



HAL
open science

Application de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection à l'étude de la spéciation de la matière organique dissoute en milieu estuarien et côtier

Johann Breitenstein

► **To cite this version:**

Johann Breitenstein. Application de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection à l'étude de la spéciation de la matière organique dissoute en milieu estuarien et côtier. Autre. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0074 . tel-02956331

HAL Id: tel-02956331

<https://theses.hal.science/tel-02956331>

Submitted on 2 Oct 2020

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : Chimie Marine

Par

Johann BREITENSTEIN

Application de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection à l'étude de la spéciation de la matière organique dissoute en milieux estuarien et côtier

Thèse présentée et soutenue à l'Institut Universitaire Européen de la Mer, le 27 Novembre 2019
Unité de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539)

Rapporteurs avant soutenance :

Gaëtane LESPES
Professeur d'Université.
Université de Pau et des Pays de l'Adour

Marie BOYE
Directrice de Recherche CNRS
Institut de Physique du Globe de Paris

Composition du Jury :

Philippe GIAMARCHI
Professeur, Université de Bretagne Occidentale.
Président du jury
Gaëtane LESPES

Professeur d'Université.
Université de Pau et des Pays de l'Adour

Marie BOYE
Directrice de Recherche CNRS
Institut de Physique du Globe de Paris

Véronique LENOBLE
Maitre de Conférences, Université de Toulon.
Examinatrice

Ricardo RISO
Professeur, Université de Bretagne Occidentale.
Directeur de thèse

Gabriel DULAQUAIS
Maitre de Conférences, Université de Bretagne Occidentale
Co-encadrant de thèse

Invité :
Matthieu WAELES
Maitre de Conférences – HDR
Co-encadrant de thèse



Remerciements

En préambule à tout ceci, je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté de corriger ce travail et de siéger à Brest malgré la tempête. Trois heures et demie de soutenance n'auront pas été de trop pour « rembourser » ces imprévus.

Plus de trois années après le début de l'aventure, il est temps de remercier tous ceux qui ont eu un rôle dans ce travail de thèse.

D'abord, un petit mot en souvenir de Benoit Pernet-Coudrier, à l'initiative de ce projet et qui m'a proposé de préparer cette thèse alors que je n'étais qu'en M1. Son souvenir était présent partout, jusque dans la LC-OCD. J'espère que cette thèse aura permis à l'équipe de poursuivre son œuvre d'une manière ou d'une autre.

Merci à Ricardo Riso, directeur de thèse et co-initiateur des travaux sur ce sujet dans notre équipe « chimie marine ». L'histoire a commencé le 13 Juin 2014 lorsque vous m'avez appelé pour me demander si j'étais toujours d'accord de venir à Brest pour le master SML-CEM. Cinq ans après, un master, deux stages, une thèse et au moins 23 kg de papier de corrections (le poids du travail !), nous voilà à la fin de notre collaboration. Merci pour toutes ces opportunités et surtout pour celle de m'avoir ouvert une porte de l'océanographie. Je vous souhaite le meilleur pour la fin de votre carrière.

Je remercie également l'ensemble du groupe chimie marine. Je pense évidemment à Mathieu Waeles et à Gabriel Dulaquais, qui ont participé plus ou moins à l'encadrement de ce travail ; mais également à Jean-François Maguer et à Stéphane L'Helguen qui ont participé aux discussions informelles qui égayent la vie au labo. Mais surtout merci à Jérémy Devesa. Le court passage dans notre bureau partagé me laisse beaucoup de souvenirs. Merci de m'avoir soutenu dans les périodes de doute et dans les moments plus gris.

Merci à Philippe Giamarchi, qui a accepté la charge de président du jury de thèse, et à Jean-Pierre Bakroum du laboratoire OPTIMAG de l'UBO pour leur accueil, leurs conseils sur la fluorescence et surtout leur bonne humeur toujours égale.

Merci au réseau SOMLIT de m'avoir permis de présenter mes résultats à deux reprises à Bordeaux et à Roscoff lors de l'exercice d'intercomparaison 2019 qui aura été la meilleure expérience hors institut de ces trois dernières années me concernant.

D'autres personnes sont à l'origine de la réussite de cette thèse d'une manière plus « terre-à-terre ». Je pense à tout le personnel administratif : Geneviève, Yves, Elisabeth et Elodie ; qui m'auront fait courir partout dans l'IUEM pour des papiers mais qui ont toujours pris le temps de m'écouter; ou technique comme l'équipe des plongeurs : Erwan, Thierry et Isabelle, qui m'auront permis de domestiquer mon mal de mer avec toutes ces sorties en estuaires, tempête ou pas, dans la bonne humeur ! Je souhaite également remercier d'autres personnalités aux rôles plus fédérateurs comme Mme Martine

Le Roux et Mr Luis Tito de Morais assistés par d'excellents conseillers qui sont Mr Ouedraogo et Mr Hugues Renaud. Vous m'avez donné l'impulsion nécessaire pour aller jusqu'au bout de ce travail.

Je remercie chaleureusement Clarisse Lemonnier, avec qui j'aurai passé pas mal de temps à découvrir le monde « émergent » des bactéries, un sujet des plus passionnants. J'espère avoir été à la hauteur sur ma partie « MOD » !

Merci également à Fanny Barbier et à Riwalenn Ruault rencontrées pour des formations en médiation scientifiques. D'une part vous m'avez ouvert les portes d'un exercice vraiment passionnant que j'espère continuer dans la suite et d'autre part vous avez été des oreilles attentives et des soutiens sans faille.

Merci à Rémi Marsac, chargé de recherches à Géosciences et surtout un ami sincère qui m'aura toujours été de bons conseils.

Merci à Lauriane Marie et Laura Cotte, deux « grandes sœurs » de thèse qui ont soutenu avant moi et qui m'ont soutenu avant et pendant ce long travail solitaire, m'aidant à relativiser tout malgré qu'il faille revenir à la charge encore et encore... Je me rappellerai toute ma vie de vos rires et de votre gourmandise devant les tas de cacahouètes enrobées de « chocolat » colorée ! ;)

Dans l'ensemble de ce travail de thèse, il y a une partie que j'ai préférée. Celle sur les cycles annuels à l'échelle hebdomadaire. Un travail imaginé en début de première année qui n'aurait pas été rendu possible sans le concours de l'équipe SOMLIT incarnée par Peggy Rimmelmaury et Emilie Grossteffan. Un soutien qui ne s'est pas arrêté à l'expertise technique. Merci de m'avoir accueilli dans votre aile, merci de m'avoir soutenu tous les jours pendant plus d'un an. Ces sorties hebdomadaires régies par les marées, ces rires, ces réunions gargantuesques... Merci d'avoir pris du temps alors que vous n'en avez jamais beaucoup. Vous me manquez déjà. Je vous souhaite bon vent mais je sais qu'on se reverra, les amies.

Je pense également à mes amis partis vers d'autres horizons : Lionel, Clément, Jean, Adeline, Luc, Clémence, Laurélyne, Maximilian, Mónica... et tous ceux que j'oublie. On s'est croisé, on s'est appelé... On a partagé le fardeau. Merci.

Un immense merci à mes parents, à mes beaux-parents et à mon frère d'avoir veillé sur moi, de loin. Je sais que je peux compter sur vous.

Pendant ce temps, à Rennes, Elaheh Lotfi-Kalahroodi réalisait un tour de force en réalisant sa thèse en trois ans presque jour pour jour avec des résultats passionnants et de la suite dans les idées. Je sais pourquoi je t'aime. Tu es l'incarnation de la scientifique droite dans ses bottes et heureuse de vivre. Merci pour ton soutien sans faille même si cela a été très difficile, je le sais.

Je conclurai cette section un peu personnelle par une citation qui m'a guidé durant ces trois années de combat : « **Je suis de ceux qui pensent que la Science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien, il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées** » - Marie Curie.

Tables des Matières

Sommaire

Introduction Générale	24
Chapitre I - La matière organique dissoute dans le continuum terre-mer	30
I.1. Introduction	32
I.2. Réservoirs, sources et cycles de la matière organique dissoute	37
I.2.1. Le réservoir océanique.....	38
I.2.2. Le réservoir fluvial.....	41
I.2.3. Le réservoir souterrain.....	43
I.2.4. Le réservoir sédimentaire	45
I.2.5. Le réservoir estuarien	46
I.2.5.1. Définition d'un estuaire.....	47
I.2.5.2. Comportement de la MOD dans les estuaires	48
I.2.6. Principaux processus de transformation de la MOD dans les estuaires	50
I.2.6.1. Influence de l'activité biologique sur la matière organique dissoute	50
I.2.6.2. Principaux processus abiotiques impactant la MOD.....	52
I.2.7. Rôle de l'estuaire dans le cycle global du carbone organique dissous	54
I.3. Techniques de caractérisation de la MOD	56
I.3.1. Techniques de séparation	56
I.3.1.1. Séparation selon la taille	56
I.3.1.2. Séparation selon la polarité	57
I.3.1.3. Séparation selon la charge	59
I.3.2. Techniques d'analyse de la matière organique dissoute	59
I.3.2.1. Analyses élémentaires et isotopiques.....	59
I.3.2.2. Analyses moléculaires	62
I.3.2.3. Analyses fonctionnelles.....	64
I.3.2.4. Spectroscopie UV-visible	64
I.3.2.5. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	65
I.3.2.6. Spectroscopie de fluorescence.....	66
I.3.2.7. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire	67
I.3.2.8. Techniques électrochimiques pour le dosage de certains composés de la MOD	69
I.3.2.9. Titrations acido-basique	70
I.3.2.10. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance.....	72

I.4.	Conclusion	73
-------------	-------------------------	-----------

Chapitre II - Matériel et méthodes 74

II.1.	Cadre des études : le système Aulne – rade de Brest	76
II.1.1.	Bassin versant de l’Aulne	77
II.1.2.	L’estuaire de l’Aulne	77
II.1.3.	La rade de Brest	80
II.1.4.	La mer d’Iroise	82
II.2.	Prélèvements	84
II.2.1.	Prélèvements dans l’estuaire de l’Aulne et traitement des échantillons	84
II.2.1.	Prélèvements et traitements des échantillons de la rade de Brest	87
II.3.	Analyses des paramètres hydrologiques et biologiques du réseau SOMLIT.....	87
II.4.	Analyse globale sélective de la matière organique dissoute	89
II.4.1.	Chromatographie d’exclusion stérique à multi-détection	89
II.4.1.1.	Principe.....	89
II.4.1.2.	Classes de composés séparés et autres grandeurs	92
II.4.1.3.	Domaine de perméation	96
II.4.1.4.	Traitement des données	99
II.4.1.5.	Etude du fractionnement chromatographique de la SEC-mDEC.....	100
II.4.1.6.	Etalonnage de l’appareil.....	109
II.4.1.7.	Efficacité de l’oxydation des composés azotés et carbonés	110
II.4.1.1.	Extraction des fractions.....	111
II.4.2.	Fluorescence 3D.....	112
II.4.2.1.	Principe de la méthode	112
II.4.2.2.	Fluorophores d’intérêt	113
II.4.2.3.	Etalonnage de la mesure de fluorescence	117
II.4.2.4.	Diffusions de Raman, Rayleigh.....	118
II.4.2.5.	Facteurs influençant le signal de fluorescence	119
II.4.2.6.	Acquisition des spectres de fluorescence	121
II.5.	Conclusion	122

Chapitre III - Application de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection à la caractérisation de la matière organique dissoute dans les eaux estuariennes 124

III.1. Contexte	126
III.2. Observations préalables à l'adaptation de la méthode	127
III.3. Application de la SEC-mDEC à la caractérisation de la MOD dans les eaux estuariennes et marines.....	130
III.4. Expérimentations supplémentaires.....	146
III.5. Conclusion	147

Chapitre IV – Spéciation de la matière organique dissoute en milieu estuarien : cas de l'estuaire de l'Aulne 150

IV.1. Introduction.....	152
IV.2. Description générale de l'estuaire de l'Aulne	153
IV.2.1. Débit fluvial et temps de résidence des eaux douces	153
IV.2.2. Concentrations en carbone organique particulaire et rapports C/N de la MOP	154
IV.2.3. Carbone organique dissous.....	157
IV.2.4. Evolution de l'absorbance UV spécifique à 254nm (SUVA) de la MOD	162
IV.3. Variabilité saisonnière des différentes fractions de la MOD obtenues par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection	164
IV.3.1. Composition de la MOD en pourcentages	164
IV.3.2. Variations des concentrations des différentes fractions le long du gradient halin	168
IV.3.2.1. Substances Humiques	168
IV.3.2.2. Carbone Organique Hydrophobe	170
IV.3.2.3. Molécules de petits poids moléculaires neutres.....	172
IV.3.2.4. Building-Blocks	174
IV.3.2.5. Biopolymères.....	176
IV.3.2.6. Molécules de petits poids moléculaires acides	178
IV.4. Discussion	180
IV.4.1. Impact de la rivière sur les variations saisonnières des concentrations des différentes fractions	180

IV.4.1.1. Apports allochtones	180
IV.4.1.2. Apports autochtones.....	181
IV.4.1.3. Maxima de concentrations mesurés en Novembre	182
IV.4.2. Caractérisation des sources de la MOD dans l'estuaire à l'aide de la fraction des SH .	183
IV.4.2.1. Aromaticité des SH	184
IV.4.2.2. Rapport C/N des SH.....	186
IV.4.2.3. Indices de fluorescence des SH	187
IV.4.3. Influence de l'activité biologique	189
IV.4.3.1. Fraction des BP.....	190
IV.4.3.2. Fraction des SH.....	193
IV.4.4. Anomalies en COD par rapport au mélange théorique : rôle de la MTZ.....	196
IV.4.4.1. Anomalies de concentrations du COD et des différentes fractions de taille	196
IV.4.4.2. Rôle de la zone de turbidité maximale.....	198
IV.4.4.3. Anomalie positive d'Octobre 2018.....	199
IV.4.5. Quantification par la fluorescence.....	200
IV.5. Conclusion	204

Chapitre V – Dynamique de la matière organique dissoute en milieu côtier : cas de la rade de Brest..... 208

V.1. Introduction.....	210
V.2. Résultats.....	211
V.2.1. Variations des paramètres physico-biogéochimiques	213
V.2.1.1. Paramètres météorologiques et hydrologiques.....	213
V.2.1.2. Température	214
V.2.1.3. Salinité.....	215
V.2.1.7. Chlorophylle a	221
V.2.1.8. Rapport chlorophylle <i>a</i> / phaeopigment	222
V.2.1.9. Carbone organique particulaire	223
V.2.1.10. Rapport C/N de la MOP	225
V.2.1.11. Evolution du rapport COP/Chl <i>a</i>	225
V.2.1.12. Comparaison entre les années 2017 et 2018.....	227
V.2.2. Variabilité du COD et des fractions de la MOD séparées par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection.....	229
V.2.2.1. Carbone organique dissous	229
V.2.2.2. Biopolymères.....	230

V.2.2.3. Substances Humiques	231
V.2.2.4. Building-Blocks	233
V.2.2.5. Molécules de petits poids moléculaires neutres.....	234
V.2.2.6. Molécules de petits poids moléculaires acides	235
V.2.2.7. Carbone organique hydrophobe	235
V.3. Discussion	236
V.3.1. Excrétion de MOD par les microalgues.....	236
V.3.2. Production de BP par dégradation bactérienne de la MOP.....	238
V.3.3. Production autochtone de LMWN	240
V.3.4. Production autochtone de SH et de BB	243
V.3.5. Mise en évidence de descripteurs de l'activité biologique	244
V.4. Conclusion	248
Conclusion et Perspectives	252
Conclusion.....	254
Perspectives	259
Axe analytique	259
Installation d'autres détecteurs	259
Dosage par la fluorescence	259
Utilisation d'une technique électrochimique	260
Séparation sur les colonnes d'exclusion stérique	260
Axe environnemental	261
Détermination du contenu de la fraction du carbone organique hydrophobe (COH).....	261
Analyse de la MOP	261
Approfondir le lien entre MOD et microorganismes	262
Application de la méthode à d'autres environnements : eaux souterraines.....	262
Références bibliographiques	264
Publications et Communications scientifiques	290

Liste des tableaux et des équations

Chapitre II

Tableau II-1. Détails de l'analyse des paramètres physico-chimiques analysées par SOMLIT et utilisés dans ce travail. La référence utilisée pour la mise en place de ces analyses est Aminot et Kérouel, 2004. -----	88
Tableau II-2. Tableau type brut des résultats d'analyse par SEC-mDEC -----	100
Tableau II-3. Signification des acronymes des standards de l'IHSS et leurs temps de rétention maximum mesurés par SEC-mDEC et présentés sur la figure II.16. -----	103
Tableau II-4. Temps de rétention maximum de la fraction des SH d'échantillons naturels mesurés par SEC-mDEC et présentés sur la figure II.16. -----	103
Tableau II-5. Composants fluorescents majeurs de la MOD et leurs nomenclatures (Coble, 1996 ; Hudson et al., 2007 ; Parlanti et al., 2000)-----	114

Chapitre IV

Tableau IV-1. Récapitulatif des paramètres hydrologiques de l'estuaire de l'Aulne lors de chaque campagne	153
Tableau IV-2. Ordres de grandeur des concentrations en COD d'autres estuaires pour les extrêmes de salinité (salinité 0 (S = 0) et salinité 35 (S=35)-----	158
Tableau IV-3. Composition de la MOD (%) dans différentes études utilisant la SEC-mDEC-----	166
Tableau IV-4. Participation de chaque fraction dans les anomalies en COD (en %) -----	198
Équation IV-1. calcul du temps de résidence des eaux dans l'estuaire de l'Aulne _____	153

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1: Processus majeurs affectant les sources et les flux de MOD dans les estuaires.....	36
Figure I.2 : Réservoirs majeurs du cycle du carbone. Modifié à partir de Richey, 2004; Bianchi et al., 2011 ; Bauer et al., 2013)	37
Figure I.3 : Estimation des flux de carbone dans l'océan en Gt.C.an ⁻¹ . Les lignes en pointillées indiquent le COD, les lignes pleines indiquent le COP. Tous les flux sont considérés à l'équilibre. Extrait et adapté de Carlson et Hansell, 2015.....	39
Figure I.4 : (a) Distribution verticale des fractions de COD définies selon leurs réactivités. (b) Estimation des concentrations en COD et des taux d'export des différentes fractions de MOD dans des eaux stratifiées oligotrophiques. (Hansell et Carlson, 2015).	40
Figure I.5 : Représentation schématique du concept de circulation verticale de la MOD dans les sols et de ses transformations. Extrait de Kaiser et Kalbitz (2012).	44
Figure I.6 : Schéma conceptuel du cycle de la MOD dans les sédiments, proposé par Burdige et Komada, 2015..Les termes <i>fast</i> (rapide) et <i>slow</i> (lent) sont utilisés au sens relatif pour indiquer que le renouvellement de certaines fractions intervient plus rapidement que pour d'autres.....	46
Figure I.7 : Diagrammes de mélange en milieu estuarien. (A) Diagramme de mélange dans le cas où les concentrations de l'élément sont plus élevées dans les eaux fluviales que dans les eaux marines et (B) diagramme de mélange lorsque les concentrations de l'élément sont plus importantes dans les eaux marines que dans les eaux fluviales.	49
Figure I.8 : Interactions globales entre le rayonnement UV, la MOD et les hétérotrophes dans les estuaires. Les structures de haut poids moléculaires sont oxydées sous formes de composés plus petits et réactifs, utilisables par les hétérotrophes. CDOM : matière organique dissoute chromophorique. Extrait de Bauer et Bianchi, 2012.....	53
Figure I.9 : Flux de COD à travers les différents compartiments centrés autour des estuaires. Les flux sont considérés pour une année. La production nette de l'écosystème est le résultat de l'équilibre entre la production primaire et la respiration des microorganismes. Figure adaptée à partir de Bauer et al., 2013 et Bauer et Bianchi, 2012.	55
Figure I.10 : Structures chimiques des résines (a) XAD et DAX, (b) C18, (c) DEAE et (d) PVP.....	58
Figure I.11 : Diagramme de Krevelen avec les principales régions marquant les compositions élémentaires de composés moléculaires de la MOD. (Kim et al., 2003).....	60
Figure I.12: Ordre de grandeur des $\delta^{13}\text{C}$ selon la source de MO. Extrait de Kracht 2001.	61
Figure I.13 : Exemple de diagramme de l'isotopie stable du carbone et de l'azote de différents groupes de producteurs primaires. SPOM : matière organique particulaire de sol. D'après Dubois et al., (2012).	62
Figure I.14 : Pyrogramme GC-MS de substances humiques extraits de marécages. Chaque pic identifié par un numéro correspond à une structure chimique connue. Extrait de Lu et al., 2000.	63
Figure I.15 : Analyses par FT-ICR-MS de quatre fractions séparées par chromatographie en phase liquide. Chaque point représente une structure contenant des atomes C, H et O. Au total cela représente entre 400 et 900 structures par fraction chromatographique. Extrait de Koch et al., 2008.....	64

Figure I.16 : Spectres UV-visible typiques de l'eau de mer. Extrait et adapté de Olivier Thomas et al., UV-Visible Spectrophotometry of Water et Wastewater, 2017.	65
Figure I.17 : Spectres FT-IR du standard international <i>Suwanee River Fulvic Acid</i> et de plusieurs fractions de MOD isolées de la Seine. (Band 1 : liaison O – H ; Bandes 2, 6 et 7 : groupes azotés ; bandes 3 et 8 : chaînes aliphatiques ; bandes 4 et 5 : groupes carboxyliques ; bande 9 : liaison C – O ; Bande 10 : groupes sulfurés). De Pernet-Coudrier et al., 2008.	66
Figure I.18 : Matrice 3D de fluorescence d'une eau de mer (rade de Brest). Les principales zones identifiées par Coble et al. (1996) sont représentées en noir.	67
Figure I.19 : (a) Spectre RMN HMBC d'un acide humique (¹³ C en ordonnées et ¹ H en abscisses).. Extrait de DiDonato & Hatcher (2017).	68
Figure I.20 : Voltampérogramme d'un échantillon de mer contenant des composés de type glutathione (GSH-like), de type thioactémide (TA-like) et de type acides fulviques (FA-like) (Marie L., 2016).....	70
Figure I.21 : courbes de titration potentiométriques d'acide humique (LRHA – <i>Laurentian River Humic Acid</i>) et d'acide fulvique (LFRA – <i>Laurentian River Fulvic Acid</i>).....	71

Chapitre II

Figure II.1: Carte du système estuaire de l'Aulne - rade de Brest. L'encadré présente l'aire de répartition du bassin versant de la rivière de l'Aulne.....	76
Figure II.2 : Evolution des concentrations en (a) chlorophylle <i>a</i> (<i>Chla</i>), (b) du ratio <i>Chla</i> /phaeophytine et (c) des matières en suspension (SPM) le long du gradient salé de l'Aulne de Décembre 2013 à Décembre 2014.	79
Figure II.3 : Diagrammes de mélange mensuels du Carbone Organique Particulaire (COP) dans l'estuaire de l'Aulne en 2014. L'échelle des concentrations en COP est trois fois plus élevée pour les mois de Juillet et Août.....	78
Figure II.4 : Modélisation de la salinité des eaux de surface de la rade de Brest à pleine et basse mer durant un événement de crue (Janvier 2015), réalisée à partir du modèle MARS3D (Ifremer) en configuration MARC sur Python®. La résolution horizontale est de 50 m et la résolution verticale est de 30 niveaux sigma.	81
Figure II.5 : Succession annuelle des efflorescences phytoplanctoniques dans la rade de Brest de 2008 à 2017, suivies par la mesure des concentrations en chlorophylle <i>a</i> (<i>Chla</i>). Les maxima de chaque année sont mesurés entre les mois de Mars et Mai. (Données du Service d'Observation du Milieu Littoral).....	82
Figure II.6 : Représentation schématique des fronts thermiques de la mer d'Iroise. Le front interne de l'Iroise, le plus à l'est et le front d'Ouessant avec sa zone de balancement en pointillés (Extrait et adapté de Morin et al., 1993).....	83
Figure II.7 : En rouge, exemple de stations de prélèvements d'une campagne en estuaire. En bleu, point de prélèvement du suivi hebdomadaire des eaux de la rade de Best	85
Figure II.8 : Hydrologie de l'Aulne en 2017 et 2018. Les sept campagnes et les coefficients de marées correspondants sont indiquées par un encadré rouge directement sur la courbe de l'évolution du débit en m ³ .s ⁻¹	86
Figure II.9: Schéma conceptuel de la SEC-mDEC. D'après Huber et al. 2011.....	91
Figure II.10 : Chromatogrammes de carbone, d'UV et d'azote d'un échantillon de la rivière de l'Aulne.	93
Figure II.11 : Continuum d'humification tel que proposé par le diagramme des SH dans Huber et al., 2011.	95

Figure II.12 : (a) Domaine de perméation du constructeur des colonnes d'exclusion stérique utilisées dans l'appareillage de la SEC-mDEC.; (b) Structure de la résine d'exclusion stérique selon le fabricant des colonnes. (Extraits du site du constructeur: Toyopearl®)	97
Figure II.13 : Domaines de perméation (a) réalisé lors de cette thèse ; et (b) tracé à partir des données de <i>Huber et al., 2011</i>	98
Figure II.14 : Placement des bornes permettant de résoudre les fractions de la MOD séparées par SEC-mDEC lors de l'intégration.....	99
Figure II.15: chromatogrammes de carbone superposés d'une protéine (BSA), de l'amidon et d'une eau de mer naturelle.....	101
Figure II.16 : Chromatogrammes de carbone de huit standards internationaux de substances humiques superposés à un chromatogramme d'eau de mer naturelle (Aulne et d'eau douce naturelle. L'encadré rappelle les temps de rétention des maximums de chaque pic de la fraction des SH.	104
Figure II.17: Pourcentage de carbone organique déterminé dans les standards internationaux de SH en fonction de l'aromaticité des SH déterminée par SEC-mDEC. Les données de pourcentage proviennent du site officiel de l' <i>International Humic Substances Society</i> et sont fournies par Thorn et al, (1989).	105
Figure II.18 : Diagramme des SH construits à partir de huit standards internationaux (points rouges) et deux échantillons expérimentaux (points verts).	106
Figure II.19 : Du haut vers le bas : chromatogrammes de carbone (noir) et d'azote (vert) de la riboflavine, du tryptophane, de l'acide urique et de l'urée. Les masses molaires et la structure de chaque substance sont rappelées.....	108
Figure II.20 : Validation de la mesure d'azote organique du détecteur d'azote de la SEC-mDEC	110
Figure II.21 : Position du robinet d'extraction des fractions	112
Figure II.22: Matrice d'un échantillon estuarien (Aulne – salinité 0) . Les localisations spectrales théoriques des fluorophores de la MOD sont marquées (Coble et al., 1996).	115
Figure II.23 : Etalonnage de la mesure de fluorescence de : (a) la bande de fluorescence A/ α' et (b) de la bande B/ δ . Plusieurs standards ont été utilisés (SRFA: Suwanee River Fulvic Acid ; SRHA : Suwanee River Humic Acid ; BSA : Bovine Serum Albumine).	118

Chapitre III

Figure III.1: Chromatogrammes de carbone (en noir) et d'UV (en bleu) superposés d'un gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne. Salinité 0 = S0, salinité 4 = S4, etc. Les temps de rétention maximum des BP et des BB n'évoluant pas, ils sont marqués d'une simple ligne. Les temps de rétention maximum des SH et des LMWA semblent évoluer avec la salinité, les maxima de S0 et S35 sont indiqués pour visualiser leur écart (ΔTr). La potentielle interférence du sel dans le domaine des LMWN est délimitée par une zone appelée « massif des 90min).	128
Figure III.2: Chromatogrammes d'azote superposés d'un gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne. Salinité 0 = S0, salinité 4 = S4, etc.	130
Figure III.1.3 : Chromatogrammes de carbone superposés du standard SRFA à cinq salinités	146

Chapitre IV

Figure IV.1 : Variations du COP le long du gradient salé de l'Aulne.	155
Figure IV.2 : Variations du rapport C/N particulaire le long du gradient de salinité de l'Aulne. Les bornes des rapports C/N de la MOP des bactéries, du phytoplancton et des particules terrigènes sont rappelées en pointillés.	156
Figure IV.3 : Diagrammes de distribution en quartile des concentrations en COD en fonction de la salinité dans l'estuaire de l'Aulne. Les concentrations de chaque campagne sont représentées en couleur.	159
Figure IV.4 : Diagrammes de mélange du carbone organique dissous pour les sept campagnes de prélèvements. Les droites de mélange conservatif sont indiquées en pointillés.	160
Figure IV.5 : Diagrammes de mélange du carbone organique total (COT), du carbone organique dissous (COD) et du carbone organique particulaire (COP) pour les sept campagnes de prélèvement.	161
Figure IV.6 : Evolution de l'absorbance spécifique à 254nm le long de l'estuaire de l'Aulne pour l'ensemble des campagnes de prélèvement. Les mélanges conservatifs sont tracés en pointillés. Les points grisés n'ont pas été comptés dans le calcul du mélange théorique.	163
Figure IV.7 : Evolution de la composition de la MOD le long du gradient salé de l'estuaire de l'Aulne, exprimée en pourcentages de chaque fraction de tailles séparées par SEC-mDEC.	165
Figure IV.8 : Diagrammes de mélanges des SH en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.	169
Figure IV.9 : Diagrammes de mélanges du COH en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.	171
Figure IV.10 : Diagrammes de mélanges des LMWN H en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.	173
Figure IV.11 : Diagrammes de mélanges des BB en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.	175
Figure IV.12 : Diagrammes de mélanges des BP en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.	177
Figure IV.13 : Diagrammes de mélanges des LMWA en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.	179
Figure IV.14 : Concentrations à S0 des différentes fractions pour chaque campagne. Les incertitudes sont comprises dans les points. Les couleurs chaudes correspondent aux saisons estivale (étiage) et automnale (crue). Les couleurs froides aux saisons hivernale et printanière.	181
Figure IV.15 : Diagrammes de mélange de l'Arm-SH. Les mélanges théoriques sont tracés en pointillés.	184
Figure IV.16 : Diagramme des SH pour les saisons hivernale (Janvier 2018), printanière (Avril 2018), estivale (Juillet 2018) et automnale (Octobre 2018).	185
Figure IV.17 : Diagramme de labilité des SH pour les saisons hivernale (Janvier 2018), printanière (Avril 2018), estivale (Juillet 2018) et automnale (Octobre 2018).	186
Figure IV.18 : Diagrammes de fluorescence des SH dans l'estuaire de l'Aulne pour quatre saisons de l'année 2018 : hiver (Janvier) ; Printemps (Avril) ; Été (Juillet) ; Automne (Octobre). BIX : Indice biologique. HIX : Indice d'humification.	189

Figure IV.19 : Evolution du rapport C/N des BP dans l'estuaire de l'Aulne pour les campagnes de Juillet et Octobre 2018. Les mélanges théoriques sont tracés en pointillés	190
Figure IV.20 : Spectres d'émission à 230nm d'excitation pour la fraction des BP et évolution de l'intensité maximale du pic à 345nm en fonction des concentrations en carbone. (Hiver : Janvier 2018 ; Printemps : Avril 2018 ; Ete :Juillet 2018 ; Automne : Octobre 2018)	192
Figure IV.21 : Spectres d'émission à 230nm d'excitation pour la fraction des SH et évolution de l'intensité maximale du pic à 450nm en fonction des concentrations en carbone. (Hiver : Janvier 2018 ; Printemps : Avril 2018 ; Ete :Juillet 2018 ; Automne : Octobre 2018)	195
Figure IV.22 : Pourcentages d'anomalies aux mélanges conservatifs des concentrations en COD et de chaque fraction de taille pour chaque campagne de prélèvement.	197
Figure IV.23 : Comparaison entre les concentrations en SH déterminées par SEC-mDEC et les concentrations en SH obtenues à partir des signaux de fluorescence en vert et bleu	201
Figure IV.24 : Comparaison des concentrations des BP obtenues par chromatographie d'exclusion stérique avec celles obtenues par fluorescence.....	203
Figure IV.25 : Schéma global des processus potentiellement identifiables sur la base de nos données.	206

Chapitre V

Figure V.1 : Paramètres hydrologiques (apport fluvial et coefficients de marée) et météorologiques (pluviométrie et rayonnement solaire quotidiens) dans la rade de Brest en 2017 et 2018.	214
Figure V.2 : Evolution de la température de l'eau dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	215
Figure V.3 : Evolution de la température dans la rade de Brest de 1999 à 2019.	215
Figure V.4 : Evolution de la salinité dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	216
Figure V.5 : Evolution de la salinité ans la rade de Brest de 1999 à 2019.	216
Figure V.6 : Evolution des concentrations en dioxygène dissous dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	217
Figure V.7 : Evolution des concentrations en oxygène dissous dans la rade de Brest de 1999 à 2019.....	217
Figure V.8 : Variations des concentrations en nitrates dans la rade de Brest en 2017 et 2018.	218
Figure V.9 : Variations des concentrations en silicates dans la rade de Brest en 2017 et 2018.	219
Figure V.10 : Evolution des concentrations en nitrates et en silicates de 1998 à 2019.....	219
Figure V.11 : Matières en suspension dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	220
Figure V.12 : Evolution des concentrations en MES de 2001 à 2019.....	221
Figure V.13 : Evolution des concentrations en chlorophylle <i>a</i> dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	221
Figure V.14 : Evolution des concentrations en chlorophylle <i>a</i> de 1998 à 2019.	222
Figure V.15 : Evolutions des rapports Chl <i>a</i> /phaeo dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	223
Figure V.16 : Evolution du rapport Chl <i>a</i> /phaeo dans la rade de Brest de 2009 à 2019.....	223
Figure V.17 : Evolution des concentrations en COP dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	224
Figure V.18 : Evolution des concentrations en COP dans la rade de Brest entre 1998 et 2019.....	224
Figure V.19 : Evolution du rapport C/N de la MOP dans la rade de Bret en 2017 et 2018.	225
Figure V.20 : Evolution du rapport COP/Chl <i>a</i> dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	226
Figure V.21 : Evolution du rapport COP/Chl <i>a</i> dans la rade de Brest entre 1998 et 2019.....	227

Figure V.22 : Evolution des concentrations en carbone organique dissous dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les zones grisées indiquent la présence d'un bloom phytoplanctonique.....	229
Figure V.23 : Evolution des concentrations en biopolymères dans la rade de Brest en 2017 et 2018. L'occurrence de bloom phytoplanctonique est marquée d'une zone verte.	230
Figure V.24 : Corrélations entre BP et Chl <i>a</i> pour 2018. La régressions linéaire est calculée pour la période de bloom phytoplanctonique correspondant aux pics de concentrations en Chl <i>a</i>	231
Figure V.25 : Evolution des concentrations en substances humiques dans la rade de Brest en 2017 et 2018. L'occurrence de bloom phytoplanctonique est marquée d'une zone colorisée.	232
Figure V.26 : Corrélations entre SH et Chl <i>a</i> pour 2018. La régressions linéaire est calculée pour la période de bloom phytoplanctonique correspondant aux pics de concentrations en Chl <i>a</i>	232
Figure V.27 : Evolution des concentrations en building-blocks en 2017 et 2018. L'occurrence de bloom phytoplanctonique est marquée d'une zone verte.	233
Figure V.28 : Corrélations entre BB et Chl <i>a</i> pour 2018. La régressions linéaire est calculée pour la période de bloom phytoplanctonique correspondant aux pics de concentrations en Chl <i>a</i>	234
Figure V.29 : Evolution des concentrations en molécules de petits poids moléculaires neutres dans la rade de Brest en 2017 et 2018. L'occurrence de bloom phytoplanctonique est marquée d'une zone grisée.	235
Figure V.30 : Evolution du carbone organique hydrophobe dans la rade de Brest en 2017 et 2018. L'occurrence de bloom phytoplanctonique est marquée d'une zone verte.	236
Figure V.31 : Evolution du SUVA dans la rade de Brest en 2017 et 2018. L'occurrence de bloom phytoplanctonique est marquée d'une zone verte.	237
Figure V.32 : Evolution des concentrations en BP superposé à celle du rapport Chl <i>a</i> / phéo. La courbe de l'évolution du rapport Chl <i>a</i> /phéo a été lissée (lissage non-paramétrique de Loess).....	238
Figure V.33 : Evolution des concentrations en Chl <i>a</i> et du nombre de bactéries dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les courbes ont été traitées selon un lissage non paramétrique de Loess.	239
Figure V.34 : Evolution des concentrations en BP et du nombre total de bactéries dans la rade de Brest en 2017 et 2018.	240
Figure V.35 : Evolution des concentrations lissées (Loess) en BP et en LMWN dans la rade de Brest en 2017 et 2018.....	241
Figure V.36 : Evolution des concentrations brutes et lissées en LMWN dans la rade de Brest en 2017 et 2018 superposées avec : a. les concentrations en chlorophylle <i>a</i> ; et b. le nombre total de bactéries.	242
Figure V.37 : Analyse par composante principale des données SOMLIT et de la MOD analysées par SEC-mDEC.	244
Figure V.38 : Analyse par composante principale des différentes familles de composés de la MOD en fonction des paramètres SOMLIT proxys de la production autotrophe et hétérotrophe.	245
Figure V.39 : Diagramme des individus de l'ACP des données SOMLIT correspondant aux activités autotrophes et hétérotrophes et de la MOD analysée par SEC-mDEC. L L	247
Figure V.40 : Schéma des différents mécanismes impliquant le phytoplancton et les bactéries dans la dynamique des fractions de taille de la MOD. Les pourcentages indiqués en bleu sont extraits de la table de corrélation de Pearson.....	249

Liste des abréviations

- ACP** : Analyse en Composantes Principales
- Arm-SH** : Aromaticité des Substances Humiques
- BB** : Building-Blocks
- BIX** : Indice Biologique
- BP** : Biopolymères
- BSA** : Albumine de Sérum Bovin
- C** : Carbone
- CDOC** : Carbone Organique Hydrophile
- CDOM** : Matière Organique Dissoute Chromophorique
- Chl *a*** : Chlorophylle *a*
- CO₂** : Dioxyde de Carbone
- COD** : Carbone Organique Dissous
- COH** : Carbone Organique Hydrophobe
- COP** : Carbone Organique Particulaire
- EEM** : Matrice d'Emission-Excitation
- ESHA** : *Elliot Soil Humic Acid*
- HIX** : Indice d'Humification
- IHSS** : *International Humic Substances Society*
- IUEM** : Institut Universitaire Européen de la Mer
- LDOC** : Carbone Organique Dissous Labile
- LDOM** : Matière Organique Dissous Labile
- LMWA** : Molécules de Petits Poids Moléculaires Acides
- LMW-DOM** : Matière Organique Dissoute de Petits Poids Moléculaires
- LMWN** : Molécules de Petits Poids Moléculaires Neutres
- MES** : Matière en Suspension
- Mn-SH** : Poids moléculaire moyen des Substances Humiques
- MO** : Matière Organique
- MOD** : Matière Organique Dissoute
- MOP** : Matière Organique Particulaire
- MTZ** : Zone de Turbidité Maximale
- NOP** : Azote Organique Particulaire

OCD : Détecteur de carbone
OND : Détecteur d'azote
Phéo : phéophytine
PLFA : *Pony Lake Fulvic Acid*
RDOC : Carbone Organique Dissous Réfractaire
RDOM : Matière Organique Dissous Réfractaire
S : Salinité
SEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique
SEC-mDEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique multi-détection
SH : Substances Humiques
SLDOC : Carbone Organique Dissous Semi-Labile
SLDOM : Matière Organique Dissous Semi-Labile
SOMLIT : Service d'Observation du Milieu LITtoral
SRDOC : Carbone Organique Dissous Semi-Réfractaire
SRFA : *Suwanee River Fulvic Acid*
SRHA : *Suwanee River Humic Acid*
SUVA : Absorbance Spécifique aux UV (254nm)
URDOC : Carbone Organique Dissous Ultra-Réfractaire
UV : Ultraviolet
UVD : Détecteur UV
 λ Em : Longueur d'onde d'Emission
 λ Ex : Longueur d'onde d'Excitation

Introduction Générale

Les estuaires et les zones côtières sont des écosystèmes clefs dans la compréhension du cycle global du carbone (Cai et al., 2011 ; Bauer et al., 2013). Ces interfaces entre milieux continental et océanique constituent moins de 10% de la surface de l'océan global (Laruelle et al., 2013), pourtant leur impact sur les flux de carbone est très important (Raymond et Bauer, 2000 ; Bianchi et al., 2011). Parmi les apports de matière continentale transitant par ces écosystèmes, la matière organique dissoute (MOD) constitue un des principaux vecteurs de carbone à l'océan. Les flux d'origine terrestre, estimés entre 0,2 et 0,4 Gt C par an, suffisent à expliquer un renouvellement de la MOD océanique en moins de trois mille ans (Del Vecchio et Blough, 2004 ; Köhler et al., 2003). Cependant, les substances terrigènes ne représentent qu'une très faible part des structures chimiques caractérisées dans le milieu océanique. Ce paradoxe est expliqué par la grande réactivité de la MOD lors de son transit dans les zones de mélange estuariennes et son séjour au niveau du plateau continental. A l'intérieur de ces écosystèmes, la MOD est susceptible d'être altérée chimiquement par de nombreux processus biologiques (e.g. dégradation bactérienne), photochimiques ou encore physiques (e.g. adsorption sur les particules). La combinaison de ces processus conditionne la qualité et la quantité de la MOD exportée effectivement vers l'océan.

Outre son importance dans le cycle du carbone, la MOD joue un rôle prépondérant dans les processus biogéochimiques (Carlson et al., 2002 ; Carlson et Hansell, 2015). Elle est constituée d'un ensemble de composés organiques structurellement variés, aux propriétés physico-chimiques hétérogènes, dont les concentrations et l'origine sont propres à chaque environnement. Du fait de cette hétérogénéité, la MOD peut être à la fois une source de nutriments pour les microorganismes et un vecteur de nombreux métaux et autres polluants organiques dissous (Hirose et al., 2007).

De nombreuses études ont été menées sur la MOD dans les estuaires et les zones côtières. Ces travaux visaient à identifier la nature et les sources de la matière organique, à mieux contraindre les différents processus d'altération de la MOD au sein du transfert terre-mer estuarien (Sholkovitz, 1976; Abril et al., 2002; Huguet et al., 2010; Markager et al., 2011; Bauer et Bianchi, 2012) ou encore à étudier le devenir de la MOD terrigène et estuarienne dans la zone côtière (Cauwet, 2002; Jahnke, 2010; Laruelle et al., 2013; Villacorte et al., 2015; Osterholz et al., 2016).

Néanmoins, le manque de techniques analytiques permettant de rendre compte de la complexité de la MOD rend les études difficiles. Deux voies sont le plus souvent privilégiées : l'analyse à caractère global comme la mesure du COD (Mantoura et Woodward, 1983) dont les résultats permettent une vision d'ensemble de la quantité de MOD dans les échantillons sans

apporter d'information sur sa composition ; et les approches spécifiques ciblant des groupes de composés ou des molécules isolées, qui ne sont pas représentatives de l'ensemble de la MOD bien qu'elles permettent une caractérisation plus fine d'une partie des substances la composant.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de déterminer la spéciation de la MOD en milieu estuarien afin d'identifier les processus environnementaux intervenant lors de son transfert du continent vers l'océan. Sa dynamique en zone côtière sera également étudiée. Il s'agira plus particulièrement :

- D'étudier le transfert terre-mer de la MOD dans l'estuaire de l'Aulne *via* les sources, les concentrations et la nature des substances la composant. Plusieurs gradients de salinité seront étudiés sur la base de périodes contrastées du cycle hydrologique de l'estuaire afin de déterminer la variabilité de la composition et de la distribution de plusieurs familles de composés.
- D'examiner l'influence du bloom phytoplanctonique printanier en zone côtière sur la composition de la MOD lors de deux cycles annuels en rade de Brest. Pour ce faire, un suivi hebdomadaire a été réalisé à une station située au niveau du goulet de la rade de Brest et sous forte influence à la fois de l'Aulne et de la Mer d'Iroise.

Une méthode d'analyse globale et semi-spécifique permettra une approche complète de la spéciation de la MOD en milieux estuarien et côtier. La chromatographie d'exclusion stérique multi-détection (SEC-mDEC) permet de séparer la MOD en six classes de tailles aux propriétés chimiques différentes tout en analysant le carbone organique dissous (COD) global de l'échantillon. Cette technique, performante dans les thématiques liées au traitement de l'eau, a été peu utilisée dans le cadre d'analyses environnementales et très peu en milieu marin. A ce jour, aucune information sur les performances de la méthode pour l'analyse des milieux à salinité variable n'existe, à notre connaissance. Un développement analytique préalable a donc été nécessaire à toute étude en milieux estuarien et côtier.

Ce travail est structuré en six chapitres :

Le premier chapitre, est un état de l'art sur la composition, les cycles biogéochimiques et les techniques d'analyse de la MOD.

Le second chapitre, décrit le cadre des études, les stratégies de prélèvements et les méthodes analytiques utilisées.

Le troisième chapitre se présente sous la forme d'une publication scientifique complétée de plusieurs remarques. Elle décrit le développement analytique de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection à l'analyse des milieux environnementaux à salinité variable. Les limites de détection et les répétabilités des différents paramètres mesurés y sont présentés.

Le quatrième chapitre concerne les résultats décrivant le suivi saisonnier de la MOD dans l'estuaire de l'Aulne. Cette étude présente pour la première fois, la distribution des différentes familles de composés séparées par SEC-mDEC dans un estuaire tempéré macrotidal dans différentes périodes du cycle hydrologique. La dynamique de ces composés a été reliée avec succès à plusieurs sources de MOD mais aussi à certains processus internes à l'estuaire de l'Aulne. Certaines des fractions de taille ont bénéficié d'une analyse complémentaire par fluorescence 3D.

Le cinquième chapitre discute du suivi hebdomadaire de la MOD qui a été mené dans la rade de Brest durant presque deux ans. L'influence du bloom phytoplanctonique et de l'activité biologique en général est démontrée. Une attention particulière a été donnée à la possibilité d'utiliser les différentes classes de composés séparées par SEC-mDEC comme « proxys » des différents stades du développement phytoplanctonique.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui rappelle les principaux résultats de ce travail et les perspectives envisagées.

Chapitre I - La matière organique dissoute dans le continuum terre-mer

I.1. Introduction

En milieu aquatique, le terme matière organique (MO) désigne l'ensemble des composés hydrocarbonés d'origine naturelle et anthropique à l'exception des organismes vivants, et des composés manufacturés (Rashid, 1985; Filella, 2009). Sa nature modifie les qualités organoleptiques des eaux (tels que la couleur, le goût ou l'odeur), détermine la spéciation et le transport des contaminants organiques (hydrocarbures polyaromatiques, HAP ou substances aromatiques polychlorés, PCB, par exemple) et inorganiques (tel que le cuivre ou le mercure), est à l'origine de composés toxiques résultant du traitement des eaux (trihalométhanes) et régule les processus photochimiques dans les eaux de surface. De plus, la MO peut être une source ou un puits de carbone atmosphérique. Dans ce contexte, l'étude de sa nature et de ses propriétés en milieu aquatique est un sujet environnemental majeur.

Les communautés océanographiques et limnologiques séparent la MO en deux fractions ; l'une particulaire (MOP) et l'autre dissoute (MOD). Cette séparation est arbitraire et consiste en une filtration sur des filtres d'une porosité de $0,45\mu\text{m}$ (Aminot et Kérouel, 2004). A l'échelle océanique, la MOP constitue un faible réservoir (3 Gigatonnes de C) au regard de l'abondance de la MOD qui constitue un réservoir de carbone quasi-équivalent à celui du carbone atmosphérique (685 Gigatonnes de C, (Bianchi, 2011). Les concentrations en MOD sont généralement exprimées en équivalent de carbone organique dissous (COD). Néanmoins, les concentrations en COD présentent de grandes variabilités spatiales selon les différents types de systèmes aquatiques (Clair et al., 1996; Kaiser et al., 2002; Aoki et al., 2004; Guéguen et al., 2006; Minor et al., 2006; Biber et al., 2012).

En milieu océanique, les concentrations en COD sont relativement faibles et varient entre 0.4 et 1 mgC.L (Hansell et al., 2009) ; elles sont plus élevées en surface et diminuent avec la profondeur. Par ailleurs, les concentrations en COD diminuent le long de la circulation thermohaline dessinant un fractionnement inter bassin entre les eaux profondes de l'Atlantique (riches en MO) et celles du Pacifiques (pauvres en MO).

Dans les eaux de rivière, les concentrations en COD sont généralement comprises entre 1 et 11 mgC.L⁻¹ (Ertel et al., 1986; Pettersson et al., 1997; Nagao et al., 2003; Chanudet et Filella, 2007) et vont dépendre principalement du climat et de l'occupation des sols du bassin versant (Dai et al., 2012; Bauer et al., 2013). L'activité anthropique est responsable d'une augmentation des concentrations en COD dans les rivières aux bassins versants agricoles

(Royer et David, 2005; Dalzell et al., 2007; Oeurng et al., 2011), pouvant aller jusqu'à une multiplication par 4 dans les rivières urbanisées (Pernet-coudrier et al., 2008; Pernet-Coudrier et al., 2011; Louis et al., 2014).

Les eaux estuariennes et côtières se situent à l'interface entre les eaux océaniques pauvres en COD et les eaux de rivières riches en COD. Dans ces écosystèmes, la concentration en COD varie selon la saison, le type et la taille du bassin versant. Dans les estuaires, les concentrations en COD ne dépassent que rarement les 10 mgC.L⁻¹ et le COD présente un comportement conservatif le long du gradient halin (Sholkovitz, 1976; Mantoura et Woodward, 1983; Aminot et al., 1990; Abril et al., 2002). Cette distribution conservative du COD résulte de l'existence de sources et de puits simultanés le long du gradient halin qui se compensent et font que la dilution l'emporte sur les processus biogéochimiques (Moran et al., 1999; Raymond et Bauer, 2000). En revanche, dans les écosystèmes côtiers la distribution du COD est non conservative entre l'embouchure de l'estuaire et l'océan ouvert. En effet, seuls 20 à 50% du COD apportés par les fleuves, les eaux souterraines et la désorption sédimentaire en estuaire échappent aux processus de photo-oxydation, de respiration bactérienne et d'enfouissement sédimentaire sur les marges continentales (Cai, 2011). Cependant, ces distributions globales de COD ne sont pas représentatives des différents composés qui constituent la MOD car celle-ci est composée d'un mélange moléculaire hautement hétérogène dont les constituants présentent de multiples structures et fonctions chimiques (Repeta et al., 2002). La majorité de ces composés organiques dissous n'ont pas encore été identifiés (Kracht, 2000; Filella, 2009).

La MOD peut également être définie selon des critères de solubilité (hydrophobicité) et de qualité (biodisponibilité). Les structures phénoliques et de doubles liaisons conjuguées augmentent le caractère hydrophobe de la matière organique. En revanche, le caractère hydrophile de la MOD est accentué par la présence de structures carbonées aliphatiques, oxydées et azotées, tels que les acides aminés, les glucides, les protéines, ou les polysaccharides.

Les eaux douces sont caractérisées par une proportion importante de composés hydrophobes, décrits le plus souvent sous le nom de « substances humiques » (SH), qui constituent en moyenne plus de la moitié de la MOD (Świetlik et al., 2004; Filella, 2009). La composition et la taille des SH sont très variables. Les SH semblent être constituées de petites molécules (100-2000 Da), dérivées de la dégradation de la lignine, s'agrégeant par liaisons hydrogènes, interactions hydrophobes et liaisons ioniques, formant ainsi des macromolécules

(Leenheer et Croué, 2003). En revanche, les eaux marines présentent des teneurs élevées en composés hydrophiles de tailles < 1000 Da (Repeta et al., 2002; Dittmar et Kattner, 2003; Penru et al., 2013). En milieu marin, la qualité de la MO est définie selon la classification de Hansell et Carlson, (2002) ; la MOD est ainsi divisée en trois fractions distinctes : la MOD labile (LDOM), la MOD semi labile (SLDOM) et la MOD réfractaire (RDOM). La notion de labilité est basée sur la capacité d'une substance organique à être utilisée par les organismes aquatiques (biodisponibilité). Ces fractions ont donc des comportements, des distributions et des temps de résidence différents. La LDOM est principalement constituée de petites molécules simples (acide aminés, sucres, lipides) et a un temps de résidence court qui peut varier des quelques minutes à quelques jours. Cette fraction n'a pas le temps de s'accumuler et elle n'est significative, en termes de concentration, que dans les eaux de surface. Pour la SLDOM, le temps de résidence est compris entre quelques mois et un an selon le type d'écosystème. Cette fraction est constituée de molécules de faible poids moléculaire ainsi que de polymères (polysaccharides, protéines) issus de la lyse cellulaire ou sécrétés par le phytoplancton. La SLDOM peut être exportée des écosystèmes côtiers vers le large, elle représente une proportion significative de la MOD en surface mais diminue le long de la colonne d'eau en raison de sa minéralisation par les bactéries hétérotrophes. Enfin, la RDOM qui par définition n'est pas dégradée par des processus microbiologiques, est constituée à la fois de grosses et des petites molécules très oxydées. La RDOM a un temps de résidence de l'ordre de cent à mille ans, elle s'accumule au cours du temps et représente de ce fait la fraction majoritaire de la MOD en milieu marin (Hansell et Carlson, 1998).

En milieu estuarien et côtier, la MOD possède à la fois des sources naturelles et anthropiques. Les sources naturelles peuvent être externes, allochtones au système (pluies, ruissellement, rivière) fournissant des composés terrigènes ; ou internes, autochtones au système (lyse cellulaire, transformation microbienne, excrétion), source de composés aquagéniques (voir figure I.1). Les composés terrigènes, proviennent des sols et ont pour origine la dégradation biotique (utilisation par les bactéries hétérotrophes) et abiotique (hydrolyse, photo-oxydation) des végétaux supérieurs ainsi que des microorganismes responsables de cette dégradation. Il s'agit principalement d'un matériel réfractaire constitué de molécules complexes et aromatiques (Hansell et Carlson, 2014) tels que les SH (McDonald et al., 2004). Les composés aquagéniques sont issus principalement de la dégradation et des excréctions des communautés phytoplanctoniques et bactériennes (Labanowski, 2004; Chen et Jaffé, 2014) ; la proportion apportée par des végétaux supérieures et des animaux aquatiques étant considérée

comme faible (Buffle et Chalmers, 1988). Les produits de l'activité biologique *in situ* sont considérés comme plus labiles du fait de la relative simplicité de leur structure et de leur faible caractère aromatique. Il est courant d'identifier des composés tels que les acides aminés ou les sucres, ou encore des macromolécules (biopolymères) comme les protéines et les TEPs (substances transparentes exopolymériques) (Panagiotopoulos et al., 2012; Villacorte et al., 2013, 2015). Néanmoins des composés ayant des caractéristiques similaires aux substances humiques peuvent aussi être produits *in situ* par l'activité biologique (Tranvik, 1993).

Aux sources naturelles, s'ajoutent les sources anthropiques par les eaux de ruissellement (lixiviats de décharges, ruissellement de chaussées) et les rejets urbains d'origine domestique, industriel et agricole, traités et non traités (Pernet-coudrier et al., 2008; Meng et al., 2013; Waeles et al., 2013). Il a été montré (Pernet-coudrier, 2008) que la MOD issue des effluents traités et plus largement d'origine urbaine, possède une nature plus hydrophile que la MOD d'origine naturelle. En effet, cette MOD présente, entre autre, un fort taux de protéines, des plus faibles teneurs en SH, une faible absorbance UV spécifique (SUVA) ainsi qu'une masse molaire moyenne plus faible.

A la diversité de ces sources s'additionne une multitude de processus biogéochimiques de transformations et de dégradations qui modifient la structure de la MOD dans les systèmes estuariens et côtiers (figure I.1). La photoxydation (Liu et al., 2010) et l'activité microbienne altèrent l'aromaticité, la taille de molécules ainsi que la qualité de la MOD (Jiao et al., 2010). Par ailleurs, d'autres processus peuvent constituer des puits pour la MOD dans ces systèmes. Ainsi, le changement de force ionique en estuaire peut entraîner une floculation massive des SH le long du gradient halin (Sholkovitz, 1976; Markager et al., 2011), les processus de fractionnement et de minéralisation bactérienne induisent l'oxydation de la MOD en CO₂ ; et les processus de coagulation-floculation et d'adsorption sur les particules entraînent un enfouissement sédimentaire de la MOD (Dittmar et Kattner, 2003).

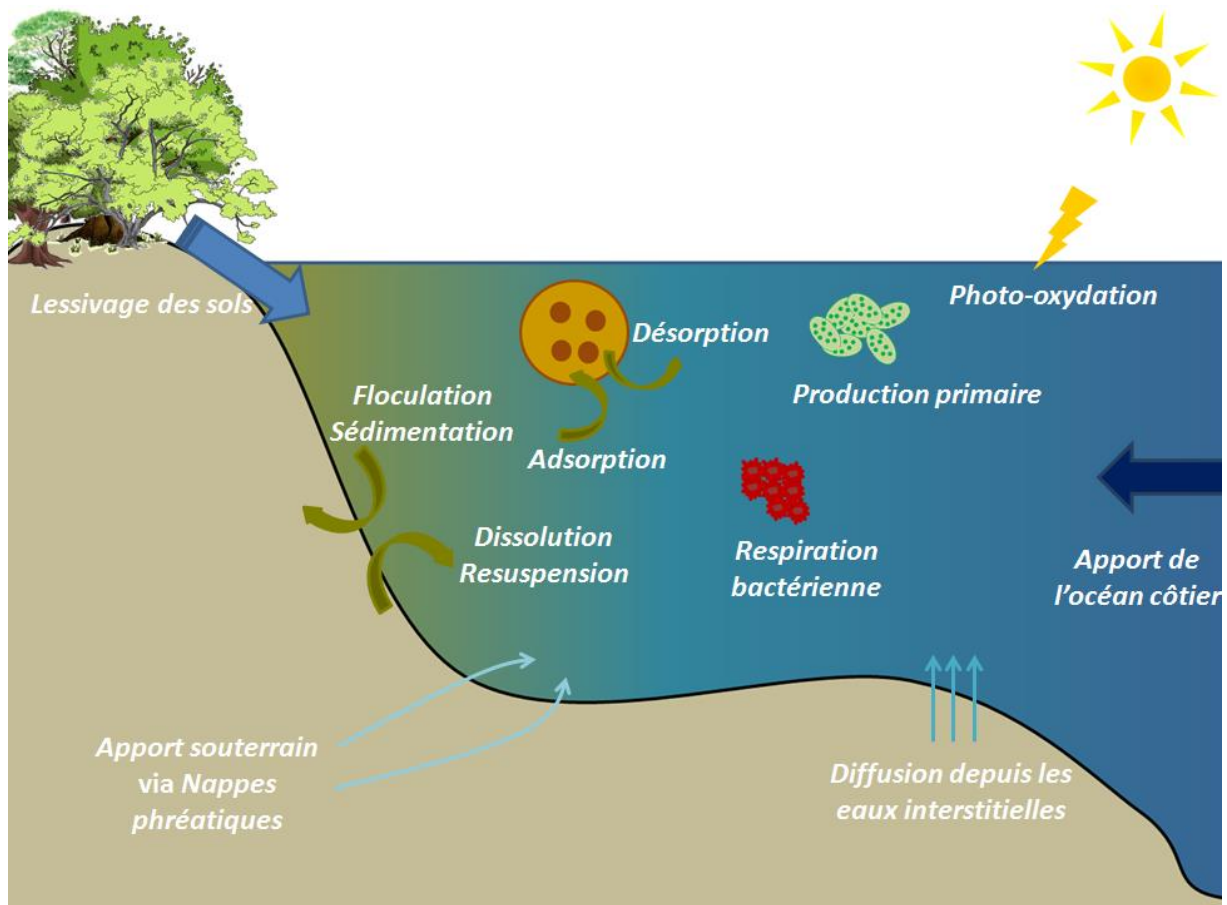


Figure I.1: Processus majeurs affectant les sources et les flux de MOD dans les estuaires

I.2. Réservoirs, sources et cycles de la matière organique dissoute

Comme indiqué précédemment, l’océan est un réservoir de MOD particulièrement important estimé à environ 685 gigatonnes de carbone (GtC) (Bianchi, 2011) (figure I.2). Chaque année, 50 GtC de MOD marine sont produits par l’activité biologique. Par comparaison, les apports allochtones à l’océan ne représentent que 1 % de cette production primaire globale océanique (Hedges, 1992; Burdige, D., 2007; Jurado et al., 2008; Bauer et Bianchi, 2012; Hansell, 2013). Les sources allochtones de MOD à l’océan sont représentées principalement par les apports fluviaux (Panagiotopoulos et al., 2012) avec un flux continental estimé entre 0,17 et 0,45 Gt.C.an⁻¹ (Cauwet, 2002; Boyd et Osburn, 2004; Cai, 2011; Dai et al., 2012; Hansell et Carlson, 2015) et par diffusion à partir du sédiment avec environ 0,28 Gt.C.an⁻¹ (Hansell et Carlson, 2015). Rien que la moyenne des apports continentaux suffirait à renouveler le réservoir de MOD océanique en seulement 2800 ans (Bauer et al., 1992; Köhler et al., 2003). Pourtant, les structures terrigènes ne représentent qu’une faible part de la MOD marine (Hedges et al., 1997; Opsahl et Benner, 1997; Opsahl et al., 2007). Ce paradoxe met en évidence des interactions beaucoup plus complexes entre les différents réservoirs du cycle du carbone (figure I.2).

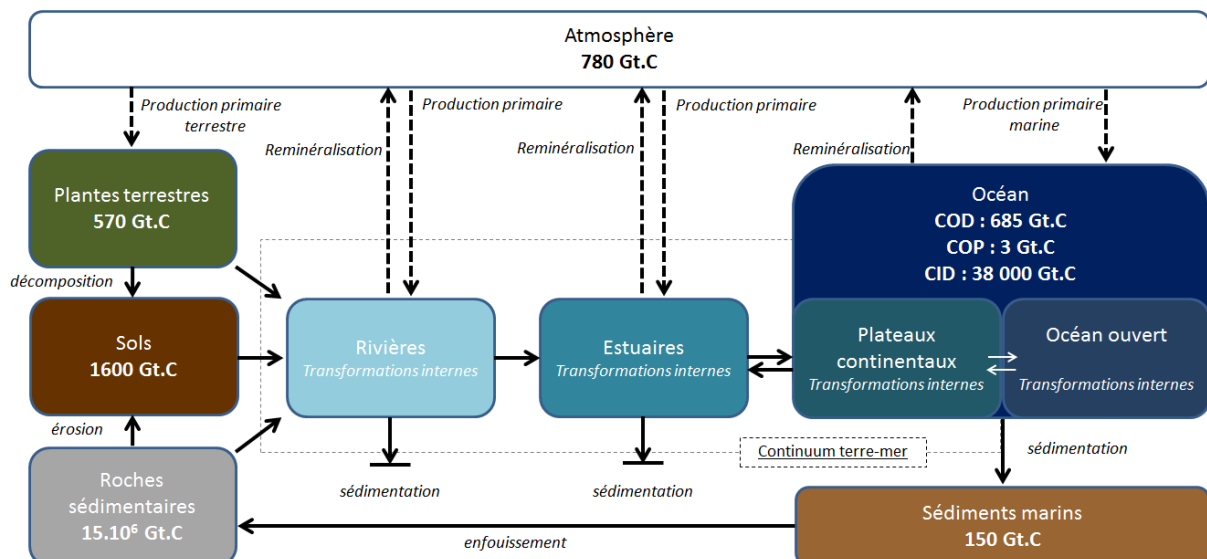


Figure I.2 : Réservoirs majeurs du cycle du carbone. Les flèches pleines indiquent les principaux transferts de matière entre les réservoirs de carbone organique. Les flèches hachurées indiquent les principaux échanges avec le réservoir atmosphérique. Les mentions « transformations internes » qui font référence aux processus *in situ* dans les réservoirs concernés (e.g. photo-oxydation, production autotrophe...). COD : carbone organique dissous ; COP : carbone organique particulaire ; CID : carbone inorganique dissous. Modifié à partir de Richey, 2004; Bianchi et al., 2011 ; Bauer et al., 2013)

Dans la suite de cette section, les principaux réservoirs de MOD sont présentés en commençant par le plus important, le réservoir océanique, avant de poursuivre avec les réservoirs continentaux (fluvial et souterrain) et le réservoir sédimentaire. Puis, l'importance des estuaires, écosystèmes clés des zones côtières, sera mise en avant pour aborder leur rôle d'interface entre ces différents réservoirs. Enfin, une explication plus détaillée des différents processus biogéochimiques majeurs régissant le cycle de la MOD dans les estuaires sera proposée pour mieux appréhender le transfert terre-mer.

I.2.1. Le réservoir océanique

La MOD océanique est considérée comme le réservoir de carbone le plus biodisponible du compartiment marin (Hansell et al., 2009; Jiao et al., 2010). Dans l'océan de surface (<200 m), l'origine de la MOD est principalement autochtone ; la MOD peut être produite par excrétion des procaryotes, par lyse cellulaire ou à partir de la matière particulaire par dégradation bactérienne (Nagata, 2000, 2008; Jiao et al., 2010). La pompe biologique de carbone fixe chaque année, *via* la photosynthèse, 53,6 Gt.C dont 21,4 Gt.C sous forme dissoute (Hansell et Carlson, 2015). Sur ces 21,4 Gt.C.an⁻¹ de COD, seulement 1,9 Gt.C.an⁻¹ est exportée à des profondeurs supérieures à 100m (figure I.3), ce qui représente un flux d'export d'environ 30% de la production annuelle nette de carbone (Hansell et al., 2009) (figure I.3). Ces différents flux sont rappelés sur la figure I.3 avec d'autres flux d'origine externe à l'océan comme l'apport fluvial de 0,36 Gt.C.an⁻¹ ou l'apport d'origine sédimentaire de 0,28 Gt.C.an⁻¹.

L'hétérogénéité des sources de MOD dans l'océan (production primaire, activité hétérotrophe, sources allochtones...) rend sa classification complexe. Cette complexité peut être simplifiée en la représentant selon un continuum de réactivité, ou de labilité, avec des temps de séjour allant de la minute aux millénaires. (Hansell, 2013). Un rappel de cette classification ainsi qu'une répartition verticale des différentes classes de composés sont présentés sur la figure I.4.

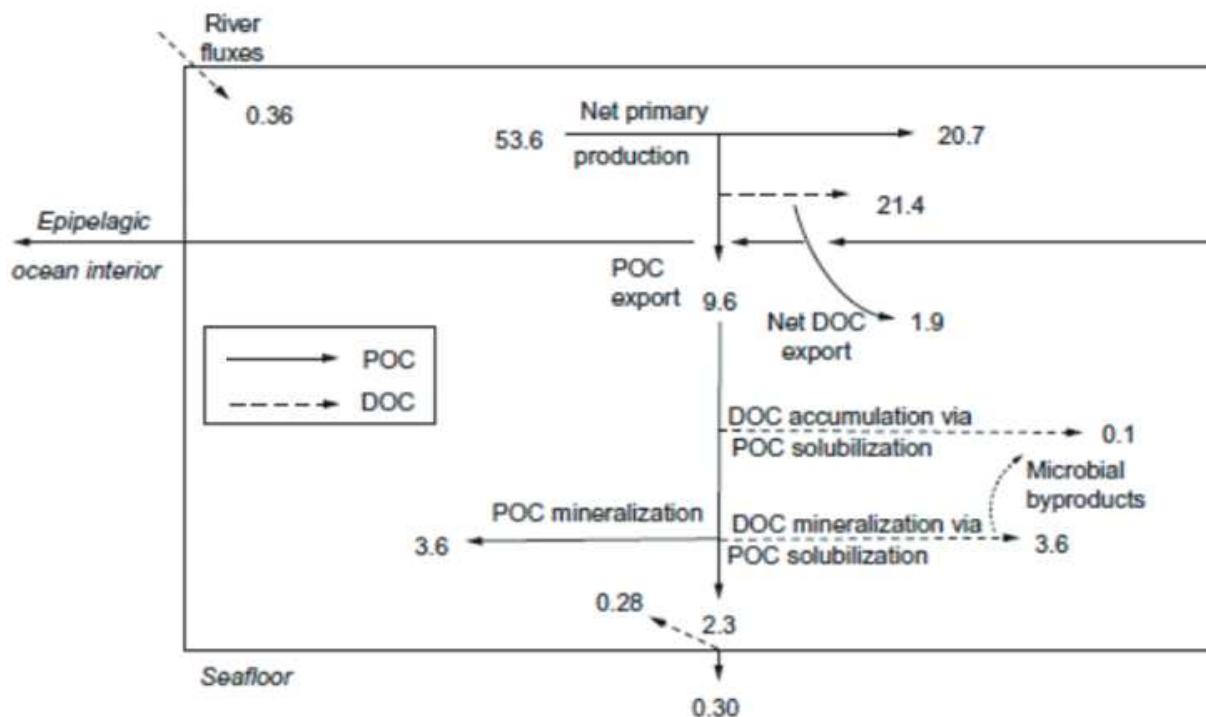


Figure I.3 : Estimation des flux de carbone dans l'océan en Gt.C.an⁻¹. Les lignes en pointillées indiquent le COD, les lignes pleines indiquent le COP. Tous les flux sont considérés à l'équilibre. Extrait et adapté de Carlson et Hansell, 2015.

La MOD dégradée sur des échelles de temps très courts (de plusieurs minutes à quelques jours) est considérée comme réactive ou labile. Cette MOD labile (LDOC) représente 0,2 Gt.C soit moins de 1% du COD contenu dans l'océan (Hansell, 2013). Les principales sources de la LDOC sont l'excrétion par les microorganismes, la lyse virale ou la consommation du phytoplancton par le zooplancton (Nagata, 2008). Entre 15 et 25 Gt.C.an⁻¹ de LDOC sont produites chaque année (Hansell, 2013). La LDOC est composée principalement de molécules de petits poids moléculaires bio-assimilables comme les monosaccharides, les acides aminés simples et les protéines (Benner, 2002). Les concentrations de ces composés sont maintenues à l'échelle du nanomolaire du fait de la demande importante des communautés bactériennes hétérotrophes dans les eaux de surface (environ 1.10^{29} cellules) ; (Fuhrman, 1987; Skoog et Benner, 1997; Carlson, 2002; Kaiser et Benner, 2009).

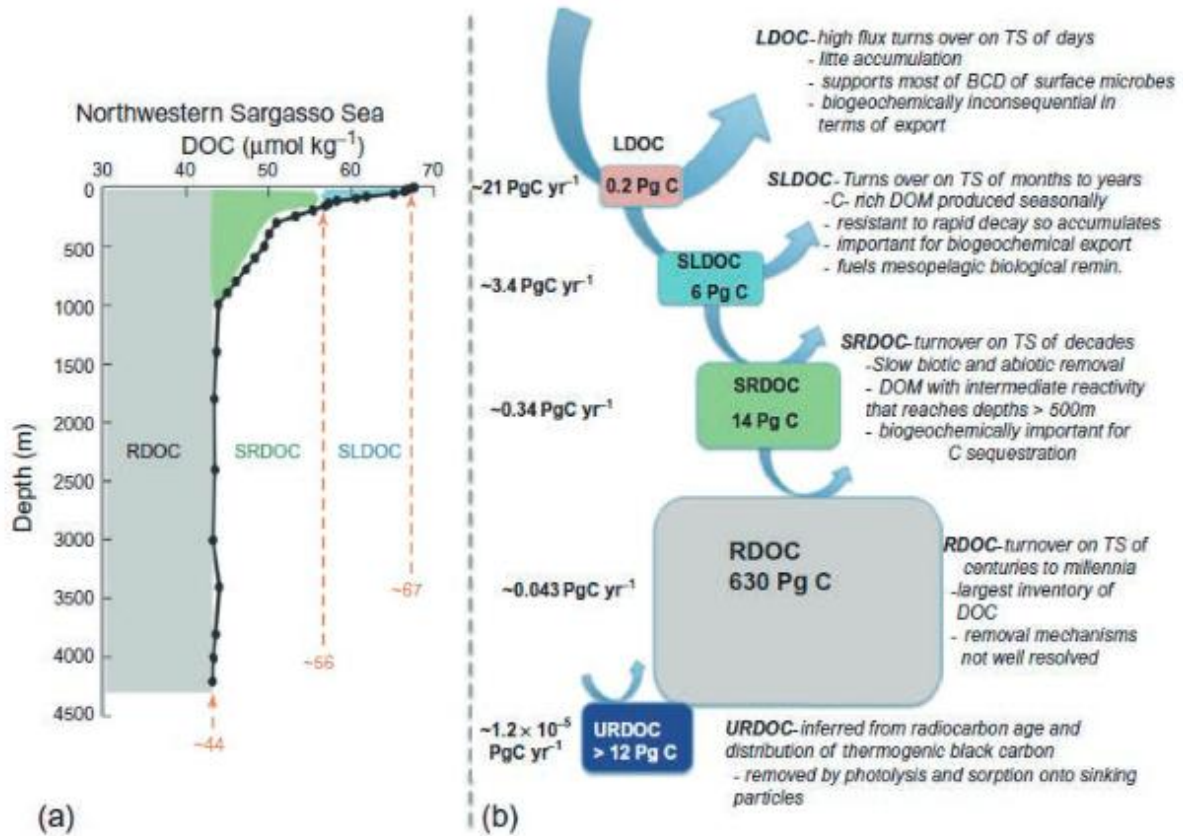


Figure I.4 : (a) Distribution verticale des fractions de COD définies selon leurs réactivités. (b) Estimation des concentrations en COD et des taux d'export des différentes fractions de MOD dans des eaux stratifiées oligotrophiques. (Hansell et Carlson, 2015). Un pentagramme de carbone est égal à une gigatonne de carbone (1Pg.C = 1Gt.C)

La MOD plus résistante à la biodégradation, avec des durées de vie supérieures aux mois mais inférieures aux siècles, est dite « semi-labile ». Récemment, cette classification a été revue afin de distinguer deux fractions : la MOD semi-labile (SLDOC) et la MOD semi-réfractaire (SRDOC) (Hansell, 2013; Hansell et Carlson, 2014). La SLDOC est produite à un taux de $3,4 \text{ Gt.C.an}^{-1}$. Elle représente une quantité de 6 Gt.C dans l'océan de surface, soit au moins 25% du COD (Carlson, 2002; Hansell, 2013). La SLDOC est composé principalement de polysaccharides mais aussi de protéines plus complexes que celles composant la LDOC (Aluwihare et al., 1997; Carlson, 2002). Ces polymères biogéniques nécessitent une hydrolyse enzymatique préalable avant de pouvoir être utilisés par les bactéries (Arnosti, 2011). La différence de temporalité entre la production/excrétion de SLDOC et sa consommation effective par les bactéries explique son accumulation dans la zone mésopélagique (100-500m) (Hansell, 2013). La SRDOC est, elle, caractérisée par des temps de séjour de l'ordre de la dizaine d'années. Son accumulation est observée dans les zones régies par des pycnoclines

permanentes. Ces zones où l'eau change brutalement de densité (pour cause de température ou de salinité) accumulent la SRDOC jusqu'à des profondeurs supérieures à 500m (Hansell et Carlson, 2015).

La MOD réfractaire (RDOC) est la principale fraction de carbone dans l'océan (630 Gt.C) (Hansell, 2013). Par définition, la RDOC ne se dégrade pas *via* les processus microbiens ou chimiques qui recyclent la MOD labile et semi-labile. Son temps de résidence est de l'ordre de la centaine aux milliers d'années (Bauer, 2002; Hansell et Carlson, 2015) et excède l'échelle de temps de la circulation thermohaline, ce qui rend sa distribution sur la colonne d'eau homogène (Benner, 2002). Les molécules de petits poids moléculaires (<1kDa) représentent une part significative de la RDOC (Amon et Benner, 1996 ; Benner et al., 2002 ; Kattner et al., 2011). Les concentrations de ces structures chimiques sont trop faibles pour être détectées par les microorganismes consommateurs (Kujawinski, 2011) ou trop coûteuses à métaboliser pour être utilisées de manière significative (Arrieta et al., 2015).

