

Fossiles moléculaires d'intérêt microbiologique, pétrolier, agronomique et environnemental

Eric Lichtfouse* docteur

Summary : *Molecular fossils. Applications to microbiology, petroleum geochemistry, agronomy and environment*

Molecular fossils are organic substances occurring in soils, sediments, coals and crude oils. The study of these structurally specific fossils has generated applications among several scientific fields. For instance, the discovery of fossil hopanes in petroleum in 1970 has unexpectedly led to the identification of novel bacterial substances, hopanols, in 1976 ! Here, a handful of such « orphan » fossils await the discovery of their « parents » in modern biological organisms. Further, molecular fossils have been widely used to decrypt the biogeochemical processes ruling the degradation and the maturation of sedimentary organic matter with increasing burial. The findings have proved particularly efficient to locate new petroleum deposits. More recently, molecular and isotopic investigations of soils have revealed novel pathways of transformations of humic substances. To this end, a method has been set up to measure the long-term turnover of individual organic substances in soil. Last, molecular fossils are now used as tools to authenticate polluted samples and to remediate petroleum-polluted media such as soils, plants, atmosphere, recent sediments and food.

Mots clefs : *Pétrole, humus, pollution, sol, sédiment.*

Key-words : *Petroleum, humic substances, pollution, soil, sediment.*

La chimie organique est vieille de 2 700 millions d'années, au moins. C'est en effet l'âge d'un schiste australien dans lequel les plus vieux fossiles moléculaires ont été identifiés grâce aux méthodes fines de la chimie analytique [1]. En l'occurrence, des hopanes et des stérane dont la stéréochimie très spécifique démontre l'existence d'organismes évolués à cette époque : des bactéries et des eucaryotes. Mais qu'est-ce qu'un fossile moléculaire ? De la même manière qu'un poisson va donner lieu après quelques millions d'années d'enfouissement dans les sédiments à ces magnifiques empreintes d'arêtes que l'on observe en brisant les roches, les molécules biologiques sont

altérées, biodégradées, chauffées, déshydratées, aromatisées et finalement livrent ces molécules fossiles dont la structure spécifique permet de faire le lien avec leur précurseur biologique [2-5] (figure 1). Aujourd'hui, les champs

d'application des fossiles moléculaires foisonnent, notamment pour la recherche de nouveaux gisements de pétrole ou pour élucider l'origine des débris archéologiques [6-7]. Une des découvertes parmi les plus étonnantes a été

Eric Lichtfouse a été le lauréat de la division Chimie analytique de la SFC en 1995. Il a reçu le Grand Prix de la chancellerie des universités de Lorraine 1999. Ce manuscrit est extrait d'un mémoire d'habilitation à diriger des recherches (INPL, 1998).

* Laboratoire sols et environnement, INRA/ENSAIA-INPL, BP 172, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy.
Tél. : 03.83.59.58.99. Fax : 03.83.59.57.91.
E-mail : Eric.Lichtfouse@ensaia.inpl-nancy.fr

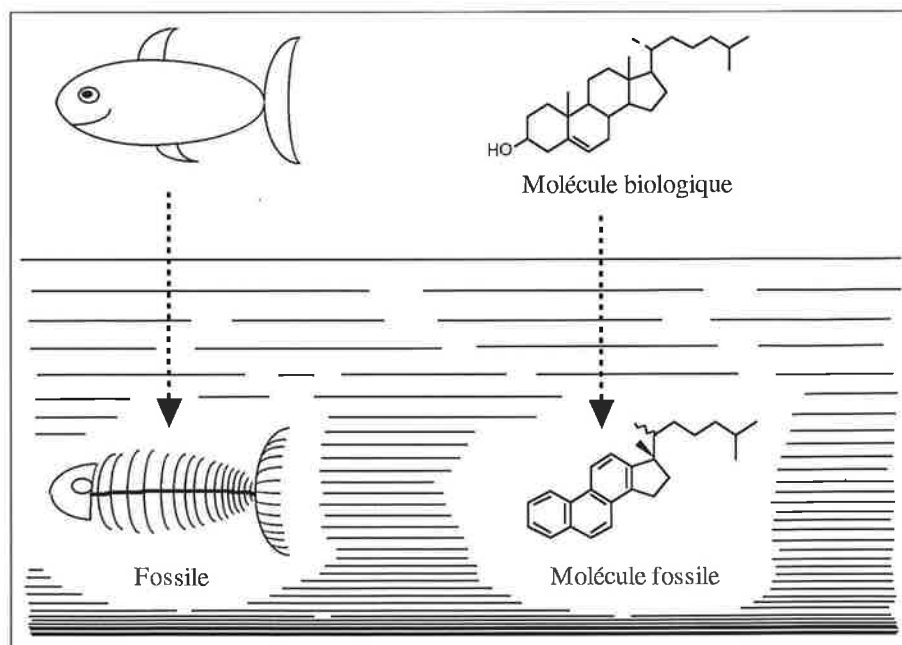
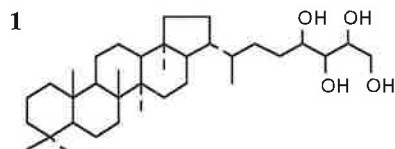


Figure 1.

l'identification en 1976 des hopanols bactériens par Ourisson et Rohmer grâce à l'identification préalable de leurs fossiles, véritables « cœlacanthes moléculaires », par van Dorsselaer et coll. [8]. Quelques autres fossiles « orphelins » attendant la découverte de leurs « parents » sont présentés au début de cette synthèse. Puis, après une incursion en géochimie pétrolière, nous découvrirons quelques aspects de l'utilisation des fossiles moléculaires en agronomie et en environnement.

Les fossiles moléculaires

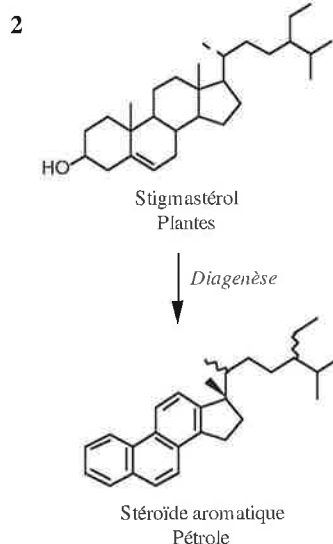
La matière organique des sols et des sédiments est issue de la transformation des tissus biologiques après la mort des organismes vivants [9-10]. Elle est constituée de substances provenant d'organismes comme les plantes, les algues et les bactéries [2-3, 11-17]. Le stigmastérol, par exemple, est une molécule biologique typique des plantes supérieures [12, 18-19], alors que le hopanetétrol **1** est présent dans les bactéries [20-21].



Hopanetétrol
Bactéries

Après leur introduction dans le milieu géologique, ces substances biologiques sont altérées sous l'influence de la biodégradation, de la température et de la pression [6]. L'étude des changements de structure moléculaire au cours de l'enfouissement a permis de déterminer la nature des principales réactions géochimiques subies par la matière organique, notamment la défonctionnalisation, la décarboxylation, la condensation, la vulcanisation, l'aromatisation et le craquage [6, 22-23]. Le stigmastérol **2** est ainsi déshydraté, déméthylé et déshydrogéné au cours de la lente diagenèse pour former des stéroïdes aromatiques dans les sédiments matures et les pétroles [24-26]. Les fossiles moléculaires sont des indicateurs de source et de transformation qui ont donné lieu à de nombreuses applications [5-7, 27-29].

Dans cette synthèse, nous allons tout d'abord montrer que l'identification de



fossiles moléculaires peut conduire de façon inattendue à la découverte de nouvelles substances biologiques. Puis nous décrirons leur utilisation en tant que paramètre de source et de transformation en géochimie pétrolière. Nous découvrirons ensuite qu'ils s'avèrent de puissants outils d'étude de la formation et de la dynamique de l'humus des sols. Nous expliquerons aussi comment ils peuvent authentifier la contamination des sols et des plantes par les produits pétroliers. Enfin, nous proposerons quelques axes de recherche qui s'intègrent dans une discipline scientifique en émergence, la géochimie organique environnementale.

Microbiologie

Découverte des hopanoïdes bactériens

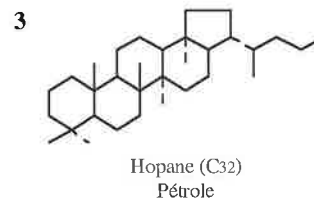
Après 1970, les géochimistes organiciens identifièrent de nombreux dérivés hopaniques **3** en C_{27} - C_{35} dans les sédiments, les sols, les pétroles et les charbons [8, 30]. A cette époque, leur origine biologique reste mystérieuse car on ne connaît qu'une dizaine de hopanoïdes synthétisés par des arbres, avec toutefois un nombre de carbone ne dépassant pas 30. Il est alors difficile d'expliquer la présence ubiquiste de leurs fossiles dans les sédiments, en particulier dans des pétroles dont la contribution végétale est souvent mineure.

Les précurseurs biologiques des hopanoïdes fossiles doivent donc probablement se trouver dans des organismes ubiquistes. Or, en analysant de façon

méticuleuse quelques souches de bactéries, Rohmer et Ourisson [31-32] identifient des hopanetétrols dont le nombre de carbone de 35 explique bien la présence de fossiles en C_{27} - C_{35} par dégradation de la chaîne latérale.

La raison pour laquelle ces hopanols bactériens n'ont pas été identifiés plus tôt est d'ordre analytique. En effet, la séparation classique des lipides comporte une étape de trois lavages de la phase organique à l'eau distillée au cours de laquelle les hopanols, substances amphiphiles, sont transférés vers la phase aqueuse puis dans l'évier.

Ces résultats montrent que l'analyse d'échantillons géologiques âgés de plusieurs centaines de millions d'années a suscité la découverte des hopanoïdes bactériens [33-34]. Ces substances biologiques revêtent une importance particulière parce qu'elles sont très probablement les précurseurs phylogénétiques des stérols, molécules ubiquistes chez les eucaryotes. Les hopanoïdes joueraient ainsi des rôles physiologiques analogues, notamment en tant que renforts membranaires [35]. Nous allons maintenant exposer la découverte de fossiles moléculaires dont les précurseurs biologiques sont encore inconnus.

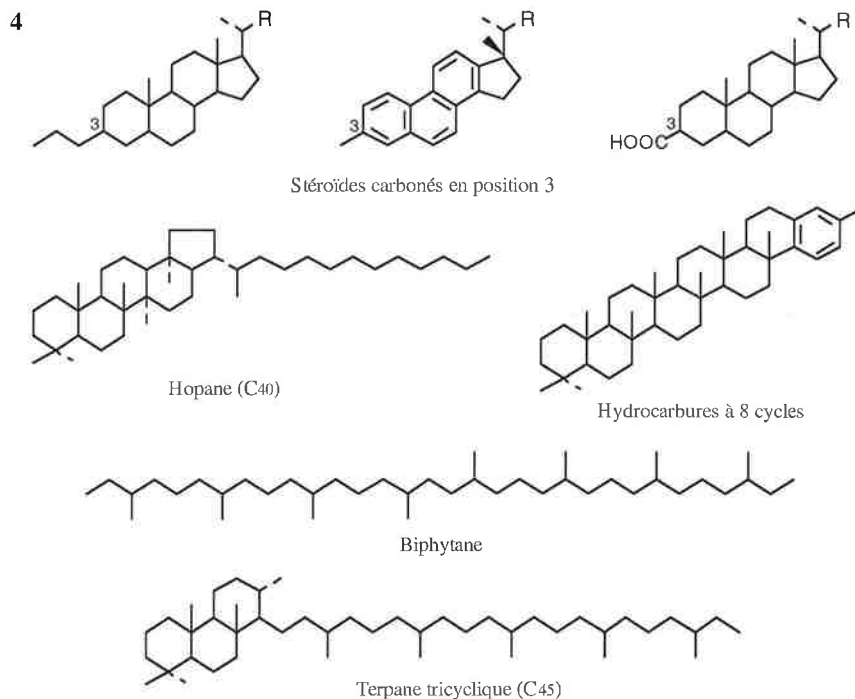


Fossiles orphelins

De nombreux dérivés stéroïdiques ont été identifiés dans les sédiments et pétroles [22]. Leur présence dans le milieu géologique peut être expliquée par la transformation diagenétique des stérols d'organismes vivants comme les plantes supérieures, les algues et les champignons. Toutefois, plusieurs groupes de recherche identifient des stéroïdes fossiles dont la structure singulière est difficile à corréler avec les stérols biologiques (**4**). Ainsi, des stéranes alkylés en position 2 ou 3 sont présents dans des sédiments d'âges variés [36-38]. Puis, des stéroïdes triaromatiques méthylés en position 2, 3 ou 6 sont identifiés dans les sédiments matures et les pétroles du Jurassique du

bassin de Paris [39-40]. Enfin, des stéranes carboxylés en position 3 sont mis en évidence dans les sédiments potassiques éocène d'Alsace [41]. C'est la présence de substituants carbonés en position 3 sur ces fossiles qui est particulièrement préoccupante car aucun stérol biologique connu ne possède une telle structure. En outre, il est difficile d'expliquer l'ajout d'un carbone en position 3 par un processus diagénétique. Ainsi, la présence de substituants carbonés de nature variée en position 3 suggère l'existence d'un précurseur biologique chez les organismes vivants [42].

