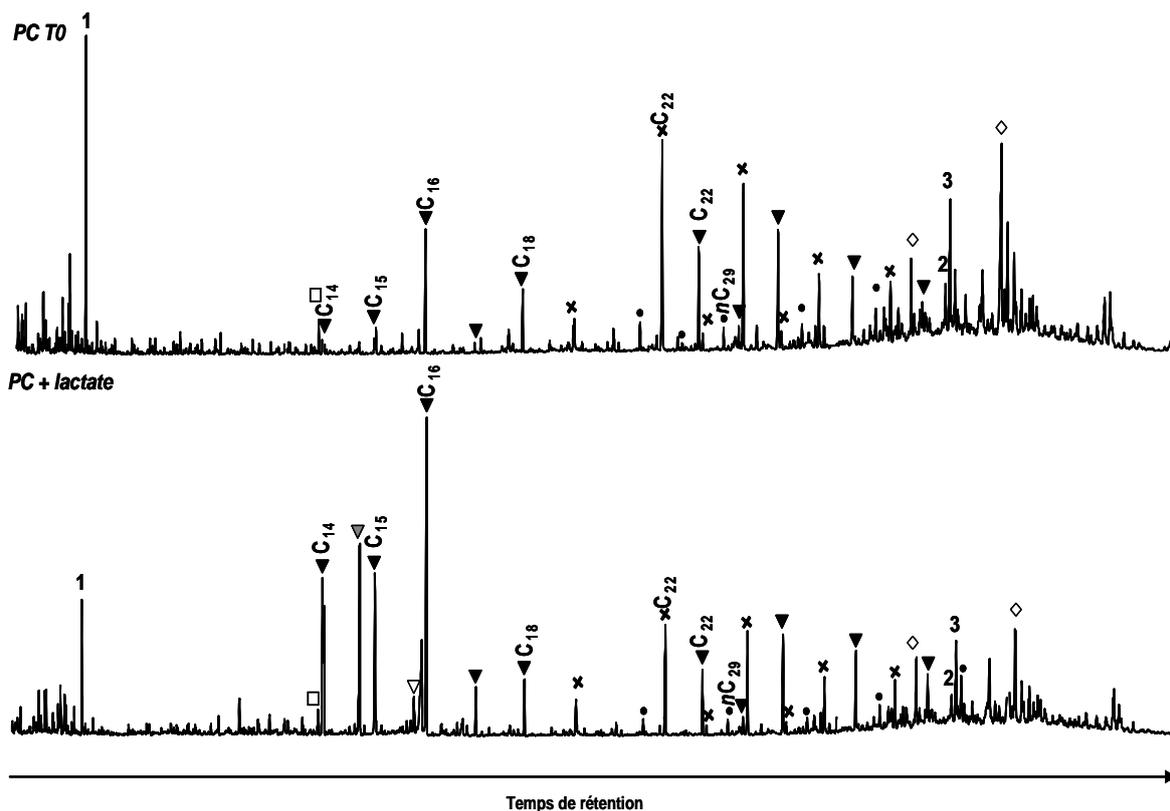


Figure 5-14 : Chromatogramme de la fraction totale des échantillons PC-T0 et PC+ lactate (identification Tableau 5-5).

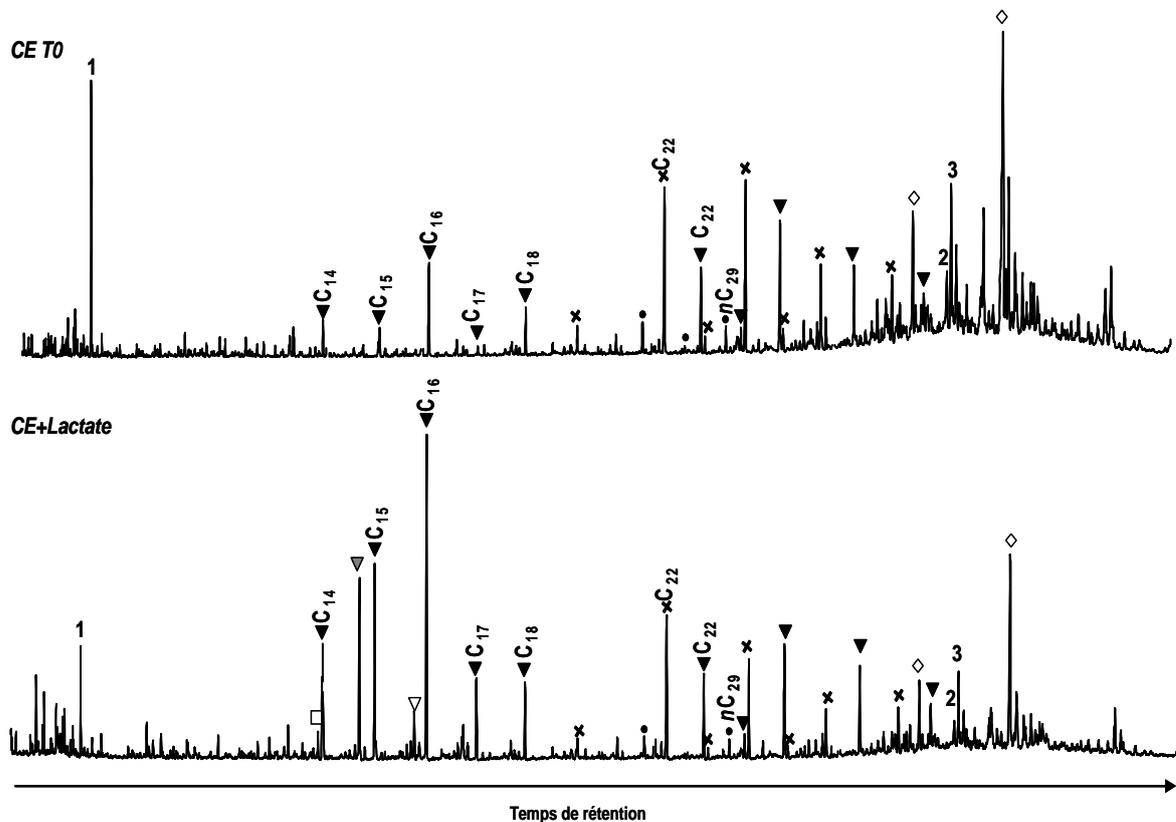


Figure 5-15 : Chromatogramme de la fraction totale des échantillons CE-T0 et CE+ lactate (identification Tableau 5-5).

Les chromatogrammes des échantillons PC+Lactate et CE+Lactate présentent une augmentation de l'abondance relative des acides alcanoniques saturés, insaturés et méthylés, notamment pour les acides saturés : C<sub>14</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub> et C<sub>18</sub>, l'acide tétradecanoïque méthyle et l'acide hexadécénoïque.

La distribution des n-alcanes a été étudiée pour l'ensemble des échantillons et des pas de temps ; différents rapports tels que le CPI et le rapport LMW/HMW ( $\sum (nC_{12}-nC_{20}) / \sum (nC_{21}-nC_{33})$ ) ont été calculés (Figure 5-16 et Figure 5-17). Ces molécules sont, généralement, les premières à être dégradées lors de biodégradation (Peters et Moldowan, 1993; Wenger *et al.*, 2002).

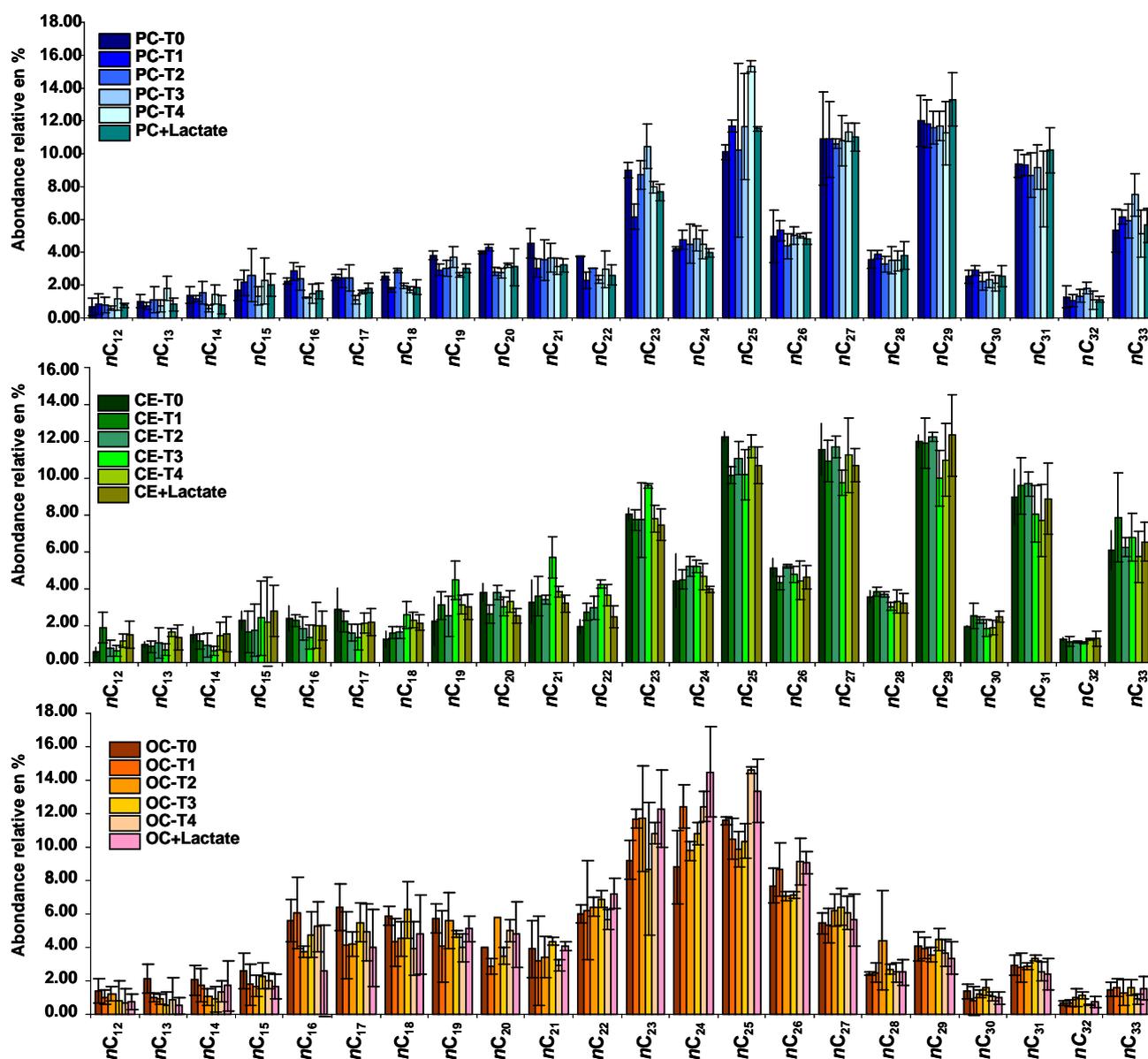


Figure 5-16 : Distribution des n-alcanes des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate.

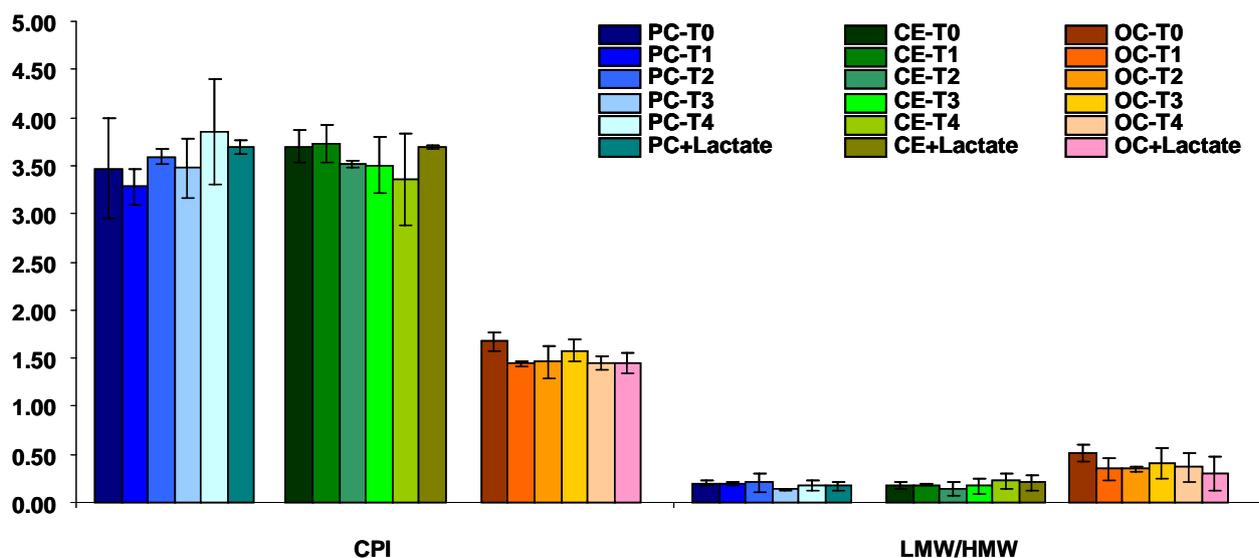


Figure 5-17 : CPI et rapport LMW/HMW des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, et avec lactate. Avec :  $LMW/HMW = \frac{\sum (nC_{12}-nC_{20})}{\sum (nC_{21}-nC_{33})}$ .

La distribution des n-alcanes des échantillons PC et CE est marquée par une prépondérance des n-alcanes de haut poids moléculaire, au nombre de carbones impairs. Elle est soulignée par un CPI nettement supérieur à 1 ainsi qu'un rapport LMW/HMW de 0.2 (Figure 5-16 et Figure 5-17). Les échantillons OC ont une distribution bimodale centrée sur nC24 et nC17 avec un CPI égal à 1.5 et un rapport LMW/HMW voisin de 0.5 (Figure 5-16 et Figure 5-17). La distribution des n-alcanes n'évolue ni pour les temps T1 à T4 et les trois conditions, ni avec l'ajout de lactate.

### 5.2.4.3. Evolution de la distribution des masses par HPLC-SEC

La distribution des masses moléculaires des extraits organiques totaux a été obtenu par analyse en HPLC-SEC (Figure 5-18) et les masses moyennes ont été calculées pour tous les temps étudiés (Figure 5-19).