Environ 2 % de la RDOC est considérée comme inerte ou dite « ultra réfractaire » (URDOC). L'URDOC est constituée de structures hydrocarbonées provenant des hydrocarbures ou de la combustion des forêts terrestres (Hansell, 2013). Son temps de séjour en phase dissoute est estimé à environ 14 000 ans avant d'être transférée aux sédiments par adsorption sur les particules sédimentaires (Hansell et Carlson, 2014).

I.2.2. Le réservoir fluvial

A l'échelle globale, selon les études, les rivières drainent entre 0,17 et 0,45 Gt.C.an⁻¹ (Cauwet et al., 2002 ; Bauer et Bianchi, 2011 ; Cai et al., 2011 ; Dai et al., 2012 ; Boyd et al., 2013 ; Hansell et Carlson, 2015). La variabilité des précipitations et l'occurrence d'évènements particuliers comme les tempêtes permettent d'expliquer jusqu'à 30% des flux continentaux (Dai et al., 2012). Le lessivage des sols représente le principal apport de MOD terrigène aux eaux fluviales (Laraque et al., 2009; Marie et al., 2015; Lambert et al., 2016). Les concentrations en MOD terrigène dans les rivières sont contrôlées par les conditions hydrologiques de l'environnement étudié (Jaffé et al., 2008). Dans les régions soumises à des climats tempérés, le lessivage intervient lors des périodes de crues, dues aux fontes des neiges ou aux premières pluies automnales. Ce drainage est particulièrement important dans les écosystèmes de haute altitude (Landon, 2004) et dans les zones humides où le contact permanent eau-sol-plantes et

les conditions de faible oxygénation produisent de grandes quantités de MOD (Fellman et al., 2009).

Les concentrations en COD dépendent à la fois de la région étudiée, de la nature du bassin versant et de la période de l'année. Ainsi, les concentrations en COD restent faibles dans les rivières alpines, entre 0,2 et 1 mgC.L⁻¹ (Nagao et al., 2003; Chanudet et Filella, 2007). En revanche, dans les rivières équatoriales, elles fluctuent entre 3 et 11 mgC.L⁻¹ (Ertel et al., 1986) et atteignent 20 mgC.L⁻¹ dans les rivières boréales (Pettersson et al., 1997). Les zones humides (tourbières, marais...) présentent de très fortes concentrations en COD, pouvant atteindre jusqu'à 100 mgC.L⁻¹. Les bassins versants soumis aux pressions anthropiques (agricoles, urbaines) peuvent présenter des concentrations en COD jusqu'à 40 mgC.L⁻¹ (Pernet-coudrier et al., 2008; Pernet-Coudrier et al., 2011; Louis et al., 2014).

La MOD fluviale est constituée principalement de molécules provenant des sols ou de la végétation terrestre en décomposition (Thrumann, 1985). La MOD terrigène est classiquement décrite comme réfractaire à la dégradation et hydrophobe (Perdue et Ritchie ; Hedges, 1992; Bianchi, 2011). Entre 50 et 70% du COD des rivières est constitué de substances humiques (SH), macromolécules aromatiques à la structure hétérogène (Ertel et al., 1986; Blasioli et al., 2008; Tremblay et Gagné, 2009). La lignine, composé uniquement synthétisé par les plantes vasculaires, a aussi servi de traceur de l'origine continentale de la MOD (Hernes et Benner, 2006). La MOD fluviale est également riche en composés chromophoriques (i.e. caractère structurel permettant l'absorption d'une partie du rayonnement lumineux) et photosensibles, responsables de 20 à 40% de l'absorption des UV (Del Vecchio et Blough, 2004) pouvant réduire le rayonnement biodisponible aux microorganismes (Frenette et al., 2006, 2012).

La MOD fluviale n'est pas complètement terrigène. Sa composition évolue avec le temps par des phénomènes biotiques et abiotiques (Lambert et al., 2016). Une matière d'origine autochtone, plus aliphatique, peut ainsi être produite *in situ* dans les rivières par l'activité phytoplanctonique (Raymond et Hopkinson, 2003; Creed et al., 2015) ou par la transformation de la MOD terrigène par les bactéries hétérotrophes (Kellerman et al., 2015). La MOD terrigène peut aussi subir de nombreux changements causés par la photo-oxydation ou la floculation (Sholkovitz, 1976; Spencer et al., 2009; Asmala et al., 2014; Asmala et al., 2014).

Les activités anthropiques ont une forte incidence directe et indirecte sur la dynamique et la composition de la MOD dans les rivières. Les rejets anthropiques dus aux activités agricoles ou aux centres urbains représentent également une source de MOD non-négligeable aux propriétés différentes de la MOD naturelle (Griffith et Raymond, 2011). La MOD

anthropique urbaine est plus hydrophile que la MOD naturelle (Pernet-Courdrier et al., 2011) et peut provenir des rejets de station d'épuration ou des lixiviats de décharges (Abril et al., 2002; Seo et al., 2007). Les bassins versants soumis à de fortes activités agricoles sont enrichies en substances humiques (Markager et al., 2011; Waeles et al., 2013; Marie et al., 2015) mais aussi en MOD d'origine bactérienne (Wilson et Xenopoulos, 2009). De manière indirecte, les changements climatiques peuvent contribuer à une modification de l'intensité du lessivage des sols ou encore à une augmentation de l'activité bactérienne avec la température (Bauer et al., 2013).

I.2.3. Le réservoir souterrain

Les sols constituent un réservoir de 1500 Gt.C (Jobbagy et Jackson, 2000), stabilisés sur des périodes de l'ordre de la dizaine à la centaine d'année *via* l'association des molécules carbonées sur les particules minérales constitutives de ce type d'environnement. Les sols sont constitués d'une superposition de couches homogènes, appelées *horizons*, caractérisés par une épaisseur, une granulométrie et un degré d'alévation de la roche-mère. La MOD dans les horizons organiques (couches de surface riches en MO) peut provenir : (i) de la végétation par excréation directe ou par lessivage des débris végétaux en décomposition (Kuzyakov, 2010; Klotzbücher et al., 2013), (ii) de la biomasse microbienne par excréation directe ou mobilisation biotique de complexes MOD-particules (Hagedorn et al., 2004 ; Kawasaki et Benner, 2006), ou (iii) de l'épandage d'amendements organiques et de lisiers lessivés par les pluies (Plaza et al., 2004).

La nature des sols joue un rôle prépondérant dans la séquestration du carbone organique dissous. Par exemple, dans les forêts de conifères riches en humus, 20% du COD est séquestré au-dessus d'un mètre de profondeur tandis que dans les prairies, cette séquestration n'est que de 10%. (Sanderman et al., 2008). Bien que la majorité de la MOD fluviale provienne des écoulements de surface et de subsurface du bassin versant, les écoulements souterrains peuvent en apporter jusqu'à 2mg.C L⁻¹ dans certains environnements (Billett et al., 2006).

La solubilisation et le transport vertical de la MOD sont contrôlés par les conditions hydrologiques (climat), le type de sol et la topographie du bassin versant (Detty et McGuire, 2010; Jencso et McGlynn, 2011). L'évolution saisonnière du niveau de la nappe phréatique permet l'interaction entre la rivière, les zones humides (connectées la majeure partie de l'année) et les hauts de versants, (connectées quelques moins par an) (Nippgen et al., 2015; Covino,

2017). Les transferts de MOD entre les horizons organiques du haut des bassins versants et les rivières est dépendant de plusieurs facteurs comme la taille du bassin versant, la composition du sol mais aussi l'hydrologie de la rivière (Humbert et al., 2015).

La litière végétale de surface et l'horizon superficiel riche en MO sont lessivés par les eaux de pluie. Cette solution de sol riche en MOD d'origine végétale (Guggenberger et Zech, 1984; Kaiser et al., 2004) percole à travers les différents horizons du sol (Kaiser et Kalbitz, 2012). Au cours de ce transfert, les composés hydrophobes sont préférentiellement adsorbés sur les particules du sol alors que les molécules hydrophiles, comme les carbohydrates ou les composés riches en azote, restent en solution (figure I.5) (Kaiser et al., 2004; Hernes et al., 2007; Sanderman et al., 2008).

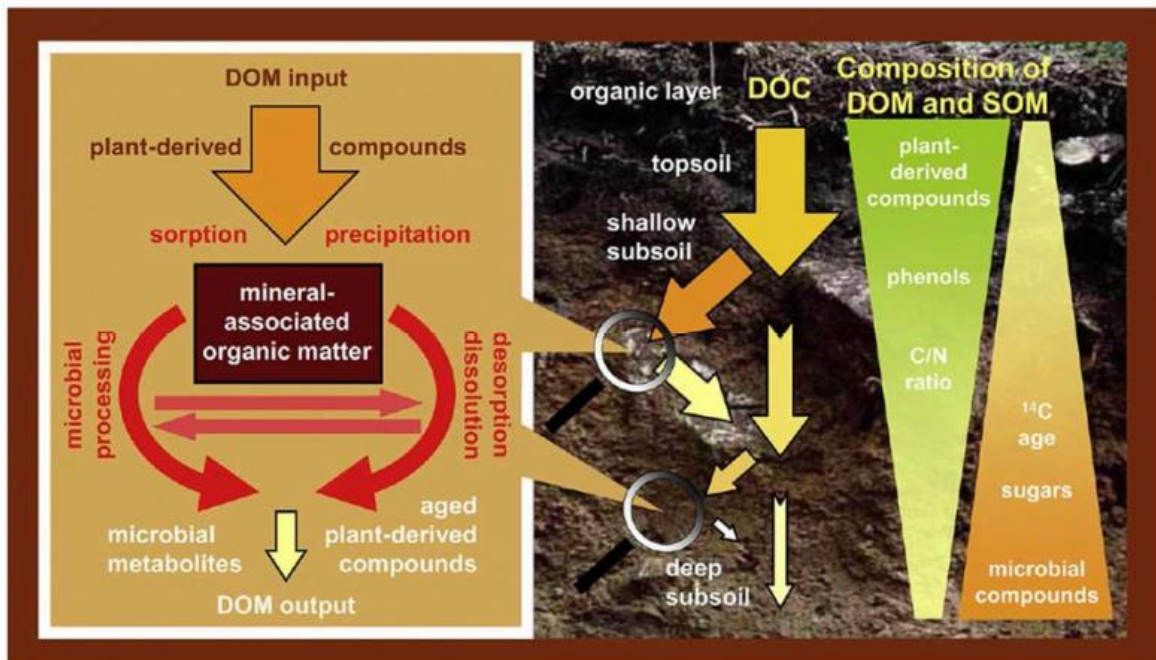


Figure I.5 : Représentation schématique du concept de circulation verticale de la MOD dans les sols et de ses transformations. Extrait de Kaiser et Kalbitz (2012).

Les concentrations en COD diminuent avec la profondeur principalement par l'effet d'adsorption de la MOD sur les particules du sol (entre 60 et 90% selon Kaiser et Zech, 1999) ; entre 40 et 70% pour Sanderman et al., 2008). Cependant, cette MOD adsorbée n'est pas réfractaire et peut subir une minéralisation ou des transformations en composés métaboliques par l'action des microorganismes (figure I.5). Ces processus augmentent le caractère autochtone de la MOD avec la profondeur (Mikutta et al., 2007; Tipping et al., 2012). L'influence de l'activité bactérienne est plus importante dans les milieux insaturés en eau où l'isolement saisonnier de la MOD augmente son temps de rétention (Kalbitz et al., 2000). Par ailleurs, ces

processus induisent la formation de composés soufrés réduits comme les thiols, les disulfides ou les thiophènes (Henen et Lauwers, 1996; Schäfer et al., 2005; Einsiedl et al., 2008; Longnecker et Kujawinski, 2011). Ces composés sont générés dans les nappes phréatiques en présence de MO sous conditions anaérobies et sont incorporées aux rivières lors des périodes d'étéage (Marie et al., 2015).

I.2.4. Le réservoir sédimentaire

Les eaux interstitielles représentent une source importante de MOD à l'océan par diffusion avec des flux de COD d'environ $0,35 \text{ Gt.C.an}^{-1}$, similaires à ceux des rivières (Burdige et Komada, 2015). La majeure partie de cette MOD est constituée de structures de hauts poids moléculaires libérées lors de la dépolymérisation de la MOP par les bactéries (Blackburn et al., 1996; Landén-Hillmeyr, 1998; Burdige et Komada, 2015). Les structures réfractaires ne représentent qu'entre 3 et 8% de ce flux de MOD (Bauer et Bianchi, 2012). Dans les eaux interstitielles du sédiment, les concentrations en COD augmentent avec la profondeur, passant de $2,4 \text{ mg.C.L}^{-1}$ en subsurface à plus de 12 mg.C.L^{-1} au-delà de quelques centimètres (Burdige et Zheng, 1998; Komada et al., 2013), mettant en évidence l'accumulation de formes réfractaires à la biodégradation (Burdige et Komada, 2015).

Le modèle conceptuel présenté par Burdige et Komada (2015) propose un continuum de taille et de réactivité basé sur la dégradation du flux de MOP venu de la colonne d'eau (figure I.6). Des composés labiles de hauts poids moléculaires, comme les protéines ou les polysaccharides, produits à partir de la dégradation de la MOP sédimentée (figure I.6-1), subissent des réactions de dépolymérisation successives *via* l'activité bactérienne. Le résultat se trouve sous la forme de monomères (figure I.6 : m-LMW-DOM) comme les acides aminés, les carbohydrates ou les acides organiques aliphatiques. (Repeta et Aluwihare, 2006).

L'augmentation du rapport C/N des eaux interstitielles avec la profondeur illustre cette utilisation préférentielle de composés labiles plus riches en azote (Burdige, 2006). Ces molécules simples peuvent être utilisées dans les processus de respiration bactériens (Repeta et Aluwihare, 2006).

A chacune des étapes de minéralisation de la MOD labile, des formes réfractaires de la MOD sont libérées sous la forme de composés de petits poids moléculaire (figure I.6-2, -3 et -4). Les interactions entre ces molécules peuvent créer des assemblages supramoléculaires de plus haut poids moléculaire (Piccolo, 2001). La lyse cellulaire est également une source

potentielle de composés réfractaires dans le sédiment (Hedges et al., 1988). L'adsorption de ces composés réfractaires sur la MOP est le principal vecteur de la séquestration de la MOD dans le sédiment (Liu et Lee, 2007) et peut expliquer l'augmentation des concentrations en carbone avec la profondeur du sédiment (Burdige et Komada, 2015).

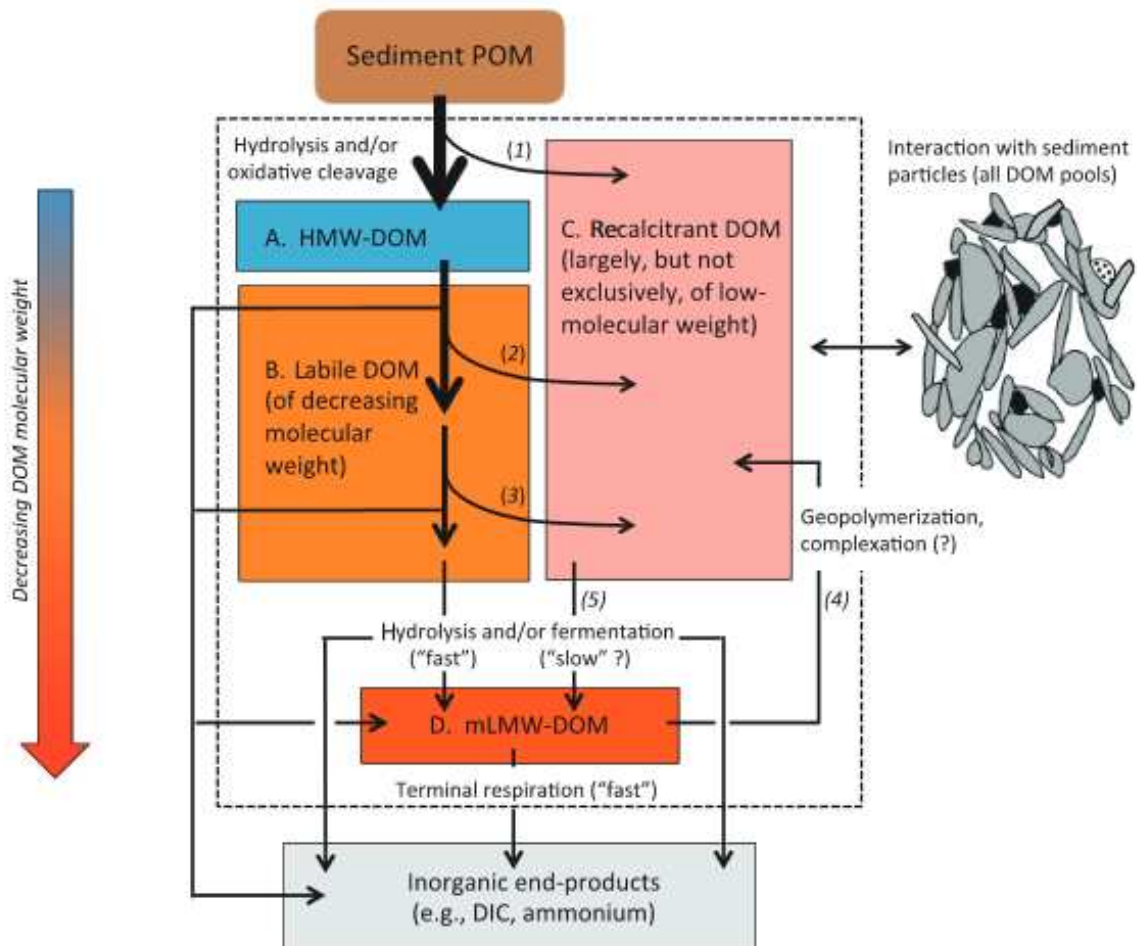


Figure I.6 : Schéma conceptuel du cycle de la MOD dans les sédiments, proposé par Burdige et Komada, 2015. Les termes *fast* (rapide) et *slow* (lent) sont utilisés au sens relatif pour indiquer que le renouvellement de certaines fractions intervient plus rapidement que pour d'autres.

I.2.5. Le réservoir estuarien

L'océan côtier est constitué d'un vaste ensemble d'écosystèmes interconnectés incluant estuaires et plateaux continentaux. (Cole et al., 2007; Cai, 2011; Bauer et al., 2013; Regnier et al., 2013). Les zones côtières représentent des interfaces entre les systèmes terrestre et océanique (Bauer et al., 2013). Leur implication dans le cycle global du carbone est

particulièrement importante. A titre d'exemple, les plateaux continentaux concentrent jusqu'à 30% de la production primaire globale et contribuent à 80% du stockage de carbone organique dans les sédiments (Jahnke, 2010) alors qu'ils ne représentent que 10% de la surface de l'océan globale (Laruelle et al., 2013).

Les apports fluviaux de MOD ont été proposés comme constitutifs de cette dynamique propre à l'océan côtier (Cauwet, 2002). Néanmoins, alors que les flux continentaux suffiraient à expliquer les temps de résidence du COD dans les océans (Bauer et al., 1992; Köhler et al., 2003), seule une faible part de la MOD océanique (0,7 – 2,4%) peut être qualifiée de terrigène (Hedges et al., 1997; Opsahl et Benner, 1997). Ce paradoxe est expliqué par le rôle central que jouent certains processus majeurs de transformation de la MOD dans les zones côtières comme l'activité bactérienne, la photo-oxydation ou l'adsorption sur la phase particulaire (Kujawinski, 2011; Bauer et Bianchi, 2012). Parmi ces écosystèmes, les estuaires forment des milieux particulièrement réactifs en termes de biogéochimie, transformant la quantité et les caractéristiques de la MOD le long du continuum terre-mer (Bauer et Bianchi, 2011; Bianchi et Bauer, 2011; Cai, 2011).

I.2.5.1. Définition d'un estuaire

Les estuaires constituent des entités hydrologiques transitoires entre des eaux fluviales douces (salinité 0) et des eaux de mer (généralement à salinité 35). Ces zones d'échanges sont caractérisées par de forts gradients physico-chimiques de salinité, mais aussi de pH et de température et par une intense productivité biologique (Renjith et al., 2013). Deux classifications sont utilisées pour caractériser les écosystèmes estuariens. D'abord, la classification géomorphologique différencie plusieurs types d'estuaires en fonction de l'importance des apports sédimentaires fluviaux et des caractéristiques hydrodynamiques du mélange des eaux. Elle permet de distinguer deltas, estuaires intérieurs, lagunes ou encore fjords (Perillo, 1995). En parallèle, une classification en fonction de la structure saline permet de distinguer les estuaires en fonction de l'intensité du mélange des eaux. Elle distingue trois types d'estuaires : les estuaires très stratifiés, partiellement stratifiés et les estuaires bien mélangés (Elliott et McLusky, 2002; Tagliapietra et al., 2009).

L'hydrologie des estuaires est régie à la fois par le débit du fleuve, en amont, et par la marée, en aval. Le débit du fleuve est contrasté de manière saisonnière selon les périodes de crue (fort débit) et d'étiage (faible débit). Les marées sont contrôlées par deux cycles : un cycle

semi-diurne de 12h15 (pleine mer/basse mer) et un cycle bimensuel de 14,5 jours (vives eaux/mortes eaux). Ces phénomènes favorisent le mélange des eaux selon les périodes de l'année. Au point d'équilibre entre ces deux flux, se trouve le point nodal, une zone de l'estuaire où va s'accumuler la matière particulaire en suspension (Brenon et Hir, 1999).

De la même manière que dans les systèmes fluviaux, les concentrations en COD dans les systèmes estuariens varient principalement selon la saison, le type d'estuaire, la taille et la nature du bassin versant. Les concentrations ne dépassent que rarement les 20 mg.C.L⁻¹ comme il a été observé dans de nombreuses études effectuées dans les estuaires d'Europe (Mantoura et Woodward, 1983; Aminot et al., 1990; Abril et al., 2002; Markager et al., 2011; Asmala et al., 2014) et d'Amérique du Nord (Benner et Opsahl, 2001; Goñi et al., 2003; McKenna, 2004; Hernes et Benner, 2006; Tremblay et Gagné, 2009). Cependant, de plus fortes concentrations peuvent être observées dans les estuaires dont le bassin versant est soumis à l'agriculture (Alberts et al., 2004; Waeles et al., 2013) ou dans les systèmes connectés à des zones humides comme les tourbières (Spencer et al., 2007; Graeber et al., 2012).

I.2.5.2. Comportement de la MOD dans les estuaires

Lors de son parcours dans les estuaires, la MOD peut être modifiée ou éliminée par de multiples processus physico-chimiques comme l'agrégation-floculation ou la photo-oxydation, et biologiques comme la dégradation bactérienne. La MOD peut également être apportée au milieu estuarien *via* la production autochtone ou par des phénomènes abiotiques tels que la désorption ou la remise en suspension de sédiments.

Afin de décrire de façon simple le comportement des composés dans la zone de mélange entre les eaux douces et les eaux marines, un outil essentiel est le diagramme de mélange (Boyle et al., 1974). Ce dernier relie la concentration du composé considéré à la salinité. Sur la figure I.7, les droites de type (a) représentent les droites de dilution théoriques du composé entre les eaux fluviales et marines. Les composés présentant ce genre de comportement de mélange sont dits « conservatifs », seul le mélange physique des eaux douces et marines modifie les concentrations et aucun processus biogéochimique n'intervient. Il peut aussi résulter de l'existence simultanée de sources et de puits qui se compensent et rendent majeur le phénomène de dilution le long du gradient salé (Moran et al., 1999; Raymond et Bauer, 2000). Dans le cas des courbes de type (b) et (c), le mélange est qualifié de non-conservatif avec, respectivement, soit un enrichissement, soit une élimination de l'élément dans la zone de mélange. Néanmoins,

ce type de diagramme ne fournit pas d'information sur les processus biogéochimiques impliqués dans ces pertes ou enrichissements.

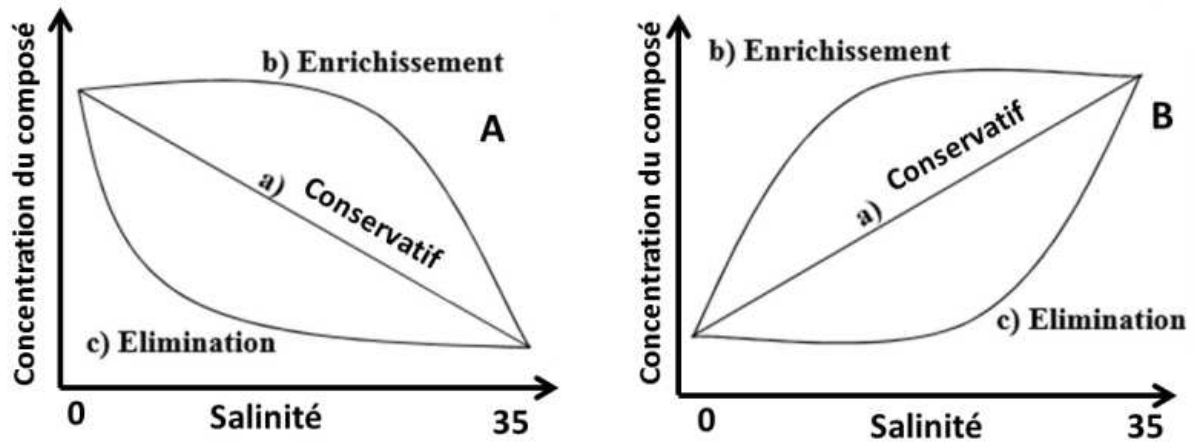


Figure I.7 : Diagrammes de mélange en milieu estuarien. (A) Diagramme de mélange dans le cas où les concentrations de l'élément sont plus élevées dans les eaux fluviales que dans les eaux marines et (B) diagramme de mélange lorsque les concentrations de l'élément sont plus importantes dans les eaux marines que dans les eaux fluviales.

Dans les estuaires, le COD (proxy de la MOD) peut présenter ces trois types de diagramme de mélange (Abril et al., 2002; Middelburg et Herman, 2007; Bauer et Bianchi, 2011). Certaines études ont démontré le comportement conservatif du COD (Mantoura et Woodward, 1983; Álvarez-Salgado et Miller, 1999; Goñi et al., 2003). Au contraire, d'autres études présentent des comportements de mélange non-conservatifs du COD avec de grands écarts de la droite de dilution qui sont imputés à différentes modifications (apports ou retraits). Par exemple, une diminution par consommation nette du COD a été observée par Abril et al. (2002) dans l'estuaire de l'Escault (Belgique). Inversement, une production de COD est visible dans l'estuaire de la Gironde (France) au niveau de la zone de maximum de turbidité (Abril et al., 2002). Une production autochtone de COD peut également être observée en période de bloom phytoplanctonique et engendrer un comportement non-conservatif le long du gradient salé (Rochelle-Newall et Fisher, 2002; McKenna, 2004). Ce genre d'anomalies positives a aussi été expliqué par des apports des nappes phréatiques directement en milieu estuarien (Swarzenski et al., 2006; Santos et al., 2008). D'autres études, comme celles menées par Spencer et al., (2007) dans l'estuaire de Tyne et Tweek (UK) et celle de Benner et Opsahl (2001) dans l'estuaire du Mississippi montrent des variations des concentrations en COD encore plus importantes. Ainsi, la perte en COD observée aux faibles salinités serait le résultat de la dégradation microbienne mais aussi de plusieurs processus abiotiques comme la dégradation photochimique, l'adsorption dans la zone de forte turbidité (point nodal) et la floculation. Les

gains observés dans les zones de plus fortes salinités seraient liés à des apports d'eaux usées citadines ou à la production phytoplanctonique.

Les principaux processus biogéochimiques impliqués dans la dynamique de la MOD le long du mélange estuarien (Bauer et Bianchi, 2012) sont présentés ci-après.

I.2.6. Principaux processus de transformation de la MOD dans les estuaires

Le transport de MOD *via* les estuaires représente une source majeure de carbone pour les océans (Bianchi, 2011). L'absence de fortes concentrations en biomarqueurs d'origine végétale dans les eaux marines démontre la transformation et/ou la consommation de la MOD terrigène dans les estuaires (Bauer et Bianchi, 2012). Lors de son passage dans les estuaires, la MOD peut (i) disparaître totalement par dégradations bactérienne ou photochimique, le flux positif de CO₂ nette des estuaires soutenant cette hypothèse (Raymond et Bauer, 2000; Richey, 2004; Cai, 2011; Bauer et al., 2013), (ii) être modifiée structurellement, ce qui pourrait expliquer la différence entre l'apport de MOD terrigène supposée transférée aux océans et la difficulté de détecter des composés d'origine terrestre en milieu marin, ou (iii) adsorbée préférentiellement sur des particules minérales ou organiques.

I.2.6.1. Influence de l'activité biologique sur la matière organique dissoute

Les microorganismes influent directement sur leur environnement à travers leurs besoins métaboliques. La membrane cellulaire est une barrière physique qui, de la même manière qu'un filtre, interagit avec son environnement pour sélectionner les substances chimiques d'intérêt. Parmi les microorganismes, se distinguent : les autotrophes, capables de synthétiser les macromolécules nécessaires à leur survie par photosynthèse, des hétérotrophes, consommateurs de matière organique.

I.2.6.1.a. Excrétion directe par le phytoplancton

Le phytoplancton constitue l'ensemble des microorganismes autotrophes, capables de subvenir à leurs besoins à partir d'une source d'énergie et de nutriments inorganiques. Sous certaines conditions, comme les stress environnementaux (température, salinité, etc.), la nature

du substrat (qualité et quantité de la MOD) ou la structure des communautés microbiennes, le phytoplancton peut excréter une partie de son contenu cellulaire *in situ* dans le milieu aquatique. Les protéines, les polysaccharides et leurs monomères composent la majeure partie de cet exsudat (Granum et al., 2002; Hansell, 2013). Néanmoins, la composition de la MOD excrétée reste peu caractérisée du fait de sa variabilité en fonction des expérimentations (Barofsky et al., 2010) et peut évoluer en fonction de la présence d'autres algues ou de la présence de bactéries (Grossart et Simon, 2007; Paul et al., 2009).

I.2.6.1.b. Influence de l'activité hétérotrophe

Les bactéries hétérotrophes et les archées représentent jusqu'à 90% de la biomasse dans les milieux aquatiques (Whitman, et al., 1998). Ces microorganismes utilisent la MOD comme source d'énergie et sont les principaux consommateurs de carbone dans les milieux aquatiques (Azam et Malfatti, 2007). Les formes labiles de la MOD sont consommées rapidement et transformées en MOP (Pomeroy et Darwin, 2007) ou reminéralisées sous la forme de nutriments et de dioxyde de carbone (Carlson et al., 2007).

L'assimilation de composés organiques par les bactéries est contrainte par la taille des molécules (Kirchman, 2012). Ainsi, au-dessus de 500 Da, les molécules biodisponibles doivent être transformées, ou « découpées », avant de pouvoir être assimilées (Amon et Benner, 1994, 1996). Pour ce faire, les bactéries produisent des enzymes spécifiques (protease, glucosidase, etc.) capables d'hydrolyser les composés de haut poids moléculaires ciblés (Azam et Malfatti, 2007; Arnosti, 2011). Les bactéries excrètent aussi d'autres types de composés organiques comme des composés sidérophores afin d'acquérir les métaux traces indispensables à leur développement (Vraspir et Butler, 2009), ou encore des molécules liées à la détection du quorum (*quorum sensing*, i.e. composés permettant à une population de bactéries de réagir en tant que colonie ; Hmelo et al., 2011).

I.2.6.1.c. Conséquences de la prédation par le zooplancton et de la lyse cellulaire

Le contenu des cellules est libéré dans les eaux environnantes autant par sénescence des microalgues (Borsheim et al., 2005 ; Maie et al., 2006) que par la rupture physique de la membrane *via* broutage par le zooplancton ou lyse cellulaire des microorganismes par infection (Middelboe et Lyck, 2002; Suttle, 2005).

Le zooplancton représente une source significative de MOD pour la colonne d'eau (Nagata et Kirchman, 1992). Il libère des composés intracellulaires par le phénomène de *sloppy feeding*, ou « nourrissage bâclé », qui consiste en une rupture partielle de la cellule par broutage (Jumars et al., 1989; Møller et al., 2007). Dans le cas des diatomées, le *sloppy feeding* entraîne la libération de 50 à 70% du COD présent dans la cellule (Møller et al., 2007). L'excrétion directe de MOD par le zooplancton représente aussi un mécanisme important de production de MOD (Kujawinski, 2011). Entre 20 et 40% de la biomasse ingérée est excrétée sous la forme de composés organiques pouvant représenter une source significative d'azote *via* l'excrétion d'urée et d'acides aminés (Nagata, 2000).

La lyse, i.e. rupture de la membrane cellulaire par un agent physique, chimique, ou biologique, peut être provoqué de plusieurs manières. La mortalité du phytoplancton provoquée par les virus représente entre 3 et 20 GtC.an⁻¹ de contenu cellulaire libéré dans le milieu (Wilhelm et Suttle, 1999). Les bactéries peuvent aussi provoquer une lyse cellulaire. Le lysat est constitué de composés labiles (acides aminés et carbohydrates, entre autre) mais aussi de composés plus récalcitrants comme des débris de membrane cellulaire (Dittmar et Kattner, 2003; Cava et al., 2011; Calleja et al., 2013; Borcier et al., 2017).

I.2.6.2. Principaux processus abiotiques impactant la MOD

I.2.6.2.a. *Photo-oxydation de la MOD*

Dans la couche de surface de la colonne d'eau, la MOD est sujette aux effets du rayonnement lumineux. La photo-oxydation agit de manière directe en détruisant les structures aromatiques de haut poids moléculaire en les transformant en molécules de plus en plus petites. La production de ces photoproduits implique une libération de structures chimiques labiles, riches en azote et en phosphore, favorisant l'activité microbienne (Moran et Zepp, 1997) (figure I.8).

La MOD chromophorique (CDOM), i.e. les structures de la MOD absorbant les ultraviolets, est particulièrement sensible à l'incidence des rayons lumineux (Del Vecchio et Blough, 2004). Ce processus analogue appelé photo-blanchiment (photobleaching), touche particulièrement les composés réfractaires dont l'abondance de structures aromatiques les rends plus sensibles aux UVs que les molécules aliphatiques (Gonsior et al., 2009).

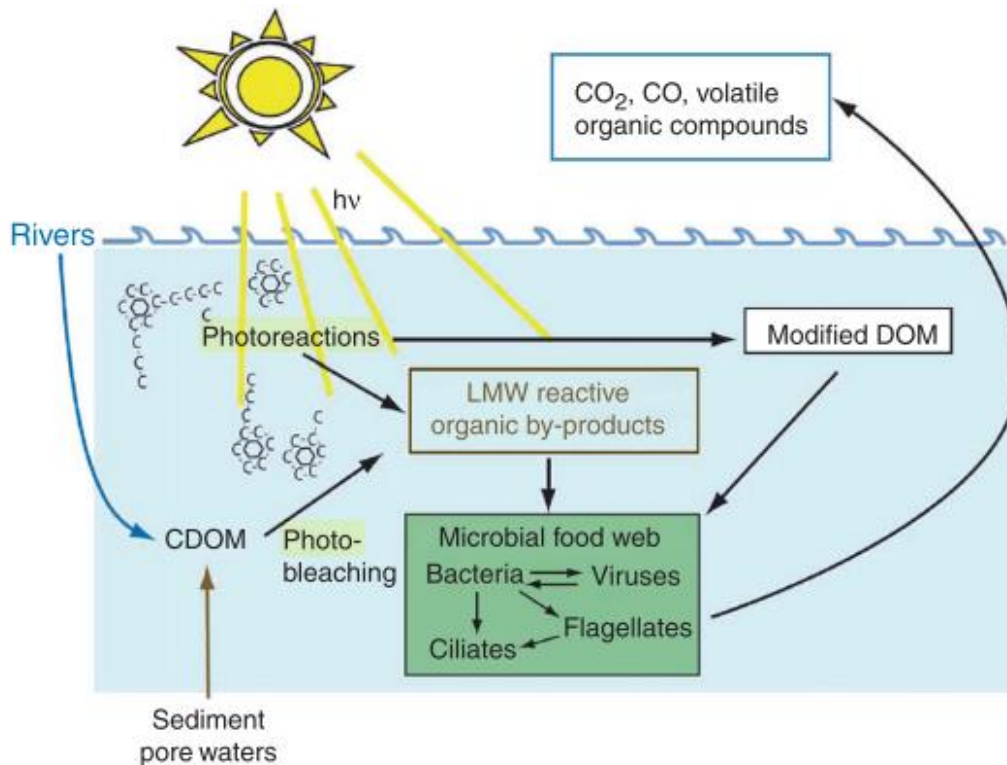


Figure I.8 : Interactions globales entre le rayonnement UV, la MOD et les hétérotrophes dans les estuaires. Les structures de haut poids moléculaires sont oxydées sous formes de composés plus petits et réactifs, utilisables par les hétérotrophes. CDOM : matière organique dissoute chromophorique. Extrait de Bauer et Bianchi, 2012.

Le photoblanchiment entraîne une diminution de la fluorescence des molécules et a été corrélé avec la production d'espèces inorganiques, surtout en amont des estuaires où les concentrations en composés aromatiques terrigènes sont les plus importantes (Minor et al., 2006). Les processus de photoblanchiment et de photooxydation n'ont pas le même impact en fonction de la nature de la MOD. En amont de l'estuaire, ils auront tendance à transformer les structures aromatiques terrigènes comme les substances humiques en composés biodisponibles de petits poids moléculaires (figure I.8). En aval, l'abondance de composés d'origine algale peut entraîner la formation de structures de plus hauts poids moléculaires apparentées aux substances humiques *via* polymérisation photocatalysée (Mopper et al., 2014).

I.2.6.2.b. Adsorption sur les particules

De nombreux facteurs physico-chimiques contrôlent les processus d'adsorption/désorption sur les particules dans les estuaires dont la nature des particules minérales, le pH, la force ionique ou la nature des structures chimiques composant la MOD (Bauer et Bianchi, 2012).

L'augmentation de la force ionique et du pH dès l'entrée des eaux fluviales dans l'estuaire impose une transformation de la phase dissoute à la phase particulaire à environ 10% de la MOD (Sholkovitz, 1976). Les acides humiques sont plus sensibles à la floculation (Marie et al., 2017). En milieu marin, les composés de hauts poids moléculaires peuvent précipiter spontanément dans la colonne d'eau sous la forme de microgels (ou *self assembled microgels*) dans le cas de changements physicochimiques brutaux (Verdugo, 2011).

Néanmoins, les échanges entre les phases particulaire et dissoute se fait aussi dans le sens de la désorption et va dépendre principalement de la nature des structures chimiques qui composent la MOD et la phase particulaire (Keil et al., 1997; Komada et Reimers, 2001; Satterberg et al., 2003). La désorption de certaines structures peut être favorisée par le rayonnement (photodissolution) *via* des changements structurels analogues à ceux qui se produisent lors de la photooxydation de la MOD (Mayer et al., 2006). Ces échanges entre phases particulaire et dissoute peuvent modifier la structure de communautés bactériennes ou du moins l'efficacité de l'hydrolyse et de la reminéralisation des composés biodisponibles comme les protéines. (Nagata et Kirchman, 1996; Borch et Kirchman, 1999; Lønborg et al., 2017)

I.2.7. Rôle de l'estuaire dans le cycle global du carbone organique dissous

Sur la figure I.9, les sources et les puits majeurs qui influencent la biogéochimie de la MOD dans les estuaires sont rappelés. Les estuaires constituent une interface entre les milieux terrigènes et océaniques. Ainsi, les rivières représentent en moyenne un flux de 0,25 Gt.C.an⁻¹ (Raymond et Spencer, 2014) de MOD terrigène. Entre 0,3 et 25% de ce flux peut être attribué à des sources souterraines (Burnett et al., 2003; Santos et al., 2008) soit *via* la rivière soit *in situ* dans l'estuaire. Un flux de MOD, similaire en magnitude, provient du sédiment estuarien principalement par diffusion des eaux interstitielles mais aussi par remise en suspension et dissolution des particules benthiques lors des variations des courants de marée (Guo et al., 1995; Mitra et al., 2000; Bauer et Bianchi, 2012). Les estuaires sont des milieux dominés par les hétérotrophes, consommateurs de MOD. Le bilan entre la production primaire brute et la respiration des microorganismes est estimée à -0,2 GtC.an⁻¹. Ceci confirme l'hypothèse que les estuaires constituent une source de CO₂ pour l'atmosphère (Bauer et al., 2013). La quantité de carbone exportée vers l'océan côtier n'est pas encore estimée avec exactitude et est souvent ramenée à la quantité de carbone drainée par les rivières. Ceci fait écho avec le consensus selon

lequel la majeure partie de la MOD terrigène serait altérée chimiquement (voir section I.2.6) lors de son transfert vers l'océan plutôt que d'être totalement oxydée sous forme de dioxyde de carbone (Bauer et al., 2013).

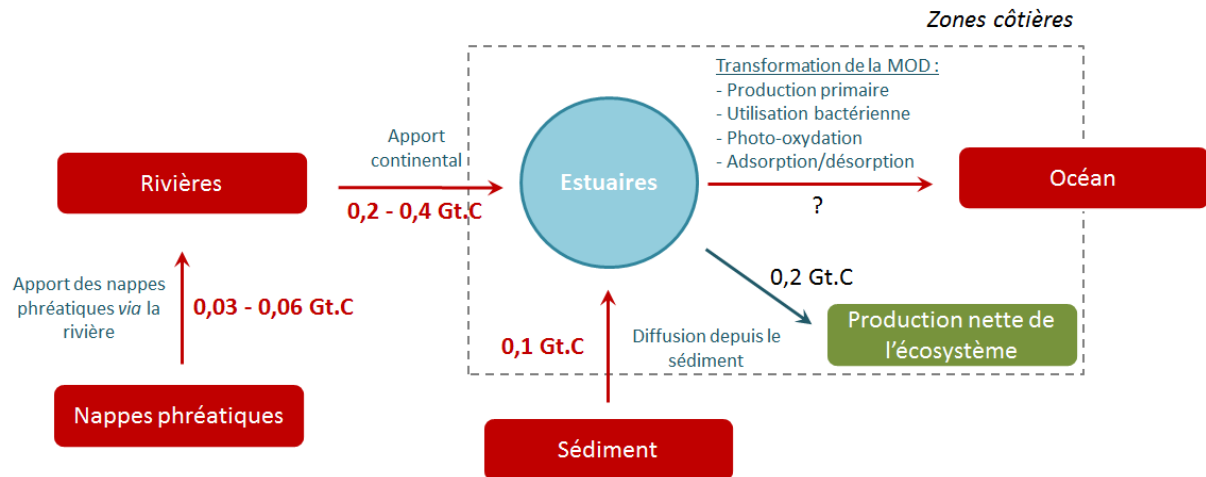


Figure I.9 : Flux de COD à travers les différents compartiments centrés autour des estuaires. Les flux sont considérés pour une année. La production nette de l'écosystème est le résultat de l'équilibre entre la production primaire et la respiration des microorganismes. Figure adaptée à partir de Bauer et al., 2013 et Bauer et Bianchi, 2012.

Cette grande variabilité de sources et de processus est à l'origine de la forte diversité structurelle de la MOD, véritable barrière analytique, qui complexifie son étude. Dans la mesure où la qualité et la quantité de la MOD sont extrêmement variables d'un système à un autre, des choix analytiques sont nécessaires lors de la mise en place d'une étude environnementale

I.3. Techniques de caractérisation de la MOD

Il n'est pas réaliste d'envisager la caractérisation de chaque composé sur la base de structures uniques à grande échelle (Croué et al., 2000). C'est pourquoi de très nombreux travaux étudient la MOD selon des critères opérationnels qui visent soit l'analyse « globale » sous la forme de COD soit l'analyse « spécifique » de classes de molécules aux propriétés similaires. L'analyse globale est représentative de l'échantillon mais ne donne pas d'information sur une structure chimique ou un groupement fonctionnel caractérisé (Sposito, 1981). A l'inverse, l'analyse spécifique offre une caractérisation fine mais sans être représentative de l'ensemble de la MOD (e.g. analyse par émission de fluorescence). Autre point déterminant, l'analyse spécifique peut nécessiter une phase de prétraitement durant laquelle les groupes ciblés sont séparés du reste de la MOD par des techniques de fractionnement (critères de taille, de charge, d'hydrophobicité) et de concentration (évaporation, lyophilisation, techniques membranaires ; Frimmel et Abbt-Braun, 1999; Peuravuori et al., 2002). Ces opérations peuvent altérer les caractéristiques des composés ciblés (Baghoth et al., 2011).

I.3.1. Techniques de séparation

I.3.1.1. Séparation selon la taille

La séparation par classes de taille a été le plus souvent réalisée par ultrafiltration (UF) et chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

L'ultrafiltration est utilisée pour extraire et caractériser la taille des molécules de la MOD de nombreux milieux aquatiques naturels comme les rivières (Guo et al., 2003), les estuaires (Huguet et al., 2009), les eaux marines (Ogura, 1974) ou encore les eaux interstitielles (Burdige et Gardner, 1998). Cependant, des phénomènes d'agglomérations peuvent conduire à une surestimation des composés à hauts poids moléculaires (Aiken et Malcolm, 1987 ; Peuravuori, 2005). Les molécules hydrophobes retenues sur les membranes sont également une source de contamination possible.

La chromatographie par exclusion stérique permet d'obtenir une répartition « continue » des molécules dans l'échantillon selon leur taille, exprimée en poids moléculaire rapporté à une

molécule modèle. La répartition des poids moléculaires moyens donne un aperçu rapide de l'hétérogénéité en taille de l'échantillon considéré (Chin et al., 1994). Les fractions peuvent être caractérisées directement après leur séparation par un détecteur en ligne comme un détecteur de carbone (Huber et al., 2011) ou de fluorescence (Shimotori, 2009). L'étude de la répartition des tailles de la MOD permet de suivre la dynamique des cycles biologiques (Villacorte et al., 2015), l'évolution de sa nature le long des transferts continent-océan (He et al., 2016) ou encore d'identifier les sources de la MOD (Rutledge et al., 2015). La SEC est idéale pour de petits volumes d'échantillons malgré que ceux-ci empêchent la récupération de grandes quantités de fractions en vue d'études ultérieures (He et al., 2003). Des effets de charge peuvent aussi interférer lors de la séparation (Zhou et al., 2000).

I.3.1.2. Séparation selon la polarité

Le fractionnement selon des caractéristiques d'hydrophobicité est basé sur le passage de la MOD sur des résines retenant de manière sélective certains composés organiques. Ces composés hydrophobes retenus sont opérationnellement définis comme substances humiques (SH). Plusieurs types de résines existent ; XAD, DEAE, PVP et C18. Elles sont détaillées ci-dessous.

Reconnue comme méthode standard pour l'isolation et le fractionnement des substances humiques (Janoš, 2003) par l'IHSS (International Humic Substances Society), la méthode d'extraction sur résines XAD est la plus utilisée. Les résines XAD sont constituées d'un substrat macroporeux non ionique (styrène – divinylbenzène ou polymères de méthacrylate de méthyle – voir figure I.10.) avec différents types de groupements greffés. Différentes résines XAD existent (XAD-1, XAD-2, XAD-3, XAD-7, XAD-8) mais seule la résine XAD-8, par son rendement d'extraction et l'efficacité de sa séparation, est fréquemment utilisée pour les substances humiques (Aiken et al., 1979; Thurman et Malcolm, 1981).

D'autres résines, plus récentes, composées de méthacrylate de polyméthyle (figure I.10.a) ont été développées. Ces résines DAX-8 possèdent des propriétés de sorption et désorption hydrophile – hydrophobe plus précises (Peuravuori et al., 2002; Labanowski, 2004) et permettent une séparation plus fine entre SH et substances non-humiques (SNH – acides aminés, sucres, polymères biogéniques). Il existe différents protocoles variant en fonction de la nature et du nombre de colonnes utilisées ainsi que du type d'élution appliquée (Leenheer, 1981 ; Aiken et Leenheer, 1993 ; Namour et Muller, 1998 ; Imai et al. 2001 ; Ma et al., 2001 ; Peuravuori et al., 2005).

Les résines C18 sont composées de chaînes alkyles hydrophobes greffées sur un gel de silice (figure I.10.b). Elles ne sont pas aussi spécifiques que la DAX-8 et concentrent aussi bien les substances humiques que les composés protéiques (Kieber et al., 2006), ce qui la rend intéressante dans le cas de l'analyse des composés chromophoriques contenus dans les eaux faiblement concentrées en MOD comme les eaux de pluie (Amador et al., 1990 ; Kieber et al., 2005).

Les résines DEAE (cellulose de diéthylaminoéthyle – figure I.10.c) présentent l'avantage par rapport aux résines XAD de ne pas soumettre la MOD à des conditions de pH acide, ce qui peut changer la structure des molécules et leur solubilité (Miles et al., 1983 ; Green et Blough, 1994 ; Peuravuori et al., 1997). Cependant, une élution complète de la MOD adsorbée semble difficile à obtenir (Peuravuori et al., 2005).

Les résines PVP (polyvinylpyrrolidone – figure I.10.d) donnent des résultats comparables aux résines XAD pour l'isolement des SH. En revanche, une disparition des composés de grande taille suite à des réarrangements lors du fractionnement rend cette méthode inadéquate (Peuravuori, et al., 2005).

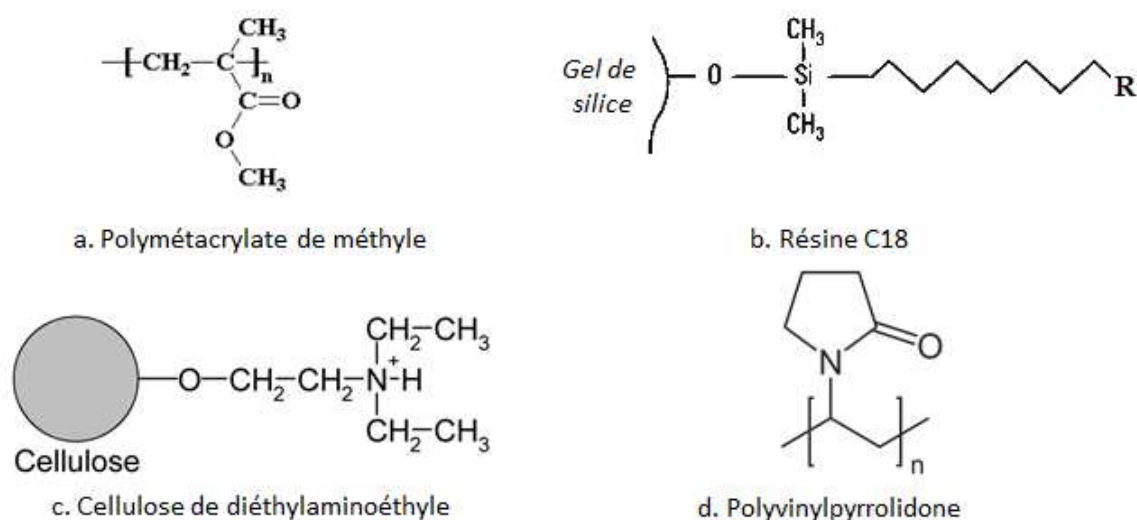


Figure I.10 : Structures chimique des résines (a) XAD et DAX, (b) C18, (c) DEAE et (d) PVP

I.3.1.3. Séparation selon la charge

La séparation des composés selon leur charge est obtenue grâce aux méthodes électrophorétiques. La migration des composés électriquement chargés en solution est obtenue par l'application d'un champ électrique entre deux électrodes. Ces techniques sont relativement sensibles puisque des acides fulviques de même origine ont pu être différenciés (Dunkellog et al., 1997). Cependant, si elles ne sont pas couplées à l'osmose inverse, ces techniques séparent également les sels inorganiques, entraînant des interférences sur les analyses suivant la séparation (Vetter et al., 2007 ; Koprivnjak et al., 2009).

I.3.2. Techniques d'analyse de la matière organique dissoute

I.3.2.1. Analyses élémentaires et isotopiques

L'analyse élémentaire de la MO permet d'obtenir sa composition relative en C, H, O, N et S (Huffman et Stuber, 1985). Cette mesure fournit des informations sur la nature saturée et polaire des composés de la MOD. La polarité des composés peut être évaluée par le ratio $(N+O)/C$ et le caractère aromatique (saturation des chaînes de carbone) par les rapports O/C et H/C . Ainsi, Ma et al. (2001) observent que le ratio H/C est de l'ordre de 1 pour les acides humiques hydrophobes et de 1.5 pour les acides humiques plus hydrophiles. De même, le rapport O/C est deux fois plus élevé pour les molécules hydrophiles que pour les substances humiques, traduisant le caractère aromatique insaturé de celles-ci. Le diagramme de Van Krevelen (figure I.11) permet en fonction des rapports H/C et O/C de retrouver des classes de composés chimiquement différents. Néanmoins, l'analyse élémentaire peut être faussée par le pourcentage de résidu lié à la méthode d'extraction de l'échantillon. Celui-ci peut représenter jusqu'à 5% dans les échantillons de substances humiques (Thurman, 1985), entraînant une sous-estimation des différents éléments.

Le rapport C/N est aussi très utilisé en océanographie. Ce ratio permet de discriminer les sources de matière organique, en particulier le matériel terrigène ($C/N > 12$) du matériel planctonique ($C/N < 10$). Il est classiquement utilisé pour déterminer l'origine de la matière organique dans les écosystèmes côtiers (Savoye et al., 2003).

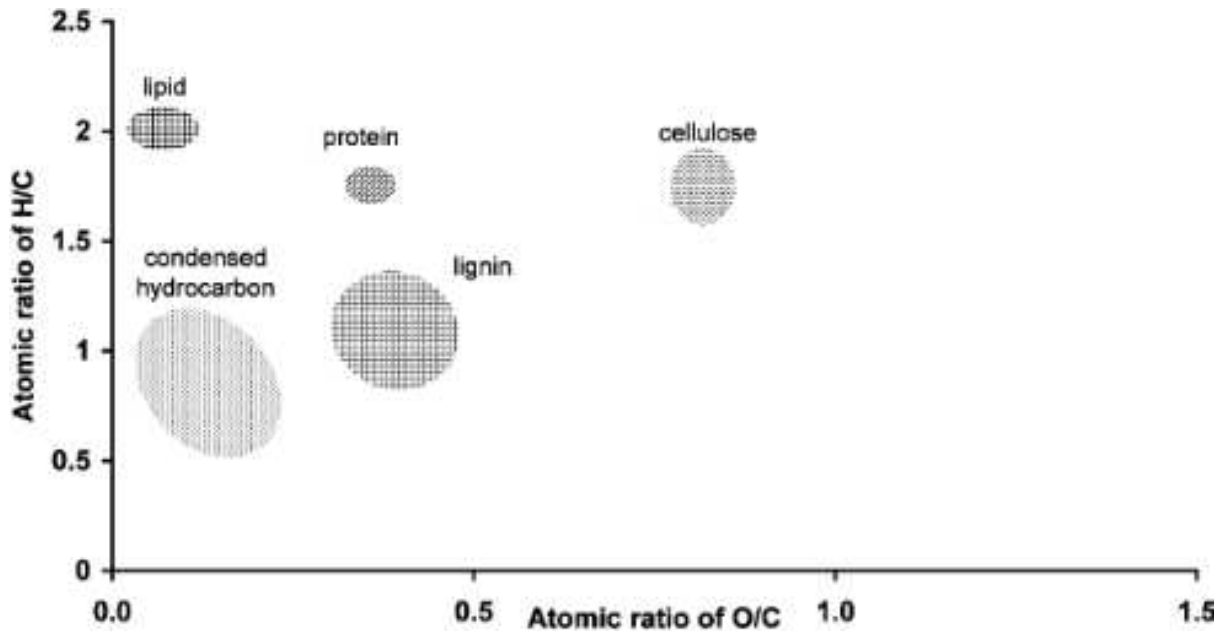


Figure I.11 : Diagramme de Krevelen avec les principales régions marquant les compositions élémentaires de composés moléculaires de la MOD. (Kim et al., 2003)

Les isotopes stables du carbone et de l'azote sont utilisés pour identifier des sources de matière (e.g. des polluants, McClelland et Valiela, 1998), des processus (e.g., la nitrification ou la dénitrification ; Carini et al., 2010), ou encore déterminer les interactions trophiques interspécifiques (i.e. contributions relatives des proies au régime alimentaire d'un consommateur, Lemons et al., 2011). Les rapports isotopiques stables du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) et de l'azote ($\delta^{15}\text{N}$) sont exprimés par un ratio « δ », exprimé en ‰ par rapport à une référence internationale (e.g. PDB Pee Dee Belemnite rostre de bélemnite pour le carbone et CDT Cañon Diablo Troilite, pour l'azote), selon la formule :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{échantillon}} \text{ ou } \delta^{15}\text{N}_{\text{échantillon}} = \left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{référence}}} - 1 \right)$$

avec $R = {}^{13}\text{C} / {}^{12}\text{C}$ ou ${}^{15}\text{N} / {}^{14}\text{N}$

Ce ratio est obtenu par la combustion complète des échantillons et l'analyse des gaz de combustion par spectrométrie de masse isotopique. Les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ et de $\delta^{15}\text{N}$ sont fonctions des voies de synthèse organiques de la MO (O'Leary, 1981) ainsi que de la signature isotopique et de la disponibilité des nutriments (Montoya al., 2007). Dans les systèmes côtiers, une des principales applications du $\delta^{13}\text{C}$ est l'identification des sources de substances naturelles (Figure I.12).

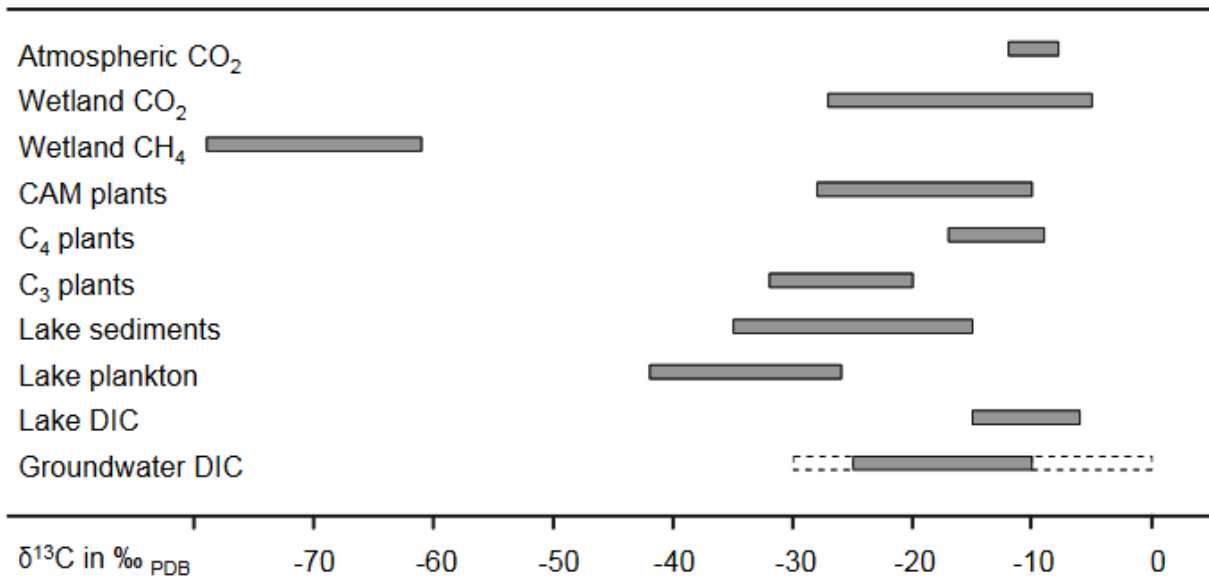


Figure I.12: Ordre de grandeur des $\delta^{13}\text{C}$ selon la source de MO. Extrait de Kracht 2001.

Néanmoins, le $\delta^{13}\text{C}$ ne permet pas une discrimination totale des différents groupes de producteurs primaires (sur la figure I.12, plusieurs ordres de grandeurs se chevauchent). Son association avec le $\delta^{15}\text{N}$ permet une meilleure identification de ces différents groupes (figure I.13).

Les signatures de ces différents groupes de producteurs primaires permettent la quantification des contributions relatives de chacun à la MO (e.g. mélange estuarien avec signature continentale ou océanique, Papadimitriou et al., 2005 ; Zhou et al., 2006 ; Ramaswany et al., 2008).

Cette composition isotopique peut être préservée au cours des transferts trophiques (Fry & Sherr, 1984). Ainsi, lors du transfert de MO d'une proie à un prédateur, un fractionnement isotopique a lieu avec un enrichissement en isotopes lourds dans les échelons trophiques supérieurs (DeNiro et Epstein, 1989). Cet enrichissement entre échelons trophiques est estimé à 1‰ pour le $\delta^{13}\text{C}$ et à $2,54 \pm 0,11$ ‰ pour le $\delta^{15}\text{N}$ (Vanderklift et Ponsard 2003) . Les rapports isotopiques stables sont largement utilisés dans l'identification des transferts de matière dans les réseaux trophiques (Takai et al., 2004 ; Bode et al., 2007 ; Schaal et al., 2008 ; Lebreton et al., 2012 ; Ouisse et al., 2012). Bien que ces techniques apportent une information sur les sources de la MOD et les processus pouvant l'impacter, elles ne fournissent pas d'informations sur les structures moléculaires (Li et al., 2009).

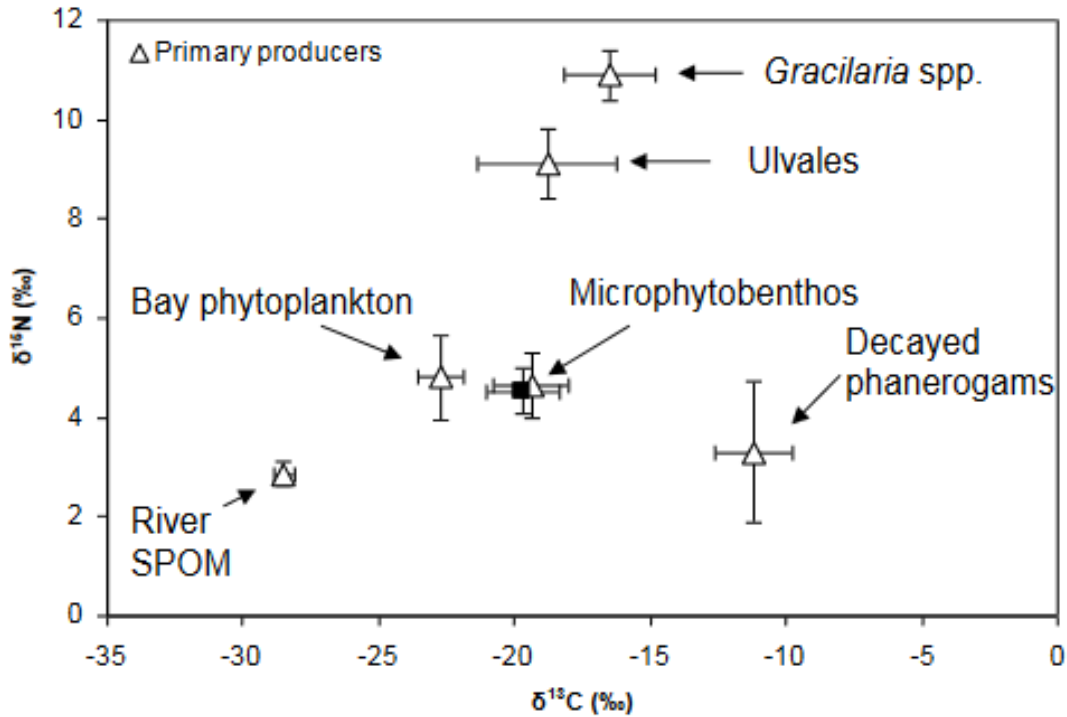


Figure I.13 : Exemple de diagramme de l'isotopie stable du carbone et de l'azote de différents groupes de producteurs primaires. SPOM : matière organique particulaire de sol. D'après Dubois et al., (2012).

I.3.2.2. Analyses moléculaires

Plusieurs composés ou groupes de composés sont identifiables dans la MOD. Que ce soit de manière directe ou indirecte (prétraitement), les acides aminés, les sucres ou des biopolymères plus complexes (protéines, polysaccharides, lipides) sont identifiables et quantifiables par dosages colorimétriques, hydrolyses ou par chromatographie. Des techniques comme la pyrolyse couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (pyrolyse-GC-MS) ou la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) sont très lourdes à mettre en œuvre mais possèdent l'avantage d'être précises et sensibles (Hatcher et al., 2001 ; Reemtsma, 2001 ; Labanowski, 2004).

La pyrolyse- GC-MS ne nécessite pas de prétraitement des échantillons et permet de limiter les risques de contamination (Dignac, 1998). Les fragments moléculaires obtenus par spectrométrie de masse permettent l'identification simultanée de l'ensemble des molécules analysables de l'échantillon (voir exemple sur figure I.14). Jusqu'à 322 composés ont été identifiés dans les pyrolysats de substances humiques de sols (Saiz-Jimenez et De Leeuw, 1986). La proportion des sucres, protéines et composés aromatiques polyhydroxylés peut être

déterminé dans l'échantillon (Bruchet et al., 1990). Néanmoins, toutes les molécules ne sont pas détectables par pyrolyse-CG-SM et certains fragments peuvent provenir d'une recombinaison lors de l'étape de la pyrolyse. De même, l'identification de composés à partir de fragments ne permet pas de définir les structures complexes dont ils sont issus (Leenher et Croué, 2003). Une utilisation quantitative de la pyrolyse nécessite une calibration externe de chacun des composés quantifiés car leurs réponses ne sont pas les mêmes. Cette méthode est utile en tant qu'outil de comparaison qualitatif entre différents échantillons.

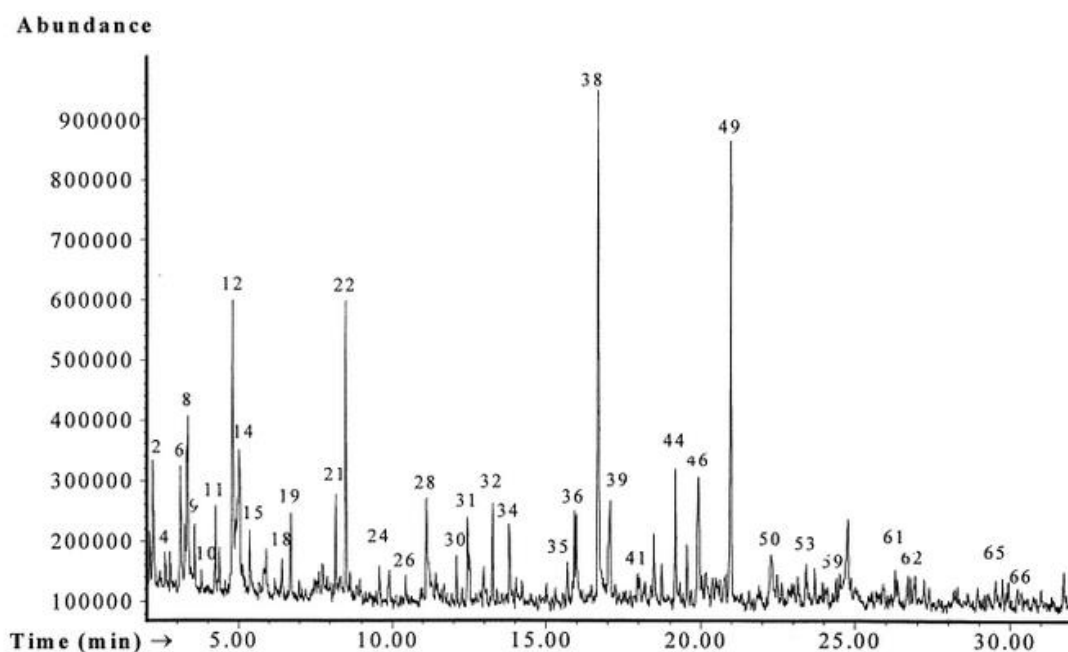


Figure I.14 : Pyrogramme GC-MS de substances humiques extraits de marécages. Chaque pic identifié par un numéro correspond à une structure chimique connue. Extrait de Lu et al., 2000.

La FT-ICR-MS, spectroscopie de masse à résonance cyclotronique ionique possède un haut pouvoir de résolution et une bonne exactitude de la détermination des masses (Amster, 1996). Cette technique est particulièrement adaptée à l'analyse de mélanges organiques complexes. Les sous-groupes de molécules résolues par la FT-ICR-MS ont été identifiés comme des biomarqueurs de sources de la MO (Koch et al., 2005) ou de processus (Einsiedl et al., 2007). Le couplage de cette technique avec la chromatographie en phase liquide permet de réduire la complexité de la MON en séparant les centaines de fragments en plusieurs groupes (figure I.15). L'identification de biomarqueurs d'intérêt est simplifiée (Koch et al., 2008) et permet de suivre des processus ciblés (e.g. métabolisme cellulaire ; Ward et al., 2018).

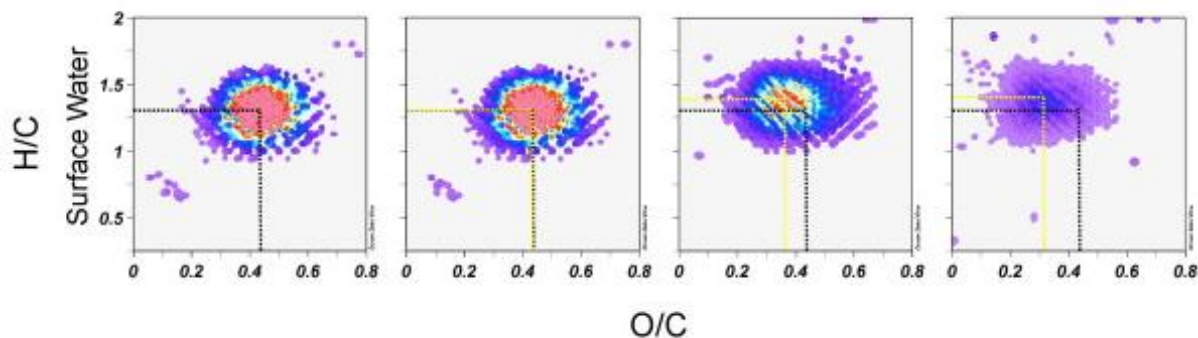


Figure I.15 : Analyses par FT-ICR-MS de quatre fractions séparées par chromatographie en phase liquide. Chaque point représente une structure contenant des atomes C, H et O. Au total cela représente entre 400 et 900 structures par fraction chromatographique. Extrait de Koch et al., 2008.

I.3.2.3. Analyses fonctionnelles

L'analyse fonctionnelle regroupe plusieurs techniques qui identifient des types de structures et de fonctions chimiques comme l'aromaticité (cycles benzéniques et doubles liaisons) ou l'acidité (structures carboxyliques). Ces méthodes n'analysent pas l'ensemble des composés mais permettent, par comparaison entre plusieurs échantillons, d'obtenir des informations sur la composition de la MOD.

I.3.2.4. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie d'absorption UV est la plus utilisée dans la caractérisation de la MOD. L'absorption dans l'UV est liée à l'existence de transitions $\pi-\pi^*$ dans les cycles benzéniques et les fonctions alcènes, responsables du caractère aromatique des molécules de la MOD (Traina et al., 1990). Néanmoins, les ions nitrates peuvent fortement contribuer à l'absorption de la lumière jusqu'à 230 nm (figure I.16). Cette technique est donc peu spécifique et ne permet pas d'identifier clairement les classes de chromophores présentes dans l'échantillon. Le caractère aromatique de la MOD est estimé par le SUVA (Specific UV Absorbance) (Leenheer et Croué, 2003), c'est-à-dire la mesure de l'absorbance spécifique à une longueur d'onde, souvent fixée à 254 nm, relative à la concentration en COD. L'absorption de la MOD dans le domaine du visible a été utilisée, par exemple, pour estimer le degré d'humification de la MOD par le rapport des absorbances E_{465}/E_{665} (Chen et al., 1977).

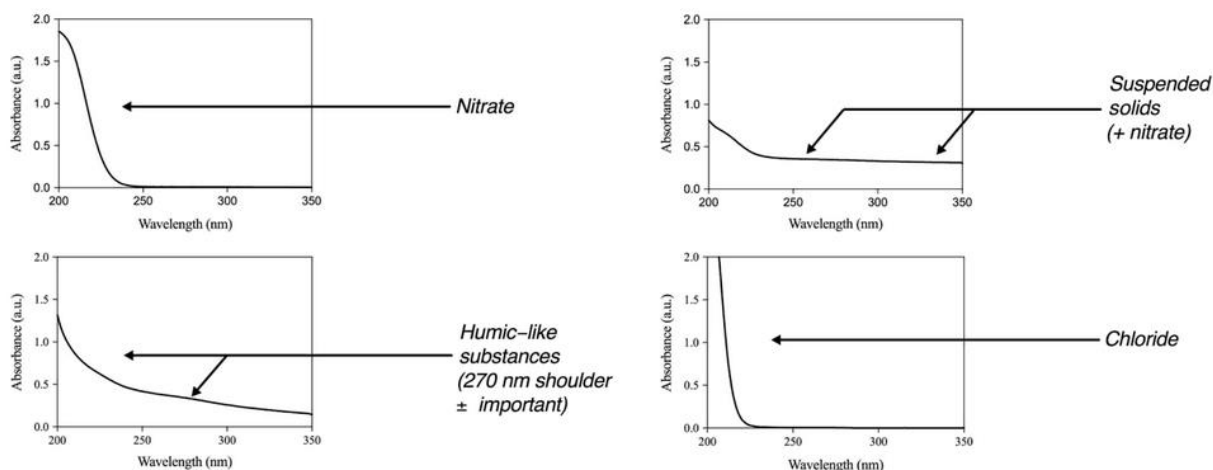


Figure I.16 : Spectres UV-visible typiques de l'eau de mer. Extrait et adapté de Olivier Thomas et al., *UV-Visible Spectrophotometry of Water et Wastewater*, 2017.

I.3.2.5. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La facilité d'obtention des spectres, la grande quantité d'information fournie par ceux-ci (figure I.17) et la faible quantité d'échantillon exigée font de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) une technique attrayante pour la caractérisation de la MOD (Davis et al., 1999 ; Matilainen et al., 2011). L'IRTF met en évidence la nature des liaisons (C-C, C-O, C-H, C-N, O-H, etc. ; voir figure I.17) et ainsi les groupes fonctionnels des molécules par la vibration et la rotation de ces liaisons suite à l'absorption d'énergie.

Cette technique reste cependant uniquement qualitative du fait de l'impossibilité à réaliser des pastilles solides parfaitement homogènes et des spectres complexes dans leur interprétation. Par ailleurs, la détection d'un grand nombre d'espèces inorganiques permet également de contrôler la pureté de l'échantillon (Croué et al., 2000). Le plus grand défaut de cette technique vient de la manière de préparer les échantillons. En effet, c'est souvent le bromure de potassium (KBr) qui est utilisé dans la confection des pastilles contenant l'échantillon à étudier. Or, le KBr peut, dans certaines conditions, catalyser la décarboxylation des groupes fonctionnels acides, altérant de ce fait les substances humiques (Davis et al., 1999).