Il existe actuellement plusieurs familles de fossiles « orphelins » ou « cœlacanthes moléculaires », c'est-à-dire des molécules géologiques dont les précurseurs biologiques n'ont pas encore été identifiés (4) [33]. Ainsi, Rullkötter et Philip ont identifié dans un bitume du Silurien des hopanes dont le nombre de carbone s'étend jusqu'à 40, alors que ce nombre n'atteint que 35 chez les hopanols bactériens connus [43]. D'autre part, en brisant les liaisons des macromolécules organiques sédimentaires avec des réactifs spécifiques Chappe et coll. ont mis en évidence de longs hydrocarbures, le biphytane par exemple [44]. Ces fossiles sont probablement dérivés des lipides membranaires des archéobactéries vivant actuellement dans les niches écologiques aux conditions extrêmes de température, de salinité et d'anaérobiose [45]. Des terpanes tricycliques dont le nombre de carbone varie de 19 à 45 ont été identifiés dans les sédiments et pétroles [46-48]. Leur origine biologique est difficile à cerner, quoique l'hypothèse la plus satisfaisante soit une source microbienne [48]. Enfin, Schaeffer et coll. ont mis en évidence des hydrocarbures possédant de 4 à 8 cycles dans les schistes Éocène de Messel [49]. La biosynthèse de leurs précurseurs biologiques pourrait avoir eu lieu à partir de polyprénols dans des organismes dont l'origine reste inconnue. En conclusion, l'identification de fossiles moléculaires peut conduire à la découverte de nouvelles substances biologiques. Nous allons montrer maintenant que les molécules fossiles s'avèrent utiles pour étudier l'origine et le devenir de la matière organique sédimentaire.



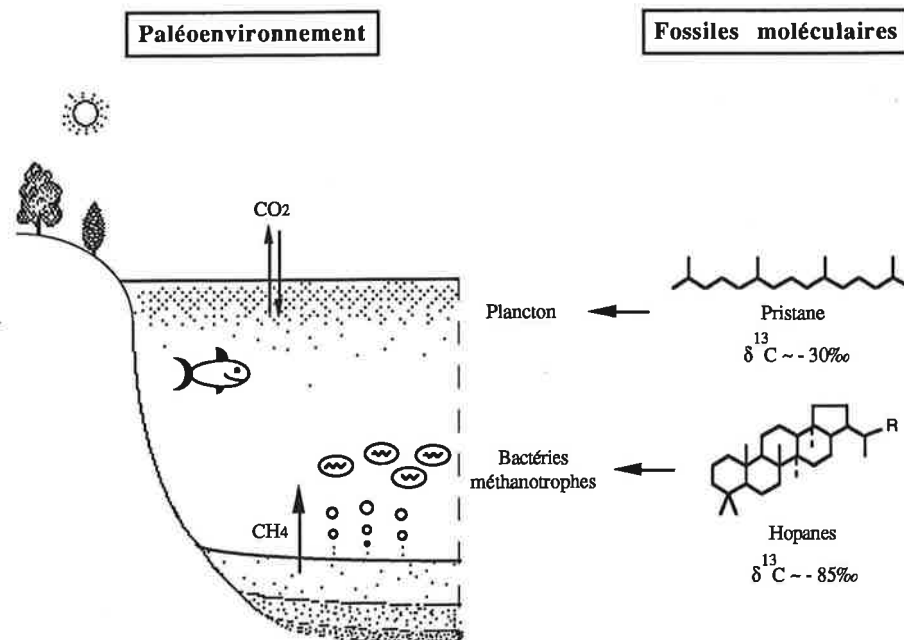
Géochimie pétrolière

Reconstruction du paléoenvironnement

L'étude isotopique des molécules sédimentaires peut livrer des informations sur l'environnement du milieu de dépôt [50-53]. Ainsi, la structure moléculaire permet de préciser la nature du précurseur biologique. Le pristane sédimentaire, par exemple, provient en majeure partie du phytol de la chlorophylle [5]. En outre, grâce à la mise au point de l'analyse du carbone 13 au niveau moléculaire [50, 54-57], il est possible d'obtenir des informations sur la place

de l'organisme précurseur dans la chaîne alimentaire.

Ainsi, la composition isotopique en carbone 13 du pristane (-30‰) des sédiments Éocène de Green River montre que ce fossile provient de la chlorophylle du plancton, notamment à cause de valeurs identiques observées pour les stéranes algaux (5) [52]. La présence des hopanes révèle une contribution bactérienne. De surcroît, leurs compositions isotopiques très appauvries en carbone 13 (-85‰) indiquent une provenance de bactéries méthanotrophes, d'une part parce que le méthane biogénique issu de la

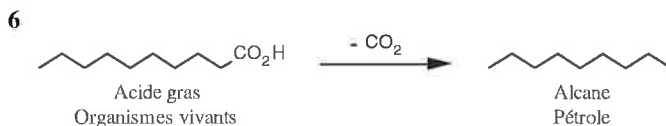


décomposition de la matière organique est appauvri en carbone 13 ($< -60\text{‰}$) [58-59] et, d'autre part, parce que l'appauvrissement isotopique entre le substrat et les lipides des bactéries méthanotrophes peut atteindre 40 ‰ [60]. Les études moléculaires s'avèrent donc utiles pour préciser quel maillon occupe le précurseur biologique dans la chaîne alimentaire d'un milieu complexe. Enfin, la prédominance de ces marqueurs algaux et bactériens indique que la matière organique est susceptible de générer du pétrole léger par pyrolyse ou au cours de l'enfouissement.

Identification des réactions géochimiques

Au cours de l'enfouissement, la matière organique sédimentaire se transforme lentement sous l'action de la biodégradation, de la pression, de la température et de la catalyse par les minéraux [6]. Toutefois, la nature exacte des réactions chimiques mises en jeu est difficile à cerner, notamment à cause de l'extrême complexité du milieu et en raison de la difficulté à suivre en temps réel les transformations moléculaires. A cet égard, la formation des alcanes linéaires, constituants majeurs du pétrole, peut être expliquée par plusieurs mécanismes faisant intervenir des précurseurs variés [6, 61] : la préservation des alcanes des cires végétales [62-64] ; la réduction des alcènes linéaires algaux [65-67] ou des alcools végétaux [62, 68-69] ; la décarboxylation des acides gras (6) [70-71] et le craquage du kérogène, matière organique sédimentaire insoluble dans les solvants [72-74].

L'hypothèse de formation des alcanes par décarboxylation des acides gras est étayée par plusieurs observations. Tout d'abord, la transformation de la matière organique génère d'importantes quantités de dioxyde de carbone [6]. D'autre part, la distribution des alcanes linéaires fossiles est souvent marquée par une forte prédominance des homologues à nombre de carbone impair (25, 27, 29...) alors que les acides gras biologiques montrent presque toujours une prédominance paire (26, 28, 30...), d'où l'idée d'une décarboxylation [70, 75-76]. Cette cor-



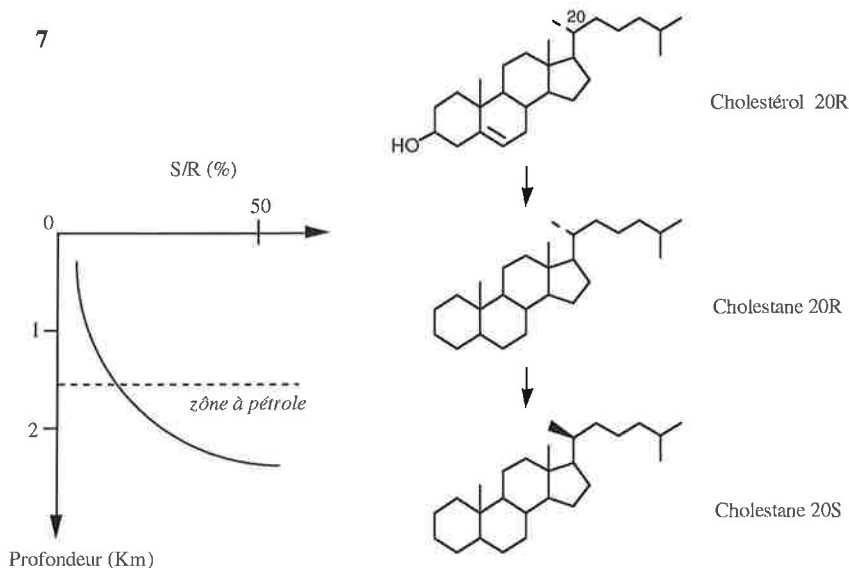
rélation entre précurseur acide et produit saturé est aussi mise en évidence par Behar et Albrecht dans le cas d'hydrocarbures polycycliques de structure spécifique [71]. Pour simuler les réactions géochimiques Shimoyama et Johns chauffent à 250 °C des acides gras purs en présence d'argile ou de carbonate, et obtiennent bien des alcanes linéaires [77]. La pyrolyse d'acides humiques, substances riches en fonctions carboxyliques, livre le même résultat [78]. Enfin, Lichtfouse et Collister mettent en évidence une corrélation isotopique entre les acides gras à nombre de carbones impair et les alcanes linéaires à nombre de carbones pair dans les schistes Éocène de la formation de Green River, Colorado [79].

La formation des alcanes linéaires fossiles s'explique donc bien par la décarboxylation des acides gras (6). Toutefois, d'autres voies ne sont pas exclues car l'hétérogénéité des compositions isotopiques des alcanes linéaires suggère l'existence de sources multiples [61]. L'étude de la structure et de la composition isotopique des fossiles moléculaires s'avère donc utile pour identifier les réactions géochimiques opérant dans les milieux complexes. A cet égard, cette démarche apparaît prometteuse pour étudier le devenir des constituants organiques et des xénobiotiques au sein des écosystèmes modernes [53, 80-81].

Paramètres moléculaires de maturité

Les fossiles moléculaires sont utilisés pour étudier la transformation de la matière organique, notamment dans les bassins pétroliers [5-6]. Le principe repose sur les altérations des structures moléculaires au cours de l'enfouissement [82-85]. D'une manière générale, dans les sédiments de surface, les fossiles ont une configuration proche de celle des molécules biologiques (7). Puis, avec l'enfouissement, ils adoptent progressivement une configuration « géologique » plus stable [86-87]. Ainsi, le cholestérol de configuration « biologique » 20R se transforme tout d'abord en cholestane 20R dans les sédiments immatures. Puis, dans les sédiments profonds du bassin de Paris, on observe la formation progressive du cholestane « géologique » 20S dont la proportion dépasse 50 % dans la zone à pétrole ($> 1,5\text{ km}$).

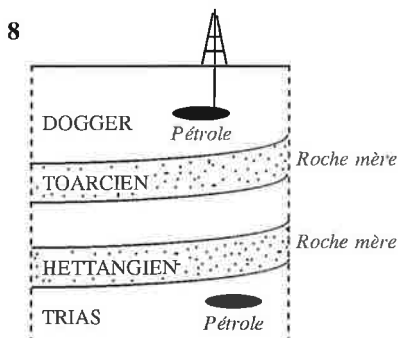
Il est donc possible de mesurer la maturité, c'est-à-dire en quelle sorte le degré de « cuisson », de la matière organique sédimentaire à l'aide des isomères « biologiques » et « géologiques ». C'est notamment un moyen de distinguer les sédiments matures qui ont pu générer du pétrole de ceux dont le kérogène est encore trop immature [88]. En outre, dans la partie suivante, nous allons montrer que de tels indices moléculaires s'avèrent particulièrement



utiles pour corréler les réservoirs de pétrole avec leur roches mères présumées. On entrevoit aussi l'utilisation des fossiles matures comme le cholestane 20S en tant que marqueurs des combustibles fossiles dans les cas de contamination de l'environnement moderne [89-91].

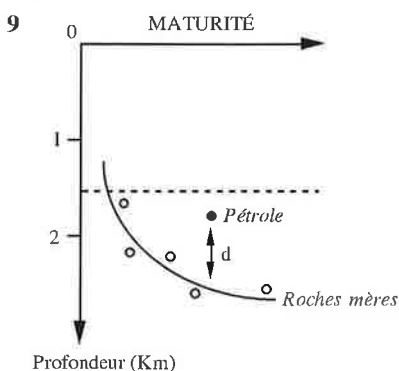
Migration du pétrole

Dans le bassin de Paris, les deux principales roches mères, c'est-à-dire des sédiments susceptibles de générer du pétrole à cause de leur richesse en matière organique, sont localisées dans les couches du Toarcien et de l'Hettangien (8). Les réservoirs de pétrole sont situés soit au-dessus dans le Dogger, soit en-dessous dans le Trias [92-94]. Il est ainsi difficile de préciser quelle roche mère contribue à l'accumulation des pétroles, notamment parce que les chemins de migration du pétrole sont peu connus.