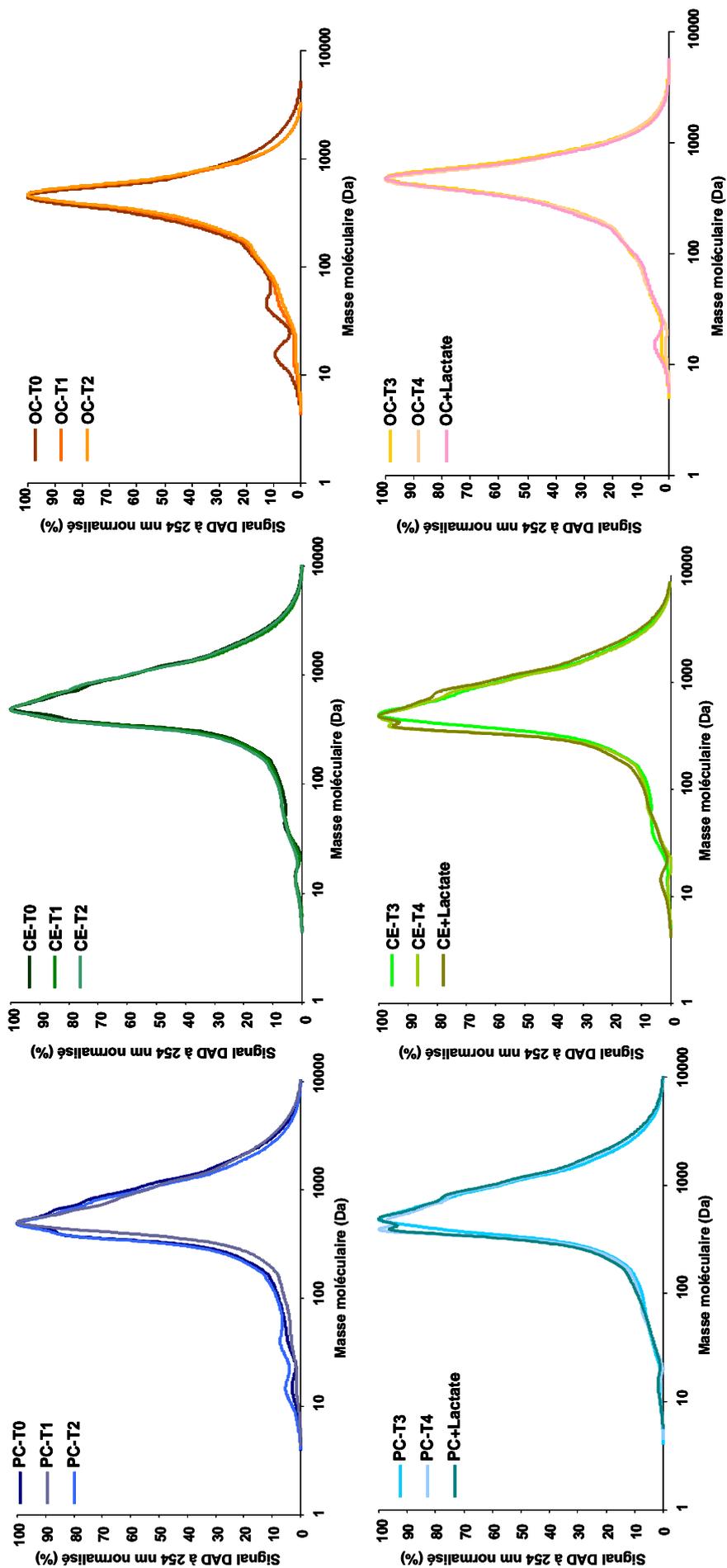


Figure 5-18 : Distribution des masses de la MOE des échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, avec lactate.

La masse moyenne des échantillons OC est égale à 470 g/mol en moyenne alors que les échantillons PC et CE ont une masse moyenne plus élevée de 800 g/mol (Figure 5-19): quels que soient les temps de biodégradation et l'ajout de lactate, la masse moyenne ne présente pas d'évolution significative.

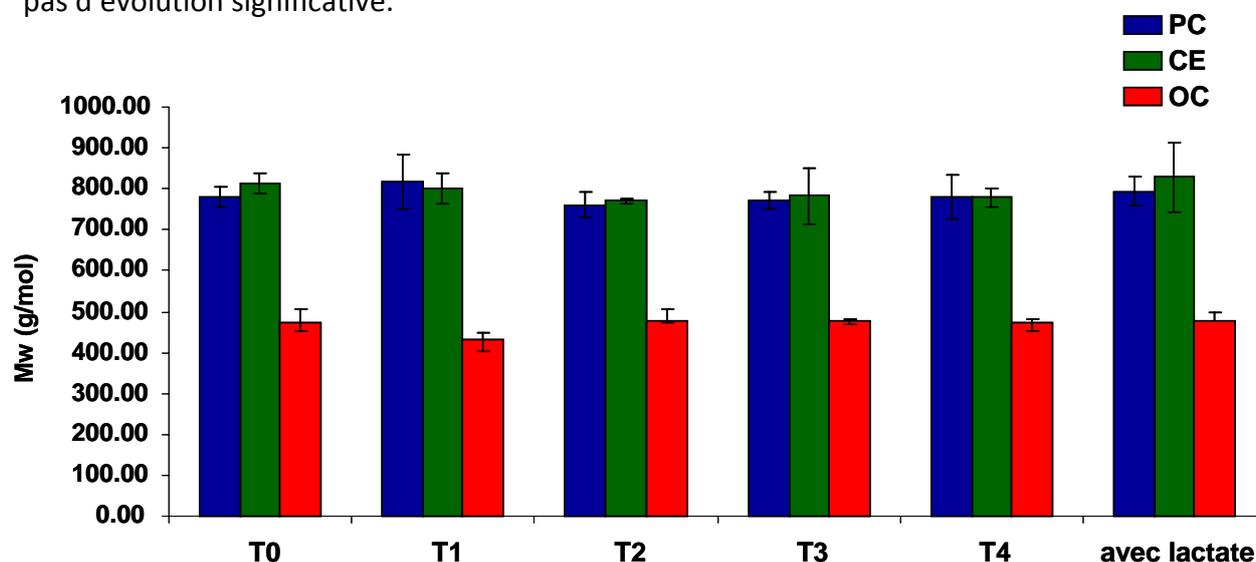


Figure 5-19 : Masse moyenne calculée à partir du signal du DAD à 254 nm pour les échantillons PC, CE, et OC pour les temps T0, T1, T2, T3, T4, avec lactate.

### 5.3. Discussion

#### 5.3.1. Activité bactérienne

Le test d'activité bactérienne est négatif pour l'ensemble des conditions et des pas de temps, excepté pour les conditions PC et CE avec lactate (Tableau 5-2). Pour la condition CE, le test est positif alors que du biocide a été ajouté en début d'expérience ; il semblerait, donc, que le biocide n'est pas été totalement efficace ou alors qu'il ait été adsorbé sur les argiles, ce qui aurait limité son efficacité. La condition OC ne présente pas d'activité bactérienne, ce qui permet de proposer l'hypothèse suivante : un composant spécifique aux réacteurs OC inhibe l'activité bactérienne, malgré l'ajout de lactate.

Le test d'activité bactérienne permet, aussi, de mesurer la concentration en  $H_2S$  dans l'eau. Pour les réacteurs positifs au test, la concentration en  $H_2S$  diminue entre 28j et 130j alors qu'elle devrait augmenter (rappel ;  $H_2S$  = produit final de la réduction du sulfate)(Figure 5-6). Le  $H_2S$  est stable à pH acide ; à pH neutre et basique, ce sont les espèces  $HS^-$  et  $S_2^{2-}$  qui sont majoritaires. La diminution de la concentration peut s'expliquer par la décomposition de  $H_2S$  en  $HS^-$ .

### 5.3.2. Evolution de la phase aqueuse

#### 5.3.2.1. Le carbone organique dissous

Le COD de la condition OC est nettement supérieur à celui de CE et PC, ce qui est une conséquence directe de l'oxydation (cf. paragraphe 4.1.2.). Les valeurs du COD de PC et CE sont dans la même gamme et ne suggère pas d'évolutions notables (Tableau 5-3).

#### 5.3.2.2. Evolution de la composition de l'eau

##### 5.3.2.2.1. Expérience sans lactate

De Craen *et al.* (2004), ont travaillé sur l'eau de pore d'échantillons de Boom Clay issue de carottes plus ou moins oxydées. Ils ont montré les conséquences de l'oxydation sur la composition chimique de l'eau. Elles peuvent se résumer en trois réactions (Équation 5-2, Équation 5-3, Équation 5-4) :

- **L'oxydation de la pyrite** : la pyrite s'oxyde selon l'équation suivante



Équation 5-2

Les sulfates ainsi produits sont libérés dans le milieu alors que le Fer peut précipiter sous forme d'hydroxyde de fer (Équation 5-3).



Équation 5-3

Ces réactions libèrent des protons et ont tendance à faire diminuer le pH, ce qui va entraîner, principalement, la dissolution de la calcite (Équation 5-4).

- **La dissolution de la calcite** : la calcite se dissout selon l'équation suivante



Équation 5-4

Cette réaction libère du  $\text{Ca}^{2+}$  ; ce dernier va pouvoir s'échanger avec les ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  dans les feuilletts argileux. Ce phénomène va entraîner une augmentation de la concentration en ions  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$  dans l'eau.

- **La dissolution du quartz** : la dernière conséquence de l'oxydation sur la composition chimique de l'eau est l'augmentation de la concentration en  $\text{Si}^{4+}$

dans l'eau. De Craen *et al.* (2004), l'explique par la dissolution du quartz qui libère le  $\text{Si}^{4+}$ .

Dans nos expériences, l'argile oxydée libère plus de cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  et  $\text{Si}^{4+}$ ) dans le milieu aqueux que l'argile non oxydée (Tableau 5-4). Ces observations concordent avec les études menées précédemment. L'oxydation à 130°C en étuve s'est effectuée sans eau (échantillon lyophilisé) ; cependant, au vu de la concentration en sulfate dans les eaux OC, il semblerait que la pyrite se soit, malgré tout, tout de même altérée.

La distribution des masses et la réponse du FLD n'évoluent pas pour les conditions sans lactate (Figure 5-7 et Figure 5-8). Seul un massif important est observé en fluorescence pour les longueurs d'onde d'émission comprises entre 370 et 500nm (à  $\lambda_{\text{ex}}=270$  nm). Ce massif correspond à la signature naturelle de la matière organique dissoute de la formation de Boom (le massif n°1) décrite dans le chapitre 4.

#### **5.3.2.2.2. Expérience avec lactate**

L'ajout du Na-Lactate augmente, de manière artificielle, la concentration en sodium pour les trois conditions (Tableau 5-4). De plus, il semblerait que cela ait un effet sur la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , en  $\text{Mg}^{2+}$  et, en moindre mesure, sur celle de  $\text{K}^+$ . La concentration de ces ions augmente et cette évolution est indépendante de l'activité bactérienne, puisqu'elle concerne PC, CE et OC. L'ajout de sodium en excès doit perturber l'équilibre chimique et les échanges d'ions dans les feuillets argileux doivent se faire de manière différente que dans les expériences sans lactate.

Pour les réacteurs PC et CE, la concentration en sulfate à la fin de l'expérience est presque nulle : l'oxydation du lactate par les bactéries aboutit à la consommation presque totale du sulfate qui semble être le réactif limitant de la réaction (Tableau 5-4).

Pour les réacteurs PC et CE, la concentration en  $\text{Si}^{4+}$  en solution augmente ; la dissolution du quartz est plus importante avec l'activité bactérienne.

L'activité bactérienne est négative pour les réacteurs OC (Tableau 5-2), avec lactate, malgré des conditions qui semblent être optimales : une concentration presque 4 fois supérieure en sulfate par rapport à PC et CE et l'ajout de lactate. Pour cette condition, l'hypothèse posée dans le paragraphe 5.3.1 peut être affinée : les bactéries sont en vie, mais un ou des éléments présents dans les réacteurs ont un effet inhibiteur sur les bactéries

comme, par exemple, la concentration trop élevée en sulfates. En effet, certains auteurs ont montré qu'une trop grande concentration en sulfate pouvait avoir un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries sulfato-réductrice (Al-Zuhair *et al.*, 2008).

L'analyse en HPLC révèle des différences entre OC et PC/CE, notamment pour la réponse du FLD : un petit massif est présent aux longueurs d'onde d'émission comprises entre 300 et 340nm (Figure 5-7 et Figure 5-8). Ce massif fluoresce aux mêmes longueurs d'ondes que les molécules de type protéique observées en fluorescence 3D lors d'études sur de la MOD récentes (tryptophane/tyrosine like, Parlanti *et al.*, 2000; Birdwell et Engel, 2010). Ce massif est absent pour la condition OC+ Lactate ; il s'agit, donc, d'une molécule produite par l'activité biologique. De plus, son temps d'élution est plus élevé que celui du massif observé aux longueurs d'onde d'émission comprises entre 370 et 500nm ; il s'agit, donc, de molécules de plus petites tailles.

### **5.3.3. Evolution de l'extrait organique**

#### **5.3.3.1. Taux d'extrait**

Le taux d'extrait est constant pour les temps T0 à T4 ; il augmente, seulement, pour les trois conditions, lors de l'ajout de lactate. Cette augmentation est indépendante de l'activité bactérienne et serait, donc, liée directement à l'ajout de Na-lactate dans le milieu (Figure 5-13).

#### **5.3.3.2. Evolution moléculaire**

Les échantillons OC ont une distribution des *n*-alcanes et une masse moyenne qui diffèrent des deux autres conditions (Figure 5-16, Figure 5-19). Ces différences découlent du traitement d'oxydation effectué avant les expériences de biodégradation. Les distributions des *n*-alcanes et des acides alcanoïques n'évoluent pas de T0 à T4, ce qui concorde avec les résultats obtenus sur la phase aqueuse.

Pour les conditions avec lactate, seuls les extraits des réacteurs PC et CE montrent des évolutions : la proportion des acides alcanoïques à chaîne courte ainsi que celle des acides alcanoïques méthylés augmentent (Figure 5-14 et Figure 5-15). Les acides alcanoïques à chaîne courte (<C<sub>20</sub>) sont, généralement, attribués aux bactéries (Sun *et al.*, 1998; Foster *et*

*al.*, 2008) et dérivent de la membrane cellulaire des bactéries. Ces observations sont, donc, cohérentes avec une activité bactérienne.

L'ajout de lactate ne fait pas évoluer la distribution des *n*-alcanes pour les conditions PC et CE ; les bactéries ne consomment, donc, pas de *n*-alcanes lorsqu'elles sont actives ; elles se contentent de consommer la source de carbone qui leurs conviennent, c'est-à-dire le lactate.

Les modifications de l'extrait, observées sur les chromatogrammes pour les conditions PC et CE avec lactate, n'ont d'effets majeurs ni sur la masse moyenne de l'extrait, ni sur la distribution des masses.