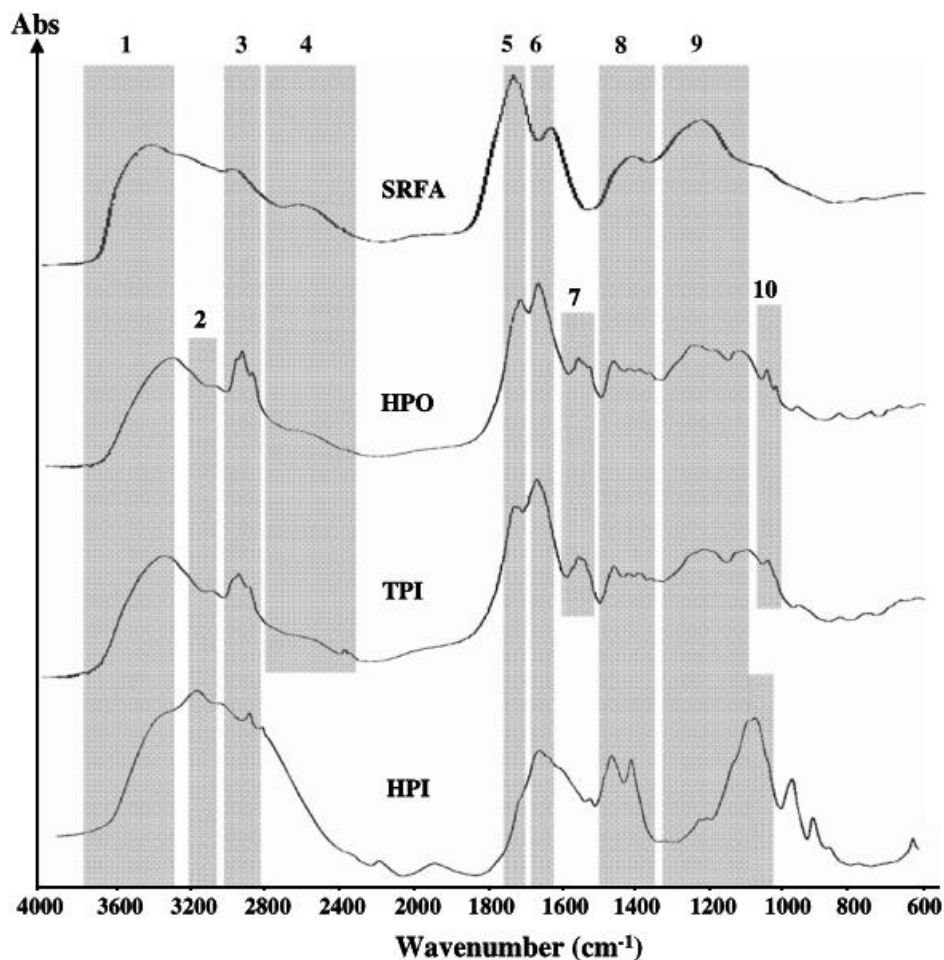


Figure I.17 : Spectres FT-IR du standard international *Suwanee River Fulvic Acid* et de plusieurs fractions de MOD isolées de la Seine. (Bande 1 : liaison O – H ; Bandes 2, 6 et 7 : groupes azotés ; bandes 3 et 8 : chaînes aliphatiques ; bandes 4 et 5 : groupes carboxyliques ; bande 9 : liaison C – O ; Bande 10 : groupes sulfurés). De Pernet-Coudrier et al., 2008.

I.3.2.6. Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence a l'avantage d'offrir une meilleure résolution des spectres par rapport à la spectroscopie UV-visible, ce qui permet une discrimination plus aisée des composés de la MOD (Kalbitz et al., 1999 ; Peruavouri et al., 2002). Les molécules fluorescentes ne constituent qu'une partie de la MOD mais celle-ci est caractérisée par des cycles aromatiques condensés et/ou des chaînes aliphatiques fortement insaturées (Miano et Senesi, 1990, 1992). Ces molécules absorbent dans le domaine UV-visible et réémettent dans des longueurs d'onde plus élevées que celles absorbées. La spectroscopie de fluorescence a été largement appliquée à l'étude des SH (Senesi, 1990) et sa bonne sensibilité explique son application précoce sur la MOD marine (Coble, 1996).

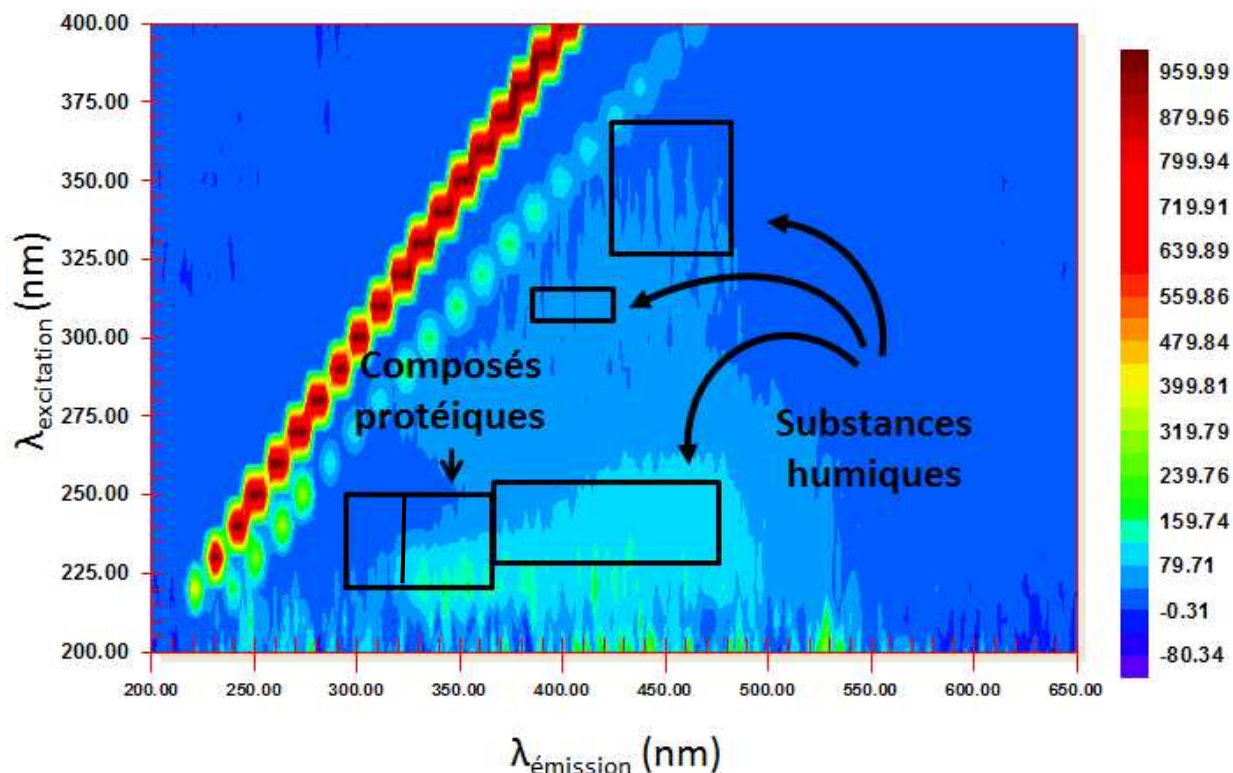


Figure I.18 : Matrice 3D de fluorescence d'une eau de mer (rade de Brest). Les principales zones identifiées par Coble et al. (1996) sont représentées en noir.

Aujourd'hui, la fluorescence à trois dimensions (3D) est la plus utilisée. Elle permet l'analyse spécifique de la MOD en enregistrant l'intensité et la position des maxima de fluorescence (figure I.18). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de ces maxima varient avec la nature et la structure des fluorophores. Cinq fluorophores sont particulièrement bien identifiables, trois liés aux SH, les deux autres aux composés protéiques (Coble, 1996; Parlanti, 2000; Hudson et al., 2007).

I.3.2.7. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) a été utilisée dans l'étude des SH (Hatcher et al., 2001 ; Cook, 2004). La RMN est basée sur l'absorption nucléaire de longueurs d'onde située dans la gamme des radiofréquences. Bien que cette technique soit à l'origine exploitée pour résoudre les problèmes de détermination de structure des composés moléculaires et des matériaux, l'identification de composés spécifiques de la MOD n'est pas possible du fait de la grande diversité de molécules présentes.

L'information se fait par l'intermédiaire de la répartition des divers groupes fonctionnels répartis sur les spectres. Le signal est néanmoins perturbé par les interactions entre composés. Ainsi, un signal bien défini est observé seulement quand un type de structure semblable prédomine. En dépit des difficultés dans l'interprétation des spectres, la RMN a contribué à une meilleure compréhension de la structure des SH. Par exemple, la RMN du carbone a permis de démontrer que les SH n'étaient pas constituées que de structures aromatiques mais étaient aussi dotées d'une forte structure aliphatique (Malcolm, 1990). Elle a aussi permis d'identifier différentes classes de polysaccharides en milieu estuarien et de montrer une évolution dans leurs proportions le long du gradient halin (Abdulla et al., 2010).

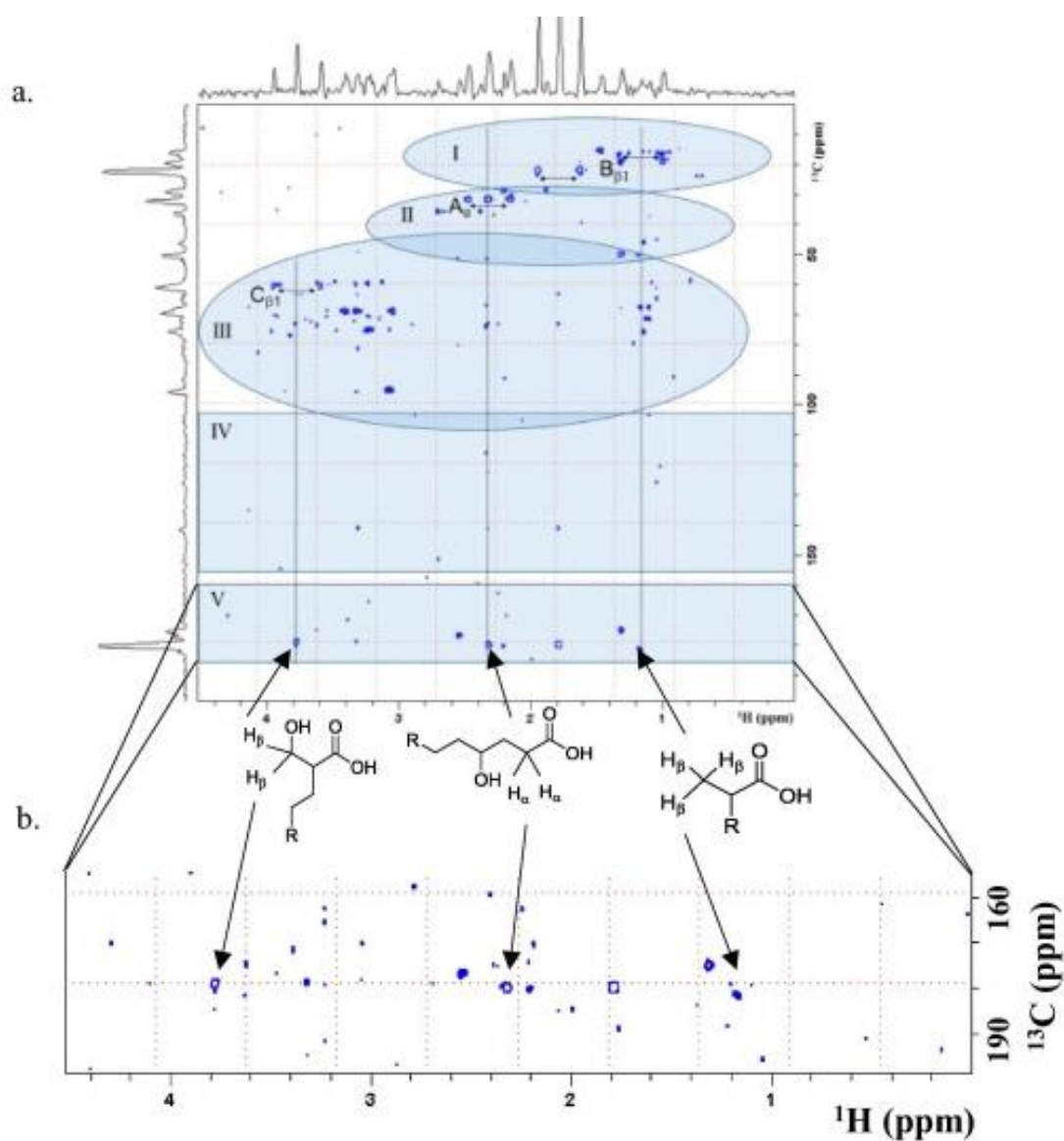


Figure I.19 : (a) Spectre RMN HMBC d'un acide humique (^{13}C en ordonnées et ^1H en abscisses). Les régions sont précisés sur le graphique : I (méthyl), II (méthylène), III (carbohydrates/hétéroatomes), IV (aromatiques/oléfinés) et V (carbonyles/acides carboxyliques) ; (b) agrandissement de la région V avec les structures associées aux corrélations proton- ^{13}C . Extrait de DiDonato & Hatcher (2017).

La RMN du carbone a été préférée à celle du proton (hydrogène) car elle permet d'obtenir des informations sur le squelette carboné des structures organiques plutôt que sur leur périphérie. De plus, la RMN du solide est souvent privilégiée à la RMN du liquide car certains composés comme les SH se dissolvent mal dans les solvants adaptés à ce genre d'analyse. Ceci entraîne des biais analytiques (Peuravuori et al., 2003). Néanmoins, l'analyse de ces composés reste possible et permet d'identifier certaines structures les composant (figure I.19). La quantification par cette méthode reste approximative du fait de la difficulté de mise en œuvre des ajustements requis pour ce genre de manipulation (Dudley et Fyfe, 1982 ; Gonzalez-Vila et al., 2001 ; Poirier et al., 2000).

I.3.2.8. Techniques électrochimiques pour le dosage de certains composés de la MOD

Les substances humiques forment des complexes avec le fer, le cuivre ou le molybdène. Une méthode électrochimique basée sur la redissolution cathodique des complexes SH - Mo(VI) (Quentel et al., 1986 ; Chanudet et al., 2006 ; Pernet-Coudrier et al., 2013), SH - Fe (Laglera et al., 2009) ou SH - Cu (Whitby et al., 2015) préalablement adsorbés sur goutte de mercure permet le dosage des substances humiques. Dans le cas des complexes SH – Mo(VI), le molybdène n'est pas électroactif dans le domaine de potentiel autorisé par la goutte de mercure (-1 V / +0.1V). L'utilisation d'un ligand est donc nécessaire pour mesurer sa redissolution. Ici, ce sont les substances humiques qui jouent ce rôle. En présence d'un excès de molybdène, le signal ne dépend que de la quantité de ligand adsorbé sur la goutte de mercure et non de la force ou de la capacité de complexation des MOD vis-à-vis du Mo(VI) (Quentel et Filella, 2008). Ainsi, le signal mesuré est proportionnel à la quantité de substances humiques présentes dans le milieu (Chanudet et al., 2006 ; Pernet-Coudrier et al., 2013).

La grande sensibilité de cette méthode en présence d'acides fulviques et humiques et le signal négligeable attribué aux protéines ou aux polysaccharides rendent cette méthode particulièrement adaptée pour le dosage des substances humiques dites réfractaires (Chanudet et al., 2006 ; Filella et al., 2013). Cette méthode a été utilisée dans les lacs et les rivières (Chanudet et Filella, 2007 ; Filella et al., 2013 ; Waeles et al., 2013 ; Marie et al., 2016) et dans les estuaires (Marie et al., 2017). Récemment, une adaptation de cette technique (Pernet-Coudrier et al., 2013) a permis le dosage simultané de deux familles de composés soufrés

réduits (type glutathione et type thioacétamide) en milieu naturel (Marie et al., 2016 ; 2017) (figure I.20).

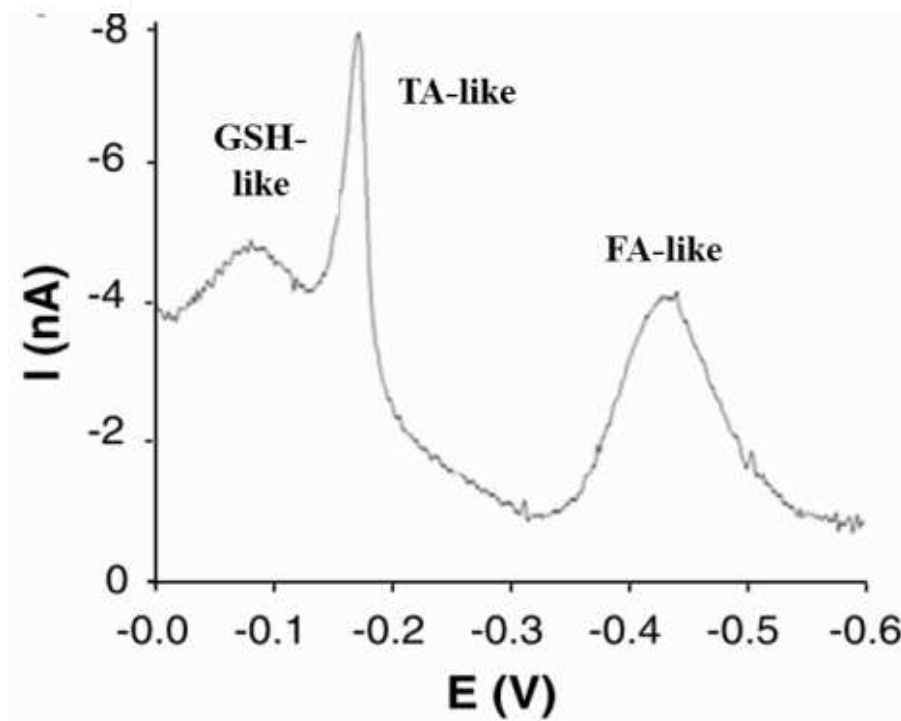


Figure I.20 : Voltampérogramme d'un échantillon de mer contenant des composés de type glutathione (GSH-like), de type thioacétamide (TA-like) et de type acides fulviques (FA-like) (Marie L., 2016)

Le dosage par technique électrochimique dépend de l'étalon choisi. Ainsi, le principal désavantage de cette technique se situe dans le choix d'un standard (acide humique ou fulvique) proche structurellement aux substances contenus dans les échantillons étudiés (Quentel et Filella, 2008).

I.3.2.9. Titration acido-basique

Les propriétés acido-basiques de la MOD font partie des facteurs primordiaux influençant son pouvoir complexant vis-à-vis des métaux traces (Perdue et Lytle, 1983 ; Buffle, 1988 ; Christensen et Christensen, 2000 ; Louis et al., 2009). La densité des sites de types carboxyliques et phénoliques est particulièrement étudiée (Lu et Allen, 2002 ; Ritchie et Perdue, 2003 ; Garnier et al., 2004). Le suivi de ce rapport carboxylique/phénolique peut ainsi permettre de suivre la variabilité des propriétés de la MOD voire de déterminer ses origines. Il a ainsi été démontré que la MOD terrigène a un caractère phénolique plus marqué que la MOD d'origine

aquagénique (Davi et Gnudi, 1999). La manière la plus simple et courante d'analyser et caractériser les sites acides d'une molécule organique de structure simple ou complexe, repose sur une mesure potentiométrique de la concentration en proton libre, c'est-à-dire le pH, au cours d'une titration acido-basique (Christensen et al., 1998 ; Smith et Kramer, 1999 ; De Souza Sierra et al., 2001 ; Richie et Perdue, 2003) (figure I.21).

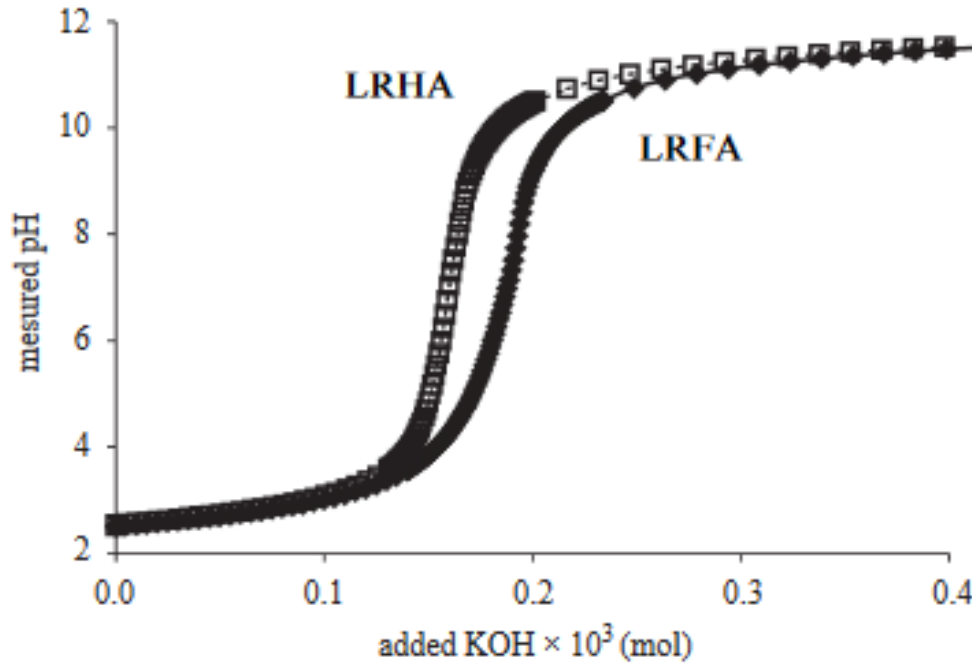


Figure I.21 : courbes de titration potentiométriques d'acide humique (LRHA – *Laurentian River Humic Acid*) et d'acide fulvique (LFRA – *Laurentian River Fulvic Acid*).

Il faut néanmoins appliquer un traitement mathématique (linéarisation de Gran, méthode des dérivés première et seconde, fitting non-linéaire, etc.) pour représenter le comportement de la molécule vis-à-vis du proton. Cette combinaison entre la technique d'analyse et le traitement analytique a été initialement appliquée à la caractérisation de molécules organiques de structures simples (EDTA, acide phénolique, acétique, salicylique...) présentant des fonctions d'acidité distinctes, visibles par des inflexions marquées de la courbe de titration. Toutes les techniques de complexation ne sont cependant pas étudiées.

I.3.2.10. Chromatographie d'exclusion de taille à haute performance

La chromatographie par exclusion de taille à haute performance (HPSEC) permet l'obtention d'un continuum de molécules réparties selon leurs tailles (exprimée en poids moléculaire rapportée à une molécule modèle). De cette répartition, il est possible d'extraire le poids moléculaire moyen en nombre de molécules (M_n), le poids moléculaire moyen en taille (M_w) et la polydispersité (M_w/M_n), qui fournit une idée de l'hétérogénéité en taille de la MOD considérée (Chin et al., 1994). Le principe de fonctionnement consiste en une séparation des composés de la MOD en fonction de leur taille sur un gel ou une résine macroporeuse de silice. L'étape critique de cette méthode est plus le choix de la phase mobile que celui de la colonne ou du gel (Peuravuori et Pihlaja, 1997). Différentes méthodes sont utilisées pour détecter les composés précédemment séparés tels que l'absorbance UV, la fluorescence, l'indice de réfraction, l'analyseur de carbone organique, la spectrométrie de masse à plasma induit (Mc Donald et al., 2004). Par exemple, le couplage de l'HPSEC avec un analyseur UV et un analyseur de carbone permet d'obtenir le SUVA qui, tracé en fonction de la taille des substances humiques, permet d'obtenir des diagrammes de substances humiques révélant leur sources (aquagénique, pédogénique) et leur nature (substance humique ou substance fulvique). Ce diagramme a principalement été utilisée dans les eaux douces (Huber et al., 2011 ; He et al., 2016).

I.4. Conclusion

La MOD joue un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques. De par ses propriétés, elle représente à la fois une source de nutriments pour les microorganismes, un puissant vecteur des métaux ou d'autres polluants organiques et un agent photochimique altérant la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau.

La position centrale des estuaires et des milieux côtiers dans le transfert de carbone entre les continents et les océans incite à étudier de plus près les mécanismes de perte et de création de MOD, qu'ils soient biotiques ou abiotiques. Contrainte par de nombreux forçages biogéochimiques, la MOD s'altère le long du gradient de salinité. Les processus à l'œuvre laissent une empreinte dans la composition de la MOD. Ainsi, mieux caractériser la MOD permettrait de mieux décrire les cycles régissant sa dynamique.

Malheureusement la MOD est constituée d'une infinité de composés et un des enjeux de la chimie environnementale moderne consiste à développer des outils et des méthodes toujours plus performants pour décrire cette hétérogénéité. Cette étude n'est pas aisée et des choix analytiques s'imposent. D'une part, il y a l'analyse globale, ne fournissant que peu d'informations sur la composition et d'autre part l'analyse spécifique permettant d'isoler et de caractériser certains groupes de molécules sur la base de critères communs.

Au croisement entre ces deux catégories de techniques analytiques, la SEC-OCD-UVD-OND (SEC-mDEC) permet d'allier en partie les avantages de l'analyse de type globale et spécifique. Dans sa version la plus récente (Huber et al., 2011), elle consiste en une chromatographie liquide par exclusion stérique couplée à trois détecteurs (carbone, azote et UV-visible). En plus de quantifier le COD de manière globale, la SEC-mDEC permet la séparation de l'échantillon en six classes de composés de caractéristiques spécifiques. Principalement utilisée dans le cadre des études pour le traitement de l'eau (Huber et al., 2011 ; Simon et al., 2013 ; Peiris et al., 2013) la SEC-mDEC a cependant été appliquée avec succès dans la description de la MOD dans quelques systèmes naturels. Cependant, les possibilités et limitations de l'utilisation de la SEC-mDEC en milieu marin ne sont pas clairement établies.

Devant cet état de fait, les travaux de recherche présentés ci-après auront pour objectif principal d'utiliser la SEC-mDEC pour étudier la spéciation de la MOD en milieux estuarien et côtier.

Chapitre II- Matériel et méthodes

II.1. Cadre des études : le système Aulne – rade de Brest

Comme expliqué précédemment, l’océan côtier est constitué d’un continuum d’écosystèmes incluant rivières, estuaires et plateaux continentaux. Le bassin semi-fermé qu’est la rade de Brest (figure II.1) constitue un écosystème intéressant dans l’étude des transferts de la MOD dans le continuum « terre-mer » car il est soumis à de fortes influences continentale et océanique. D’une part, l’influence océanique est importante avec des marnages pouvant atteindre 8m. L’eau de mer entre dans la rade *via* le goulet de Brest et provient principalement de la mer d’Iroise qui est située à la confluence entre les eaux de l’Atlantique et de la Manche. D’autre part, la rade de Brest est également sous influence continentale puisqu’elle est l’exutoire côtier de deux rivières : l’Aulne au Sud-Est et l’Elorn au Nord-Est (figure II.1).

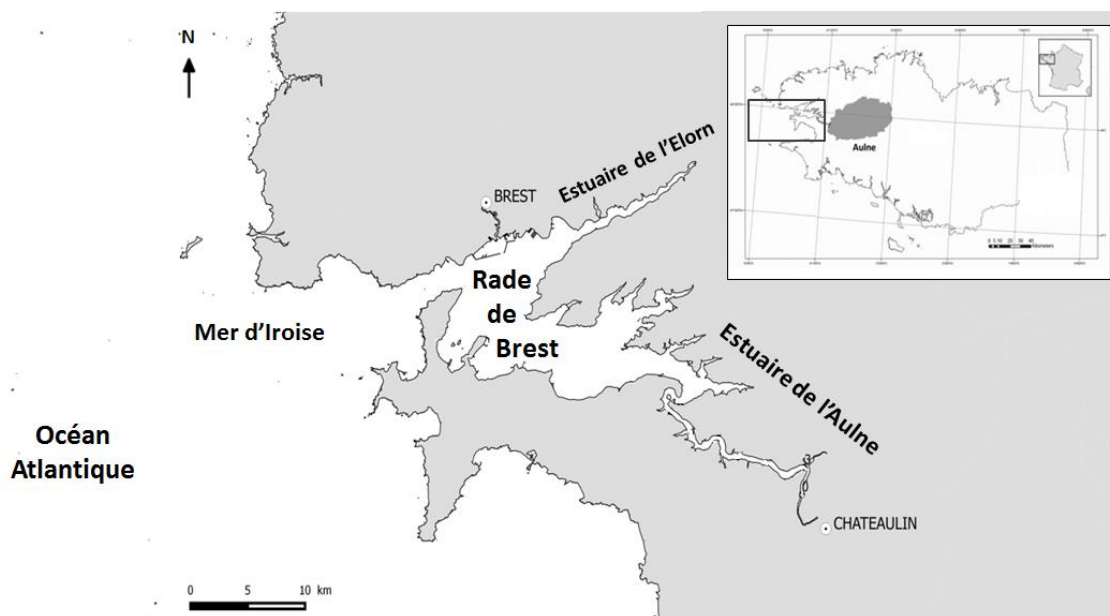


Figure II.1: Carte du système estuaire de l’Aulne - rade de Brest. L’encadré présente l’aire de répartition du bassin versant de la rivière de l’Aulne

L’Aulne représente 70% des apports en volume d’eau douce dans la rade de Brest (Delmas, 1981). Lors des périodes de crues, les salinités dans le sud de la rade de Brest peuvent chuter à des valeurs inférieures à 32, faisant de ce bassin semi-fermé une partie intégrante de l’estuaire de l’Aulne.

Pour mieux appréhender l’évolution de la MOD le long de ces deux environnements à salinité variable que sont l’estuaire de l’Aulne et la rade de Brest, une description succincte de

leur hydrologie et de celle des écosystèmes naturels interconnectés est proposée ci-après en quatre points : (i) le bassin versant de l'Aulne, (ii) l'estuaire de l'Aulne, (iii) la rade de Brest, et (iv) la mer d'Iroise

II.1.1. Bassin versant de l'Aulne

Située en Bretagne, l'Aulne est une rivière de 140km de long qui prend sa source dans les Monts d'Arrée sur la commune de Lohuec (Côtes d'Armor) et se jette dans la rade de Brest. Son bassin versant de 1900km² (figure II.1) est peu industrialisé et l'activité agricole y est largement majoritaire, occupant jusqu'à 60% de la superficie drainée (Marie, 2016). L'évolution du débit est typique d'un climat océanique tempéré. Le cycle hydrologique de la rivière se compose d'une période d'étiage en été avec des débits faibles (autour de 5 m³.s⁻¹) et d'une période de crue en automne - hiver avec des débits importants (autour de 200 m³.s⁻¹). Son débit annuel moyen est de 25±8 m³.s⁻¹.

La contribution du milieu souterrain à l'écoulement total de la rivière de l'Aulne est non-négligeable. Il varie de 40% en période de crue à 88% en période d'étiage (Marie ; 2016).

II.1.2. L'estuaire de l'Aulne

L'estuaire de l'Aulne est un estuaire macrotidal typique des écosystèmes littoraux ouest-européens dont le cours inférieur est fortement influencé par la marée. Le gradient salé s'étend sur 40km.

Les principaux facteurs qui vont définir les états hydrologiques de l'estuaire sont le volume d'eau de mer introduit par la marée et le débit fluvial (Bassoulet, 1979; Delmas, 1981). Ainsi, on distingue deux périodes : (i) une période de crue automnale et hivernale caractérisée par des débits importants et une structure stratifiée en coin salé, et (ii) une période d'étiage estival caractérisée par de faibles débits où l'estuaire est plutôt bien mélangé avec des isohalines proches de la verticale. Le temps de résidence des eaux estuariennes varie de la même manière, allant de 3 jours en période de crue jusqu'à 25 jours en période d'étiage (Bassoulet, 1979, Marie et al., 2017).

Les estuaires macrotidaux sont souvent caractérisés par un point nodal où les eaux douces de surface et les eaux marines de fond se rencontrent et bloquent les sédiments en

suspension apportés par la rivière (Brenon et Hir, 1999). Cette zone de maximum de turbidité, aussi appelée « bouchon vaseux » (Bassoulet, 1979; Allen et al., 1980; Abril et al., 2002), est riche en matière organique. Sa position dépend de l'état hydrologique de la rivière et de la force de la marée (Delmas, 1981; Brenon et Hir, 1999; Middelburg et Herman, 2007; Savoye et al., 2012; Waeles et al., 2013).

Les données en carbone organique particulaire (COP) extraites de l'étude de Marie (2016), permettent d'identifier la présence d'une zone de maximum de turbidité (figure II.2). En 2014, les concentrations en COP dans l'estuaire de l'Aulne sont comprises entre 30 et 12300 $\mu\text{gC.L}^{-1}$. Les concentrations les plus élevées sont observées en Juillet et en Août ($>3000 \mu\text{gC.L}^{-1}$). Les diagrammes de mélange de ces deux mois présentent des anomalies positives importantes avec le maximum d'environ 12 300 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ observé à salinité 2 au mois d'Août (figure II.3).

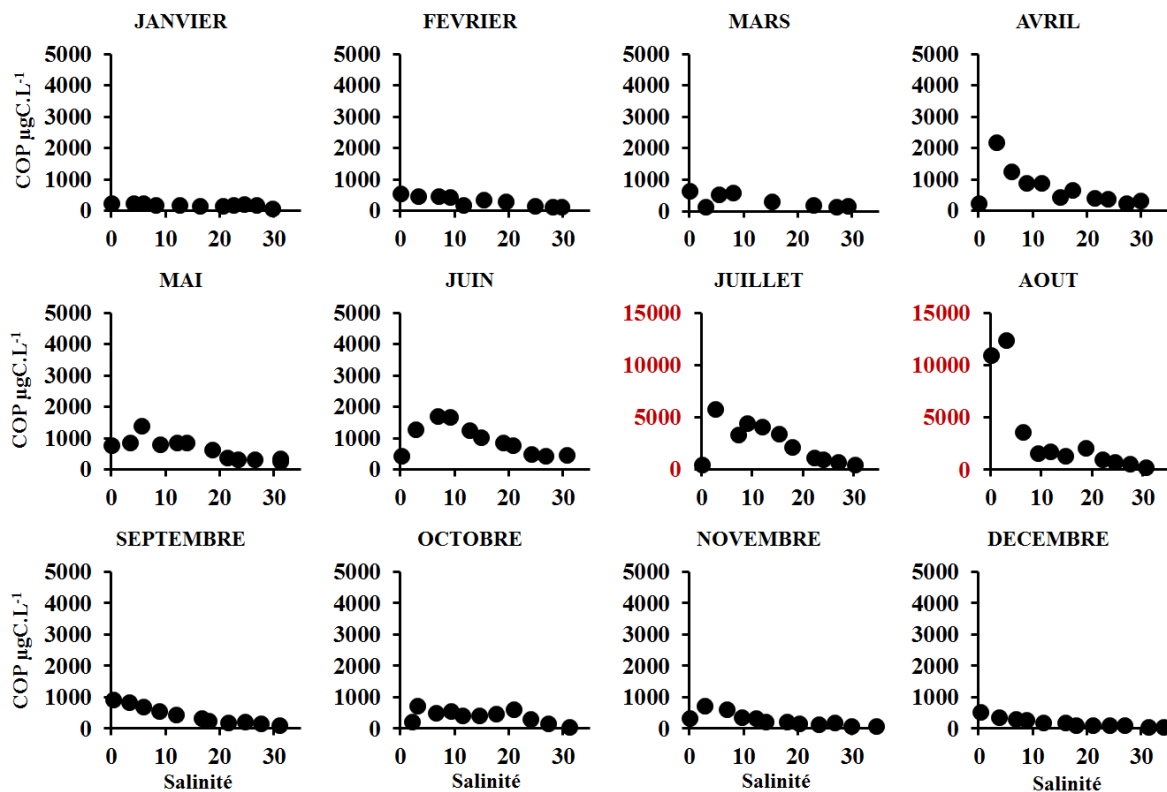


Figure II.2 : Diagrammes de mélange mensuels du Carbone Organique Particulaire (COP) dans l'estuaire de l'Aulne en 2014. L'échelle des concentrations en COP est trois fois plus élevée pour les mois de Juillet et Août.

Ces observations coïncident avec les conclusions de l'analyse des matières en suspension sur le même cycle hydrologique (figure II.3c), publiées dans une étude récente (Marie et al., 2017). La présence d'un bouchon vaseux en période estivale a été mise en évidence

aux faibles salinités (0-10) par la présence de fortes concentrations en matière en suspension (maximas entre Juin et Août - figure II.3c).

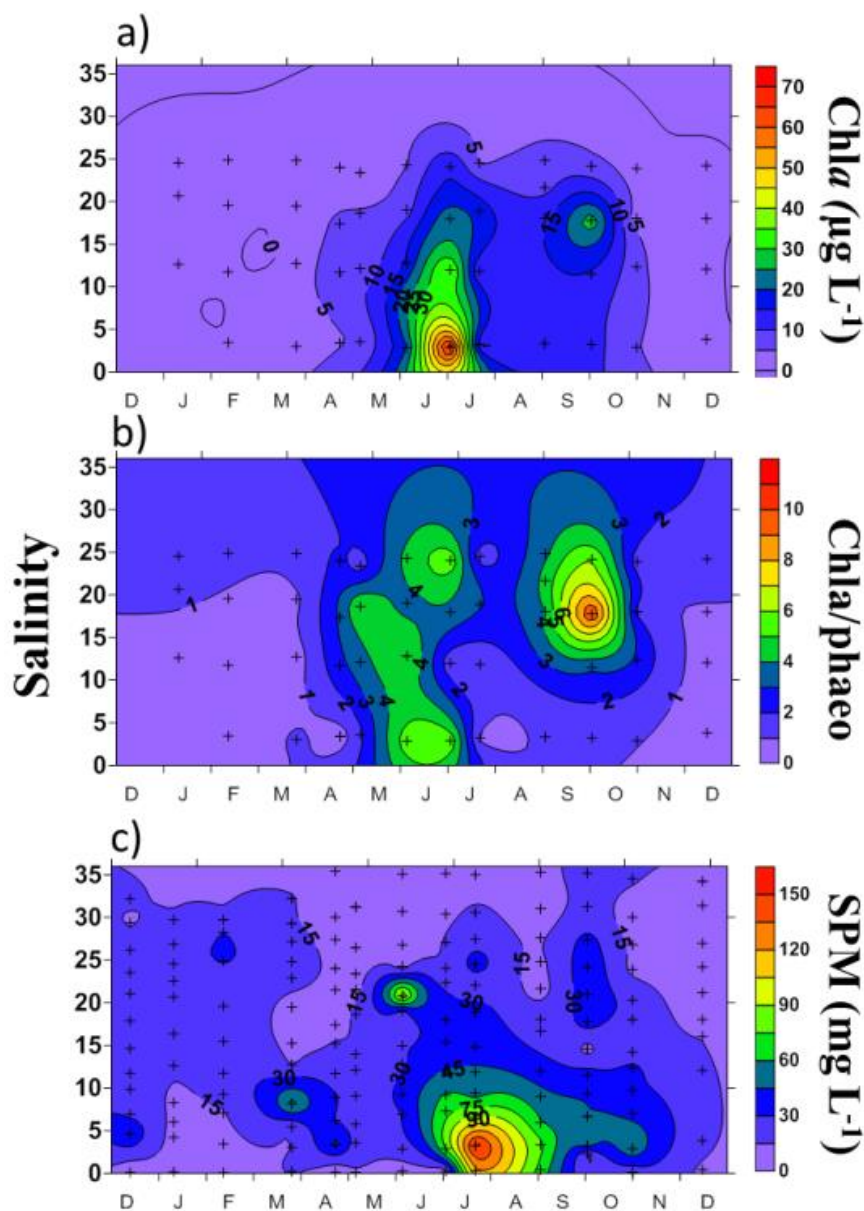


Figure II.3 : Evolution des concentrations en (a) chlorophylle *a* (Chla), (b) du ratio Chla/phaeocystes et (c) des matières en suspension (SPM) le long du gradient salé de l'Aulne de Décembre 2013 à Décembre 2014.

Les auteurs ont aussi étudié l'évolution annuelle de la biomasse phytoplanctonique *via* le suivi des concentrations en chlorophylle *a* (figure II.3.a). Deux périodes de production phytoplanctonique ont été mises en évidence : une première période en Juin-Juillet sur une grande partie de l'estuaire ($S=0-25$) et une seconde période en Septembre de moindre intensité entre 15 et 20 de salinité. La figure II.3.b illustre les variations du rapport chlorophylle *a*/phaeocystes (Chla/phaeo) qui fluctue entre 0 et 10 sur l'année étudiée. Des valeurs supérieures

à 4 sont observées en Juin-Juillet sur l'ensemble du gradient de salinité. Les valeurs maximales (5-10) sont observées en Septembre entre 10 et 25 de salinité. Elles indiquent la présence d'un phytoplancton en bonne condition physiologique. En effet, la production de phéophytine (i.e. oxydation de la chlorophylle a) est liée à la sénescence du phytoplancton due à des conditions environnementales peu optimales ou au broutage par le zooplancton (Vernet et Lorenzen, 1987).

II.1.3. La rade de Brest

La rade de Brest est une vaste étendue d'eau saumâtre d'environ 181 km². En raison de la forte amplitude des marées dans cette région, le marnage peut atteindre jusqu'à 8m en périodes de vives eaux et le volume de la rade peut être renouvelé du tiers de son volume. Cette eau provient de la mer d'Iroise, à l'ouest de la rade de Brest.

Trois cycles contraignent les évolutions de température et de salinité (Delmas, 1981) : (i) une variation semi-diurne liée à l'alternance pleine mer, basse mer, d'environ 12h15 qui influe directement sur les maximum (marée haute) et minimum (marée basse) de salinité (figure II.4), (ii) une variation bimensuelle du cycle vives eaux, mortes eaux de 14,7 jours engendrant une homogénéisation de la colonne d'eau en période de vives eaux et une stratification en période de mortes eaux, et (iii) un cycle annuel en lien avec les états hydrologiques de l'Aulne et l'Elorn qui, en période de crue, peuvent apparenter la rade de Brest à un estuaire avec des diminutions drastiques de la salinité des eaux de surface (figure II.4).

Le bassin Nord de la rade de Brest peut être dissocié du bassin Sud sous influence majeure de l'Aulne (Le Jehan et Tréguer, 1985). L'agglomération de Brest augmente artificiellement les concentrations en azote dissous total dans la partie Nord (Le Jehan et Tréguer, 1984). Les eaux de ces deux bassins se mélangent avec celle venue de la mer d'Iroise dans une zone spécifique située entre les points d'Armorique, de Lanvéoc et la jetée sud du port de commerce (CNEXO, 1977; Delmas, 1981).

La production primaire est importante dès le mois d'Avril sous l'effet de bloom successifs (Delmas et Tréguer, 1983). Les concentrations en chlorophylle *a* (Chl*a*) augmentent dès le mois de Mars et atteignent leur maximum en Avril. (Birrien, 1991). Ces efflorescences phytoplanctoniques récurrentes sont visibles sur la figure II.5 où les maxima annuels sont supérieurs à 2µg.L⁻¹ ces dix dernières années. Ces blooms phytoplanctoniques interviennent relativement tôt du fait d'une stratification horizontale des eaux de la rade de Brest au printemps

(Cadier, 2016). Par comparaison, le bloom se produit avec deux ou trois semaines de retard dans la colonne d'eau verticalement homogène de la Mer d'Iroise (Le Jehan et Tréguer, 1984).

Le bloom phytoplanctonique dans la rade de Brest est corrélé à une chute rapide des sels nutritifs (Delmas et Tréguer, 1983). Les premières fortes marées d'automne permettent le renouvellement partiel des stocks de nutriments *via* une homogénéisation momentanée de la colonne d'eau. Un troisième bloom phytoplanctonique, mais de moindre intensité, peut émerger de cet apport nutritif ($>2\mu\text{g L}^{-1}$) (Birrien et al., 1991).

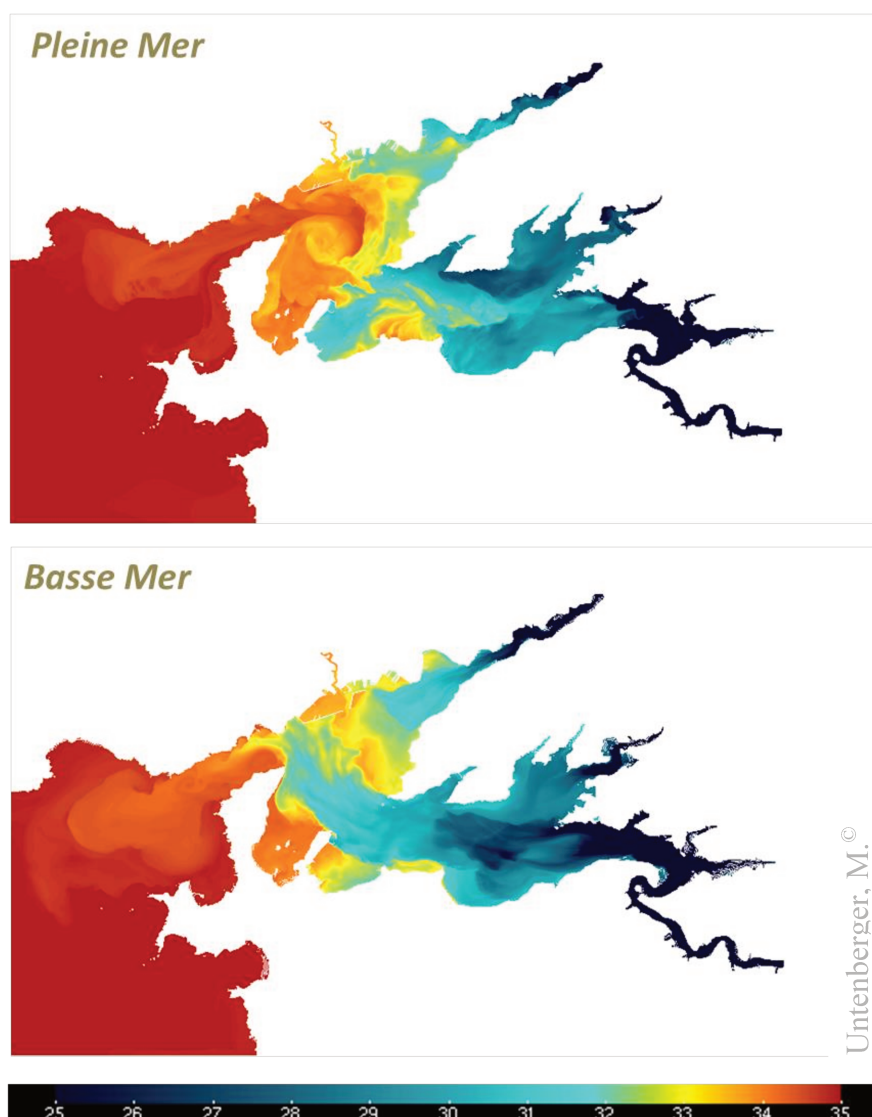


Figure II.4 : Modélisation de la salinité des eaux de surface de la rade de Brest à pleine et basse mer durant un évènement de crue (Janvier 2015), réalisée à partir du modèle MARS3D (Ifremer) en configuration MARC sur Python®. La résolution horizontale est de 50 m et la résolution verticale est de 30 niveaux sigma.

Les blooms phytoplanctoniques sont constitués principalement de diatomées (*Chaetoceros. Sp.*) dans des proportions >40% (Morin et al., 1989) et associées à de forts taux d'absorption des nitrates (Cadier, 2016). En période estivale l'activité phytoplanctonique, plus faible, est basée sur les formes régénérées de l'azote (55% de l'absorption d'azote total ; (L'Helguen et al., 1997). La diversité spécifique du phytoplancton est alors plus importante avec moins de diatomées (<40%, Morin et al., 1989) remplacées par des cellules plus petites (i.e. picoplancton, Landeira et al., 2014) comme les dinoflagellés (Morin et al., 1989; Cadier et al., 2017). L'activité bactérienne est principalement basée sur la MOP phytoplanctonique au printemps et en été avant de se spécialiser dans l'utilisation de la MOP sédimentée et estuarienne en automne et en hiver (Le Jehan et Tréguer, 1984). Environ 20% des bactéries sont considérées comme actives en automne contre <5% en hiver (Jacq et al., 1985).

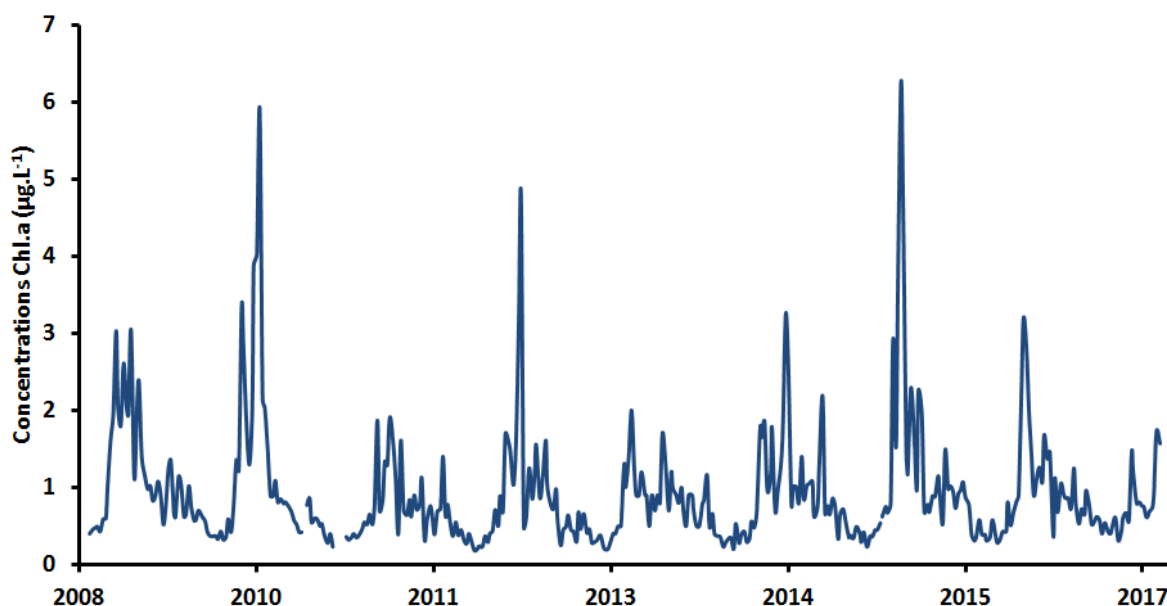


Figure II.5 : Succession annuelle des efflorescences phytoplanctoniques dans la rade de Brest de 2008 à 2017, suivies par la mesure des concentrations en chlorophylle *a* (Chl*a*). Les maxima de chaque année sont mesurés entre les mois de Mars et Mai. (Données du Service d'Observation du Milieu Littoral)

II.1.4. La mer d'Iroise

La rade de Brest fait partie d'un ensemble de milieux naturels marins de l'ouest de la Bretagne qui comporte, entre autre, la baie de Douarnenez et la mer d'Iroise. Les interactions entre ces milieux varient d'une saison à l'autre. En été, un système de front thermique apparait au large du Finistère (figure II.6). Ces fronts matérialisent trois zones distinctes :

- Une zone côtière à l'intérieur du front interne de l'Iroise caractérisée par des eaux chaudes, stratifiées et légèrement dessalées, englobant la rade de Brest, son goulet et la baie de Douarnenez.
- Une zone intermédiaire, centrée sur la mer d'Iroise, des îles de Sein à Ouessant, occupée par une masse d'eau plus froide et homogène venant de la Manche (Altazin-Pichon, 1981; Morin et al., 1993). Les caractéristiques de température (10,3 – 14,5 °C) et de salinité (34,7 – 35,3) de cette eau ne sont pas stables sur l'année (Delmas, 1981).
- Les eaux stratifiées du plateau continental séparées des eaux de l'Iroise par un front thermique entre Ouessant et Audierne ; dit front d'Ouessant.

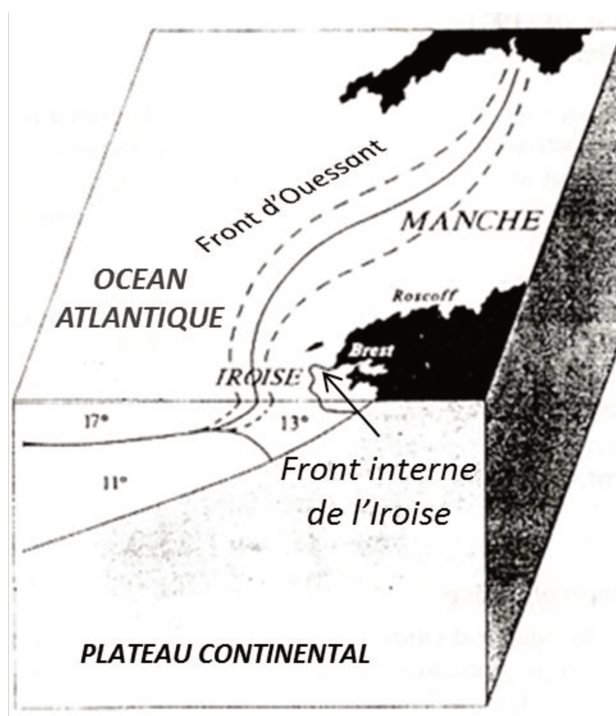


Figure II.6 : Représentation schématique des fronts thermiques de la mer d'Iroise. Le front interne de l'Iroise, le plus à l'est et le front d'Ouessant avec sa zone de balancement en pointillés (Extrait et adapté de Morin et al., 1993).

La profondeur de la Mer d'Iroise entre Ouessant et la pointe du Finistère ne dépasse pas les 60 m. En profondeur, les forts courants de marée entrent en interaction avec la topographie du plateau continental et remontent la colonne d'eau, ne permettant pas de stratification horizontale (Mariette, 1983). Cette instabilité retarde le développement rapide d'un bloom phytoplanctonique au printemps, comparé avec la rade de Brest, mais la disponibilité continue en nutriments permet de maintenir une activité phytoplanctonique, dominée par les diatomées

(Cadier et al., 2017) importante durant tout l'été (environ $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Chla) avec un pic en Mai ($>2 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Wafar et al., 1983). Le brassage permanent permet une utilisation immédiate de la MO par les bactéries, responsables de taux de concentrations en ammonium importants durant l'été ($> 0,5 \mu\text{g.N.L}^{-1}$) (Wafar et al., 1983; Maguer et al., 1999).

Au printemps et en été, les eaux côtières, notamment celles de la rade de Brest, sont isolées des eaux du plateau continental. A chaque marée, l'eau marine pénétrant en rade Brest provient de cette masse d'eau plus froide de la mer d'Iroise. En hiver, les fronts thermiques disparaissent. Les eaux du plateau continental se mélangent avec celles venues de la Manche dans la mer d'Iroise (Delmas, 1981).

II.2. Prélèvements

Lors de cette étude, deux types de prélèvements ont été effectués : (i) dans le gradient salé de l'estuaire de l'Aulne, entre l'écluse de Port-Launay et le goulet de la rade de Brest, à différentes périodes hydrologiques ; et (ii) à un point fixe à l'entrée de la rade de Brest, sous influence côtière et océanique, à basse fréquence.

II.2.1. Prélèvements dans l'estuaire de l'Aulne et traitement des échantillons

Sept campagnes de prélèvements dans l'estuaire ont été réalisées le long du gradient de salinité entre Janvier 2017 et Novembre 2018. L'échantillonnage s'est fait par ordre croissant de salinité, à marée descendante. Seize points de prélèvements ont été choisis en fonction de la salinité pour couvrir au mieux la zone du gradient salé (figure II.7). De façon à s'affranchir d'un potentiel effet « marée », les différentes campagnes de prélèvements ont été réalisées avec des coefficients de marée moyens compris entre 57 et 73. Les campagnes ont été programmées à diverses périodes du cycle hydrologique (début et apogée de la crue annuelle ainsi que période d'étiage) et biologique (bloom phytoplanctonique au printemps) de l'Aulne (figure II.8).

Les mesures de salinité et de température ont été effectuées avec une sonde multi-paramètres (HANNA, HI 9828). Les précisions des mesures sont de $\pm 0,01$ pour la salinité et de $\pm 0,015 \text{ }^\circ\text{C}$ pour la température. Les prélèvements ont été effectués en subsurface (0,5m) directement dans des flacons en verre Schott de 500mL préalablement grillés à 450°C pendant

4 heures. Dans le but d'éviter la contamination des échantillons, des gants en plastique de 92 cm (Polysem®) ont été utilisés. Du fait de la relative courte durée des prélèvements (2-3h) et de la difficulté d'effectuer des filtrations à bord du bateau (Hésione, navire de station IUEM – UBO), les échantillons ont été stockés à l'abri de la lumière après prélèvement puis filtrés sur filtres GF/F (0,7µm de porosité) préalablement grillés (450°C pendant 4h), dès l'arrivée au laboratoire. L'ensemble du matériel de prélèvement et de filtration utilisé, a été rincé trois fois à l'eau acidifiée pH ~ 2 (HCl 10⁻² M, qualité suprapur Merck®) puis trois fois à l'eau ultra pure et enfin une fois avec l'échantillon. L'eau utilisée pour tous les rinçages était de qualité ultra pure (Eau Milli-Q, Element system®). Les filtres ont été placés dans des piluliers en verre préalablement grillés puis conservés au congélateur pendant plusieurs mois avant d'être analysés pour l'analyse élémentaire (voir tableau II-1).

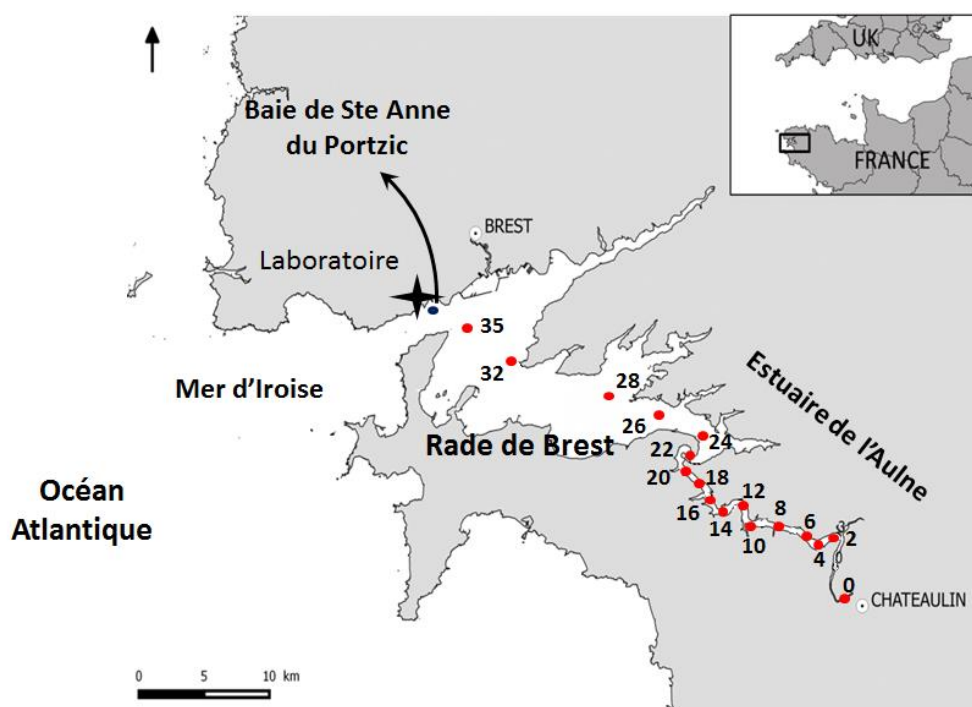


Figure II.7 : En rouge, exemple de stations de prélèvements d'une campagne en estuaire. En bleu, point de prélèvement du suivi hebdomadaire des eaux de la rade de Best

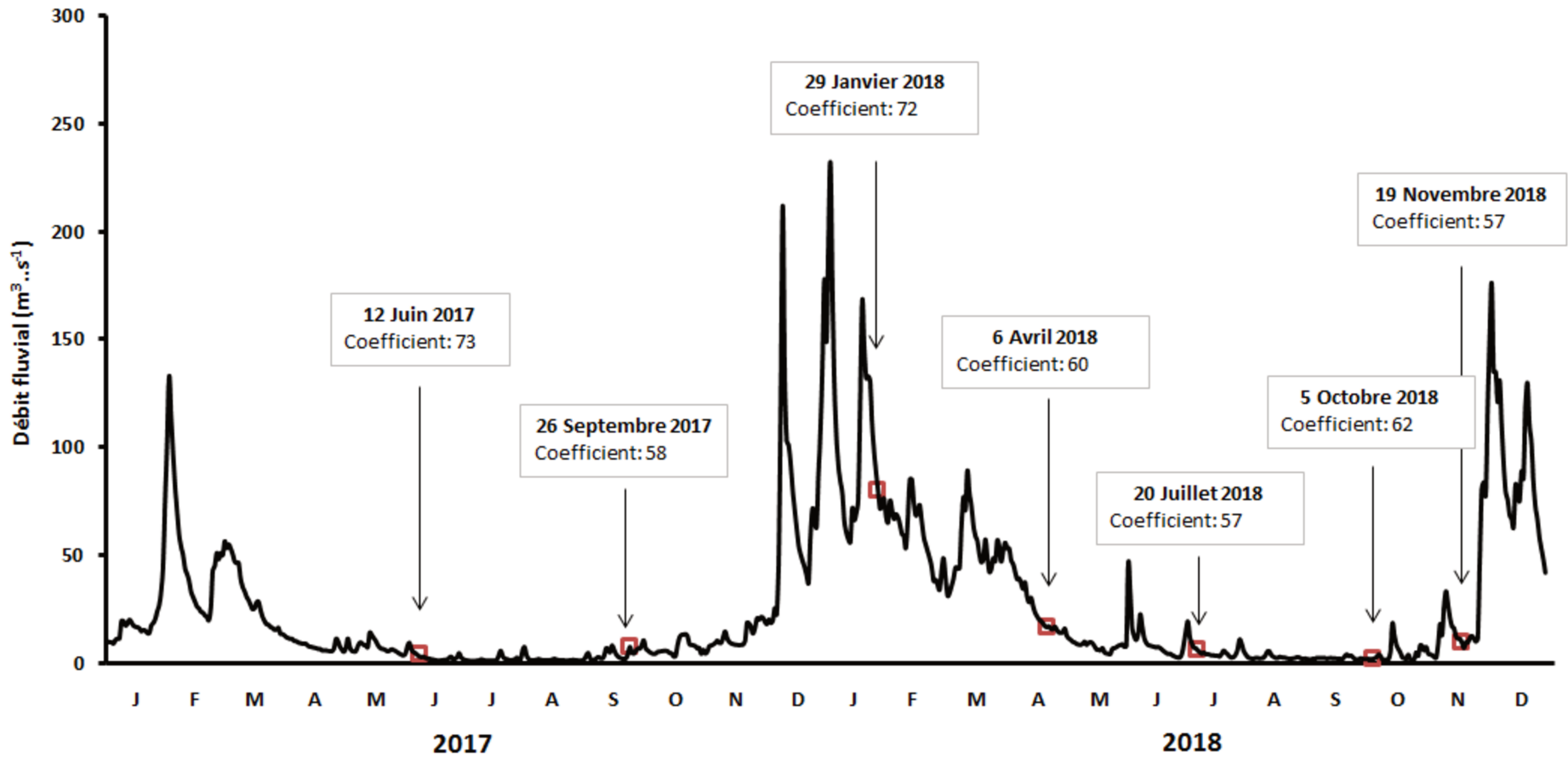


Figure II.8 : Hydrologie de l'Aulne en 2017 et 2018. Les sept campagnes et les coefficients de marées correspondants sont indiqués par un encadré rouge directement sur la courbe de l'évolution du débit en $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

II.2.1. Prélèvements et traitements des échantillons de la rade de Brest

Les prélèvements dans la rade de Brest ont été effectués à la station du *Service d'Observation du Milieu Littoral* (SOMLIT) dans la baie de Sainte Anne du Portzic au niveau du goulet de Brest (figure II.7) de Février 2017 à Décembre 2018. L'échantillonnage hebdomadaire a été réalisé à marée haute et à des coefficients de marée compris dans un intervalle de 50 à 70. Les 90 échantillons ont été prélevés à 1m de profondeur avec une bouteille de prélèvement de type Niskin[®]. Ils sont stockés dans des flacons en verre préalablement grillés (450°C pendant 4h), rincés à l'eau ultra pure puis trois fois avec l'échantillon. Les flacons ont été stockés à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse, moins d'une heure après le prélèvement. Lors de chaque prélèvement, la température et la salinité ont été mesurées *in situ* grâce à une sonde CTD (Conductivity Temperature Depth) *SBE19 plus* calibrée tous les deux ans. Les précisions pour ces deux paramètres sont de $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ et ± 0.01 , respectivement.

II.3. Analyses des paramètres hydrologiques et biologiques du réseau SOMLIT

L'étude de l'évolution de la MOD dans la rade de Brest a été réalisée sur le site de Sainte Anne du Portzic à la même fréquence d'échantillonnage que le suivi hydrologique hebdomadaire organisé par le service d'observation du milieu littoral (SOMLIT). Le tableau II-1 compile les principales caractéristiques de l'analyse des paramètres utilisés dans cette étude.

Tableau II-1 : Détails de l'analyse des paramètres physico-chimiques analysées par SOMLIT et utilisés dans ce travail. L'ensemble des prélèvements et des analyses a été réalisé en duplicat, à l'exception du paramètre pH. La référence utilisée pour la mise en place de ces analyses est (Aminot et Kérrouel, 2004).

Paramètre	Flacon	Volume échantillonné	Filtration	Stockage	Conservation	Nom de la méthode d'analyse	Précision
Oxygène dissous	en verre à doigt plongeant	180 mL	Non	Rodage immergé et à l'abri de la lumière	1-2mois	Winkler	± 0,1%
pH	en verre	250 mL	Non	Sans contact avec l'air et à l'abri de la lumière	Dosage immédiat	Mesure électrochimique	± 0,1-0,2
Ammonium NH₄⁺	en verre Schott [®] décontaminé	80mL	Non	-20 °C	2-3 mois	Colorimétrie sur analyseur automatique	± 3-5%
Nitrates NO₃²⁻ Nitrites NO₂⁻ Phosphates PO₄³⁻ Silicates SO₄²⁻	en plastique HDPE	1L	0,4µm polycarbonates	125 mL filtrés dans des flacons (Nalgène) à -20°C 125 mL filtrés dans des flacons (Nalgène) à +4°C	2-3 mois	Colorimétrie sur analyseur automatique	± 5-10%
Matière en suspension	en plastique HDPE	2L	0,7µm GF/F Whatmann [®] (47mm) grillés (4h, 450°C) et rincés à l'EMQ	filtres séchés à l'étuve (60°C) pendant 24h minimum	2-3 mois	Pesée	± 0,1%
Matière particulaire (COP/NOP)	en plastique HDPE	500mL	0,7µm GF/F Whatmann [®] (25mm) grillés (4h, 450°C)	filtres séchés dans des flacons en verre	6-12 mois	Analyseur élémentaire "CHN"	± 5%
Chlorophylle a	en plastique opaque	500mL	0,7µm GF/F Whatmann [®] (25mm) grillés (4h, 450°C)	filtres congelés à -80°C	2-3 mois	Spectrophotométrie	± 5%

II.4. Analyse globale sélective de la matière organique dissoute

II.4.1. Chromatographie d'exclusion stérique à multi-détection

Le système de chromatographie d'exclusion stérique couplée à trois détecteurs (carbone, azote et UV) - appelée SEC-mDEC par la suite - utilisé dans cette étude est construit par la compagnie DOC-Labor® (Allemagne). Cet outil a été développé afin de caractériser la MOD dans le cas particulier du traitement de l'eau et permet la mesure du carbone organique, de l'azote ainsi que de l'absorbance UV à 254nm. Bien que la SEC-mDEC ait été utilisée avec succès pour l'analyse de la MOD des eaux naturelles, son utilisation en étude environnementale reste rare aussi bien dans les eaux douces (Huber et al., 2011; Chen et Hur, 2015; He et al., 2016; Marie et al., 2017) que dans les eaux marines (Dittmar et Kattner, 2003; Baghoth et al., 2008; Penru et al., 2013). Dans cette étude l'adaptation de cette technique analytique aux milieux estuarien et marin a fait l'objet d'un développement analytique qui est détaillé dans le chapitre III. Seul le principe de la méthode sera présenté ci-après.

II.4.1.1. Principe

Le principe de la SEC-mDEC repose sur la séparation des composés en six classes de tailles, variant de plus de 10 000 Da à moins de 350 Da, par deux colonnes d'exclusion stérique. Sont alors définis par ordre croissant de temps de rétention, les biopolymères (BP), les substances humiques (SH), les building-blocks (BB), les molécules de faibles poids moléculaires acides (LMWA) et les molécules de faibles poids moléculaires neutres (LMWN).

Des flacons d'environ 15 mL préalablement grillés à 450°C sont utilisés pour placer les échantillons dans un passeur d'échantillon (PS 61 FIA – mle.dresden.com). Une boucle d'injection permet d'injecter jusqu'à 4 mL de l'échantillon. Le volume injecté est ensuite poussé dans le circuit par la phase mobile à un débit de 1,5 mL /min. Cette phase mobile est constituée d'un tampon phosphates (pH = 6.85, 7.5g Na₂HPO₄ (EMSURE® - 99.5+%) + 12.5 KH₂PO₄ (EMSURE® - 99.5+%) dans 5L d'eau ultrapure (Eau Milli-Q, Element system). Elle est purifiée de toute contamination en carbone organique par irradiation au sein d'un réacteur UV (DOCOX Reactor, figure II.9). Avant son passage au travers des colonnes d'exclusion stérique, l'échantillon est filtré sur des filtres (Polyether sulfone ; PES, Sartorius®, Germany)

de 0,45 µm de porosité. Les différentes classes de composé sont ensuite séparées par passage au travers de deux colonnes chromatographiques montées en série (250mm x 20mm, TSK HW 50S, Tosoh, Japan, (figure II.9). Il s'agit de colonnes type échangeuses de cations faibles, composées d'un gel de polyméthacrylate. Le choix d'utiliser deux colonnes chromatographiques en série a été fait par anticipation à l'analyse en matrice salée, la séparation des différentes classes des composés étant supposée plus délicate en raison de la contraction du signal des chromatogrammes. En contrepartie d'une meilleure séparation des classes de composé le temps d'analyse est allongé, trois à quatre heures environ, pour chaque échantillon dans notre cas.

La détermination du COD se fait par l'intermédiaire d'un circuit parallèle aux colonnes chromatographiques, le « bypass » (figure II.9). Une fraction de 10% de l'échantillon injecté ne passera pas au travers des colonnes et son signal apparaîtra entre 5 et 10 minutes de temps de rétention sur les chromatogrammes (figure II.10). Le logiciel prend en compte les fractionnements de l'échantillon durant l'analyse pour donner la valeur de COD global de l'échantillon à partir de l'aire du pic.

Au cours de son trajet, l'échantillon est d'abord analysé par un premier détecteur UV non destructif (UVD Knauer S200) dont la mesure est effectuée à une longueur d'onde de 254 nm, particulièrement adaptée pour l'identification des structures insaturées (figure II.9). L'aromaticité de certaines fractions (échantillon global : SUVA ; et SH) est déterminée par le logiciel en faisant le rapport entre l'absorbance spécifique à 254 nm , déterminée par le détecteur UV, et la concentration en carbone, déterminée par le détecteur de carbone organique par la suite. Après le détecteur UV, l'échantillon est de nouveau séparé en deux fractions ; 10% servent à l'analyse du contenu en azote ; le reste permet la quantification du carbone organique.

La détermination du contenu en azote de l'échantillon est effectuée à l'aide d'un réacteur UV (DOCOX-reactor, figure II.9) qui oxyde l'azote organique dissous (NOD) ou l'azote réduit (NH_4^+ , NO_2^-) en nitrate. Le nitrate produit est ensuite quantifié par un détecteur UV (OND Knauer Azura 2.1S) à une longueur d'onde de 220nm.

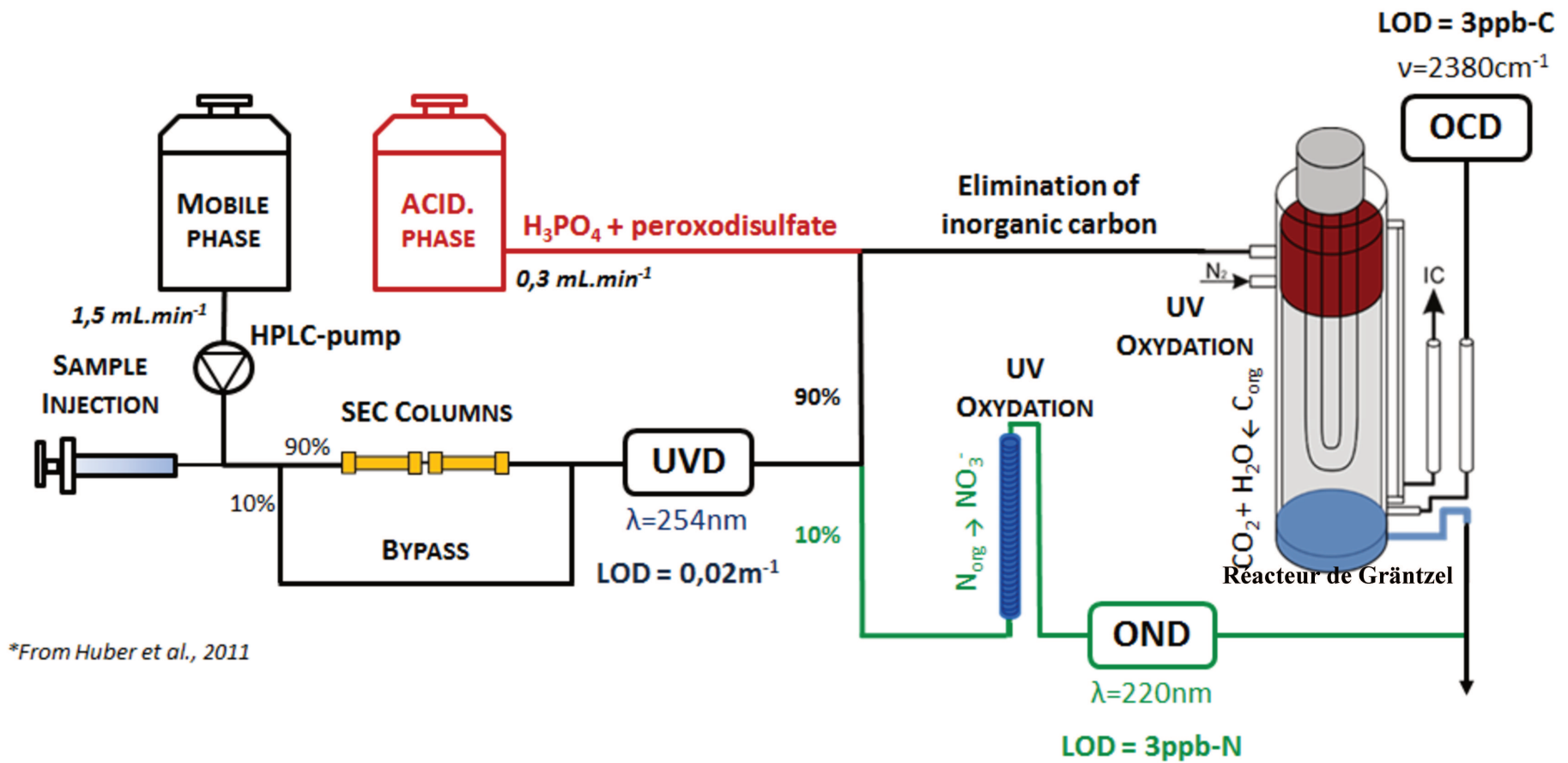


Figure II.9: Schéma conceptuel de la SEC-mDEC. D'après Huber et al. 2011.

La détermination du carbone organique dissous (COD) se fait dans le réacteur de Gräntzel, un cylindre de quartz au centre duquel se trouve une lampe UV fonctionnant à 185nm. La rotation de ce cylindre permet la dispersion de l'échantillon sur toute sa surface, ralentissant ainsi sa chute et favorisant l'oxydation de la MOD en CO₂. Préalablement, une solution acide (2.5g de peroxodisulfate (Alfa Aesar – 97%) + 20mL d'H₃PO₄ (EMSURE® - 85%,) dans 5L d'eau Milli-Q) est ajoutée (figure II.9) à un débit de 0.3mL.min⁻¹, dans le but d'éliminer le carbone inorganique. Le dioxyde de carbone (CO₂) produit par l'acidification est éliminé dans la partie supérieure du réacteur de Gräntzel (figure II.9).

La réaction d'oxydation du COD est une réaction radicalaire initiée par la formation d'OH· produit par action du rayonnement UV sur l'eau au cœur du réacteur (Huber et Frimmel, 1996). Cette réaction est catalysée par le peroxodisulfate présent dans la solution acide ajoutée précédemment, en amont. Le CO₂ formé est transporté par un gaz porteur (Azote U - N₂ - 99.995+%) jusqu'à un détecteur infrarouge (IR) (NDIR ABB A2020). Sa quantification est effectuée dans une gamme de longueurs d'onde variant de 3 à 8 μm (infra-rouge).