Or, à l'aide d'un nouveau paramètre basé sur les stéroïdes fossiles, Lichtfouse et coll. distinguent la maturité de la matière organique du Toarcien (32 %) de celle de l'Hettangien (49 %) [26]. Comme les pétroles livrent des valeurs intermédiaires (38 %), c'est la contribution de l'Hettangien qui s'avère quantitativement la plus importante. En effet, la formation du pétrole s'explique bien dans un premier temps par une expulsion de matière organique à partir des roches de l'Hettangien. Puis, au cours du temps, la maturité des fossiles moléculaires de l'Hettangien continue à augmenter alors que le réservoir, moins chaud et moins riche en argiles, est sujet à une maturation plus lente. L'accumulation du pétrole est donc principalement due à une expulsion à partir des roches de l'Hettangien suivie d'une migration vers les formations du Trias et du Dogger.

Lichtfouse et coll. [26] ont proposé un moyen de calculer la distance de migration du pétrole à l'aide des fossiles moléculaires (9). Le principe repose sur le fait que la maturité de la roche mère est généralement au moins égale à celle du pétrole. La distance minimale de migration verticale est alors déterminée par différence entre la profondeur de la roche mère d'isomaturité et celle du réservoir. Cette distance est estimée à 440 m dans le bassin de Paris en utilisant plusieurs paramètres moléculaires basés sur les isomères des stéroïdes fossiles.



En **conclusion**, les fossiles moléculaires s'avèrent de puissants outils pour étudier les sources, la transformation et le mouvement de la matière organique sédimentaire. Dans les parties suivantes, nous montrerons que ces concepts développés dans le domaine sédimentaire trouvent des applications en recherche agronomique et environnementale.

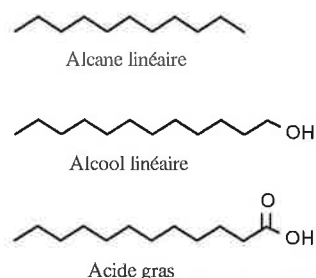
Agronomie

Indicateurs de source végétale

Le concept d'indicateur de source biologique fondé sur les fossiles moléculaires peut être appliqué à l'étude des matières humiques du sol : les acides humiques et fulviques solubles dans la soude aqueuse, et l'humine insoluble. En effet, les sources biologiques et les réactions chimiques qui président à l'accumulation de l'humus sont aussi très peu connues [95-96]. Parmi la multitude des constituants organiques du sol, prenons l'exemple des alcanes, des alcools et des acides gras linéaires (10) [16, 97-102].

Ces molécules peuvent provenir de la décomposition d'organismes variés comme les plantes, les algues, les bac-

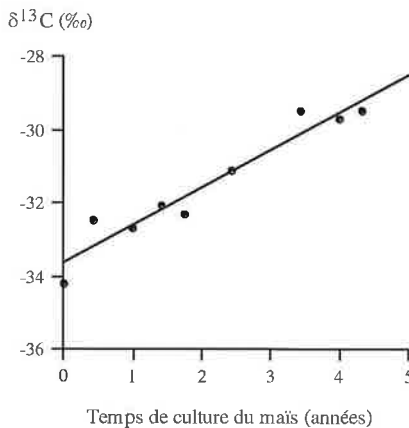
10



téries, les champignons et les insectes [62, 65, 68]. L'hypothèse de l'origine végétale est étayée par plusieurs observations.

Tout d'abord, leurs distributions montrent une forte prédominance, soit des homologues pairs pour les alcools et les acides gras, soit des homologues impairs pour les alcanes [98, 101-103]. Ces distributions particulières sont semblables à celles des cires cuticulaires des plantes [62]. D'autre part, leurs compositions en carbone 13 [81, 105] sont analogues à celles des plantes [106-108]. De surcroît, Lichtfouse et coll. observent l'absence de leur marquage isotopique en incubant des sols avec du glucose-¹³C, permettant ainsi d'écarter une contribution microbienne [105].

11 Marquage de l'alcane du sol



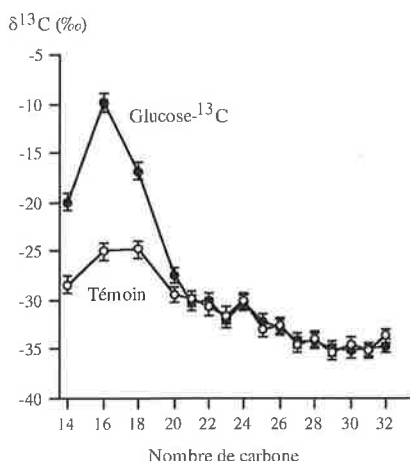
Enfin, en utilisant la technique de marquage au carbone 13 par culture de maïs [109-110], Lichtfouse et coll. mettent en évidence l'enrichissement en carbone 13 des alcanes à longues chaînes du sol, authentifiant ainsi la contribution végétale (11) [111]. Ainsi, ces résultats démontrent l'origine végétale des alcanes, des alcools et des acides gras linéaires à longues chaînes du sol. Nous allons voir maintenant qu'il existe aussi des indicateurs moléculaires microbiens.

Indicateurs de source microbienne

La présence d'acides gras à courtes chaînes dans les sols et dans les sédiments est souvent attribuée à une contribution bactérienne [112-117]. Néanmoins, d'autres sources biologiques sont possibles car les acides gras sont des constituants ubiquistes chez les organismes vivants. Les acides gras à chaînes courtes peuvent être aussi formés par dégradation des alcanes, des alcools et des acides gras à chaînes longues [118]. Afin de distinguer ces diverses contributions, Lichtfouse et coll. ont incubé un sol agricole à l'obscurité avec du glucose- ^{13}C [105]. Ils observent un enrichissement des acides gras linéaires en C_{14} , C_{16} et C_{18} (12). Ce résultat confirme donc la synthèse microbienne de ces acides.

12

Marquage des acides gras du sol



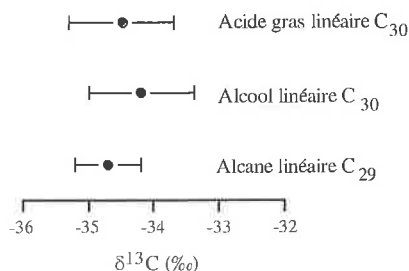
Mise en évidence de liens biogéniques

L'humus étant constitué de nombreuses molécules provenant de sources multiples, il est difficile d'établir des relations de parenté entre les différentes classes de substances. Or, en étudiant les lipides du sol, on observe que les alcanes linéaires à n carbones ont des compositions isotopiques analogues à leur précurseurs biosynthétiques, les alcools linéaires et les acides gras à n + 1 carbones (13) [81].

Ce résultat montre que ces trois classes de molécules du sol utilisent la même voie de biosynthèse dans le même organisme. En effet, une contribution d'organismes de nature variée est très improbable à cause de la varia-

13

Lipides du sol



bilité de la composition isotopique des sources de carbone et en raison de la variabilité de l'intensité des fractionnements isotopiques lors de l'assimilation et de la biosynthèse [50, 119]. Ainsi l'étude isotopique de différentes classes de molécules du sol permet d'élucider leurs liens biogéniques. Dans les parties suivantes, nous allons montrer que cette démarche s'avère utile pour étudier les voies de formation de l'humus.

Identification de polymères aliphatiques

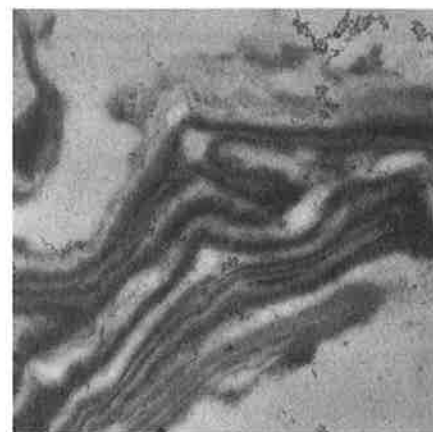
Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation des matières humiques [120-124]. Dans l'hypothèse de l'*altération des plantes*, les parties résistantes comme la lignine sont peu modifiées et contribuent donc à la préservation de matière de haut poids moléculaire. L'hypothèse de la *synthèse microbienne* invoque une fabrication intracellulaire d'acides humiques par les microbes. L'hypothèse de la *condensation* met en jeu l'agglomération de petites molécules comme les sucres et les acides aminés [125, 126].

Or, en analysant divers sols cultivés, Lichtfouse et coll. observent un enrichissement en carbone 13 des constituants organiques du sol par rapport à la plante [127]. Ce résultat inattendu montre que la préservation sélective des organes végétaux ligneux, les plus résistants, est dans ce cas un processus mineur car la lignine est appauvrie en carbone 13 [58, 128]. En revanche, il semble en accord avec l'hypothèse de polycondensation des acides aminés et des sucres puisque ces derniers sont enrichis en carbone 13 [58, 129-130].

Néanmoins, nous suspectons l'existence d'un autre processus basé sur la synthèse microbienne de polymères ali-

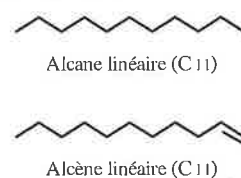
phatiques extracellulaires, d'une part à cause de leur découverte récente dans les algues et les sédiments profonds [131-133] et, d'autre part, en raison de la détection de carbone aliphatique dans les sols [134-137]. Dans les sédiments, ces polymères très résistants à la dégradation apparaissent sous la forme de fines lamelles nommées « ultralaminae ».

14 Ultralaminae du sol



Lichtfouse et coll. observent à leur tour par microscopie électronique des ultralaminae d'une épaisseur variant de 10 à 50 μm dans l'humine d'un sol agricole (14) [138]. L'analyse moléculaire de l'humine par pyrolyse révèle en outre une suite de doublets alcane/alcène linéaires (C_{11} - C_{24}) typique des biopolymères aliphatiques ultrarésistants (15) [139].

15



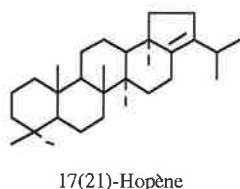
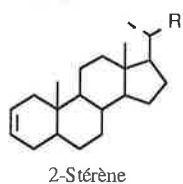
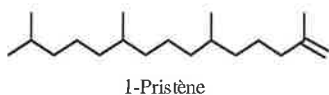
Enfin, cette contribution majeure de carbone aliphatique à l'humine est confirmée par l'analyse en résonance magnétique nucléaire du carbone 13 [139]. La préservation sélective de biopolymères à chaînes aliphatiques linéaires représente donc une voie alternative expliquant la stabilisation de l'humus.

Liaisons fortes

L'analyse moléculaire de l'humine donne des informations sur la nature des réactions chimiques qui président à la formation de ce réseau macromoléculaire. Ainsi, Lichtfouse et coll.

identifient plusieurs fossiles dans un pyrolysat de l'humine, notamment du pristène, des stérènes et des hopènes (16) [140].

16

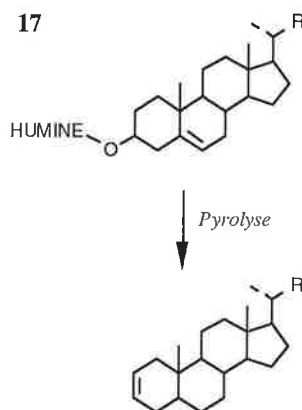


Tout d'abord, leur structure moléculaire spécifique indique la contribution de plusieurs sources biologiques. Ainsi, le pristène provient du phytol des organismes photosynthétiques comme les plantes, les algues ou les cyanobactéries [5, 141]. Les stérènes sont issus des stérols des eucaryotes, notamment les algues pour les homologues en C_{27} , les champignons pour les homologues en C_{28} et les plantes pour les homologues en C_{29} [18-19, 22]. Les hopènes proviennent principalement des hopenols bactériens [15, 142].

D'autre part, la position de la double liaison sur le squelette de ces molécules est très proche de la position des fonctions alcools des précurseurs biologiques. Cette observation indique que les alcènes ont été formés par coupure pyrolytique des liaisons covalentes liant les précurseurs alcooliques au réseau humique (17). Les stérènes, par exemple, sont issus de la coupure de stérols liés à l'humine par des fonctions esters car les matières humiques sont très riches en groupes carboxyliques [10].

Cette hypothèse est confortée par l'identification de stérols dans les hydrolysats de fractions polaires du sol [102]. Le processus d'estérification est aussi en accord avec plusieurs investigations structurales mettant en jeu des réactifs de coupure marqués [143-145]. Les études moléculaires témoignent donc bien de l'existence de liai-

17



sons chimiques fortes au sein de l'humine. Néanmoins, nous allons voir maintenant que certaines molécules peuvent être séquestrées par des liaisons faibles.