#### **5.4. Conclusion**

L'étude de la biodégradation anaérobie sur l'Argile de Boom a été effectuée sur deux types d'argile : une argile non altérée et une argile oxydée artificiellement. Sans source de carbone adaptée aux bactéries, ces dernières ne sont pas actives ; elles ne consomment pas spontanément le carbone présent dans le milieu. L'ajout de lactate dans le milieu met en lumière plusieurs éléments :

- Les conditions PC et CE sont compatibles avec une activité biologique de type sulfato-réductrice à partir du moment où les bactéries ont une source de carbone adaptée. Sous les conditions CE et PC, les réacteurs ont le même comportement, alors que l'on ne devrait trouver aucune bactérie viable dans le premier cas : le biocide n'a pas dû être complètement efficace ou il s'est en partie adsorbé sur l'argile, limitant ainsi son action.
- Pour les conditions PC et CE, le lactate n'a pas eu l'effet souhaité (co-métabolisme), car seul ce dernier a été consommé jusqu'à disparition presque total du sulfate du milieu. La distribution des *n*-alcanes, qui sont les molécules les plus susceptibles d'être consommées, ne varie pas.
- L'activité bactérienne peut être mesurée : 1) dans la MOD par la présence d'un biomarqueur qui fluoresce à une longueur d'onde d'émission comprise entre 300 et 340 nm à une longueur d'onde d'excitation fixée à 270 nm, 2) dans la MOE par la présence d'acides alcanoïques à chaîne aliphatique courte. Ces marqueurs dérivent probablement de l'activité biologique et non d'une consommation/transformation de la matière organique de l'Argile de Boom.

- La condition OC ne semble pas adaptée à l'activité bactérienne sulfato-réductrice. Une des hypothèses proposées est que l'eau du milieu est incompatible avec l'activité bactérienne, car elle contient des ions en concentration très élevée ; certains auraient pu avoir un effet inhibiteur sur l'activité bactérienne.

Ces expériences de biodégradation anaérobie n'ont pas été concluantes bien que les conditions d'incubation aient été favorables, hormis pour la condition OC (présence de sulfates, absence d'O<sub>2</sub>, température d'incubation de 35°C, pH neutre, inoculum autochtone etc.). Cette absence de biodégradation peut avoir trois origines :

- **La biodisponibilité de la MO dans les réacteurs** : bien que la roche ait été broyée, la matière organique susceptible d'être biodégradée par les bactéries sulfato-réductrices n'est pas accessible à ces dernières. En effet, de nombreux auteurs ont montré que la MOD, qui était adsorbée sur les phases minérales dans les sols ou les sédiments, était très stable et peu biodégradée (Sollins *et al.*, 1996; Hedges *et al.*, 1997; Kaiser et Guggenberger, 2000). De même, les phases minérales à forte surface spécifique, telles que les argiles, limitent la biodégradation des composés organiques hydrophobes (Amellal *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2011).
- **La composition de la MO** : la composition de la matière organique joue un rôle important dans sa biodégradabilité. En effet, que ce soit pour la MOE ou la MOD, plus ces dernières sont aromatiques et condensées, moins elles sont biodégradables (Wenger *et al.*, 2001; Glatzel *et al.*, 2003; Kalbitz *et al.*, 2003). Dans le chapitre précédent, il a été montré que la MOD était plutôt aromatique et dérivant de composés ligneux; elle est donc difficilement biodégradable. La MOE, quant à elle, contient des *n*-alcanes qui peuvent être biodégradés par des bactéries sulfato-réductrices (Aeckersberg *et al.*, 1998). Cependant, aucune évolution n'a été observée; c'est pourquoi, il est possible que pour cette fraction hydrophobe, la biodisponibilité de la MO ait joué un rôle plus important que la composition de la MO.
- **La cinétique** : des études ont montré que les réactions de biodégradation anaérobie de matière organique naturelle étaient plus lentes que les réactions de biodégradation aérobie (Yamane *et al.*, 1997; Larter *et al.*, 2003). Ainsi, si l'on considère que l'inoculum peut dégrader la matière organique de la formation de Boom, une faible cinétique pourrait expliquer une absence apparente de réaction pour les temps T4 (12 mois), par exemple.

Ainsi, dans le cadre du laboratoire souterrain, il semble que l'hypothèse selon laquelle les bactéries sulfato-réductrices puissent affecter la matière organique des Argiles de Boom saines ou préalablement oxydées (contact avec l'air de ventilation lors du creusement, puis confinées par auto-sealing) n'est pas validée. Seul un apport de carbone facilement assimilable pourrait favoriser une telle activité bactérienne. Il reste néanmoins à envisager le rôle d'autres catégories d'activités bactériennes ; en particulier, les bactéries aérobies pourraient jouer un rôle dans l'altération de la matière organique, notamment lors de la phase d'excavation, puis lors de la phase d'étude.

## 5.5. *Références*

- Aeckersberg, F., F. A. Rainey and F. Widdel (1998).** "Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions." *Archives of Microbiology* 170(5): 361-369.
- Al-Zuhair, A., M. H. El-Naas and H. Al-Hassani (2008).** "Sulfate inhibition effect on sulfate reducing bacteria." *Journal of Biochemical Technology* 1(02).
- Amellal, N., J. M. Portal and J. Berthelin (2001).** "Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil." *Applied Geochemistry* 16(14): 1611-1619.
- Birdwell, J. E. and A. S. Engel (2010).** "Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy." *Organic Geochemistry* 41(3): 270-280.
- Chen, J. L., M. H. Wong, Y. S. Wong and N. F. Y. Tam (2011).** "Modeling sorption and biodegradation of phenanthrene in mangrove sediment slurry." *Journal of Hazardous Materials* 190(1-3): 409-415.
- Coble, P. G. (1996).** "Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy." *Marine Chemistry* 51(4): 325-346.
- Cui, X., W. Hunter, Y. Yang, Y. Chen and J. Gan (2011).** "Biodegradation of pyrene in sand, silt and clay fractions of sediment." *Biodegradation* 22(2): 297-307.
- De Craen, M., M. Van Geet, L. Wang and M. Put (2004).** "High sulphate concentrations in squeezed Boom Clay pore water: evidence of oxidation of clay cores." *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 29(1): 91-103.
- Foster, A. L., L. Munk, R. A. Koski, W. C. Shanks lii and L. L. Stillings (2008).** "Relationships between microbial communities and environmental parameters at sites impacted by mining of volcanogenic massive sulfide deposits, Prince William Sound, Alaska." *Applied Geochemistry* 23(2): 279-307.
- Glatzel, S., K. Kalbitz, M. Dalva and T. Moore (2003).** "Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide efflux from restored peat bogs." *Geoderma* 113(3-4): 397-411.
- Hedges, J. I., R. G. Keil and R. Benner (1997).** "What happens to terrestrial organic matter in the ocean?" *Organic Geochemistry* 27(5-6): 195-212.
- Kaiser, K. and G. Guggenberger (2000).** "The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils." *Organic Geochemistry* 31(7-8): 711-725.

- Kalbitz, K., J. Schmerwitz, D. Schwesig and E. Matzner (2003).** "Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties." *Geoderma* 113(3-4): 273-291.
- Larter, S., A. Wilhelms, I. Head, M. Koopmans, A. Aplin, R. Di Primio, C. Zwach, M. Erdmann and N. Telnaes (2003).** "The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface--part 1: biodegradation rates in petroleum reservoirs." *Organic Geochemistry* 34(4): 601-613.
- Parlanti, E., K. Wörz, L. Geoffroy and M. Lamotte (2000).** "Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs." *Organic Geochemistry* 31(12): 1765-1781.
- Peters, K. E. and J. M. Moldowan (1993).** "The biomarker Guide. Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments." eds. Peters and Moldowan.
- Sollins, P., P. Homann and B. A. Caldwell (1996).** "Stabilization and destabilization of soil organic matter: Mechanisms and controls." *Geoderma* 74(1-2): 65-105.
- Sun, M. Y., S. G. Wakeham, R. C. Aller and C. Lee (1998).** "Impact of seasonal hypoxia on diagenesis of phytol and its derivatives in Long Island Sound." *Marine Chemistry* 62(1-2): 157-173.
- Wenger, L. M., C. L. Davis and G. H. Isaksen (2001).** Multiple Controls on Petroleum Biodegradation and Impact on Oil Quality. Proceedings - SPE Annual Technical Conference and Exhibition.
- Wenger, L. M., C. L. Davis and G. H. Isaksen (2002).** "Multiple controls on petroleum biodegradation and impact on oil quality." *SPE Reservoir Evaluation and Engineering* 5(5): 375-383.
- Yamane, A., K. Sakakibara, M. Hosomi and A. Murakami (1997).** "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in estuarine sediment of tama river in Tokyo urban area." *Water Science and Technology* 35(8): 69-76.





# **Conclusions Générales**



## 6. Conclusions générales

Le laboratoire souterrain HADES (site de Mol, Belgique) a été creusé au sein des argiles de la formation de Boom, afin d'étudier la faisabilité d'un stockage de déchets radioactifs en couche géologique profonde. De nombreuses études sont menées par ailleurs, afin d'évaluer les conséquences de la mise en place de galeries dans la formation argileuse ; elles impliquent des étapes d'excavation et de ventilation en continu. Parmi les différentes observations faites lors d'études antérieures sur les eaux de piézomètres situés dans les galeries, il a été constaté que **la teneur du carbone organique dissous (COD) variait fortement, puis diminuait au cours du temps sans explication évidente dans les différents piézomètres mis en place.**

Suite à ces observations, deux hypothèses majeures ont été proposées pour expliquer cette variabilité de teneur en COD. Pendant et après l'excavation des galeries (phase d'exploitation du site souterrain avec une ventilation en continue), l'oxygène de l'air entre en contact avec l'argile jusqu'à présent confinée et peut entraîner (i) **l'oxydation de la matière organique pouvant conduire à la formation de composés hydrosolubles** et (ii) la perturbation des équilibres eau-minéraux, avec notamment l'oxydation de la pyrite induisant la production de sulfates. Ensuite, lors de la phase de fermeture du site (confinement du système), les conditions anaérobies associées à la présence de sulfates nouvellement formés peuvent favoriser la prolifération de **bactéries anaérobies sulfato-réductrices**, induire une biodégradation de la matière organique et conduire à la formation de produits organiques hydrosolubles.

**Ce travail de recherche avait, ainsi, pour objectif de mieux comprendre les conséquences sur la matière organique de la mise en place d'une galerie de stockage au sein de la formation des Argiles de Boom à Mol. Il visait, notamment, à hiérarchiser les rôles respectifs (i) de l'oxydation à l'air et (ii) de la biodégradation anaérobie sur la production d'espèces organiques hydrosolubles.**

Les réponses à ces objectifs nécessitaient, d'abord, la caractérisation de la matière organique présente. Ensuite, deux types d'altérations artificielles ont été réalisés au laboratoire sur des échantillons d'Argile de Boom : oxydation à l'air et biodégradation anaérobie. La matière organique de ces échantillons altérés artificiellement a été comparée à celle de deux séries altérées naturellement *in situ* ainsi qu'à des échantillons d'eaux issus

de piézomètres, afin de replacer les résultats expérimentaux dans le contexte du site de HADES.

### **1) Origine, préservation et maturité de la matière organique de la formation de Boom.**

Les données bibliographiques ciblant l'origine, la préservation et la maturité thermique de la matière organique de la formation de Boom révèlent une composition hétérogène. En effet, la matière organique de la formation a une origine mixte marine/terrestre et la proportion en kérogène type II/type III varie tout au long de la colonne stratigraphique. Au cours de ce travail, la matière organique de deux échantillons non altérés, prélevés directement dans le laboratoire souterrain de Mol, a été caractérisée aux échelles élémentaires, moléculaires et spectroscopiques, afin de préciser le type de MO prédominant (marine/ terrestre).

Dans ce travail, les analyses géochimiques de la matière organique extractible au chloroforme (MOE) et du kérogène des deux échantillons de référence révèlent **une origine essentiellement continentale (type III) et immature thermiquement**. Ceci est révélé par l'abondance des composés polaires linéaires (acide *n*-alcanoïques, alcanols...) et de dérivés de la lignine, hérités des plantes supérieures. Cependant, quelques marqueurs de matière organique d'origine marine, présents dans la MOE, soulignent la mixité des sources. En comparant nos données Rock-Eval avec celles des échantillons du sondage HADES 2001/4 (Van Geet, 2002), il s'avère que **nos échantillons de référence sont représentatifs de la matière organique présente dans le membre *Putte***.

### **2) Caractérisation de la matière organique dissoute du site de Mol.**

La matière organique hydrosoluble (MOD) des échantillons non altérés est composée majoritairement d'assemblages moléculaires de taille inférieure à 3.5 kDa et constituée à la fois de structures aliphatiques et aromatiques. La nature des composés aromatiques est compatible avec une contribution majeure de produits dérivant de la lignine. Les signatures de fluorescence 3D révèlent la présence d'un fluorophore principal, appelé dans ce travail Massif n°1, correspondant à un domaine généralement attribué aux acides humiques.

### 3) Impact de l'oxydation à l'air sur la matière organique de la formation de Boom.

Des expériences d'oxydation artificielle ont été réalisées afin de simuler une exposition à l'air de la barrière géologique (contexte d'excavation et d'exploitation des galeries). Deux séries d'expériences ont été menées au laboratoire :

- Une série d'oxydation à 80°C, afin d'étudier l'évolution de la composition de la matière organique de la formation de Boom dans son ensemble (MOE + MOD + kérogène + phases minérales) ;
- Une série d'oxydation à 130°C réalisée sur le kérogène préalablement isolé et sur le kérogène associé aux phases minérales afin d'étudier, plus spécifiquement et sur le long terme, les conséquences d'une oxydation à l'air sur le kérogène et le rôle éventuel des phases minérales.

Ces oxydations ont été réalisées à des températures plus importantes que celle du site (80°C et 130°C au lieu de 25°C) afin d'accélérer la cinétique des processus et permettre, dans le cadre d'une thèse, de mener à bien les expériences. L'évolution des caractéristiques de la matière organique (Kérogène, MOE, MOD), lors de ces oxydations artificielles, a été comparée à celle d'une série d'altération naturelle *in situ* grâce à des échantillons prélevés directement dans le laboratoire HADES. Les analyses géochimiques montrent que l'évolution de la matière organique des deux séries suit la même tendance. Cette similitude valide les conditions expérimentales choisies, dans la mesure où elles sont analogues à l'oxydation à l'air en conditions *in situ*. Les principales étapes d'oxydations identifiées dans ce travail ont ainsi été établies :

- Perte relative d'hydrogène et enrichissement en oxygène du kérogène ;
- Oxydation catalysée par les argiles de l'extrait organique néoformé induisant la formation de composés de faibles poids moléculaires (notamment *n*-alcanes, 2-alcanols et 2-alcanones) ;
- Augmentation consécutive de la teneur en COD et extraction sélective par dissolution dans l'eau de formation des espèces les plus hydrosolubles. Cette matière organique hydrosoluble générée est constituée de molécules principalement mono-aromatiques fortement fonctionnalisées (une à plusieurs fonctions acides) et de poids moléculaires décroissants avec l'avancée du processus d'altération. Les marqueurs moléculaires suggèrent que la MOD serait principalement issue du kérogène de type III. De plus, les effets de l'oxydation sur la nature de la MOD sont révélés par la disparition progressive de la fraction « humic like ».