II.4.1.2. Classes de composés séparés et autres grandeurs

Les résultats de la SEC-mDEC s'acquièrent à partir de chromatogrammes dont l'allure évolue suivant les variations des concentrations des différentes fractions séparées par les colonnes d'exclusion stérique. La figure II.10 présente, à titre d'exemple, un chromatogramme type d'une eau de rivière. Les différentes classes de composés séparés sont identifiées. Il est également possible d'analyser certaines espèces de l'azote ; les nitrates, l'urée et l'ammonium à l'aide du détecteur OND, dans le cas particulier des eaux douces (Huber et al., 2011).

II.4.1.2.a. Analyse globale (carbone organique dissous et SUVA)

La fraction globale de la MOD est déterminée à partir des 10% d'échantillon non-séparés sur les colonnes d'exclusion stérique. Plus communément appelé « bypass », le pic correspondant à cette fraction sort entre 5 et 10 min de temps de rétention (voir figure II.10). Deux grandeurs sont quantifiées à partir des aires correspondants au bypass : (i) le carbone organique dissous (COD), représentatif des concentrations globales en carbone et (ii)

l'absorbance-UV spécifique (SUVA) qui exprime l'aromaticité globale de l'échantillon. Le COD est calculé à partir de l'aire du pic de carbone et est exprimé en $\mu\text{gC.L}^{-1}$. Le SUVA est le rapport entre l'absorbance UV de la fraction globale, déterminée à partir du pic d'absorption UV, et le COD. Il est exprimé en $\text{L} \cdot (\text{mg-C} \cdot \text{m})^{-1}$.

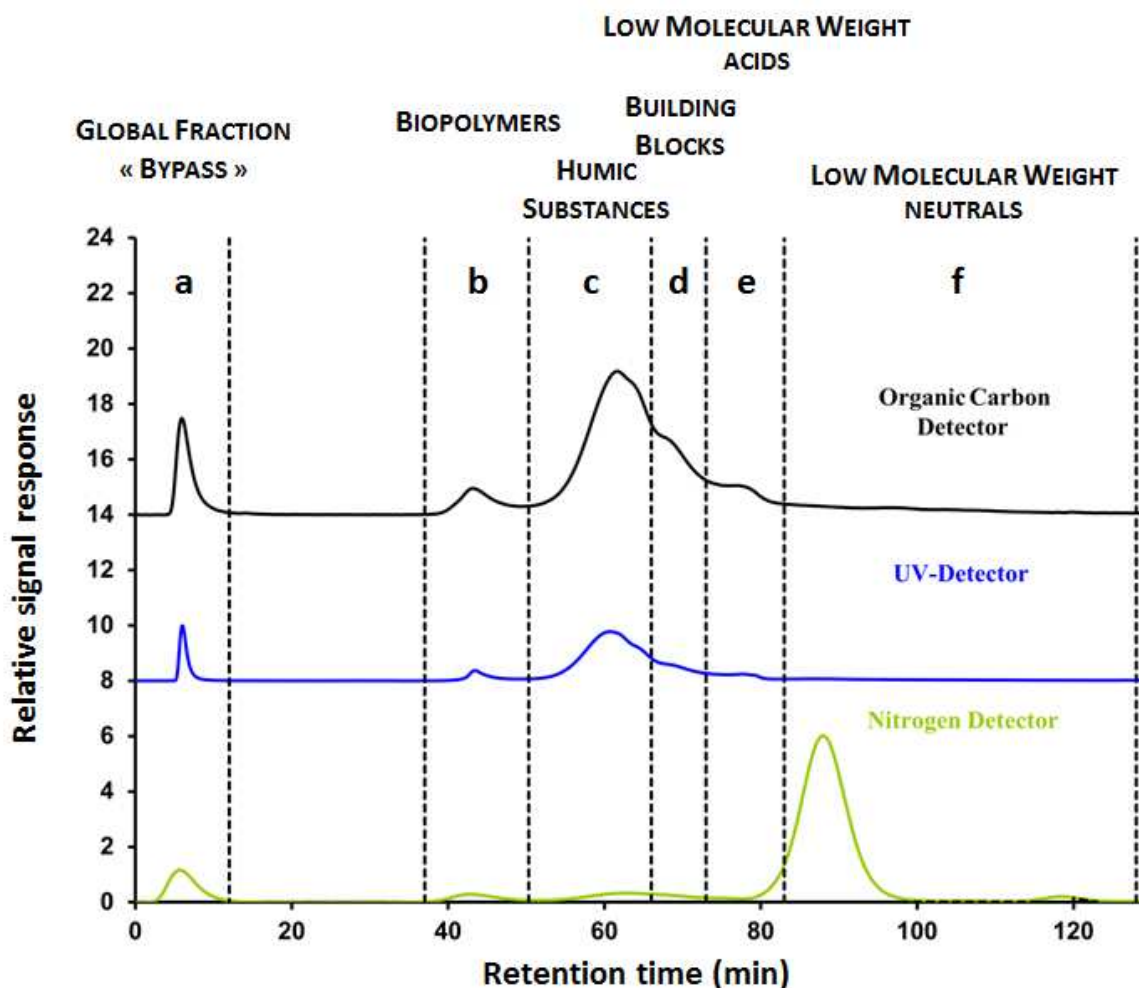


Figure II.10 : Chromatogrammes de carbone, d'UV et d'azote d'un échantillon de la rivière de l'Aulne. Les domaines des rétentions sont rappelés : (a) fraction globale ou « bypass », (b) biopolymères (BP), (c) substances humiques (SH), (d) building-blocks (BB), (e) molécules de petits poids moléculaires acides (LMWA), et (f) molécules de petits poids moléculaires neutres (LMWN).

II.4.1.2.a. Biopolymères

La fraction des biopolymères (BP) est définie par la limite de perméation (ou volume mort) des colonnes d'exclusion stérique (environ 40min). Elle est composée principalement de polysaccharides et de protéines d'une taille supérieure à 10 000 Da. D'après Huber et al. (2011), l'éventuelle réponse UV des BP ne peut être attribuée au contenu organique de la fraction mais

à la présence de « colloïdes inorganiques » comme les hydroxydes de fer. Néanmoins, la réponse de l'UVD est utilisée pour calculer « manuellement » l'aromaticité des BP à l'aide de leurs concentrations en carbone (voir Ch.III). Il est considéré que la réponse du détecteur d'azote est principalement expliquée par son contenu protéique (Huber et al., 2011).

II.4.1.2.b. Substances Humiques

Les substances humiques (SH) composent une part importante de la MOD et sont majoritaires dans les eaux douces (Świetlik et al., 2004; Filella, 2009). Cette fraction a une taille qui varie entre 600 et 1000 Da. Elle est principalement caractérisée par des molécules plutôt hydrophobes qui absorbent les UV. Sur le même principe que la détermination du SUVA, l'aromaticité des SH (arm-SH) est déterminée en faisant le rapport de l'absorbance de la fraction sur sa concentration en carbone. La détermination de la masse moléculaire (M-SH) de cette fraction est également disponible grâce à une calibration de masse. A partir de ces deux grandeurs (arm-SH et Mn-SH), un diagramme des SH proposé par Huber et al., 2011 peut être tracé. Ce diagramme permet de classer les SH selon un continuum d'humification qui va de petites structures peu aromatiques typiques des acides fulviques aquagéniques, jusqu'aux structures plus grandes et très aromatiques typiques des acides humiques terrigènes (figure II.11).

II.4.1.2.a. « Building-Blocks »

Les building-blocks (BB) sont de même nature que les substances humiques. Sur la base d'expérimentations de dégradation des substances humiques par sonication, Huber et al., 2011 ont proposé de considérer ces substances organiques comme des sous-produits de dégradation de ces dernières ou des substances humiques de plus petites tailles que leur fraction nominative (Huber et al., 2011). La taille de cette fraction varie entre 350 et 600 Da.

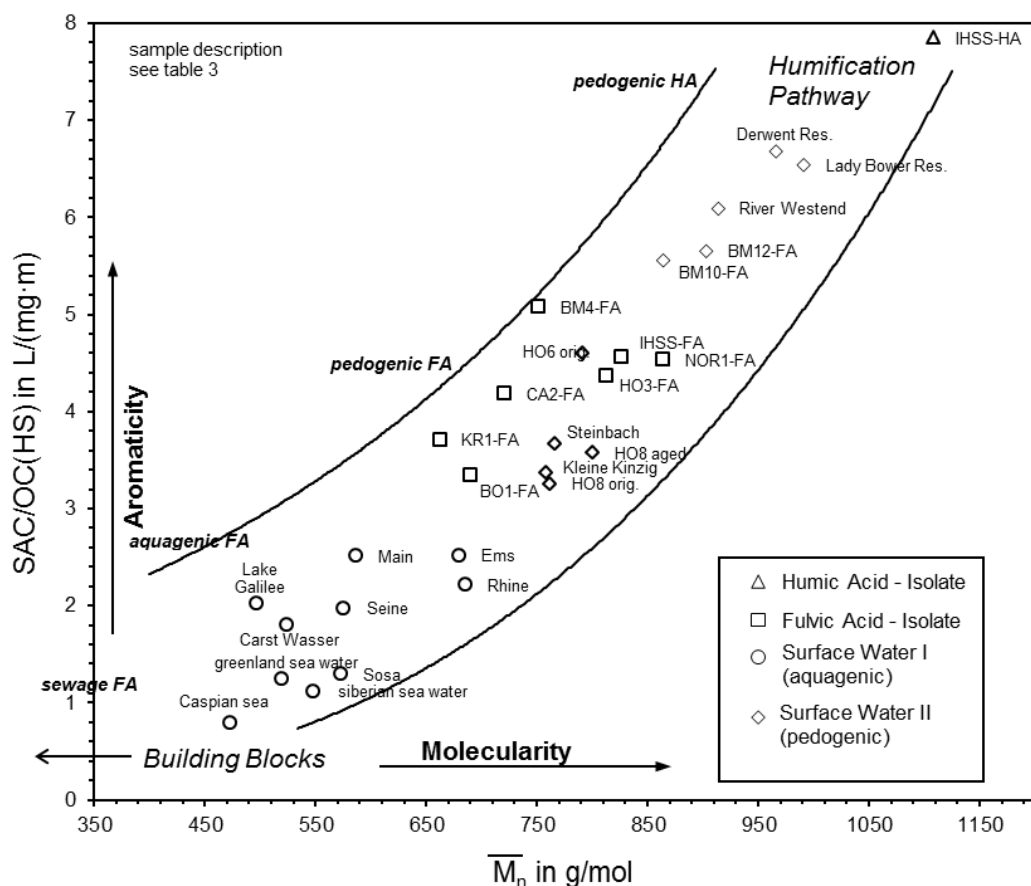


Figure II.11 : Continuum d'humification tel que proposé par le diagramme des SH dans Huber et al., 2011.

II.4.1.2.b. Molécules de petits poids moléculaires acides et neutres

Ces deux fractions sont constituées de composés de petites tailles, inférieures à 350 Da. La fraction des composés de petits poids moléculaires acides (LMWA) est définie par un pic unique situé vers 70min (figure II.10e). Ce dernier résulte de la répulsion par le gel de la colonne des anions de petits poids moléculaires. Le pic résultant, connu sous le nom de « pic d'exclusion de sel » (Swift et Posner, 2006), est représentatif de structures chimiques négativement chargées au pH de la phase mobile comme les acides organiques de petite taille (e.g. acide oxalique, acide malique...). La fraction des LMWA peut aussi être composée de SH de faibles poids moléculaires (LMW-SH). La détermination de la contribution des LMW-SH à cette fraction se fait de manière empirique par le logiciel. La concentration en COD correspondant aux LMW-SH est estimée en multipliant le signal UV de la fraction des LMWA par l'aromaticité des SH.

La fraction des composés de petits poids moléculaires neutres (LMWN) est la fraction la plus étendue en termes de temps de rétention. Elle s'étend de la fin du domaine de rétention des LMWA (70min) jusqu'à la fin de l'analyse. Cette fraction est composée d'un mélange hétérogène de composés (alcools, aldéhydes, cétones, sucres, acides aminés dont les temps de rétention dépendent des interactions hydrophobes avec le gel de la colonne d'exclusion stérique (Hubert et Frimmel, 1996).

II.4.1.2.c. *Carbone organique hydrophobe*

Lors de l'analyse, il peut exister une différence entre la valeur de COD total déterminée à partir du bypass (COD) et la somme des cinq fractions séparées sur les colonnes d'exclusion stérique la fraction hydrophile du COD, (CDOC, Huber et al., 2011). Par opposition avec le CDOC, la fraction retenue sur les colonnes est appelée carbone organique hydrophobe (COH). Le COH quantifie de manière indirecte la fraction de MOD adsorbée sur les colonnes d'exclusion stérique ou qui élue très lentement par interactions hydrophobes sur le gel des colonnes d'exclusion stérique (Huber et al., 2011).

II.4.1.3. Domaine de perméation

Le domaine de perméation d'une colonne d'exclusion stérique permet de définir les capacités de séparation propres à la colonne. Ce domaine est compris entre le volume d'exclusion du gel, limite pour laquelle les molécules sont trop grandes pour être séparées, et le volume de perméation totale au-delà duquel les molécules sont trop petites et élue toutes en même temps. Ces diagrammes sont construits avec le rapport V_e/V_c (V_e = volume d'élution ; V_c = volume des colonnes) en abscisses et le logarithme de la masse molaire en ordonnées.

Le constructeur des colonnes d'exclusion stérique (TOYOPEARL®) qui équipent la SEC-mDEC a établi ce diagramme pour un mélange de protéines dans des conditions proches de celles utilisées dans ce travail (phase mobile : $0,06\text{mol.L}^{-1}$, pH tampon phosphate = 7,0). Sur la figure II.12a, le domaine de perméation est compris entre $V_e/V_c = 0.35$ et $V_e/V_c = 0.72$.

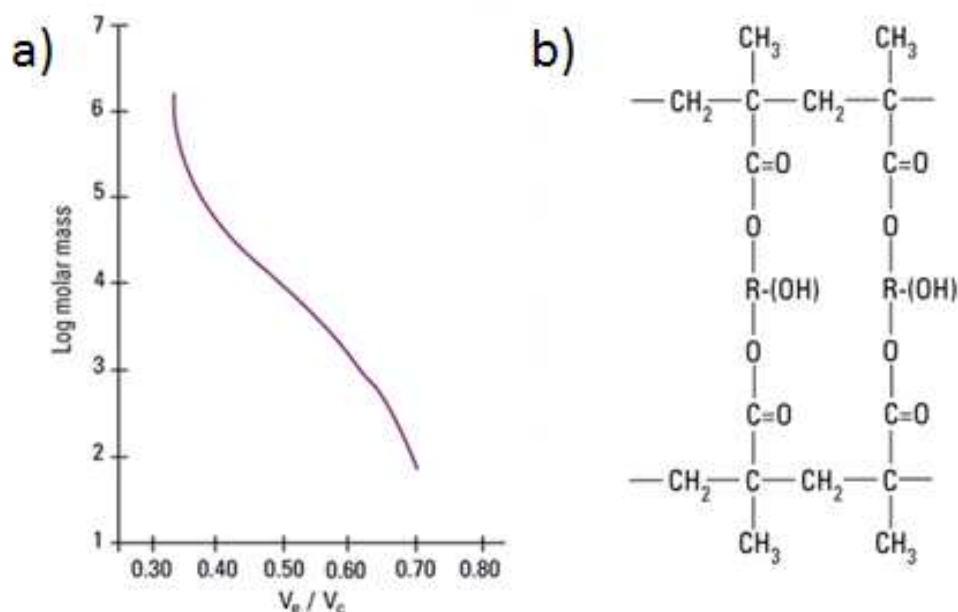


Figure II.12 : (a) Domaine de perméation (1 colonne) du constructeur des colonnes d'exclusion stérique utilisées dans l'appareillage de la SEC-mDEC. Le diagramme a été tracé à partir d'un mélange de « standards de protéines » (protein standards); (b) Structure de la résine d'exclusion stérique selon le fabricant des colonnes. (Extraits du site du constructeur: Toyopearl®)

Si l'on considère les dimensions des colonnes et le débit interne effectif qui passe par les colonnes ($1,35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), le domaine de perméation en termes de temps de rétention est compris entre 59 et 122 min. Or, des analyses de composés pures réalisées au cours de ces travaux de thèse (figure II.13a) mais aussi lors du travail de développement analytique d'Huber et al., (2011) (figure II.13b) ont démontré que le domaine de perméation de la colonne pouvait aller de 40 min à 206 min, soit des V_e/V_c compris entre 0,28 et 1,2.

Les figures II.13a et II.13b présentent les diagrammes de perméation réalisés lors de ce travail et celui tracé à partir des données d'Huber et al. (2011). Dans le diagramme II.13a, l'amidon, dont le poids moléculaire atteint 100kDa, marque la limite haute d'exclusion de gel à $V_e/V_c=0,28$ (40min). Ensuite, le domaine de perméation sélective est tracé à partir de composés de poids moléculaires variant de 60kDa pour l'albumine de sérum bovin (BSA) jusqu'à 700 Da pour le standard international « Suwanee River Fulvic Acid » (SRFA). Cependant, à l'inverse des données constructeur, le domaine de perméation sélective expérimental (fig II.13b) ne présente pas de limite de perméation totale. Les molécules de petits poids moléculaires éluent sur une grande gamme de temps de rétention allant de 70,3min ($V_e/V_c = 0,46$) à 159,7min ($V_e/V_c = 1,15$).

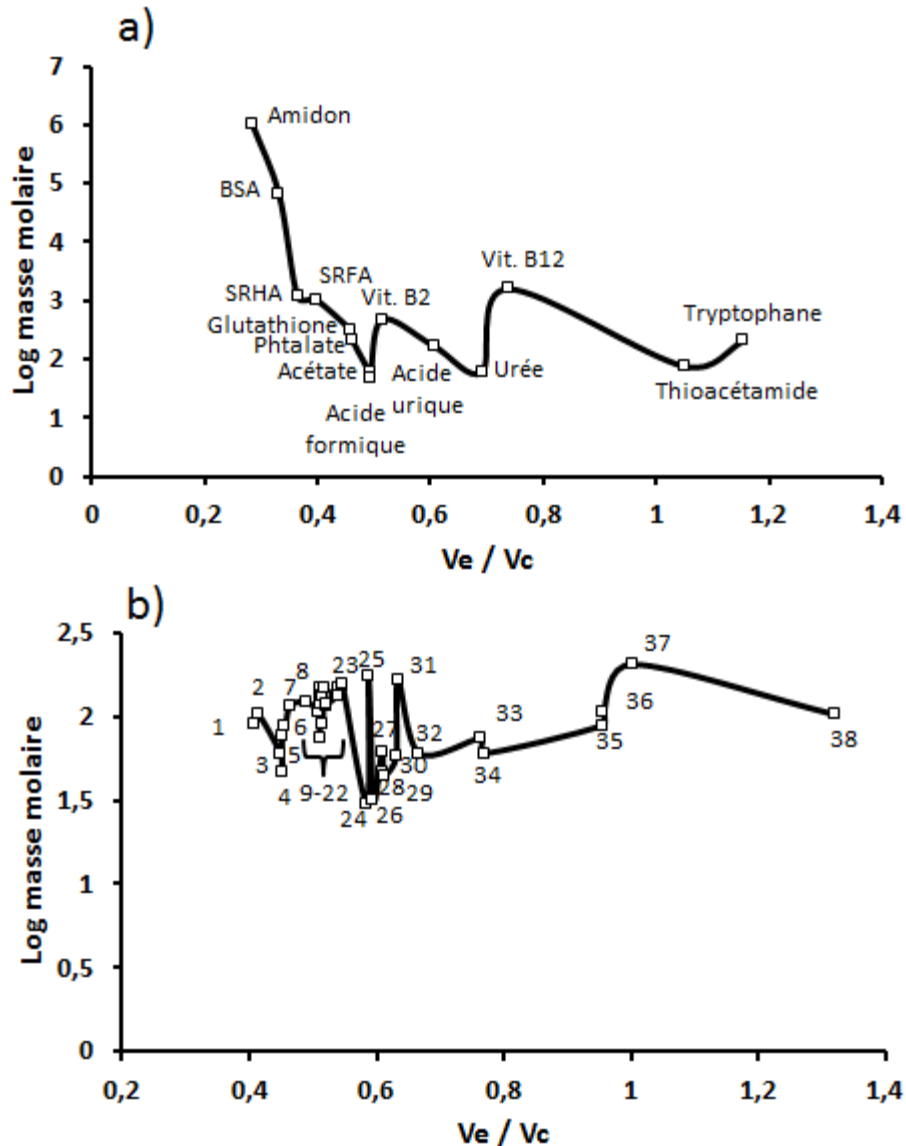


Figure II.13 : Domaines de perméation (a) réalisé lors de ces travaux (2 colonnes); et (b) tracé à partir des données de *Huber et al., 2011* (1 colonne). Dénomination des standards : 1:acide oxalique, 2: acide malonique, 3: acide acétique, 4: acide formique, 5 : acide glycolique, 6 : acide pyruvique, 7 : acide caproïque, 8 : cystéine, 9 : serine, 10 : glycine, 11 : théronine, 12 : glutamine, 13 : asparagine, 14 : alanine, 15 : asparagine, 16 : glutamine, 17 : proline, 18 : valine, 19 : isoleucine, 20 : lysine, 21 : leucine, 22 : méthionine, 23 : histidine, 24 : formaldéhyde, 25 : arginine, 26 : méthanol, 27 : éthanolamine, 28 : éthanol, 29 : acétaldéhyde, 30 : acétone, 31 : phénylalanine, 32 : n-propanol, 33 : butanol, 34 : éthylènediamine, 35 : pentanol, 36 : benzylamine, 37 : tryptophane, 38 : hexanol.

Cette particularité peut également s’observer dans le travail d’Huber et al., (2011). Les auteurs avaient injecté 38 composés de petits poids moléculaires (fig II.13b). Le diagramme de perméation tracé à partir de ces données présentent des temps de rétention s’étendant de 63,6 min ($V_e/V_c=0,38$) à 206 min ($V_e/V_c=1,2$). L’absence de limite de perméation totale est expliquée par les interactions entre le gel polymétacrylate hydrophobe des colonnes et les composés de petits poids moléculaires (Huber et Frimmel, 1996 ; Huber et al., 2011) (figure

II.12b). Les composés neutres ou cationiques peuvent être retenus par des interactions de type Van der Waals avec les chaînes alkyles du gel des colonnes (groupements R sur la figure II.12b), rendant la famille des LMWN dispersés sur de très grands temps de rétention (>100min). Lorsque ces interactions sont très fortes, les composés peuvent rester adsorbés sur le gel d'exclusion stérique et former la fraction du carbone organique hydrophobe (Huber et al., 2011).

II.4.1.4. Traitement des données

L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés avec le logiciel ChromCALC développé par les constructeurs de l'appareillage (DOC-LABOR, Karlsruhe, Allemagne).

Le principal enjeu du traitement du signal analytique repose sur l'intégration de pics co-élués. La modélisation des différentes fractions se fait *via* une procédure semi-automatique de déconvolution de pic qui nécessite la définition de bornes. Cette étape délicate est illustrée par la figure II.14.

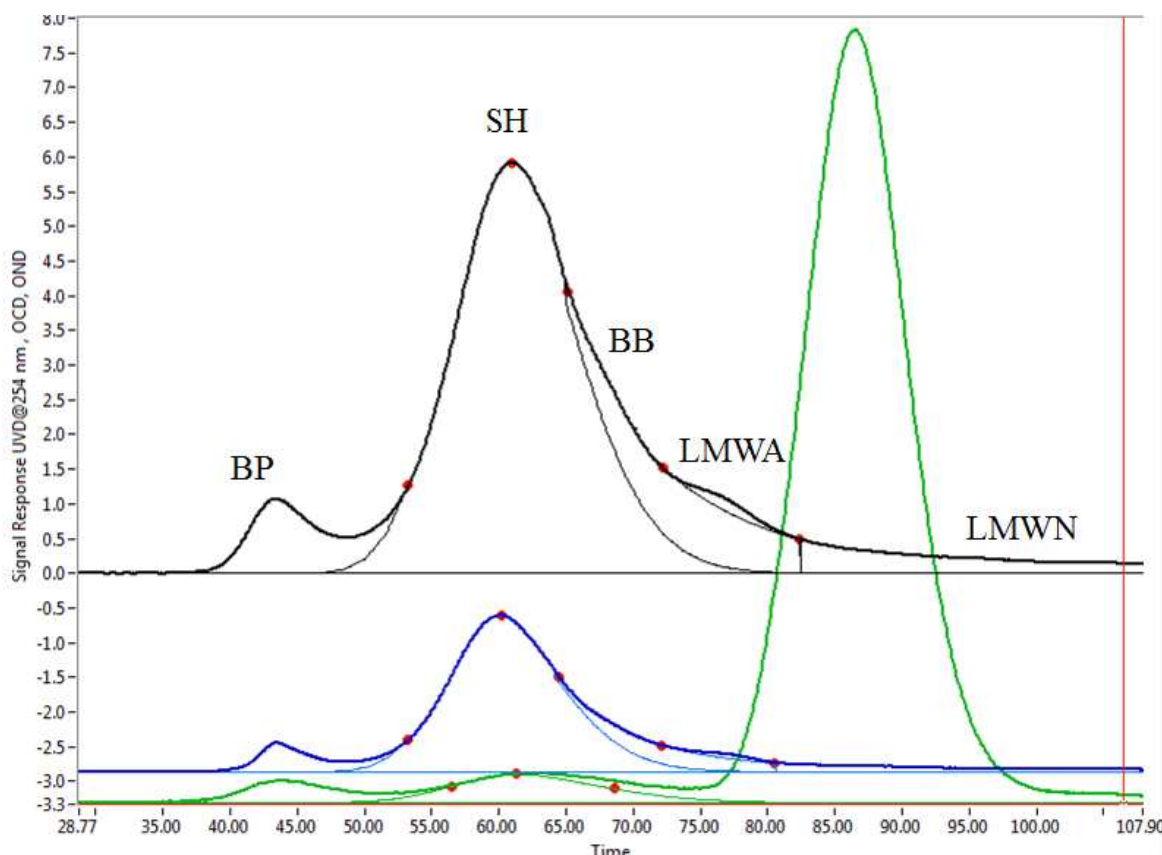


Figure II.14 : Placement des bornes permettant de résoudre les fractions de la MOD séparées par SEC-mDEC lors de l'intégration.

Le tableau II-2, ci-après, présente les résultats de l'analyse globale et semi-spécifique de la MOD de l'échantillon correspondant au chromatogramme de la figure II.14. Il est divisé en trois parties. La colonne de gauche (a), présente le résultat en pourcentage et en ppb ($\mu\text{g/L}$) de C de l'analyse globale (DOC). On observe également des concentrations en carbone hydrophile (CDOC) et en carbone hydrophobe (HOC).

La deuxième colonne (b) présente les résultats obtenus pour l'analyse semi-spécifique des cinq classes de composé séparées. Pour la fraction dite des « biopolymères », en plus de la concentration en COD sont présentées les concentrations en NOD, les rapports N/C et le pourcentage des protéines dans les biopolymères (estimé à partir du rapport C/N). Les substances humiques sont caractérisées par leur concentrations en COD et en NOD, leur rapport N/C, leur aromaticité (exprimé en $L.(mg-C.m)^{-1}$) ainsi que par leur masse molaire moyenne ($g.mol^{-1}$), ce qui permet de définir leur origine à l'aide d'un diagramme aromaticité vs masse molaire (figure II.10). Finalement la dernière colonne (c) donne les valeurs de l'absorbance UV globale de l'échantillon (SUVA) ainsi que des informations concernant la présence des colloïdes inorganiques (signal UV sortant au temps de rétention des BP). Cette valeur d'absorbance en m^{-1} permettra par la suite de calculer une valeur d'aromaticité pour les BP.

Tableau II-2 : Tableau type brut des résultats d'analyse par SEC-mDEC

	a)			b)										c)					
	DOC			Approx. Molecular Weights in g/mol:															
	HOC*		CDOC	>>20.000			~1000 (see separate HS-Diagram)				300-500	<350	<350						
	Dissolve/dydrophob		Hydrophil.	BIO-polymers			Humic Subst.				Building Blocks	LMW	LMW	Inorg. Colloid.	SUVA Global	SUVA-HOC			
	ppb-C	ppb-C	ppb-C	ppb-C	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N	ppb-N		
	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC	% DOC		
Aulne	10160	1661	8498	389	10	0,03	8	3275	110	0,03	5,58	785	A	671	4143	20	1,72	2,99	3,52
	100%	16,4%	83,6%	3,8%	--	--	--	32,2%	--	--	--	--	--	6,6%	40,8%	0,2%	--	--	--

II.4.1.5. Etude du fractionnement chromatographique de la SEC-mDEC

Pour mieux contraindre la composition de certaines fractions et comprendre le processus de fractionnement des colonnes, des composés purs ont été analysés en SEC-mDEC.

II.4.1.5.a. Fraction des biopolymères

La fraction définie comme « biopolymères » est composée de substances biogéniques de haut poids moléculaire définissant la limite d'exclusion des colonnes (Huber et al., 2011). A

ce jour, il n'existe pas d'information sur un potentiel biais dû à l'hydrolyse des protéines ou à la dépolymérisation des polysaccharides qui interviendrait lors de l'élution. En plus d'entraîner la sous-estimation des concentrations en BP, cela augmenterait artificiellement la part des fractions de plus petits poids moléculaires.

Pour étudier ces processus deux composés représentatifs des molécules constituant cette fraction ont été injectés : (i) de l'amidon, polysaccharide de poids moléculaire supérieur à 100 kDa, et (ii) de l'albumine de sérum bovin (BSA), une protéine d'un poids moléculaire de 66,5k Da. Les chromatogrammes de carbone ont été superposés et comparés avec celui typique d'une eau de mer naturelle sur la figure II.15.

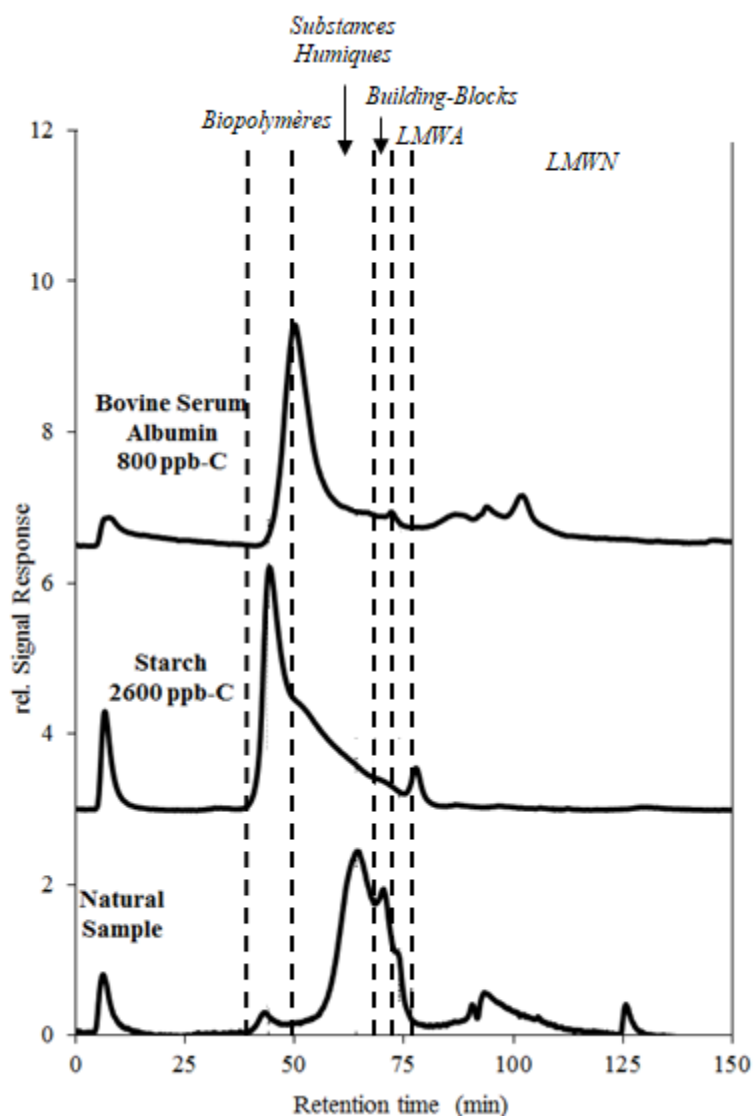


Figure II.15: chromatogrammes de carbone superposés d'une protéine (BSA), de l'amidon et d'une eau de mer naturelle.

Comme attendu, les deux composés éluent principalement dans la fraction des BP. L'amidon sort majoritairement à 43,4 min et marque le temps mort expérimental de l'appareillage utilisé dans cette étude. La BSA sort légèrement après à 50,4 min, indiquant de ce fait que le volume mort de la colonne est représentatif de composés d'un poids >70kDa. Néanmoins, une réponse est également observée dans les autres fractions de taille. Dans le cas de la BSA, environ 30% du carbone injecté est retrouvé dans la famille des LMWN. Ces résultats indiquent qu'une hydrolyse partielle de la BSA a lieu au sein des colonnes chromatographiques et forme des peptides de petites tailles et des acides aminés. Ceux-ci enrichissent artificiellement la fraction des LMWN en composés labiles. La réponse de l'amidon est divisée en deux parties. D'abord un premier pic à 43,4 min puis un long signal pouvant atteindre 75 min. L'amidon est constitué de structures polymériques de tailles variables comprises entre 10kDa et 100kDa. Ceci explique une partie du signal. La dépolymérisation des polysaccharides lors du passage sur le gel d'exclusion stérique semble être une hypothèse plausible pour expliquer l'intensité du signal à des temps de rétention propres aux SH (1kDa) ou inférieurs.

II.4.1.5.b. Standards internationaux de Substances Humiques

Les substances humiques constituent la fraction majeure de la MOD dans les eaux douces. L'analyse de cette fraction par SEC-mDEC quantifie, en plus de leurs concentrations en carbone et en azote, leur aromaticité (arm-SH) et leur poids moléculaire (M-SH). Cette dernière caractéristique est déterminée par étalonnage en calibrant le temps de rétention au poids moléculaires moyen à partir de l'analyse de deux standards de l'*International Humic Substances Society* (IHSS) : un acide humique (*Suwanee River Humic Acid – SRHA*) et un acide fulvique (*Suwanee River Fulvic Acid – SRFA*). Ces deux standards sont les plus couramment utilisés en chimie environnementale (Filella et al., 2014).

Pour évaluer la variabilité des temps de rétention des SH en fonction de leurs origines, huit standards de substances humiques certifiés par l'IHSS ont été injectés (figure II.16). Leur temps de rétention varie de 52,8min à 60,1 min (tableau II-3). Sur la figure II.16, deux échantillons naturels ont été superposés aux standards internationaux. Les SH de la rivière de l'Aulne (eau douce, salinité 0) présentent un temps de rétention de 61,8 min (tableau II-3). Le pic des SH de la rade de Brest (eau de mer, salinité 35) est situé à 63,4min (tableau II-3). Ces

deux échantillons naturels présentent des temps de rétention supérieurs à ceux des standards internationaux (Tableau II-3), néanmoins, le temps de rétention de l'échantillon SRFA (60,1 min) est voisin de celui de l'échantillon fluvial (61,8 min). Ainsi, la rivière de l'Aulne apportent principalement des acides fulviques dans à l'estuaire de l'Aulne.

Tableau II-3 : Signification des acronymes des standards de l'IHSS et leurs temps de rétention maximum mesurés par SEC-mDEC et présentés sur la figure II.16.

Acronyme de l'IHSS	Nom du standard	Tr SH (min)
PPFA	Pahokee Peat Fulvic Acid	56,2
NAFA	Norse Aquatic Fulvic Acid	57,1
SRNOM	Suwanee River Natural Organic Matter	58,3
UMRNOM	Upper Mississippi River Natural Organic Matter	59,2
ESHA	Elliott Soil Humic Acid	52,8
--	Leonardite	56,1
SRFA	Suwanee River Fulvic Acid	60,1
SRHA	Suwanee River Humic Acid	55,4

Tableau I-4 : Temps de rétention maximum de la fraction des SH d'échantillons naturels mesurés par SEC-mDEC et présentés sur la figure II.16.

Origine de l'échantillon naturel	Tr SH (min)
Rade de Brest	63,4
Rivière de l'Aulne	61,8

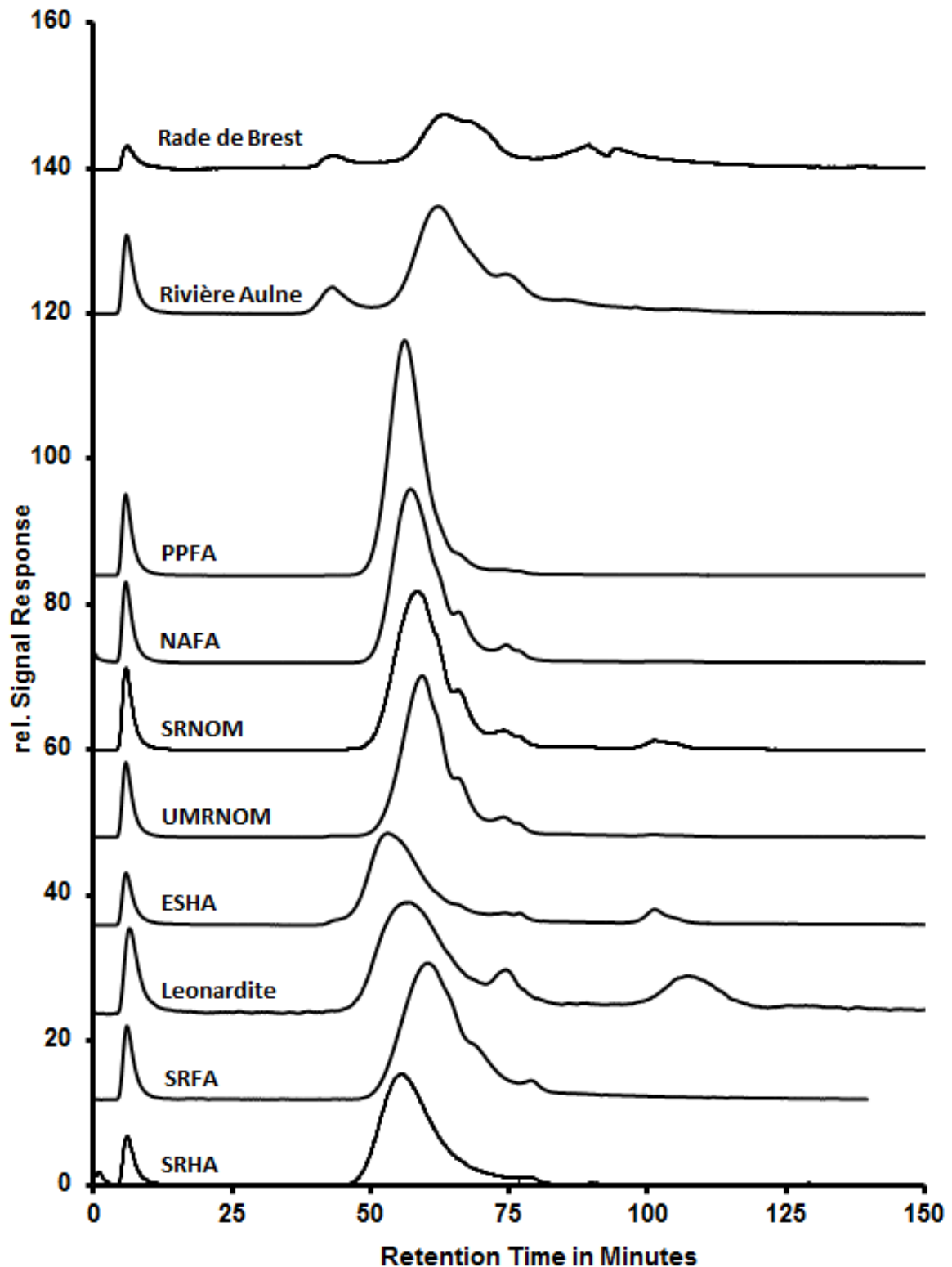


Figure II.16 : Chromatogrammes de carbone de huit standards internationaux de substances humiques (concentrations similaires) superposés à un chromatogramme d'eau de mer naturelle (Aulne) et d'eau douce naturelle. L'encadré rappelle les temps de rétention des maximums de chaque pic de la fraction des SH.

Afin de vérifier que l'aromaticité des SH déterminée par SEC-mDEC est quantitative, les valeurs mesurées pour les différents standards ont été comparées avec leurs pourcentages de carbone aromatique déterminée par spectroscopie RMN du carbone. Une corrélation significative ($R^2 > 0,96$; $p\text{value} < 0.005$) est observée entre les deux paramètres (figures II.17). La relation entre le pourcentage de carbone aromatique des SH standards de l'IHSS déterminé par RMN et leur aromaticité mesurée par SEC-mDEC présente un coefficient de régression de 0.97. Les valeurs les plus élevées en pourcentage de carbone aromatique sont atteintes par les standards présentant des origines fortement terrigènes (Leonardite, ESHA, PPFA, SRHA). Ces résultats démontrent que l'aromaticité des SH mesurée par SEC-mDEC est bien représentative de la contribution en carbone aromatique des substances humiques et peut être utilisée comme indicateur de l'origine terrigène des SH. Expérimentalement, l'aromaticité des SH avait déjà servi à tracer l'ajout de MOD terrigène dans des lacs dominés par de la MOD d'origine phytoplanctoniques (Ilina et al., 2014).

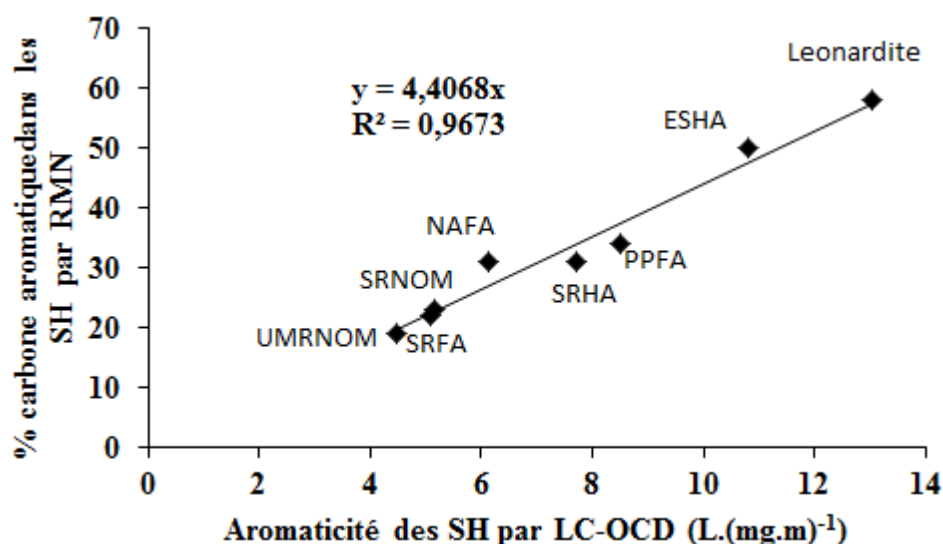


Figure II.17: Pourcentage de carbone organique déterminé dans les standards internationaux de SH en fonction de l'aromaticité des SH déterminée par SEC-mDEC. Les données de pourcentage proviennent du site officiel de l'*International Humic Substances Society* et sont fournies par Thorn et al, (1989).

Proposé par Huber et al. (2011), le diagramme des SH est présenté comme un outil visuel permettant de comparer l'origine des SH sur la base de leur aromaticité et de leur poids moléculaire des SH. La figure II.18 présente ce diagramme pour les huit standards internationaux analysés lors de cette étude et pour les deux eaux naturelles.

La variabilité des caractéristiques des standards internationaux dépasse l'échelle proposée par Huber et al., (2011). Les standards ESHA (Ulu et al., 2015) et PPFA sont extraits d'environnement fortement impactés par l'agriculture. L'épandage régulier de MO sur les sols augmente artificiellement le degré d'humification des SH (Plaza et al., 2004), ce qui peut expliquer des valeurs de poids moléculaires particulièrement importantes.

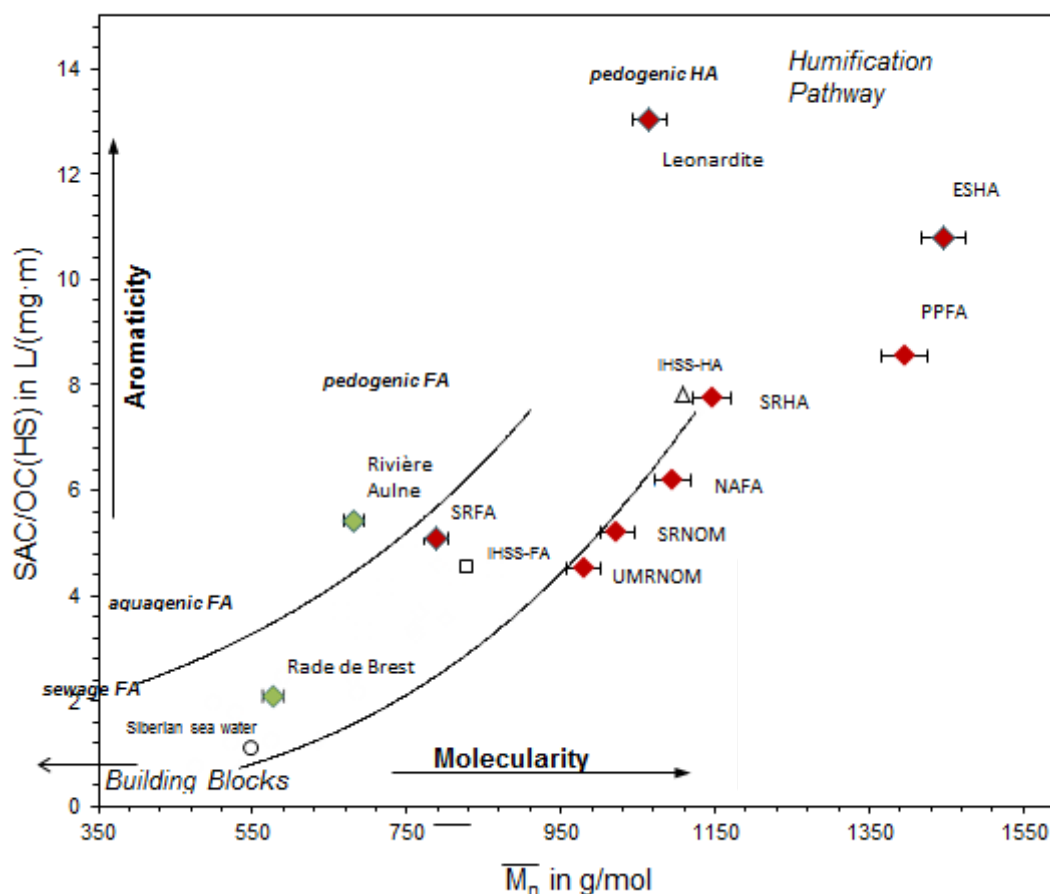


Figure II.18 : Diagramme des SH construits à partir de huit standards internationaux (points rouges) et deux échantillons expérimentaux (points verts). L'incertitude sur la masse molaire est de 2%. Les standards et les eaux de surface de référence (IHSS-HA, IHSS-HA et Siberian Seawater) sont extraits de Huber et al., (2011).

Les SH de l'Aulne sont des acides fulviques pédogéniques. Cette particularité avait déjà été observée dans une précédente étude (Marie et al., 2017). Les SH de la rade de Brest sont plus petites et moins aromatiques que les SH de l'Aulne. Elles sont classées dans les acides fulviques aquagéniques, i.e. synthétisées *in situ* dans le milieu. Le continuum d'humification permet de visualiser les différences qualitatives entre les SH, au-delà de la simple mesure de leurs concentrations. Des valeurs d'aromaticité supérieures à 4 indiquent des molécules hydrophobes et particulièrement aromatiques tandis que des valeurs inférieures à 3

correspondent à des composés plus hydrophiles (Minor et Stephens, 2008; Matilainen et al., 2011). Ces ordres de grandeur permettent de déterminer l'impact des apports de MOD allochtone ou autochtone dans le milieu aquatique, aussi bien que l'incidence des dégradations bactérienne et photochimique (Ilina et al., 2014).

II.4.1.5.c. Fraction des petits poids moléculaires

Six substances de faibles poids moléculaires ont été analysés afin d'étudier la répartition de molécules biogéniques au sein des fractions de petits poids moléculaires LMWA et LMWN: l'acide acétique, l'acide formique, l'urée, l'acide urique, le tryptophane et la riboflavine (vitamine B2). Les chromatogrammes de ces substances sont présentés sur la figure II.19. L'acide formique et l'acide acétique éluent tous les deux au même temps de rétention (75min). La riboflavine, l'acide urique et l'urée sortent dans un ordre de taille décroissante. Néanmoins, le tryptophane (204,22 g.mol⁻¹), d'un poids moléculaire supérieur à celui de l'acide urique (168,1 g.mol⁻¹) élue à 180 min, soit 85 min de plus que l'acide urique. L'urée (60,0 g.mol⁻¹) sort à un temps de rétention relativement proche de l'acide urique (107 min) alors que leur différence de poids moléculaire est de plus de 100 g.mol⁻¹. La riboflavine qui possède un poids moléculaire la classant théoriquement dans la fraction des BB (376 g.mol⁻¹), sort dans le domaine de rétention des LMWA vers 78 min.

La séparation des différents composés de petits poids moléculaires est contrainte par leurs interactions avec la phase mobile et le gel polymétacrylate des colonnes d'exclusion stérique (Figure II.12 ; Huber et al., 2011). Le gel de polymétacrylate peut être considéré comme une résine échangeuse de cations de faible efficacité. Ces interactions permettent de distinguer la fraction des LMWA, caractérisée par un pic unique (~75 min) où éluent rapidement les substances organiques anioniques au pH de la phase mobile, de la fraction des LMWN qui est composée d'un ensemble hétérogène de composés organiques aux structures chimiques variées et éluant sur une grande gamme de temps de rétention (80 – 180 min).

Au pH de travail, les acides formique (46 g.mol⁻¹) et acétique (60 g.mol⁻¹), présentés sur la figure II.19, éluent sous la forme de leurs bases conjuguées, les ions formiate (HCOO⁻) et acétate (CH₃COO⁻). Ces deux molécules polaires sortent toutes deux dans la fraction des LMWA. Dans la même gamme de poids moléculaire, l'urée (60,0 g.mol⁻¹) est une molécule polaire mais non chargée, qui n'est pas soumise à des interactions ioniques ou hydrophobes

avec la phase stationnaire. La taille est donc le seul paramètre influant son temps de rétention. Ce dernier, relativement court, est de 105 min. Il correspond au domaine de la fraction des LMWN.

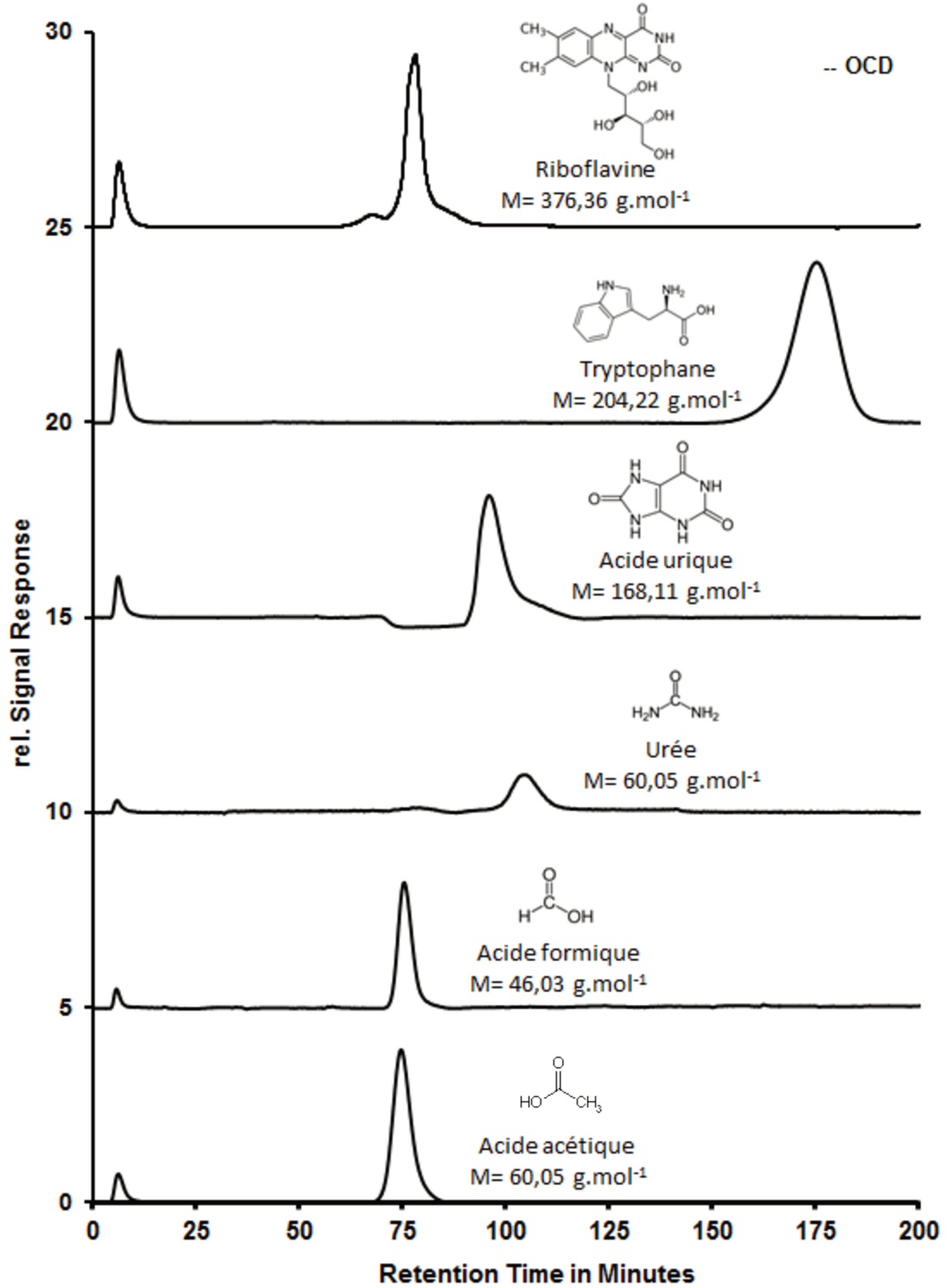


Figure II.19 : Du haut vers le bas : chromatogrammes de carbone (noir) et d'azote (vert) de la riboflavine, du tryptophane, de l'acide urique et de l'urée. Les masses molaires et la structure de chaque substance sont rappelées.

Bien que le poids moléculaire du tryptophane (204 g.mol^{-1}) soit 6 fois plus grand que celui de l'urée, son temps de rétention (180min) est supérieur. L'absence de charge au pH de la phase mobile et la présence d'un hétérocycle indole (figure II.19) le rendent particulièrement sensible aux interactions hydrophobes avec le gel polymétacrylate des colonnes. Ces interactions augmentent fortement son temps de rétention par rapport à l'urée.

La riboflavine (ou vitamine B2) élue au niveau du temps de rétention des LMWA à 78 min. Cette molécule, composée d'un ensemble d'hétérocycles aromatiques propices aux interactions hydrophobes, n'est pas chargée. Une telle structure aurait pu justifier un temps de rétention similaire à celui du tryptophane ($>150\text{min}$). Cette particularité peut s'expliquer par la résonance des cycles avec les groupements carbonyles, stabilisant des charges négatives au niveau des atomes d'oxygène. Par ailleurs, la chaîne aliphatique poly-hydroxylés rend la molécule particulièrement dense en doublet non-liant, créant une configuration riche en charges négatives (tout autour d'elle). La forte densité de charge négative de la riboflavine pourrait alors expliquer que cette molécule élue rapidement de la colonne, par répulsion de charge à l'instar des anions.

Un autre cas particulier est celui de l'acide urique. Au pH de la phase mobile, l'acide urique est sous sa forme conjuguée, l'ion urate ($\text{pK}_a = 5,4$) et présente une charge négative. Pourtant, cette molécule n'élue pas dans la fraction des LMWA et son temps de rétention (100min) est proche de l'urée. L'acide urique peut se présenter sous forme tautomérique *énol*. Les fonctions carbonyles sont protonées en hydroxyles, rendant l'hétérocycle aromatique. Sous cette forme, l'acide urique peut être sujet aux interactions hydrophobes avec le gel, limitant les répulsions électroniques et augmentant son temps de rétention.

Le résultat global de la série d'analyse présentée sur la figure II.19 a permis de mettre en évidence l'importance des interactions ioniques et hydrophobes pour les molécules de petits poids moléculaires au sein de la colonne. Le pH de la phase mobile et les structures des molécules sont des paramètres analytiques importants dans la séparation de la MOD de petits poids moléculaires ($<350\text{g.mol}^{-1}$) par SEC-mDEC.

II.4.1.6. Etalonnage de l'appareil

Les trois détecteurs (carbone – bypass et chromatogramme -, azote et UV) ont été calibrés selon les recommandations du constructeur. Les détecteurs de carbone (OCD) et UV (UVD) ont été calibrés avec de l'hydrogénophthalate de potassium ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ - Alfa Aesar –

99.95-100.05% ; Huber *et al.*, 2011). La gamme d'étalonnage comportait cinq concentrations se répartissant entre 100 et 5000 ppb-C. Le détecteur d'azote (OND) a été calibré avec cinq concentrations de nitrate de potassium (EMSURE® - 99.0+%) se répartissant entre 0.2 et 750 ppb-N.

L'obtention de la masse molaire des Substances Humiques nécessite une calibration de masse afin de lier le temps de rétention de cette famille de composés à leur masse molaire. Deux standards de l'*International Humic Substances Society* (IHSS) ont été utilisés : l'acide humique de la rivière Suwanee (1S101H), et l'acide fulvique de la rivière Suwanee (1S101F). Leurs valeurs nominales de masses molaires sont respectivement de 1066 et 711 Da (Aiken et Malcolm, 1987). Des concentrations d'environ 4mg.L⁻¹ sont nécessaires pour mener à bien cette opération.

II.4.1.7. Efficacité de l'oxydation des composés azotés et carbonés

La mesure du carbone organique se fait après l'oxydation des molécules carbonées dans le réacteur de Gräntzel. Selon le même principe, la mesure de l'azote organique se fait *via* oxydation des molécules azotées en nitrates dans un réacteur UV précédent le détecteur d'azote. Afin de déterminer l'efficacité de ces processus d'oxydation, un dosage de l'urée a été réalisé à partir d'une gamme étalon de quatre échantillons (0,1 ; 5 ; 10 ; 20 μmol.L⁻¹). Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure II.20.

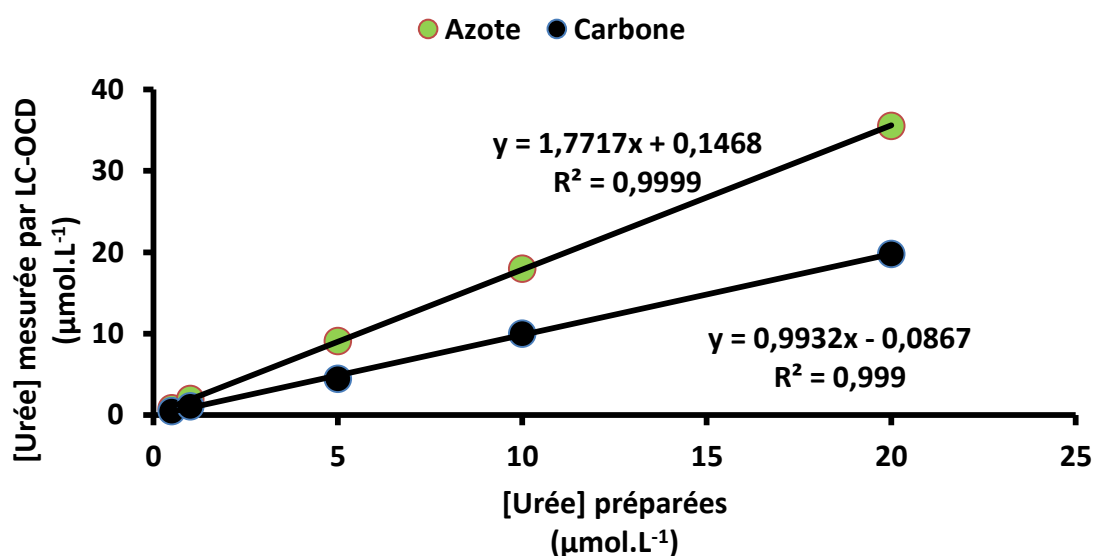


Figure II.20 : Validation de la mesure d'azote organique du détecteur d'azote de la SEC-mDEC

Les courbes de tendance linéaires pour l'analyse de carbone et d'azote présentent, respectivement des coefficients de régression égaux à 0,9999 et 0,999. Les pentes des droites sont de 0,9932 pour le carbone et de 1,7717 pour l'azote. En sachant que théoriquement une mole d'urée est constituée d'une mole de carbone et de deux moles d'azote ; le taux de recouvrement de cette molécule est de 99% pour la mesure de carbone organique et de 89% pour la mesure d'azote. L'oxydation incomplète des structures azotées est à l'origine d'une sous-estimation de la mesure d'environ 10%.

II.4.1.1. Extraction des fractions

A partir des temps de rétention des différentes fractions d'un échantillon donné, il est possible d'extraire les fractions *via* un robinet installé après le détecteur UV et après l'intersection entre les circuits de l'analyse de carbone et l'analyse d'azote (figure II.21). L'extraction des fractions permet leur analyse spécifique par un détecteur non-installé sur la SEC-mDEC.

Néanmoins, les échantillons extraits subissent une dilution opérationnelle proportionnelle à la répartition de leurs temps de rétention. Le facteur de dilution est également lié au débit de la phase mobile et aux différentes scissions opérationnels de l'échantillon initial (i.e : ponction de 10% dans le bypass et utilisation de 9% pour l'analyse du contenu en azote). Dans cette étude, l'extraction a été réalisée pour étudier les fractions des BP, ainsi que la combinaison des fractions SH et BB. Les fractions SH et BB ont été extraites ensemble du fait de la co-élution des deux pics et de la nature très proche de ces deux fractions (Huber et al., 2011). A cause de l'étendue de ses temps de rétention (>100 min), la fraction des LMWN n'a pas été extraite. Le volume récupéré aurait été bien trop important et le facteur de dilution trop élevé pour des analyses ultérieures. La fraction des LMWA a été jugée trop peu concentrée pour essayer de l'extraire et de l'analyser par une autre méthode analytique.

Les fractions BP et SH-BB ont été extraites dans des flacons en verre brun en fonction des temps de rétention déterminées par une première analyse. Les volumes moyens des extraits sont d'environ 12mL pour les BP et 25mL pour les SH. Les facteurs de dilution moyens sont de l'ordre de 3 pour les BP et de 6,5 pour les SH. Le temps de stockage à l'obscurité jusqu'à l'analyse par fluorescence 3D sont d'une semaine maximum.

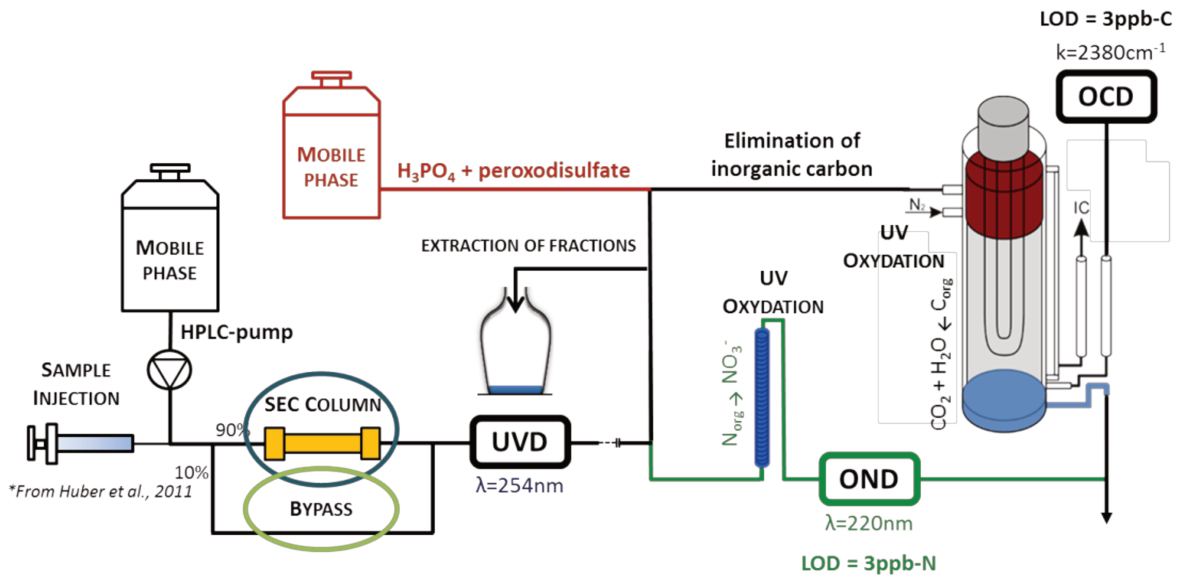


Figure II.21 : Position du robinet d'extraction des fractions

II.4.2. Fluorescence 3D

La spectroscopie de fluorescence 3D consiste en la production de matrices excitation émission. Cette technique, largement utilisée pour l'étude de la MOD, a permis l'identification de différents composantes (Tableau II-5) spécifiques à certains groupes de composés chimiques types de la MOD (Coble, 1996, 2007; Parlanti, 2000). Les composés identifiés par fluorescence 3D sont utilisés comme traceurs des sources (Stedmon et Markager, 2005; Jaffé et al., 2008; Murphy et al., 2008; Yamashita et al., 2010) et de la qualité de la MOD (Mopper et Schultz, 1993; Coble et al., 1998; Romera-Castillo et al., 2014).

II.4.2.1. Principe de la méthode

Les molécules susceptibles d'absorber l'énergie d'une longueur d'onde spécifique (excitation) et de se relaxer spontanément à une longueur d'onde spécifique plus importante (émission) sont qualifiées de fluorophores. Ces fluorophores sont caractérisés par deux longueurs d'onde du domaine UV-visible : la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) et la longueur d'onde d'émission (λ_{em}) (Stedmon et Cory, 2014). La fluorescence est généralement décrite comme une interaction électronique au sein de complexes à transfert de charge depuis un donneur riche en électrons vers un accepteur pauvre en électrons. Pour fluorescer, les molécules

doivent être de nature aromatique (donneur) et comporter des fonctions chimiques permettant les transferts de charge (accepteur) comme un carbonyle, une thiocétone ou encore un halogène (MacCarthy et Rice, 1985; Bloom et Leenheer, Jerry, 1989; Carstea, 2012). Plusieurs structures de la MOD naturelle répondent à ces spécificités comme certains acides aminés (tyrosine et tryptophane), le phénol ou les substances humiques (Coble, 1996).

Les variations de la composition chimique et des structures moléculaires de la MOD fluorescente peuvent être visualisées *via* l'étude de l'intensité maximale de fluorescence (Coble, 1996), des ratios de fluorescence spécifiques (Diane M McKnight et al., 2001; Conmy et al., 2004), par la localisation des bandes d'excitation et d'émission ainsi que par traitement mathématique des matrices (PARAFAC ; Bro, 1997).

Dans cette étude, les spectres de fluorescence ont été obtenus à l'aide d'un spectrofluorimètre Cary Eclipse Varian (Agilent®) équipé d'une lampe Xénon (150Watts) comme source excitatrice. Une cuve en quartz de 1cm a été utilisée pour les mesures optiques.

Pour toutes les mesures, les bandes passantes d'excitation et d'émission ont été fixées à 5nm. Les matrices d'excitation-émission (EEM) ont été enregistrées avec un intervalle de 10nm pour des λ_{ex} allant de 200 à 400nm et des λ_{em} allant de 200 à 650nm. La vitesse d'analyse a été fixée à 1200 nm.min⁻¹. Des spectres d'émission et d'excitation aux longueurs d'ondes des bandes de fluorescence détectées ont également été enregistrés. Entre chaque analyse, la cuve est rincée à l'eau acidifiée, à l'eau ultrapure et deux fois avec l'échantillon. Des blancs ont été réalisés dans les mêmes conditions avant chaque série d'analyses pour vérifier la présence éventuelle de contaminations.

Pour éviter tout effet de filtre interne, les échantillons trop concentrés, c'est à dire dont l'absorbance à 254nm était supérieure à 1, ont été dilués dans l'eau ultrapure.

II.4.2.2. Fluorophores d'intérêt

Chaque molécule organique fluorescente présente une intensité de fluorescence maximale à un couple de longueurs d'onde d'excitation/émission (Ex-Em) qui lui est propre. Les spectres de fluorescence de la MOD naturelle contiennent les contributions simultanées de différents fluorophores (Vacher, 2004). La position de leurs maxima d'intensité ont été attribués à différents groupes de composés chimiques « types » de la MOD par comparaison avec les spectres de fluorescence de standards aux propriétés optiques similaires (Henderson et al.,

2009). Deux familles de composés type ont été différenciées : (i) les substances humiques, subdivisées entre acides humiques et acides fulviques ; et (ii) les composés protéiques, dont la fluorescence provient de deux acides aminés aromatiques : la tyrosine et le tryptophane, qu'ils soient constitutifs des protéiques ou qu'ils soient sous forme libres (Coble, 1996). Ainsi la fluorescence des composés protéiques est subdivisée entre les protéines de type tryptophane et les protéines de type tyrosine en fonction des acides aminés qui les composent.

Plusieurs nomenclatures spécifiques existent pour désigner les bandes de fluorescence correspondant à ces groupes. La nomenclature de Coble (1996) définit les bandes A et C relatives aux composés fulviques et humiques, la bande T pour les composés protéiques de type tryptophane, la bande B pour les composés protéiques de type tyrosine et enfin la bande M caractéristiques de composés qualifiés de substances humiques d'origine marine. Une autre nomenclature correspondante a également été introduite par Parlanti et al. (2000). Les bandes A et C correspondent aux bandes α et α' , la bande M devient la bande β et les bandes T et B correspondent aux bandes δ et γ . Les bandes de fluorescence et leurs nomenclatures sont rappelées dans le tableau II-5 et présentées sur la figure II.22.

Tableau II-5 : Composants fluorescents majeurs de la MOD et leurs nomenclatures (Coble, 1996 ; Hudson et al., 2007 ; Parlanti et al., 2000)

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

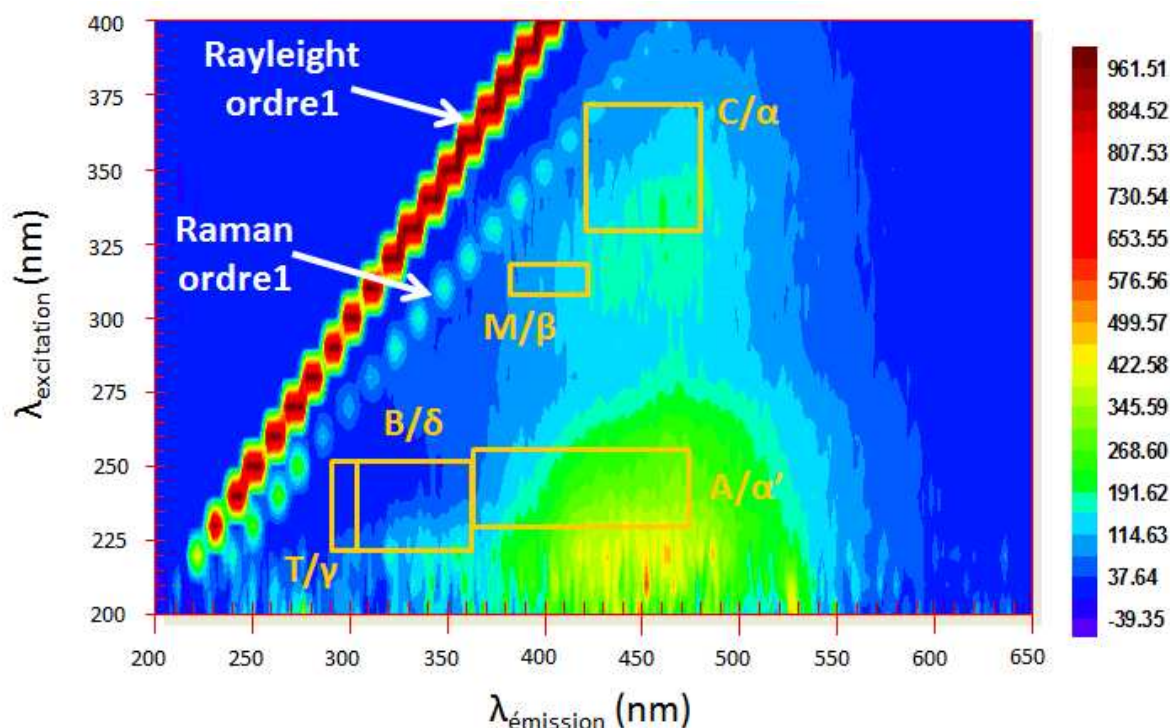


Figure II.22: Matrice d'un échantillon estuarien (Aulne – salinité 0) . Les localisations spectrales théoriques des fluorophores de la MOD sont marquées (Coble et al., 1996).

II.4.2.2.a. Fluorescence des composés de type protéines

Deux bandes de fluorescence caractéristiques des composés de type protéique et peptidique ont été identifiés (Coble, 1996). Ces bandes sont produites par la fluorescence du cycle benzénique de trois acides aminés : la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine (Hudson et al., 2007). Néanmoins, en raison de son rendement quantique dix fois inférieur à celui de la tyrosine et du tryptophane, la phénylalanine n'est pas détectable dans les milieux aquatiques (Determann et al., 1994).

La tyrosine est associée au fluorophore T ($\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}}$: 270-280 / 300-320 nm) et le tryptophane au fluorophore B ($\lambda_{\text{Ex}} / \lambda_{\text{Em}}$: 270-280 / 320-380 nm). Les bandes de fluorescence B et T sont associées à l'activité biologique du milieu ou à l'état de dégradation de la MOD (Determann et al., 1998; Repeta et al., 2002).

Ces deux bandes, proches en gamme de longueurs d'onde, peuvent se superposer et être interférées par la fluorescence des substances humiques, rendant leur distinction complexe (Vacher, 2004).

II.4.2.2.b. Fluorescence des composés de type substances humiques

Les bandes de fluorescence A et C sont associées aux substances humiques terrigènes (Coble, 1996; Sierra et al., 2005). Le fluorophore A ($\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$: 230-260 / 380-480 nm) est généralement associé aux acides fulviques (Mounier et al., 1999; Baker et Spencer, 2004). Du fait d'un plus grand nombre de composantes aromatiques (Mobed et al., 1996), les acides humiques ont des longueurs d'onde d'excitation plus élevées et sont associées au fluorophore C ($\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$: 330-370 / 420-480 nm).

La bande de fluoresce M ($\lambda_{Ex} / \lambda_{Em}$: 310-320 / 380-420 nm) est associée à des composés type substances humiques d'origine marine (Coble, 1996). A l'inverse des bandes A et C qui sont considérées comme provenant de sources pédogéniques (Sierra et al., 2005), le fluorophore M est produit *in situ* par l'activité microbienne récente ou la dégradation des microalgues en milieu marin (Parlanti, 2000; Stedmon et Markager, 2005; Huguet et al., 2009). Ce type de structure a aussi été détecté dans les eaux douces (Huguet et al., 2010). L'intensité des fluorophores A et C ont tendance à masquer la bande de fluorescence M.

II.4.2.2.c. Indices de fluorescence

Les indices d'intensité de fluorescence permettent d'avoir un aperçu de l'origine de la MOD. Trois indices de fluorescence peuvent être calculés pour caractériser la MOD :

- Indice de fluorescence (FI) : ratio entre les intensités d'émission à $\lambda_{Em} = 450\text{nm}$ et à $\lambda_{Em} = 500\text{ nm}$ pour une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{Ex} = 370\text{ nm}$ (McKnight et al., 2001). Le FI est associé à la fluorescence des pics M et C (Coble, 1996; Burdige et al., 2004). Cet indice permet de déterminer la part relative des sources de MOD autochtone et allochtone dans les eaux naturelles. Des valeurs égales ou inférieures à 1,4 indiquent une MOD d'origine terrestre. Des valeurs égales ou supérieures à 1,9 indiquent une prédominance de composés d'origine microbienne.