Liaisons faibles

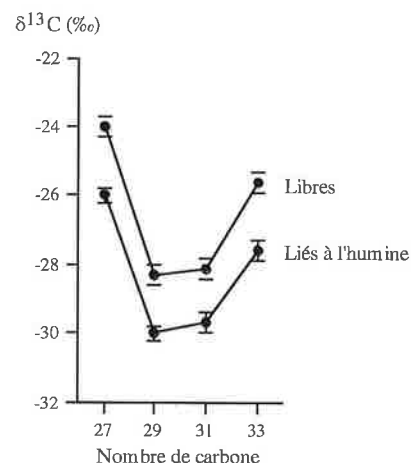
Plusieurs études suggèrent l'existence de liaisons faibles, non covalentes, dans le réseau macromoléculaire des matières humiques. Ainsi, Schnitzer et Neyroud observent que le traitement aux ultrasons des acides humiques libère des alcanes et des acides gras linéaires [97]. Ici, bien qu'une rupture de liaisons fortes puisse expliquer la libération des acides, un tel mécanisme explique difficilement l'expulsion des alcanes, substances non fonctionnalisées.

Par ailleurs, la préparation des kérogènes par dissolution de la matrice minérale des sédiments libère toujours une fraction organique dont une partie était probablement séquestrée par des liaisons faibles [74]. Nanny et coll. mettent aussi en évidence des interactions non covalentes entre l'acénaphthène et les acides fulviques par résonance magnétique nucléaire [146]. De même, Lichtfouse et coll. identifient des alcanes linéaires d'origine végétale non seulement dans le sol total, mais aussi dans l'extrait organique de l'humine et dans le pyrolysat de l'humine [139-140, 147]. Ces alcanes sont donc séquestrés dans le réseau de l'humine. Néanmoins, leur présence dans l'humine pourrait être éventuellement expliquée par un défaut d'extraction du sol, à moins qu'un paramètre indépendant ne montrât leur appartenance à un compartiment différent. Or, Lichtfouse et coll. observent que les compositions isotopiques en carbone 13 des alcanes piégés sont nettement infé-

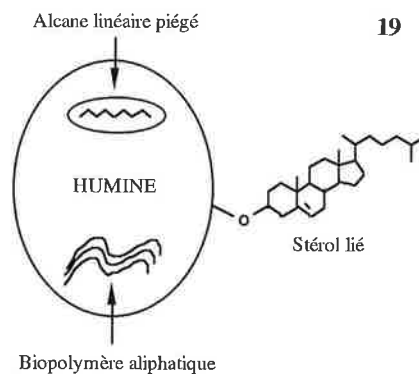
rieures à celles de leurs homologues libres (18) [147]. Ces différences montrent donc bien que les alcanes des cires végétales peuvent être séquestrés par des liaisons non covalentes dans l'humus.

18

Alcanes linéaires du sol



En résumé, l'étude des fossiles moléculaires de l'humine a livré des informations concernant l'origine et les voies de genèse des matières humiques. Trois mécanismes de formation ont été mis en évidence (19) : la préservation sélective de biopolymères résistants à chaînes linéaires, la séquestration chimique par des liaisons fortes et la séquestration physique par des liaisons faibles [148-149].



Dynamique moléculaire

L'analyse isotopique du carbone renseigne sur la dynamique de l'humus [150-158]. Ainsi, la différence de teneur en carbone 13 des plantes de type photosynthétique C_3 et C_4 [159-161] a suscité leur utilisation pour étudier le devenir des débris végétaux dans l'humus [109-110, 162-163]. La datation au carbone 14 a aussi révélé l'existence de compartiments organiques à

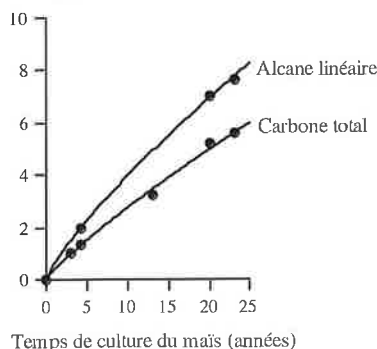
renouvellement très lent au sein de l'humus [157].

En revanche, les acides fulviques se renouvellent plus rapidement [152-153, 158, 164]. Balesdent et coll. montrent aussi que les fractions granulométriques du sol ont un renouvellement très hétérogène [110]. Enfin, Jenkinson et Rayner distinguent cinq compartiments organiques selon leur demi-vie : les matières décomposables (0,16 an), résistantes (2,3 ans), stabilisées physiquement (50 ans) ou chimiquement (1980 ans) [156]. Ces investigations ont permis de mieux comprendre la dynamique de l'humus et de ses fractions grossières. Ici, une approche permettant d'étudier la dynamique au niveau moléculaire a été élaborée de la façon suivante [165-166].

Les alcanes linéaires à chaînes longues du sol, fossiles des cires végétales [62] ont été marqués par culture du maïs (20) [165]. A cet égard, des analyses de lipides de sédiments et des expériences de décomposition de végétaux permettent d'écarter un éventuel biais isotopique [167-168].

20

$\Delta\delta^{13}\text{C}$ (‰)



Le marquage isotopique permet de mesurer la part de carbone provenant du maïs. Ainsi, l'alcane en C_{31} du sol cultivé 23 ans contient 50 % de carbone issu du maïs. Le renouvellement de cette molécule est déterminé avec une loi cinétique du premier ordre [166]. Ce calcul révèle que la demi-vie de l'alcane (22,4 ans) est plus courte que celle de l'humus (28,8 ans). Ce résultat est en accord avec la présence des alcanes dans la fraction extractible dont la disponibilité est *a priori* plus forte. En résumé, les fossiles moléculaires s'avèrent de puissants outils pour étudier les sources biologiques et les processus présidant à la formation de l'humus.

Environnement

Principe

Les écosystèmes modernes sont potentiellement contaminés à divers degrés par des produits fossiles d'origine naturelle ou anthropique. Dans les situations de contaminations à l'état de traces dans les milieux complexes, il est souvent difficile d'authentifier l'origine fossile de molécules présentes. Néanmoins, nous allons montrer ici que les investigations combinant l'identification de fossiles moléculaires, la datation au carbone 14 et le marquage au carbone 13 s'avèrent fructueuses. Tout d'abord, la structure des fossiles moléculaires renseigne sur la maturité de la matière organique, notamment en révélant la présence de dérivés pétroliers. De cette manière, des contaminations de sédiments de surface ont été mises en évidence par identification de fossiles spécifiques [169-170]. Puis, cette contribution de carbone ancien, *a fortiori* pétrolier, peut être confortée par datation au carbone 14 [80, 171-172]. Enfin, l'absence de variation isotopique lors d'expérience de marquage d'un écosystème peut témoigner d'une origine exogène [89, 104].

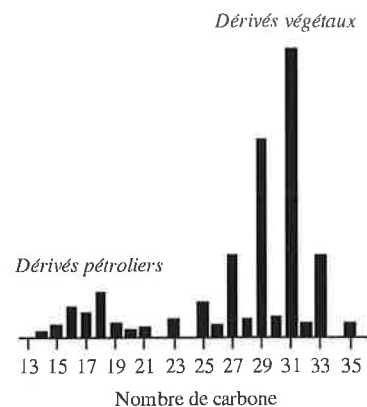
Cas de contamination diffuse

Les alcanes linéaires des sols agricoles peuvent être classés dans deux catégories suivant leur source (21). Tout d'abord, les homologues à longues chaînes (C_{25} - C_{33}) proviennent des cires cuticulaires des plantes [62]. Puis, les homologues à courtes chaînes (C_{15} - C_{18}) dont l'origine est généralement attribuée à des sources bactériennes, algues ou fongiques [14, 65-66, 173-174].

Néanmoins, ces alcanes à chaînes courtes étant aussi les constituants majeurs des pétroles [92, 175], une source pétrolière est aussi à considérer. C'est le cas de sols de la région parisienne [104] où la faible prédominance paire-impair de ces molécules ressemble à celle des pétroles [75, 92, 175]. De surcroît, le diesel et ses produits de combustion, sources possibles, montrent aussi des distributions analogues. Cette contribution de carbone ancien a été confirmée par datation au carbone 14 de la fraction alcane du sol (> 8510 ans).

21

Alcanes linéaires de sols agricoles



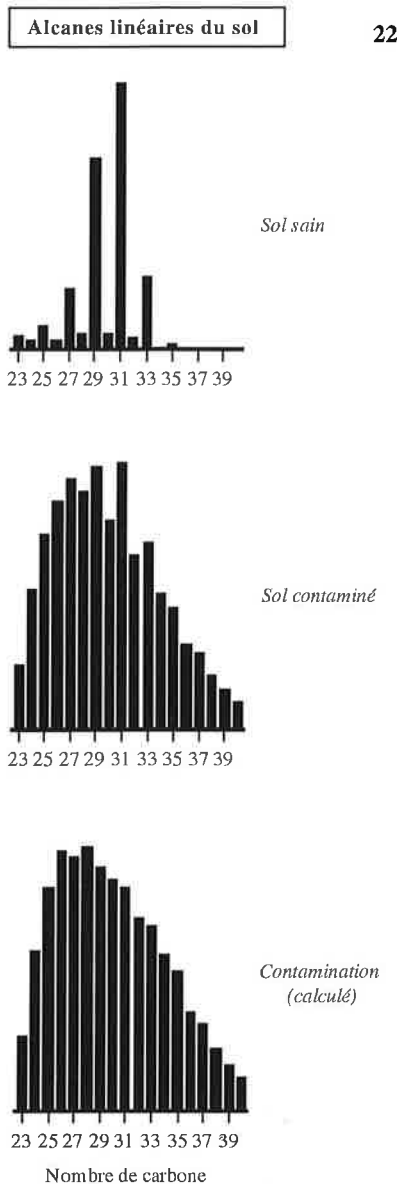
Enfin, une éventuelle contribution microbienne peut être écartée car les alcanes à chaînes courtes ne présentent aucune variation isotopique ni lors du marquage au carbone 13 de l'humus pendant 23 ans, ni lors d'une incubation de sol avec du glucose- ^{13}C [104-105]. En fait, il peut s'agir soit d'une remontée lente de pétrole, soit d'un dépôt régulier d'aérosols. Cette contamination du sol est loin d'être négligeable car sa concentration est proche de celle des dérivés végétaux.

Cas de contamination ponctuelle

Une étude de sols agricoles de la région parisienne nous mit en évidence un cas de pollution ponctuelle par des alcanes à chaînes longues [80]. Ici, la distribution des alcanes des sols contaminés se distingue nettement de celle des sols sains par une prédominance des homologues à nombre de carbone s'étendant de 23 à 40 (22). Une telle distribution est typique de produits pétroliers lourds [64, 75]. Cette contribution pétrolière est confirmée par analyse isotopique. Ainsi, la datation au carbone 14 de la fraction alcane (> 8770 ans) montre une contribution notable de carbone ancien (> 66 %). De surcroît, les teneurs en carbone 13 des alcanes linéaires (- 30 ‰) sont proches de celles des produits pétroliers [26, 176-177], et se distinguent de celles des sols sains (- 36 ‰).

En fait, la faible prédominance des alcanes en C_{29} , C_{31} et C_{33} du sol contaminé (22) indique que la fraction analysée est un mélange de deux catégories d'alcanes : des molécules en C_{23} - C_{40} sans prédominance paire-impair, d'ori-

gine pétrolière, et des molécules en C_{27} - C_{33} avec une forte prédominance impaire, dérivées des plantes. Grâce aux concentrations relatives et aux teneurs en carbone 13, il est possible de calculer, pour chaque substance, la part de la contribution pétrolière. Ainsi, l'alcane en C_{31} contient 74 % de carbone pétrolier. En soustrayant la contribution végétale, on peut donc reconstruire la distribution initiale de la contamination [80].



Nous allons maintenant découvrir d'autres molécules fossiles qui permettent d'authentifier les contaminations pétrolières des sols et des plantes.

Hopanes et les stérans pétroliers

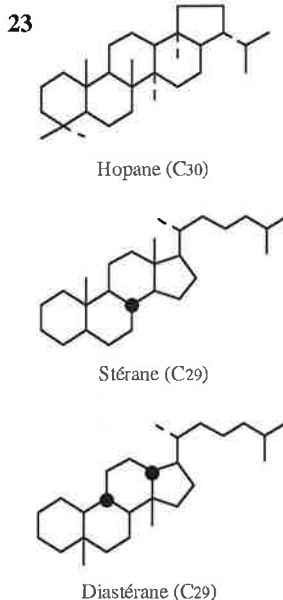
Les hopanes et les stérans sont de bons marqueurs de contamination pé-

trolière en raison de leur structure moléculaire très spécifique témoignant de la maturation de la matière organique pendant des millions d'années [8, 22, 86-87]. Leurs isomères sont couramment utilisés en géochimie pétrolière pour comparer la maturité des roches mères avec celle des pétroles [5, 83].

Lors d'une étude préliminaire de végétaux poussant à proximité de voies autoroutières à Nancy, visant à mettre au point le dosage des hydrocarbures aromatiques [178], nous avons identifié des hopanes, des stérans et des diastérans dans cinq espèces (23) [90]. De telles molécules authentifient l'apport des combustibles fossiles aux plantes. Ainsi, le ratio Ts/Tm basé sur les hopanes et utilisé couramment en géochimie pétrolière [5, 83] atteint une valeur de 56 %, ce qui est typique de la matière organique géochimiquement très mature comme le pétrole.