## Conclusions Générales.

Bien que les deux séries d'oxydation naturelle et artificielle reproduisent les mêmes caractéristiques géochimiques (nature des produits d'altération, évolutions), pour les degrés d'oxydation les plus élevés, la teneur en MOD est maximale pour la série d'oxydation artificielle alors qu'elle régresse pour la série naturelle. La présence d'eau (eau de formation d'abord, puis humidité de la galerie) pourrait expliquer cette différence. En effet, les échantillons les plus altérés en galerie présentent une altération notable de la pyrite (apparition de sulfates, de la jarosite), ce qui n'est jamais le cas dans nos oxydations artificielles, menées en atmosphère sèche. Les produits de dégradation des minéraux jouent, donc, très certainement un rôle dans la divergence des évolutions géochimiques de la matière organique des deux séries. Par ailleurs, la présence d'eau en condition *in situ* dans les galeries peut également permettre l'installation et le développement de micro-organismes et favoriser une altération supplémentaire de la MOD.

**La matière organique des deux séries, altérées artificiellement et *in situ*, montrent des évolutions très similaires aussi bien sur des paramètres globaux (pyrolyse Rock-Eval) qu'à l'échelle moléculaire (biomarqueurs). Cette comparaison expérimentation/*in situ* permet ainsi (i) de conclure que le processus majeur d'altération de la matière organique dans les galeries actuelles est l'oxydation à l'air et (ii) de valider l'approche expérimentale choisie (étuve ventilée – température). Par ailleurs, ce travail démontre sans ambiguïté que l'oxydation à l'air induit une altération majeure du kérogène, conduisant à une production de matière organique hydrosoluble de composition chimique spécifique.**

#### **4) Impact de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de la formation de Boom. Cas des bactéries sulfato-réductrices.**

Dans le scénario d'altération oxydante liée à l'excavation et à la ventilation des galeries, il est considéré que l'altération, même ménagée, de la pyrite libèrera des sulfates dans les eaux de formation. Après la fermeture du site, la mise en place de conditions anaérobies et la présence de sulfates en solution pourront favoriser le développement de bactéries sulfato-réductrices. Afin de vérifier quel est potentiellement le rôle de la matière organique (saine ou oxydée) des Argiles de Boom dans de telles conditions, des expériences de biodégradation anaérobie ont été réalisées.

Deux modalités expérimentales de biodégradation ont été testées : la biodégradation d'une argile non altérée et la biodégradation d'une argile préalablement oxydée à l'air pour

## Conclusions Générales.

simuler une barrière altérée suite à l'excavation. Le milieu de culture a été enrichi en sulfate, facilitant ainsi le développement éventuel des bactéries sulfato-réductrices. En revanche, aucune source de carbone étrangère à la MO présente dans l'argile n'a été ajoutée.

Les tests d'activités bactériennes sur les premier pas de temps (6 mois) se sont révélés négatifs ; c'est pourquoi, une source de carbone additionnelle (lactate) a été ajoutée dans une partie des réacteurs, afin de favoriser une réaction de type co-métabolisme. Suite à cet ajout, l'activité bactérienne a été stimulée dans les réacteurs contenant de l'argile saine. Cependant, il s'avère que seul le lactate a été consommé alors qu'aucune **modification majeure de la MO des Argiles de Boom n'a pu être constatée**, mise à part des marqueurs du développement de l'activité bactérienne. Ces marqueurs sont présents, à la fois, dans la fraction MOE (acides *n*-alcanoïques spécifiques) et MOD (fluorophore typique des molécules de type protéique).

Les bactéries des réacteurs, contenant de l'argile préalablement oxydée, n'ont pas présenté d'activité de type sulfato-réductrice avec ou sans carbone additionnel (lactate). Cette inhibition de l'activité bactérienne pour l'argile préalablement oxydée est peut être liée à une composition de l'eau des réacteurs, très concentrée en ions, incompatible avec le développement d'une activité bactérienne.

**Ainsi, les bactéries sulfato-réductrices, même si elles sont initialement présentes dans la formation des Argiles de Boom, ne semblent pas stimulées par la formation de sulfate suite à l'altération de la pyrite. En effet, la nature de la matière organique de la formation préalablement oxydée ou non ne semble pas favoriser un développement bactérien. En conséquence, aucune transformation de la matière organique de la formation n'a pu être révélée, notamment la production de composés hydrosolubles, ce qui invalide l'hypothèse de l'influence d'organismes sulfato-réducteurs sur la nature de la MOD.**

### **5) Origine de la matière organique hydrosoluble des eaux de piézomètres du site de HADES.**

La matière organique hydrosoluble de la formation de Boom à Mol a été étudiée *in situ*, à partir de quatre piézomètres dont les conditions de mise en place et les faciès prélevés diffèrent. Cependant, l'ensemble des caractéristiques spectroscopiques de la MOD de ces quatre piézomètres sont semblables. Cette MOD est constituée de molécules aliphatiques et aromatiques de taille majoritairement inférieure à 3.5 kDa. La MOD présente un fluorophore

## Conclusions Générales.

qui fluoresce à des longueurs d'ondes spécifiques, identiques à celles des argiles saines (Massif n°1) et différentes de celles issues des eaux provenant des argiles préalablement oxydées (présence du Massif n°2). Par ailleurs, la matière organique hydrosoluble issue des échantillons oxydés (naturellement ou artificiellement) présente des critères géochimiques et spectroscopiques spécifiques. Ces critères ne sont jamais observés dans les eaux des piézomètres.

**Ainsi, actuellement, la MOD issue des piézomètres ne semble pas être héritée d'une MO altérée. Les variations de concentration en COD entre les piézomètres semblent être une conséquence des différences de faciès au sein de la formation de Boom. De plus, les fluctuations observées au cours du temps dans un des piézomètres de la galerie (Morphéus) peuvent s'expliquer par un régime transitoire de mise en équilibre du système suite à l'installation du piézomètre. La composition de la MOD issue des piézomètres serait gouvernée par la nature et la teneur en kérogène de l'argile (le kérogène de type III serait la source principale de MOD) et non pas par les effets d'une altération oxydante.**

## 6) Perspectives.

### Tracage de l'altération en galerie.

La mise au point d'une méthode d'analyse multi-instrumentale pour les eaux des piézomètres a permis de caractériser la matière organique dissoute des Argiles de Boom. Par ailleurs, les mêmes outils analytiques ont conduit à identifier les caractéristiques propres à la matière organique hydrosoluble néoformée lors de l'oxydation. L'ensemble des outils mis au point devrait permettre le suivi de la composition des eaux prélevées dans la barrière géologique et, ainsi, de diagnostiquer l'évolution de la perturbation oxydante. La méthode d'analyse par spectroscopie de fluorescence 3D semble, notamment, être la plus adaptée pour des mesures en grand nombre et/ou en continu *in situ* de la barrière.

### Relations entre la composition de la matière hydrosoluble et architecture sédimentaire de l'Argile de Boom.

L'ensemble des résultats de ce travail suggère que la matière organique dissoute est en intime relation avec la présence du kérogène de type III de l'argile. En effet, l'analyse moléculaire, notamment, révèle que la matière organique des eaux de piézomètres contient

## Conclusions Générales.

une proportion relative de marqueurs de la lignine importante par rapport aux autres biomarqueurs. Les expériences d'oxydation montrent que ce sont les composés aromatiques oxygénés (hérités de la lignine ou de ses produits d'oxydation) qui sont préférentiellement solubles. Il serait ainsi intéressant de vérifier si les teneurs de matière organique dissoute peuvent être mis en relation avec la nature du kérogène (proportion de kérogène de type II) et sa distribution en liaison avec l'architecture sédimentaire (caractéristiques sédimentologiques et séquentielles) des Argiles de Boom. Etablir une telle relation contribuerait à une meilleure compréhension des circulations des eaux de formation.

### Etudier l'impact de l'oxydation à l'air sur une matière organique dont la composition est prédominée par un kérogène de type II.

La matière organique étudiée, dans le cadre de ce travail, s'est révélée dominée par un kérogène de type III (origine continentale). Cependant, une des caractéristiques de la formation de Boom est son hétérogénéité de composition avec, notamment, des niveaux plus riches en matière organique d'origine marine (type II). Cette matière organique est potentiellement plus aliphatique et moins aromatique que celle étudiée dans ce travail et pourrait, donc, réagir différemment à l'oxydation. En effet, l'oxydation d'un kérogène plus riche en structures aliphatiques et contenant moins de composés aromatiques pourrait induire des différences de composition (qualitativement et quantitativement) des fractions MOE et MOD. C'est pourquoi, une étude de l'influence de l'oxydation à l'air sur la matière organique de la formation de Boom principalement de type II et ses conséquences sur la formation de composés organiques hydrosolubles doit être envisagée.

### Evaluer les conséquences d'une biodégradation aérobie sur la matière organique des Argiles de Boom.

Le bilan géochimique effectué sur les échantillons les plus altérés de la galerie ont montré que l'oxydation en présence d'eau conduisait à des degrés d'altération bien plus avancés que dans les expériences effectuées sans eau : altération de la pyrite, formation de sulfates, de jarosite, chute de la teneur en MOD et du TOC. Il est très fortement soupçonné que des micro-organismes soient impliqués à ce stade. En effet, l'altération de la pyrite est souvent accélérée par une activité bactérienne. Mais la chute du TOC et du COD reste le plus frappant dans les mesures préliminaires acquises. Cela signifie que la matière organique est efficacement éliminée du système eau-roche, a priori sous forme CO<sub>2</sub>.

## Conclusions Générales.

Des tests de biodégradation aérobie de matières organiques fossiles contenus dans des argiles ont été menés à G2R dans le cadre de travaux non publiés. Ces tests montrent que la biodégradation aérobie modifie la composition de la matière organique de façon bien plus efficace qu'en conditions anaérobies. Des tests similaires devraient être réalisés sur l'Argile de Boom, saine et préalablement oxydée, afin d'évaluer le rôle de la biodégradation aérobie de la barrière géologique en phase d'excavation et d'exploitation.

### Rôle des minéraux dans l'oxydation de la matière organique des Argiles de Boom.

Les oxydations expérimentales réalisées sur le kérogène seul et en présence des phases minérales (notamment les phases argileuses) ont révélé un pouvoir catalytique relativement fort des minéraux sur l'altération du kérogène. Il paraît essentiel de mieux identifier les phases minérales les plus réactives et d'évaluer leur rôle dans le phénomène catalytique. Pour cela, des expériences d'oxydation sur des kérogènes de natures différentes (type III ou type II) en présence de minéraux spécifiques (calcite, smectite, illite...) permettraient de mieux prédire l'intensité de l'oxydation suivant la nature minéralogique et géochimique de la formation.

Le contexte aérobie de dégradation de la pyrite modifie considérablement la nature de la roche. La composition de l'eau interstitielle, conditions Eh, pH, la libération de composés minéraux réactifs peuvent jouer un rôle sur la dégradation de la matière organique. C'est, d'ailleurs, dans les échantillons présentant les modifications minéralogiques les plus fortes que la matière organique est la plus affectée (perte nette de carbone organique total). En contexte aérobie, il est nécessaire d'évaluer l'impact sur la matière organique de ces modifications chimiques et minéralogiques en concurrence de la biodégradation.

### Impact de l'oxydation sur les propriétés de barrière.

L'oxydation de la matière organique des Argiles de Boom conduit non seulement à augmenter les teneurs en matière organique dissoute, mais aussi à des spécificités géochimiques propres (tailles moléculaires, fonctions organiques). Il serait nécessaire de tenir compte de ces caractéristiques dans l'évaluation des propriétés de barrière des Argiles de Boom. Cela concerne notamment :

- Les capacités de la matière organique (kérogène oxydé, matière organique hydrosoluble néoformée) à complexer les radionucléides et à les fixer/transporter.

### Conclusions Générales.

- La réactivité de la matière organique oxydée vis-à-vis d'un événement thermique. En effet, la matière organique réagit différemment à un échauffement lorsqu'elle a subi préalablement une oxydation (Landais *et al.*, 1991; Michels *et al.*, 1993; Gerard-Zaugg, 1994), car cette dernière modifie la teneur et la nature des fonctions oxygénées par rapport au kérogène non altéré. La quantité de CO<sub>2</sub> ainsi que la cinétique de formation sont, alors, susceptibles d'être modifiés.

## Références

**Gerard-Zaugg, L., (1994).** "Effets de la maturation thermique sur les processus d'oxydation des charbons". PhD-dissertation, Université de Nancy,

**Landais, P., R. Michels, J. Kister, J. M. Dereppe and Z. Benkhedda (1991).** "Behavior of oxidized type II kerogen during artificial maturation." *Energy and Fuels* 5(6): 860-866.

**Michels, R., P. Landais, L. Gerard and J. Kister (1993).** "Removal of the oxygenated functions during thermal maturation of an artificially oxidized coal." *Elimination des fonctions oxygénées lors de la maturation thermique d'un charbon oxyde artificiellement* 316(10): 1375-1381.