- Indice biologique (BIX) : ratio entre les intensités d'émission à $\lambda_{Em} = 380\text{ nm}$ et à $\lambda_{Em} = 430\text{ nm}$ pour une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{Ex} = 310\text{nm}$ (Huguet et al., 2009). Comme le FI, le BIX est influencé par l'intensité de fluorescence des pics M et C (Coble, 1996). Un BIX en dessous de 0,6 est considéré comme peu autochtone alors que des valeurs de BIX entre 0,8 et 1,0 correspondent à de la MOD biogénique.

- Indice d'humification (HIX) : ratio entre l'intensité d'émission des régions de fluorescence $\lambda_{Em} = 435-480$ nm et $\lambda_{Em} = 300-345$ nm mesurées à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{Ex} = 254$ nm (Zsolnay et al., 1999). Le HIX est bas pour de la MOD fraîche, dérivée de la biomasse végétale (Hunt et Ohno, 2007). Il augmente avec le degré de décomposition et l'avancée du processus d'humification.

II.4.2.3. Étalonnage de la mesure de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur des extraits de BP et de SH-BB. Afin de donner un aspect quantitatif à ces analyses, un étalonnage de la mesure de fluorescence a été réalisé à partir de quatre standards : le tryptophane et l'albumine de sérum bovin (BSA) pour la mesure du fluorophore B/ δ ; le SRFA et le SRHA pour la mesure du fluorophore A/ α' (figure II.23).

Les coefficients de régression des droites d'étalonnage sont supérieurs à 0,99.

L'étalonnage de la bande de fluorescence A ($\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} : 230-260 / 380-480$ nm) présente des coefficients de régression $> 0,99$ pour le SRFA et le SRHA. La pente de la droite du SRFA est plus élevée que la pente de la droite du SRHA. Cette différence provient du rendement quantique de ces deux standards, plus important dans le cas du SRFA. Comme précisé précédemment, les SH de l'estuaire de l'Aulne possèdent des caractéristiques de taille et d'aromaticité proches de celles du standards SRFA dans une grande partie de l'estuaire. Cette calibration sera donc utilisée préférentiellement dans la suite de ce travail.

L'étalonnage de la bande de fluorescence B ($\lambda_{Ex} / \lambda_{Em} : 270-280 / 320-380$ nm) a été réalisé avec un standard de tryptophane et avec de la BSA. Le tryptophane est la « molécule modèle » fluorescente de la fluorescence de cette bande protéique (Coble, 1996). La pente de la droite de calibration réalisée avec le tryptophane est beaucoup plus élevée que celle réalisée à partir de BSA. Le rendement quantique du tryptophane est particulièrement important du fait que c'est une molécule simple. A contrario, la BSA est constituée d'environ 583 acides aminés, dont seulement 3 sont du tryptophane (soit moins de 1% en masse de la BSA). La complexité plus importante de cette molécule réduit l'intensité de fluorescence à concentrations égales avec le tryptophane. Le mélange complexe de composés présents dans les eaux naturelles ne permet pas de déterminer une structure unique pour les protéines contenues dans la fraction des BP. Néanmoins, les protéines de grandes tailles contenues dans cette fraction sont constituées d'un grand nombre de structures et d'acides aminés, à l'instar de

la BSA (voir section II.4.1.5.a). Ainsi, dans la suite de cette étude, l'étalonnage de la mesure de fluorescence par la BSA sera préférentiellement utilisé.

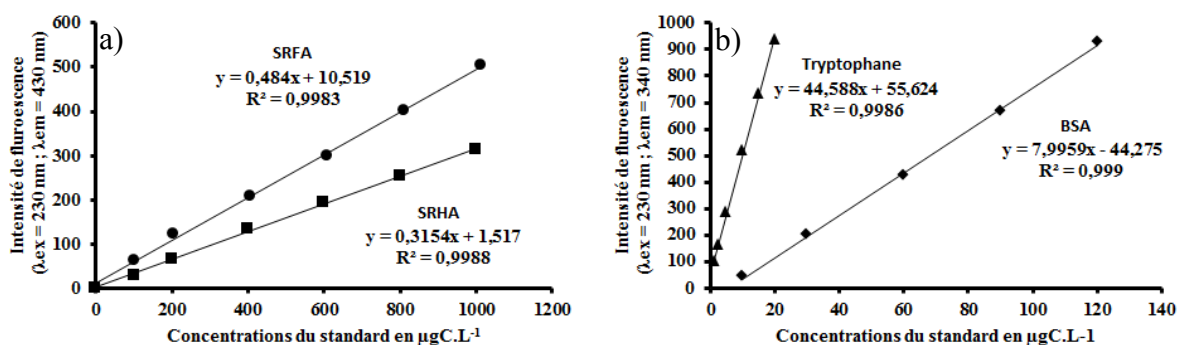


Figure II.23 : Etalonnage de la mesure de fluorescence de : (a) la bande de fluorescence A/α' et (b) de la bande B/δ. Plusieurs standards ont été utilisés (SRFA: Suwanee River Fulvic Acid ; SRHA : Suwanee River Humic Acid ; BSA : Bovine Serum Albumine).

II.4.2.4. Diffusions de Raman, Rayleigh

La diffusion de Raman (voir figure II.22), ou effet Raman, est un phénomène optique issu de la diffusion inélastique de la lumière. L'interaction du milieu avec le rayonnement incident change la fréquence du rayonnement diffusé dans le milieu. Ainsi, en solution aqueuse, les vibrations moléculaires de la liaison covalente O-H provoquent par rétrodiffusion une perte d'énergie de 3600 cm^{-1} (Hudson et al., 2007). Cette perte d'énergie est propre à chaque solvant et présente une sensibilité à la composition de l'échantillon (Spaak, 2014).

La diffusion de Rayleigh (voir figure II.22) est produite lors de la réémission d'un photon à la même énergie que la lumière résultant de l'excitation (Andrade-Eiroa et al., 2013a, 2013b). La diffusion de la lumière est dite élastique. La diffusion de Rayleigh sera alors observée aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les électrons des molécules vont vibrer à la même fréquence que la lumière incidente induisant l'absorption et l'émission de la lumière à la même énergie.

Pour chacune de ces diffusions, il existe deux ordres. Le premier ordre est observé à la longueur d'onde pour laquelle l'échantillon est excité. Le second au double de la longueur d'onde d'excitation.

II.4.2.5. Facteurs influençant le signal de fluorescence

Le signal de fluorescence émis par les fluorophores dépend des propriétés intrinsèques aux molécules fluorescentes mais aussi des propriétés physico-chimiques du milieu de l'échantillon comme le pH, la salinité ou, la température (Hudson et al., 2008). Ces facteurs influencent l'intensité de fluorescence mesurée et les couples de longueurs d'onde associées aux fluorophores. Ces décalages peuvent être bathochromiques (vers des longueurs d'onde plus élevées) ou hypsochromiques (vers des longueurs d'onde moins élevées).

II.4.2.5.a. Rendement quantique

Le rendement quantique représente l'efficacité d'émission d'un fluorophore donné, c'est-à-dire sa capacité à émettre des photons par rapport à celle d'en absorber. Plus le rendement quantique est important, plus le composé, ou la structure, sera fluorescent. Le rendement quantique est dépendant de la structure du fluorophore. La présence de désactivateur de fluorescence, comme les complexes métalliques, ou la formation d'excimères peuvent être responsables d'un transfert d'énergie interne à la molécule et influencer le rendement quantique (Lakowicz, 2013).

II.4.2.5.b. Effet du pH

Le pH altère la nature chimique d'un fluorophore en augmentant ou en diminuant les échanges d'énergie. Ainsi, la protonation de groupes accepteurs d'électrons, comme les carboxyles, induit un décalage bathochromique alors que la protonation de fonctions alcools ou amines induit un décalage hypsochromiques (Sheng et Yu, 2006). L'intensité de fluorescence de certaines eaux de différentes origines varient avec des changements de pH (Spencer et al., 2007). Néanmoins, du fait de la séparation sur SEC-mDEC, les échantillons extraits de l'appareil sont dans la phase mobile (tampon phosphate), et non dans la matrice d'origine.

II.4.2.5.c. Structure et poids moléculaire

La composition hétérogène de la MOD rend complexe l'association de spectres de fluorescence avec des structures moléculaires spécifiques (Spencer et al., 2007b).

Il existe un lien entre taille des composés et longueurs d'onde de fluorescence (Lavaud, 2010). Ainsi, les acides humiques, qui sont des structures aromatiques comportant un grand

nombre de cycles benzéniques, émettent dans des longueurs d'ondes élevées (partie rouge du spectre UV-visible) alors que les composés moins aromatiques et comportant des chaînes aliphatiques comme les acides aminés, émettent à des longueurs d'onde basses (partie bleu du spectre UV-visible). Les processus physico-chimiques altérant le contenu aromatique ou la taille des grosses molécules comme le photoblanchiment (*photobleaching*), causent des déplacements hypsochromiques des bandes de fluorescence (Korshin et al., 1999).

La nature et la position des groupements liés aux noyaux aromatiques influent également le signal de fluorescence observé (Valeur, 2003). La présence de groupes donneurs d'électrons (-OH, -OR, -NH₂ -NR, -NR₂) augmentent le coefficient d'absorption molaire et la probabilité de fluorescence d'une molécule. À l'inverse, les groupes électroattracteurs (-COOH; -NO₂; NO₂) réduisent la probabilité de fluorescence d'une molécule (Chen et al., 2003).

II.4.2.5.d. Phénomène d'extinction de fluorescence ou « quenching »

Le phénomène d'extinction de fluorescence, ou « quenching », est une diminution de l'intensité de fluorescence provoquée par des échanges énergétiques entre les molécules de l'échantillon. Ces échanges d'énergies ont diverses origines et peuvent être statique, dynamique ou provoqués par des effets de filtres internes.

La formation de complexes intramoléculaires avec d'autres espèces du milieu bloque la fluorescence. C'est l'extinction de fluorescence statique. Par exemple, les acides fulviques complexés avec des métaux (Cu²⁺, Fe³⁺) fluorescent moins intensément (Esteves da Silva, 1998).

L'extinction de fluorescence dynamique est la désexcitation d'une molécule par contact avec une autre. Ce phénomène est observé lorsque la température augmente (Lakowicz, 2013). Les acides aminés sont plus sensibles au quenching thermique que les substances humiques (Baker, 2005). La viscosité du milieu influence également les possibilités de collisions causant des variations de l'intensité de fluorescence (Valeur, 2003).

L'effet de filtre interne se produit lors de l'analyse de matrice à forte densité optique ou à forte turbidité (Lakowicz, 2013). La perte d'intensité de fluorescence est due à l'absorption spécifique des molécules les plus proches du rayon lumineux incident. Les molécules plus éloignées ne peuvent pas fluorescer, ce qui provoque un biais dans l'intensité mesurée. L'effet de filtre interne ne dépend pas de la concentration en fluorophores mais de la section efficace

d'absorption de l'échantillon, i.e la distance sur laquelle la lumière peut être absorbée par les composés fluorescents (Reynolds, 2003). Pour résoudre ce phénomène, l'échantillon est dilué afin d'avoir une absorbance à 254nm inférieure à $0,1\text{cm}^{-1}$ et de conserver la linéarité de la loi de Beer-Lambert (Valeur, 2003). Cette dilution présente un risque de contamination et peut modifier le pH du milieu ou les propriétés de fluorescence de l'échantillon (Andrade-Eiroa et al., 2013a, 2013b).

II.4.2.6. Acquisition des spectres de fluorescence

Le scan simultané à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission et l'acquisition de matrices en trois dimensions d'excitation-émission (3D-EEM) est la méthode la plus couramment utilisée à ce jour. Elle permet d'avoir une vision globale de l'échantillon. Dans cette étude, la méthode du « peak-picking » a été choisie pour identifier les couples $\lambda_{\text{ex}}-\lambda_{\text{em}}$ des maximums de fluorescence observés sur les 3D-EEM. Les fluorophores correspondant ont été identifiés selon la nomenclature définie dans la littérature (Tableau II-5). Des spectres d'émission simples ont été acquis aux longueurs d'onde caractérisant les fluorophores observés.

II.5. Conclusion

Le système estuaire de l'Aulne-rade de Brest est particulièrement intéressant pour étudier le transfert continent-océan de la MOD. Dans le cadre de ce travail, deux sites d'études ont été choisis :

- L'estuaire de l'Aulne. La rivière de l'Aulne draine un bassin versant de 1900km² et est responsable de 70% des apports d'eau douce à la rade de Brest. Le gradient de salinité de son estuaire a été échantillonné à plusieurs périodes contrastées des cycles hydrologique et saisonnier.
- A la sortie de la rade de Brest, la station « SOMLIT » est idéalement placée pour étudier les interactions entre les eaux côtières fortement influencées par les apports continentaux de la rade de Brest et les eaux océaniques venues de la Mer d'Iroise. A cette station fixe, la MOD a été échantillonnée de manière hebdomadaire.

Les échantillons de ces deux sites d'étude ont été analysés par chromatographie liquide d'exclusion stérique à multi-détection (SEC-mDEC), une technique d'analyse globale et semi-spécifique qui permet de caractériser la MOD en plusieurs fractions de taille et de nature différentes *via* trois détecteurs de carbone, d'azote et d'UV. Un des objectifs principaux de ce travail est d'explorer les possibilités de cette méthode pour analyser la MOD dans les milieux environnementaux et particulièrement les milieux estuarien et marin.

La fluorescence 3D est un outil facile à mettre en œuvre qui permet d'identifier certains composants de la MOD de nature différente. Le couplage de cette méthode avec la SEC-mDEC a été réalisé pour l'analyse de certaines campagnes estuariennes afin de fournir une meilleure caractérisation des fractions séparées par SEC-mDEC.

Néanmoins, en amont de ces études, il est nécessaire de réaliser un développement analytique sur la SEC-mDEC telle que présentée par Huber et al., 2011. En effet, bien qu'il existe quelques rares études environnementales en milieu marin (Baghoth et al., 2011 ; Penru et al., 2013), il n'existe pas, à notre connaissance, de données sur les performances et les limitations de cette technique pour l'analyse des milieux à salinité variable. C'est le cœur du sujet présenté ci-après dans le chapitre III.

**Chapitre III - Application
de la chromatographie
d'exclusion stérique multi-
détection à la caractérisation
de la matière organique
dissoute dans les eaux
estuariennes**

III.1. Contexte

La MOD est omniprésente dans les cycles biogéochimiques. Elle peut tenir le rôle de nutriments, complexer les métaux ou encore capter une partie du rayonnement lumineux incident. De fait, les structures chimiques composant la MOD sont nombreuses et constituent autant d'empreintes de processus environnementaux à l'œuvre dans les écosystèmes comme le mélange entre les masses d'eaux ou l'activité biologique. Ces processus environnementaux sont particulièrement importants dans les estuaires, principales interfaces entre les milieux continentaux et océaniques.

Ainsi, l'identification de groupes de composés spécifiques au sein de la MOD et l'observation de leurs dynamiques devrait permettre de tracer les processus environnementaux auxquels ils sont associés. Néanmoins, l'hétérogénéité de la MOD constitue un frein analytique à sa description. Pour résoudre ce problème, la chimie environnementale moderne a été conduite selon deux axes : (i) l'analyse globale qui ne fournit que très peu d'informations sur la composition chimique, et (ii) l'analyse spécifique, qui permet de caractériser un groupe isolé de composés sur la base de critères communs, sans pour autant être représentative de l'ensemble des composés présents dans l'échantillon.

La chromatographie d'exclusion stérique à multi-détection (SEC-mDEC) permet d'allier les avantages des deux axes analytiques. En effet, cette technique analytique semi-spécifique permet de quantifier le COD de manière globale mais aussi six fractions de la MOD de taille et de nature différente (Huber et al., 2011). De plus, la SEC-mDEC permet d'obtenir plusieurs facteurs qualitatifs comme l'aromaticité *via* une mesure d'absorbance UV à 254 nm ou le rapport C/N *via* une mesure des concentrations en azote.

Cette technique relativement récente a été appliquée à plusieurs reprises en milieu naturel d'eau douce (Chen et al., 2013 ; He et al., 2016) et parfois en milieu marin (Bagtho et al., 2008 ; Penru et al., 2013). Néanmoins, à ce jour, il n'existe pas d'étude approfondie sur les performances de la méthode en présence d'une matrice salée de type eau de mer ou eau estuarienne.

C'est pourquoi les performances analytiques de la méthode ont été explorées dans le cadre de l'analyse d'un gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne. Les objectifs étaient de :

- Déterminer l'influence de l'augmentation de la salinité sur les paramètres analytiques de la SEC-mDEC

- Adapter la méthode à l'analyse des eaux de salinité variable dans le cas où les performances analytiques de la SEC-mDEC en étaient altérées.
- Appliquer le nouveau protocole à l'analyse de la MOD le long du gradient de salinité de l'Aulne

III.2. Observations préalables à l'adaptation de la méthode

L'analyse visuelle des chromatogrammes obtenus après l'analyse d'un gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne apporte plusieurs indices sur les conséquences de l'augmentation de la salinité sur la détermination des concentrations de carbone et des autres paramètres fournis par la SEC-mDEC.

La figure III.1 présente les chromatogrammes de carbone et d'UV superposés tous les 4 de salinité. La figure III.2 présente les chromatogrammes d'azote pour ces mêmes échantillons.

Sur la figure III.1, plusieurs différences sur les chromatogrammes de carbone peuvent être observées le long du gradient salé :

- Entre salinité 0 (S0) et salinité 35 (S35), le temps de rétention maximal de la fraction des SH augmente d'environ 4 min (ΔTr_{SH}).
- Entre S0 et S35, le temps de rétention maximal de la fraction des LMWA diminue de 4min (Δ_{LMWA}).
- Un nouveau massif apparaît à partir de S4 et est entrecoupé d'un creux de plus en plus large jusqu'à S35 (massif des 90 min).

Le temps de rétention des SH est directement lié à leur poids moléculaire, et donc à leur taille (Huber et al., 2011). 5 min d'écart entre les temps de rétention des standards internationaux SRFA et SRHA permettent d'expliquer un écart de 200 g.mol^{-1} (810 g.mol^{-1} pour SRFA et 1110 g.mol^{-1} pour SRHA ; voir figure II.9 et tableau II-3 ; Huber et al., 2011). Ainsi, la différence de poids moléculaire observée sur la figure III.1 pourrait être expliquée par la persistance de formes plus petites le long du gradient halin ou alors par la production de SH plus petites en milieu marin. Néanmoins, la contraction des structures chimiques avec l'augmentation de la force ionique le long de l'estuaire pourrait aussi expliquer une perte de taille des SH le long du gradient salé, sur le même modèle que ce qui peut se produire lors de la floculation en début de mélange estuarien (Sholkovitz et al., 1976).

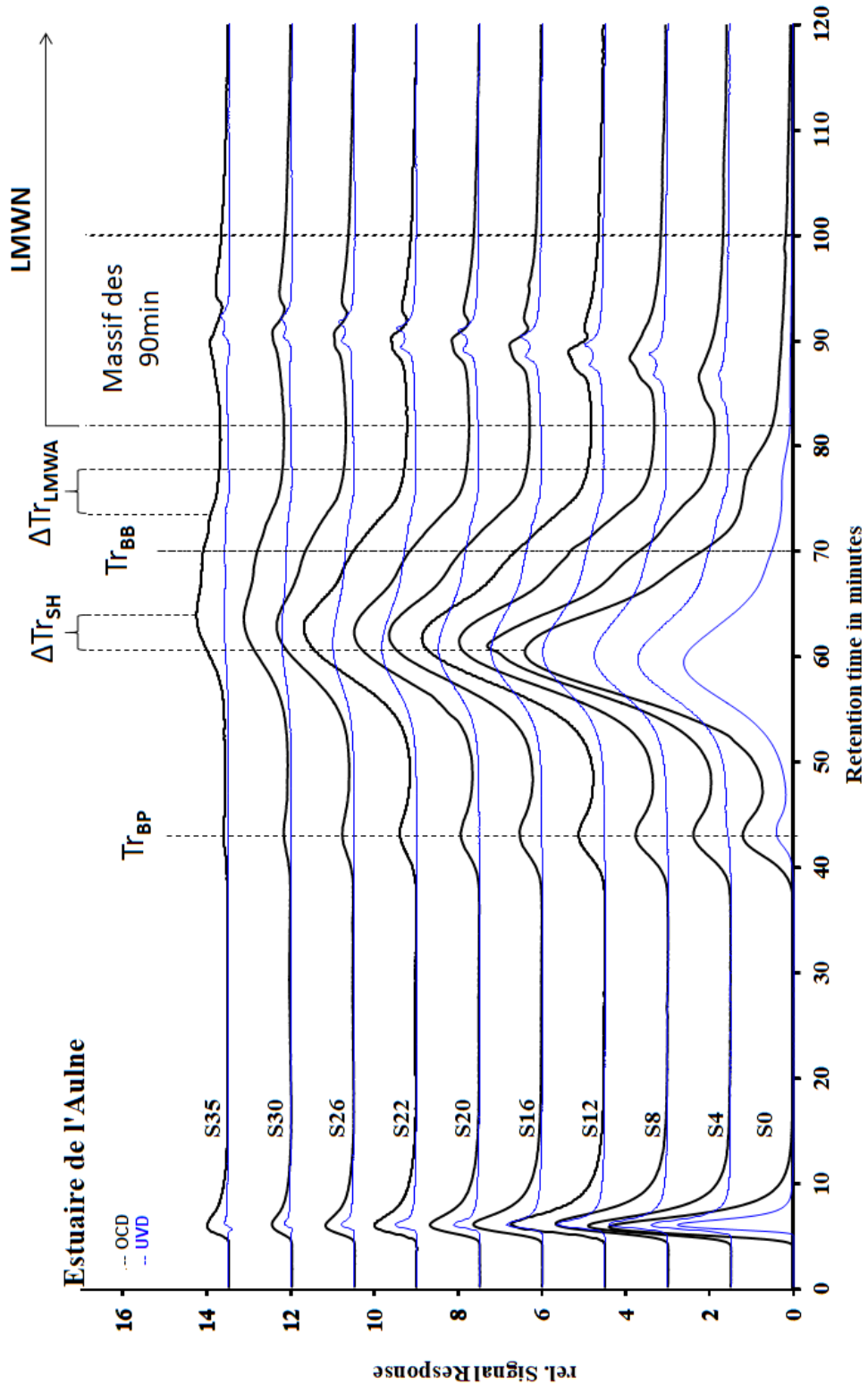


Figure III.1: Chromatogrammes de carbone (en noir) et d'UV (en bleu) superposés d'un gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne. Salinité 0 = S0, salinité 4 = S4, etc. Les temps de rétention maximums des BP et des BB n'évoluent pas, ils sont marqués d'une simple ligne. Les temps de rétention maximums des SH et des LMWA semblent évoluer avec la salinité, les maxima de S0 et S35 sont indiqués pour visualiser leur écart (ΔTr). La potentielle interférence du sel dans le domaine des LMWN est délimitée par une zone appelée « massif des 90min ».

A l'inverse des SH, le temps de rétention maximal de la fraction des LMWA diminue. Ce pic d'exclusion de sel est composé préférentiellement d'anions (Huber et al., 2011). Une augmentation de la densité ionique dans la matrice naturelle pourrait avoir comme conséquence une contraction du chromatogramme dû aux effets de répulsion entre la matrice et les LMWA (Huber et al., 2011).

L'impact de la matrice naturelle sur les chromatogrammes s'observe aussi aux alentours de 90min, dans la fraction des LMWN. En effet, dès le début de la présence de sel (S2) une réponse du détecteur de carbone est mesurée jusqu'à S35. De plus, à partir de S6, une dépression dans le signal est observée jusqu'en milieu marin. Cette déformation du signal avait déjà été mise en évidence lors du passage d'échantillons marin lors d'études précédentes sur des techniques similaires (Huber et Frimmel, 1994; Baghoth et al., 2008). Appelé « effet de sel », il est produit lors de la formation préférentielle de composés hydrochlorés entre les radicaux hydroxy formés par l'oxydation de l'eau à l'intérieur du réacteur de Gräntzel et les chlorures qui sortent à ~90min (Huber et Frimmel, 1994).

Cette déformation du signal due aux chlorures est observée aussi dans les chromatogrammes du détecteur UV (figure III.1) aux mêmes temps de rétention (~90min) et aux mêmes salinités. Ainsi, la quantification des concentrations de carbone en LMWN et la mesure de l'aromaticité globale de l'échantillon (SUVA) semblent être perturbées lors de l'analyse d'échantillons salés.

Sur la figure III.2, les chromatogrammes d'azote présentent un signal important aux alentours de 90 min, temps de rétention théorique des nitrates (Huber et al., 2011). L'intensité de ce pic diminue avec la salinité, probablement de manière proportionnelle avec les concentrations en nitrates le long de l'estuaire. La correspondance des temps de rétention de cette espèce chimique et de l'interférence relevée sur les chromatogrammes de carbone et d'UV (figure III.1) nous encourage à remettre en question la faisabilité de cette mesure. En effet, la présence de chlorures, surtout en grandes concentrations, a été présentée comme source d'interférences pour le dosage des nitrates par absorption UV (Sah, 1994). La mesure d'azote reposant sur une oxydation des formes azotées en nitrates avant mesure par absorption UV à 220nm (voir Ch.II), il nous apparaît logique que la mesure d'azote totale de l'échantillon (bypass) et des nitrates ne soit pas viable dans le cas de matrices salées, comme cela a été précisé par les constructeurs de l'appareil (DOC Labor®, Karlsruhe, Allemagne).

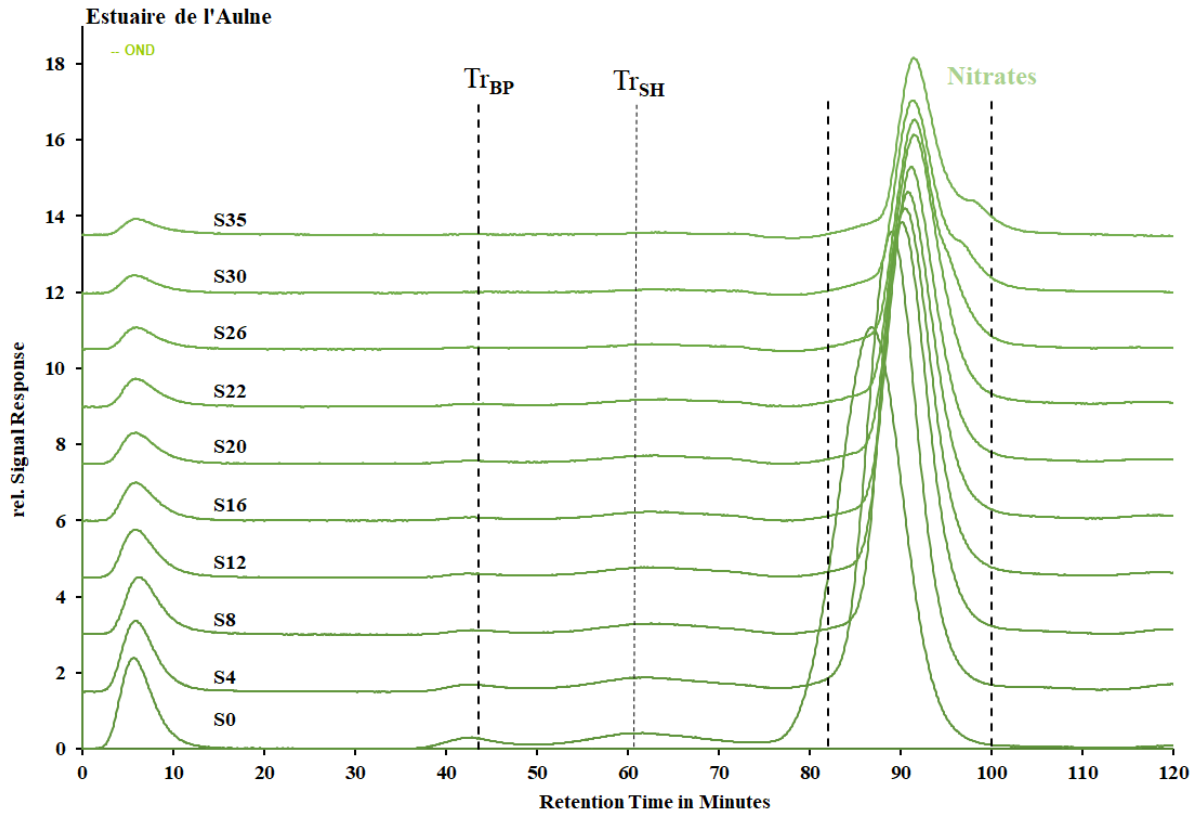


Figure III.2: Chromatogrammes d'azote superposés d'un gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne. Salinité 0 = S0, salinité 4 = S4, etc.

III.3. Application de la SEC-mDEC à la caractérisation de la MOD dans les eaux estuariennes et marines.

Dans ce chapitre présenté sous la forme d'un article publié en 2018 (**Dulaquais, G. ; Breitenstein, J. ; Waelles, M. et Riso, R. – Environmental Chemistry 15(7) – 436-449**), les possibilités et limitations de la SEC-mDEC à l'analyse de la MOD dans les eaux estuariennes et marines ont été déterminées à partir d'échantillons estuariens de l'Aulne (Bretagne, France).

Les objectifs étaient de : (i) déterminer l'impact d'une matrice salée sur les performances analytiques de la SEC-mDEC, (ii) adapter la méthode à l'analyse des eaux estuariennes et marines et (iii) proposer l'analyse de la MOD d'un gradient salé de l'Aulne avec le nouveau protocole d'analyse.

Measuring dissolved organic matter in estuarine and marine waters: size-exclusion chromatography with various detection methods

Gabriel Dulaquais,^{id} A,C Johann Breitenstein,^A Matthieu Waeles,^A
Remi Marsac^B and Ricardo Riso^A

^ALaboratoire des sciences de l'environnement marin, Institut Universitaire Européen de la Mer
CNRS/IRD/UBO UMR 6539, place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané, France.

^BGeosciences Rennes, CNRS - UMR 6118, Université de Rennes 1, F-35000 Rennes, France.

^CCorresponding author. Email: gabriel.dulaquais@univ-brest.fr

Environmental context. Dissolved organic matter (DOM), a key parameter in aquatic biogeochemistry, is difficult to characterise owing to its variable composition and structure. We report a chromatographic method with carbon, nitrogen and absorbance detection able to record the size distribution of DOM and changes in its composition. The method could be used to identify additional sources to river or coastal waters as well as monitoring the DOM size/reactivity continuum in open oceans.

Abstract. We studied the performance and limitations of size-exclusion chromatography with organic carbon, ultraviolet and organic nitrogen detectors (SEC-OCD-UVD-OND) for characterising dissolved organic matter (DOM) in estuarine and marine waters. We identified a strong salt effect on dissolved organic carbon (DOC) determination; however, calibration gave good results at salinity levels close to those of the sample analysed (DS = 2 psu (practical salinity units)), with limited matrix effects, enabling an accurate measurement of DOC, as demonstrated by an intercalibration exercise. The repeatability, reproducibility and limit of detection (3 ppb for both carbon and nitrogen) for the three detectors demonstrated the robustness of the method for a wide range of natural waters, including carbon-rich freshwaters and deep seawaters with low carbon content (6000 ppb-C to 300 ppb-C). Deeper analysis of the SEC demonstrated that proteins and polysaccharides are partly fractionated within the column, and that terrestrial humic substances, isolated on a XAD-8 resin, can also be eluted in both fractions associated with biopolymers and low-molecular-weight neutrals. Application of the method to the study of DOM along a macrotidal estuary that was influenced by agricultural activities revealed significant changes in its composition despite a conservative DOC distribution. Distinct origins and qualities of high-molecular-weight (> 500 kDa) organic compounds were identified for riverine and marine end-members. A new diagram to track changes in DOM lability is proposed to complete the humic-substances diagram.

Additional keywords: estuary, humic substances, lability diagram, organic carbon detector, SEC.

Received 24 May 2018, accepted 23 August 2018, published online

Introduction

Dissolved organic matter (DOM) plays a major role in aquatic biogeochemistry. It regulates contaminant transport, microbial growth, metal complexation and light penetration (Carlson and Hansell 2014; Hirose 2007; Nelson and Siegel 2013). Often described as a complex mixture of thousands of compounds (Repeta et al. 2014), the variable composition and structure of aquatic DOM means that it cannot be completely characterised (Leenheer and Croue 2003). Another feature of aquatic DOM biogeochemistry is the varying lability of its constituent compounds; on the one hand, the young labile organic matter (LDOM) is bioavailable for microorganisms, and on the other hand, the old refractory organic (RDOM) matter can be sequestered for centuries or millennia in the deep ocean (Hansell 2013). Often described by the size-reactivity continuum (Benner 2002), DOM lability is related more to its structure than its elemental composition. Thanks to advances in mass

spectrometry, the simultaneous determination of thousands of molecular formulae is now possible; for example, by using Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry (Flerus et al. 2011). Nonetheless, this technique is not widespread because of the high cost, the substantial volume of water required and an inability to resolve DOM reactivity without complementary analyses (Martínez-Perez et al. 2017). In estuarine and marine systems, the reactivity of DOM has been extensively studied based on total dissolved organic carbon (DOC) concentration and optical properties (Hansell et al. 2009; Mantoura and Woodward 1983; Stedmon and Markager 2005; Yamashita and Tanoue 2008, 2009). Although DOC concentration describes the general distribution of DOM and enables estimation of global carbon fluxes (Twilley 1985), it does not reveal the behaviour of the different classes of compounds that comprise DOM. Optical and particularly fluorescence techniques can trace the composition and specific source of aquatic

DOM along the earth–ocean continuum (e.g. EEM-PARFAC, Guo et al. 2011; Stedmon and Markager 2005). Even though fluorescence techniques can trace changes in the nature of bulk DOM, the data is only semi-quantitative. In recent years, the relationship between fluorescence and the size distribution of DOM has been examined (Cuss and Gueguen 2012, 2015; Stolpe et al. 2014; Yan et al. 2016). These studies have shown that humic-like and protein-like aquatic DOM are associated with the larger colloids, whereas fulvic-like DOM and tyrosine/polyphenol-like DOM are associated with intermediate and small colloids, respectively. Thus, we reason that size-exclusion chromatography (SEC) combined with UV and carbon detection (SEC-OCD-UVD) could complement these techniques by providing information on size distribution, polarity, aromaticity and carbon concentration for bulk DOM without any pre-processing.

While this technique does not provide an unambiguously fine definition of the DOM according to its structure, it does allow the quantification and optical characterisation of six operationally defined groups of organic compounds, such as humic substances or biopolymers. Additionally, the technique requires a smaller sample volume (a few mL) than that required by solid-phase extraction methods (> 2 L). SEC-OCD-UVD has been widely used for the quality control of drinking water (Cornelissen et al. 2008; Grünheid et al. 2005), wastewater (Amy and Her 2004; Batsch et al. 2005) and technical/industrial waters (Heijboer et al. 2006), and to monitor fouling in desalination systems (Huber 1998; Kennedy et al. 2005; Simon et al. 2013; Villacorte et al. 2013). However, there are relatively few reports on the use of LC-OCD-UVD to study DOM in the environment (Bagtho et al. 2008; Dittmar and Kattner 2003; Marie et al. 2017; Penru et al. 2013; Rutledge et al. 2015). While LC-OCD-UVD was successfully used to characterise DOM diversity in freshwater, the study of marine waters revealed salt issues affecting both carbon (Huber and Frimmel 1994) and UV (Bagtho et al. 2008) detector signals. Until now, LC-OCD-UVD has only been applied to one estuarine system (Dittmar and Kattner 2003), but that study did not cover the whole salinity gradient; nonetheless, significant variation in the composition and nature of humic and non-humic material from freshwater to

seawater was revealed, highlighting LC-OCD-UVD as a new tool for DOM study along the earth–ocean continuum. Furthermore, the addition of a nitrogen detector to LC-OCD-UVD has provided new perspectives for characterising DOM (becoming LC-OCD-OND-UVD, Huber et al. 2011), although environmental studies using LC-OCD-UVD-OND are still scarce. Previous studies have also focussed primarily on carbon detection, and this method has not yet been validated by marine certified reference material.

In this study, we evaluate the analytical performance and limitations of an LC-OCD-OND-UVD system for the study of DOM in estuarine and marine waters. We then apply the method to tracing changes in the distribution and composition of DOM along the salinity gradient of a macrotidal estuary (Aulne River, Bay of Brest, France) with an emphasis on humic-like substances. This work demonstrates the value of the use of LC-OCD-OND-UVD for studying DOM in estuarine and marine systems.

Experimental

Sampling

Estuarine and coastal waters were collected on the 12th of June 2017 (neap tide) along the Aulne estuary (Bay of Brest, France—Fig. 1) onboard the RV *Hesione* (INSU-CNRS-UBO). Stations were selected according to their salinity from 0 to 35 psu (practical salinity units) with a step of 2 psu, resulting in 18 sampling stations covering the whole salinity gradient (Fig. 1). Salinity was measured *in situ* using a multi-element probe (HI 9828, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA; precision of ±0.1). Sampling started from the salinity front (S ≈ 40 psu) at high tide and ended at mid tide with the sampling of the marine endmember (S = 35 psu). The inner part of the system (< 15 km long, S < 15 psu) was sampled within the first hour to limit tidal effects. Then, the outer wide-open part of the system and the Bay of Brest (> 35 km long) were sampled before mid-tide. Sampling was carried out by hand, wearing long plastic gloves (92 cm, Polysem). Samples were collected at < 0.5 m depth in precombusted (450 °C, 4 h) glass bottles (500 mL, Schott) that



Fig. 1. Sampling locations labelled with salinities along the Aulne estuary. The shore-based laboratory is also indicated.

were thoroughly rinsed with aliquots of sample. Samples were then stored in cool, dark conditions until filtration at the shore-base laboratory, ~ 1 km from the last sampling station. In the laboratory, samples were immediately vacuum-filtered using 0.7 µm precombusted GF/F filters (Ø25 mm – Whatman) placed in an acid-cleaned (HCl 0.01 M) and rinsed Teflon filter holder. Rinsing was conducted using UltraPure water (UP-water, resistivity = 18.2 MO, MilliQ Element system, Millipore). Samples were filtered from the marine to the riverine end-member in order to limit the risk of contamination in the low-organic-concentration, high-salinity samples by the high-organic, low-salinity samples. Ten mL of filtrate was collected in precombusted 20 mL glass vials (450 µL, 4 h), covered with aluminium foil and immediately placed in the refrigerated (4 °C) rack of the autosampler. All samples were filtered within four hours, and analyses were performed within three days of sampling. Estuarine samples used for the inter-comparison study were collected and filtered on the 22 of September 2017 following the procedure described above. Internal preservation tests showed that, after filtration, samples kept in the dark in glass vials are stable for at least one month (< 2% of DOC variation), ensuring no microbial processing on DOM from the filtration to the analysis of the sample.

Apparatus

Analyses were performed by using liquid chromatography with organic carbon, nitrogen, and ultraviolet detectors (LC-OCD-OND-UVD, called LC-OCD hereafter) designed and assembled by DOC-Labour (Karlsruhe, Germany). The chromatographic section consisted of two weak cation exchange columns on polymethacrylate gel (250 mm × 20 mm, TSK HW 50S, 3000 theoretical plates, Toso, Japan), in which the on-line filtered (0.45 µm PES-filter, Sartorius, Goettingen, Germany) mixture is separated into 5 distinct fractions (see section *Data acquisition and processing*). In this study, two chromatographic columns were used instead of one, because it enables better separation of DOM, especially in a seawater matrix, which has been shown to contract the chromatogram, reducing the resolution/separation (Baghoth et al. 2008). The mobile phase, a phosphate buffer purified online by UV-irradiation, was provided by an HPLC pump (S-100, Knauer, Berlin, Germany) at a flow rate of 1.5 mL min⁻¹ to an autosampler (MLE, Dresden, Germany), which injected the analyte through an injection loop. After separation, the eluate was transferred to a non-destructive UV detector (UVD, type S-200, Knauer, Berlin, Germany), with fixed-wavelength detection at 254 nm. The eluate was then divided into two fractions. One fraction was acidified online (acidification-phase flow rate 0.3 mL min⁻¹) and carried at a flow rate of 1.65 mL/min to the organic carbon detector (OCD; Huber and Frimmel 1991). The other was carried to the organic nitrogen detector (OND; K-2001, Knauer, Berlin, Germany; Huber et al. 2011) at a flow rate of 0.15 mL min⁻¹.

Reagents

All reagents were prepared with UP-water. Artificial salinities were generated by using NaCl (ChemLab, 99.8%). The phosphate-buffer mobile phase (pH 6.85) was prepared by dissolving dibasic sodium phosphate (7.5 g; EMSURE, Merck, Germany, 99.5%) and monobasic potassium phosphate (12.5 g, EMSURE, 99.5%) in UP-water (5 L). The acidification solution was prepared by adding orthophosphoric acid (20 mL; EMSURE, 85%) to a solution of potassium peroxodisulfate

(2.5 g; Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA, 97%) in UP-water (5 L). Potassium hydrogen phthalate (Alfa Aesar, 99.95–100.05%) was used to calibrate the carbon and UV detectors. The nitrogen detector was calibrated by using potassium nitrate (KNO₃, EMSURE, 99.0%). Suwannee River fulvic acid (SRFA 1S101F; International Humic Substances Society (IHSS)) and humic acid (SRHA 1S101H) were used to calibrate humic-substance (HS) molecular weights. According to Huber et al. (2011), average molecular weights for IHSS-FA (711 Da) and IHSS-HA (1066 Da) were assumed to be identical to those determined by Aiken et al. (1989). Deep-sea reference (DSR) seawater samples used to validate the measurement of DOC were provided by the Hansell Research Laboratory (Batch 17, lot#04–17).

Calibration

Calibrations were conducted following manufacturer recommendations (DOC-Labour, Karlsruhe – Germany). A stock solution containing C₈H₅KO₄ (2.13 g L⁻¹) and KNO₃ (1.39 g L⁻¹) was diluted by a factor of 100 in the mobile phase to produce a second stock solution with carbon and nitrogen concentrations of 10.0 and 1.39 mg L⁻¹, respectively. The stock solution was then diluted to generate five standard solutions with concentrations of 100, 1000, 2500, 3750, 5000 parts per billion of carbon (ppb-C) and 13.9, 139, 346, 521, 695 parts per billion of nitrogen (ppb-N). The extinction coefficient (ε) of C₈H₅KO₄ at 254 nm (ε = 1.683 × 10³ L mol⁻¹ cm⁻¹; Huber et al. 2011) was used to calibrate the spectral absorption coefficient (SAC) of the UVD. The five standard solutions used for calibration have SACs of 0.17, 1.7, 4.25, 6.37 and 8.5 m⁻¹, respectively. Mass calibration for the determination of humic substance molecular weight was assessed using two solutions made from SRFA and SRHA, both at a concentration of 0.4 mg L⁻¹ in UP-water. The aromaticity of humic substances is a calculated parameter, defined as the SAC to organic carbon (OC) content of the humic fraction (SAC/OC, Huber et al. 2011), and so could not be calibrated. Chromatographic analyses of SRFA and SRHA showed aromaticity distributions similar to those previously reported (Huber et al. 2011) (Table S1, Supplementary Material).

Data acquisition and processing

A chromatographic run provides three chromatograms (OCD, OND, UVD) which display six fractions, as exemplified by a freshwater sample in Fig. 2: (i) The bypass used to calculate the total DOC and the global absorbance of the sample; (ii) the biopolymer (BP) fraction, typically representative of high-molecular-weight compounds, including polysaccharides and proteins; (iii) the humic substances fraction (HS), in which humics are eluted, as evidenced by the SRFA and SRHA standards; (iv) the building blocks fraction (BB), which according to Huber et al. (2011), reflects breakdown products of HS and therefore HS-like material of lower molecular weight; (v) the low-molecular-weight acids fraction (LMW-acids) composed of small organic anions, typically with acid function, but small humics (LMW-HS) can also be included; and (vi) the low-molecular-weight neutrals fraction (LMW-neutrals), which is composed of small molecules with low ion density, typically alcohols, aldehydes, ketones and monosaccharides. Finally, a hydrophobic organic-carbon fraction (HOC) is determined by subtraction of the DOC concentrations in fractions (ii) to (vi) from the total DOC (i). The HOC is assumed to be stuck on the

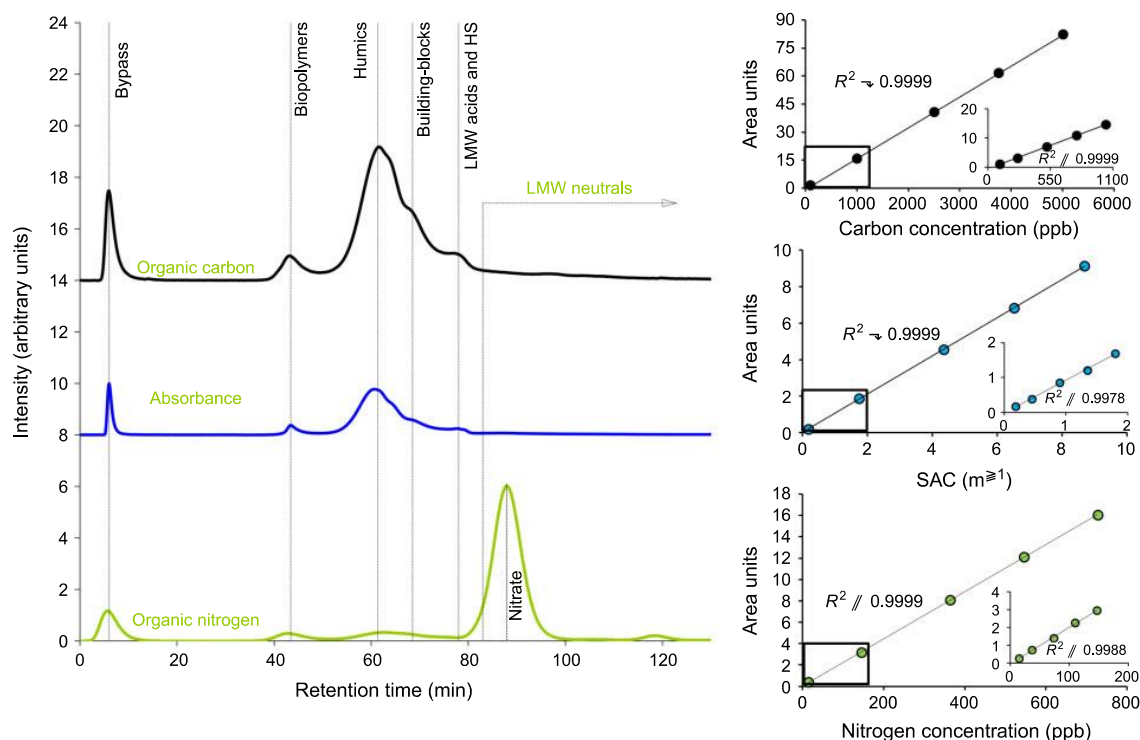


Fig. 2. Chromatograms of organic carbon (black line), UV (blue line) and organic nitrogen (green line) detectors obtained for a freshwater sample from the Aulne River. Calibrations of the three detectors at usual and low concentrations are also provided.

column by hydrophobic interactions. It should be noted that all fractions are operationally defined by the size-exclusion chromatography columns, and that shear forces could result in the breakage of macromolecules resulting in changes on the natural size spectrum of DOM. Once the chromatograms are generated, the area under each fraction is integrated and data-processed by using *ChromCALC* software provided by the manufacturer (DOC-LABOUR, Karlsruhe, Germany). *ChromCALC* software then provides the concentration of organic carbon and SAC for the six fractions described above, organic nitrogen content for BP and HS, and the mean molar mass of the HS fraction.

Results and discussion

Analytical performances and limitations

Limit of detection, repeatability and reproducibility

The analytical performance of the LC-OCD system was determined for all parameters quantified by the three detectors on three types of samples (injection volume of 2 mL). Blanks and limits of detection (LODs) were determined for repeated analyses ($n = 10$) of UP-water and UV-irradiated (3 h) coastal seawater from the Bay of Brest (S 1/434). LODs were defined as three times the standard deviation of the blanks, and all measurements were blank-corrected to enable comparison with LODs. Repeatability of the data analysis (based on 10 unpaired integrations of the same chromatogram) and repeatability of the measurement (estimated on 10 non-consecutive analyses) were assessed by using coastal seawater (Bay of Brest). The reproducibility of the method has been previously reported for freshwater (Huber et al. 2011).

Blanks for DOC determination were measured as 20 and 104 ppb of carbon for non-saline and saline matrices, respectively

(Table 1). The LODs for DOC were 10 and 27 ppb-C for UP-water and seawater, respectively. In the case of low-carbon seawater, blanks can represent a significant fraction of the DOC signal, but the LOD and quantification limit (LOQ, 10 s.d. blank) were much lower. For example, the blank of the deep-seawater reference sample (DSR) represented 16% of the DOC signal, which is 24 and 9 x higher than the LOD and quantification limits, respectively. These calculations ensure reliable DOC data after blank subtraction (see below, in *Intercomparison study*). Carbon blanks and LODs for the BP, HS, BB and LMW-acids fractions were all in the lower ppb range for carbon (# 12 ppb), which meant that quantification of OC for these fractions was still accurate, even at low concentrations. The LMW-neutrals fractions had a relatively high carbon blank and LOD in the saline matrix (Table 1, 96 and 35 ppb-C, respectively). These weak performances result from a few peaks in the irradiated coastal seawater at 90 min, the same retention time as salts. For the DSR sample, the LMW-neutrals blank value represented 28% of the signal, and so could be a source of error for seawater samples that are depleted in LMW-neutrals (e.g., 200 ppb-C). However, the LOD and LOQ were still 9.5 and 2.9 x lower than the OC signal, indicating a fair quantification of this fraction in seawater.

The performance of the UV detector was determined for the SAC of the sample (total), as well as for the BP and HS fractions. Significant blanks were only observed for total SAC in the seawater (0.64 m^{-1} , Table 1). This signal was induced by the chloride interference at an elution time of 90 min. However, SAC blanks and LODs in BP and HS for both types of water tested were extremely low (0.02 m^{-1}) and resulted mainly from the integration of baseline noise. In seawater, the SAC blank represented up to 25% of the bypass signal, as found for DSR.

Table 1. Analytical performances of the LC-OCN-OND-UVD system in freshwater and in seawater

Blanks and LOD were determined in irradiated ultrapure deionised water, and in irradiated coastal seawater (Bay of Brest, S $\frac{1}{4}$ 35 psu) for freshwater and seawater, respectively. Repeatability and reproducibility were determined on a natural coastal water (Bay of Brest, S $\frac{1}{4}$ 35 psu). nd $\frac{1}{4}$ not determined; bld $\frac{1}{4}$ below limit of detection

Organic carbon		Total DOC	BP	HS	BB	LMWN	LMWA
Fraction		(ppb-C)					
blank	freshwater	20	2	2	1	12	2
	seawater	104	1	1	0	96	6
LOD	freshwater	10	3	3	3	7	3
	seawater	27	4	2	1	35	12
coastal seawater (Bay of Brest)							
repeatability of data analysis ($n = 4$)	mean	1046	65	551	170	231	bld
	s.d.	9	2	12	8	4	bld
	RSD (%)	1	3	2	5	2	bld
repeatability ($n = 4$)	mean	1071	72	565	173	233	bld
	s.d.	31	6	14	13	12	bld
	RSD (%)	3	9	2	8	5	bld
Fraction		Molecular weight (g mol^{-1})	Organic nitrogen (ppb-N)		SAC (m^{-1})		
Fraction		HS	BP	HS	Total	BP	HS
blank	freshwater	nd	1	1	0.05	0.02	0.02
	seawater	nd	1	3	0.64	0.02	0.01
LOD	freshwater	nd	2	3	0.07	0.05	0.04
	seawater	nd	3	3	0.63	0.04	0.04
coastal seawater (Bay of Brest)							
repeatability of data analysis ($n = 4$)	mean	718	9	31	4.54	bld	4.22
	s.d.	11	3	3	0.05	bld	0.08
	RSD (%)	1	28	9	1	bld	2
repeatability ($n = 4$)	mean	718	11	31	4.11	bld	4.09
	s.d.	15	3	6	0.46	bld	0.16
	RSD (%)	2	32	19	13	bld	4

Without subtraction of this blank, the global specific UVA absorbance (SUVA) can be greatly overestimated and lead to misinterpretation of DOM quality, particularly for seawater depleted in aromatic organic matter. The LOD and LOQ of SAC in seawater were 0.63 and 2.1 m^{-1} , respectively, indicating that the total SAC may be close to or below the quantification limit in seawater, as exemplified by the SAC signal of the DSR (2.45 m^{-1}). As a result, total SAC data from the LC-OCD and derived parameters (e.g. SUVA) must be used carefully in a saline matrix. Nevertheless, the SAC of both the BP and HS fractions were not affected by high blank values (SAC \approx 3 LOQ in DSR); thus, SAC data remain quantitative in seawater for these two fractions.

Due to salt interference at 90 min, OND is mainly used for the quantification of nitrogen content in the BP and HS fractions in marine samples. In these two fractions, blanks were in the low ppb range for both the UP-water (1 ppb-N) and the irradiated seawater (3 ppb-N). Similar to UVD, dissolved organic nitrogen (DON) blanks resulted from noise in the baseline. The absence of nitrogen in these fractions was expected, since UV irradiation converts DON into nitrate. The LODs were also in the low ppb range, but were slightly higher for seawater than for UP-water. However, the LOQ of the OND in seawater (10 ppb-N) may be insufficient for an accurate quantification of DON in seawater due to low concentrations. Indeed, DON in the HS fraction of the

DSR sample (i.e. 9ppb-N) was less than the LOQ. As a result, uncertainties on DON measurements could occur for nitrogen-depleted seawater.

The repeatabilities of the OCD and UVD signals were always \leq 5% of RSD (Table 1), ensuring accurate quantification of OC and aromaticity in the different fractions. However, higher RSDs were recorded for DON measurements in the marine sample, for HS and BP fractions (9 and 28% respectively). The high RSD for the determination of nitrogen content in the BP fraction can be explained by the low concentration of organic nitrogen (9 ppb), which is less than the LOQ of the OND in seawater (Table 1). The SAC of the BP fraction was below the LOD, which meant that the repeatability could not be quantified. The repeatability of the OCD measurements was slightly higher than the error resulting from the *ChromCALC* data analysis but always \leq 10% of RSD in all fractions including total DOC (Table 1). The molecular weight and SAC of the HS also showed high performance, with RSDs of 2 and 4%, respectively. The RSD of SUVA was relatively high (13%), but was considered acceptable for a qualitative description of changes in the aromaticity of DOC. Again, weaker performances were found for the OND. The RSD of nitrogen quantification in the BP and HS fractions were respectively 32 and 19%. The high RSD in the BP fraction can be explained by the low concentrations measured. In the HS fraction, the DON (31 ppb) was only 3 x

higher than the LOQ. In the BP fraction, DON was close to LOQ. The RSDs in the freshwater samples were $\approx 10\%$ in both the HS and BP fractions.

The carbon to nitrogen ratio is often used to identify the nature and the origin of organic matter. The high RSD for the OND will therefore lead to high uncertainties in the C/N molar ratio. In our coastal sample, the C/N ratio of HS was reasonably affected by such uncertainties (C/N $\approx 19 \pm 3$). However, uncertainties in the BP fraction were particularly critical. The mean molar ratio of C/N in the BP fraction was eight, but when both carbon and nitrogen uncertainties were considered, the C/N ratio varied between 6.4 and 15.2. In other words, C/N can be close to the Redfield ratio, or to the elemental ratio of a fulvic acid standard (International Humic Substances Society standard 2S102F) and, if not taken into account, such uncertainties can lead to misinterpretation of the data. While the RSD was acceptable in freshwater samples of high nitrogen content ($\approx 10\%$, ≈ 50 ppb-N), nitrogen data for the BP fraction should only be used for qualitative interpretation (e.g., general trends, significant variation) for marine samples which are generally depleted in DON.

Effect of salinity

LC-OCD systems are known to be affected by salts (Baghoth et al. 2008; Huber and Frimmel 1994). Since we are using this system in marine and estuarine waters, the impact of salt on the sensitivity and uncertainty must be quantified. The salt effect was first highlighted by comparing chromatograms of an irradiated salty UP-water ($35 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$) or irradiated coastal seawater (Fig. S1, Supplementary Material) with an irradiated UP-water. As expected, the UP-water did not show any detectable peak for the different detectors. In contrast, a salt effect was observed in the chromatograms for both the salty UP-water and the irradiated coastal seawater for all three detectors. The OND chromatogram of the salty UP-water showed interference at 90 min, corresponding to nitrate (Fig. 2). Chloride interference in nitrate quantification using UV detection is well known (Sah 1994). Therefore OND cannot be used to determine nitrate or total nitrogen (bypass) in salty waters. Similarly, the OND chromatogram of the irradiated coastal seawater had an intense peak at 90 min resulting from the combination of residual nitrate and the chloride interference (Fig. S1, Supplementary Material). Another small peak in the OND chromatogram was observed near 70 min, corresponding to the retention time of LMW-acids. Huber et al. (2011) noted that ion-exchange interactions in the resin cause small anions to be eluted in this domain; i.e., chloride may be eluted at the same time as LMW-acids and cause interference. Nevertheless, no salt interference was found at the time of elution for either BP or HS fractions, allowing an accurate quantification of DON. The UVD chromatograms of both salty UP-water and irradiated coastal seawater also showed interferences in the bypass peak. Bypass peaks included a small negative component before the peak. If integrated, this negative interference would be a source of error for the total SAC. Similar to the OND chromatogram, two narrow peaks were observed at retention times of ≈ 70 min (LMW-acids) and 90 min (LMW-neutrals), and were both attributed to chloride interference. While salt interference did not affect the BP and HS fractions, a salt peak for the bypass must be subtracted for an accurate estimation of the SUVA of marine samples.

A different pattern was apparent for the OCD chromatograms. For the UV-irradiated salty UP-water, a 'salt through' was observed for the retention times from 70 to 90 min (Fig. S1a,

Supplementary Material), followed by a small peak. Such an effect was previously observed in LC-OCD studies (Baghoth et al. 2008; Huber and Frimmel 1994), where it was explained by the competition for UV-oxidation between chloride and DOM. The formation of hypochlorite by UV irradiation leads to an incomplete oxidation of DOC, and decreases the production of CO_2 in the OCD detector (Aiken 1992). In contrast, for the irradiated coastal seawater, a small bypass peak was found as well as a double peak at 90 min in the LMW-neutral fraction. Considering the retention times, it is conceivable that this double peak is in fact a simple peak altered by the formation of hypochlorite in the presence of salt. The presence of a small bypass peak may reflect the presence of ultra-refractory organic matter that could not be oxidised by the high-pressure mercury-vapour lamp. However, since the quantification of organic carbon is based on UV oxidation in the Grätzel thin-film reactor, the possibility of UV-refractory organic matter should be discarded. Alternatively, this peak could be due to salt-induced 'column bleeding' as proposed by Huber and Frimmel (1994). Some of the DOC is retained by the columns (e.g. HOC), and it is possible that salts allow partial elution of the accumulated hydrophobic DOC, inducing an OC peak at the same elution time as the salt. Nevertheless, the salt interference does not impact carbon quantification of the other fractions (Fig. S1, Supplementary Material), and accurate quantification of DOC can be assessed by subtracting these interferences (Fig. S1, Supplementary Material).

The dependence of detectors on salinity was examined by running calibrations at different salinities (i.e. 0, 8, 16, 24, and 34 psu). The salinity dependence varied among the different detectors (Fig. 3). The UVD signal did not vary with salinity (Fig. 3c), and variation seen for OND was within the uncertainty of the method ($\approx 5\%$) over the salinity interval studied (0–34 psu). However, the intercept of the OND calibration curve did increase with salinity (Fig. 3d), resulting from chloride interference at 220 nm (Fig. S1, Supplementary Material). Nonetheless, intercepts of calibration are not used for calculating nitrogen concentration, which means that the quantification of the nitrogen content in the HS and BP fractions is still accurate. On the other hand, the OCD sensitivity was affected by salinity. While the salt effect on OCD sensitivity for carbon quantification in the different fractions was relatively small (Fig. 3b, $\approx 7\%$ in the [0–34 g/L] interval), determination of the total DOC (bypass signal) was found to be highly dependent on salinity (Fig. 3a). The bypass calibration is twice as sensitive without salt ($1.6 \times 10^{-3} \text{ AU ppb-C}^{-1}$) than at a marine salinity ($8.0 \times 10^{-4} \text{ AU ppb-C}^{-1}$), which demonstrates the absolute necessity to calibrate the detector at a salinity as close as possible to those of the samples studied. Indeed, the use of a salty calibration for freshwater analysis overestimates the DOC by 100%. Conversely, the quantification of DOC in marine waters with a freshwater-type calibration leads to a systematic underestimation of 50%. A linear dependence of the OCD sensitivity to salinity was observed (sensitivity $\approx 1.6 \times 10^{-3} - 2.4 \times 10^{-5}$ salinity, $R^2 = 0.999$, $n = 45$), allowing the calibration slope to be adjusted to the exact salinity. The dependence of the detector on salinity can be an important issue in systems with variable salinities, such as estuaries. This is exemplified in Fig. 3e, where DOC concentrations are calculated using a fresh calibration (S0, red dots), a marine calibration (S35, violet dots) and an adjusted salinity calibration (white dots). The use of two types of calibration (fresh and marine) allowed correct DOC quantification at low (≈ 5 psu) and high salinities (≈ 30 psu); however, systematic errors on DOC quantification were found

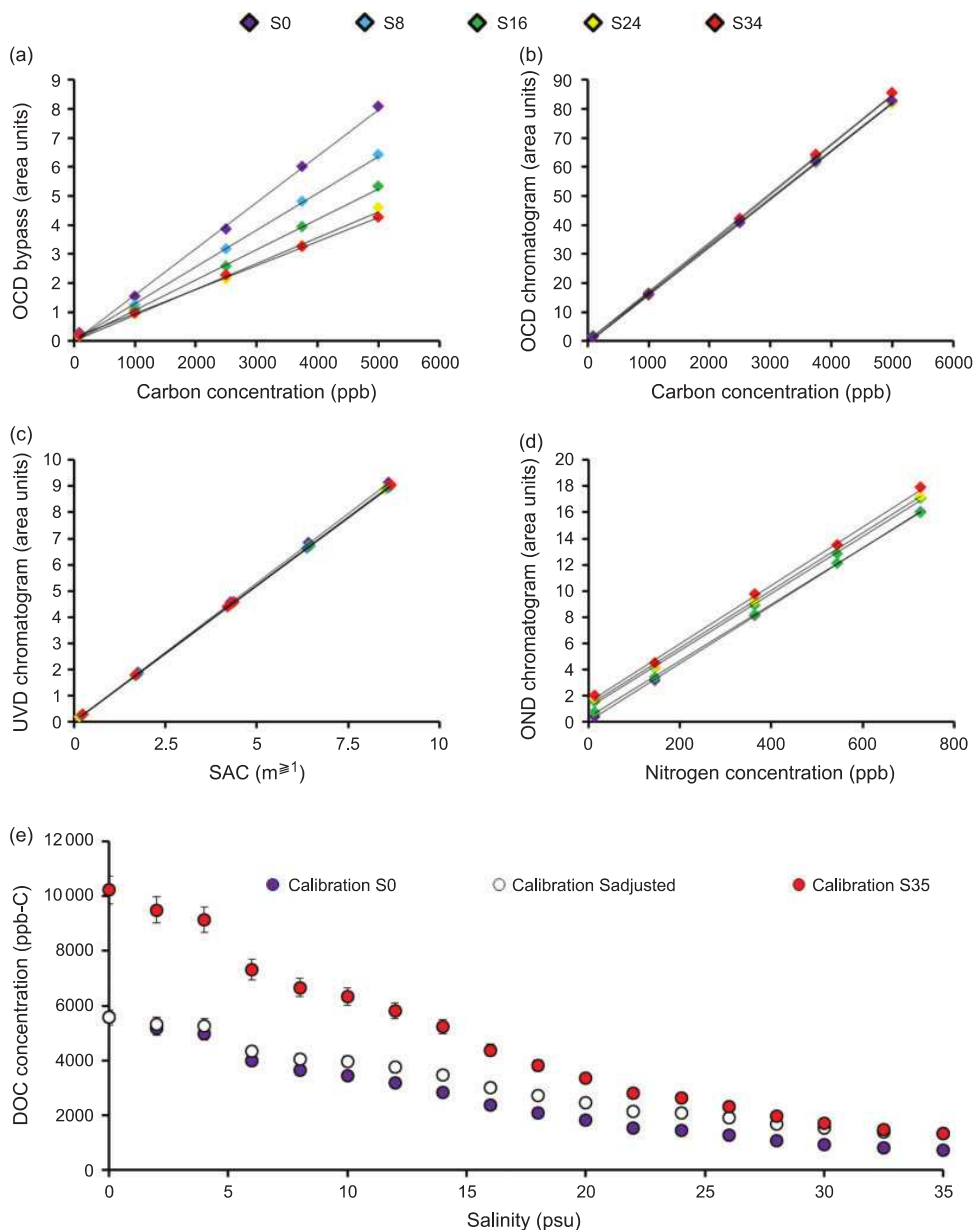


Fig. 3. Calibration of LC-OCD-OND-UVD detectors at various salinities. (a) Total dissolved organic carbon (OCD bypass), (b) organic carbon in the different fractions (OCD chromatogram), (c) UV detector (UVD chromatogram), (d) organic nitrogen detector (OND chromatogram). (e) Salinity dependence of dissolved organic carbon concentration measurement. DOC concentrations are calculated using a fresh calibration (S0, red dots), a marine calibration (S35, violet dots) and using adjusted salinity calibrations (white dots).

in the core of the estuary (5 psu, $S = 30$ psu). We thus recommend either calibrating the system at adjusted salinity, or determining the salinity dependence (linearity) of the detector to estimate the adjusted calibration. Alternatively, calibrations at salinities close to those of the samples ($DS = 2$ psu) would limit any errors resulting from matrix effects.

Intercomparison study

The accuracy of the DOC measurement in seawater was determined after repeated analyses ($n = 15$) of a deep-seawater

reference sample (DSR; Hansell laboratory; Miami, USA). The mean DOC concentration measured was 552 ± 37 ppb-C, or 45.3 ± 3.1 $\mu\text{mol-C L}^{-1}$, which is in excellent agreement with the consensus value for the DOC of the reference seawater ($43\text{--}45$ $\mu\text{mol-C L}^{-1}$). Thus, the determination of DOC in marine samples by LC-OCD system is validated. We further studied the reliability of the method through an intercomparison exercise of DOC quantification along the Aulne estuary. After filtration, two sets of 18 samples, covering the whole salinity gradient, were stored in precombusted amber glass. Immediately after collection, one set was placed in the refrigerated plate of the

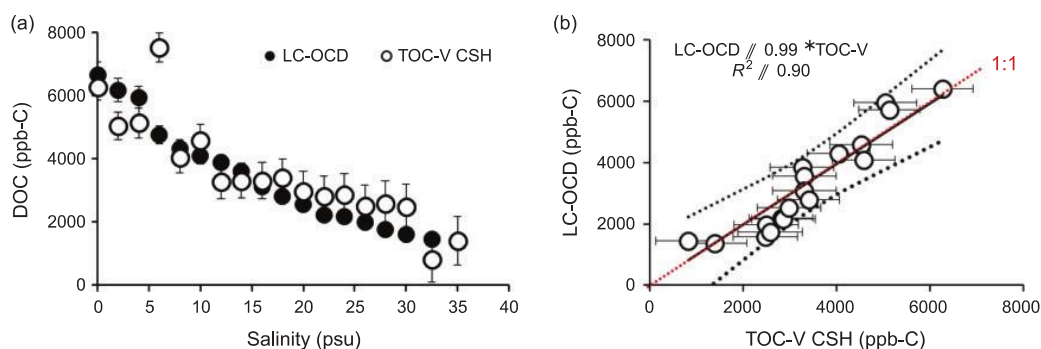


Fig. 4. Intercomparison study for dissolved organic carbon determination between LC-OCD (dark dots) and TOC-V (white dots) methods. (a) DOC concentrations along the salinity gradient of the Aulne estuary. (b) Scatter plot of DOC values measured by LC-OCD versus TOC-V method. The equivalence line (red dotted line) and the 95 % confidence interval (black dotted line) are shown.

autosampler for analyses, while the other set was sent to Geosciences Rennes laboratory (University Rennes 1, Rennes, France) for analyses. Samples were received 4 h after filtration and were analysed immediately. DOC concentrations were measured by using a total organic carbon analyzer (Shimadzu TOC-V-5050A). The accuracy of the total carbon measurement was 3 %. Detection and quantification limits were 230 and 310 ppb-C, respectively. Results from the intercalibration exercise are shown in Fig. 4. The DOC concentrations decrease along the salinity gradient from the freshwater (S0) to the marine end-member (S35) for both methods. However, DOC concentrations measured by LC-OCD were slightly higher than those determined by the TOC-V in the upper part of the estuary, but lower at salinities higher than 15 psu. The linear regression between the two datasets did not significantly differ from the equivalence line (0.99 ± 0.04), and all data points fall within the 95 % confidence interval (Fig. 4b). Nonetheless, the correlation coefficient was relatively weak ($r^2 \approx 0.90$). Therefore, two additional statistical tests were performed; a bilateral paired *t*-test and a Wilcoxon Mann–Whitney test, in order to determine whether the two datasets were significantly different. Results from both the *t*-test (p value ≈ 0.76 ; $t_{\text{value}} \approx 0.3$; $t_{\text{critical}} \approx 2.11$) and the Mann–Whitney test ($W \approx 494$; p -value ≈ 0.73) indicate that the null hypothesis cannot be rejected at a 5 % confidence level. These results confirm that DOC data acquired by the LC-OCD can be compared with the data generated by the TOC-V method, which is widely used for the study of DOC in estuarine and marine systems.

Chromatographic study

Effect of injection volume

For an injection volume of 2 mL, LODs of the LC-OCD system were found low enough for DOC (1 # LOD # 27 ppb-C) and DON (LOD ≈ 3 ppb-N) quantification in the different fractions in most natural waters. Nonetheless, in the case of carbon-depleted seawater, such as the old deep north Pacific seawater, concentrations of DOC (300–450 ppb-C; Jackson and Williams 1985; Medeiros et al. 2015) could be close to the LOQ. Injecting a larger volume of sample is a standard operating procedure for low carbon/nitrogen samples in chromatography. It increases the DOC (and DON) load and subsequently decreases the LOQ. However, a change in injection volume may also affect the elution of the sample, and thus also the chromatogram and the results. We checked whether such modifications exist by injecting from 1 to 4 mL of coastal

seawater and DSR. For all injection volumes studied, the DOC concentrations (bypass pathway), nitrogen contents and UV signals variations were within the uncertainties of the method. A higher injection volume increases the UV and nitrogen peaks of chromatograms, which simplifies their integration and decreases the RSD on the OND signal. On the contrary, the molecular weight of HS and OC concentrations of the different fractions were significantly modified at an injection volume greater than 3 mL. Indeed, the injection of 4 mL of coastal seawater decreased the carbon concentration of the HS fraction by 110 ppb (25 %) compared with 1 mL of injection. At the same time, the BB fraction increased by 100 ppb (100 %). The molecular weight of HS was also affected, with an apparent decrease from 619 to 574 Da, when the injection volume increased from 1 to 4 mL. We assign these changes to insufficient separation of the different fractions by the column for the injection of 4 mL of sample. These changes were much less significant for 3 mL of injection (e.g. 10 % decrease in HS) and within the measurement uncertainty when 2 mL was injected. Based on these results, we suggest using an injection volume of 2 to 3 mL for accurate measurement of DOM in organic carbon-depleted seawater.

XAD-8 fractionation

Humic substances are hydrophobic organic compounds that are generally isolated on an XAD-8 resin (Thurman and Malcolm 1981). In order to determine which fractions are retained by this resin (defined by the column), we analysed a freshwater sample (Aulne River) before and after it passed through an XAD-8 (Superlite™, Sigma-Aldrich). After cleaning and preparation of the hydrated DAX-8 resin, 3.8 L of sample flowed at 1 mL min^{-1} through two parallel columns (200 \times 25 mm) each containing 15 mL of resin. After eluting the resin (0.1 M NaOH ultrapure; 0.5 mL min^{-1}), and subsequently neutralising the hydroxide ions (with 1 mL HCl for 100 mL suprapure HCl 30 %), the eluate was analysed. Taking LMW-HS as part of the HS fraction, we found that 80 % of the compounds retained by the DAX-8 resin were in the HS fraction, with just 7 % in the BB fraction. The remaining 13 % were BP (5 %) and LMW-neutrals (8 %). The DOM size distribution in the eluate was identical to that before the sample passed through the resin, indicating there was no fractionation during elution. A similar effect of XAD fractionation on LC-OCD chromatograms has been previously observed in marine samples by Penru et al. (2013). Those authors found that all the organic compounds

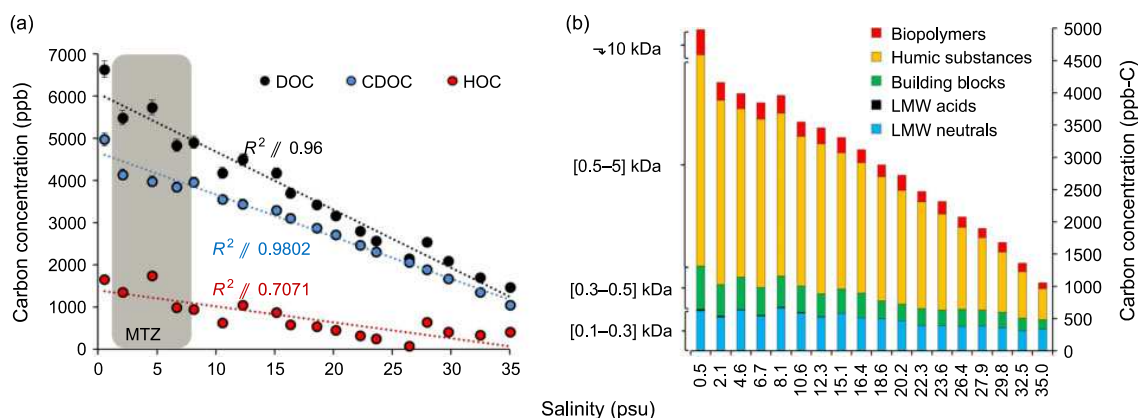


Fig. 5. (a) Dissolved organic carbon (DOC, black dots), dissolved hydrophilic organic carbon (CDOC, blue dots) and dissolved hydrophobic carbon (HOC, red dots) distributions along the Aulne estuary. The maximum turbidity zone (MTZ) is indicated by the grey area. (b) Distribution of carbon concentration along the Aulne estuary in the five fractions separated by size exclusion chromatography.

retained by a XAD-8 were in the HS and LMW-acid (probably LMW-HS) fractions. Retention of BB by the XAD was expected, since BB are thought to be fragments of HS (Huber et al. 2011).

The presence of 'XAD-8 type' compounds in the BP fraction in our case is more surprising. Nonetheless, it shows that, in freshwater samples, humic substances of high molecular weight may be eluted in the BP fraction. Overall, our results indicate that the HS fraction is well representative of XAD-8 resin-trapped compounds, and thus also of humic substances, as operationally defined by Thurman and Malcolm (1981).