Nous avons aussi établi des paramètres basés sur les hopanes du pétrole et les alcanes des végétaux afin de mesurer l'ampleur de la contamination. Ainsi, le pourcentage du α,β -hopane en C_{30} par rapport à l'alcane linéaire en C_{29} est de 23 % pour le pin noir d'Autriche localisé à environ 500 m de l'autoroute. Au bord de l'autoroute, cette valeur est de 66 %. Ce résultat met donc en évidence une contribution plus élevée de combustibles fossiles au bord de la voie routière.

Des hopanes ont aussi été identifiés dans des sols agricoles et dans des boues de station d'épuration [89, 91, 179]. De manière analogue, la forte

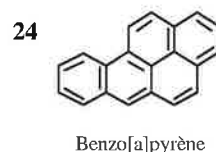


maturité géochimique mesurée à l'aide des isomères « biologiques » et « géochimiques » atteste la contribution de produits pétroliers [5]. Dans ce cas, la contamination peut être d'origine naturelle ou anthropique.

En résumé, de tels paramètres moléculaires s'avèrent très prometteurs pour étudier la diffusion des contaminations pétrolières dans les écosystèmes. Leur utilisation mériterait d'être étendue à l'étude des filières alimentaires : eau, plante, produit alimentaire et organisme vivant, par exemple. Nous allons maintenant montrer que les micropolluants aromatiques des sols ont aussi une origine ancienne.

Hydrocarbures aromatiques polycycliques

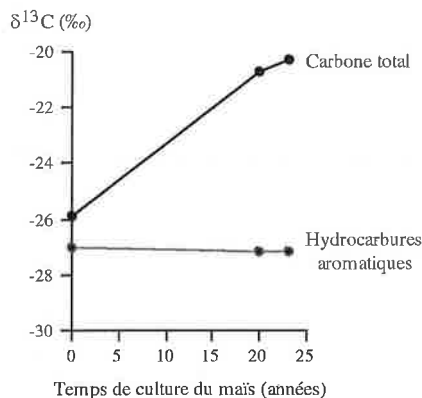
Des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été identifiés dans la plupart des écosystèmes [180-184]. Ils peuvent être issus soit de sources naturelles telles que les remontées de pétroles et l'aromatisation rapide des terpènes végétaux, soit de sources anthropiques comme les accidents pétroliers ou les gaz d'échappement [89, 185-186]. Certains homologues comme le benzo[a]pyrène (24) sont mutagènes et potentiellement cancérogènes [187], notamment à cause des corrélations entre les sources d'hydrocarbures et la fréquence d'apparition des cancers [188-189].



Dans les sols agricoles de la région parisienne, nous avons identifié des hydrocarbures aromatiques présents à l'état de traces [89]. L'étude de leur structure et de leur distribution suggère une source fossile ou pyrolytique plutôt qu'une formation par aromatisation rapide au cours de l'humification. En outre, la datation au carbone 14 d'une fraction aromatique (> 9820 ans) montre la présence d'une fraction majeure de carbone ancien (> 70 %). Ce résultat est appuyé par les paramètres de maturité basés sur les isomères des méthylphénanthrènes, utilisés couramment en géochimie

pétrolière [26, 190-191], qui livrent des valeurs équivalentes à celles de sédiments profonds et de pétroles.

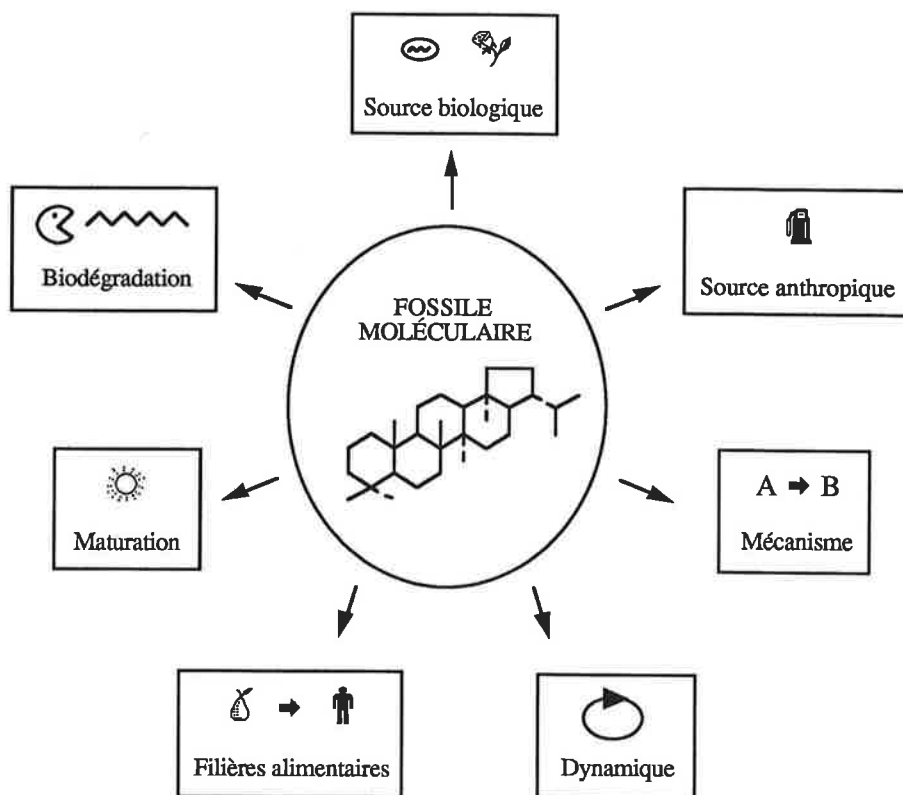
25



Enfin, nous observons une absence de variation isotopique des fractions aromatiques au cours d'une expérience de marquage du carbone du sol par culture du maïs pendant 23 ans (25). Ceci montre que ces molécules ne font pas partie du cycle du carbone du sol, du moins sur ce laps de temps. En fait, il peut s'agir soit d'une remontée lente et diffuse de pétrole, soit d'un dépôt régulier d'aérosols. En définitive, les fossiles moléculaires s'avèrent de puissants outils pour étudier la diffusion des contaminations pétrolières d'origine naturelle ou anthropique dans les écosystèmes.

Conclusion et perspectives

Les fossiles moléculaires sont de puissants outils pour étudier l'origine, la transformation et le transfert de la matière organique dans les écosystèmes modernes et anciens (26). Marqueurs d'origine, ils livrent des informations sur le milieu de dépôt, en précisant notamment les sources de la matière organique et la place de leur précurseurs biologiques dans les chaînes alimentaires. De manière surprenante, la découverte de certains fossiles « orphelins » peut conduire à l'identification de nouvelles substances biologiques. D'autre part, l'analyse isotopique de marqueurs végétaux dans les sols a permis d'étudier la dynamique de l'humus au niveau moléculaire. Marqueurs de processus, leur structure moléculaire et leur composition isotopique permettent d'identifier la nature des réactions géochimiques opérant dans les milieux très



complexes. Marqueurs de maturité, les fossiles moléculaires permettent de mesurer l'intensité du stress thermique subi par la matière organique au cours de l'enfouissement dans les sédiments. A cet égard, ils s'avèrent utiles à la fois pour la recherche pétrolière et pour authentifier la présence de contamination pétrolière dans les écosystèmes modernes. D'une manière plus générale, le concept de marqueur développé en géochimie pétrolière, grâce aux fossiles moléculaires, est à la base d'un domaine scientifique en émergence, la géochimie organique environnementale.

Géochimie organique environnementale

L'étude moléculaire des sols, des sédiments et des plantes s'est avérée utile pour préciser les sources, les processus de transformation et le devenir de la matière organique. Ces résultats s'intègrent ainsi dans un domaine scientifique en émergence rapide : la géochimie organique environnementale [192]. Les premières percées bénéficient largement des concepts et des techniques analytiques fines développés en géochimie pétrolière depuis 1960 [5-6, 27-29, 193]. Actuellement, trois outils moléculaires s'avèreraient parti-

culièrement prometteurs : les marqueurs de **contamination** pétrolière associés à la datation au carbone 14, les marqueurs de **biodégradation**, et les marqueurs de **maturité**.

Marqueurs de contamination pétrolière

De nombreux micropolluants organiques contaminent actuellement les écosystèmes. Comme les processus qui président à leur diffusion sont encore peu connus, il est souvent difficile de préciser leur origine. Ces interrogations pourraient être levées par des études au niveau moléculaire. Par exemple, des marqueurs pétroliers ont été identifiés dans les sols et dans les plantes poussant à proximité des voies routières [89-90] et dans les boues de station d'épuration [91, 179]. A cet égard, il serait souhaitable d'étendre la recherche de ces fossiles pétroliers à l'ensemble des filières alimentaires : pluies, solution du sol, amendements, sols, plantes, produits alimentaires, tissus biologiques, boues de stations d'épuration et sédiments de rivière. Les informations structurales seraient avantageusement complétées par la datation au carbone 14 des molécules [194] car tous les produits pétroliers n'en contiennent pres-

que plus. Il conviendrait aussi de s'intéresser aux micropolluants liés aux matrices organiques macromoléculaires car ces substances sont susceptibles d'être transférées vers les organismes vivants à la faveur des transformations de la matière organique [44, 122, 146, 195-200]. Enfin, de manière plus générale, l'étude moléculaire peut s'avérer un puissant moyen d'investigation de l'authentification, de la biodisponibilité et des mécanismes de transfert des micropolluants organiques.

Marqueurs de biodégradation

De part leur structure carbonée, tous les micropolluants organiques pourraient être biodégradés dans des conditions adéquates. Néanmoins, étant donné la complexité des écosystèmes, les facteurs qui contrôlent la dégradation sont encore peu connus, notamment à cause du manque d'outils permettant d'étudier ce phénomène au niveau moléculaire. Or, des études récentes suggèrent que ces interrogations pourraient être levées à l'aide de marqueurs moléculaires de biodégradation. Par exemple, les molécules pétrolières ont des aptitudes différentes à se biodégrader selon leur structure moléculaire [5, 201]. De telles différences ont été exploitées pour mesurer l'intensité de la biodégradation du pétrole dans les réservoirs et dans les sols des raffineries [202-203]. Un tel concept s'appliquerait donc bien aux situations de contamination ponctuelle des sols par les produits pétroliers [204]. Il permettrait non seulement d'évaluer l'intensité de la dépollution par atténuation naturelle, mais aussi de mesurer l'efficacité des technologies de réhabilitation, notamment l'épandage, l'incinération, la désorption thermique, les bioréacteurs, les biotertres et les cultures [205-206]. De manière plus générale, des investigations de la filière alimentaire pourraient livrer de puissants outils moléculaires pour étudier la dégradation des polluants organiques.

Marqueurs de maturité

Les facteurs qui contrôlent la maturation des matières organiques impliquées dans les différentes étapes de la filière alimentaire sont peu connus,

notamment dans le cas des déchets où il n'existe actuellement aucun indice moléculaire de transformation. Or, de nombreuses études sédimentaires ont conduit à la définition de puissants paramètres moléculaires permettant de mesurer la maturité de la matière organique au cours des temps géologiques [5, 26, 88, 207]. Aussi, il serait opportun d'étudier les matières organiques en décomposition pour identifier des substances organiques dont les changements moléculaires ont lieu sur des pas de temps plus courts (de l'heure à la centaine d'années). De tels paramètres moléculaires s'avéreraient utiles pour mesurer et authentifier l'état de maturation des matières organiques impliquées dans des processus divers : le compostage des déchets, l'épandage des boues, l'humification des sols, le mûrissement des fruits, la vinification des jus de raisins, l'affinement des fromages, la cuisson des aliments, etc. En résumé, le concept de paramètre moléculaire de maturité pourrait donc trouver des applications dans la plupart des domaines de la recherche environnementale et agronomique.

Remerciements : Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Français du Pétrole, université Louis Pasteur, université de l'Indiana, Centre de Recherche de Jülich (KFA), université Pierre et Marie Curie, Institut National Polytechnique de Lorraine.