**Van Geet, M. (2002).** "Interpretation of Rock-eval data on samples of core HADES 2001/4." *SCK.CEN report, R-3605, Mol, Belgium, 12pp.*





# Annexes



## LISTES DES ANNEXES

<b>Annexe 1.</b> Test d'absorbance avant et après SPE sur l'eau de piézomètre EGBS d'après Kim <i>et al.</i> , 2003.....	<b>A5</b>
<b>Annexe 2.</b> Données Rock Eval des échantillons (roche totale) du sondage HADES 2001/4 (Van Geet, 2002) .....	<b>A6</b>
<b>Annexe 3.</b> Comparaison échantillons soxhlet et leaching.....	<b>A7</b>
<b>Annexe 4.</b> Valeurs des rapports $I_1$ et $I_2$ calculés à partir des EEM de la fraction totale pour les échantillons EGBS, Morphéus F2, Archimède F1 et Spring 116 F1. ....	<b>A8</b>
<b>Annexe 5.</b> Présentation des échantillons naturels prélevés au niveau de la fenêtre TDR 97W.....	<b>A9</b>
<b>Annexe 6.</b> Présentation des échantillons naturels prélevés en carrière de Kruibeke et en carothèque.....	<b>A10</b>
<i>A. Les échantillons prélevés en carrière de Kruibeke, des échantillons altérés naturellement en surface .....</i>	<b>A11</b>
<i>B. Présentation des échantillons prélevés en carothèque .....</i>	<b>A12</b>
<b>Annexe 7.</b> Protocole général d'étude des échantillons prélevés en carrière et carothèque.....	<b>A14</b>
<b>Annexe 8.</b> Pourcentages d'humidité des échantillons prélevés en carrière et en carothèque.....	<b>A15</b>
<b>Annexe 9.</b> Résultats de l'analyse Rock Eval sur la roche totale des échantillons prélevés en carrière et en carothèque .....	<b>A15</b>
<b>Annexe 10.</b> Echantillons prélevés en carrière de Kruibeke, étude de la MOE.....	<b>A16</b>
<b>Annexe 11.</b> Echantillons prélevés en carothèque, étude de la MOE.....	<b>A18</b>

LISTE DES FIGURES :

<b>Figure 1 :</b> 1_Plan du laboratoire souterrain HADES (d'après De Craen <i>et al.</i> , 2008) avec A : Premier puits, B_Galerie URL, C : Puits expérimental et galerie expérimentale, D : Galerie Test Drift, E : Second puits, F : Galerie de liaison (connecting gallery), G :Galerie PRACLAY. 2_Fenêtre TDR 97W en octobre 2008 avec la carotte échantillonnée en place. 3_Position des échantillons Gal-1b à Gal-5b sur la carotte.....	<b>A9</b>
<b>Figure 2 :</b> Position des sondages et de la carrière de Kruibeke sur la carte des affleurements de la formation de Boom en Belgique (d'après Marivoet <i>et al.</i> , 2000) .....	<b>A10</b>
<b>Figure 3:</b> Position des échantillons Car-1A, Car-1F, Car-2A et Car-2F sur le log stratigraphique (d'après Vandenberghe et Van Echelpoel, 1987), Photo des échantillons Car-1A, Car-1F, Car-2A et Car-2F.....	<b>A12</b>
<b>Figure 4 :</b> Position des échantillons Doel-a-1998, Doel-b-1998, Essen-2006 et Weelde-2003 sur les log stratigraphique des sondages Doel-2b, Essen-1 et Weelde-1 (d'après Wemaere <i>et al.</i> , 2005; Labat <i>et al.</i> , 2008.) BDT=Below the Drilling Table.....	<b>A13</b>
<b>Figure 5 :</b> Série naturelle de la carrière de Kruibeke_ distributions des $n$ -alcanes ( $m/z=57$ ), acides alcanoniques ( $m/z=117$ ), 1-alcanols ( $m/z=75$ ), 2-alcanols ( $m/z=117$ ), 2-alcanones ( $m/z=58$ ) et alcanals ( $m/z=82$ ). .....	<b>A16</b>
<b>Figure 6 :</b> Série naturelle de la carrière de Kruibeke_Masses moyennes et distribution des masses de l'extrait total des échantillons Car-1F, Car-1A, Car-2F et Car-2A. ....	<b>A17</b>

**Figure 7** : Série naturelle, échantillons de carotte\_ distributions des *n*-alcanes ( $m/z=57$ ), acides alcanoniques ( $m/z=117$ ), 1-alcanols ( $m/z=75$ ), 2-alcanols ( $m/z=117$ ), 2-alcanones ( $m/z=58$ ) et alcanals ( $m/z=82$ ). ..... **A18**

**Figure 8** : Série naturelle, échantillons de carotte \_Masses moyennes et distribution des masses de l'extrait total des échantillons Essen-2006, Weelde-2003, Doel-a-1998, Doel-b-1998..... **A19**

**LISTE DES TABLEAUX :**

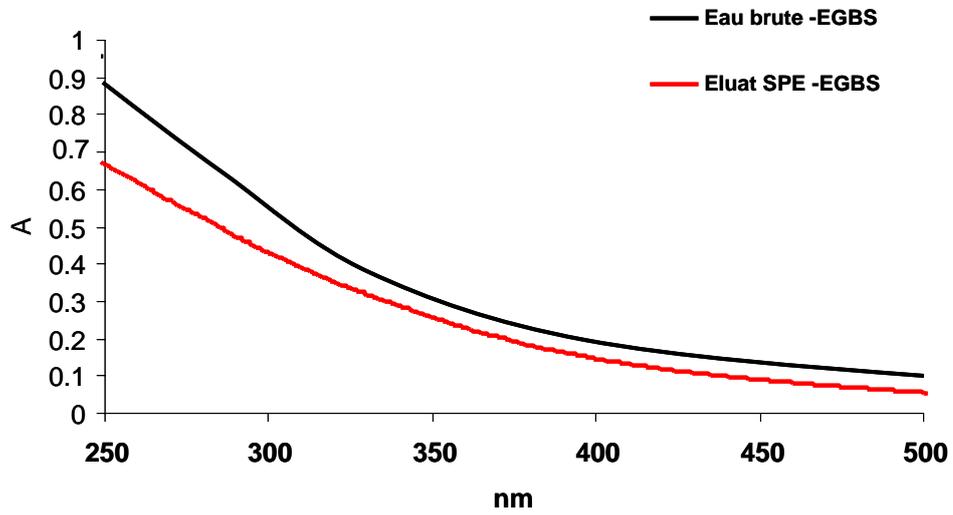
**Tableau 1** : Résultats de l'analyse Rock Eval sur la roche totale des échantillons prélevés au niveau de la fenêtre TDR 97W ..... **A9**

**Tableau 2** : Profondeur des échantillons Doel-a-1998, Doel-b-1998, Essen-2006 et Weelde-2003 et situation dans la formation de Boom. BDT=Below the Drilling Table. .... **A13**

**Tableau 3** : Série naturelle de la carrière de Kruibeke\_ Valeurs des rapports  $Pr/nC_{17}$ ,  $Ph/nC_{18}$  et  $Pr/Ph$ , du CPI pour les *n*-alcanes 2-alcanols et les 2-alcanones, et valeur du rapport BPM/HPM pour les *n*-alcanes ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), les acides alcanoniques ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), 1-alcanols ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanones ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ) et alcanals ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{24})$ ) ..... **A17**

**Tableau 4** : Série naturelle, échantillons de carotte \_Valeurs des rapports  $Pr/nC_{17}$ ,  $Ph/nC_{18}$  et  $Pr/Ph$ , du CPI pour les *n*-alcanes 2-alcanols et les 2-alcanones, et valeur du rapport BPM/HPM pour les *n*-alcanes ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), les acides alcanoniques ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), 1-alcanols ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanones ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ) et alcanals ( $\Sigma (C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{24})$ ) ..... **A19**

### Annexe 1. Test d'absorbance avant et après SPE sur l'eau de piézomètre EGBS d'après Kim *et al.*, 2003

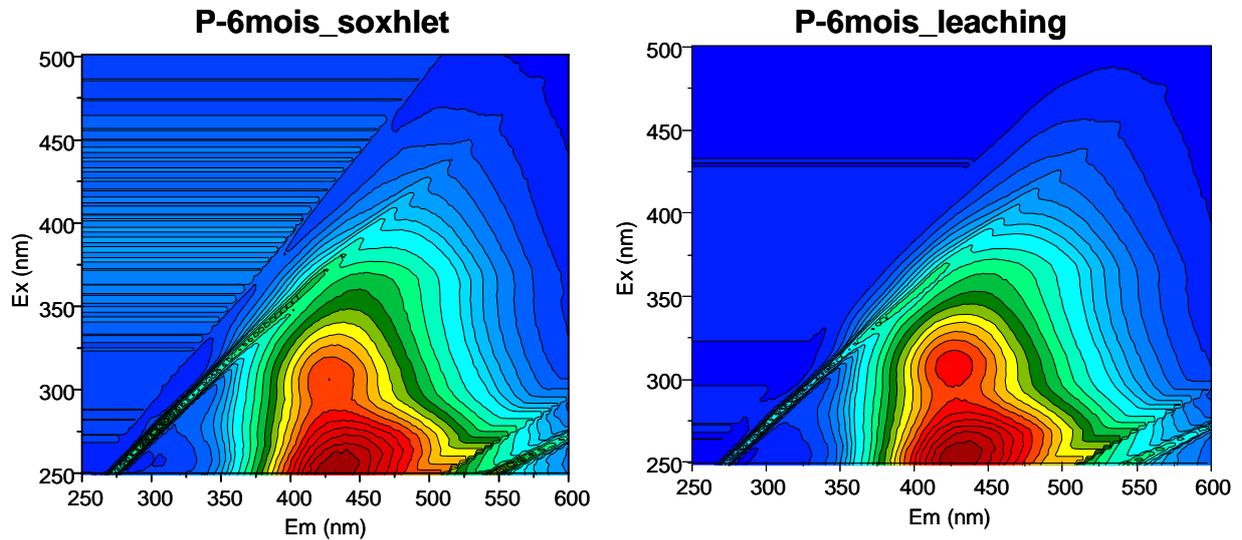


## Annexe 2. Données Rock Eval des échantillons (roche totale) du sondage HADES 2001/4 (Van Geet, 2002)

depth		filter	TOC (%)	T <sub>max</sub> [°C]	S1 [mg HC/g rock]	S2 [mg HC/g rock]	S3 [mg CO2/g rock]	HI [mg HC/g TOC]	OI [mg CO2/g TOC]	
-202,575	Punta		2,05	418	0,04	1,59	0,89	77	43	
-204,275			1,84	416	0,03	1,26	0,93	69	50	
-209,975			1,56	417	0,03	0,78	0,75	50	48	
-210,725			1,40	413	0,02	0,72	0,67	51	48	
-211,475			2,25	424	0,09	3,12	1,08	139	48	
-213,325			1,21	419	0,03	0,79	0,80	65	66	
-214,225			1,25	416	0,04	0,90	0,79	72	63	
-215,175			1,58	421	0,05	1,38	0,95	87	60	
-216,175			1,39	418	0,07	1,08	1,21	78	87	
-217,125			F23	1,37	425	0,07	1,68	1,27	123	93
-218,325				2,76	427	0,19	5,62	2,58	204	94
-218,775				1,54	424	0,09	1,84	1,82	119	118
-219,875				1,39	421	0,07	1,23	2,16	88	155
-220,025				1,37	421	0,05	0,91	2,11	66	154
-220,825			F20	2,70	427	0,13	3,46	4,30	128	159
-221,275				1,51	424	0,08	1,45	3,52	96	232
-221,975				1,24	418	0,06	0,85	1,10	68	88
-222,625		F18	2,93	426	0,19	6,15	2,17	210	74	
-222,775			1,35	422	0,06	1,03	1,37	77	102	
-222,925			1,35	418	0,05	0,87	0,63	65	46	
-223,225			1,08	415	0,04	0,55	0,83	50	77	
-224,025			1,43	422	0,08	1,54	1,00	108	70	
-224,855			2,16	425	0,12	2,98	1,48	138	68	
-225,475			1,19	415	0,06	0,96	1,13	81	95	
-226,025		F15	2,67	424	0,16	5,73	0,62	215	23	
-226,175			1,55	421	0,08	1,66	0,52	107	33	
-226,325			1,42	417	0,07	1,24	0,49	87	34	
-227,245		F13	1,82	424	0,09	2,41	0,55	132	30	
-227,675			2,54	427	0,17	5,43	1,26	214	50	
-227,825		F12	1,89	423	0,08	2,42	0,90	128	48	
-227,975			1,28	421	0,05	1,00	0,70	78	54	
-228,375			2,01	423	0,12	3,17	1,18	158	59	
-228,675			1,20	413	0,06	0,86	0,78	71	65	
-229,125		F10	2,25	424	0,11	3,43	1,29	152	57	
-229,475			1,39	417	0,07	1,15	1,07	82	77	
-229,800		F9	2,79	424	0,18	5,26	1,70	188	61	
-229,975			1,47	426	0,10	2,12	0,50	144	34	
-230,125			1,79	423	0,09	2,40	0,48	134	27	
-230,275		F8	2,51	425	0,13	4,98	0,69	198	27	
-230,495			1,15	424	0,08	1,65	0,56	144	48	
-230,645			1,59	425	0,09	2,24	0,59	141	37	
-230,795			3,20	425	0,20	7,44	1,40	233	44	
-230,925			4,13	423	0,27	11,29	1,34	274	32	
-231,075			3,79	423	0,25	10,71	1,25	283	33	
-231,200			2,57	425	0,13	4,66	1,17	181	45	
-231,310			2,76	424	0,15	5,18	1,51	188	55	
-231,460			2,60	425	0,17	5,37	1,57	207	60	
-231,625			2,77	425	0,15	5,99	1,61	216	58	
-231,825		F6	3,27	423	0,20	8,12	2,11	248	64	
-232,025			2,75	426	0,18	7,24	1,62	263	59	
-232,325			3,10	423	0,17	6,78	2,09	218	67	
-232,525			2,83	427	0,16	6,45	1,87	228	66	
-232,675			2,27	427	0,12	3,79	1,17	167	51	
-232,825			2,28	428	0,12	4,22	1,27	185	56	
-233,015			2,19	426	0,12	3,62	1,34	166	61	
-233,155			3,69	425	0,18	7,01	2,22	190	60	
-233,268			2,76	425	0,17	5,64	1,59	204	58	
-233,455	Terhagen		1,15	422	0,06	1,22	0,73	107	64	
-233,825		F4	1,26	420	0,08	1,29	0,78	102	62	
-234,125			0,85	418	0,04	0,61	0,65	72	76	
-234,875			1,10	421	0,07	1,09	0,62	99	57	
-235,225		F2	1,14	421	0,07	0,61	0,59	53	51	
-235,875			0,99	419	0,05	0,76	0,47	77	47	
-236,725			1,88	427	0,19	3,42	0,89	182	47	
-237,075			0,92	421	0,04	0,68	0,34	73	37	
-227,095			2,89	427	0,15	5,98	1,15	207	40	
-229,875			3,17	425	0,18	6,44	1,56	203	49	

### Annexe 3. Comparaison échantillons soxhlet et leaching

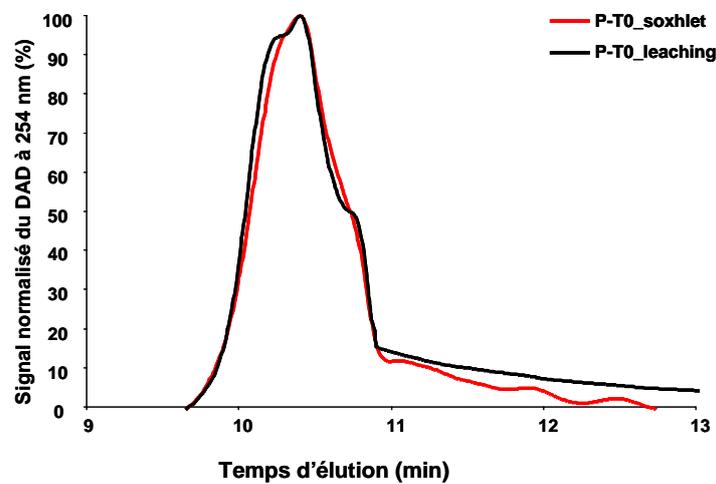
#### A. Matrice d'excitation et d'émission des eaux de l'échantillon oxydé 6 mois extrait par soxhlet (P-6 mois\_soxhlet) et par leaching (P-6 mois\_leaching)



#### Indice I1 et I2 des échantillons P-6 mois soxhlet et P-6 mois leaching

	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>
P-6 mois_soxhlet	58.5	41.5
P-6 mois_leaching	57.6	42.4

#### B. Signal normalisé du DAD à 254 nm en fonction du temps obtenu par HPLC-SEC pour les échantillons P-T0\_soxhlet et P-T0\_leaching



**Annexe 4. Valeurs des rapports  $I_1$  et  $I_2$  calculés à partir des EEM de la fraction totale pour les échantillons EGBS, Morphéus F2, Archimède F1 et Spring 116 F1.**

	$I_1$	$I_2$
<b>N2TD-F1</b>	62.6	37.4
<b>EGBS</b>	63.2	36.8
<b>N2CG-F1</b>	62.4	37.6
<b>Spring-F1</b>	63.4	36.6

## Annexe 5. Présentation des échantillons naturels prélevés au niveau de la fenêtre TDR 97W

Des échantillons naturels supplémentaires ont été prélevés en galerie en octobre 2008. Une carotte a été échantillonnée dans la partie appelée Test Drift du laboratoire au niveau de la fenêtre TDR 97W (Figure 1). La carotte prélevée a été fractionnée en 5 échantillons appelés Gal-1b (échantillon non altéré) à Gal-5b (échantillon le plus exposé à l'air). Seules les analyses Rock Eval ont été effectuées sur cette série d'échantillon (Tableau 1).