Elution of high-molecular-weight biological compounds

According to Huber et al. (2011), high-molecular-weight (HMW) compounds of biological origin, typically proteins and polysaccharides, are eluted in the biopolymer fraction (BP). While elution of biopolymer mixtures by a LC-OCD has been studied (Stewart et al. 2013), the effect of the SEC column on HMW compound fractionation is unknown. Hydrolysis of peptides or depolymerisation of polysaccharides can occur on SEC columns, thereby inducing bias in the DOM study by artificially increasing the LMW fractions and decreasing the BP fraction. We attempted to determine if such a process occurred in our case, by injecting a bovine serum albumin protein (BSA, MW 66.5 kDa) and a polysaccharide (starch, MW . 100 kDa) samples. After elution, the two carbon chromatograms showed that the two compounds are eluted mainly in the BP fraction. As Stewart et al. (2013) showed, the BSA signal is eluted slightly after the SEC column void volume, indicating that void volume is representative of compounds with MW . 70 kDa. In contrast, some of the starch sample was eluted at the SEC column void volume, resulting from a compound with MW . 100 kDa. For both the BSA and the starch, most of the carbon signal was found in the BP fraction, but the presence of LMW-neutrals compounds was also observed in both cases. This was particularly important for the BSA, for which 30 % of the total carbon load eluted in the LMW-neutrals fraction. These results show that peptide and polysaccharide fractionation did take place within the SEC column. We demonstrate here that the LMW-neutrals fraction may contain labile organic matter resulting from protein degradation within the SEC column. This kind of interference may be important in protein-rich media such as in bacterial

culture, wastewaters or biofilms, but should be limited in natural freshwaters and in marine waters. The UV chromatogram of the BSA was marked by a significant signal in the BP fraction. This signal has been attributed to the 45 aromatic amino acids of the BSA (3 Tryptophan, 21 Phenylalanine and 21 Tyrosine; www.uniprot.org [accessed 16 February 2018]). When the UV chromatogram is combined with that of the OND, the BP fraction in natural waters can be better characterised. In the case of a low C/N ratio (. 8), the BP fraction would be composed of proteins that could be defined as hydrophobic (high SAC) or hydrophilic (low SAC) depending on the UV absorbance. The absence of a UV signal and a high C/N ratio (. 20) would be representative of polysaccharides. In the case of both high SAC and C/N ratio, the presence of humic substances of high molecular weight in the BP could be invoked because these compounds can also be eluted within this fraction, as previously demonstrated (see *XAD-8 fractionation*).

Re-elution of the HS fraction

The LC-OCD device is equipped with a fraction collector at the back of the SEC column and in front of the detectors. Due to hydrophobic interactions, it is possible that low-molecular-weight compounds are co-eluted with HS (or BP) within the SEC column, and are therefore not completely separated in a first chromatographic run. To determine whether such co-elution occurs, we collected the HS of a coastal seawater sample (Bay of Brest) after a first pass through the SEC and then reinjected it after complete elution of the sample. After the HS fraction was eluted, the chromatogram showed no other peak than that of the HS, which demonstrates that optimal separation is achieved in a single chromatographic run.

Application study: DOM changes along an estuarine mixing gradient

Global and specific distributions

The distribution of DOC, hydrophilic DOC (CDOC) and hydrophobic DOC (HOC) along the Aulne estuary are shown in Fig. 5a. During the sampling period, concentrations along the mixing gradient decreased from 6641, 4979 and 1748 ppb-C to 1473, 1053 and 85 ppb-C for DOC, CDOC and HOC respectively. DOC concentrations measured in the outer wide-open part of the estuary were in the same range as those previously

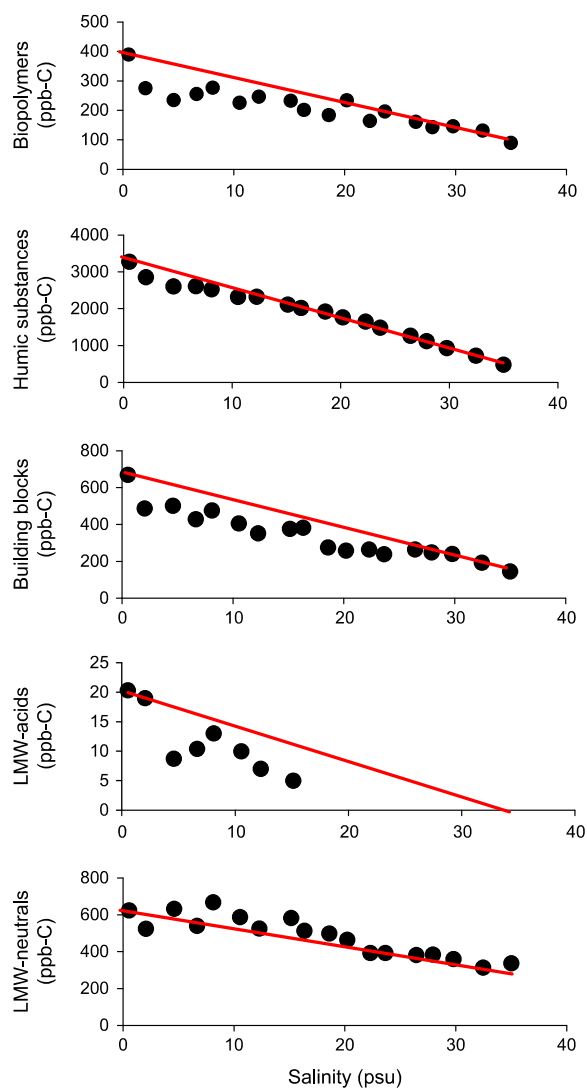


Fig. 6. Distributions of carbon concentrations along the salinity gradient of the Aulne estuary in the five fractions separated by size exclusion chromatography. Red dashed lines indicate theoretical dilution slopes.

observed in the Bay of Brest by Aminot et al. (1990). The distributions of DOC, CDOC and HOC were all relatively conservative, indicating limited DOM transfers between different phases within the system (e.g. exchanges with particles or sediments). However, our data suggest a slight loss of CDOC in the maximum turbidity zone (MTZ, salinity range 1–8 psu, Fig. 5a) and a small source of HOC at high salinities ($S = 27$ psu). The linear regression for DOC provided a slope of -137 ppb-C per salinity unit. This is consistent with the linear regression found by Aminot et al. (1990) in the nearby Elorn estuary (Bay of Brest) at similar water flow ($3.1 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$).

Fig. 5b shows the distributions of the five CDOC fractions separated by the columns. All fractions showed a decrease in concentration from the upstream part of the estuary to the marine part (Fig. 5b and Fig. 6). The distributions of the different fractions were relatively conservative, as displayed by the small differences between the theoretical dilution equation and the observed linear regression equations (Table 2). With concentrations ranging from 3275 to 482 ppb-C, the HS fraction was the main contributor to CDOC, accounting for 62% at low salinities, and 44% in the marine part. This is consistent with previous results showing that humic substances account for 30 to 80% of DOC in estuarine systems (Dittmar and Kattner 2003; Waelles et al. 2013).

In the Aulne estuary, the distribution of electroactive humic substances (eHS), determined by cathodic voltammetry, was previously reported by Marie et al. (2015). Although distributions along the salinity gradient are similar (conservative), the HS concentrations determined by LC-OCD reported in this study are higher than those reported by Marie et al. (2015). This could be explained by the fact that eHS represents the fraction of humic substances able to bind to trace elements (Dulaquais et al. 2018), whereas LC-OCD measurement is more representative of all humic substances (see *XAD-8 fractionation*). In other words, our results indicate that not all humic substances are metal ligands in the Aulne estuary. LMW-neutrals were the second-largest contributors to CDOC, with a proportion increasing from 13 to 32% along the estuary, suggesting a change in DOM composition from freshwaters to marine waters. The contribution of building blocks and biopolymers to CDOC (8 and 14% respectively) were relatively constant in the estuary (Fig. 5b). That of LMW-acids was close to the limit of quantification throughout the estuary (Fig. 5b).

Table 2. Range of carbon concentrations, theoretical dilution equation and observed regression along the salinity gradient of the Aulne estuary for CDOC and the different fractions separated by size-exclusion chromatography

Fraction size	CDOC	Biopolymers (, 10 kDa)	Humic substances (0.5–10 kDa)	Building blocks (0.3–0.5 kDa)	Low molecular acids (, 0.3 kDa)	Low molecular neutrals (, 0.3 kDa)
Carbon concentration in ppb (contribution to CDOC) in the end-members						
S 0.5		380 (8%)	3275 (66%)	671 (13%)	20 (, 1%)	624 (13%)
S 35		89 (8%)	482 (46%)	145 (14%)	, LOD	337 (32%)
Theoretical dilution equation						
	113S β 5030	9S β 385	81S β 3315	15S β 680	0.6S β 20	7.9S β 630
Observed linear regression						
equation	100S β 4666	5.9S β 312	72S β 3146	12S β 550	0.9S β 19	9.4S β 650
R^2	0.98	0.82	0.98	0.88	0.76	0.82
n	18	18	18	18	8	18

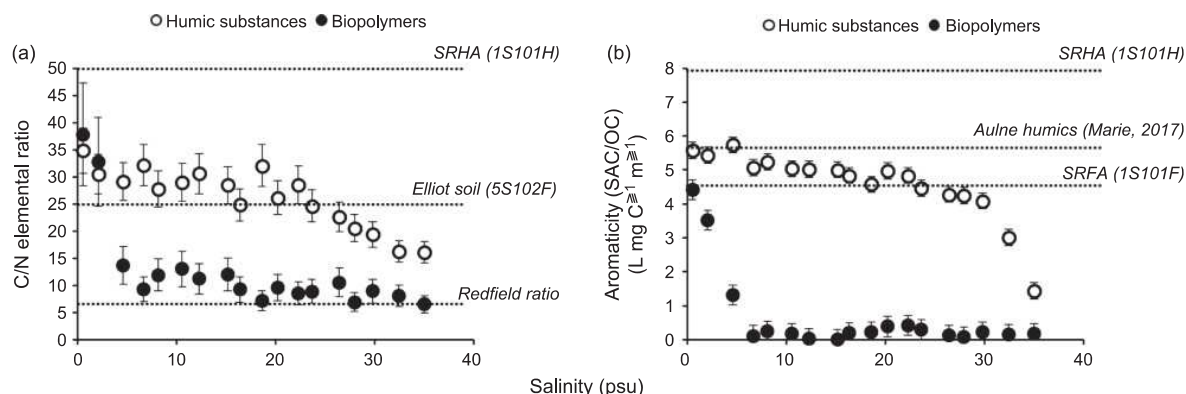


Fig. 7. Distribution of (a) carbon to nitrogen (C/N) ratio and (b) aromaticity in the humic substance (white dots) and biopolymer (black dots) fractions along the salinity gradient of the Aulne estuary.

While at salinities < 12 psu, all operational fractions of the CDCC were conservative, slight deficits in BP, HS and BB and enrichment in LMW-neutrals were recorded in the upper estuary and, more specifically, in the MTZ (Fig. 5a). These anomalies could be related to coagulation/flocculation induced by the increase in ionic strength at the beginning of mixing and by particle exchange in the MTZ. Loss of humic acids by coagulation–flocculation processes in the early stage of mixing is well known and has been previously observed in estuarine systems, including the Aulne estuary (Ertel et al. 1986; Fox 1983; Leenheer and Croue 2003; Sholkovitz et al. 1978). Although these processes can be invoked for HS and BB deficits, they do not explain the excess of LMW-neutrals and BP deficit in this part of the estuary. Excess of LMW-neutrals could be attributed to partial degradation/decomposition of humic material or colloidal DOM. Indeed, the increase in ionic strength and pH probably affected weak bonds, leading to partial dissociation of DOM in supramolecular assemblages, as well as desorption of DOM from inorganic colloids (Meyer 1994). All these processes may have increased the concentration of LMW-neutrals. In addition, microbial degradation of large labile organic compounds, such as those typically found in the BP fraction, could also explain this positive anomaly. However, the C/N ratio and the aromaticity of BP (see below) indicate that, in the upstream part of the estuary, the fraction of BP was probably composed of high-molecular-weight HS (HMW-HS). Therefore, the excess of LMW-neutrals could be related to humics disaggregation of this HMW-HS rather than to microbial degradation of large labile organic compounds. However, it should be noted that, in this part of the estuary (MTZ), this source of LMW-neutrals only slightly affected the overall composition of DOC, and was insufficient to offset the deficits of BP, HS and BB.

Monitoring the carbon to nitrogen ratio and the aromaticity of DOM along the estuary

The C/N ratios and the aromaticity of the BP and HS fractions were used to monitor significant variations in the composition of DOM along the estuary (Fig. 7). In the upstream part ($S < 3$ psu), the BP and HS fractions had similar C/N ratios in the 30–40 range (Fig. 7a), and the aromaticity of the BP was relatively high (> 5 , Fig. 7b). Since the BP fraction is composed of high molecular weight (HMW) compounds, the presence of HMW-HS in the upper part of the estuary is highly probable, as it has previously been observed in a similar temperate macrotidal estuary (Waelles et al. 2013). At higher salinities, the sharp

decrease in C/N ratio and aromaticity (Fig. 7) indicates a significant change in BP composition, and suggests that HMW-HS does not persist in this fraction. As with HS and BB, flocculation of HMW-HS in the early stage of mixing could then explain the BP deficit observed in the upper part of the estuary (Fig. 6). In the marine part of the estuary ($S > 20$ psu), the C/N ratio of BP tends to reach the Redfield ratio (Fig. 7a), and aromaticity was near or below the detection limit of UVD (Fig. 7b). These results indicate that the marine organic compounds of high molecular weight were mainly composed of aliphatic structures probably derived from degraded marine microorganisms, rather than of polysaccharides or HMW-HS.

The HS fraction was marked by a high and relatively constant C/N ratio (29.5 \pm 2.7) down to a salinity of 20 psu. This C/N ratio is significantly lower than those of the Suwannee River Humic Acid standard (1S101 SRHA, C/N $\frac{1}{451}$) but close to the elemental ratio of Elliot soil standard (Fig. 7a). Elliot soil standard is typical of the prairie of the Indiana (USA) and is representative of a fertilised terrestrial source (Ulu et al. 2015). This indicates that, in the inner part of the Aulne estuary, HS would mainly come from the weathering of fertilised soils. This is in line with the land use of the Aulne River watershed (cultivated areas and in heterogeneous agricultural areas). At salinities above 20 psu, the C/N ratio of HS fell to 16 (Fig. 7a). This decrease indicates a change in the composition of these substances, probably due to increased inputs of protein, N-rich bacteria and phytoplankton to the marine part of the estuary (Hedges and Oades 1997; Nissenbaum and Kaplan 1972). Nevertheless, the C/N ratio remained higher than that of HS found in marine sediments (i.e. 11–13; Dereppe et al. 1980; Nissenbaum and Kaplan 1972; Zhang et al. 2016), indicating that terrestrial humic substances still persisted in coastal seawater. The distribution of the aromaticity of the HS fraction along the estuary also showed changes in its composition (Fig. 7b). While the aromaticity is relatively constant in the inner part of the estuary (5.1 \pm 0.3 L mg C⁻¹ m⁻¹), and in good agreement with those previously measured in the Aulne river (5.2 \pm 0.6 L mg C⁻¹ m⁻¹; Marie 2016), it decreased sharply in the marine sector (Fig. 7b) from 5 to 1.4 L mg C⁻¹ m⁻¹. Such variation indicates a change in the molecular composition of HS from unsaturated structures (e.g. phenol, alkyl phenols) in freshwaters to long-chain aliphatic components in marine waters. These kinds of structural changes are unlikely to occur in the 25–35 psu salinity range, and we associate this decrease in aromaticity with an increasing contribution of marine humic

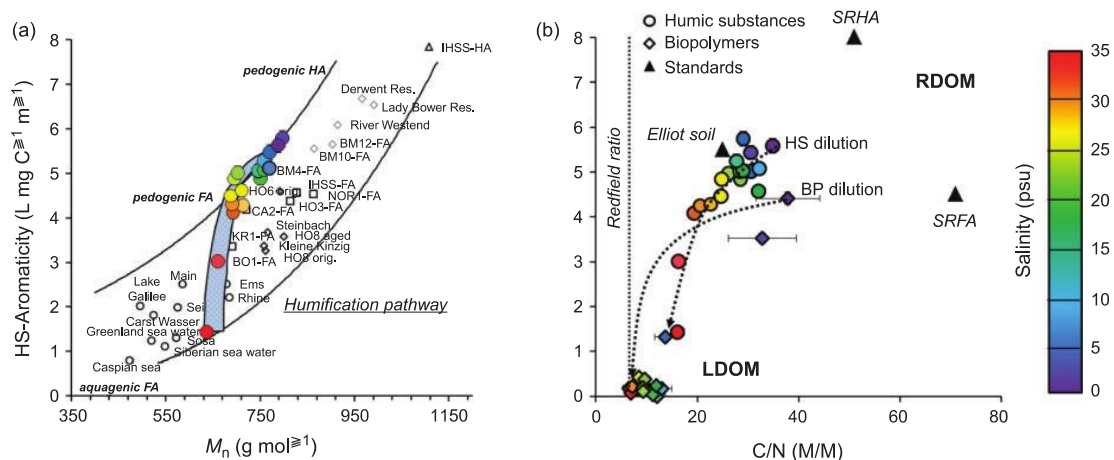


Fig. 8. (a) Plot of the humic substances of the Aulne estuary in the HS-diagram adapted from Huber et al. (2011). The blue-shaded area represents the theoretical mixing of the freshwater of the Aulne River with the seawater of the Bay of Brest. (b) Plot of humic substance (dots) and biopolymer (squares) fractions in the lability diagram: carbon to nitrogen ratio (C/N) versus aromaticity. Natural refractory dissolved organic matter (RDOM) is considered as nitrogen-depleted and mainly composed of unsaturated carbon (aromatic rings), whereas natural labile dissolved organic matter (LDOM) is considered as enriched in nitrogen, and composed of saturated aliphatic chains. Redfieldian material (dashed line), Suwannee River humic (SRHA) and fulvic (SRFA) acid as well as Elliot soil standard are indicated (dark dots). Colours indicate salinity and dotted arrows indicate the theoretical dilution curves.

compounds at this stage of mixing. Indeed, marine humic substances are known to be mainly composed of alkyl carbon and nitrogen rather than aromatic structures (Dereppe et al. 1980; Nissenbaum and Kaplan 1972; Sierra et al. 2005; Zhang et al. 2016).

The HS-diagram proposed by Huber et al. (2011) combining nominal molecular weight of HS (M_n) and aromaticity (Fig. 8a) also helps to describe changes in the nature of HS along the salinity gradient. Indeed, the M_n of HS decreased from 785 to 633 g mol⁻¹ for a decrease in aromaticity from 5.6 to 1.4 L mg⁻¹ m³, reflecting dilution between the terrestrial HS of high-molecular-weight and smaller aquagenic HS (Penru et al. 2013). Thus, as expected, the HS changed from fulvic and humic pedogenic acids to aquagenic fulvic acids by following a dilution-type behaviour, as shown in Fig. 8a (blue-shaded area). This demonstrates that the main process behind the structural changes in humic substances along this estuary is dilution.

Using the data acquired by LC-OCD, a second diagram representing the aromaticity as a function of the C/N ratio (Fig. 8b) can be constructed and used to monitor the evolution of the DOM's lability. Indeed, although the lability depends on the structure of microbial communities and their needs, in a first approach, the natural refractory organic matter can be considered to be depleted in nitrogen and rich in unsaturated rings (upper part right of the diagram). On the other hand, the natural labile organic matter can be considered as enriched in nitrogen, and containing a large number of saturated aliphatic chains (lower left part of the diagram). With this diagram, it is possible to observe a sudden change in the lability of the BP fraction along the salinity gradient. While this fraction was composed of refractory DOM in the early stage of mixing (probably HMW-HS), this fraction suddenly became labile in the middle of the estuary (Fig. 8b). The strong non-conservative distribution indicates that this change in lability results from internal biogeochemical processes (Fig. 8b). The HS fraction also follows a similar change in lability along the estuary. Humic

substances become more labile as the contribution of seawater increases (Fig. 8b). However, the distribution of HS here also follows the theoretical dilution along the salinity gradient, again indicating that biogeochemical processes poorly affect the HS fraction, probably due to a limited residence time of water in this macrotidal estuary (Fig. 8b, dashed line).

Conclusions

We determined the performances of liquid chromatography with organic carbon, nitrogen and UV detectors for the study of DOM in estuarine and marine waters. A strong salt effect was found to influence the sensitivity of OCD, which induces a significant bias in the DOC measurement if no correction is applied. The sensitivities of OND and UVD do not appear to be significantly affected by salinity. After calibration at appropriate salinities, the determination of DOC in estuarine, coastal and marine waters was validated. Despite some analytical limitations (e.g. DON and total SAC LOQ), our study demonstrated that LC-OCD opens new perspectives for studying the size fractionation and composition of DOM along the earth-ocean continuum. Using 1 to 3 mL of sample, OC, aromaticity and elemental C/N ratios were determined in a wide range of samples, including freshwater and carbon-depleted seawater. The HS and BP fractions operationally defined by the two size-exclusion chromatography columns were found to be well representative of humic material and HMW biogenic DOM, respectively. However, some of the humic substances may also be eluted into the BP or the LMW-neutral fractions. In addition, we have shown that fractionation of proteins and polysaccharides can occur within the SEC, which can lead to a bias in the measurement of the size fractionation of the DOM. However, this effect can be considered limited for natural water, in which proteins represent only a small part of the DOM (, 8%). An LC-OCD study of the DOM along the salinity gradient of a macrotidal estuary then showed that specific distributions (e.g. HS deficit and positive anomaly of LMW-neutrals) can be hidden behind an overall

conservative DOC distribution. Furthermore, this study demonstrated that LC-OCD can be used to track the origin of DOM and its changes in composition and structure, particularly of humic substances and HMW compounds, across the earth–ocean continuum. Finally a DOM lability diagram has been proposed to complement the HS-diagram by Huber et al. (2011). Although the lability depends on the microbial structure and its needs, monitoring the aromaticity as a function of the C/N ratio enables, in a first approach, the evolution of the lability of HMW DOM and humic-like material to be monitored. Our DOM lability diagram could also be used to identify additional sources (e.g. wastewater) in river, estuarine or coastal waters, as well as to monitor the DOM size/reactivity continuum in large-scale systems (e.g. the open ocean). Although opening new perspectives for the environmental study of DOM, our work highlights the need to compare LC-OCD results with size-fractionation fluorescence data on common samples. This would be the next step for a better characterisation of DOM.

Supplementary material

The supplementary material contains a table (Table S1) showing the intercomparison of the aromaticity measured for two humic type standards and a figure (Fig. S1) showing the salt interference on the three detectors (carbon, nitrogen and UV) as well as the correction applied to overcome the salt effect for the integration of a carbon chromatogram.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This article is dedicated to the memory of our colleague and friend Benoît Pernet-Coudrier who initiated this project under the financial support of a Marie Curie FP7 project (Dynamite project CIG-333727). Thierry Le Bec, Erwan Amice and Jeremy Devesa are acknowledged for their assistance during sampling campaigns.

References

- Aiken GR (1992). Chloride interference in the analysis of dissolved organic carbon by the wet oxidation method. *Environmental Science & Technology* **26**, 2435–2439. doi:10.1021/ES00036A015
- Aiken GR, Brown PA, Noyes TI, Pinckney DJ (1989). Molecular size and weight of fulvic and humic acids from the Suwannee River. In 'Humic substances in the Suwannee River, Georgia: Interactions, properties, and proposed structures'. (Eds RC Averett, JA Leenheer, DM McKnight, KA Thorn) pp. 163–178. (U.S. Geological Survey: Denver, CO)
- Aminot A, El-Sayed MA, Kerouel R (1990). Fate of natural and anthropogenic dissolved organic carbon in the macrotidal Elorn estuary (France). *Marine Chemistry* **29**, 255–275. doi:10.1016/0304-4203(90)90017-7
- Amy GL, Her N (2004). Size exclusion chromatography (SEC) with multiple detectors: a powerful tool in treatment process selection and performance monitoring. *Water Science and Technology: Water Supply* **4**, 19–24. doi:10.2166/WS.2004.0056
- Baghoth SA, Maeng SK, Rodríguez SS, Ronteltap M, Sharma S, Kennedy M, Amy GL (2008). An urban water cycle perspective of natural organic matter (NOM): NOM in drinking water, wastewater effluent, storm water, and seawater. *Water Science and Technology: Water Supply* **8**, 701–707. doi:10.2166/WS.2008.146
- Batsch A, Tyszler D, Brügger A, Panglisch S, Melin T (2005). Foulant analysis of modified and unmodified membranes for water and wastewater treatment with LC-OCD. *Desalination* **178**, 63–72. doi:10.1016/J.DESAL.2004.11.029
- Benner R (2002). Chemical composition and reactivity. In 'Biogeochemistry of marine dissolved organic matter'. (Eds DA Hansell, CA Carlson) pp. 59–90. (Academic Press: Cambridge, MA)
- Carlson CA, Hansell DA (2014). DOM sources, sinks, reactivity, and budgets. In 'Biogeochemistry of marine dissolved organic matter (second edition)'. (Eds CA Carlson, DA Hansell) pp. 65–126. (Academic Press: San Diego, CA)
- Cornelissen ER, Moreau N, Siegers WG, Abrahamse AJ, Rietveld LC, Grefte A, Dignum M, Amy GL, Wessels LP (2008). Selection of anionic exchange resins for removal of natural organic matter (NOM) fractions. *Water Research* **42**, 413–423. doi:10.1016/J.WATRES.2007.07.033
- Cuss CW, Gueguen C (2012). Determination of relative molecular weights of fluorescent components in dissolved organic matter using asymmetrical flow field-flow fractionation and parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta* **733**, 98–102.
- Cuss CW, Gueguen C (2015). Relationships between molecular weight and fluorescence properties for size-fractionated dissolved organic matter from fresh and aged sources. *Water Research* **68**, 487–497. doi:10.1016/J.WATRES.2014.10.013
- Dereppe JM, Moreaux C, Debyser Y (1980). Investigation of marine and terrestrial humic substances by ¹H and ¹³C, nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy. *Organic Geochemistry* **2**, 117–124. doi:10.1016/0146-6380(80)90001-7
- Dittmar T, Kattner G (2003). Recalcitrant dissolved organic matter in the ocean: major contribution of small amphiphilics. *Marine Chemistry* **82**, 115–123. doi:10.1016/S0304-4203(03)00068-9
- Dulaquais G, Waeles M, Gerringa LJ, Middag R, Rijkenberg MJ, Riso R (2018). The biogeochemistry of electroactive humic substances and its connection to iron chemistry in the North East Atlantic and the Western Mediterranean Sea. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, in press. doi:10.1029/2018JC014211
- Ertel JR, Hedges JI, Devol AH, Richey JE, Ribeiro MDNG (1986). Dissolved humic substances of the Amazon River system. *Limnology and Oceanography* **31**, 739–754. doi:10.4319/LO.1986.31.4.0739
- Flerus R, Koch BP, Schmitt-Kopplin P, Witt M, Kattner G (2011). Molecular level investigation of reactions between dissolved organic matter and extraction solvents using FT-ICR MS. *Marine Chemistry* **124**, 100–107. doi:10.1016/J.MARCHEM.2010.12.006
- Fox LE (1983). The removal of dissolved humic acid during estuarine mixing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **16**, 431–440. doi:10.1016/0272-7714(83)90104-X
- Grünheid S, Amy G, Jekel M (2005). Removal of bulk dissolved organic carbon (DOC) and trace organic compounds by bank filtration and artificial recharge. *Water Research* **39**, 3219–3228. doi:10.1016/J.WATRES.2005.05.030
- Guo W, Yang L, Hong H, Stedmon CA, Wang F, Xu J, Xie Y (2011). Assessing the dynamics of chromophoric dissolved organic matter in a subtropical estuary using parallel factor analysis. *Marine Chemistry* **124**, 125–133. doi:10.1016/J.MARCHEM.2011.01.003
- Hansell DA (2013). Recalcitrant dissolved organic carbon fractions. *Annual Review of Marine Science* **5**, 421–445. doi:10.1146/ANNUREV-MARINE-120710-100757
- Hansell DA, Carlson CA, Repeta DJ, Schlitzer R (2009). Dissolved organic matter in the ocean: A controversy stimulates new insights. *Oceanography* **22**, 202–211. doi:10.5670/OCEANO.2009.109
- Hedges JI, Oades JM (1997). Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Organic Geochemistry* **27**, 319–361. doi:10.1016/S0146-6380(97)00056-9
- Heijboer R, Van Deelen-Bremer MH, Butter LM, Zeijseink AG (2006). The behavior of organics in a makeup water plant. *Powerplant Chemistry* **8**, 197–202.
- Hirose K (2007). Metal–organic matter interaction: ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Applied Geochemistry* **22**, 1636–1645. doi:10.1016/J.APGEOCHEM.2007.03.042
- Huber SA (1998). Evidence for membrane fouling by specific TOC constituents. *Desalination* **119**, 229–234. doi:10.1016/S0011-9164(98)00162-3

- Huber SA, Frimmel FH (1991). Flow injection analysis for organic and inorganic carbon in the low-ppb range. *Analytical Chemistry* **63**, 2122–2130. doi:10.1021/AC00019A011
- Huber SA, Frimmel FH (1994). Direct gel chromatographic characterization and quantification of marine dissolved organic carbon using high-sensitivity DOC detection. *Environmental Science & Technology* **28**, 1194–1197. doi:10.1021/ES00055A035
- Huber SA, Balz A, Abert M, Pronk W (2011). Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography–organic carbon detection–organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Research* **45**, 879–885. doi:10.1016/j.watres.2010.09.023
- Jackson GA, Williams PM (1985). Importance of dissolved organic nitrogen and phosphorus to biological nutrient cycling. *Deep Sea Research. Part A, Oceanographic Research Papers* **32**, 223–235. doi:10.1016/0198-0149(85)90030-5
- Kennedy MD, Chun HK, Yangali VAQ, Heijman BG, Schippers JC (2005). Natural organic matter (NOM) fouling of ultrafiltration membranes: fractionation of NOM in surface water and characterisation by LC-OCD. *Desalination* **178**, 73–83. doi:10.1016/j.desal.2005.02.004
- Leenheer JA, Croue JP (2003). Peer reviewed: characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology* **37**, 18A–26A. doi:10.1021/ES032333C
- Mantoura RFC, Woodward EMS (1983). Conservative behaviour of riverine dissolved organic carbon in the Severn Estuary: chemical and geochemical implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **47**, 1293–1309. doi:10.1016/0016-7037(83)90069-8
- Marie L (2016). ‘Composition, transfert et dynamique de la matière organique dissoute (MOD) dans les eaux fluviales et estuariennes: impact des activités agricoles’ (doctoral dissertation, Brest).
- Marie L, Pernet-Coudrier B, Waeles M, Gabon M, Riso R (2015). Dynamics and sources of reduced sulfur, humic substances and dissolved organic carbon in a temperate river system affected by agricultural practices. *The Science of the Total Environment* **537**, 23–32. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.089
- Marie L, Pernet-Coudrier B, Waeles M, Riso R (2017). Seasonal variation and mixing behaviour of glutathione, thioacetamide and fulvic acids in a temperate macrotidal estuary (Aulne, NW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **184**, 177–190. doi:10.1016/j.ecss.2016.11.018
- Martínez-Pérez AM, Nieto-Cid M, Osterholz H, Catalá TS, Reche I, Dittmar T, Álvarez-Salgado XA (2017). Linking optical and molecular signatures of dissolved organic matter in the Mediterranean Sea. *Scientific Reports* **7**, 3436. doi:10.1038/S41598-017-03735-4
- Medeiros P, Seidel M, Powers LC, Dittmar T, Hansell DA, Miller WL (2015). Dissolved organic matter composition and photochemical transformations in the northern North Pacific Ocean. *Geophysical Research Letters* **42**, 863–870. doi:10.1002/2014GL062663
- Meyer JL (1994). The microbial loop in flowing waters. *Microbial Ecology* **28**, 195–199. doi:10.1007/BF00166808
- Nelson NB, Siegel DA (2013). The global distribution and dynamics of chromophoric dissolved organic matter. *Annual Review of Marine Science* **5**, 447–476. doi:10.1146/ANNUREV-MARINE-120710-100751
- Nissenbaum A, Kaplan IR (1972). Chemical and isotopic evidence for the in situ origin of marine humic substances. *Limnology and Oceanography* **17**, 570–582. doi:10.4319/LO.1972.17.4.0570
- Penru Y, Simon FX, Guastalli AR, Esplugas S, Llorens J, Baig S (2013). Characterization of natural organic matter from Mediterranean coastal seawater. *Journal of Water Supply: Research & Technology - Aqua* **62**, 42–51. doi:10.2166/AQUA.2013.113
- Repetta DJ, Hansell DA, Carlson CA (2014). Chemical characterization and cycling of dissolved organic matter. In ‘Biogeochemistry of marine dissolved organic matter’. (Eds DA Hansell, CA Carlson) pp. 22–65. (Academic Press: Waltham, MA)
- Rutledge H, Andersen MS, Baker A, Chinu KJ, Cuthbert MO, Jex CN, Marjo CE, Markowska M, Rau GC (2015). Organic characterisation of cave drip water by LC-OCD and fluorescence analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **166**, 15–28. doi:10.1016/j.gca.2015.05.042
- Sah RN (1994). Nitrate-nitrogen determination – a critical review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **25**, 2841–2869. doi:10.1080/00103629409369230
- Sholkovitz ER, Boyle EA, Price NB (1978). The removal of dissolved humic acids and iron during estuarine mixing. *Earth and Planetary Science Letters* **40**, 130–136. doi:10.1016/0012-821X(78)90082-1
- Sierra MMD, Giovanela M, Parlanti E, Esteves VI, Duarte AC, Fransozo A, Soriano-Sierra EJ (2005). Structural description of humic substances from subtropical coastal environments using elemental analysis, FT-IR and ¹³C-solid state NMR data. *Journal of Coastal Research Special Issue No. 42*, 370–382.
- Simon FX, Penru Y, Guastalli AR, Esplugas S, Llorens J, Baig S (2013). NOM characterization by LC-OCD in a SWRO desalination line. *Desalination and Water Treatment* **51**, 1776–1780.
- Stedmon CA, Markager S (2005). Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnology and Oceanography* **50**, 1415–1426.
- Stewart TJ, Traber J, Kroll A, Behra R, Sigg L (2013). Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from periphyton using liquid chromatography–organic carbon detection–organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Environmental Science and Pollution Research International* **20**, 3214–3223. doi:10.1007/S11356-012-1228-Y
- Stolpe B, Zhou Z, Guo L, Shiller AM (2014). Colloidal size distribution of humic-and protein-like fluorescent organic matter in the northern Gulf of Mexico. *Marine Chemistry* **164**, 25–37.
- Thurman EM, Malcolm RL (1981). Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology* **15**, 463–466. doi:10.1021/ES00086A012
- Twilley RR (1985). The exchange of organic carbon in basin mangrove forests in a southwest Florida estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **20**, 543–557. doi:10.1016/0272-7714(85)90106-4
- Ulu F, Barışçi S, Kobya M, Sillanpää M (2015). An evaluation on different origins of natural organic matters using various anodes by electrocoagulation. *Chemosphere* **125**, 108–114. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.063
- Villacorte LO, Ekowati Y, Winters H, Amy GL, Schippers JC, Kennedy MD (2013). Characterisation of transparent exopolymer particles (TEP) produced during algal bloom: a membrane treatment perspective. *Desalination and Water Treatment* **51**, 1021–1033. doi:10.1080/19443994.2012.699359
- Waeles M, Riso R, Pernet-Coudrier B, Quentel F, Durrieu G, Tissot C (2013). Annual cycle of humic substances in a temperate estuarine system affected by agricultural practices. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **106**, 231–246. doi:10.1016/j.gca.2012.12.040
- Yamashita Y, Tanoue E (2008). Production of bio-refractory fluorescent dissolved organic matter in the ocean interior. *Nature Geoscience* **1**, 579–582. doi:10.1038/NGEO279
- Yamashita Y, Tanoue E (2009). Basin scale distribution of chromophoric dissolved organic matter in the Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* **54**, 598–609. doi:10.4319/LO.2009.54.2.0598
- Yan C, Nie M, Lead JR, Yang Y, Zhou J, Merrifield R, Baalousha M (2016). Application of a multi-method approach in characterization of natural aquatic colloids from different sources along Huangpu River in Shanghai, China. *Science of the Total Environment* **554**, 228–236.
- Zhang Y, Du J, Ding X, Zhang F (2016). Comparison study of sedimentary humic substances isolated from contrasting coastal marine environments by chemical and spectroscopic analysis. *Environmental Earth Sciences* **75**, 378. doi:10.1007/S12665-016-5263-8

Handling Editor: Kevin Wilkinson

III.4. Expérimentations supplémentaires

Le poids moléculaire des SH est calculé en fonction du temps de rétention de cette fraction (Huber et al., 2011). Sur la figure III.1, l'évolution de ce temps de rétention dans les eaux naturelles pouvait être attribuée à un changement de nature des SH. Les résultats de Dulaquais et al., 2019 indiquent que les SH marines sont plus petites et plus aliphatiques que celles provenant de la rivière, en amont de l'estuaire. Néanmoins, des expériences sur une solution du standard international SRFA, *Suwanee River Fulvic Acid*, dont la salinité a été augmentée de manière artificielle permettent d'apporter quelques éléments supplémentaires sur l'impact de la matrice salée sur l'analyse des échantillons de MOD. La figure III.3 présente les chromatogrammes de carbone de ce standard à cinq salinités différentes

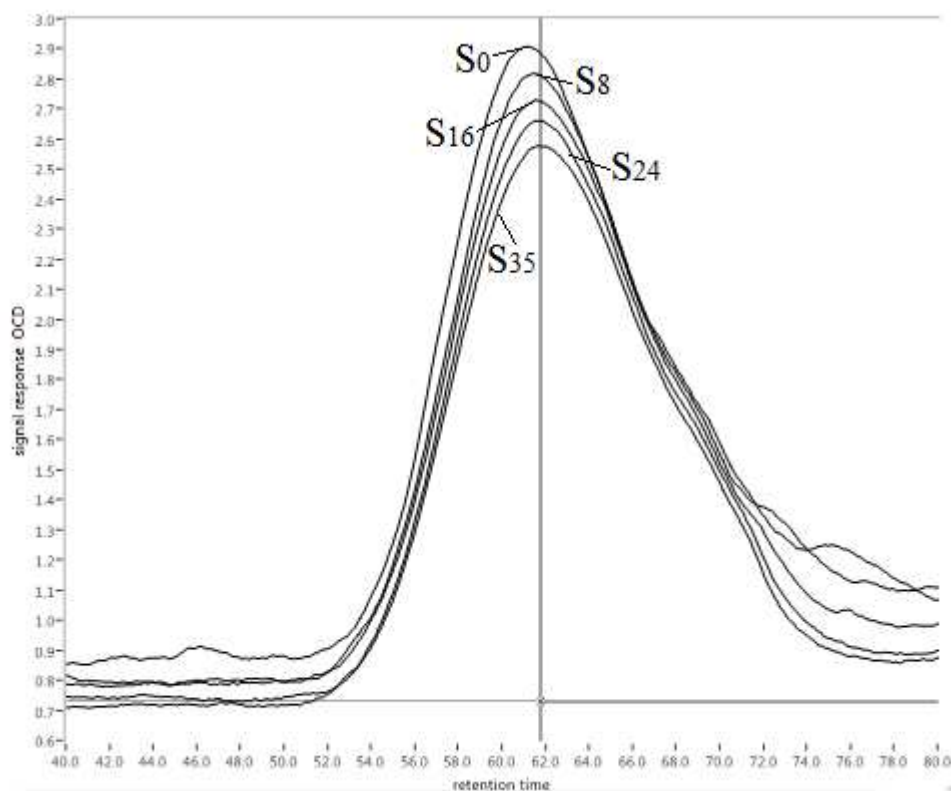


Figure III3 : Chromatogrammes de carbone superposés du standard SRFA à cinq salinités

La différence entre les temps de rétention à S=0 et à S=35 est de 0,8 min, soit une différence de poids moléculaire de 32 g.mol^{-1} , ce qui représente une perte de 5% par rapport au poids moléculaire théorique du SRFA. La perte par unité de salinité est estimée à $0,9 \text{ g.mol}^{-1}$.

Il est donc important, en plus de corriger le SUVA ou les concentrations en COD et en LMWN, de corriger le poids moléculaire des SH dès lors que l'on travaille en milieu halin.

III.5. Conclusion

Un des avantages de la SEC-mDEC est de pouvoir utiliser les échantillons sans traitement préalable. Cette particularité qui permet d'éviter les artefacts consécutifs à la manipulation des échantillons, n'empêche pas l'apparition d'interférences dues aux sels inorganiques présents dans les matrices salées. Les sels, comme les chlorures, peuvent entrer en interaction avec le processus d'oxydation de l'eau, préalable à l'oxydation de la MOD, et conduire à une mésestimation des concentrations en carbone (COD ou LMWN). Les chlorures sont également responsables d'une certaine absorbance aux longueurs d'onde de travail des détecteurs UV et OND, ce qui rend les mesures UV non viables pour l'analyse des échantillons marins. Ces interférences faussent la mesure de l'aromaticité globale (SUVA) et la mesure des nitrates, dont le temps de rétention correspond à celui de cette interférence.

La solution proposée ici est d'étalonner la méthode originelle selon le même protocole en rajoutant la salinité. Ceci s'est concrétisé par l'élaboration de plusieurs gammes d'étalonnage, réalisées à différentes salinités. Cette adaptation a été validée par :

- une intercomparaison de la mesure du COD dans les eaux estuariennes avec un analyseur TOC de type Shimadzu.
- l'analyse d'un standard international marin de COD (DSR ; Hansell ; Laboratory : Miami, USA)

De plus, les limitations et les performances de cette nouvelle méthode ont été définies. Les limites de détection sont un peu plus élevées que celles estimées par le constructeur de l'appareillage. Globalement, l'ensemble des concentrations et des paramètres qualitatifs associés sont utilisables. Néanmoins, des limitations perdurent comme la mesure de l'azote organique dissous dans les BP, la détermination du SUVA ou celle du poids moléculaire des SH. Pour ce dernier paramètre, il semble que la diminution du poids moléculaire avec la salinité soit révélatrice d'un processus de contraction des structures analogues au processus de floculation en début de mélange estuarien (Sholkovitz et al., 1976 ; Baalousha et al., 2006).

La SEC-mDEC présente plusieurs avantages pour l'étude de la MOD le long du continuum terre-mer. La détermination des concentrations en carbone, de l'aromaticité et du rapport C/N pour un volume d'injection minimale, a été réalisée pour des échantillons présentant

une grande gamme de concentrations en MOD (1000 – 6000 $\mu\text{gC.L}^{-1}$) correspondant à toute une variété d'environnements allant des écosystèmes d'eau douce au milieu marin. L'analyse semi-spécifique proposée ici permet de déterminer la variabilité de chaque fraction de la MOD (perte de SH en début de mélange ou anomalie positive en LMWN), qui serait camouflée par la seule et unique mesure du COD global des échantillons.

L'utilisation de plusieurs détecteurs pour qualifier la MOD a permis d'identifier et de qualifier les sources de la MOD dans l'estuaire de l'Aulne, et de suivre les changements de composition et de structure le long du mélange estuarien. Ces avancées permettent d'envisager un suivi à plus long terme de la MOD dans l'estuaire de l'Aulne.

**Chapitre IV – Spéciation de
la matière organique
dissoute en milieu
estuarien : cas de l'estuaire
de l'Aulne**

IV.1. Introduction

Les apports de MOD transitant par les estuaires sont considérés comme une source majeure de carbone pour l'océan côtier (Bianchi, 2011), pourtant, seule une faible part (0,7 – 2,4 %) de la MOD océanique hauturière peut être qualifiée de terrigène (Opsahl et Benner, 1997 ; Hedges et al., 1997).

Ce paradoxe peut être expliqué par la grande variabilité de sources et de processus mis en œuvre au sein des zones côtières tels les plateaux continentaux et les estuaires. Dans un estuaire, la MOD peut avoir une origine continentale (allochtone), être produite *in situ* (autochtones) ou être d'origine marine (De Souza Sierra et al., 1997; Hansell et Carlson, 2015). Les composés constitutifs de la MOD peuvent être ensuite altérés par l'ensemble des processus biogéochimiques qui ont lieu au sein des estuaires comme la dégradation ou la production de MOD par les microorganismes, la photo-oxydation ou les transferts entre phases dissoute et particulaire (Cai et al., 2011 ; Kujawinsky et al., 2011 ; Bauer et Bianchi, 2012 ; Bauer et al., 2013).

La rivière de l'Aulne est responsable de 70% des apports d'eau douce dans la rade de Brest et son estuaire est macrotidal. En raison des importantes pratiques agricoles sur son bassin versant (épandages, élevages), le lessivage des sols du bassin versant enrichi les eaux fluviales de l'Aulne en MOD terrigène . A l'autre extrémité de l'estuaire, la rade de Brest est renouvelée du tiers de son volume à chaque marée avec une eau d'origine océanique provenant de la mer d'Iroise. Ces deux types d'eaux, fluviale et marine, n'ont pas les mêmes caractéristiques physico-chimiques (T°, Salinité, pH) et se mélangent dans l'estuaire.

Dans ce chapitre, les distributions du COD et du contenu en carbone organique des différentes fractions de la MOD (séparées par chromatographie d'exclusion stérique) sont présentées le long de l'estuaire de l'Aulne pour des périodes contrastées du cycle hydrologique entre l'été 2017 et l'automne 2018. L'absorbance spécifique UV à 254nm, la composition en azote organique ainsi que les propriétés de fluorescence de deux fractions séparée par chromatographie d'exclusion stérique (biopolymères et substances humiques) sont aussi étudiées afin de mieux identifier les processus biogéochimiques responsable de la dynamique de la MOD au sein de l'estuaire de l'Aulne. Dans un contexte plus global, cette étude permet de mieux caractériser le cycle saisonnier de la MOD des estuaires tempérés macrotidaux ainsi que de définir les dynamiques spatiales et saisonnières de la MOD le long du continuum terre-mer.

IV.2. Description générale de l'estuaire de l'Aulne

Dans le but de décrire les caractéristiques physico-chimiques des différentes campagnes de prélèvements, le régime hydrologique de l'estuaire de l'Aulne, l'évolution des concentrations en COP le long du gradient de salinité et les niveaux de concentrations en COD dans les eaux fluviales et marines sont présentés ci-après. Le tableau IV-1 synthétise les informations principales caractérisant chaque campagne de prélèvements, comme le jour du prélèvement, le débit moyen (Q_j), le temps de résidence des eaux dans l'estuaire, le coefficient de marée et les concentrations en COD aux extrêmes de l'estuaire : eau douce et eau de mer.

Tableau IV-1 : Récapitulatif des paramètres hydrologiques de l'estuaire de l'Aulne lors de chaque campagne. Les concentrations en COD à chaque extrémité de l'estuaire sont données : COD₀ pour la salinité 0 et COD₃₅ pour la salinité 35.

Campagne	Date	Q_j (m ³ .s ⁻¹)	Etiage/Crue	Temps de résidence des eaux (jours)	Coefficient de marée	COD ₀ (µgC.L ⁻¹)	COD ₃₅ (µgC.L ⁻¹)
Juin 2017	12/06/2017	3,08	Etiage	34	73	6413	792
Septembre 2017	26/09/2017	7,56	Etiage	13	58	6562	1202
Janvier 2018	29/01/2018	79,7	Crue	1	72	4019	670
Avril 2018	06/04/2018	47,7	Crue	2	60	3826	1539
Juillet 2018	20/07/2018	3,03	Etiage	31	57	7909	1422
Octobre 2018	05/10/2018	1,88	Etiage	52	62	5468	1073
Novembre 2018	19/11/2018	9,46	Crue	10	57	9702	1846

IV.2.1. Débit fluvial et temps de résidence des eaux douces

Le temps de résidence des eaux dans l'estuaire a été calculé selon l'équation IV-1 proposée par Bassoullet et al., (1979) :

Équation IV-1 : calcul du temps de résidence des eaux dans l'estuaire de l'Aulne

$$\tau = \frac{L_{estuaire}}{v_{estuaire}} = \frac{L_{estuaire}}{\frac{Q_{Aulne}}{S_{estuaire}}} = \frac{L_{estuaire}}{l_{estuaire} \times H_{rade}}$$

où τ est le temps de séjour ; $L_{estuaire}$ la longueur de l'estuaire (27,5 km) ; $v_{estuaire}$ la vitesse d'écoulement dans l'estuaire ; Q_{Aulne} le débit de l'Aulne mesuré à Châteaulin ; $S_{estuaire}$ la section de l'estuaire ; $l_{estuaire}$ la largeur de l'estuaire ; et H_{rade} la hauteur d'eau mesurée dans la rade de Brest pour inclure l'influence du marnage dans l'équation.

Sur la période d'étude, les débits moyens étaient compris entre $0,9 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (08/07/2017) et $232 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (05/01/2018). Le cycle hydrologique de la rivière peut être séparé en deux périodes distinctes : une période de crue de Novembre à Avril avec des débits élevés ou en cours d'augmentation ; et une période d'étiage de Mai à Octobre avec des débits plutôt faibles.

Pour ces débits, le temps de résidence des eaux dans l'estuaire varie entre un jour en plein cœur de la crue annuelle en Janvier, à 52 jours lors de la période des débits minimaux observés en fin d'étiage. Les temps de résidence estimés sont compris entre les limites calculées par Bassoullet (1979) entre < 5 jours et ~ 30 jours. Le temps de résidence particulièrement long observé en Octobre 2018 dans notre étude est directement lié à un débit particulièrement faible en comparaison avec les autres mois de la période d'étiage (Juin et Septembre 2017 ; Juillet 2018).

Le débit moyen de l'Aulne sur les deux années étudiées est de $25,4 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, ce qui est quasi-identique à la moyenne sur les vingt dernières années de $25 \pm 8 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (données Hydro Eau France). Cependant, les années 2017 et 2018 sont différentes hydrologiquement. En effet, la moyenne observée en 2017 ($17,3 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) est deux fois moins importante que celle calculée pour l'année 2018 ($33,5 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$). Cette différence vient de la puissance de la crue annuelle qui, en Janvier-Février 2017 n'a pas dépassé $150 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (Marie et al., 2017) alors qu'à l'hiver 2018 les débits ont pu atteindre des valeurs supérieures à $200 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ (figure II.8).

IV.2.2. Concentrations en carbone organique particulaire et rapports C/N de la MOP

Les mesures de COP dans l'estuaire de l'Aulne ont été réalisées pour six des sept campagnes présentées dans cette étude (figure IV.1). Les concentrations en COP sont comprises entre 57 et $5530 \mu\text{gC} \cdot \text{L}^{-1}$. Les valeurs de COP mesurées sont du même ordre de grandeur que celles observées dans d'autres estuaires tempérés macrotidaux français tel que la Gironde ou dans la baie de Seine, sous forte influence terrigène (Savoye et al., 2003; Liénart et al., 2017). Ces concentrations ne sont cependant pas aussi élevées que celles qui peuvent être observées dans des bassins fortement anthropisés comme le Scheldt en Belgique (Abril et al., 1999).

La figure IV.1 présente les diagrammes de mélange COP-salinité lors des différentes campagnes de prélèvements. On note un comportement non-conservatif avec un enrichissement des concentrations entre 0 et 20 de salinité. Cet enrichissement varie en fonction de la période

concernée. Les concentrations maximales en COP sont atteintes en Juillet et Octobre 2018 avec des valeurs $> 2000 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ entre les salinités 2 et 18 pour Juillet et entre 6 et 14 pour le mois d'Octobre. Le diagramme de mélange de Juillet 2018 présente également un pic de concentrations supplémentaires $> 5000 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ pour les salinités 14 et 16. Ces comportements ont déjà été observés précédemment dans le système (figure II.3) et sont révélateurs de la présence d'un bouchon vaseux permanent, ou zone de turbidité maximale (MTZ), en début d'estuaire et se prolongeant jusqu'à salinité 18 pour les mois d'été (Brenon et Le Hir, 1999 ; Middleburg et Herman, 2007 ; Savoye et al., 2012 ; Waeles et al., 2013 ; Marie et al., 2017).

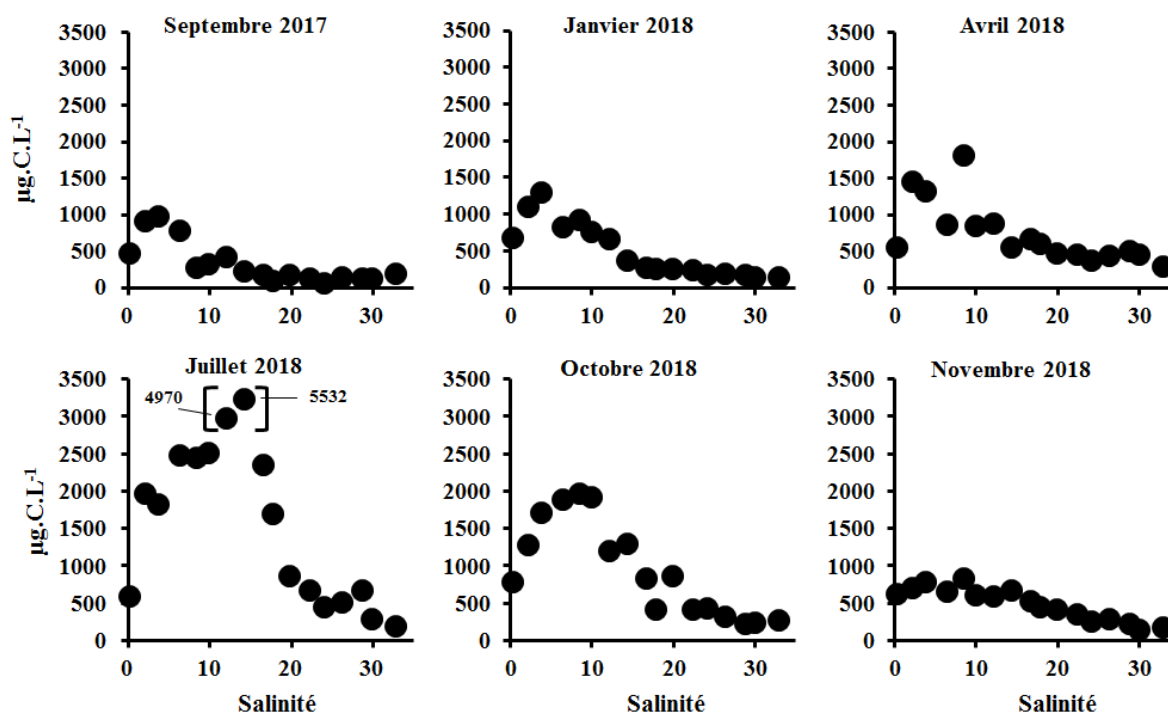


Figure IV.1 : Variations du COP le long du gradient salé de l'Aulne.

Le rapport C/N de la MOP peut être utilisé pour appréhender son origine ou son état de dégradation (Savoye et al., 2012). Des rapports compris entre 3 et 6 sont généralement attribués à une forte contribution de la biomasse bactérienne ou zooplanctonique (Faganeli et al., 1988; Fagerbakke et al., 1996), ceux compris entre 6 et 10 au phytoplancton (Montagnes et al., 1994; Creach, 1995), et les rapports supérieurs à 12 sont typiquement considérés comme résultant d'une forte contribution de MOP terrigène (Goñi et al., 2003; Perdue et Koprivnjak, 2007). L'évolution de ce rapport renseigne sur certains processus (Savoye et al., 2003) : l'azote organique particulaire (NOP) phytoplanctonique est préférentiellement dégradé comparé au COP, ce qui conduit à une augmentation du rapport C/N (Bordovskiy, 1965; Smith et al., 1992).

A l'inverse, la colonisation des particules terrigènes par les bactéries spécialisée dans leur dégradation peut diminuer le rapport C/N mesuré (Bordovskiy, 1965; Thornton et McManus, 1994).

Lors de cette étude, le rapport C/N de la MOP est compris entre 6 et 11 (figure IV.2). A salinité 0, les rapports sont compris entre 7 et 11 tandis qu'à salinité 35 ils sont plus bas et compris entre 6 et 8.

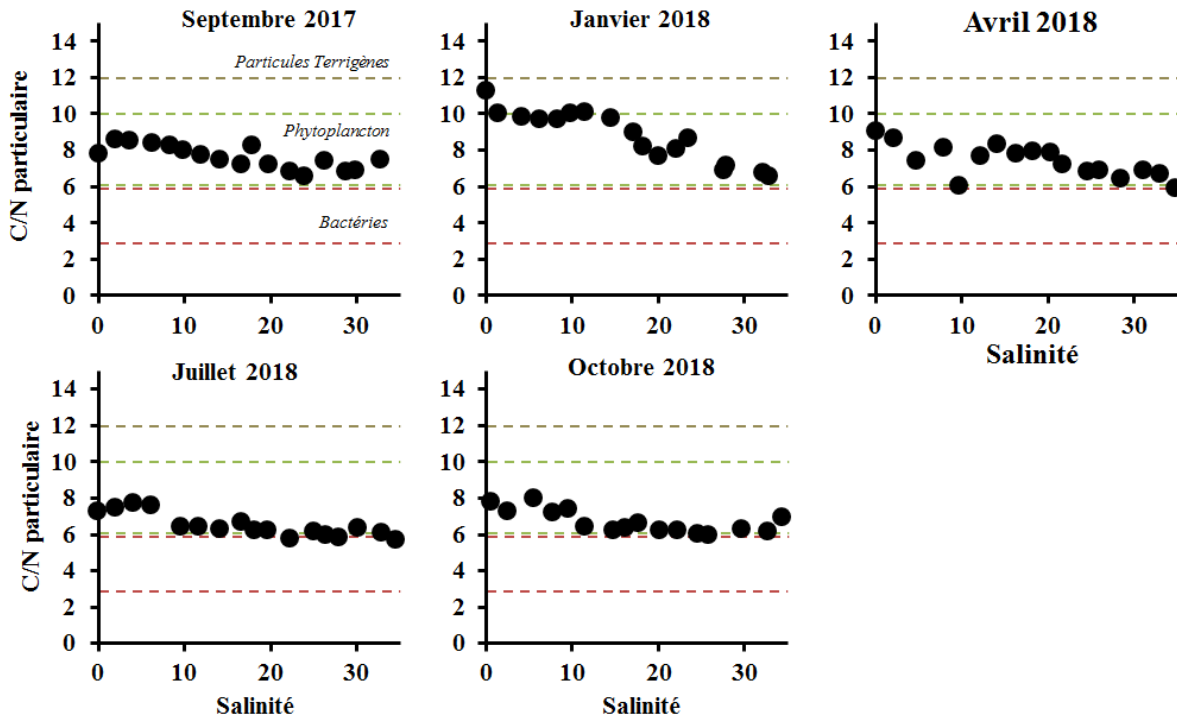


Figure IV.2 : Variations du rapport C/N particulaire le long du gradient de salinité de l'Aulne. Les bornes des rapports C/N de la MOP des bactéries, du phytoplancton et des particules terrigènes sont rappelées en pointillés.

D'après les valeurs mesurées dans l'estuaire de l'Aulne, la MOP fluviale n'est pas constituée uniquement de particules terrigènes caractérisées par de forts rapports C/N ; celles-ci sont mélangées avec de la MOP dérivée du phytoplancton fluvial aux rapports C/N plutôt faibles, ce qui rend sa signature élémentaire sujette aux variations saisonnières (Harmelin-Vivien et al., 2010). A l'exception du mois de Janvier 2018 avec des rapports C/N ~10 jusqu'en milieu d'estuaire, les autres campagnes présentent des rapports compris entre 6 et 9 ; ce qui suggère que le COP est principalement composé de résidus de microalgues dans l'estuaire pour la plupart des périodes étudiées. Dans la partie marine de l'estuaire ($S > 28$), et d'une manière générale, le rapport C/N est compris entre 5 et 8 et peut être associée avec une MOP dérivée du phytoplancton (Thornton et McManus, 1994 ; Savoye et al., 2003).

Dans l'ensemble, la diminution du rapport C/N le long du gradient halin démontre la présence de particules de plus en plus azotées associées avec une MOP de type aquagénique, potentiellement amenée depuis le milieu marin par les courants de marée ou produite *in situ* dans l'estuaire (Linéart, 2017). La diminution des rapports C/N le long du gradient estuarien pourrait aussi être la marque d'une floculation des formes terrigènes de la MOD.

IV.2.3. Carbone organique dissous

Les concentrations en COD dans l'estuaire de l'Aulne varient entre 555 ± 17 et 9702 ± 291 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (figure IV.3). Le tableau IV-2 compare les valeurs mesurées à salinité 0 et 35 de notre étude avec celles d'autres estuaires. La moyenne des concentrations en COD à salinité 0 de notre étude ($4571 \mu\text{gC.L}^{-1}$) est du même ordre de grandeur que ce qui a pu être observé dans l'estuaire de la Penzé, un autre estuaire breton soumis à l'agriculture intensive (Waeles et al., 2013). Les variations de concentrations à salinité 0 sont également équivalentes à celles qui peuvent être observées dans d'autres rivières soumises à l'urbanisation (Goffin et al., 2017) ou à l'agriculture intensive (Oeurng et al., 2011; Marie et al., 2017). Les concentrations maximales à $S = 0$ observées en Novembre 2018 ($9702 \mu\text{gC.L}^{-1}$) sont du même ordre de grandeur que celles observées dans la rivière de l'Aulne au début de la crue annuelle (Marie, 2016). Les teneurs minimales de COD à salinité 0 sont mesurées pour les mois de Janvier et d'Avril 2018 (3039 et $3826 \mu\text{gC.L}^{-1}$, respectivement) et restent supérieures à celles observées en été pour l'estuaire de la Gironde (tableau IV-2).

Un des facteurs déterminant concernant les concentrations en COD mesurées dans les eaux fluviales est la présence d'activités de nature anthropique et surtout agricole sur le bassin versant de la rivière alimentant l'estuaire (Marie et al., 2017). Ainsi, ces différences de concentrations mesurées entre notre système et l'estuaire de la Gironde proviennent probablement du fait que l'estuaire de la Gironde n'est pas considéré comme perturbé par les activités agricoles (Huguet et al., 2009). A l'inverse, le maximum observé en Novembre à salinité 0 dans l'Aulne est proche des concentrations observées à salinité équivalente dans la même rivière par Marie et al., 2017, dans l'estuaire du Fjord Roskilde (Asmala et al., 2018) et relativement proche des concentrations observées toute l'année à cette salinité dans l'estuaire du Horsens Fjord (Markager et al., 2011), tous sous influence des activités agricoles. Les valeurs maximales dans l'Aulne restent néanmoins inférieures aux valeurs observées dans les

rivières arctiques (Lobbès et al., 2000) où des concentrations particulièrement élevées ($>12\ 000\ \mu\text{gC.L}^{-1}$) sont dues à une érosion importante des sols lors du dégel.

Tableau IV-2 : Ordres de grandeur des concentrations en COD d'autres estuaires pour les extrêmes de salinité (salinité 0 (S=0) et salinité 35 (S=35))

Milieux	Eaux douces	Eaux côtières
Notre étude	3039 – 9702 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	555 – 1529 $\mu\text{gC.L}^{-1}$
Rivière de l'Aulne (Marie, 2016)	2000 – 9500 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	---
Rivières arctiques (Russie) (Lobbès et al., 2000)	2800 – 12100 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	---
Rivière du Save (Aquitaine) (Oeurng et al., 2011)	1500 – 7900 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	---
La Seine (Goffin et al., 2017)	1900 – 6800 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	---
Estuaire de la Penzé (Waeles et al., 2013)	2000 – 4000 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	900 – 2000 $\mu\text{gC.L}^{-1}$
Estuaire du Horsens Fjord (Markager et al., 2011)	6170 – 7100 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	2300 – 2800 $\mu\text{gC.L}^{-1}$
Panache du Mississippi Benner et Opsahl (2001)	3610 – 4300 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	780 – 1300 $\mu\text{gC.L}^{-1}$
Estuaire de la Gironde (Huguet et al., 2009)	2000 – 2350 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	1170 $\mu\text{gC.L}^{-1}$
Estuaire de la Seine (Savoie et al., 2003)	2800 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	2050 $\mu\text{gC.L}^{-1}$
Estuaire du Fjord Roskilde (Asmala et al., 2018)	9600 $\mu\text{gC.L}^{-1}$	3600 $\mu\text{gC.L}^{-1}$

Dans la partie marine de l'estuaire de l'Aulne, les concentrations mesurées sont du même ordre de grandeur que celles observées dans les études résumées dans le tableau IV-1. Elles restent cependant inférieures à celles observées dans la partie marine de l'estuaire du Fjord Horsens. Ce dernier se jette dans la mer de Belt à l'interface entre la mer Baltique et la mer du

Nord. Les salinités dans cette région sont relativement instables et fluctuent entre 12 et 33 en fonction des échanges avec la Mer Baltique (Markager et al., 2011). Cette particularité rend la mer de Belt particulièrement sujette aux apports d'origine continentaux, d'où des concentrations en COD plus importantes dans ce milieu (Markager et al., 2011). L'estuaire du Fjord Roskilde est également limité dans ses échanges avec le milieu marin, ce qui rend ses concentrations en COD particulièrement élevées (Asmala et al., 2018).

Le long de l'estuaire, les teneurs en COD sont décroissantes ; les teneurs les plus faibles sont observées dans les eaux marines tandis que les teneurs les plus élevées sont observées dans la partie amont de l'estuaire. De plus, des différences saisonnières importantes peuvent être mesurées selon les campagnes essentiellement en amont de l'estuaire (Figure IV.3).

Deux périodes peuvent être distinguées : en hiver (Janvier) et au printemps (Avril), les concentrations ne dépassent pas les 4000 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. En été et en automne, les concentrations sont supérieures à 5000 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ avec le maximum observé en Novembre au début de la crue annuelle à 9702 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Ce comportement de type « purging » est typique des substances lessivés par les sols au moment des pluies automnales. Ainsi, les concentrations augmentent rapidement avec le début de la crue puis, l'épuisement relatif des sols réduit les concentrations observées dans les eaux de rivière (Nagorski et al., 2003; Waeles et al., 2013).

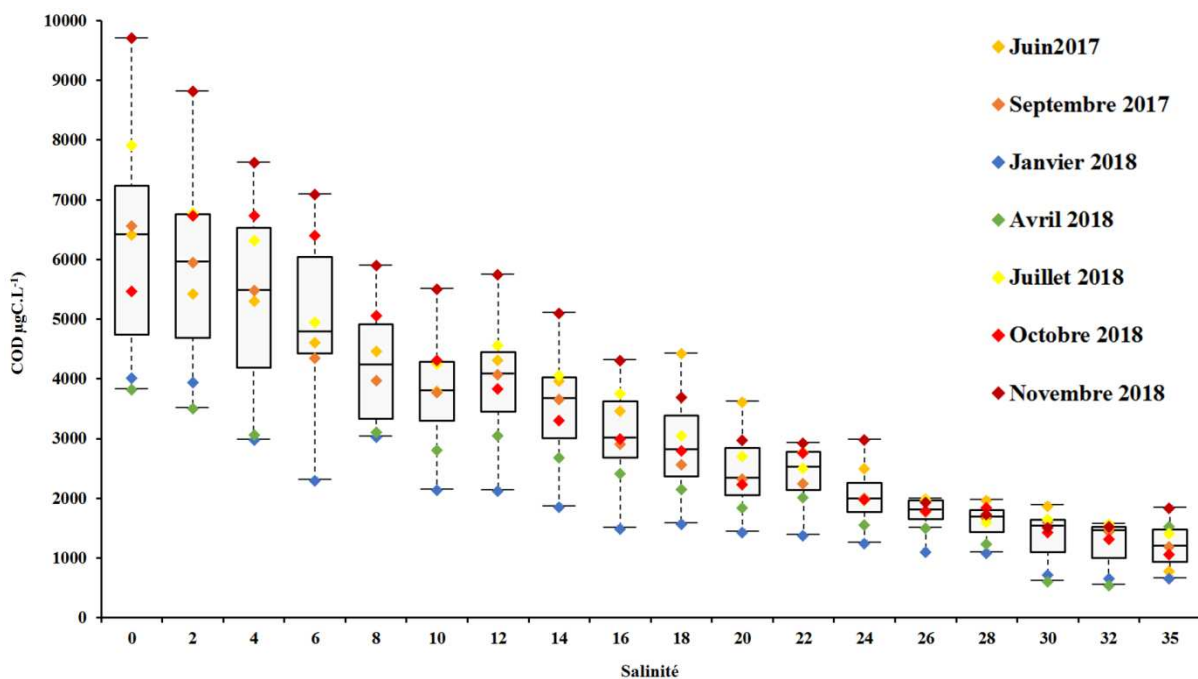


Figure IV.3 : Diagrammes de distribution en quartile des concentrations en COD en fonction de la salinité dans l'estuaire de l'Aulne. Les concentrations de chaque campagne sont représentées en couleur.

Dans la partie marine de l'estuaire (salinité 35), les concentrations sont réparties entre 670 et 1846 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ sans reproduire la dynamique saisonnière mesurée à S0 (fig IV.3). Néanmoins le minimum est mesuré en hiver et le maximum en Novembre 2018, selon la même répartition qu'en amont de l'Aulne.

Les diagrammes de mélange COD-salinité pour chaque campagne de prélèvement sont présentés sur la figure IV.4. Seuls ceux de Juin 2017 et d'Avril 2018 montrent un comportement globalement conservatif. Les campagnes de Septembre 2017, Janvier, Juillet et Novembre 2018 présentent un comportement non-conservatif avec une perte de COD lors du mélange estuarien. La campagne d'Octobre 2018 montre un gain de COD aux faibles salinités.

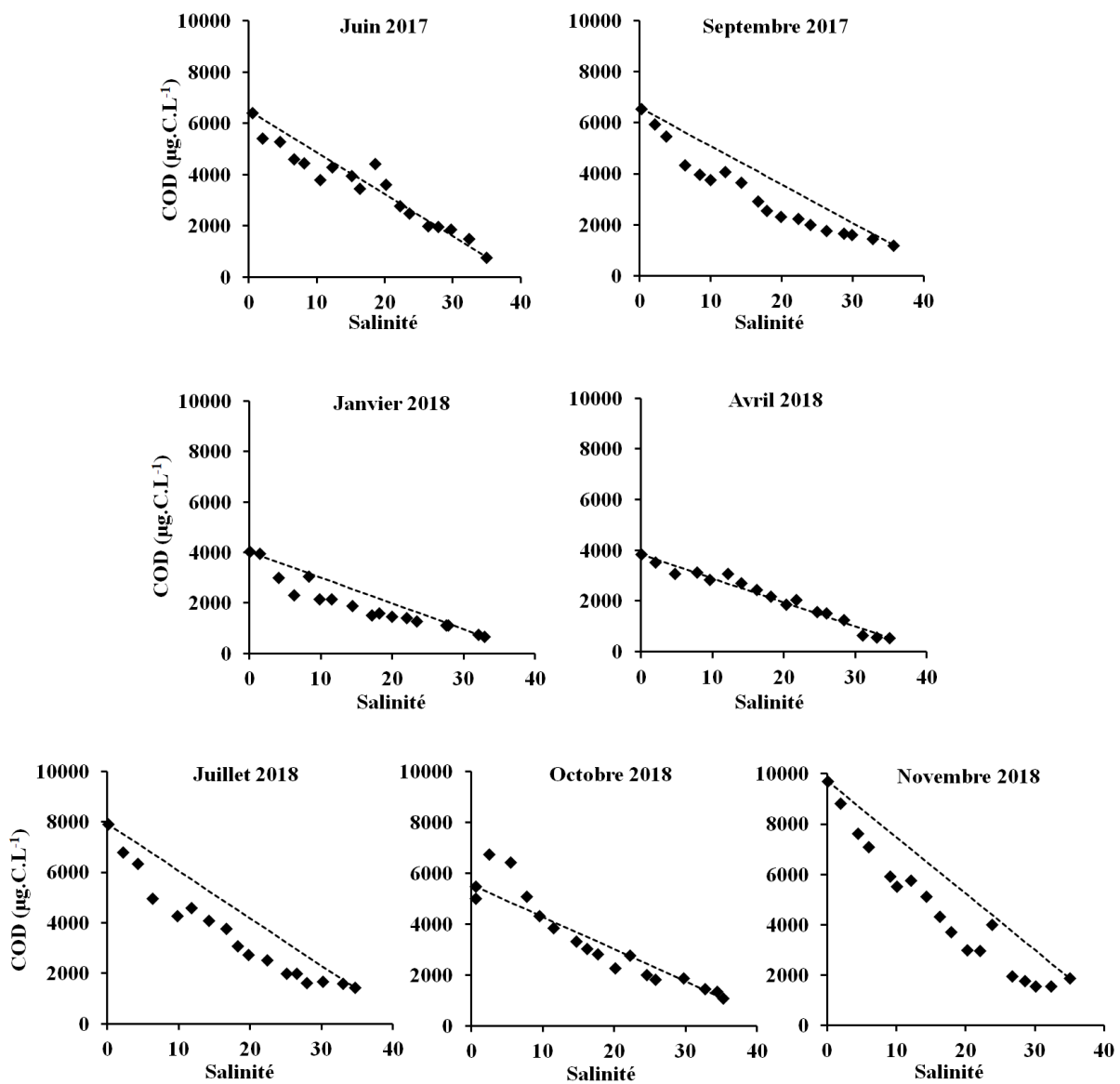


Figure IV.4 : Diagrammes de mélange du carbone organique dissous pour les sept campagnes de prélèvements. Les droites de mélange conservatif sont indiquées en pointillés.

Les anomalies aux diagrammes de mélange théoriques peuvent être expliquées par des transferts de matière entre phases dissoute et particulaire, par l'activité des bactéries hétérotrophes dans la MTZ ou encore par une remise en suspension des eaux interstitielles sédimentaires (Sholkovitz, 1976; Turbidity et al., 1999; E. Asmala et al., 2014). La MTZ, présente en début d'estuaire selon la distribution des données de COP, pourrait permettre d'expliquer en partie l'origine de ces anomalies (Herman et Heip, 1999; Huguet et al., 2009; Marie et al., 2017).

La figure IV.5 superpose les diagrammes de mélange du COT, du COD et du COP pour six des sept campagnes de prélèvement. Le transfert entre phase dissoute et phase particulaire est visible sur les diagrammes de Septembre 2017, Janvier 2018 et Juillet 2018. En effet, les pertes enregistrées pour le COD correspondent aux gains du COP. Néanmoins, en Juillet 2018, ce transfert n'a lieu qu'en amont de l'estuaire ($S < 10$) puisque le pic de milieu d'estuaire ne correspond pas à un puits dans la phase dissoute.

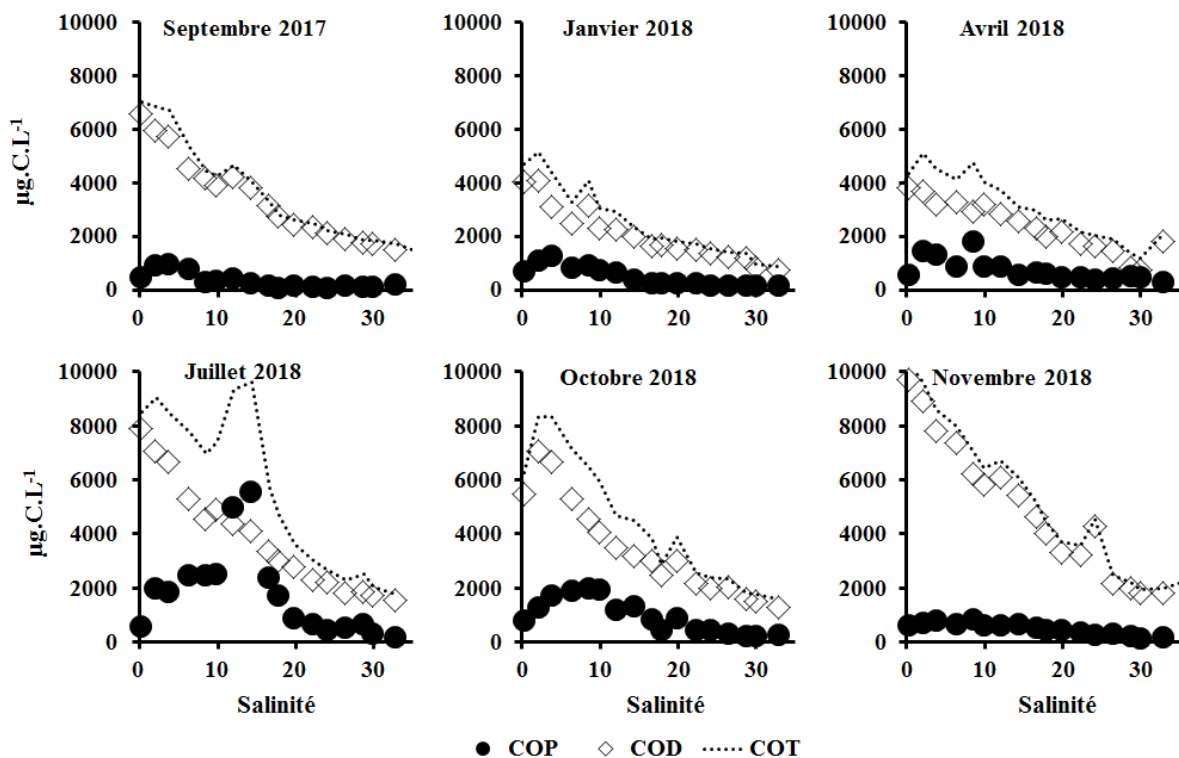


Figure IV.5 : Diagrammes de mélange du carbone organique total (COT), du carbone organique dissous (COD) et du carbone organique particulaire (COP) pour les sept campagnes de prélèvement.