Références

- [1] Brocks J.J., Logan G.A., Buick R., Summons R.E., Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes, *Science*, **1999**, 285, p. 1033-1036.
- [2] Albrecht P., Ourisson G., Biogenic substances in sediments and fossils, *Angewandte Chemie International*, **1971**, 10, p. 209-225.
- [3] Eglinton G., Chemical fossils : a combined organic geochemical and environmental approach, *Pure and Applied Chemistry*, **1973**, 34, p. 611-632.
- [4] Ourisson G., Des pétroles à l'évolution des biomembranes. Des hopanoïdes au cholestérol, la longue phylogénèse des terpènes, *L'Actualité Chimique*, mai **1986**, p. 23-30.
- [5] Peters K.E., Moldowan J.M., *The Biomarker Guide*, Prentice Hall, **1993**.
- [6] Tissot B.P., Welte D.H., *Petroleum Formation and Occurrence*, Springer, **1984**.
- [7] Connan J., Nissenbaum A., Dessort D., Molecular archaeology : export of Dead Sea asphalt to Canaan and Egypt in the Chalcolithic-Early Bronze Age (4th-3rd millennium BC), *Geochim. Cosmochim. Acta*, **1992**, 56, p. 2743-2759.
- [8] Van Dorsselaer A., Ensminger A., Spyckerelle C., Dastillung M., Sieskind O., Arpino P., Albrecht P., Ourisson G., Degraded and extended hopane derivatives (C₂₇ to C₃₅) as ubiquitous geochemical markers, *Tetrahedron Letters*, **1974**, 14, p. 1349-1352.
- [9] Welte D.H., Organischer Kohlenstoff und die Entwicklung der Photosynthese auf der Erde, *Naturwissenschaften*, **1970**, 57, p. 17-23.
- [10] Schnitzer M., Soil organic matter, the next 75 years, *Soil Science*, **1991**, 151, p. 41-58.
- [11] Schreiner O., Shorey E.C., The presence of a cholesterol substance in soils ; agrostol, *Journal of the American Chemical Society*, **1909**, 31, p. 116-118.
- [12] Schreiner O., Shorey E.C., Cholesterol bodies in soils : phytosterol, *Journal of Biological Chemistry*, **1911**, 9, p. 9-12.
- [13] Eglinton G., Murphy M.T.J., Editeurs, *Organic Geochemistry. Methods and Results*, Springer, **1969**.
- [14] Ambles A., Magnoux P., Jambu P., Jacquesy R., Fustec E., Effects of addition of bentonite on the hydrocarbon fraction of a podzol soil (A₁ Horizon), *Journal of Soil Science*, **1989**, 40, p. 685-694.
- [15] Ries-Kaunt M., Albrecht P., Hopane-derived triterpenoids in soils, *Chemical Geology*, **1989**, 76, p. 143-151.
- [16] Diné H., Schnitzer M., Mehuys M., Soil lipids : origin, nature, content, decomposition, and effect on soil physical properties, *Soil Biochemistry*, édité par J.-M. Bollag et G. Stotzky, Marcel Dekker, **1990**.
- [17] Lichtfouse E., Littke R., Disko U., Willsch H., Rullkötter J., Stein R., Geochemistry and petrology of organic matter in Miocene to Quaternary deep sea sediments from the Japan Sea (Sites 798 and 799), *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results*, **1992**, 127/128, p. 667-675.
- [18] Huang W.-Y., Meinschein W.G., Sterols as source indicators of organic materials in sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1976**, 40, p. 323-330.
- [19] Huang W.-Y., Meinschein W.G., Sterols as ecological indicators, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1979**, 40, p. 323-330.
- [20] Ourisson G., Albrecht P., Rohmer M., The hopanoids. Palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products, *Pure and Applied Chemistry*, **1979**, 51, p. 709-729.
- [21] Rohmer M., Bouvier-Nave P., Ourisson G., Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes, *Journal of General Microbiology*, **1984**, 130, p. 1137-1150.
- [22] Mackenzie A.S., Brassell S.C., Eglinton E., Maxwell J.R., Chemical fossils : the geological fate of steroids, *Science*, **1982**, 217, p. 491-504.
- [23] Sinnighe Damsté J.S., De Leeuw J.S., Analysis, structure and geochemical significance of organically-bound sulphur in the geosphere : state of the art and future research, *Organic Geochemistry*, **1990**, 16, p. 1077-1101.

- [24] Riolo J., Hussler G., Albrecht P., Connan J., Distribution of aromatic steroids in geological samples : their evaluation as geochemical parameters, *Organic Geochemistry*, **1986**, 10, p. 981-990.
- [25] Lichtfouse E., Nouveaux stéroïdes aromatiques fossiles, *thèse de doctorat*, université Louis Pasteur, Strasbourg, 189 pages, **1989**, Technip, 1990.
- [26] Lichtfouse E., Albrecht P., Behar F., Hayes J.M., A molecular and isotopic study of the organic matter from the Paris Basin, France, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1994**, 58, p. 209-221.
- [27] Moldowan J.M., Albrecht P., Philp R.P., Editeurs, *Biological Markers in Sediments and Petroleum*, Prentice Hall, **1992**.
- [28] Killops S.D., Killops V.J., *An Introduction to Organic Geochemistry*, Longman, **1993**.
- [29] Engel M.H., Macko S.A., éditeurs, *Organic Geochemistry, Principles and Applications*, Plenum, **1993**.
- [30] Van Dorsselaer A., Albrecht P., Ourisson G., Identification of novel (17 α H)-hopanes in shales, coals, lignites, sediments and petroleum, *Bulletin de la Société Chimique de France*, **1977**, 5, p. 165-170.
- [31] Rohmer M., Ourisson G., Structure des bactériohopanétrols d'*Acetobacter xylinum*, *Tetrahedron Letters*, **1976**, 40, p. 3633-3636.
- [31^{bis}] Rohmer M., Ourisson G., Dérivés du bactériohopane : variations structurales et répartition, *Tetrahedron Letters*, **1976**, 40, p. 3637-3640.
- [32] Rohmer M., Ourisson G., Méthylhopanes d'*Acetobacter xylinum* et d'*Acetobacter rancens*, *Tetrahedron Letters*, **1976**, 40, p. 3641-3644.
- [33] Ourisson G., Albrecht P., Rohmer M., Predictive microbial biochemistry, from molecular fossils to procaryotic membranes, *TIBS*, **1982**, p. 236-239.
- [34] Ourisson G., Rohmer M., Poralla K., Microbial lipids betrayed by their fossils, *Microbiological Sciences*, **1987**, 4, p. 52-57.
- [35] Ourisson G., Rohmer M., Poralla K., Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates, *Annual Reviews of Microbiology*, **1987**, 41, p. 301-333.
- [36] Summons R.E., Capon R.J., Fossil steranes with unprecedented methylation in ring-A, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1988**, 52, p. 2733-2736.
- [37] Summons R.E., Capon R.J., Identification and significance of 3 β -ethyl steranes in sediments and petroleum, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1991**, 55, p. 2391-2395.
- [38] Dahl J., Moldowan J.M., McCaffrey M.A., Lipton P.A., A new class of natural products revealed by 3 β -alkyl steranes in petroleum, *Nature*, **1992**, 355, p. 154-157.
- [39] Lichtfouse E., Riolo J., Albrecht P., Occurrence of 2-methyl-, 3-methyl- and 6-methyltri-aromatic steroid hydrocarbons in geological samples, *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31, p. 3937-3940.
- [40] Lichtfouse E., Albrecht P., Synthesis of triaromatic steroid hydrocarbons methylated at position 2, 3 or 6 : molecular fossils of yet unknown biological origin, *Tetrahedron*, **1994**, 50, p. 1731-1744.
- [41] Dany F., Riolo J., Trendel J.-M., Albrecht P., **1990**, 3 β -Carboxysteranes, a novel family of fossil steroids, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, p. 1228-1230.
- [42] Lichtfouse E., Albrecht P., Behar F., 3-Methyltri-aromatic steroids in sediments, molecular fossils with unknown precursors, *Polycyclic Aromatic Compounds* **3**, **1993**, p. 635-638.
- [43] Rullkötter J., Philip P., Extended hopanes up to C₄₀ in Thornton bitumen, *Nature*, **1981**, 292, p. 616-618.
- [44] Chappe B., Michaelis W., Albrecht P., Ourisson G., Fossil evidence for a novel series of archaeobacterial lipids, *Naturwissenschaften*, **1979**, 66, p. 522-523.
- [45] De Rosa M., Gambacorta A., Gliozzi A., Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids, *Microbiological Reviews*, **1986**, 50, p. 70-80.
- [46] Aquino Neto F.R., Restlé A., Connan J., Albrecht P., Ourisson G., Novel tricyclic terpanes (C₁₉, C₂₀) in sediments and petroleum, *Tetrahedron Letters*, **1982**, 23, p. 2027-2030.
- [47] Moldowan J.M., Seifert W.K., Seifert W.K., Gallegos E., Identification of an extended series of tricyclic terpanes in petroleum, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1983**, 47, p. 1531-1534.
- [48] Heissler D., Ocampo R., Albrecht P., Riehl J.-J., Ourisson G., Identification of long-chain tricyclic terpene hydrocarbons (C₂₁-C₃₀) in geological samples, *Journal of the Chemical Society, Chemical Commun.*, **1984**, p. 496-498.
- [49] Schaeffer P., Poinot J., Hauke V., Adam P., Wehrung P., Trendel J.-M., Albrecht P., Dessort D., Connan J., Novel optically active hydrocarbons in sediments : evidence for an extensive biological cyclisation of higher regular polyprenols, *Angewandte Chemie International Edition*, **1994**, 33, p. 1166-1169.
- [50] Hayes J.M., Freeman K.H., Popp B.N., Hoham C.H., Compound-specific isotopic analyses : a novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes, *Organic Geochemistry*, **1990**, 16, p. 1115-1128.
- [51] Jasper J.P., Hayes J.M., A carbon isotope record of CO₂ levels during the late Quaternary, *Nature*, **1990**, 347, p. 462-464.
- [52] Collister J.W., Summons R.E., Lichtfouse E., Hayes J.M., An isotopic biogeochemical study of the Green River oil shale, *Organic Geochemistry*, **1992**, 19, p. 265-276.
- [53] Lichtfouse E., Budzinski H., ¹³C analysis of molecular organic substances, a novel breakthrough in analytical sciences, *Analusis*, **1995**, 23, p. 263-265.
- [54] Sano M., Yotsui Y., Abe H., Sasaki S., A new technique for the detection of metabolites labelled by the isotope ¹³C using mass fragmentometry, *Biomedical Mass Spectrometry*, **1976**, 3, p. 1-3.
- [55] Matthews D.E., Hayes J.M., Isotope-ratio monitoring gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, **1978**, 50, p. 1465-1473.
- [56] Barrie A., Bricout J., Koziat J., Gas chromatography-stable isotope ratio analysis. A technique for ¹³C tracer studies at low isotopic enrichments, *Spectroscopy International Journal*, **1984**, 3, p. 259-260.
- [57] Lichtfouse E., Freeman K.H., Collister J.W., Merritt D.A., Enhanced resolution of organic compounds from sediments by isotopic gas chromatography-combustion-mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, **1991**, 585, p. 177-180.
- [58] Deines P., The isotopic composition of reduced organic carbon, *Handbook of Environmental Isotope Geochemistry*, édité par P. Fritz et J.C. Fontes, Elsevier, **1980**, p. 329-406.
- [59] Schoell M., The hydrogen and carbon isotopic composition of methane from natural gases of various origins, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1980**, 44, p. 649-661.
- [60] Summons R.E., Jahnke L.L., Roksandic Z., Carbon isotopic fractionation in lipids from methanotrophic bacteria : relevance for interpretation of the geochemical record of biomarkers, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1994**, 58, p. 2853-2863.
- [61] Collister J.W., Lichtfouse E., Hieshima G., Hayes J.M., Partial resolution of sources of *n*-alkanes in the saline portion of the Parachute Creek Member, Green River Formation (Piceance Creek Basin, Colorado), *Organic Geochemistry*, **1994**, 21, p. 645-659.
- [62] Eglinton G., Hamilton R.J., Leaf epicuticular waxes, *Science*, **1967**, 156, p. 1322-1335.
- [63] Huc A.Y., Mise en évidence de provinces géochimiques dans les schistes bitumineux du Toarcien de l'est du Bassin de Paris, *Revue de l'Institut du Pétrole*, **1976**, 31, p. 933-953.
- [64] Tegelaar E.W., Mattheizing R.M., Jansen J.B.H., Horsfield B., De Leeuw J.W., Possible origin of *n*-alkanes in high wax crude oils, *Nature*, **1989**, 342, p. 529-531.
- [65] Gelpi E., Schneider H.J., Mann J., Oró J., Olefins of high molecular weight in two microscopic algae, *Science*, **1968**, 161, p. 700-702.
- [66] Gelpi E., Schneider H.J., Mann J., Oró J., Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic algae, *Phytochemistry*, **1970**, 9, p. 603-612.
- [67] Lichtfouse E., Derenne S., Mariotti A., Largeau C., Possible algal origin of long chain odd *n*-alkanes in immature sediments as revealed by distributions and carbon isotope ratios, *Organic Geochemistry*, **1994**, 22, p. 1023-1027.
- [68] Kolattukudy P.E., éditeur, *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*, Elsevier, **1976**.
- [69] Kolattukudy P.E., Biopolyester membranes of plants : cutin and suberin, *Science*, **1980**, 208, p. 990-1000.
- [70] Cooper J.E., Bray E.E., A postulated role of fatty acids in petroleum formation, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1963**, 27, p. 1113-1127.
- [71] Behar F.H., Albrecht P., Correlations between carboxylic acids and hydrocarbons in several crude oils, Alteration by biodegradation, *Organic Geochemistry*, **1984**, 6, p. 597-604.