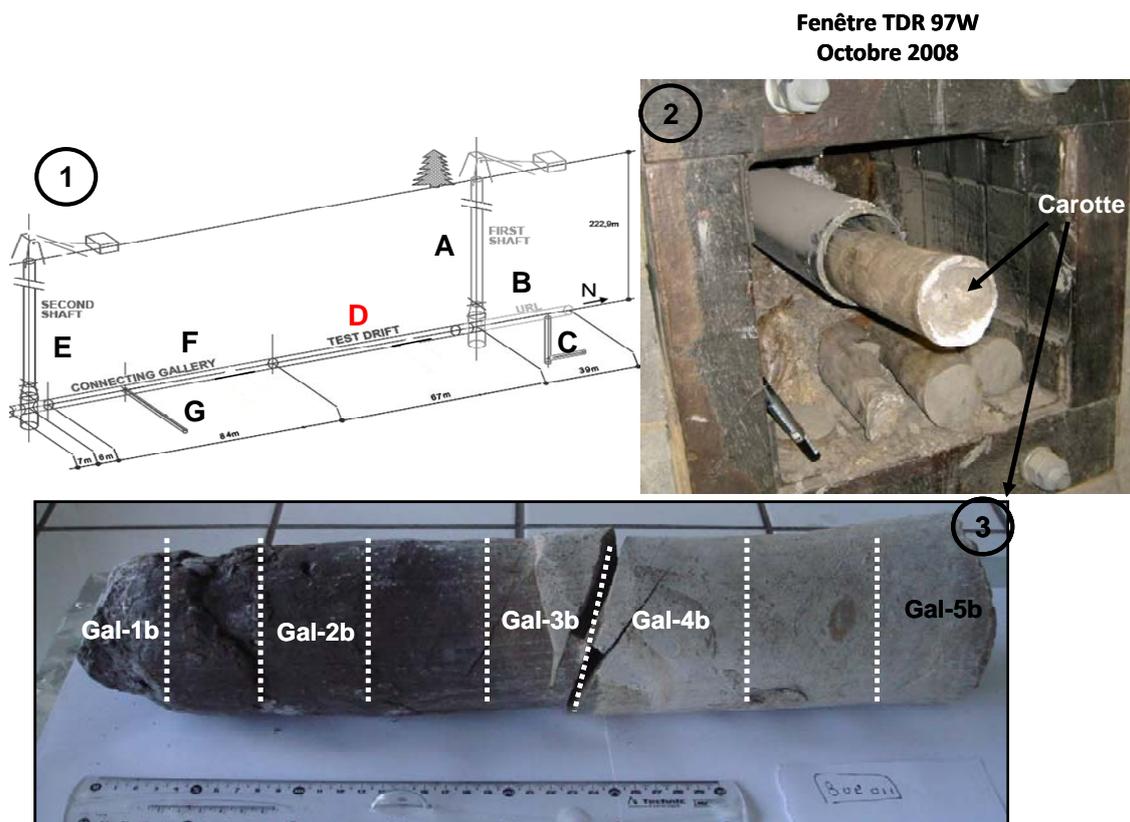


Figure 1 : 1\_Plan du laboratoire souterrain HADES (d'après De Craen *et al.*, 2008) avec A : Premier puits, B\_Galerie URL, C : Puits expérimental et galerie expérimentale, D : Galerie Test Drift, E : Second puits, F : Galerie de liaison (connecting gallery), G :Galerie PRACLAY. 2\_Fenêtre TDR 97W en octobre 2008 avec la carotte échantillonnée en place. 3\_Position des échantillons Gal-1b à Gal-5b sur la carotte.

	COT [%]	IH [mg HC/g TOC]	IO [mg CO <sub>2</sub> /g TOC]	Tmax [°C]	S2a [mg HC/g]
Gal-1b	1.24	73	63	422	0.91
Gal-2b	1.23	63	81	409	0.77
Gal-3b	1.23	50	98	410	0.61
Gal-4b	1.18	45	121	407	0.53
Gal-5b	1.21	42	120	410	0.51

Tableau 1 : Résultats de l'analyse Rock Eval sur la roche totale des échantillons prélevés au niveau de la fenêtre TDR 97W

## Annexe 6. Présentation des échantillons naturels prélevés en carrière de Kruibeke et en carothèque

D'autres échantillons naturels ont été échantillonnés au cours de ce travail afin d'obtenir des points de comparaison supplémentaires entre les échantillons oxydés artificiellement en laboratoire et des échantillons altérés de manière naturelle.

Ces échantillons naturels peuvent être divisés en deux catégories :

- **Des échantillons prélevés dans la carrière de Kruibeke (Figure 2) :** ces échantillons ont subi différents processus d'altérations de surfaces que l'on n'observe pas dans la galerie HADES (weathering, biodégradation aérobie) ;
- **Des échantillons de carottes** de différents sondages (Doel, Essen, Weelde) (Figure 2) conservés au sec dans la carothèque Euridice à Mol, ces échantillons proviennent de différents faciès de l'Argile de Boom.

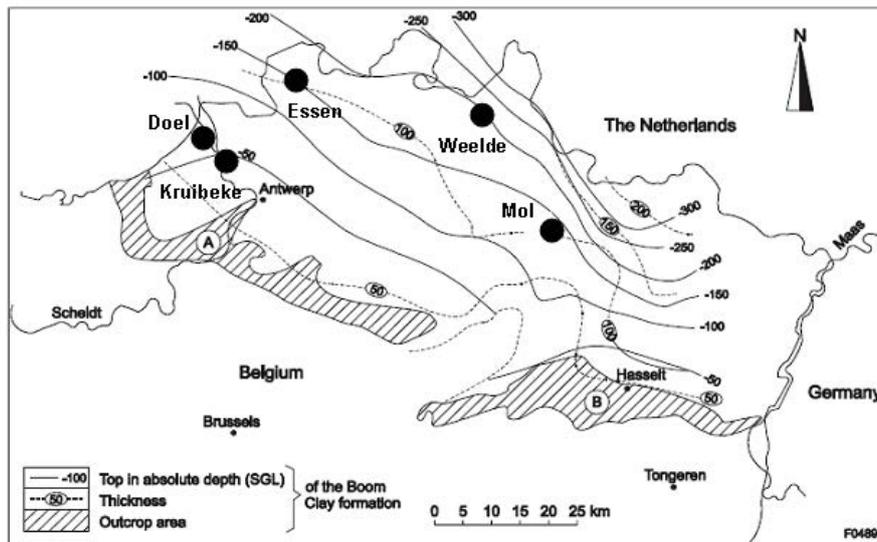


Figure 2 : Position des sondages et de la carrière de Kruibeke sur la carte des affleurements de la formation de Boom en Belgique (d'après Marivoet *et al.*, 2000)

Les échantillons prélevés en carrière et en carothèque devaient permettre d'avoir une vision plus globale sur la formation de Boom et d'observer les conséquences de l'altération naturelle sur différents les faciès. Cependant, il s'est avéré que ces échantillons n'étaient pas assez contraints :

- Pour les échantillons de carotte, nous ne possédons que les échantillons altérés, et, vu l'hétérogénéité de la pile sédimentaire, il est apparu difficile de comparer les évolutions moléculaires sans les échantillons de départ ;

## Annexes.

- Les échantillons de la carrière ont subi de nombreux phénomènes en plus de l'oxydation. Ils ont été oxydés à l'air, mais, également, lixiviés par l'eau météoritique et, probablement, dégradés par les micro-organismes de surface, ce qui complexifie l'étude de l'évolution de la matière organique.

Afin de mieux comprendre les phénomènes liés à l'altération de la galerie, ces échantillons n'ont pas été intégrés dans l'étude principale. Toutefois, la MOE de ces échantillons a été étudiée suivant le même protocole que les échantillons de la galerie ; les résultats concernant ces huit échantillons sont présentés en Annexe 7 à 11.

### ***A. Les échantillons prélevés en carrière de Kruibeke, des échantillons altérés naturellement en surface***

Quatre échantillons ont été prélevés dans la carrière de Kruibeke. Les zones d'échantillonnage se situent de part et d'autre du banc S60 (2m au dessus et 2m en dessous), et dans deux zones exploitées à deux périodes différentes (Figure 3):

- **Les échantillons prélevés dans la partie ancienne de la carrière :** *Car-1A* (en dessous de S60) et *Car-2A* (au dessus de S60),
- **Les échantillons prélevés près du front de taille** et, donc, supposés moins altérés : *Car-1F* (en dessous de S60) et *Car-2F* (au dessus de S60).

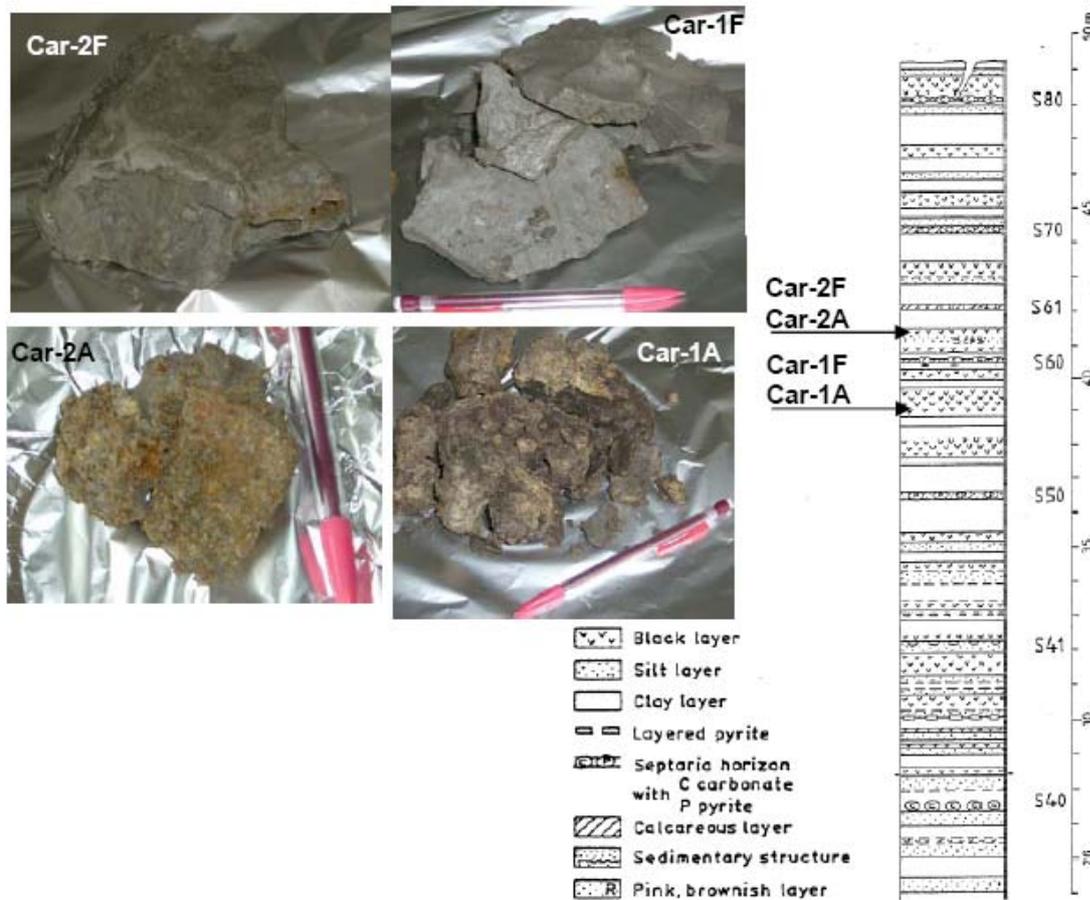


Figure 3: Position des échantillons Car-1A, Car-1F, Car-2A et Car-2F sur le log stratigraphique (d'après Vandenberghe et Van Echelpoel, 1987), Photo des échantillons Car-1A, Car-1F, Car-2A et Car-2F.

### B. Présentation des échantillons prélevés en carothèque

Quatre échantillons de carottes ont été échantillonnés dans la carothèque du site de Mol. Ces échantillons proviennent de trois sondages différents : Doel-2b, Essen-1 et Weelde-1. Ces échantillons ont été conservés différemment ; en effet, les échantillons du sondage de Doel-2b et Essen-1 ont été conservés à l'air depuis respectivement 1998 et 2006, alors que l'échantillon du sondage Weelde-1 a, tout d'abord, été conservé sous atmosphère inerte (azote), puis à l'air libre à partir de 2003 du fait d'une défaillance de conditionnement (fuite). Chaque échantillon porte le nom du sondage où il a été prélevé, ainsi que l'année à partir de laquelle il a été exposé à l'air libre. Le log stratigraphique de chaque sondage ainsi que la position des échantillons sont présentés ci-dessous (Tableau 2 et Figure 4).

Annexes.

Nom de l'échantillon	Profondeur du toit (m BDT)	Profondeur du mur (m BDT)	Situation dans la formation de Boom
Doel-a-1998	84.4	84.57	Putte member
Doel-b-1998	104.2	104.33	Waas Belsele member
Essen-2006	217.55	217.74	Putte member
Weelde-2003	313.8	313.9	Putte member

Tableau 2 : Profondeur des échantillons Doel-a-1998, Doel-b-1998, Essen-2006 et Weelde-2003 et situation dans la formation de Boom. BDT=Below the Drilling Table.