En Avril 2018, le mélange conservatif du COD n'est pas associé à un mélange conservatif du COP. En Octobre 2018, l'anomalie du COD en amont de l'estuaire correspond à une anomalie toute aussi positive en COP. Dans ces deux cas, les anomalies de mélange ne

peuvent être expliquées par un transfert de phase mais bien par d'autres processus environnementaux comme l'activité bactérienne.

IV.2.4. Evolution de l'absorbance UV spécifique à 254nm (SUVA) de la MOD

Les valeurs de SUVA dans l'estuaire de l'Aulne sont comprises entre 0,4 et 6,3 L.(mg.m)⁻¹ (figure IV.6). A salinité 0, les valeurs de SUVA sont élevées à (3 – 5,5). Ces valeurs sont supérieures à celles observées dans d'autres systèmes fluviaux comme la Seine (Goffin et al., 2017) ou la vallée de la Bassée, un territoire relativement préservée des activités humaines (Parlanti et al., 2018). Dans le cas de la Seine, les valeurs relativement basses du SUVA (1,2 – 4,3) sont possiblement dues à des apports important en MOD hydrophiles et moins aromatiques depuis les stations d'épuration vers le milieu récepteur (Pernet-Coudrier et al., 2011). Dans la vallée de la Bassée, le SUVA dans les eaux de surface est relativement bas (< 4) et indiquerait la présence de molécules peu hydrophobes dues à la préservation du bassin versant de l'agriculture intensive (Milori et al., 2002) ou d'échanges importants avec le compartiment souterrain riche en MOD plus hydrophile (SUVA < 3) (Parlanti et al., 2018). 70% du bassin versant de l'estuaire de l'Aulne est soumis aux activités agricoles (Marie, 2016). L'impact de l'agriculture intensive sur la qualité de la MOD avait déjà été observée dans une précédente étude sur ce système (Marie et al., 2017) et peut expliquer la présence de structures aromatiques à forts SUVA à salinité 0 dans notre étude.

Le SUVA dans la partie marine (S > 30) de l'estuaire de l'Aulne est compris entre 1 et 4 L.(mg.m)⁻¹. Pour la plupart des campagnes, les valeurs de SUVA sont relativement faibles à S=35 (entre 1 et 2). Dans une étude réalisée en milieu marin, Penru et al. (2013) ont séparé la MOD en trois fractions par résine XAD. La fraction hydrophobe présente un SUVA d'environ 5 L.(mg.m)⁻¹ et correspond à une MOD riche en structures aromatiques telles les SH (Weishaar et al., 2003). Les deux autres fractions transphiliques et hydrophiles présentent un SUVA < 1 L.(mg.m)⁻¹ qui correspond à des structures peu aromatiques et labiles (Weishaar et al., 2003). Cette différence dans les propriétés d'absorbance UV a été présentée comme un outil de suivi de l'origine de la MOD ; les formes terrigènes et aromatiques possèdent un SUVA plus élevée que les formes biogéniques (DeSouza Sierra et al., 1997).

Pour la quasi-totalité des campagnes de prélèvements, lors du mélange estuarien le SUVA reste supérieure à 4 L.(mg.m)⁻¹ sur une grande partie de l'estuaire (S < 28) ; avant de

chuter brutalement à des valeurs plus basses comprises entre 1,3 et 2,5 à salinité 35. La fin du palier change selon les saisons et est compris entre les salinités 25 et 32,5. Dans le cas particulier de la campagne de Juillet 2018, le rapport augmente à nouveau à partir de S = 28 pour atteindre une valeur équivalente à celles observées dans la partie fluviale (~4).

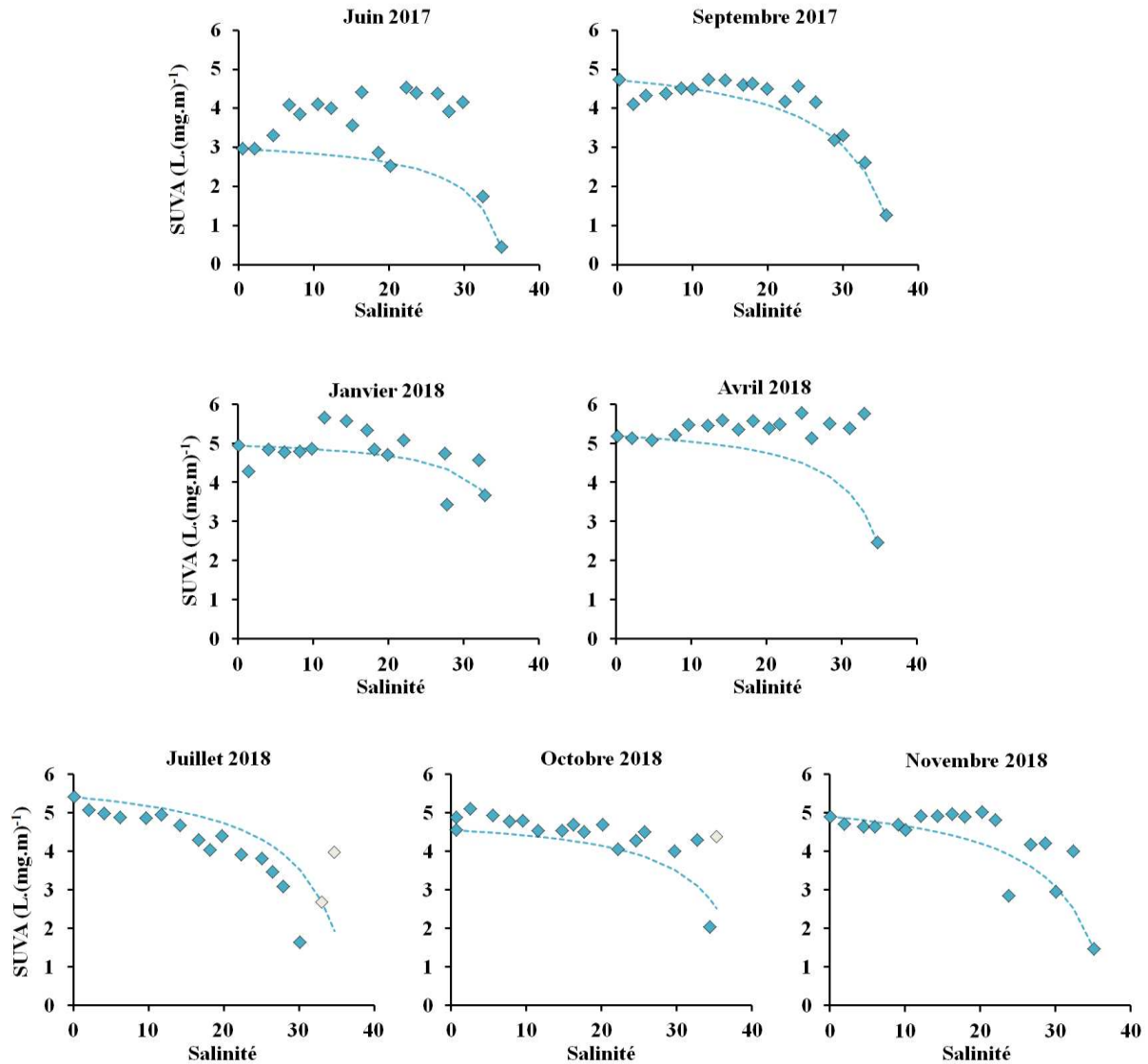


Figure IV.6 : Evolution de l'absorbance spécifique à 254nm le long de l'estuaire de l'Aulne pour l'ensemble des campagnes de prélèvement. Les mélanges conservatifs sont tracés en pointillés. Les points grisés n'ont pas été comptés dans le calcul du mélange théorique

La MOD des eaux marines de la rade de Brest a une signature aromatique distincte de celle des eaux fluviales. Dans les eaux marines la MOD semble être dominées par des structures peu aromatiques (< 2) tandis que la MOD des eaux continentales serait constituée de molécules fortement aromatiques (~5). Le changement de prédominance d'une source sur l'autre a lieu à une salinité donnée (entre 25 et 32,5) et varie selon les campagnes et les saisons. En Janvier et

Avril 2018, les forts débits pourraient favoriser la persistance de composés aromatiques d'origine continentale jusque dans les eaux marines puisque les formes terrigènes semblent être dominantes jusqu'à la fin du gradient halin ($SUVA > 4$). L'évolution du $SUVA$ le long des gradients de salinité ne suit pas la même tendance que les mélanges théoriques calculés et présentés sur la figure IV.6. Des anomalies importantes sont relevées en Juin 2017, Avril 2018 et Juillet 2018. L'évolution du $SUVA$ de Juin 2017 et Avril 2018 est très intéressante puisque malgré le mélange conservatif du COD enregistré pour ces deux campagnes (figure IV.4), l'absorbance spécifique ne peut être expliquée par la seule dilution entre deux sources de composés aux propriétés d'absorbance à 254 nm différentes. Ces dynamiques non-conservatives indiquent donc la présence de processus internes à l'estuaire qui modifient la nature des composés organiques dissous. L'analyse semi-spécifique de la MOD devrait permettre d'identifier les fractions de composés impliqués dans ces changements de nature le long de l'estuaire de l'Aulne et de préciser les processus responsables de ces modifications.

IV.3. Variabilité saisonnière des différentes fractions de la MOD obtenues par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection

La chromatographie d'exclusion stérique multi-détection permet la séparation de la MOD en six fractions de tailles et de nature différentes. L'exploitation des résultats de l'étude des variabilités saisonnières de la MOD le long du mélange estuarien de l'Aulne est ici appréhendée de deux manières : (i) une présentation de l'évolution de la composition moléculaire, en pourcentages ; et (ii) une description des diagrammes de mélange des concentrations de chaque fraction et des grandeurs de leurs paramètres associées.

IV.3.1. Composition de la MOD en pourcentages

La figure IV.7 présente l'évolution des pourcentages de chaque fraction le long du gradient de salinité de l'estuaire de l'Aulne. Les formes de MOD possédant les plus forts pourcentages sont les substances humiques (SH) (27-89%), le carbone organique hydrophobe (COH) (0-62%) et les molécules de petits poids moléculaires neutres (LMWN) (0-47%). Les building-blocks (BB) et les biopolymères (BP) présentent des gammes plus restreintes en composant, entre 3-14% et 2-13% de la MOD, respectivement. Les molécules de petits poids moléculaires acides (LMWA) sont essentiellement sous la limite de détection et ne représentent

que moins de 1% de la MOD lorsqu'ils sont détectés. La composition moléculaire de la MOD dans l'estuaire de l'Aulne est donc faite majoritairement de composés de nature plutôt hydrophobe (SH et COH) et de relativement hauts poids moléculaires (SH : $\sim 750\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$).

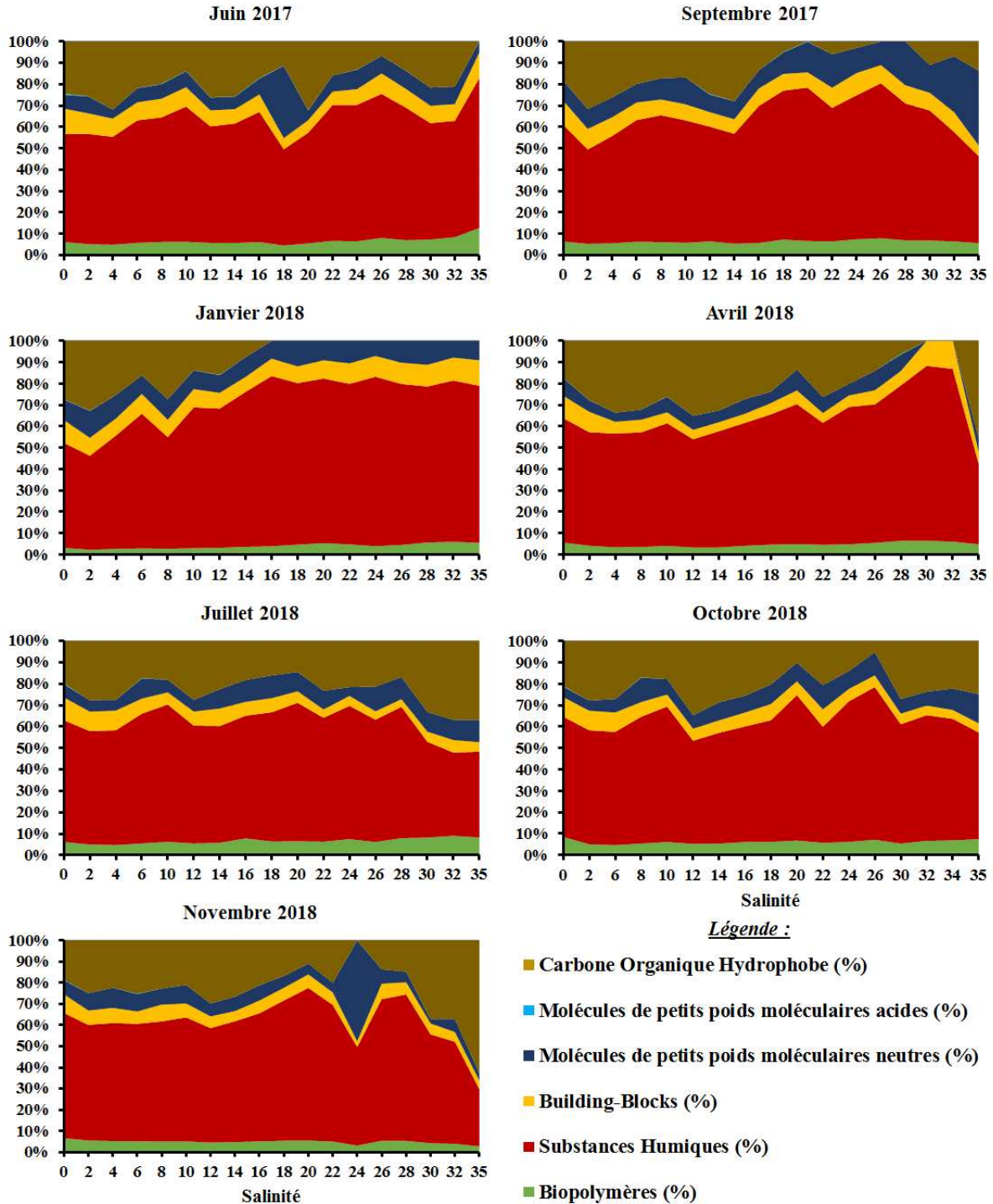


Figure IV.7 : Evolution de la composition de la MOD le long du gradient salé de l'estuaire de l'Aulne, exprimée en pourcentages de chaque fraction de tailles séparées par SEC-mDEC.

Une comparaison directe de la composition de la MOD de notre système avec celles d'autres études utilisant un appareillage similaire en milieu naturel est difficile car la fraction du COH n'est pas présentée dans les résultats de ces autres études (tableau IV-3). Néanmoins, sans modifier les pourcentages de ce travail en retirant le COH du calcul, la composition en pourcentage correspond à celle précédemment observée dans d'autres milieux naturels.

La prédominance des SH dans l'estuaire de l'Aulne est caractéristique de la forte influence continentale de la rivière dans ce système. La présence relativement importante d'une autre fraction de nature hydrophobe (COH) renforce l'idée que la MOD dans l'estuaire est principalement apportée par le lessivage des sols fortement fertilisés sur le continent.

Tableau IV-3: Composition de la MOD (%) dans différentes études utilisant la SEC-mDEC

Système (Etude)	SH (%)	LMWN (%)	BB (%)	BP (%)	LMWA (%)	COH (%)
Zone humide He et al., 2016)	42	26	25	6	0	X
Réservoir d'eau douce (Chen et al., 2013)	40 - 60	18 - 27	16 - 30	1-5	0.5 - 1	X
Zone côtière (Penru et al., 2013)	37	40	14	3	6	X
Rivière de l'Aulne (Marie, 2016)	40 - 61	7 - 16	9 - 13	2 - 8	0 - 6	X
Estuaire de l'Aulne (Cette étude)	27 - 89	0 - 47	3 - 14	2 - 13	0 - 1	0 - 62

A salinité 0, les pourcentages présentent une faible variabilité saisonnière. La moyenne est de 54 ± 5 % pour les SH, 21 ± 4 % pour le COH, 11 ± 1 % pour les BB, 8 ± 2 % pour les LMWN, 6 ± 1 % pour les BP et $0,4 \pm 0,5$ % pour les LMWA.

A salinité 35, la composition de la MOD est plus variable d'une saison à une autre. La moyenne des pourcentages de chaque fraction est de 48 ± 17 % pour les SH, 26 ± 24 % pour le COH, 7 ± 4 % pour les BB, 12 ± 11 % pour les LMWN et 7 ± 3 % pour les BP. Les LMWA ne sont pas détectés.

Entre les salinités 0 et 35, les variations de concentrations des BB et des LMWN n'excèdent pas les 5%, sauf pour quelques cas particuliers, comme au mois de Juin 2017 où la

contribution en BP double entre S0 (6%) et S35 (12%) ou au mois de Septembre 2017 où la contribution des LMWN passe de 10 à 35% d'un bout à l'autre de l'estuaire.

La contribution des BB est systématiquement divisée par deux entre S0 (~10%) et S35 (~5%) pour l'ensemble des campagnes.

L'évolution des pourcentages en SH et en COH montrent une plus grande variabilité le long du gradient halin. Alors que la contribution en COH varie peu pour une grande majorité des mois d'étiage (Juin 2017, Juillet 2018 et Octobre 2018), les campagnes de Septembre 2017 ; Janvier et Avril 2018, présentent une diminution de la contribution en COH le long de l'estuaire qui peut même devenir nulle dès $S = 16$ pour Septembre 2017 et Janvier 2018 ; ou à $S=30$ pour Avril 2018. Ces diminutions pourraient s'expliquer par l'adsorption du COH par les particules en amont de l'estuaire. En effet, en Septembre 2017 et Janvier 2018, les concentrations en COP (figure IV.4) atteignent des valeurs basses ($< 300 \mu\text{gC.L}^{-1}$) à $S = 14$ alors qu'en Avril 2018, les concentrations se maintiennent à des valeurs relativement hautes jusqu'à $S=30$ ($\sim 500 \mu\text{gC.L}^{-1}$ soit les concentrations en COP mesurées à $S=0$ pour les trois campagnes considérées ici). D'après ces résultats, la présence de COP influencerait les concentrations en COH pour les campagnes de Septembre 2017, Janvier et Avril 2018. La disparition de la fraction hydrophobe le long de l'estuaire de l'Aulne semble être liée à une très faible turbidité. Ce raisonnement pourrait se faire également pour l'évolution des pourcentages en COH d'Octobre 2018. En effet, ceux-ci suivent une dynamique proche des pourcentages en COH d'Avril 2018 avec une diminution de 30 % à $S=12$ jusqu'à 10% à $S=26$; ce qui correspond aux valeurs minimales des concentrations en COP mesurées pour Octobre 2018. Néanmoins, la réaugmentation des pourcentages à partir de $S=30$ suggère qu'au moins un autre processus que l'adsorption/désorption sur les particules régie les concentrations en COH.

En effet, en Novembre 2018, 40% de la fraction des SH disparaît entre les salinités 0 et 35, tandis que le COH augmente de 40%. Les concentrations en COP sont faibles et n'expliquent pas l'augmentation de la part de COH dans la composition de la MOD. Le débit était faible ($9,46 \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$) mais Novembre 2018 marque le début de la crue annuelle et du lessivage des sols. Un enrichissement en SH était donc attendu (Marie, 2016). Sur la base de ces résultats, nous pouvons faire l'hypothèse que des SH particulièrement hydrophobes (type acides humiques) sont mobilisés depuis les sols et drainés vers l'estuaire. Au fur et à mesure du mélange estuarien, ces SH pourraient s'agglomérer entre elles pour former des assemblages supramoléculaires et très hydrophobes, augmentant ainsi la part du COH au détriment de la fraction des SH. Ce type d'agglomération est facilitée par la formation de ponts ionique lorsque la concentration en cations majeurs (Ca^{2+} , Mg^{2+}) augmente (Baalousha et al., 2006). Le temps

de séjour relativement long (10 jours) et les faibles concentrations en COP (e.g. limitation des phénomènes d'adsorption) pourraient avoir amplifié ce processus.

Les différents scénarii d'évolution de ces pourcentages le long du gradient halin semblent mettre en évidence deux théories sur la nature du COH : (i) molécules associées à la MOP dans les cas de Septembre 2017, Janvier et Avril 2018 ou, (ii) composés hydrophobes apparentés aux SH drainées depuis les sols au début de la crue en Novembre 2018.

IV.3.2. Variations des concentrations des différentes fractions le long du gradient halin

IV.3.2.1. Substances Humiques

Les SH constituent la majeure partie de la MOD dite « réfractaire ». Ce sont des molécules aromatiques et d'un poids moléculaire d'environ 1000 Da.

Les concentrations en SH sont comprises entre 489 et 5745 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ (figure IV.8). La dynamique dans l'estuaire est à tendance décroissante avec les concentrations les plus élevées mesurées en amont à salinité 0, et les concentrations les plus basses observées dans la partie marine de l'estuaire (salinité 35).

A salinité 0, les concentrations ont une grande variabilité saisonnière. Trois périodes peuvent être distinguées : (i) une période de faibles concentrations en hiver et au printemps (Janvier et Avril 2018) avec des concentrations $< 2000 \mu\text{g.C.L}^{-1}$; (ii) une période de concentrations élevées en été et en automne avec des concentrations $> 3000 \mu\text{g.C.L}^{-1}$; et (iii) le début de la crue annuelle (Novembre) avec des concentrations en SH particulièrement élevées ($5745 \mu\text{g.C.L}^{-1}$), presque trois fois supérieures aux maxima de la période hivernale/printanière. A salinité 35, les concentrations sont quasi-identiques et présentent une moyenne de $531 \pm 37 \mu\text{g.C.L}^{-1}$.

Les diagrammes de mélange présentent des anomalies en amont de l'estuaire (salinités 0 – 10). Dans le cas des campagnes de Janvier et Avril 2018, les anomalies sont si faibles que l'on peut parler de quasi-conservativité. Ces anomalies sont souvent négatives à l'exception du mois d'Octobre 2018 qui présente un gain de SH.

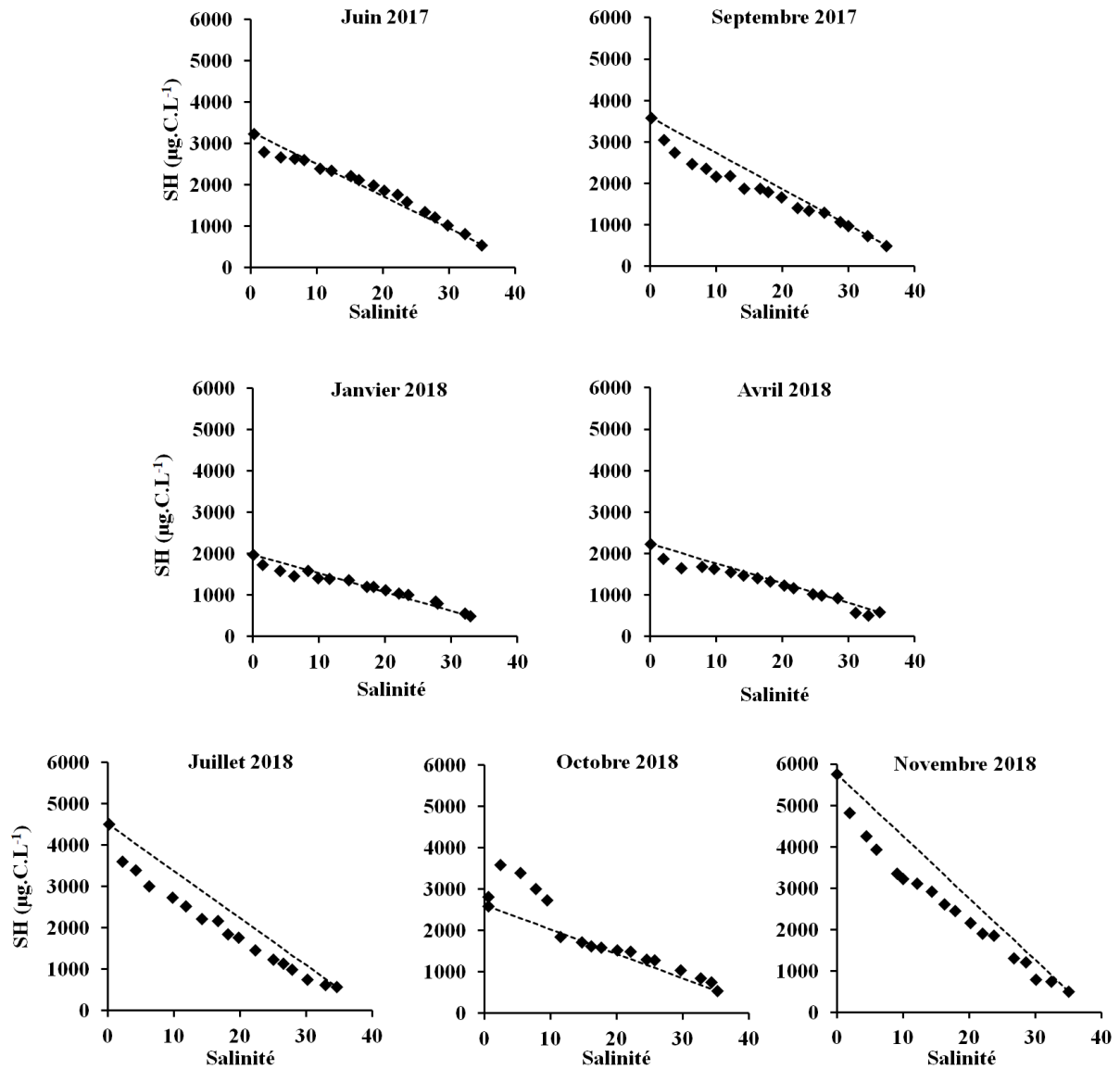


Figure IV.8 : Diagrammes de mélanges des SH en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés

IV.3.2.2. Carbone Organique Hydrophobe

La fraction du COH représente l'ensemble des composés très hydrophobes retenus par les colonnes d'exclusion stérique. Leur taille moléculaire moyenne n'est pas connue avec certitude. Il pourrait s'agir de composés de petites tailles (<350 Da) retenus sur le gel des colonnes ou dont le temps de rétention excède celui de l'analyse (180 min dans notre cas). L'hypothèse qu'il s'agisse également de composés de hauts poids moléculaires hydrophobes du même type que les SH ne peut être exclue.

Les concentrations en COH sont comprises entre 0 et 2200 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les concentrations les plus fortes sont mesurées en amont de l'estuaire et celles les plus faibles dans la partie marine (figure IV.9).

A S0, les concentrations sont globalement comprises entre 1100 et 1800 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$, à l'exception du mois d'Avril 2018 où les concentrations sont deux fois moins importantes (600 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$). A S35, les concentrations sont comprises entre 0 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ et 1160 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ (Novembre 2018).

Les diagrammes de mélanges montrent globalement un comportement de mélange non-conservatif. Dans la plupart des campagnes, les concentrations en COH chutent brutalement pour atteindre dès la salinité 20 des valeurs minimales (Juillet, Octobre et Novembre 2018). Dans le reste des campagnes, l'évolution des concentrations le long du gradient halin est plus aléatoire. Le mode de détermination des concentrations en COH par différence entre le COD et la somme des cinq autres fractions effectivement séparées par les colonnes d'exclusion stérique peut expliquer en partie la forte variabilité des concentrations.

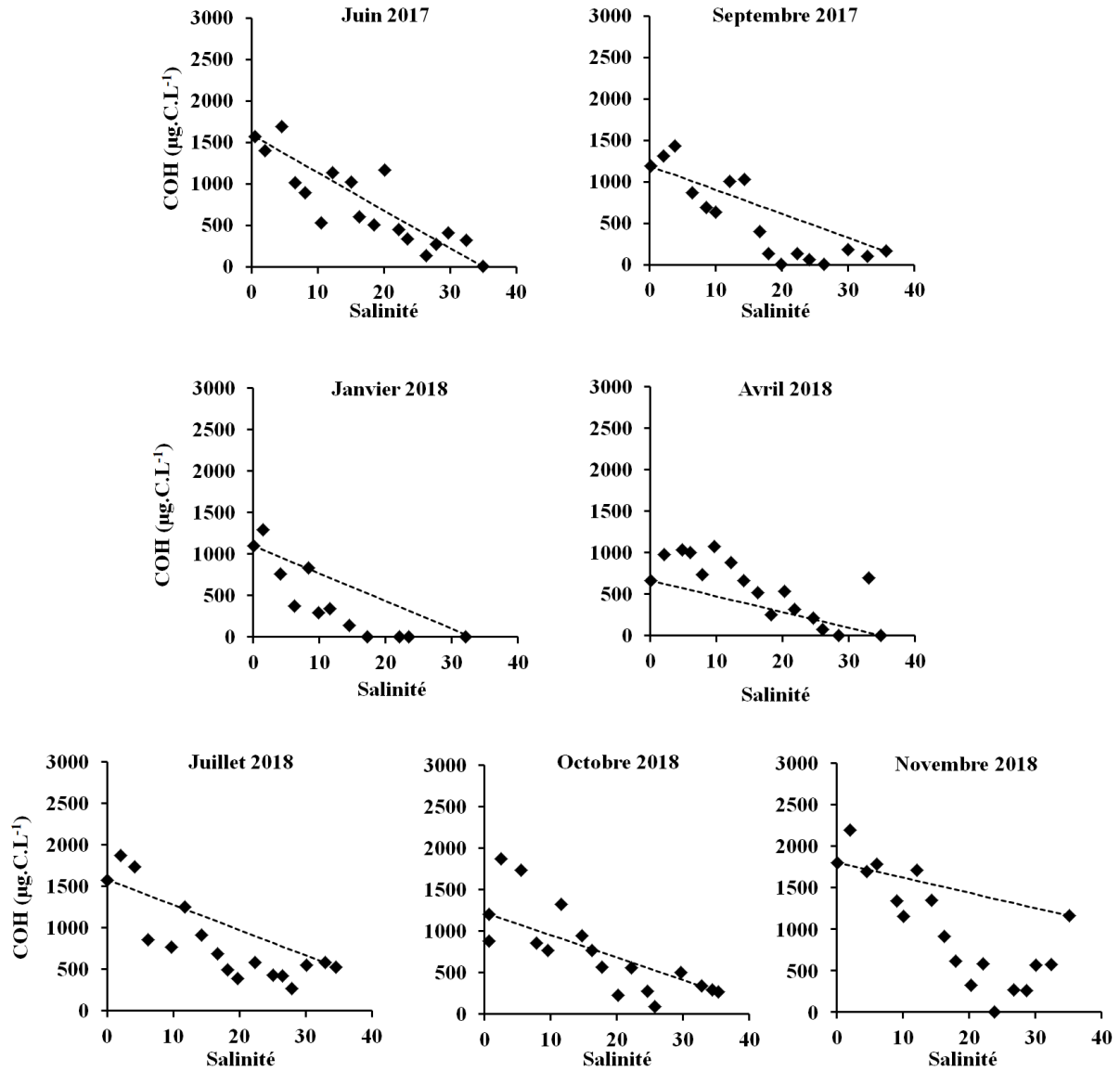


Figure IV.9 : Diagrammes de mélanges du COH en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés.

IV.3.2.3. Molécules de petits poids moléculaires neutres

Les LMWN sont un ensemble hétérogène de molécules de petites tailles (< 350 Da) qui peuvent contenir des aldéhydes, des cétones, des alcools, des acides aminés...

Les concentrations en LMWN sont comprises entre 0 et 1900 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les concentrations sont décroissantes le long de l'estuaire (figure IV.10).

A salinité 0, les concentrations sont généralement comprises entre 400 et 600 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$, sauf pour le mois d'Avril 2018 où elles ne sont que de 300 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. A salinité 35, les concentrations sont plutôt variables et sont comprises entre 60 et 420 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$.

Seul le diagramme de mélange de Juin 2017 peut être considéré comme quasi conservatif. Des anomalies négatives sont relevées en amont (Avril, Juillet et Octobre 2018), en aval (Novembre 2018) ou en milieu d'estuaire (Septembre 2017 et Janvier 2018). Deux anomalies positives sont observées en amont ($S < 8$) en Novembre 2018 et en aval ($S > 24$) en Juin 2017.

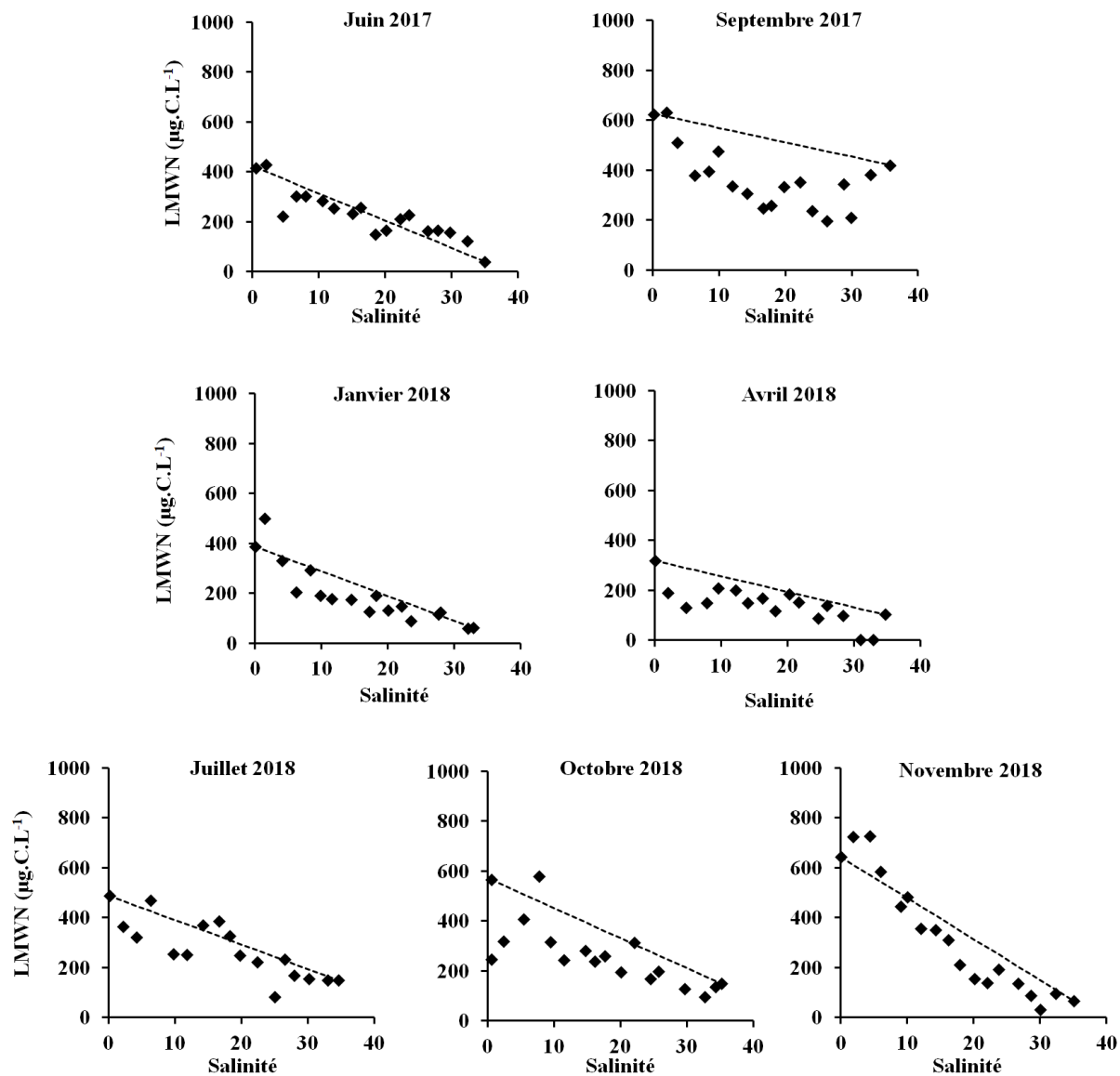


Figure IV.10 : Diagrammes de mélanges des LMWN H en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés

IV.3.2.4. Building-Blocks

Les BB peuvent être considérées comme des SH de taille intermédiaire (~500 Da).

Les concentrations en BB sont comprises entre 45 et 845 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ et diminuent avec la salinité (figure IV.11).

Sur la base des concentrations à salinité 0, deux périodes peuvent être distinguées : une période de concentrations plus faibles $< 400 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ et une période de concentrations plus élevées avec des concentrations $> 600 \mu\text{g.C.L}^{-1}$. Des valeurs maximales $> 800 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ sont observées au mois de Novembre 2018 mais aussi en Juillet 2018. A salinité 35, les variations sont moins importantes. La moyenne des concentrations dans la partie marine (S35) de l'estuaire est de $72 \pm 17 \mu\text{g.C.L}^{-1}$.

Les diagrammes de mélange illustrent des pertes importantes dès le début du mélange estuarien (fig IV.11). Le déficit de concentration commence plus tard, à salinité 6, pour la campagne d'Octobre 2018.

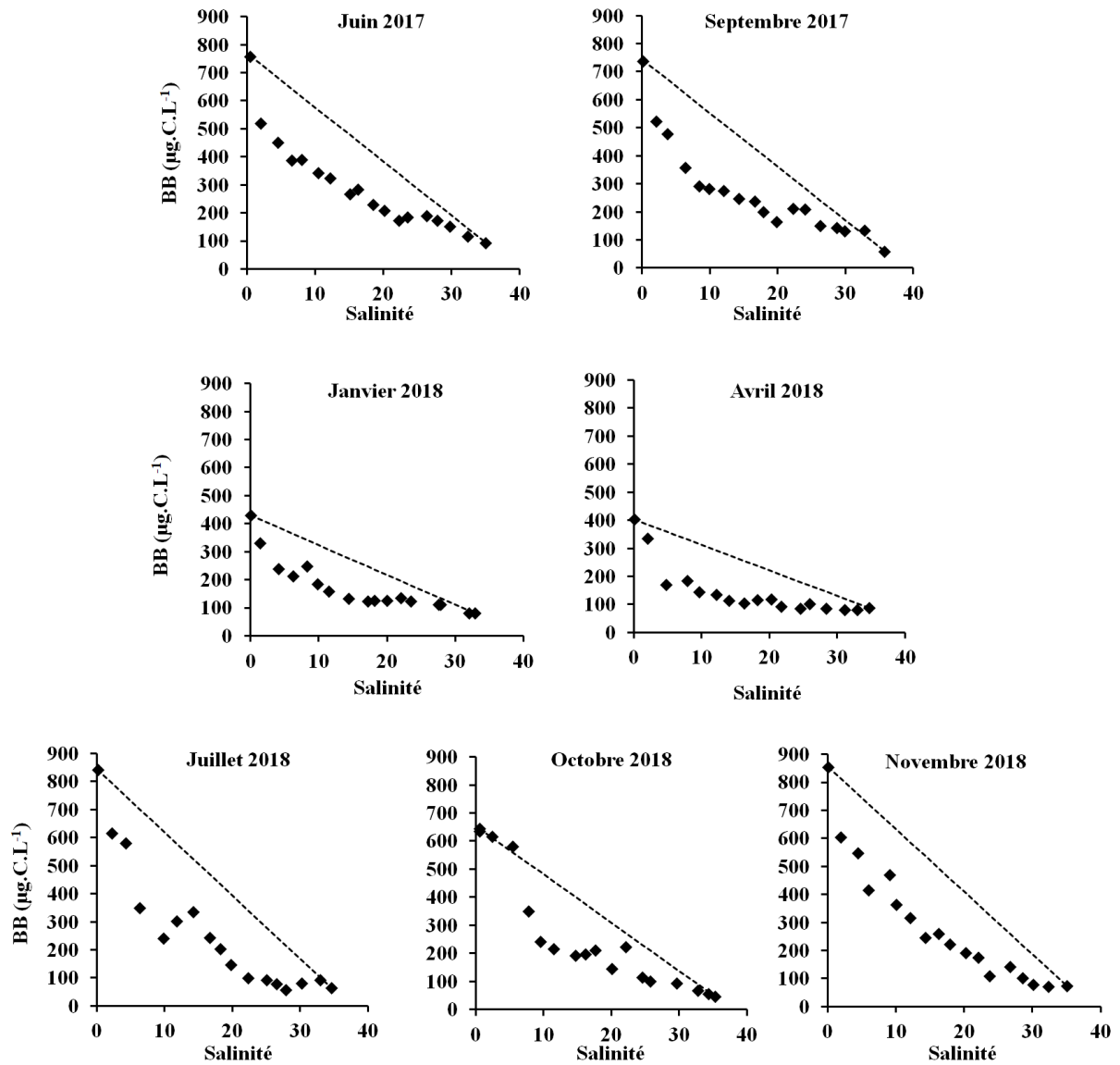


Figure IV.11 : Diagrammes de mélanges des BB en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés

IV.3.2.5. Biopolymères

Les BP constituent la fraction de limite de perméation des colonnes. Les composés la constituant ont des tailles supérieures à 10 000 Da. On y trouve principalement des polysaccharides et des protéines mais aussi potentiellement de SH de haut poids moléculaire.

Les concentrations en BP sont réparties entre 40 et 640 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les concentrations les plus élevées sont mesurées en amont et les plus basses dans la partie marine de l'estuaire (figure IV.12).

La variabilité saisonnière des concentrations à S0 dans l'estuaire de l'Aulne permet de distinguer trois périodes sur le même modèle que pour la fraction des SH : des concentrations basses $< 200 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ en Janvier et Avril 2018 ; des concentrations élevées $> 400 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ en été et en automne et un maximum enregistré en Novembre 2018, avec une concentration trois fois plus importante qu'en hiver ($640 \mu\text{g.C.L}^{-1}$). A salinité 35, cette dynamique saisonnière n'est pas reproduite. En été, en automne et au printemps, les concentrations sont comprises entre 70 et $120 \mu\text{g.C.L}^{-1}$. Des minima sont observés en Janvier 2018 ($\sim 40 \mu\text{g.C.L}^{-1}$) et en Novembre 2018 ($50 \mu\text{g.C.L}^{-1}$).

Seul le diagramme de mélange de Janvier 2018 peut être considéré comme quasi-conservatif. Les autres campagnes présentent des déficits de concentrations en amont entre les salinités 0 et 10 (Juin 2017 et Avril 2018) ou dans la quasi-totalité du mélange estuarien (Septembre 2017, Juillet, Octobre et Novembre 2018).

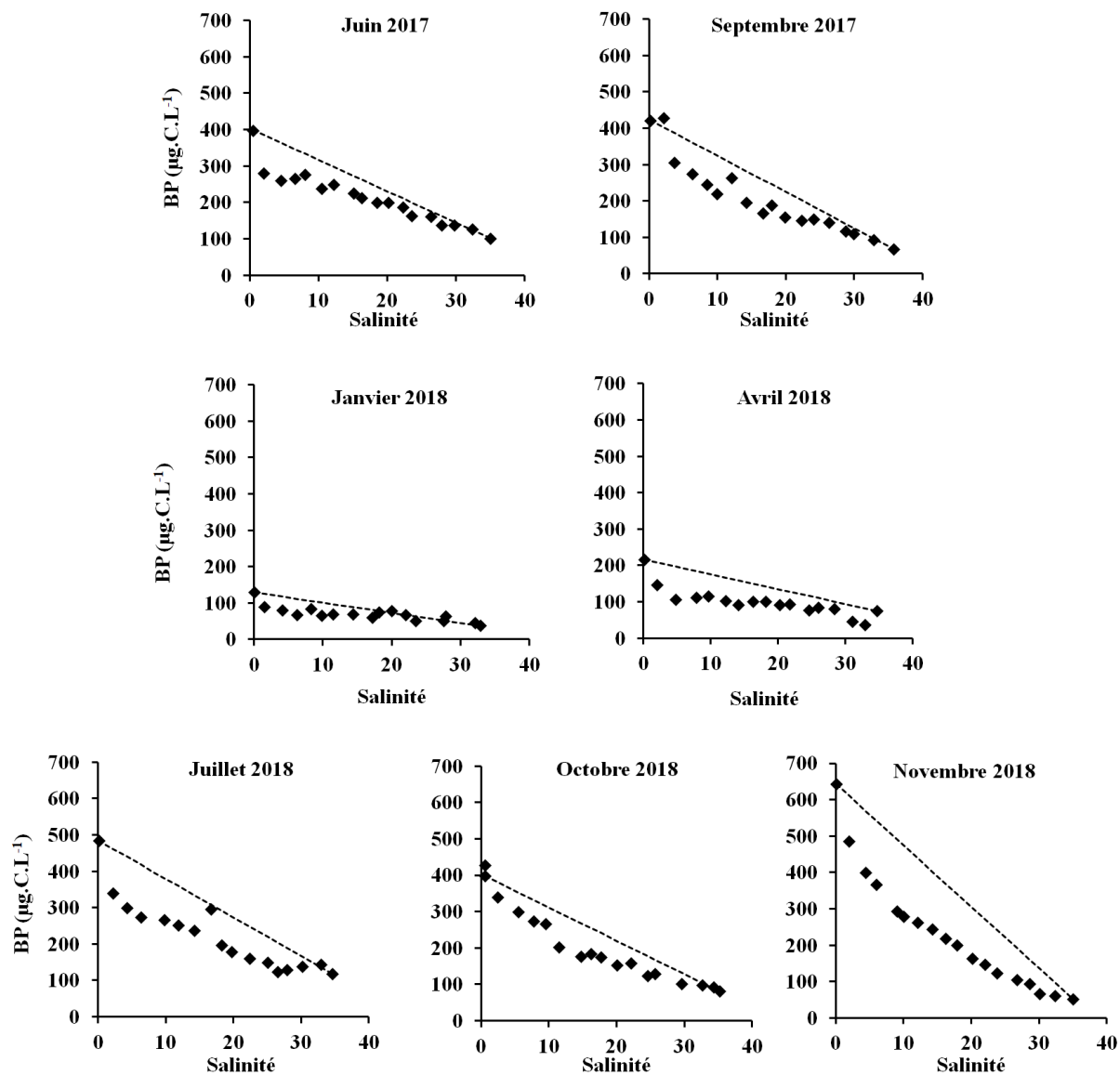


Figure IV.12 : Diagrammes de mélanges des BP en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés

IV.3.2.6. Molécules de petits poids moléculaires acides

Les LMWA sont des composés anioniques à pH neutre de petites taille (< 350 Da) comme des acides organiques.

Les concentrations en LMWA sont comprises entre 0 et 80 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Globalement, les LMWA présentent des concentrations en-deçà de la limite de détection. Néanmoins, des diagrammes de mélange peuvent être observés en Octobre et Novembre 2018 (figure IV.13).

Les concentrations à S0 sont comprises entre 2 et 78 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ (Octobre 2018). Les concentrations sont <10 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ en Octobre 2017, Janvier 2018 et Avril 2018 et comprises entre 18 et 32 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ pour les mois de Juin 2017, Juillet et Novembre 2018. A salinité 35, les concentrations sont trop faibles pour être quantifiées ou détectées.

Les diagrammes de mélange ne sont pas conservatifs. Des concentrations >10 $\mu\text{g.C.L}^{-1}$ sont détectées en Octobre et en Novembre 2018 entre 10 et 26 de salinité.

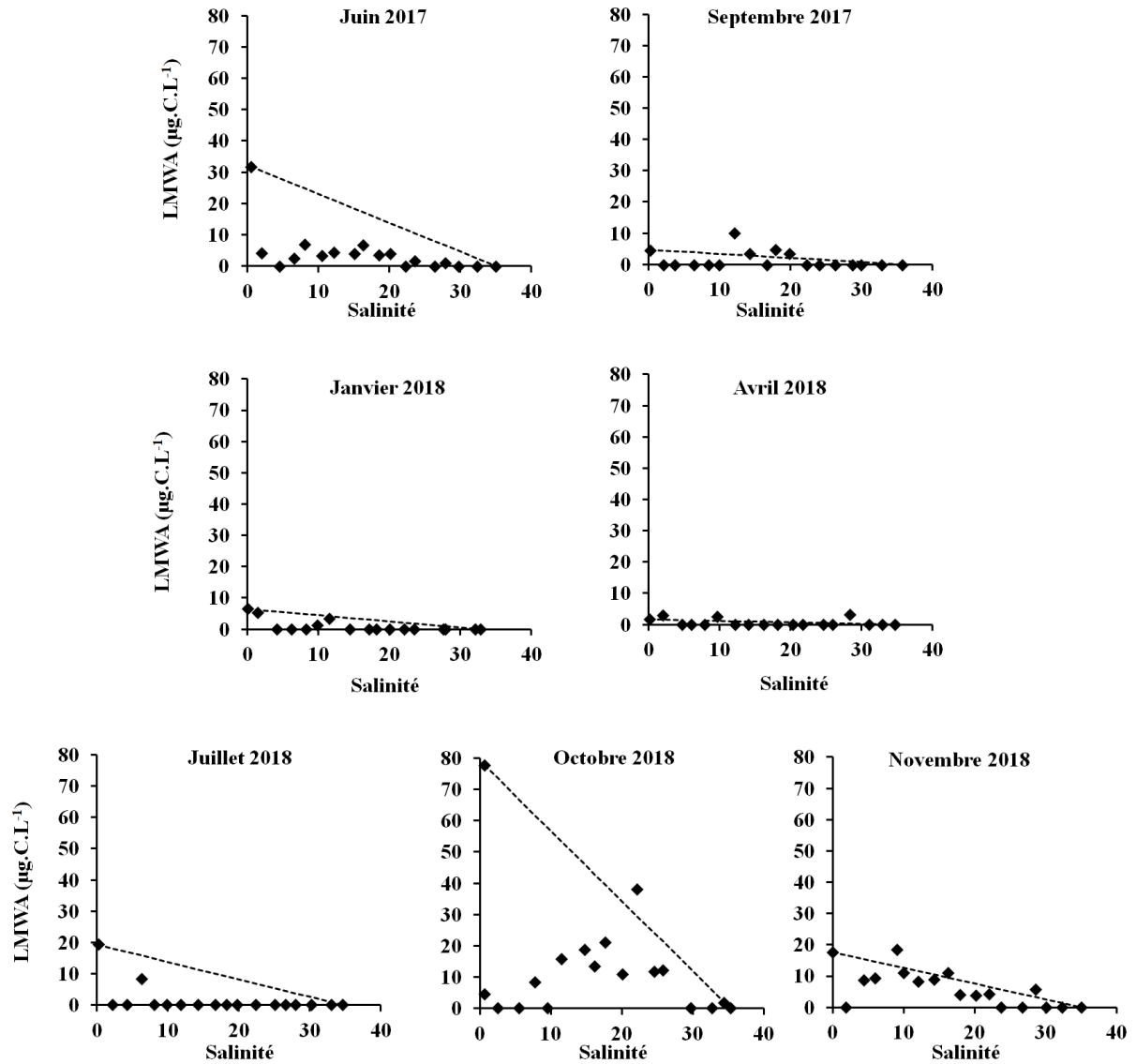


Figure IV.13 : Diagrammes de mélanges des LMWA en $\mu\text{g.C.L}^{-1}$. Les diagrammes conservatifs sont tracés en pointillés

IV.4. Discussion

IV.4.1. Impact de la rivière sur les variations saisonnières des concentrations des différentes fractions

La figure IV.14 présente les concentrations en carbone mesurées pour les différentes fractions à salinité 0 en fonction des campagnes de prélèvements. Les différentes fractions de la MOD ne montrent pas la même variabilité saisonnière. Dans le cas des SH, des BB et des BP, deux périodes peuvent être observées : une période de concentrations plus faibles en hiver (Janvier 2018) et au printemps (Avril 2018) ; et une période de concentrations plus élevées en été et en automne. Pour la fraction des LMWN, ces différences apparaissent moins marquées. Le COH présente une saisonnalité différente avec des concentrations élevées toute l'année sauf au printemps (Avril 2018). L'ensemble des fractions présentent un maximum de concentrations en Novembre 2018 au début de la crue annuelle, à l'exception des LMWA dont le maximum est observé en Octobre 2018.

IV.4.1.1. Apports allochtones

Sur le bassin versant de l'Aulne, les sols sont enrichis en MO à partir de débris végétaux et de fumier composté épandu toute l'année (Waeles et al., 2013 ; Marie et al., 2015, 2017). En période sèche, le temps de résidence de cette MO augmente, permettant aux processus d'humification d'enrichir les sols en composés de type SH (Stevenson, 1994; Tiquia et al., 1997; Milori et al., 2002; Wu et al., 2017). Aux premières pluies automnales, les sols sont lessivés et un transfert des SH a lieu vers la rivière (Royer et David, 2005; Oeurng et al., 2011; Marie et al., 2017). La mobilisation importante des composés de type SH (fractions SH et BB) peut être également expliquée par l'érosion des sols, particulièrement importante dans les bassins versants soumis à une agriculture intensive (Shang et al., 2018). En hiver, l'épuisement relatif en MO des sols se traduit par des concentrations minimales dans les eaux (Nagorski et al., 2003; Marie et al., 2015). L'augmentation des concentrations en SH et en BB en été et en automne pourrait également être expliquée par un effet de concentration induit par les débits minimaux de l'Aulne enregistrés en période d'étiage (Tableau IV-1).

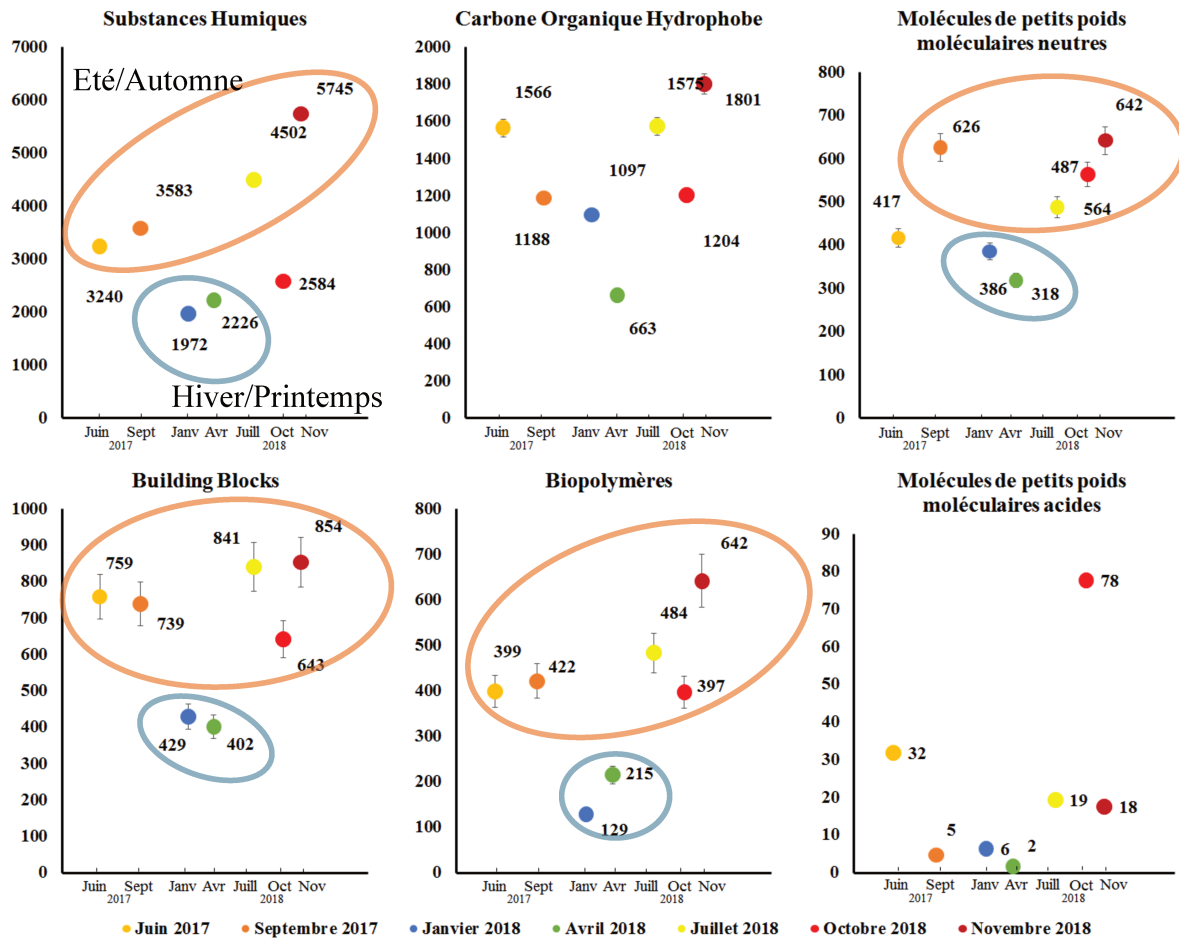


Figure IV.14 : Concentrations à S0 des différentes fractions pour chaque campagne. Les incertitudes sont comprises dans les points. Les couleurs chaudes correspondent aux saisons estivale (été) et automnale (cru). Les couleurs froides aux saisons hivernale et printanière.

IV.4.1.2. Apports autochtones

En plus des apports allochtones à la rivière, la MOD fluviale est constituée de composés produits *in situ* dans le milieu aquatique. L'activité algale dans la rivière de l'Aulne peut durer plusieurs mois (Mai à Août) avec des concentrations en Chl a $>7 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Marie, 2016). La MOP algale produite est ensuite exportée en partie dans l'estuaire (Turbidity et al., 1999; Huguet et al., 2009; Thibault et al., 2019) et peut être dégradée par les bactéries, sous la forme de composés de hauts poids moléculaires comme les protéines et les polysaccharides dans le milieu aquatique (Chin et al., 2004; Azam et Malfatti, 2007). La fraction des BP est constituée de ces classes de composés (Huber et al., 2011) et la dynamique de cette fraction dans les milieux naturels a souvent été mise en relation avec le développement phytoplanctonique (Chen et al., 2013 ; Villacorte et al., 2015 ; He et al., 2016). L'hydrolyse de ces fractions de plus hauts poids

moléculaires a été proposée comme mécanisme de production des LMWN (Dittmar et Kattner, 2003 ; Hansell et Carlson, 2015 ; He et al., 2016).

Dans notre système, les rapports C/N de la MOP corroborent la présence, en partie, d'une matière dérivée de la biomasse phytoplanctonique en amont de l'estuaire d'Avril à Octobre (Savoie et al., 2003). L'augmentation des concentrations en BP et en LMWN durant le printemps et l'été, saisons propices au développement microbologique, peut être interprétée comme une utilisation de la matière algale particulaire détritique par les hétérotrophes (Villacorte et al., 2015) suivie d'une dépolymérisation/dégradation des structures de hauts poids moléculaires résultantes (Hansell et Carlson, 2015). La différence entre les dynamiques pourrait être expliquée par la plus grande efficacité qu'ont les bactéries à dégrader la MOP que la MOD. En effet, le COP est dégradé quinze fois plus rapidement que le COD (Attermeyer et al., 2018).

Le COH pourrait aussi être un indicateur de l'activité biologique dans la rivière. La composition du COH n'est pas connue avec certitude puisque cette fraction est déterminée de manière indirecte lors de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique (Huber et al., 2011). Parmi les formes les plus hydrophobes de la MOD, il y a les SH mais aussi les lipides (Thurman, 1985). Les acides gras et les stérols (constitutifs des lipides) ont été utilisés comme biomarqueurs de l'activité planctonique (Mannino et Harvey, 1999; Goutx et al., 2009) et de l'activité hétérotrophique (Harvey et al., 2006; Marić et al., 2013). Dans notre système, les concentrations basses mesurées en Janvier (figure IV.8) sont un indicateur de l'origine du COH. Néanmoins, les concentrations de même ordre de grandeur qu'en hiver mesurées en Avril 2018 sont contre-indicatives d'une origine purement biologique de cette fraction. Pour toutes les campagnes, l'aromaticité du COH – calculée par différence entre l'aromaticité globale (SUVA) et l'aromaticité des fractions de tailles (dont Arm-SH) - à salinité 0, comprise entre 4 et 5 $L.(mg.m)^{-1}$, indique que la fraction est principalement composée de molécules aromatiques équivalentes à des substances humiques, dont l'origine se trouve sûrement sur le continent.

IV.4.1.3. Maxima de concentrations mesurés en Novembre

Les concentrations maximales observées lors de la campagne de Novembre 2018 pour les SH, les BB, les LMWN et les BP incitent néanmoins à tempérer nos propos sur la production biologique des fractions BP et LMWN. En effet, les BP peuvent dériver du lisier ou des débris végétaux en décomposition (Rashid, 1985; Aukes, 2012; He et al., 2016) ; et les LMWN sont mobilisés rapidement des sols lors d'épisodes de fortes pluies (Chen et al., 2013). Les maxima

observés en Novembre 2018 semblent donc être la preuve d'une mobilisation importante de la MOD toute fraction confondue lors des premières pluies automnales. Ce comportement de type « purging » s'expliquerait par le lessivage des sols, d'abord enrichis durant la saison sèche (Nagorski et al., 2003) comme cela avait été prouvé pour les SH et les BB dans de précédentes études (Marie et al., 2015, 2017).

Dans la majeure partie de l'estuaire, le contrôle de la MOD par les apports allochtones semble prépondérant par rapport aux apports autochtones. Les apports allochtones sont principalement représentés par la fraction des SH. Les concentrations de cette fraction ajoutée à celle du COH dominant la MOD, ce qui n'est pas incohérent au vu de la nature des activités agricoles régnant sur le bassin versant de l'Aulne (Waeles et al., 2013 ; Marie et al., 2017 ; Attermeyer et al., 2018). D'autres fractions, comme les BP et dans une moindre mesure les LMWN, sont suspectés d'être produits lors des efflorescences phytoplanctoniques (Villacorte et al., 2015)

IV.4.2. Caractérisation des sources de la MOD dans l'estuaire à l'aide de la fraction des SH

La source principale de la MOD dans l'estuaire est la rivière de l'Aulne (Marie et al., 2015, 2017) par l'intermédiaire de ses eaux fluviales riches en COD se diluant progressivement avec celles moins riches du milieu marin (figures IV.8-13). Néanmoins, si l'on regarde les paramètres qualitatifs associés aux fractions de taille, comme l'aromaticité des SH (Arm-SH), présentée sur la figure IV.15, des différences notables sont observables. En effet, pour l'ensemble des campagnes de prélèvements, l'Arm-SH est comprise entre des valeurs élevées à S=0 (entre 5,0 et 6,0 L.(mg.m)⁻¹) et des valeurs beaucoup plus faibles à S=35 (< 2 L.(mg.m)⁻¹). L'évolution de ce paramètre le long de l'estuaire de l'Aulne n'est pas équivalente à celle des concentrations en SH. L'Arm-SH décroît de manière quasi-linéaire jusqu'à salinité 28 environ avant d'opérer une chute brutale vers les valeurs faibles observées en milieu marin.

La distinction entre deux sources de MOD qualitativement distinctes a déjà été observée dans de précédentes études estuariennes (De Souza Sierra et al., 1997; Huguet et al., 2010). Elles séparent la MOD terrigène d'origine continentale, plutôt aromatique, de celle plus aliphatique d'origine autochtone, prédominante en milieu marin (Hansen et al., 2016; Zhang et

al., 2016). Ces différences peuvent s’observer *via* les propriétés spectroscopiques et les rapports C/N de la fraction des SH.

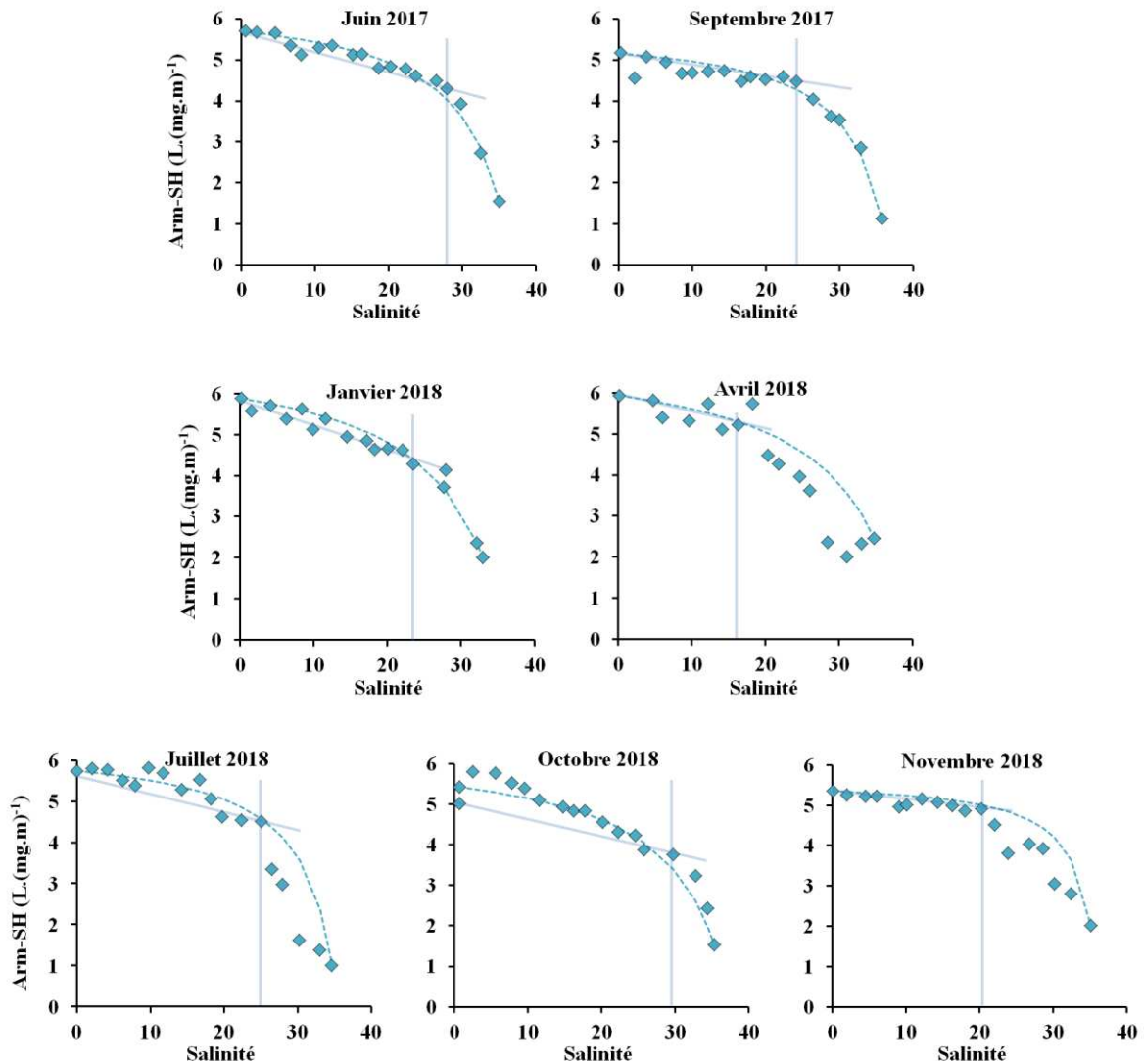


Figure IV.15 : Diagrammes de mélange de l’Arm-SH. Les mélanges théoriques sont tracés en pointillés

IV.4.2.1. Aromaticité des SH

Dans notre étude, ces deux types de MOD sont identifiables dans la fraction des SH. En effet, les fortes Arm-SH mesurées en amont de l’estuaire ($> 5 \text{ L.}(\text{mg.m})^{-1}$) sont typiques des apports d’origine terrestre (Jaffé et al., 2008) ; tandis que les faibles valeurs mesurées dans la partie marine de l’estuaire ($< 2 \text{ L.}(\text{mg.m})^{-1}$) sont relativement proches de ce qui peut être mesuré dans les exsudats algaux ($\text{Arm-SH} < 1 \text{ L.}(\text{mg.m})^{-1}$) (Pellerin et al., 2010; Hansen et al., 2016). L’évolution de ce paramètre est répétable d’une saison à l’autre, comme le montre le

diagramme des SH (figure IV.16). Ce diagramme, qui permet de tracer les origines des SH en fonction de leur aromaticité et de leur poids moléculaire moyen, montre l'évolution de ces deux paramètres pour les campagnes de Janvier (Winter), Avril (Spring), Juillet (Summer) et Octobre (Autumn) 2018. Le long du continuum d'humification, les SH varient de formes terrigènes de type acides fulviques pédogéniques, dans les premiers 75% de l'estuaire, en accord avec les résultats préliminaires mesurés dans la rivière de l'Aulne (Marie et al., 2017) ; vers des formes moins aromatiques et plus petites en aval, de type acides fulviques aquagéniques. Peu importe le moment du cycle hydrologique, la fraction des SH est toujours constituée, en aval ($S > 30$), de structures plus aliphatiques et de plus petite taille que celles exportées par la rivière de l'Aulne.

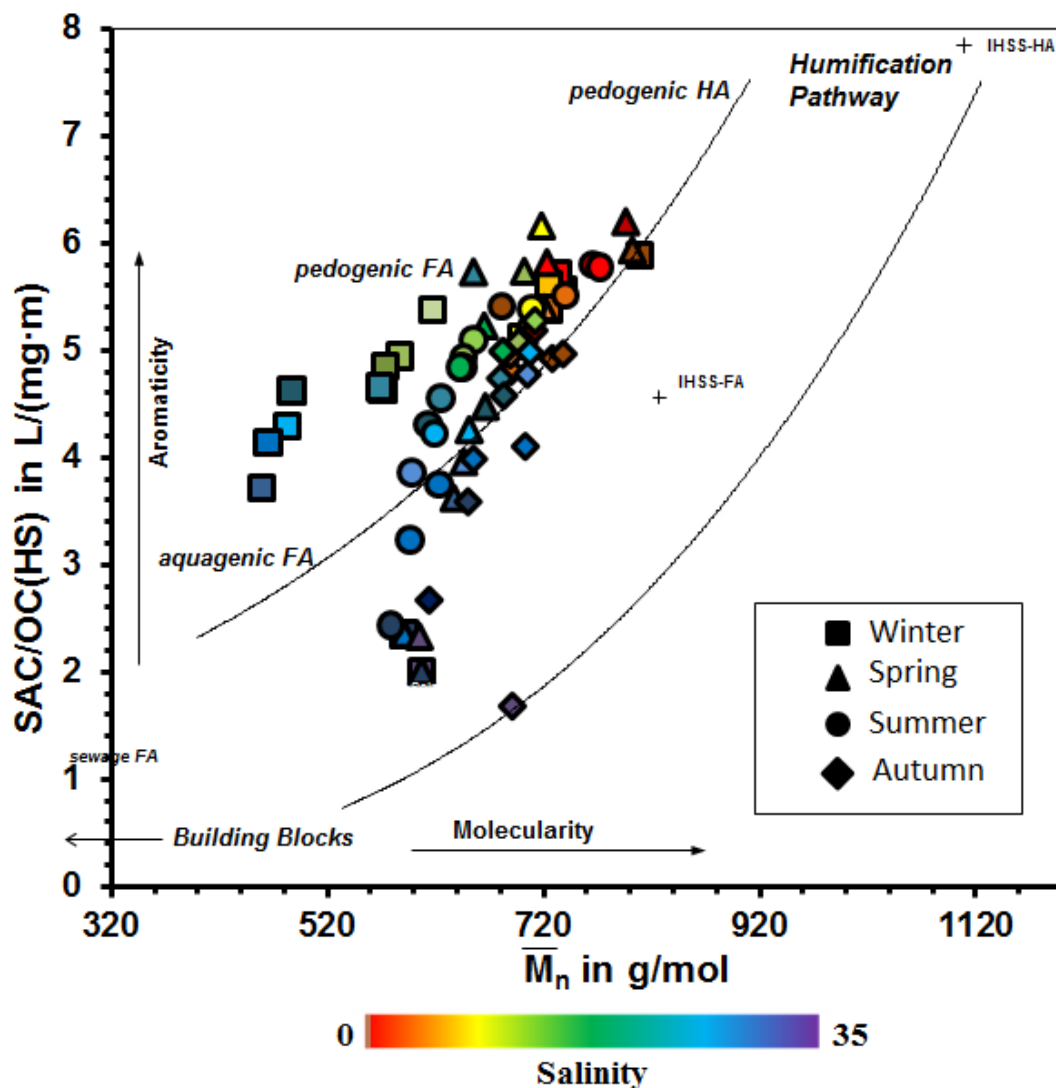


Figure IV.16 : Diagramme des SH pour les saisons hivernale (Janvier 2018), printannière (Avril 2018), estivale (Juillet 2018) et automnale (Octobre 2018).

IV.4.2.2. Rapport C/N des SH

Le changement de structures dans les SH s'observe, de manière moins franche, avec le diagramme de labilité des SH (figure IV.17). Ce diagramme présente l'aromaticité de la fraction SH en fonction de son rapport C/N (Dulaquais et al., 2018).

En amont de l'estuaire, les rapports C/N des SH sont compris entre 20 et 31. Ensuite, le long du gradient halin, les rapports diminuent pour atteindre des valeurs basses comprises entre 9 et 17 dans la partie marine de l'estuaire. Les rapports C/N sont particulièrement bas en Avril 2018 (printemps) avec plus de la moitié des points inférieurs à 15 et des échantillons marins ($S < 30$) compris entre 8 et 9. L'aromaticité suit la même dynamique que celle présentée dans la section précédente (IV.4.2.1 Aromaticité des SH).

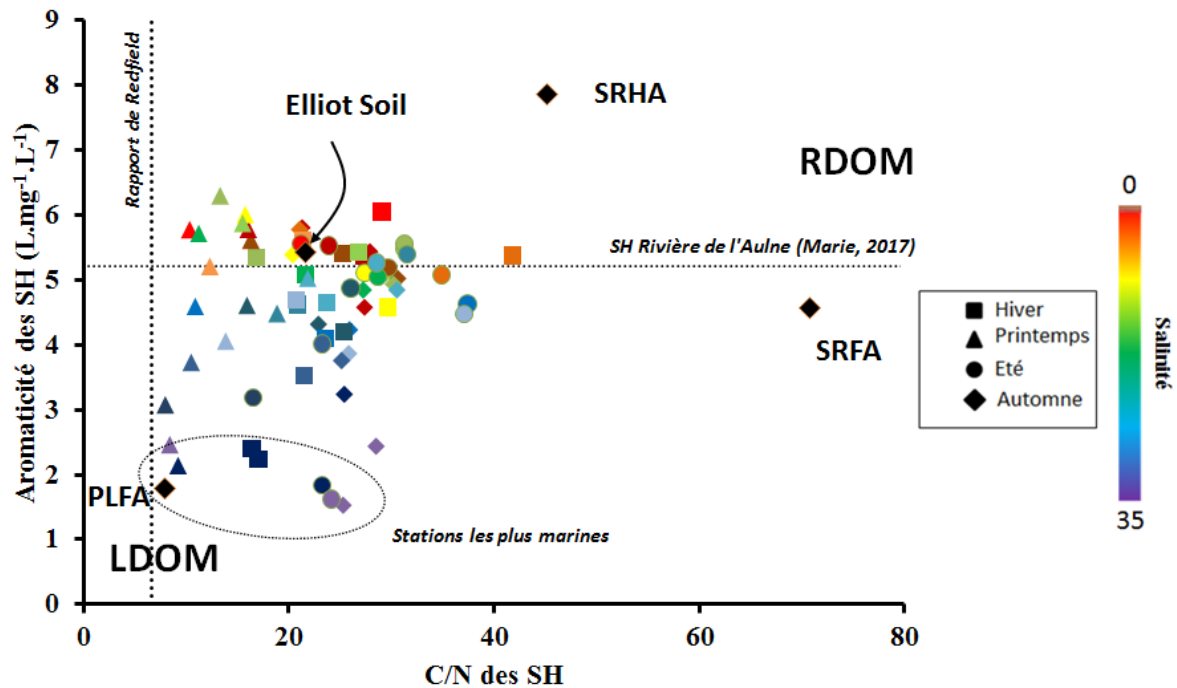


Figure IV.17 : Diagramme de labilité des SH pour les saisons hivernale (Janvier 2018), printannière (Avril 2018), estivale (Juillet 2018) et automnale (Octobre 2018)..