- [72] Durand B., éditeur, *Kerogen*, Technip, 1980.
- [73] Behar F., Pelet R., Roucaché J., Geochemistry of asphaltenes, *Organic Geochemistry*, 1984, 6, p. 587-595.
- [74] Behar F., Vandenbroucke M., Characterization and quantification of saturates trapped inside kerogen : implications for pyrolysis composition, *Organic Geochemistry*, 1988, 13, p. 927-938.
- [75] Bray E.E., Evans E.D., Distribution of *n*-paraffins as a clue to recognition of source beds, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1961, 22, p. 2-15.
- [76] Cooper J.E., Fatty acids in recent and ancient sediments and petroleum reservoir waters, *Nature*, 1962, 193, p. 744-746.
- [77] Shimoyama A., Johns W.D., 1972, Formation of alkanes from fatty acids in the presence of CaCO_3 , *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1972, 36, p. 87-91.
- [78] Fukushima K., Vacuum pyrolysis of recent sedimentary humic acids and kerogens, *Geochemical Journal*, 1982, 16, p. 43-49.
- [79] Lichtfouse E., Collister J.W., Tracing biogenic links of natural organic substances at the molecular level with stable carbon isotopes : *n*-alkanes and *n*-alkanoic acids from sediments, *Tetrahedron Letters*, 1992, 33, p. 8093-8094.
- [80] Lichtfouse E., Eglinton T.I., ^{13}C and ^{14}C evidence of pollution of a soil by fossil fuel and reconstruction of the composition of the pollutant, *Organic Geochemistry*, 1995, 23, p. 969-973.
- [81] Lichtfouse E., Isotope and biosynthetic evidence for the origin of long-chain aliphatic lipids in soils, *Naturwissenschaften*, 1998, 85, p. 76-77.
- [82] Seifert W.K., Steranes and terpanes in kerogen pyrolysis for correlation of oils and source rocks, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1978, 42, p. 473-484.
- [83] Seifert W.K., Moldowan J.M., Application of steranes, terpanes and monoaromatics to the maturation, migration and source of crude oils, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1978, 42, p. 77-95.
- [84] Seifert W.K., Moldowan J.M., The effect of biodegradation on steranes and terpanes in crude oils, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1979, 43, p. 111-126.
- [85] Seifert W.K., Moldowan J.M., Paleoreconstruction by biological markers, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1981, 45, p. 783-794.
- [86] Ensminger A., Joly G., Albrecht P., Rearranged steranes in sediments and crude oils, *Tetrahedron Letters*, 1978, 18, p. 1575-1578.
- [87] Mackenzie A.S., Patience R.L., Maxwell J.R., Vandenbroucke M., Maxwell J.R., Molecular parameters of maturation in the Toarcian shales, Paris Basin, France. I. Changes in the configurations of acyclic isoprenoid alkanes, steranes and triterpanes, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1980, 44, p. 1709-1721.
- [88] Lichtfouse E., Rullkötter J., Accelerated transformation of organic matter below the silica transition zone in immature sediments from the Japan Sea, *Organic Geochemistry*, 1994, 21, p. 517-523.
- [89] Lichtfouse E., Budzinski H., Garrigues P., Eglinton T.I., Ancient polycyclic aromatic hydrocarbons in modern soils : ^{13}C , ^{14}C and biomarker evidence, *Organic Geochemistry*, 1997, 26, p. 353-359.
- [90] Bryselbout C., Henner P., Lichtfouse E., Fossil fuel biomarkers in plant waxes as pollution parameters, *The Science of the Total Environment*, 1998, 222, p. 201-204.
- [91] Payet C., Bryselbout C., Morel J.L., Lichtfouse E., Fossil fuel biomarkers in sewage sludges : environmental significance, *Naturwissenschaften*, 1999, 86, p. 484-488.
- [92] Tissot B., Califet-Debyser Y., Deroo G., Oudin J.L., Origin and evolution of hydrocarbons in Early Toarcian shales, Paris Basin, France, *The American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, 1971, 55, p. 2177-2193.
- [93] Espitalié J., Marquis F., Sage, L., Barsony L., Géochimie organique du bassin de Paris, *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, 1987, 42, p. 271-302.
- [94] Espitalié J., Maxwell J.R., Chenet Y., Marquis F., Aspects of hydrocarbons migration in the Mesozoic in the Paris Basin as deduced from an organic geochemical survey, *Organic Geochemistry*, 1988 13, p. 467-481.
- [95] Lichtfouse E., Lévêque J., éditeurs, *Humic substances, Analysis/European Journal of Analytical Chemistry*, 1999, 27, p. 385-444.
- [96] Lichtfouse E., Lévêque J., Les substances humiques, un véritable défi pour l'analyste, *Analisis Magazine*, 1999, 1, p. 10-12.
- [97] Schnitzer M., Neyroud J.A., Alkanes and fatty acids in humic substances, *Fuel*, 1975, 54, p. 17-19.
- [98] Jambu P., Fustec E., Jacquesy R., Les lipides des sols : nature, origine, évolution, propriétés, *Science du Sol*, 1978, 4, p. 229-240.
- [99] Moucawi J., Fustec E., Jambu P., Jacquesy R., Decomposition of lipids in soils : free and esterified fatty acids, alcohols and ketones, *Soil Biology and Biochemistry*, 1981, 13, p. 461-468.
- [100] Schnitzer M., Hindle C.A., Meglic M., Supercritical gas extraction of alkanes and alkanolic acids from soils and humic materials, *Soil Science Society American Journal*, 1986, 50, p. 913-919.
- [101] Amblès A., Jambu P., Ntsikoussalabongui B., Évolution des acides gras d'un podzol forestier induite par l'apport d'engrais minéraux, *Science du Sol*, 1990, 28, p. 27-42.
- [102] Amblès A., Jacquesy J.C., Jambu P., Joffre J., Maggi-Churin R., Polar lipid fraction in soil : a kerogen-like matter, *Organic Geochemistry*, 1991, 17, p. 341-349.
- [103] Amblès A., Parlenti E., Jambu P., Mayoungou P., Jacquesy J.-C., *n*-Alkane oxidation in soil. Formation of internal monoalkenes, *Geoderma*, 1994, 64, p. 111-124.
- [104] Lichtfouse E., Bardoux G., Mariotti A., Balesdent J., Ballentine D.C., Macko S.A., Molecular, ^{13}C , and ^{14}C evidence for the allochthonous and ancient origin of C_{16} - C_{18} *n*-alkanes in modern soils, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1997, 61, p. 1891-1898.
- [105] Lichtfouse E., Berthier G., Houot S., Barriuso E., Bergheaud V., Vallaes T., Stable carbon isotope evidence for the microbial origin of C_{14} - C_{18} *n*-alkanoic acids in soils, *Organic Geochemistry*, 1995, 23, p. 849-852.
- [106] Rieley G., Collier R., Jones D.M., Eglinton G., Eakin P.A., Fallick A.E., Sources of sedimentary lipids deduced from stable carbon-isotope analyses of individual compounds, *Nature*, 1991, 352, p. 425-426.
- [107] Rieley G., Collister J.W., Stern B., Eglinton G., Gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry of leaf wax *n*-alkanes from plants of differing carbon dioxide metabolisms, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, 7, p. 488-491.
- [108] Collister J.W., Rieley G., Stern B., Eglinton G., Fry B., Compound-specific $\delta^{13}\text{C}$ analyses of leaf lipids from plants with differing carbon dioxide metabolisms, *Organic Geochemistry*, 1994, 21, p. 619-627.
- [109] Cerri C., Feller C., Balesdent J., Victoria R., Plenecassagne A., Application du traçage isotopique naturel en ^{13}C à l'étude de la dynamique de la matière organique dans les sols, *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 1985, 300, p. 423-428.
- [110] Balesdent J., Mariotti A., Guillet B., Natural ^{13}C abundance as a tracer for studies of soil organic matter dynamics, *Soil Biology and Biochemistry*, 1987, 19, p. 25-30.
- [111] Lichtfouse E., Elbisser B., Balesdent J., Mariotti A., Bardoux G., Isotope and molecular evidence for direct input of maize leaf wax *n*-alkanes into crop soils, *Organic Geochemistry*, 1994, 22, p. 349-351.
- [112] Parker P.L., Leo R.F., Fatty acids in blue-green algal mat communities, *Science*, 1965, 148, p. 373-374.
- [113] Parker P.L., Van Baalen C., Maurer L., Fatty acids in eleven species of blue-green algae : geochemical significance, *Science*, 1967, 155, p. 707-708.
- [114] Perry G.J., Volkman J.K., Johns R.B., Bavor H. J., Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1979, 43, p. 1715-1725.
- [115] Grimalt J.O., Saiz-Jimenez C., Lipids of soil humic acids. I. The hymatomelanic acid fraction, *The Science of the Total Environment*, 1989, 81/82, p. 409-420.
- [116] Grimalt J.O., Hermosin B., Yruea I., Saiz-Jimenez C., Lipids of soil humic acids. II. Residual components after hymatomelanic acid extraction, *The Science of the Total Environment*, 1989, 81/82, p. 421-428.
- [117] Thompson I.P., Bailey M.J., Ellis R.J., Purdy K.J., Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition, *FEMS Microbiology Ecology*, 1993, 102, p. 75-84.
- [118] Morrisson R.I., Soil lipids, *Organic Geochemistry, Methods and Results*, édité par G. Eglinton et M.T.J. Murphy, Springer, 1969, p. 558-575.