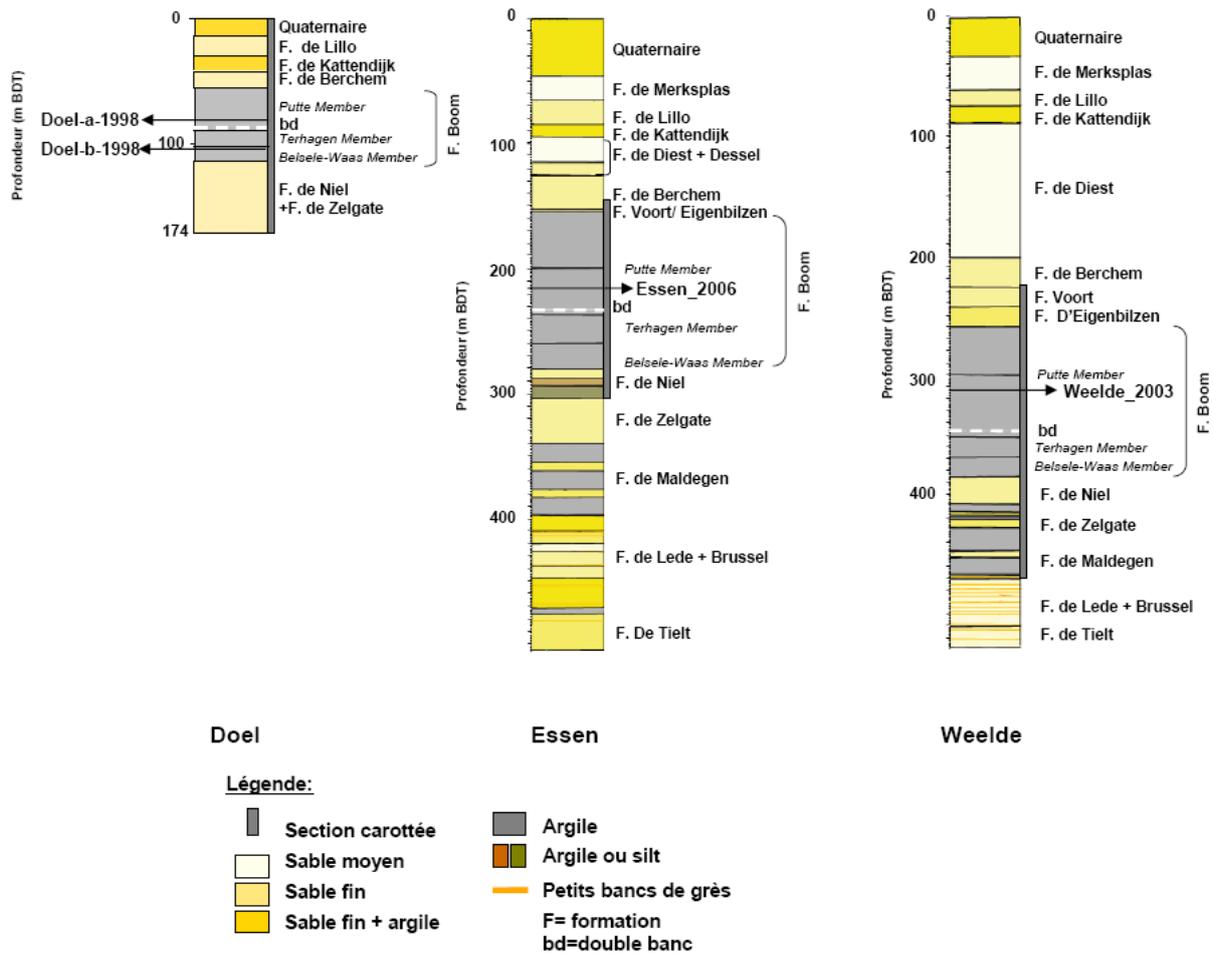
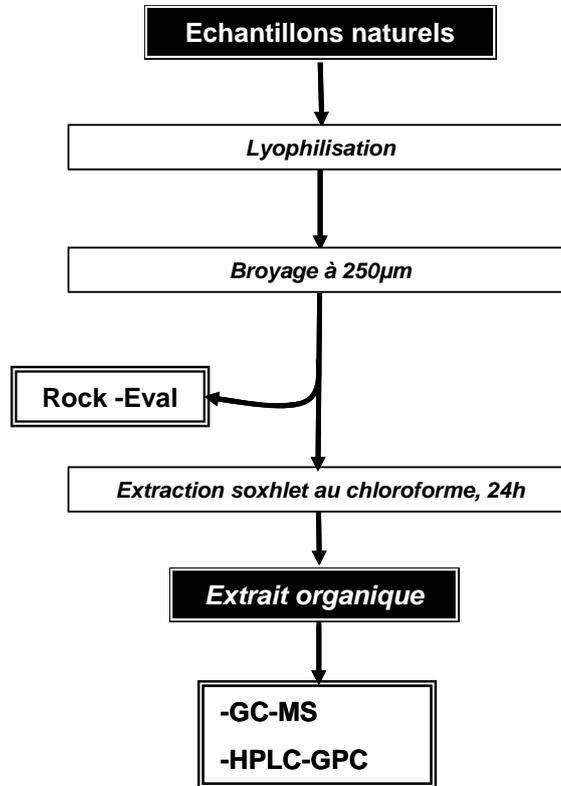


Figure 4 : Position des échantillons Doel-a-1998, Doel-b-1998, Essen-2006 et Weelde-2003 sur les log stratigraphique des sondages Doel-2b, Essen-1 et Weelde-1 (d'après Wemaere *et al.*, 2005; Labat *et al.*, 2008.) BDT=Below the Drilling Table

**Annexe 7. Protocole général d'étude des échantillons prélevés en carrière et carothèque.**



### Annexe 8. Pourcentages d'humidité des échantillons prélevés en carrière et en carothèque

Echantillon de la carrière de Kruibeke		Echantillon de carotte	
Echantillon	% d'humidité	Echantillon	% d'humidité
Car-1A	27.15	Essen-2006	/
Car-2A	28.34	Weelde-2003	16.7
Car-1F	23.46	Doel-a-1998	/
Car-2F	20.27	Doel-b-1998	/

### Annexe 9. Résultats de l'analyse Rock Eval sur la roche totale des échantillons prélevés en carrière et en carothèque

	COT [%]	IH [mg HC/g TOC]	IO [mg CO <sub>2</sub> /g TOC]	Tmax [°C]	S2 [mg HC/g]
<b>Echantillon de carotte</b>					
Essen-2006	0.72	54	121	421	0.39
Doel-a-1998	1.12	112	94	426	1.25
Doel-b-1998	0.67	61	91	417	0.41
Weelde-2003	1.29	122	71	429	1.57
<b>Echantillon de la carrière de Kruibeke</b>					
Car-1F	1.54	127	72	428	1.95
Car-2F	1.13	87	84	420	0.99
Car-1A	2.74	79	89	410	2.16
Car-2A	0.90	13	144	404	0.11

## Annexe 10. Echantillons prélevés en carrière de Kruibeke, étude de la MOE

### A. Données chromatographiques des échantillons Car-1A, Car-2A, Car-1F et Car-2F

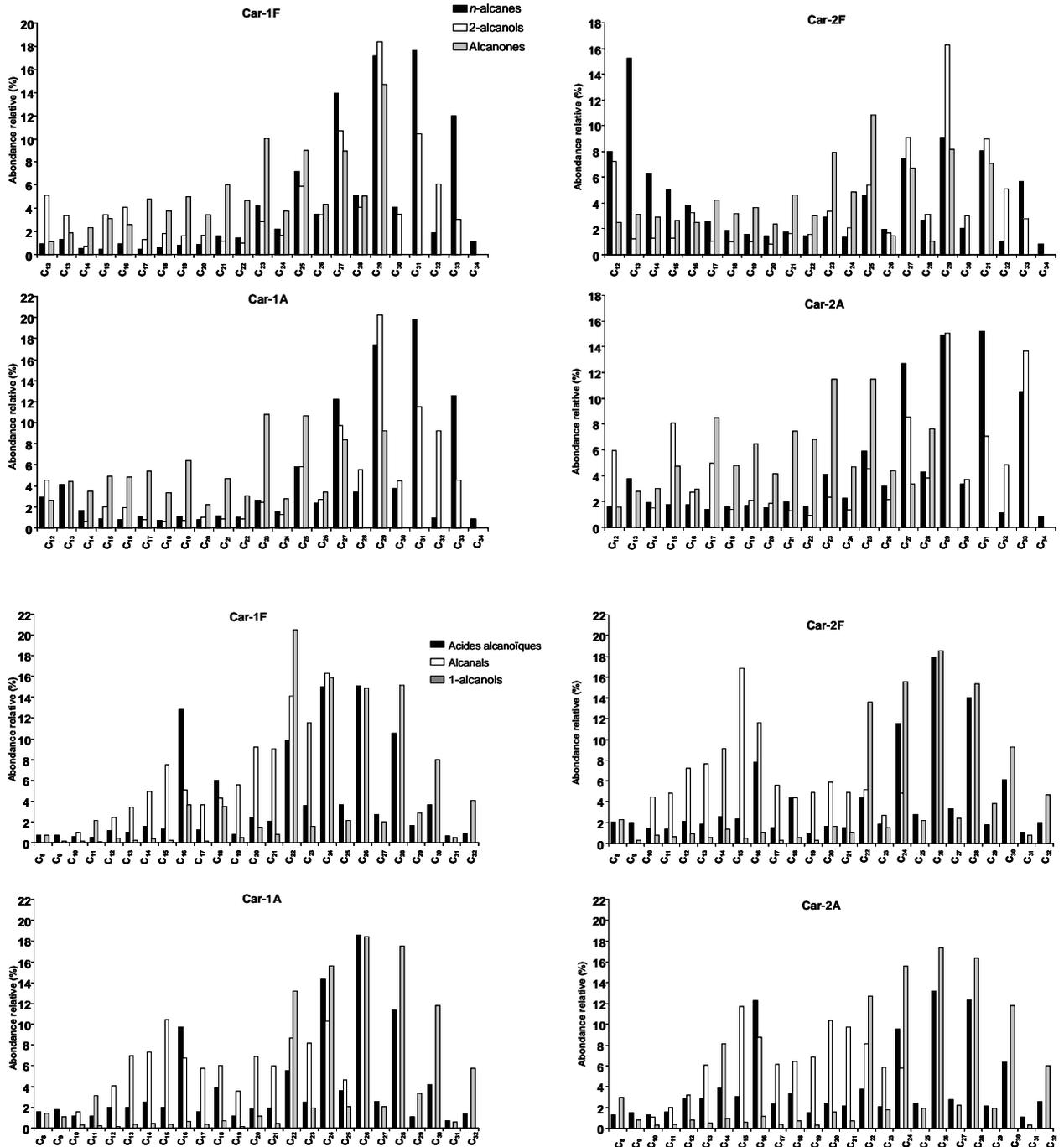


Figure 5 : Série naturelle de la carrière de Kruibeke\_ distributions des *n*-alcanes ( $m/z=57$ ), acides alcanoïques ( $m/z=117$ ), 1-alkanols ( $m/z=75$ ), 2-alkanols ( $m/z=117$ ), 2-alkanones ( $m/z=58$ ) et alcanals ( $m/z=82$ ).

Annexes.

	Car-1A	Car-2A	Car-1F	Car-2F
<b>Pr/nC<sub>17</sub></b>	0.31	0.54	0.37	0.97
<b>Ph/nC<sub>18</sub></b>	0.55	0.47	0.31	0.50
<b>Pr/Ph</b>	0.87	1.03	0.84	2.65
<b>CPI<sub>n-alcanes</sub></b>	5.82	4.42	4.20	3.99
<b>CPI<sub>2-alcanols</sub></b>	2.29	3.24	2.70	3.06
<b>CPI<sub>2-alcanones</sub></b>	6.42	1.07	2.97	1.95
<b>BPM/HPM<sub>n alcanes</sub></b>	0.17	0.22	0.08	0.97
<b>BPM/HPM<sub>acide salcanoïques</sub></b>	0.48	0.66	0.44	0.47
<b>BPM/HPM<sub>1-alcanols</sub></b>	0.08	0.12	0.13	0.12
<b>BPM/HPM<sub>2-alcanols</sub></b>	0.26	0.45	0.39	0.56
<b>BPM/HPM<sub>2-alcanones</sub></b>	0.89	0.75	0.50	0.85
<b>BPM/HPM<sub>alcanals</sub></b>	1.61	2.36	0.94	4.46

Tableau 3 : Série naturelle de la carrière de Kruikebe\_ Valeurs des rapports Pr/nC<sub>17</sub>, Ph/nC<sub>18</sub> et Pr/Ph, du CPI pour les n-alcanes 2-alcanols et les 2-alcanones, et valeur du rapport BPM/HPM pour les n-alcanes ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), les acides alcanoniques ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), 1-alcanols ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanones ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{34})$ ) et alcanals ( $\Sigma(C_8-C_{20}) / \Sigma(C_{21}-C_{24})$ ).