- [119] Hayes J.M., Factors controlling ^{13}C contents of sedimentary organic compounds : principles and evidence, *Marine Geology*, **1993**, *113*, p. 111-125.
- [120] Schnitzer M., Khan S.U., éditeurs, *Soil Organic Matter*, Elsevier, **1978**.
- [121] Huc A.Y., Origin and formation of organic matter in recent sediments and its relation to kerogen, *Kerogen*, édité par B. Durand, Technip, **1980**, p. 445-474.
- [122] Bollag J.-M., Loll M.J., Incorporation of xenobiotics into soil humus, *Experientia*, **1983**, *39*, p. 1221-1231.
- [123] Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., Swift R.S., éditeurs, *Humic Substances II. In Search of Structure*, Wiley, **1989**.
- [124] Duchaufour P., *Pédologie*, Masson, **1994**.
- [125] Maillard L.C., Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs, *Annales de Chimie de Paris*, éditées par A. Haller et Ch. Moureu, Masson, tome V, **1916**, p. 258-317.
- [126] Maillard L.C., Identité des matières humiques de synthèse avec les matières humiques naturelles, *Annales de Chimie de Paris*, éditées par A. Haller et Ch. Moureu, Masson, tome VI, **1917**, p. 113-152.
- [127] Lichtfouse E., Dou S., Girardin C., Grably M., Balesdent J., Behar F., Vandembroucke M., Unexpected ^{13}C -enrichment of organic components from wheat crop soils : evidence for the *in situ* origin of soil organic matter, *Organic Geochemistry*, **1995**, *23*, p. 865-868.
- [128] Benner R., Fogel M.L., Spargue E.K., Hodson R.E., Depletion of ^{13}C in lignin and its implications for stable carbon isotope studies, *Nature*, **1987**, *329*, p. 708-710.
- [129] Abelson P.H., Hoering T.C., Carbon isotopic fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1961**, *47*, p. 623-632.
- [130] Park R., Epstein S., Metabolic fractionation of C^{13} and C^{12} in plants, *Plant Physiology*, **1961**, *36*, p. 133-138.
- [131] Largeau C., Derenne S., Casadevall E., Berkloff C., Corolleur M., Lugardon B., Raynaud J.F., Connan J., Occurrence and origin of ultralaminae structures in amorphous kerogens of various source rocks and oil shales, *Organic Geochemistry*, **1990**, *16*, p. 889-895.
- [132] Derenne S., Largeau C., Casadevall E., Berkloff C., Rousseau B., Chemical evidence of kerogen formation in source rocks and oil shales via selective preservation of thin resistant outer walls of microalgae : origin of ultralaminae, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1991**, *55*, p. 1041-1050.
- [133] Derenne S., Le Berre F., Largeau C., Hatcher P., Connan J., Raynaud J.F., Formation of ultralaminae in marine kerogens via selective preservation of thin resistant outer walls of microalgae, *Organic Geochemistry*, **1992**, *19*, p. 345-350.
- [134] Hatcher P.G., Maciel G.E., Dennis L.W., Aliphatic structures of humic acids : a clue to their origin, *Organic Geochemistry*, **1981**, *3*, p. 43-48.
- [135] Schulten H.-R., Schnitzer M., Aliphatics in soil organic matter in fine-clay fractions, *Soil Science Society of America Journal*, **1990**, *54*, p. 98-105.
- [136] Almendros G., Sanz J., González-Vila F.J., Martin F., Evidence for a polyalkyl nature of soil humin, *Naturwissenschaften*, **1991**, *78*, p. 359-362.
- [137] Kögel-Knabner I., De Leeuw J.W., Hatcher P.G., Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles : implication for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules, *The Science of the Total Environment*, **1992**, *117/118*, p. 175-185.
- [138] Lichtfouse E., Chenu C., Baudin F., Resistant ultralaminae in soils, *Organic Geochemistry*, **1996**, *25*, p. 263-265.
- [139] Lichtfouse E., Chenu C., Baudin F., Leblond C., Da Silva M., Behar F., Derenne S., Largeau C., Wehrung P., Albrecht P., A novel pathway of soil organic matter formation by selective preservation of resistant straight-chain biopolymers : chemical and isotope evidence, *Organic Geochemistry*, **1998**, *28*, p. 411-415.
- [140] Lichtfouse E., Leblond C., Da Silva M., Behar F., Occurrence of biomarkers and straight-chain biopolymers in humin : implication for the origin of soil organic matter, *Naturwissenschaften*, **1998**, *85*, p. 497-501.
- [141] Larter S.R., Solli H., Douglas A.G., De Lange F., De Leeuw J.W., Occurrence and significance of prist-1-ene in kerogen pyrolysates, *Nature*, **1979**, *279*, p. 405-408.
- [142] Ourisson G., Albrecht P., Geohopanooids : the most abundant natural products on Earth ?, *Accounts of Chemical Research*, **1992**, *25*, p. 398-402.
- [143] Rullkötter J., Michaelis W., The structure of kerogen and related materials. A review of recent progress and future trends, *Organic Geochemistry*, **1990**, *16*, p. 829-852.
- [144] Richnow H.H., Jenish A., Michaelis W., Structural investigations of sulphur-rich macromolecular oil fractions and a kerogen by sequential chemical degradation, *Organic Geochemistry*, **1992**, *19*, p. 351-370.
- [145] Michaelis W., Richnow H.H., Seifert R., Chemically bound chlorinated aromatics in humic substances, *Naturwissenschaften*, **1995**, *82*, p. 139-142.
- [146] Nanny M.A., Bortiatynski J.M., Hatcher P.G., Noncovalent interactions between acenaphthenone and dissolved fulvic acid as determined by ^{13}C NMR T_1 relaxation measurements, *Environmental Science and Technology*, **1997**, *31*, p. 530-534.
- [147] Lichtfouse E., Wehrung P., Albrecht P., Plant wax *n*-alkanes trapped in soil humin by noncovalent bonds, *Naturwissenschaften*, **1998**, *85*, p. 449-452.
- [148] Lichtfouse E., A novel model of humin, *Analisis/European Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, *27*, p. 385-386.
- [149] Lichtfouse E., Temporal pools of individual organic substances in soil, *Analisis/European Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, *27*, p. 442-444.
- [150] Jenkinson D.S., Studies on the decomposition of plant material in soil. I. Losses of carbon from ^{14}C labelled ryegrass incubated with soil in the field, *Journal of Soil Science*, **1965**, *16*, p. 104-115.
- [151] Jenkinson D.S., Studies on the decomposition of plant material in soil. III. The distribution of labelled and unlabelled carbon in soil incubated with ^{14}C -labelled ryegrass, *Journal of Soil Science*, **1968**, *19*, p. 25-39.
- [152] Campbell C.A., Paul E.A., Rennie D.A., McCallum K.J., Applicability of the carbon-dating method of analysis to soil humus studies, *Soil Science*, **1967**, *104*, p. 217-224.
- [153] Campbell C.A., Paul E.A., Rennie D.A., McCallum K.J., Factors affecting the accuracy of the carbon-dating method in soil humus studies, *Soil Science*, **1967**, *104*, p. 81-85.
- [154] Nissenbaum A., Kaplan I.R., Chemical and isotopic evidence for the *in situ* origin of marine humic substances, *Limnology and Oceanography*, **1972**, *17*, p. 570-582.
- [155] Martel Y.A., Paul E.A., Effects of cultivation on the organic matter of grassland soils as determined by fractionation and radiocarbon dating, *Canadian Journal of Soil Science*, **1974**, *54*, p. 419-426.
- [156] Jenkinson D.S., Rayner J.H., The turnover of soil organic matter in some of the Rothamsted classical experiments, *Soil Science*, **1977**, *123*, p. 298-305.
- [157] Scharpenseel H.W. et Schiffmann H., Radiocarbon dating of soils, a review, *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **1977**, *140*, p. 159-174.
- [158] Balesdent J., The turnover of soil organic fractions estimated by radiocarbon dating, *The Science of the Total Environment*, **1987**, *62*, p. 405-408.
- [159] Smith B.N., Epstein S., Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants, *Plant Physiology*, **1971**, *47*, p. 380-384.
- [160] Bender M.M., Variations in the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of plants in relation to the pathway of photosynthetic carbon dioxide, *Phytochemistry*, **1971**, *10*, p. 1239-1244.
- [161] O'Leary M.H., Carbon isotope fractionation in plants, *Phytochemistry*, **1981**, *20*, p. 553-567.
- [162] Cerling T.E., Quade J., Wang Y., Bowman J.R., Carbon isotopes in soils and palaeosols as ecology and palaeoecology indicators, *Nature*, **1989**, *342*, p. 138-139.
- [163] Mariotti A., Peterschmitt E., Forest savanna ecotone dynamics in India as revealed by carbon isotope ratios of soil organic matter, *Oecologia*, **1994**, *97*, p. 475-480.
- [164] Lichtfouse E., Dou S., Houot S., Barriuso E., Isotope evidence for soil organic carbon pools with distinct turnover rates. II. Humic substances, *Organic Geochemistry*, **1995**, *23*, p. 845-847.
- [165] Lichtfouse E., ^{13}C labelling of soil *n*-hentriacontane (C_{31}) by maize cultivation, *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, p. 529-530.
- [166] Lichtfouse E., Heterogeneous turnover of molecular organic substances from crop soils as revealed by ^{13}C labeling at natural abundance with *Zea mays*, *Naturwissenschaften*, **1997**, *84*, p. 23-25.

- [167] Freeman K.H., Boreham C.J., Summons R.E., Hayes J.M., The effect of aromatization on the isotopic compositions of hydrocarbons during early diagenesis, *Organic Geochemistry*, **1994**, 21, p. 1037-1049.
- [168] Huang Y., Eglinton G., Ineson P., Latter P.M., Bol R., Harkness D.D., Absence of carbon isotope fractionation of individual *n*-alkanes in a 23-year field decomposition experiment with *Calluna vulgaris*, *Organic Geochemistry*, **1997**, 26, p. 497-501.
- [169] Dastillung M., Albrecht P., Molecular test for oil pollution in surface sediments, *Marine Pollution Bulletin*, **1976**, 7, p. 13-15.
- [170] Hostettler F.D., Rapp J.B., Kvenvolden K.A., Use of geochemical biomarkers in bottom sediment to track oil from a spill, San Francisco Bay, California, *Marine Pollution Bulletin*, **1992**, 24, p. 15-20.
- [171] Suess H.E., Radiocarbon concentration in modern wood, *Science*, **1955**, 122, p. 415-417.
- [172] Stuiver M., Pollach H.A., Discussion : reporting of ^{14}C data, *Radiocarbon*, **1977**, 19, p. 355-363.
- [173] Clark R.C., Blumer M., Distribution of *n*-paraffins in marine organisms and sediment, *Limnology and Oceanography*, **1967**, 12, p. 79-87.
- [174] Grimalt J.O., Albaigés J., Sources and occurrences of C_{12} - C_{22} *n*-alkane distributions with even carbon-number preference in sedimentary environments, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1987**, 51, p. 1379-1384.
- [175] Tissot B., Durand B., Espitalié J., Combaz A., Influence of nature and diagenesis of organic matter in formation of petroleum, *The American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, **1974**, 58, p. 499-506.
- [176] Clayton C.J., Bjorøy M., Effect of maturity on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of individual compounds in North Sea oils, *Organic Geochemistry*, **1994**, 21, p. 737-750.
- [177] Wilhelms A., Larter S.R., Hall K., A comparative study of the stable carbon isotopic composition of crude oil alkanes and associated crude oil asphaltene pyrolysis alkanes, *Organic Geochemistry*, **1994**, 21, p. 751-759.
- [178] Henner P., Schwartz C., Lichtfouse E., Pipette Pasteur extraction : a fast, convenient, exhaustive and environmentally friendly method for the extraction of solid samples, *Analisis Magazine*, **1997**, 25, p. M51-M52.
- [179] Payet C., Bryselbout C., Morel J.L., Lichtfouse E., Organic geochemistry of sewage sludge. I. Lipid fractionation by thin layer chromatography, *Analisis/European Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, 27, p. 396-398.
- [180] Edwards N.T., Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment. A review, *Journal of Environmental Quality*, **1983**, 12, p. 427-441.
- [181] Sicre M.A., Marty J.C., Saliot A., Aparicio X., Grimalt J., Albaiges J., Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the mediterranean sea : occurrence and origin, *Atmospheric Environment*, **1987**, 21, p. 2247-2259.
- [182] Baek S.O., Field R.A., Goldstone M.E., Kirk P.W., Lester J.N., Perry R., A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons : sources, fate and behavior, *Water, Air, and Soil Pollution*, **1991**, 60, p. 279-300.
- [183] Garrigues P., Lamotte M., éditeurs, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, OPA, **1993**.
- [184] Budzinski H., Cycles biogéochimiques des composés aromatiques, *Lettre des Sciences Chimiques*, **1997**, 60, p. 5-8.
- [185] Henner P., Schiavon M., Morel J.L., Lichtfouse E., Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods, *Analisis Magazine*, **1997**, 25, p. M56-M59.
- [186] Lichtfouse E., Apitz S., Nanny M., éditeurs, *The Biogeochemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, *Organic Geochemistry*, **1999**, 30, p. 873-969.
- [187] Pahlman R., Pelkonen O., Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons : the significance of enzymatic factors and molecular structure, *Carcinogenesis*, **1987**, 8, p. 773-778.
- [188] Lee M.L., Novotny M., Bartle K.D., Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates, *Analytical Chemistry*, **1976**, 48, p. 1566-1572.
- [189] Blumer M., Blumer W., Reich T., Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of a mountain valley. Correlation with highway traffic and cancer incidence, *Environmental Science and Technology*, **1977**, 11, p. 1082-1084.
- [190] Radke M., Welte D.H., Willsch H., Maturity parameters based on aromatic hydrocarbons : influence of the organic matter type, *Organic Geochemistry*, **1986**, 10, p. 51-63.
- [191] Garrigues P., De Sury R., Angelin M.L., Bellocq J., Oudin J.L., Ewald M., Relation of the methylated aromatic hydrocarbon distribution pattern to the maturity of organic matter in ancient sediments from the Mahakam delta, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1988**, 52, p. 375-384.
- [192] Eganhouse R.P., *Molecular Markers in Environmental Geochemistry*, ACS, **1997**.
- [193] Lichtfouse E., éditeur, *Soil Pollutants*, *Analisis*, **1997**, 25, p. M16-M72.
- [194] Eglinton T.I., Aluwihare L.I., Bauer J.E., Druffel E.R.M., McNichol A.P., Gas chromatographic isolation of individual compounds from complex matrices for radiocarbon dating, *Analytical Chemistry*, **1996**, 68, p. 904-912.
- [195] Schiavon M., Jacquin F. et Goussault C., Blocage de molécules s-triaziniques par la matière organique, *IAEA-SM*, **1978**, p. 327-332.
- [196] Roberts T.R., Non-extractable pesticide residues in soils and plants, *Pure and Applied Chemistry*, **1984**, 56, p. 945-956.
- [197] Richnow H.H., Seifert R., Heftter J., Kästner M., Mahro B., Michaelis W., Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments, *Organic Geochemistry*, **1994**, 22, p. 671-681.
- [198] Schiavon M., Barriuso E., Lichtfouse E., Morel J.-L., Contamination des sols et des productions agricoles par les produits phytosanitaires et les micropolluants organiques 155-169, *Actes des Troisièmes Rencontres de la Fertilisation Raisonnée et de l'Analyse de Terre*, édité par G. Thevenet et P. Riou, Blois, **1997**.
- [199] Lichtfouse E., Soil, a sponge for pollutants, *Analisis*, **1997**, 25, p. M16-M23.
- [200] Houot S., Benoit P., Charnay M.P., Barriuso E., Experimental techniques to study the fate of organic pollutants in soils in relation to their interactions with soil organic constituents, *Analisis*, **1997**, 25, p. 41-45.
- [201] Connan J., Restlé A., La biodégradation des hydrocarbures dans les réservoirs, *Bulletin du Centre de Recherche Exploration-Production d'Elf-Aquitaine*, **1984**, 8, p. 291-302.
- [202] Peters K.E., Moldowan J.M., Effects of source, thermal maturity, and biodegradation on the distribution and isomerization of homohopanes in petroleum, *Organic Geochemistry*, **1991**, 17, p. 47-61.
- [203] Moldowan J.M., Dahl J., McCaffrey M.A., Smith W.J., Fetzer J.C., Application of biological marker technology to bioremediation of refinery by-products, *Energy & Fuels*, **1995**, 9, p. 155-162.
- [204] Henner P., Schiavon M., Druelle V., Lichtfouse E., Phytotoxicity of ancient gaswork soils, Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination, *Organic Geochemistry*, **1999**, 30, p. 963-969.
- [205] Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J., Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings, *Environmental Science and Technology*, **1995**, 29, p. 1615-1621.
- [206] Chaîneau C.H., Morel J.L., Oudot J., Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons, *Journal of Environmental Quality*, **1997**, 26, p. 1478-1483.
- [207] Schroeder R.A., Bada J.L., A review of the geochemical applications of the amino acid racemization reaction, *Earth Science Reviews*, **1976**, 12, p. 347-391.