**B. Distribution des masses moléculaires obtenues par GPC-HPLC**

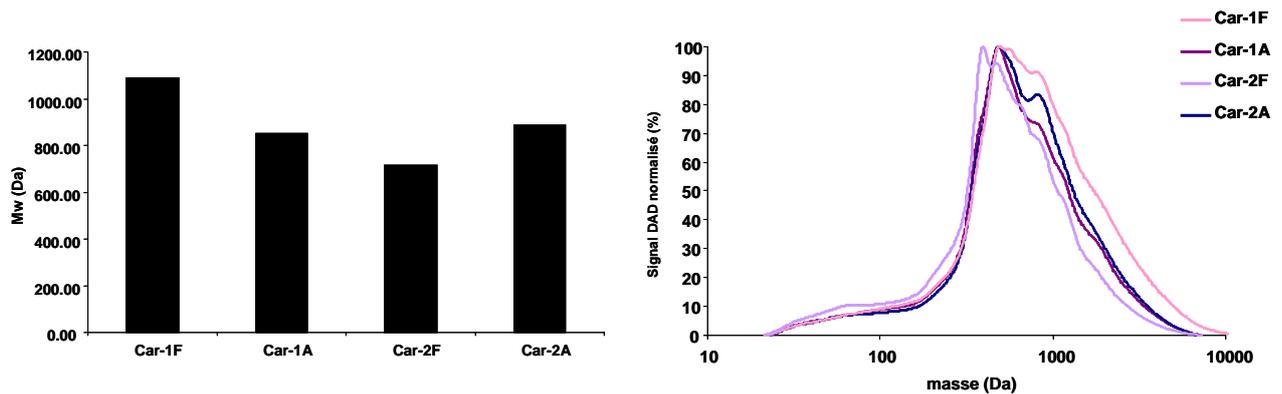
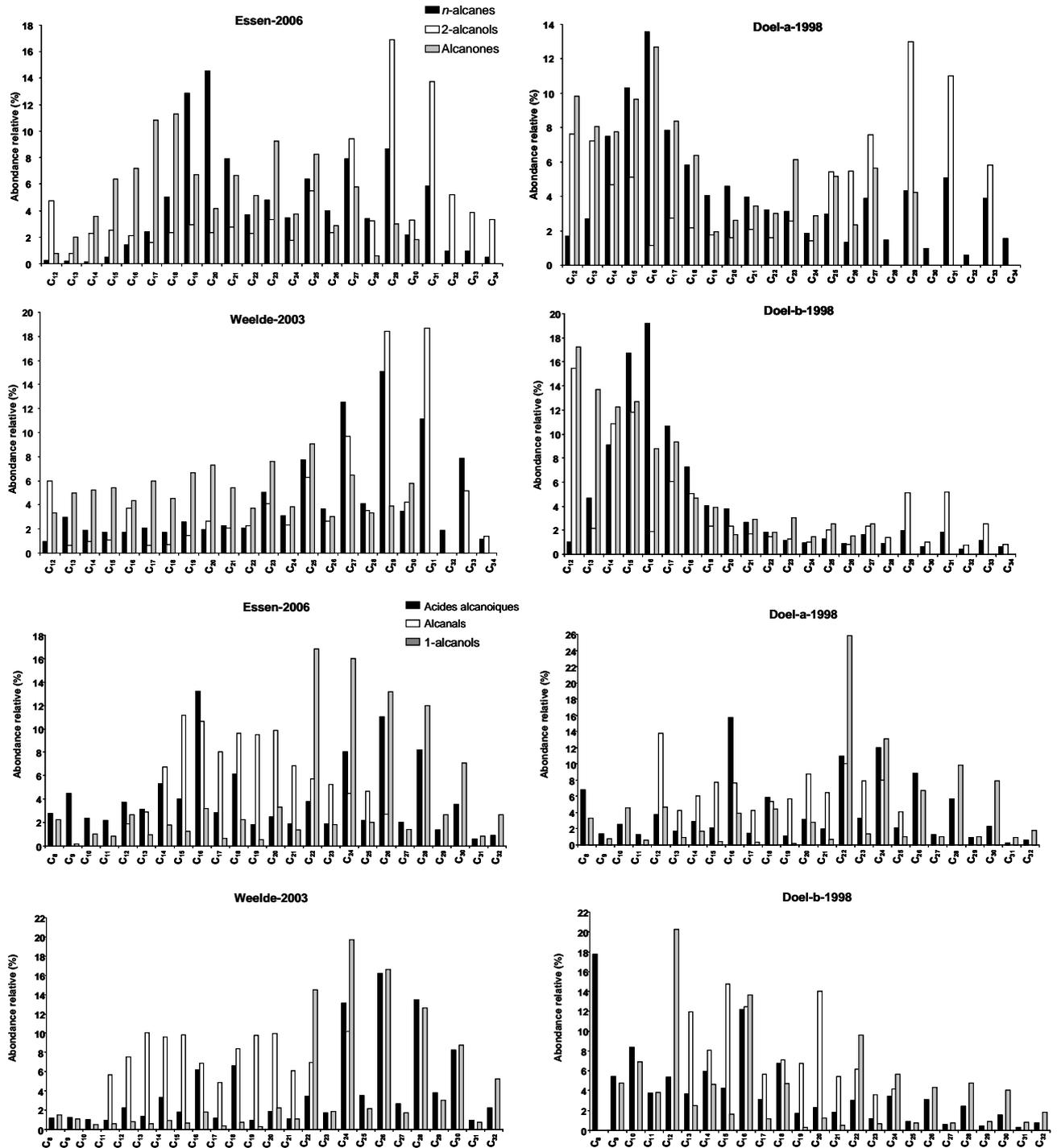


Figure 6 : Série naturelle de la carrière de Kruikebe\_Masses moyennes et distribution des masses de l'extrait total des échantillons Car-1F, Car-1A, Car-2F et Car-2A.

**Annexe 11. Echantillons prélevés en carothèque, étude de la MOE**

**A. Données chromatographiques des échantillons Essen-2006, Weelde-2003, Doel-a-1998, Doel-b-1998**



**Figure 7 : Série naturelle, échantillons de carotte\_ distributions des *n*-alcane (m/z=57), acides alcanoïques (m/z=117), 1-alkanols (m/z=75), 2-alkanols (m/z=117), 2-alkanones (m/z=58) et alcanals (m/z=82).**

	Essen-2006	Weelde-2003	Doel-a-1998	Doel-b-1998
$Pr/nC_{17}$	0.19	0.37	0.30	0.24
$Ph/nC_{18}$	0.22	0.51	0.29	0.42
$Pr/Ph$	0.35	0.71	1.06	0.67
$CPI_{n\text{-alcanes}}$	2.46	3.63	3.38	2.14
$CPI_{2\text{-alcanols}}$	2.99	4.78	7.05	3.57
$CPI_{2\text{-alcanones}}$	2.56	1.41	4.65	2.53
$BPM/HPM_{n\text{-alcanes}}$	0.57	0.19	1.31	3.66
$BPM/HPM_{\text{acide salcanoïques}}$	0.98	0.35	0.87	3.57
$BPM/HPM_{1\text{-alcanols}}$	0.21	0.11	0.31	1.50
$BPM/HPM_{2\text{-alcanols}}$	0.44	0.39	0.77	0.64
$BPM/HPM_{2\text{-alcanones}}$	1.31	0.69	1.14	3.08
$BPM/HPM_{\text{alcanals}}$	2.53	4.37	1.47	3.13

Tableau 4 : Série naturelle, échantillons de carotte \_ Valeurs des rapports  $Pr/nC_{17}$ ,  $Ph/nC_{18}$  et  $Pr/Ph$ , du CPI pour les  $n$ -alcanes 2-alcanols et les 2-alcanones, et valeur du rapport BPM/HPM pour les  $n$ -alcanes ( $\Sigma(C_8-C_{20})/\Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), les acides alcanoniques ( $\Sigma(C_8-C_{20})/\Sigma(C_{21}-C_{32})$ ), 1-alcanols ( $\Sigma(C_8-C_{20})/\Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanols ( $\Sigma(C_8-C_{20})/\Sigma(C_{21}-C_{34})$ ), 2-alcanones ( $\Sigma(C_8-C_{20})/\Sigma(C_{21}-C_{34})$ ) et alcanals ( $\Sigma(C_8-C_{20})/\Sigma(C_{21}-C_{24})$ ).

### B. Distribution des masses moléculaires obtenues par GPC-HPLC

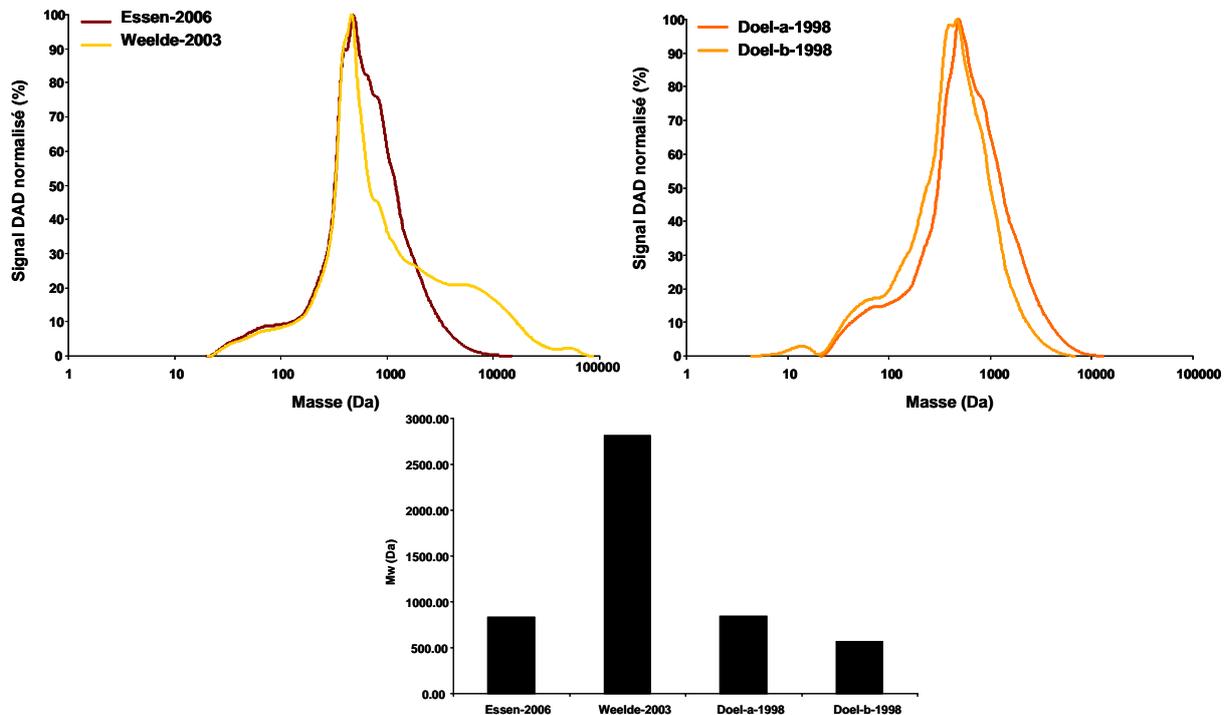


Figure 8 : Série naturelle, échantillons de carotte \_ Masses moyennes et distribution des masses de l'extrait total des échantillons Essen-2006, Weelde-2003, Doel-a-1998, Doel-b-1998.

## Références

- De Craen, M., M. V. Geet, M. Honty, E. Weetjens and X. Sillen (2008).** "Extent of oxidation in Boom Clay as a result of excavation and ventilation of the HADES URF: Experimental and modelling assessments." *Physics and Chemistry of the Earth* 33(SUPPL. 1): S350-S362.
- Kim, S., A. J. Simpson, E. B. Kujawinski, M. A. Freitas and P. G. Hatcher (2003).** "High resolution electrospray ionization mass spectrometry and 2D solution NMR for the analysis of DOM extracted by C18 solid phase disk." *Organic Geochemistry* 34(9): 1325-1335.
- Labat, S., J. Marivoet, I. Wemaere and T. Maes (2008)** "Essen-1 borehole of the hydro/05neb campaign: technical aspects and hydrogeological investigations." SCK-CEN. ER-68,
- Marivoet, J., I. Van Keer, I. Wemaere, L. Hardy, H. Pitsch, C. Beaucaire, J. L. Michelot, C. Marlin, A. C. Philippot, Hassenizadeh and F. Van Veert (2000).** "A palaeohydrogeological study of Mol site (PHYMOL project). Final report." *Luxembourg: European Commission* EUR 19146 En: 110.
- Van Geet, M. (2002).** "Interpretation of Rock-eval data on samples of core HADES 2001/4." *SCK.CEN report, R-3605, Mol, Belgium, 12pp.*
- Vandenberghe, N. and E. Van Echelpoel (1987).** "Field guide to the Rupelian stratotype." *Bulletin de la Société belge de Géologie* 96(4): 325-337.
- Wemaere, I., J. Marivoet, T. Maes and R. Beaufays (2005)** "Weelde boreholes of the hydro/96neb campaign: technical aspects and hydrogeological investigations." SCK-CEN. SCK-CEN, R-4187,





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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame Isabel SUAREZ-RUIZ, Directrice de Recherche, Instituto Nacional del Carbon, Espagne**

**Monsieur Pierre ADAM, Directeur de Recherche, Institut de chimie, Strasbourg**

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

**Madame BLANCHART Pascale**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Influences de l'oxydation et de la biodégradation anaérobie sur la matière organique de  
l'argile oligocène de boom (MOL, Belgique): conséquences sur la formation d'espèces  
organiques hydrosolubles. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : « Géosciences »

Fait à Vandoeuvre, le 6 Décembre 2011

Le Président de l'INPL

F. LAURENS







**INFLUENCES DE L'OXYDATION ET DE LA BIODEGRADATION ANAEROBIE SUR LA MATIERE ORGANIQUE DE L'ARGILE OLIGOCENE DE BOOM (MOL, BELGIQUE) : CONSEQUENCES SUR LA FORMATION D'ESPECES ORGANIQUES HYDROSOLUBLES.**

**Résumé**

Les Argiles de Boom ont été identifiées par le SCK-CEN comme un éventuel site de stockage de déchets nucléaires en couche géologique profonde : elles font l'objet d'études dans le laboratoire souterrain de Mol (Belgique). Dans ce contexte, il est important d'évaluer les conséquences du creusement de galeries sur les propriétés de ces Argiles. Ce travail de thèse cible plus particulièrement les effets d'oxydation à l'air et de biodégradation anaérobie sur la MO fossile. Les expériences d'oxydation ont combiné des suivis expérimentaux (série artificielle) et des études sur des échantillons altérés *in situ* (série naturelle) dans les galeries du laboratoire. Elles ont ciblé le kérogène, la MOE et MOD. La confrontation des données des deux séries révèle que nos simulations expérimentales sont représentatives des processus ayant lieu dans les galeries. Ces travaux démontrent aussi que l'oxydation induit (i) une augmentation importante de la quantité de MOD et (ii) une modification majeure de la chimie de la MOE et de la MOD caractérisée par la formation de molécules oxygénées de faible poids moléculaire. Par ailleurs, l'étude comparative des eaux issues des échantillons altérés avec celles prélevées dans les piézomètres du site démontre que ces dernières ne sont pas affectées par des processus d'oxydation et sont comparables aux eaux issues des échantillons sains. Des expériences de biodégradation menées sur des argiles saines et préalablement oxydées artificiellement n'ont montré aucune évolution significative de la MO fossile (MOE et MOD); la biodégradation anaérobie n'est donc pas un processus dominant dans le contexte des perturbations induites par les excavations.

**Mots clefs :** *matière organique ; Argiles de Boom ; matière organique hydrosoluble ; oxydation ; biodégradation anaérobie ; stockage de déchets nucléaires.*

**INFLUENCES OF AIR OXIDATION AND ANAEROBIC BIODEGRADATION ON THE ORGANIC MATTER OF OLIGOCENE BOOM CLAY FORMATION (MOL, BELGIUM): CONSEQUENCES ON THE FORMATION OF THE SOLUBLE ORGANIC SPECIES.**

**Abstract**

The Boom Clay was focused because it is identified by SCK-CEN as a possible radioactive waste storage in the geological disposal site and *in situ* experiments are performed in the underground laboratory of Mol (Belgium). In this context, it is important to assess the consequences of galleries excavation on the properties of the Boom Clay. The particular focus of this study is the effects of air oxidation and anaerobic biodegradation on the OM. The experiments dealing with the effects of air oxidation have combined studies of artificial oxidized samples (artificial series) and samples altered in the gallery of the underground laboratory (natural series). These experiments focus on the Kerogen, the EOM and the DOM. The comparison of data from artificial and natural series shows firstly that our experimental simulations are the representative of processes taking place in the galleries. These studies show that air oxidation induced (i) a significant increase in the amount of DOM and (ii) a major change in the chemistry of the EOM and DOM characterized by the formation of low molecular weight oxygenated molecules. Moreover, comparison between water extracted from altered samples and piezometers shows that the water of the site is not affected by oxidation processes. The piezometer water samples are similar to that extracted from non-altered samples. Biodegradation experiments conducted on non altered and artificially oxidized clay did not show significant changes of fossil and dissolved organic matter. It seems that anaerobic biodegradation is not a major process in the context of disturbances induced by the excavation.

**Keywords:** *organic matter; Boom Clay; dissolved organic matter; oxidation; anaerobic biodegradation; geological disposal; storage of nuclear wastes.*