Les rapports élevés mesurés en début de mélange estuarien sont proches du rapport élémentaire du standard IHSS *Elliot Soil Fulvic Acid (5S102F)*, mesuré à 25 (Données de l'IHSS : humic-substances.org). Ce standard de sol provient des plaines de l'Indiana (USA) fertilisés par des pratiques agricoles intensives (Ulu et al., 2015). Le bassin versant de l'Aulne étant lui aussi soumis à une activité agricole intense (Marie et al., 2017), les similarités de composition entre ce standard et les SH du début du gradient renforce l'idée d'une origine

terrigenes des SH dans la riviere de l'Aulne. Ces valeurs sont aussi tres proches a celles observees dans les rivieres de l'Aulne en 2014 (rapports C/N = 12,5 – 25 ; Donnees de Marie, 2016). A titre de comparaison le rapport du standard IHSS *Suwanee River Fulvic Acid* s'eleve a 70 (Donnees de l'IHSS : humic-substances.org).

La diminution progressive des rapports C/N observes dans la suite du gradient halin indique l'enrichissement relatif de la fraction des SH en structures azotees de type acides amines (Rosenstock et al., 2005) ou materiel proteique (Romera-Castillo et al., 2014). Ces structures pourraient provenir de la degradation des proteines en structures de type SH comme cela a ete demontree dans le cas de la degradation de MOD extracellulaire (Chu et al., 2015). Ces faibles rapports C/N se rapprochent de celui du standard IHSS *Pony Lake Fulvic Acid* qui est un standard d'origine autochtone, derive de la biomasse algale. Il est compose a 58% de structures derivees des proteines (McKnight et al., 1994; Brown et al., 2004; Mangal et al., 2016) et son rapport C/N est estime a 8 (Donnees de l'IHSS : humic-substances.org).

Ainsi, on retrouve l'influence de ces deux sources (marine et continentale) de SH qualitativement differentes aux bornes de salinite de l'estuaire. La presence d'acides amines ou de composés proteiques au sein de la fraction SH mesuree dans cette etude pourrait etre validee par une mesure des proprietés de fluorescence (Coble et al., 1996 ; Parlanti et al., 2000 ; Romera-Castillo et al., 2014).

IV.4.2.3. Indices de fluorescence des SH

Les analyses de fluorescence presentees ont ete realisees apres isolation de la fraction SH pour les campagnes de Janvier (Hiver), Avril (Printemps), Juillet (Ete) et Octobre (Automne) 2018.

A partir des donnees des matrices de fluorescence des SH, deux indices de fluorescence ont ete calculees : le HIX (Indice d'Humification) et le BIX (Indice Biologique). Ces deux indices permettent de differencier la MOD autochtone et fraiche ($HIX < 5$; $BIX = 0,8 - 1,0$) de la MOD allochtone et/ou degradee ($HIX = 10 - 30$; $BIX = 0,6$).

La figure IV.18 combine ces deux indices et permet de visualiser les changements de nature de la MOD le long du gradient halin et selon les saisons.

Les valeurs de HIX de la fraction des SH sont comprises entre 1 et 22. Elles diminuent des eaux douces vers les eaux marines pour les quatre saisons (figure IV.19). L'estuaire peut etre coupe en deux, avec une premiere moitie ($S < 15$) ou le HIX est > 5 et, une seconde moitie

($S > 15$) où le HIX est < 5 . Ces valeurs d'indice sont du même ordre de grandeur que celles observées dans l'estuaire de la Gironde par Huguet et al. (2009). Dans le cas de la fraction des SH, cet indice permet de déterminer les eaux avec un fort taux d'humification, en amont de l'estuaire, des eaux dominés par une matière plus fraîche, produite *in situ*, en aval (Hunt et Ohno, 2007).

Les valeurs de BIX sont comprises entre 0,4 et 1,8. Globalement, le BIX se maintient entre 0,4 et 0,6 jusqu'à une salinité de 30. Au-delà, les valeurs sont $> 0,7$ et l'indice atteint son maximum (1,8) à salinité 35 au printemps (figure IV.18). D'après ces résultats, la majorité de la fraction des SH peut être considérée comme allochtone jusqu'à salinité 30 (Huguet et al., 2009). La fraction SH dans la partie marine de l'estuaire peut être, sur la base du BIX, qualifiée de faiblement biologique ou microbienne (Huguet et al., 2009). Néanmoins, à salinité 35, excepté la campagne d'automne, les valeurs de BIX sont supérieures à 0,8 et les SH peuvent être considérés comme principalement autochtones. Au printemps, le point à salinité 35 présente un BIX particulièrement élevé (1,8) qui semble avoir été provoqué par le bloom phytoplanctonique observé en rade de Brest à cette saison.

Les évolutions le long du gradient salé de ces deux indices nous amènent à décrire la MOD sous un angle plutôt classique : d'un côté, la fraction des SH en amont de l'estuaire de l'Aulne est plutôt allochtone et fortement humifiée avec des valeurs fortes de SUVA et de C/N ($SUVA = 5,0 - 6,0 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{m})^{-1}$; $C/N = 20-25$; $HIX > 10$; $BIX = 0,4$) ; de l'autre, la fraction des SH en milieu marin plutôt autochtone, voire photodégradée, avec un SUVA bas et des rapports C/N plus faibles qu'en amont de l'estuaire ($SUVA < 2,0 \text{ L} \cdot (\text{mg} \cdot \text{m})^{-1}$, $C/N = 9-20$; $HIX < 5$; $BIX > 0,7$).

Malgré que les concentrations en carbone des SH ne présentent pas toujours de comportement conservatif, l'Arm-SH suit globalement les courbes de mélange théorique et plaide en faveur d'un mélange entre une source terrestre et une source marine de MOD. Les déficits de concentrations en SH peuvent donc plutôt s'expliquer par un échange entre phases dissoute et particulaire.

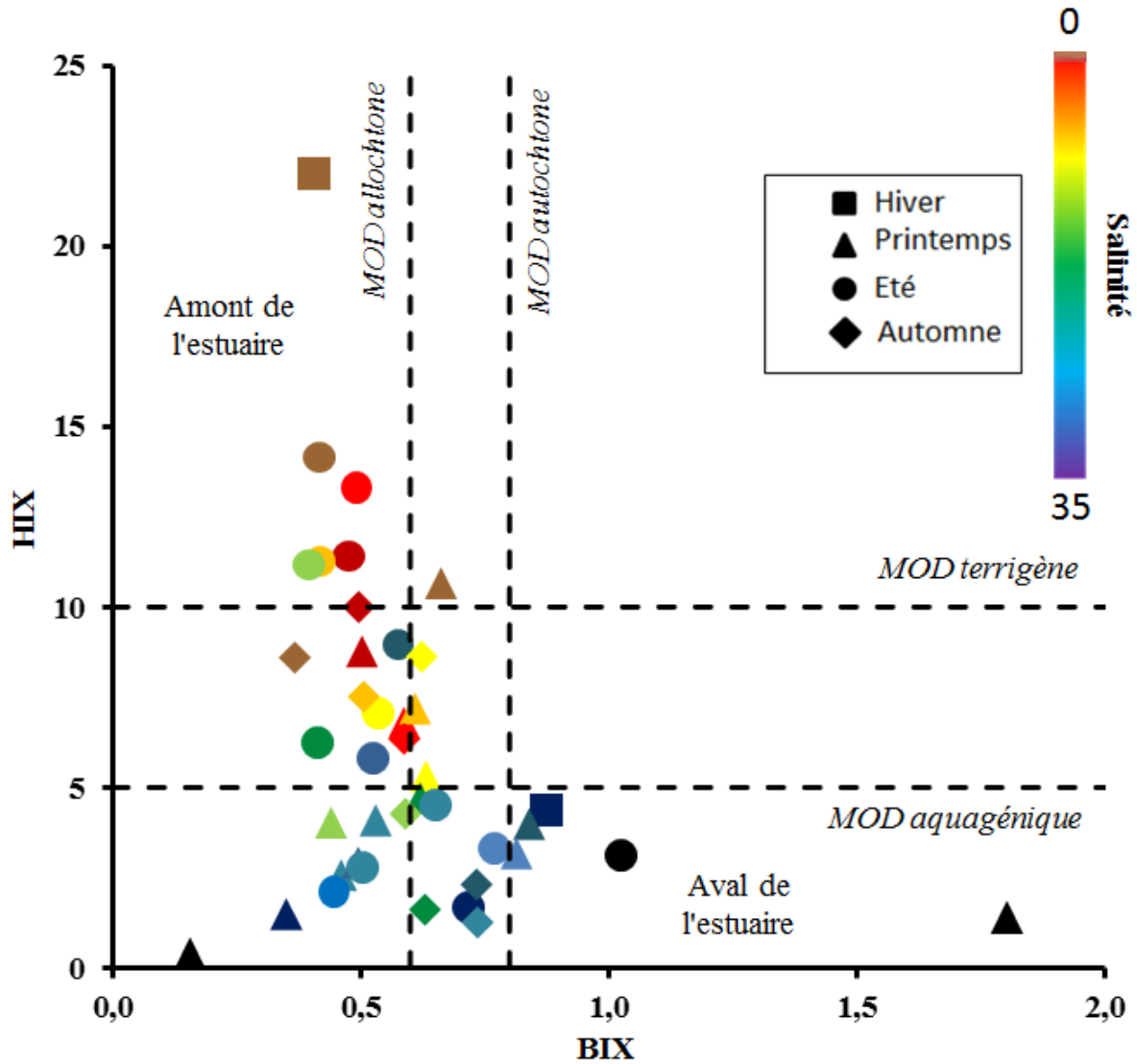


Figure IV.18 : Diagrammes de fluorescence des SH dans l'estuaire de l'Aulne pour quatre saisons de l'année 2018 : hiver (Janvier) ; Printemps (Avril) ; Été (Juillet) ; Automne (Octobre). BIX : Indice biologique. HIX : Indice d'humification.

IV.4.3. Influence de l'activité biologique

Les BP sont des composés biogéniques dont la production a été observée lors de blooms phytoplanktoniques (Chen et Jaffé, 2014; Villacorte et al., 2015; He et al., 2016). L'évolution des concentrations en BP le long de l'estuaire de l'Aulne (figure IV.12) ne présentent pas d'anomalies positives en période de bloom phytoplanktonique. En revanche, les rapports C/N ou la fluorescence de ces composés apportent des éléments essentiels sur l'impact des développements algaux sur la MOD dans notre système

IV.4.3.1. Fraction des BP

Les BP présentent des rapports C/N bas (2 - 12) qui indiquent la présence d'une matière plus riche en azote et potentiellement plus biodisponible que les SH (C/N = 30 - 12). L'évolution des rapports C/N des BP est très disparate d'une saison à l'autre. Le long du gradient estuarien la distribution de ce rapport ne suit pas le mélange théorique et, à l'exception du mois de Janvier 2018, les rapports C/N des BP sont inférieurs aux valeurs calculées pour une dilution théorique.

Deux campagnes sont particulièrement intéressantes (figure IV.19) : Juillet et Octobre 2018. Dans les deux cas, les rapports C/N des BP augmentent en fin de mélange estuarien ($S > 30$) et atteignent des valeurs proches de 10 alors que les rapports précédents étaient situés autour de 6. Dans le cas de la campagne d'Octobre 2018, les rapports augmentent jusqu' au milieu de l'estuaire (entre les salinités 16 et 20) avant de redescendre à des valeurs de l'ordre de 6.

Ces anomalies peuvent être expliquées par au moins deux hypothèses : (i) les hétérotrophes peuvent s'adapter et consommer les structures azotées qui composent les BP comme les protéines (Kujawinski et al., 2016; Kinsey et al., 2018) ; ou (ii) les cellules phytoplanctoniques libèrent, à cet endroit de l'estuaire des polysaccharides en grande quantité, comme les substances transparentes exopolymériques (TEPs) (Villacorte et al., 2015). Comme les polysaccharides ne possèdent pas d'azote, ils pourraient augmenter artificiellement le rapport C/N de la fraction des BP.

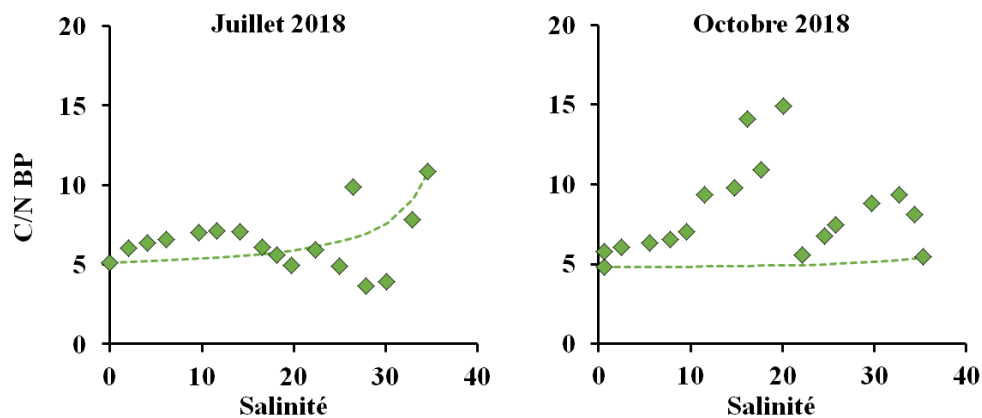


Figure IV.19 : Evolution du rapport C/N des BP dans l'estuaire de l'Aulne pour les campagnes de Juillet et Octobre 2018. Les mélanges théoriques sont tracés en pointillés

Afin d'étudier la composition de la fraction BP, les spectres d'émission de fluorescence des BP pour les campagnes de Janvier, Avril, Juillet et Octobre 2018 sont représentés sur la figure IV-20. Seule la bande des composés protéiques de type tryptophane (B/δ) est détectable dans ces échantillons. Le fait que seule cette bande fluoresce soit présente ne signifie pas que les composés de type polysaccharides soient absents, puisque ces derniers ne possèdent pas de propriétés de fluorescence. La bande de fluorescence du tryptophane ne présente pas les mêmes intensités maximales aux mêmes salinités pour chaque saison. En hiver, elle est particulièrement importante en milieu marin ($S > 30$) avec des intensités > 150 A.U. Au printemps, la grande majorité des échantillons présentent une B/δ avec des valeurs d'intensités maximales comprises entre 100 et 250 A.U. En été, seule la salinité 0 présente une fluorescence de type tryptophane où l'intensité est la plus élevée du jeu de donnée avec 400 A.U. Enfin, en automne, les échantillons présentent une intensité maximale de la bande B/δ des mêmes ordres de grandeur que durant le printemps, sauf pour deux échantillons à salinités 4 et 6 qui sont de 350-400 A.U.

Fluorescence du tryptophane et développement phytoplanctonique ont précédemment été mis en relation dans la littérature (Determann et al., 1998; Urban-Rich et al., 2006; Villacorte et al., 2015). Il a été proposé que les composés à l'origine de cette fluorescence puissent être réutilisés par les bactéries pour la production de métabolites plus complexes et réfractaires (Lechtenfeld et al., 2015; Goto et al., 2017; Osburn et al., 2019). Ainsi, ces résultats de fluorescence suggèrent que l'activité phytoplanctonique influence la composition de la fraction BP.

En été, un développement de microalgues fluviales peut avoir lieu en amont du front halin (Marie, 2016). La MOP produite peut alors être exportée vers l'estuaire où elle est retenue par le point nodal estuarien dans la MTZ (Abril et al., 1999). Les rapports Chla/phaeo calculées par Marie (2016) en été indiquent que la MOP phytoplanctonique est plutôt dégradée dès le début de l'été (figure II.2). Une dégradation de cellules phytoplanctoniques fluviales par des bactéries hétérotrophes de la MTZ pourrait expliquer la très forte fluorescence du tryptophane à salinité 0 durant l'été 2018.

En automne, un bloom phytoplanctonique tardif peut avoir lieu dans la deuxième moitié de l'estuaire (Marie et al., 2017) et pourrait expliquer une fluorescence de type tryptophane aussi importante qu'au printemps.

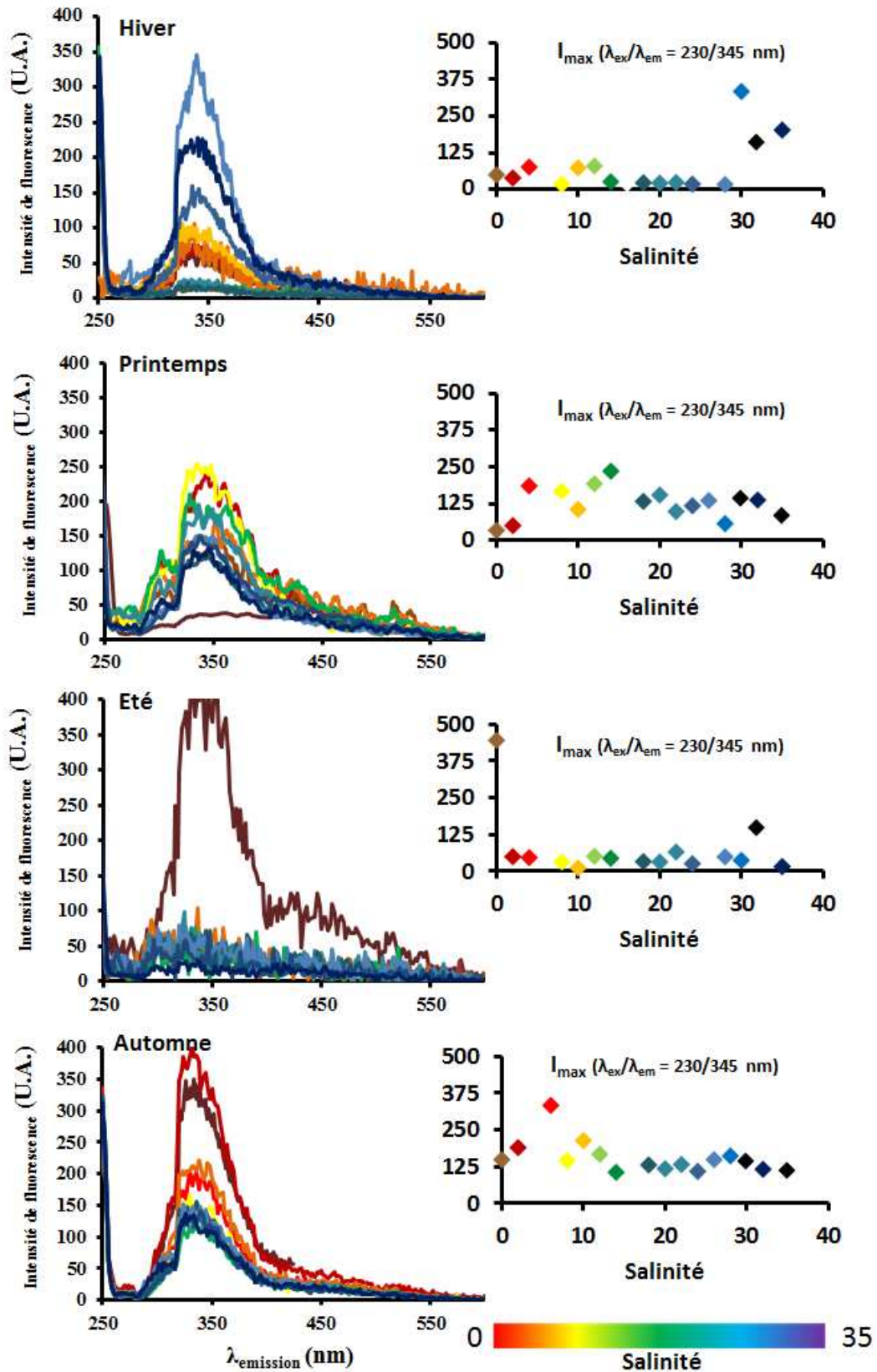


Figure IV.20 : Spectres d'émission à 230nm d'excitation pour la fraction des BP et évolution de l'intensité maximale du pic à 345nm en fonction des concentrations en carbone. (Hiver : Janvier 2018 ; Printemps : Avril 2018 ; Ete :Juillet 2018 ; Automne : Octobre 2018)

En hiver, la fluorescence des composés protéiques de type tryptophane observée dans la rade de Brest pourrait être liée à une remise en suspension des sédiments marins, riches en composés fluorescents de type tryptophane (Sierra et al., 2005) ou en acides aminés (Burdige et Komada, 2015), au cours des tempêtes hivernales. Cette dernière hypothèse peut être évoquée pour la campagne d'Octobre 2018 (Automne) qui s'est opérée après une période de vives eaux.

IV.4.3.2. Fraction des SH

En milieu marin, les SH présentent une aromaticité et un rapport C/N plus faibles que ce qui est observé en amont de l'estuaire (Figure IV-18). Ces différences peuvent s'expliquer par la production ou l'altération de ses formes par des processus biotiques et abiotiques (photoblanchiment). A l'aide d'analyses de fluorescence nous allons tenter de définir si cette altération des propriétés initiales s'effectue dans une zone clef de l'estuaire.

La figure IV.21 présente les spectres d'émission des SH pour les campagnes de Janvier, Avril, Juillet et Octobre 2018. Sur les spectres d'émission, deux bandes de fluorescence sont identifiables : la bande B/ δ ($\lambda_{em}=345nm$) associée aux composés protéiques de type tryptophane, et la bande A/ α ($\lambda_{em}=430nm$) attribué aux substances humiques de type acides fulviques. L'évolution de l'intensité maximale de la bande A/ α en fonction des concentrations en SH en $\mu gC.L^{-1}$ est également indiquée sur la figure IV.20. Cette intensité maximale évolue de manière linéaire avec les concentrations sauf à l'automne 2018 où le diagramme de mélange des concentrations en SH présente une anomalie positive en amont de l'estuaire (Fig. IV.8). A l'inverse, l'intensité maximale de fluorescence de la bande B/ δ n'est pas proportionnelle avec la concentration en carbone de la fraction des SH (données non présentées).

La présence d'une fluorescence de la bande B/ δ dans la fraction SH est inattendue. En effet, les composés à l'origine de cette fluorescence devraient éluer dans d'autres fractions de taille (protéines dans les BP et acides aminés dans les LMWN – Huber et al., 2011). La présence de composés protéiques dans la plupart des analyses, indiquent la présence d'une MOD « fraîche » dans les échantillons de SH. En effet, le fluorophore B/ δ est considéré comme un proxy de la MOD fraîchement produite *in situ* par le phytoplancton (Myklestad, 2000; Asmala et al., 2018; Wünsch et al., 2018). L'incorporation d'acides aminés, comme le tryptophane, dans les structures des SH a été proposé comme un mécanisme plausible pour expliquer la fluorescence de la bande B/ δ dans les échantillons dominés par les SH (Rosensotck et al., 2005 ; Romera-Castillo et al., 2014). En effet, les SH peuvent être considérés comme des assemblages

supramoléculaires de composés de petits poids moléculaires, dont les acides aminés feraient partie (Piccolo, 2001; Wu et al., 2017), pouvant fluorescer à des longueurs d'onde plus importantes de l'ordre de celles attribuées au fluorophore A/α (Koch et al., 2014 ; Fiore et al., 2015).

La présence simultanée du fluorophore de type tryptophane et du fluorophore de type SH peut aussi indiquer une activité bactérienne (Fellman et al., 2010; Wünsch et al., 2019)). La bande de fluorescence A/α est en effet de plus en plus utilisée comme descripteur de la MOD produite lors de la dégradation de la biomasse phytoplanctonique (Lechtenfeld et al., 2015; Simon et al., 2018; D'Andrilli et al., 2019; Osburn et al., 2019). La bande A/α a, initialement, été décrite comme traceur des apports terrigènes (Coble, 1996 ; Parlanti et al., 2000) mais la présence de ce fluorophore dans une grande variété d'environnements semble peu sélective de ces apports allochtones bien qu'elle soit plus intense dans les milieux sous forte influence terrigène (Wünsch et al., 2018, 2019).

Dans notre étude, la fluorescence de type tryptophane dans les SH est > 50 A.U. dans les trois saisons « productives » (Avril, Juillet et Octobre 2018). Les rapports C/N de la MOP (figure IV.3) compris entre 8 et 6 à ces mêmes saisons indiquent une influence significative de l'activité autotrophe dans l'estuaire de l'Aulne, ou peut-être de l'influence de l'activité hétérotrophe sur le système (Savoie et al., 2003). Les résultats indiquent qu'une partie de la fraction des SH semble être produite *in situ* dès le milieu de l'estuaire, à l'exception de la période hivernale.

Ainsi, le développement phytoplanctonique au sein de l'estuaire, visible en partie *via* les rapports C/N plutôt bas de la MOP (Savoie et al., 2004) peut aussi être tracé par les rapports C/N des BP ainsi que par la fluorescence du tryptophane des BP et des SH. Néanmoins, en période de vives eaux et particulièrement en hiver, en dehors de la période productive, ces paramètres ne sont plus valables et pourraient servir d'indicateur d'apports originaires du compartiment sédimentaire.

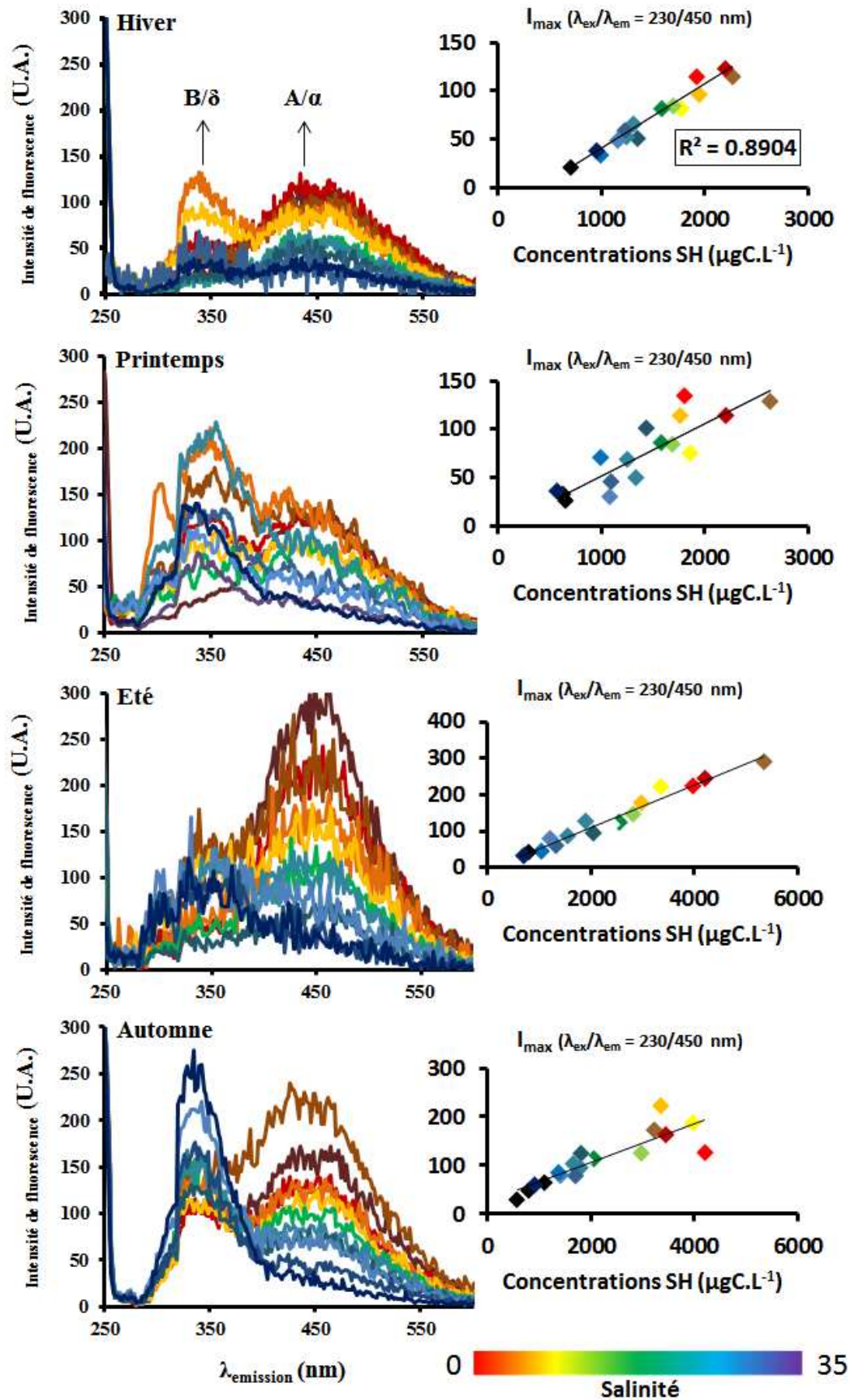


Figure IV.21 : Spectres d'émission à 230nm d'excitation pour la fraction des SH et évolution de l'intensité maximale du pic à 450nm en fonction des concentrations en carbone. (Hiver : Janvier 2018 ; Printemps : Avril 2018 ; Ete :Juillet 2018 ; Automne : Octobre 2018)

IV.4.4. Anomalies en COD par rapport au mélange théorique : rôle de la MTZ

Les diagrammes de mélange du COD (fig. IV.4 – cf. p10) illustrent des anomalies de concentrations par rapport aux mélanges conservatifs. La plupart de ces anomalies sont négatives sauf celle d'Octobre 2018 qui est positive. Sur les diagrammes de mélange des fractions séparées par chromatographie d'exclusion stérique (figures IV.8 à IV.13), des anomalies sont relevées aux mêmes salinités.

IV.4.4.1. Anomalies de concentrations du COD et des différentes fractions de taille

La figure IV.22 présente les pourcentages des anomalies aux droites de mélange théoriques du COD et des fractions de tailles pour chaque campagne. Ces sommes ont été calculées sur la base des anomalies en COD, visibles sur la figure IV.4. L'ensemble des diagrammes de mélange montrent une anomalie dans les concentrations en début d'estuaire. Cette anomalie est cantonnée jusqu'à des salinités relativement faibles dans les cas des mois de Juin 2017, Avril et Octobre 2018. Pour les autres campagnes, les différences avec le mélange théorique peuvent se prolonger jusqu'à des salinités élevées, comprises entre 24 et 35. Sur la base de ces observations, la somme cumulée des anomalies en COD et en fractions de taille par rapport aux mélanges théoriques ont été superposées sur la figure IV.21. Cette disposition permet, d'une part, de se rendre compte de la part de chaque fraction dans l'anomalie globale de COD et, d'autre part, de visualiser si certaines anomalies de COD sont minorées par certaines des fractions, comme cela est le cas pour les campagnes d'Avril et d'Octobre 2018, par exemple.

Les pourcentages d'anomalies en COD sont compris entre $-24,0$ et $+10,3$ %. Les anomalies négatives sont comprises entre $-3,1$ et $-24,0$ %. Le déficit minimum est enregistré pour la campagne d'Avril 2018 le déficit maximum est lui enregistré en Novembre 2018.

Pour les fractions de taille, des anomalies positives ou négatives par rapport à leurs mélanges théoriques sont relevées quelle que soit la saison. Le pourcentage d'anomalie des SH est compris entre $-9,8$ et $+13,2$ % ; celui du COH est compris entre $-12,2$ et $+5,7$ % ; celui des LMWN est comprise entre $-4,0$ et $-0,7$ % ; celui des BB est comprise entre $-4,2$ et $-1,3$ % ; celui

des BP est comprise entre -2,1 et -0,6 % ; et enfin, le pourcentage d'anomalie des LMWA est comprise entre -1,1 et 0 % .

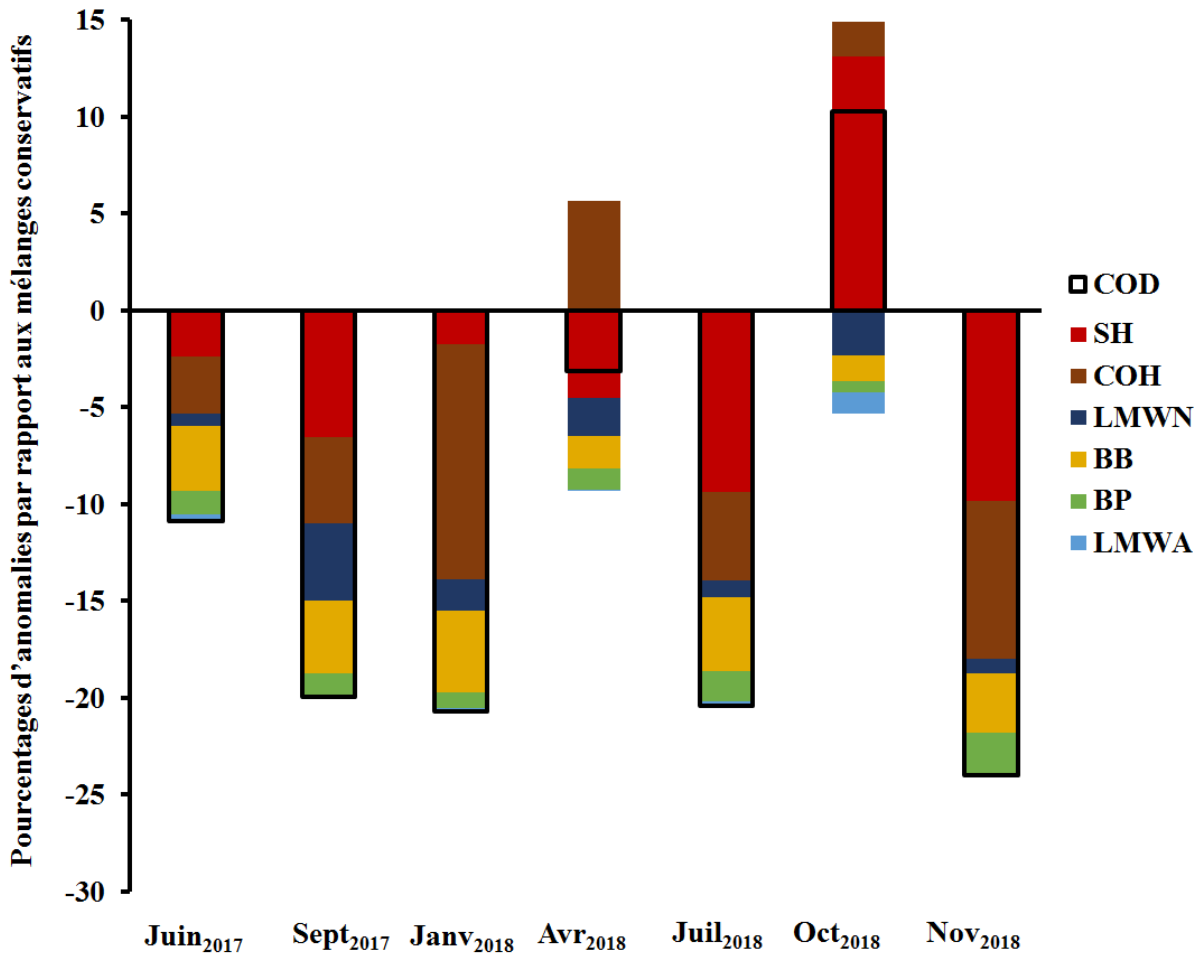


Figure IV.22 : Pourcentages d'anomalies aux mélanges conservatifs des concentrations en COD et de chaque fraction de taille pour chaque campagne de prélèvement.

Les écarts par rapport aux mélanges théoriques mesurés avec le COD sont minorés par certaines fractions pour les mois d'Avril et Octobre 2018. Dans l'ensemble des campagnes, seule la fraction des SH suit systématiquement le même comportement que le COD. Bien que la fraction des SH soit le constituant majeur du COD dans l'estuaire de l'Aulne, la variabilité de ses concentrations n'est pas suffisante pour expliquer les anomalies en COD. En effet, les pourcentages de participation au déficit global varie fortement et est compris entre 21 et 145%. Les pourcentages de participation de chaque fraction dans les anomalies en COD sont détaillés dans le tableau IV-4.

Ces résultats font apparaître clairement le problème d'analyse que constitue la mesure unique du COD. Pour les mois d'Avril et Octobre 2018, des valeurs opposées dans les anomalies de concentrations des fractions minorent le déficit ou le gain enregistré par le COD,

camouflant presque en Avril les mélanges non-conservatifs spécifiques. Pour les quatre autres campagnes, le COD mesure bien un déficit enregistré par l'ensemble des fractions. Néanmoins, ce propos doit être nuancé puisque la valeur du déficit de chaque fraction n'est pas répétable d'une campagne à une autre et n'est pas représentatif du déficit propre à chaque famille de composés. L'analyse semi-spécifique de la MOD permet de résoudre cette apparente simplification qu'apporte la mesure du COD.

Tableau IV-4 : Participation de chaque fraction dans les anomalies en COD (en %)

Participation des fractions aux anomalies en COD	Jun 2017	Septembre 2017	Janvier 2018	Avril 2018	Juillet 2018	Octobre 2018	Novembre 2018
SH	21	33	8	145	46	129	41
COH	27	22	59	-183	22	23	34
LMWN	6	20	8	62	4	-22	3
BB	31	19	20	54	19	-13	13
BP	11	6	4	34	8	-6	9
LMWA	3	0	1	0	1	-11	0

IV.4.4.2. Rôle de la zone de turbidité maximale

Les mesures de COP permettent d'identifier une zone de turbidité maximale (MTZ), ou bouchon vaseux, au début de la zone de mélange eau douce – eau de mer (figure IV.2). Les concentrations en COP dans la MTZ sont plus importantes que dans le reste de l'estuaire. Ceci est particulièrement accentué en Juillet et Octobre 2018 où les valeurs peuvent être deux à trois fois plus importantes que le reste de l'année. La MTZ est située aux mêmes salinités que la plupart des anomalies relevées dans les diagrammes de mélange des fractions de taille. Des anomalies négatives sont relevées dans la plupart des cas (voir figure IV.8-13).

En plus de la dilution mutuelle entre des eaux fluviales riches en carbone et des eaux marines pauvres en carbone, la floculation des composés terrigènes de hauts poids moléculaires peut expliquer une partie des déficit à la droite de dilution théorique observés lors du mélange estuarien du COD (De Souza Sierra et al., 1997).

L'adsorption sur des particules minérales comme les hydroxydes de fer ((Preston et Riley, 1982; Uher et al., 2001) ou la floculation des composés de type substances humiques, telles les fractions SH et BB, a été observée à plusieurs reprises en amont des estuaires dès l'augmentation de la force ionique (Sholkovitz, 1976; Abril et al., 2002; Leenheer, Jerry et Croué, 2003; Huguet et al., 2009; Eero Asmala et al., 2014). Ce puits de SH avait déjà été relevée dans l'estuaire de l'Aulne dans une précédente étude (Marie et al., 2017). De la même manière, en considérant que la fraction du COH soit principalement constituée de substances humiques particulièrement hydrophobes, la disparition rapide du COH dans la première partie du mélange estuarien (figure IV.13) pourrait être expliquée par ce même processus de floculation (voir paragraphe IV.4.1.2).

Les anomalies négatives relevées en amont de l'estuaire pour la fraction des BP peuvent quant à elles s'expliquer par un processus biologique. A l'inverse des SH qui présentent un rapport C/N > 20 (Hedges et al., 1997) en amont de l'estuaire, le rapport C/N des BP est compris entre 5 et 6 aux mêmes salinités. Les BP semblent être plus labiles par rapport aux SH. Ainsi, l'anomalie négative des concentrations en BP en début de mélange estuarien pourrait être expliquée par la consommation bactérienne de cette fraction (Thibault et al., 2019). En effet, la MTZ est une zone où l'activité bactérienne est intense (Crump et al., 1998; Goosen et al., 1999; Herman et Heip, 1999; Turbidity et al., 1999; Garnier et al., 2010). Cette reminéralisation de matière est favorisée par le temps de séjour particulièrement important dans cette zone de l'estuaire (Abril et al., 1999).

IV.4.4.3. Anomalie positive d'Octobre 2018

Le cas de la campagne du mois d'Octobre 2018 est particulier. En effet, alors que les autres campagnes présentent des anomalies de COD négatives par rapport aux mélanges théoriques, celle-ci montre une anomalie positive. Cette anomalie positive est principalement liée à un apport de SH et du COH en début de mélange mais elle est cependant minorée par les anomalies négatives des autres fractions (voir figure IV.21).

Une production de SH dans la MTZ a déjà été observée dans d'autres études estuariennes dont une portant sur l'Aulne (Asmala et al., 2014 ; Marie et al., 2017). La diminution du rapport C/N des SH (figure IV.17) aux mêmes salinités suggèrent une augmentation des fonctions azotées et donc un caractère plus labile de ces SH en excès, et donc

potentiellement une origine biologique de cette source (Lechtenfeld et al., 2015) Néanmoins, l'augmentation simultanée de l'Arm-SH (figure IV.15) et du poids moléculaire moyen des SH, qui passe de 600 (S0) à 800 Da (S2 – S6) avant de décroître à 600Da (S10) démontre une transformation vers des SH qui paraissent plus terrigènes qu'à salinité 0.

La campagne d'Octobre 2018 a été effectuée après une période de vives eaux au cours de laquelle la remobilisation du sédiment a pu être importante. La remise en suspension de sédiments dans des conditions de faibles débits pourrait rendre le milieu déficitaire en oxygène (Abril et al., 1999) et être à l'origine d'une désorption des composés organiques des particules (Keil et al., 1994). Les SH désorbées du sédiment présentent une aromaticité plus grande ((Thorn et al., 1989) et un rapport C/N plus faible que celles exportées des sols (Zhang et al., 2016). Les analyses de fluorescence des SH en cette saison (Figure IV.22) ne présentent pas une fluorescence particulièrement importante du tryptophane néanmoins, les analyses de fluorescence des BP (figure IV.21) montrent une fluorescence des composés protéiques de type tryptophane particulièrement importante aux salinités 4 et 6, c'est-à-dire au milieu de la MTZ. L'apport d'origine sédimentaire pourrait être à l'origine de cette fluorescence (Sierra et al., 2005) puisque les sédiments sont riches en composés protéiques et/ou en acides aminés (Kalbitz et al., 2004; Burdige et Komada, 2015). La sénescence des bactéries aérobies, dans le cas où le milieu deviendrait anoxique, peut conduire à une libération de composés intracellulaires responsables de cette fluorescence de la bande B/ δ dans les BP (Abril et al., 1999 ; Dittmar et Kattner, 2003).

IV.4.5. Quantification par la fluorescence

Sur les figures IV.24 et IV.25, les concentrations des fractions SH ou BP déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sont comparées aux concentrations estimées par fluorescence à l'aide d'un standard pour chaque saison étudiée.

La quantification de la MOD par fluorescence a été proposée comme une technique simple, efficace et particulièrement sensible (Lanciné et al., 2009; Bridgeman et al., 2011). Néanmoins des interférences dans la mesure de l'intensité maximale des composés protéiques ont remis en doute cette méthode de mesure du COD (Wang et al., 2015).

Dans notre étude, la séparation entre les fractions SH et BP permet de bien séparer les composés fluorescents de type SH (bande A/ α) contenus dans la fraction SH, des composés

fluorescents de type tryptophane (bande B/ δ) principalement contenus dans la fraction BP. Dans le cas de la fraction des SH, les concentrations déterminées à partir de la bande A/ α suivent le même comportement de mélange que celles déterminées par SEC (figure IV.23). Cependant, elles sont plus faibles. La fluorescence de la bande B/ δ ne permet pas d'expliquer plus de 100 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ et reflète la pauvreté du contenu de type acide aminé ou protéine piégé dans la fraction SH. Pour ce qui est de la fraction des BP, les concentrations déterminées par fluorescence ne reflètent pas le comportement de mélange de celles déterminées par SEC sauf entre les salinités 10 et 35 au printemps 2018. Le reste des échantillons présentent des concentrations sous-estimées (50 – 60 %) par rapport à celles obtenues par SEC, sauf dans la partie marine de l'estuaire en hiver.

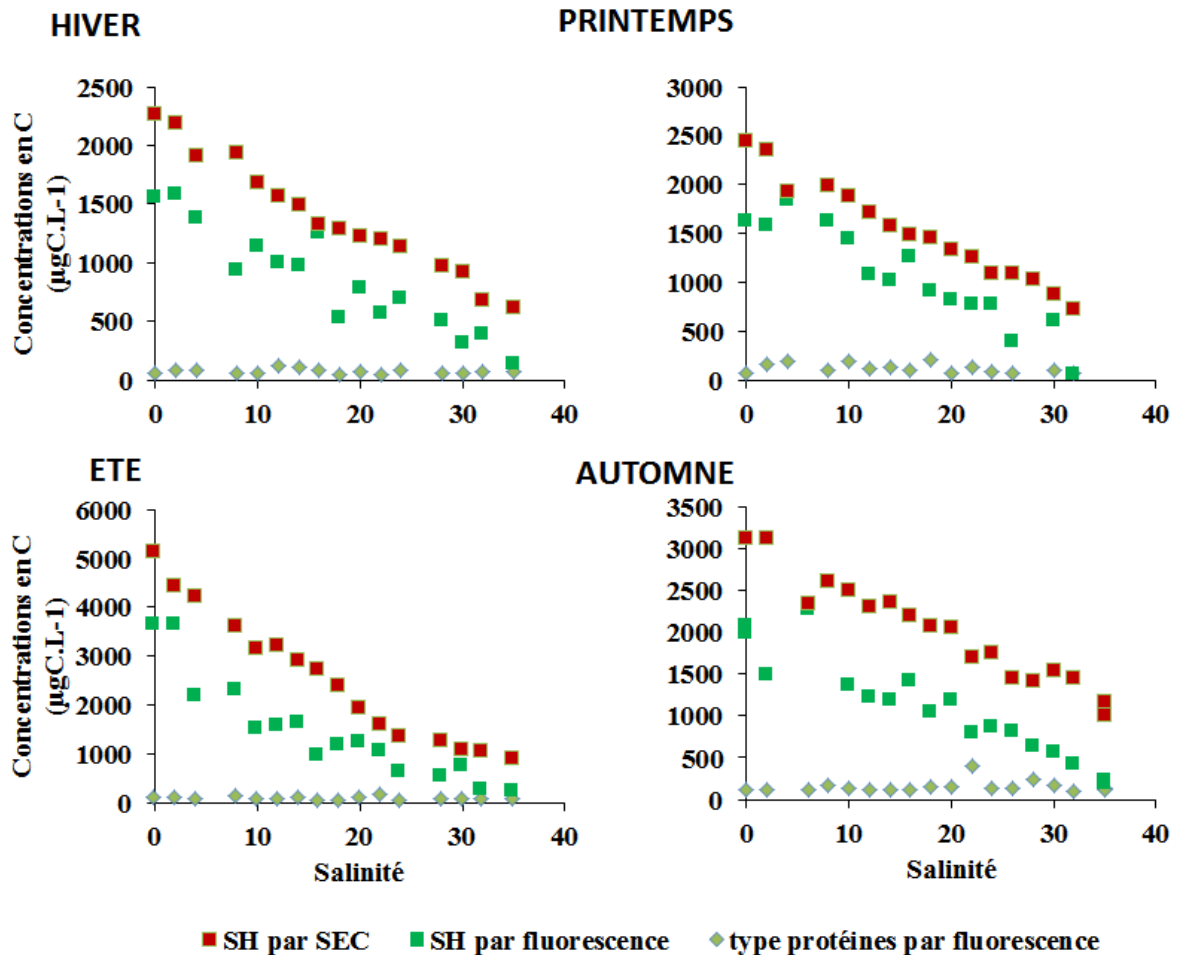


Figure IV.23 : Comparaison entre les concentrations en SH déterminées par SEC-mDEC et les concentrations en SH obtenues à partir des signaux de fluorescence en vert et bleu

Les structures typiques des SH ne fluorescent pas qu'à la bande A/ α , elles peuvent fluorescer aux bandes C/ α' et M/ β qui correspondent respectivement aux SH de type acides humiques et aux SH d'origine marine ou autochtones au milieu aquatique (Coble et al., 1996, 2007 ; Parlanti et al., 2000 ; Huguet et al., 2009). Dans notre étude, l'effet de dilution induit par le processus d'extraction des fractions ne permet pas d'observer la fluorescence de ces composés et de vérifier la fluorescence multiple des SH comme cela peut être le cas sur certaines matrices d'échantillons de salinité 0 bruts. De plus, les propriétés moléculaires des SH changent le long du gradient halin (figures IV.16-17-18). Il est donc fortement probable que les propriétés de fluorescence des SH changent également et que le standard utilisé pour l'étalonnage de la concentration (*Suwanee River Fulvic Acid* : un acide fulvique terrigène (Huber et al., 2011) ne soit pas le meilleur pour les salinités les plus élevées. Le standard *Pony Lake Fulvic Acid* pourrait être un meilleur candidat du fait qu'il puisse être qualifié d'aquagénique (Mangal et al., 2016).

Sur la figure IV.24, les concentrations en BP déterminées par fluorescence sont le plus souvent sous-estimées par rapport aux concentrations déterminées par SEC (50 – 70 %). Néanmoins, les BP sont aussi constitués de polysaccharides (Huber et al., 2011) qui ne présentent pas de propriétés de fluorescence (Coble et al., 1996). Cette sous-estimation apparente de la fraction BP par la fluorescence peut alors être interprétée comme à la présence d'une fraction importante de polysaccharides dans les BP .

Cependant, au printemps fluorescence et SEC donnent des estimations proches. Ce résultat semble indiquer que les BP sont essentiellement composés de protéines entre 10 et 35 de salinités lors de la campagne d'Avril 2018. Une activité phytoplanctonique dans l'estuaire avait été observée à cette période de l'année en 2014 (Marie, 2016) avec des concentrations d'environ $5\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figure II.2a). La présence d'un bloom phytoplanctonique dans la rade de Brest à cette saison pourrait expliquer la présence de cette fluorescence aux salinités les plus élevées.

Durant la campagne d'hiver 2018, les concentrations déterminées par fluorescence sont surestimées par rapport à celles mesurées par SEC dans la partie marine du gradient de salinité. Cette particularité pourrait mettre en évidence un défaut de standard permettant le dosage par fluorescence. En effet, la BSA (albumine de sérum bovin) utilisée dans notre étude n'est pas une protéine représentative de celles présentes dans le milieu naturel. En fonction de la complexité des protéines contenues dans les eaux estuariennes, la mesure de fluorescence peut

être sous-estimée ou surestimée de par la différence entre les rendements quantiques des substances.

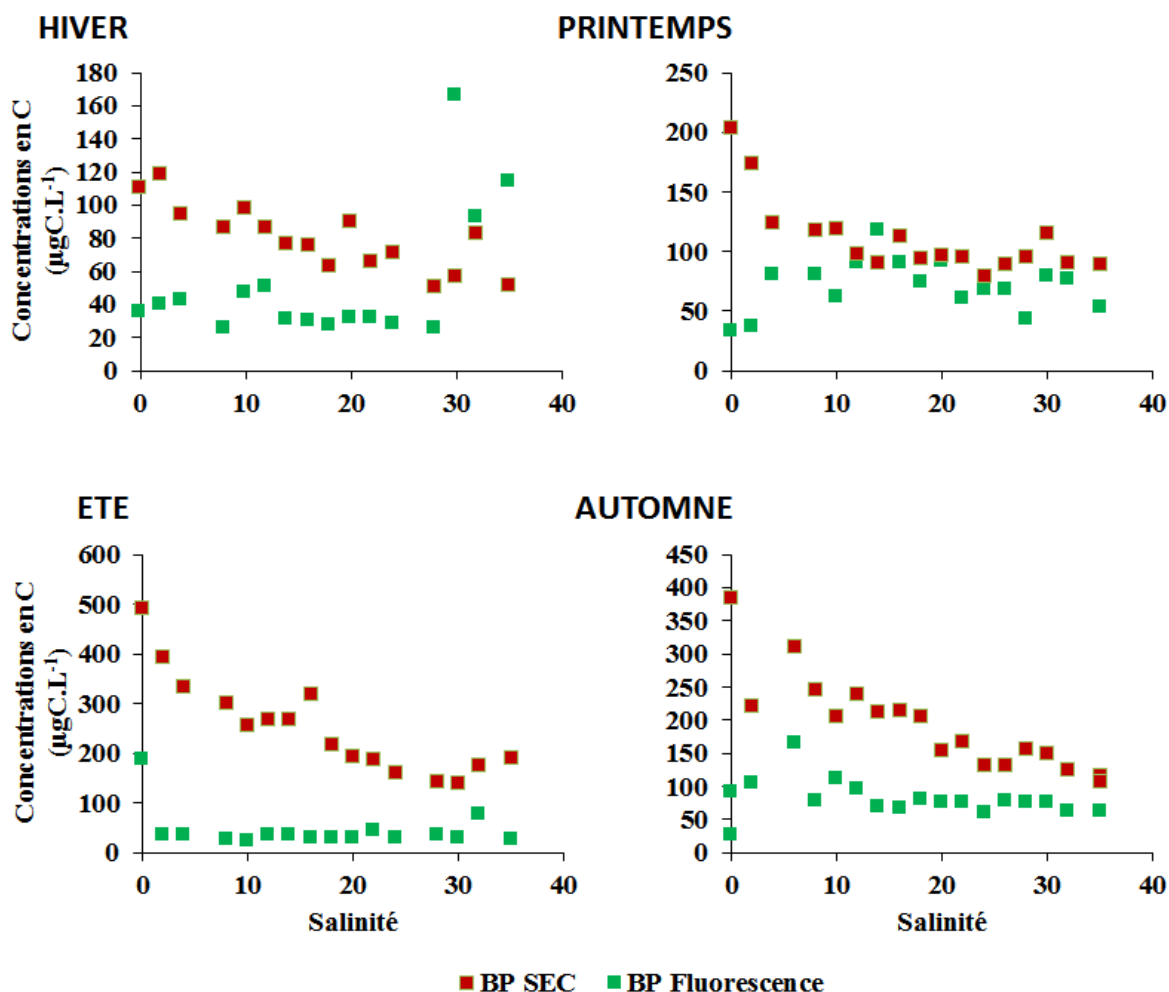


Figure IV.24 : Comparaison des concentrations des BP obtenues par chromatographie d'exclusion stérique avec celles obtenues par fluorescence.

La quantification par fluorescence laisse entrevoir des aspects intéressants dans la caractérisation plus fine des fractions SH et BP. Elle semble permettre la détermination des pourcentages de chaque fluorophore, ou type de structures rattachés (par exemple : SH plus ou moins complexes de type A, C ou M), dans les fractions. Connaître ces pourcentages pourrait aider à la compréhension du mélange estuarien.

IV.5. Conclusion

Les paramètres hydrologiques et l'étude de la MOP ont permis de définir deux grandes périodes hydrologiques dans l'estuaire de l'Aulne : l'étiage d'Avril à Octobre et la crue de Novembre à Mars. L'activité phytoplanctonique s'y déroule principalement sur la période d'étiage et influence fortement la nature de la MOP. Une zone de turbidité maximale a été localisée en amont de l'estuaire ($S < 10$) et est caractérisée par des concentrations particulièrement importantes en COP lors des campagnes de Juillet et d'Octobre 2018.

L'analyse semi-spécifique de la MOD réalisée à l'aide d'une technique chromatographique d'exclusion stérique à multi-détection ainsi que par fluorescence 3D a permis de quantifier et de caractériser six fractions de tailles différentes à l'intérieur du COD. La compréhension du cycle biogéochimique estuarien de la MOD a été rendue possible en étudiant la dynamique des mélanges des différentes fractions de taille le long du continuum terre-mer. L'identification de processus régissant son cycle a été rendue possible par l'analyse de paramètres spécifiques comme les rapports C/N, l'aromaticité des SH, la fluorescence spécifique de la MOD et les indices de fluorescence. L'ensemble des caractéristiques de la MOD et des processus régissant son cycle identifiés dans cette étude sont présentés au sein d'un schéma conceptuel (figure IV.25).

Les concentrations de carbone plus importantes à salinité 0 que dans la partie marine de l'estuaire ont permis de déterminer que la rivière était la principale source de MOD dans l'estuaire. Cette étude montre que la MOD fluviale est composée par une fraction allochtone, majoritaire mais aussi par une contribution autochtone, minoritaire. La fraction allochtone est principalement composée de substances fulviques pédogéniques et de composés particulièrement hydrophobes retenus par l'appareillage. Cette fraction allochtone semble être apportée à la rivière par lessivage des sols du bassin versant à fort caractère agricole. La fraction autochtone est principalement retrouvée sous forme de molécules de haut poids moléculaires (BP) ou de toutes petites molécules non chargées (LMWN). Cette fraction semble être produite par la dégradation du phytoplancton fluvial. Au début de la crue, au mois de Novembre, les concentrations des différentes fractions de taille atteignent leurs maxima, surlignant l'importance de l'effet de purge des premières pluies de l'automne sur l'ensemble de la MOD. La MOD d'origine fluviale a pu être distinguée de la MOD d'origine marine (dans la fraction des SH) de par son aromaticité et son rapport C/N élevé ainsi que par ses indices de fluorescence

(HIX et BIX) spécifiques. Les SH d'origine fluviale sont aromatiques, riches en carbone et peuvent être qualifiées de terrigènes et d'allochtones par les analyses de fluorescence ; tandis que les SH d'origine marine sont plutôt aliphatiques, plus riches en azote et sont principalement autochtone et/ou d'origine microbienne. Ainsi, la MOD terrigène et réfractaire de l'amont de l'estuaire est altérée chimiquement ou piégée dans l'estuaire par floculation au cours de son transport le long du gradient de salinité, devenant plus labile et aliphatique dans la partie marine de l'estuaire de l'Aulne, c'est-à-dire la rade de Brest. Il ne persiste rien de leur caractère terrigène à salinité 35.

Cette étude a aussi permis de mettre en évidence deux processus environnementaux liés à l'activité microbologique influençant la composition et la distribution de la MOD. Entre Avril et Octobre 2018, la MOP estuarienne avait une origine phytoplanctonique ($6 < C/N < 8$). En parallèle, une forte signature de fluorescence de type tryptophane a été mesurée dans les fractions SH et BP. Cette signature spécifique au matériel protéique indique que la fraction autochtone de la MOD estuarienne est issue de la dégradation de la biomasse phytoplanctonique par les bactéries hétérotrophes. Par ailleurs, au sein de la zone du maximum de turbidité (identifiée par les maxima en COP) des anomalies négatives par rapport aux diagrammes de mélange théoriques dans les fractions labiles des BP et des LMWN ont été identifiées. Ces anomalies suggèrent une utilisation accrue de la MOD par les bactéries hétérotrophes dans cette zone. Cette dernière, située en début de mélange, est aussi le lieu principal de la floculation de la MOD réfractaire (SH, BB et COH).

Les anomalies positives en COD du diagramme de mélange d'Octobre 2018 et la fluorescence du tryptophane particulièrement intense dans la MTZ à cette saison, pourraient être expliquées par la libération de MOD depuis les eaux interstitielles vers la colonne d'eau dans la partie amont de l'estuaire. Cet intense apport serait lui-même le résultat d'une intense remise en suspension des sédiments estuariens lors de la période de vives eaux précédant l'échantillonnage.

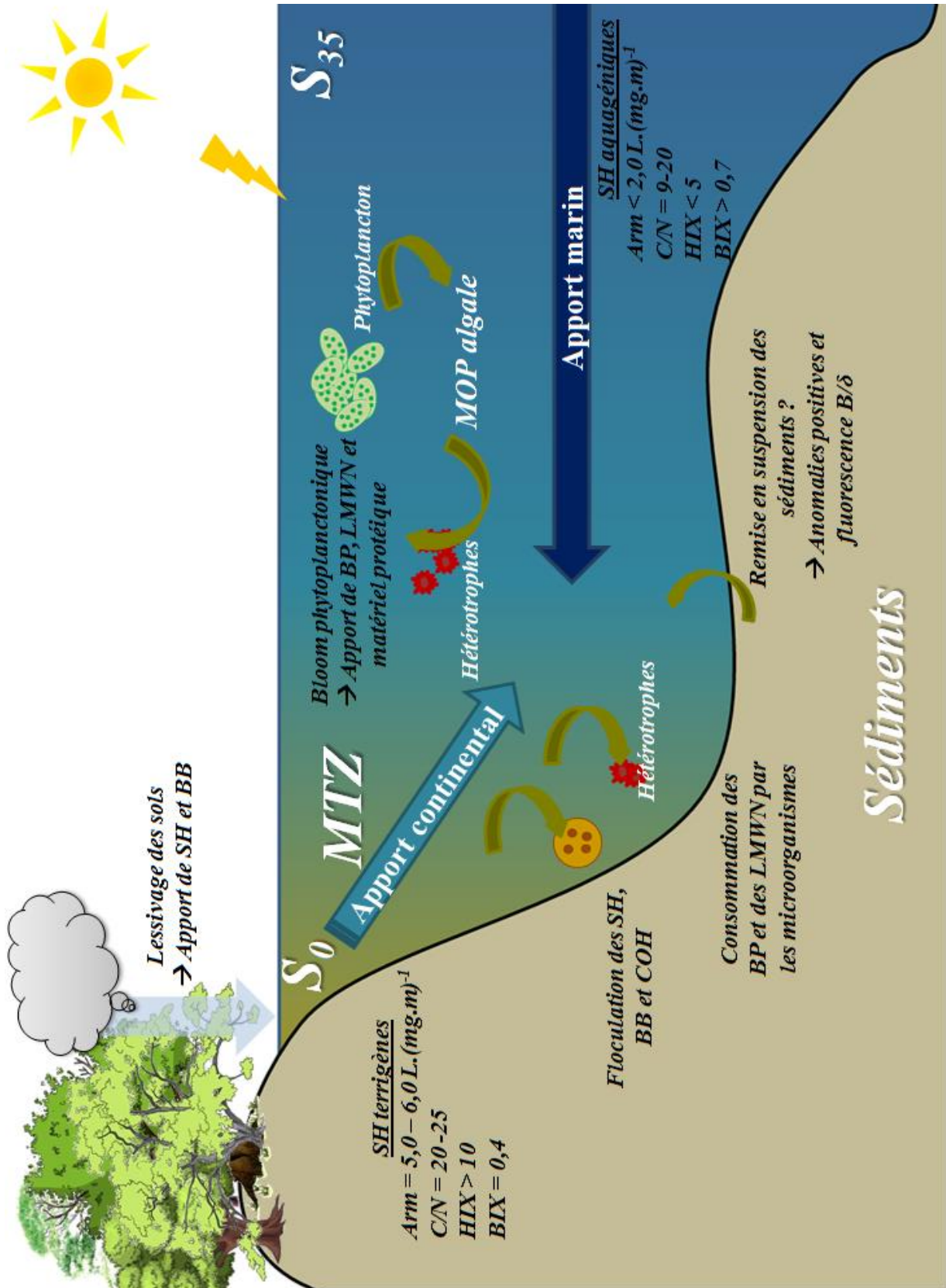


Figure IV.25 : Schéma global des processus potentiellement identifiables sur la base de nos données.

**Chapitre V – Dynamique de
la matière organique
dissoute en milieu côtier :
cas de la rade de Brest**

V.1. Introduction

Les microalgues produisent de la MOD dans les eaux de surface (Anderson et al., 2002; Qu et al., 2012). Environ 12% de la matière organique produite par le phytoplancton est excrétée directement dans le milieu aquatique sous la forme de MOD (Baines et Pace, 1991). Cette MOD extracellulaire représente une source importante dans les eaux de surface (Baltar et al., 2009).

A l'inverse de la MOD allochtone qui est composée majoritairement de structures plutôt aromatiques comme les substances humiques (McKnight et al., 2001; Martone et al., 2009), la MOD produite lors des blooms phytoplanctoniques est essentiellement aliphatique (Mash et al., 2004; Zhou et al., 2014). Ces substances organiques aquagéniques peuvent être regroupées dans quelques familles de composés majeures : les polysaccharides, les protéines, les lipides ou les acides nucléiques (Mannino et Harvey, 1999; Mykkestad, 2000; Granum et al., 2002; Villacorte et al., 2013, 2015). Ils sont constitutifs des membranes cellulaires (Lee et al., 2006), forment des mucilages (Verdugo, 2011), interviennent dans le métabolisme des microorganismes (Kujawinski, 2011) ou constituent des réservoirs d'énergie (Amo et al., 2010).

En fonction de l'évènement responsable de sa libération dans les eaux de surface, la nature de la MOD algale extracellulaire change. Par exemple, les polysaccharides semblent être excrétés lors de la phase exponentielle de croissance du phytoplancton (Villacorte et al., 2015; Han et al., 2016) tandis que l'enrichissement en protéines se déroulerait durant la phase stationnaire (Pivokonsky et al., 2006; Villacorte et al., 2015). En revanche, les stérols seraient libérés dans le milieu lors de lyse cellulaire (Amo et al., 2010).

Les composés biodisponibles excrétés par le phytoplancton servent de source d'énergie aux microorganismes bactériens (Cooper et Smith, 2015; Gong et al., 2017). Le bloom phytoplanctonique entraîne dans son sillage l'augmentation de l'assimilation du carbone organique par les bactéries (Riata-Kanto et al., 2012). Les protéines, par exemple, constituent une importante source d'azote pour ces microorganismes (Amon et Benner, 1996; Feng et al., 2019). L'interaction entre les bactéries et les composés de haut poids moléculaires est très rapide, de l'ordre de quelques minutes seulement (Reintjes et al., 2017). L'hydrolyse des composés biodisponibles par des enzymes extracellulaires spécifiques aux groupes chimiques ciblés est nécessaire à l'assimilation de la MOD algale par les bactéries (Arnosti et al., 2011, 2018).

Ainsi, la MOD extracellulaire présente tout un continuum de taille et de réactivité (Amon et Benner, 1996; Benner et Amon, 2015; Walker et al., 2016).

La MOD extracellulaire algale est constituée principalement de structures de haut poids moléculaire comme les biopolymères (BP). Dans deux études utilisant la chromatographie d'exclusion stérique à multi-détection, Villacorte et al. (2015) et Rehman et al. (2017) précisent que plus de 50% de la MOD excrétée lors du développement de microalgues cultivées en laboratoire peuvent être attribués à la fraction des BP. Le reste apparaît comme des composés réfractaires de petits poids moléculaires (LMWN) ou de type substances humiques (SH et BB). Néanmoins, d'autres expérimentations conduites sur d'autres espèces de microalgues affirment que presque 80% de la MOD excrétée est constituée de composés de petits poids moléculaires (Nguyen et al., 2005 ; Henderson et al., 2008). Cette apparente contradiction met en évidence la diversité des causes de libération de la MOD extracellulaire dans le milieu aquatique. La MOD algale peut se retrouver dans les eaux de surface selon trois voies : (i) l'excrétion directe en réponse aux stress environnementaux, (ii) la dégradation bactérienne et (iii) la détérioration des cellules algales par prédation ou sénescence (Mykkestad, 1999; Wear et al., 2015; Rehman et al., 2017). En plus de modifier et de consommer la MOD algale, les bactéries peuvent aussi excréter de la MOD de plusieurs tailles ou libérer des composés de hauts poids moléculaires lors de leur sénescence (Osterholz et al., 2015; Li et al., 2016).

Face à l'importance de ces processus biologiques dans la production et la transformation de cette MOD extracellulaire aquagénique, l'objectif principal de ce chapitre est : (i) d'identifier les fractions de la MOD séparées par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection sujettes aux variations en milieu côtier et (ii) de mettre en évidence l'influence du phytoplancton et de la dégradation bactérienne sur la MOD et ces fractions de taille. Cette étude s'est déroulée dans la rade de Brest, au point d'échantillonnage SOMLIT de la baie de Sainte Anne, de Février 2017 à Novembre 2018 à raison d'un échantillonnage par semaine.

V.2. Résultats

Pour décrire la variabilité de la MOD dans la rade de Brest, plusieurs paramètres physico-chimiques ont été sélectionnés comme proxy de phénomènes environnementaux. Ces paramètres de forçage varient de manière saisonnière durant le cycle annuel (e.g. débit fluvial, concentrations en nutriments...).

Le débit fluvial et la salinité peuvent être utilisés comme des proxys de l'apport d'eau douce par les deux rivières que sont l'Aulne et l'Elorn et des apports de MOP continentale/terrigène. La température de l'eau, le rayonnement solaire et les concentrations en nutriments sont des facteurs de contrôle de la production primaire (Chen et al., 2000; Nagata, 2000). Dans ce chapitre, les nitrates et les silicates seront présentés. Les silicates présentent l'intérêt de pouvoir tracer le développement spécifique des diatomées (Morin et al., 1989). En plus de soutenir la production primaire, les nitrates et les silicates peuvent aussi servir à tracer les apports continentaux puisque leurs stocks hivernaux sont reconstitués en grande partie à partir des apports d'origine continentale (Delmas et al., 1983).

L'activité phytoplanctonique peut être directement suivie *via* l'évolution des concentrations en chlorophylle *a* (Chl *a*) et en carbone organique particulaire (COP).

Les concentrations en matière en suspension peuvent être utilisées comme traceurs de l'hydrodynamique sédimentaire.

Le COP et les MES peuvent aussi bien être utilisées pour suivre la production phytoplanctonique que les apports terrigènes (Liénaert et al., 2017). De fait, l'utilisation de paramètres supplémentaires combinés permet de déterminer la nature de la MOP. Ces paramètres combinés sont les rapports C/N qui permettent de distinguer la MOP phytoplanctonique de la MOP terrigène, le rapport Chl *a*/ phéo, qui permet la distinction entre le phytoplancton en bonnes conditions physiologiques de la matière phytoplanctonique en cours de dégradation ou dégradée ; et le rapport COP/Chl *a* qui permet d'estimer la contribution à la MOP du phytoplancton « vivant » et non dégradé des particules originaires du sédiment ou du continent (Savoie et al., 2003).

L'ensemble des données présentées ci-après proviennent du Service d'Observation du Milieu LITtoral (SOMLIT). L'échantillonnage de chaque paramètre présenté ci-après a été réalisé à une fréquence hebdomadaire pendant quasiment deux ans.

V.2.1. Variations des paramètres physico-biogéochimiques

V.2.1.1. Paramètres météorologiques et hydrologiques

La figure V.1 présente les variations de la pluviométrie, du rayonnement solaire global quotidien (paramètres fournis par Météo France) et des apports fluviaux à la rade de Brest (somme des débits de l'Elorn et de l'Aulne – données du portail *Hydro Eau Data*). Sont également présentés les coefficients de marée auxquels chaque prélèvement correspond (Données du SHOM)

Les coefficients sont répartis entre 60 et 84 avec une moyenne de 70 ± 5 , ce qui respecte le cahier des charges du suivi basse fréquence de SOMLIT.

L'apport fluvial journalier est compris entre 2 et $250 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$. Les débits peuvent être rangés en deux catégories : des débits faibles ($< 30 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) caractéristiques d'une période d'étiage entre les mois d'Avril et Septembre, et des débits forts ($> 30 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) durant la période de crue qui s'étend de Novembre à Mars.

La pluviométrie est comprise entre 0 et 40 mm. Les périodes de pluies sont quasi-identiques à 50 mm près entre les périodes de crue (1127 mm cumulés) et les périodes d'étiage (1074 mm cumulés).

Le rayonnement solaire global quotidien varie entre 80 et $3000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$. Proportionnelle à la durée du jour, l'intensité lumineuse est maximale en Juin et minimale en Décembre.

Globalement, si on compare les deux années civiles, les apports fluviaux ne sont pas du même ordre de grandeur. En 2017, les débits fluviaux sont supérieurs à $30 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ de Février à Mars ainsi qu'en décembre alors qu'en 2018, cette période s'étale de décembre à mi-Avril. En comparant la pluviométrie sur les mois de Janvier – Février – Mars de chaque année, il a plu 100 mm de plus en 2018 qu'en 2017.

La fréquence des prélèvements permet de couvrir l'ensemble des périodes hydrologiques présentées précédemment.

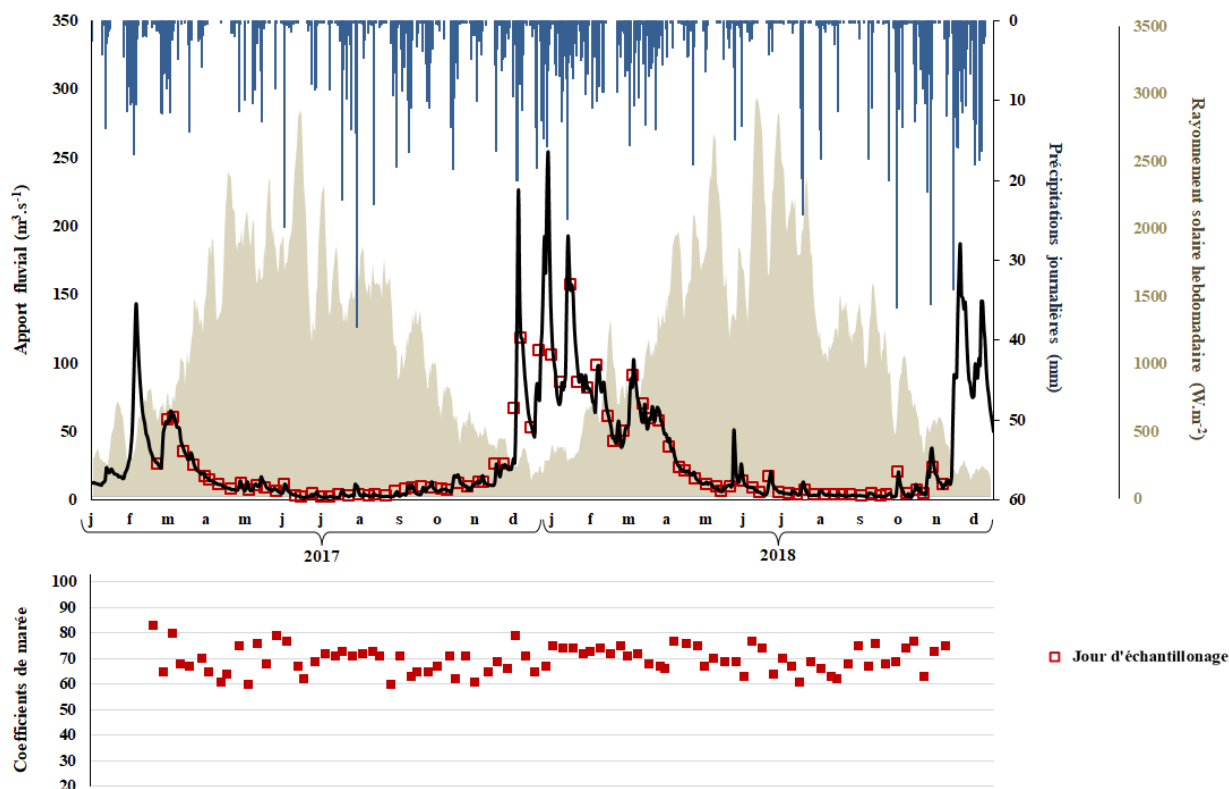


Figure V.1 : Paramètres hydrologiques (apport fluvial et coefficients de marée) et météorologiques (pluviométrie et rayonnement solaire quotidiens) dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

V.2.1.2. Température

Les variations de la température dans la rade de Brest pour les années 2017 et 2018 sont présentées sur la figure V.2. La température est comprise entre 8 et 18 °C. La dynamique annuelle de la température présente deux périodes distinctes. Une période de températures élevées avec un plateau en été autour de 17°C ; et des températures basses en hiver entre Décembre et Février avec des températures inférieures autour de 9 °C. La température est un paramètre idéal pour suivre la saisonnalité du milieu aquatique.

Les deux années étudiées ne présentent pas de différences majeures en termes de température, hormis un degré supplémentaire pour la température maximale enregistrée en 2018 par rapport à 2017. La comparaison de 2017 et 2018 avec les vingt dernières années de suivi de la température dans la rade de Brest (figure V.3) ne présente pas de différence notable.

L'évolution saisonnière de la température en rade de Brest suit une dynamique équivalente à l'ensemble des stations du réseau SOMLIT : un maximum en été, un minimum en hiver et des évolutions croissantes et décroissantes entre les deux opposés.

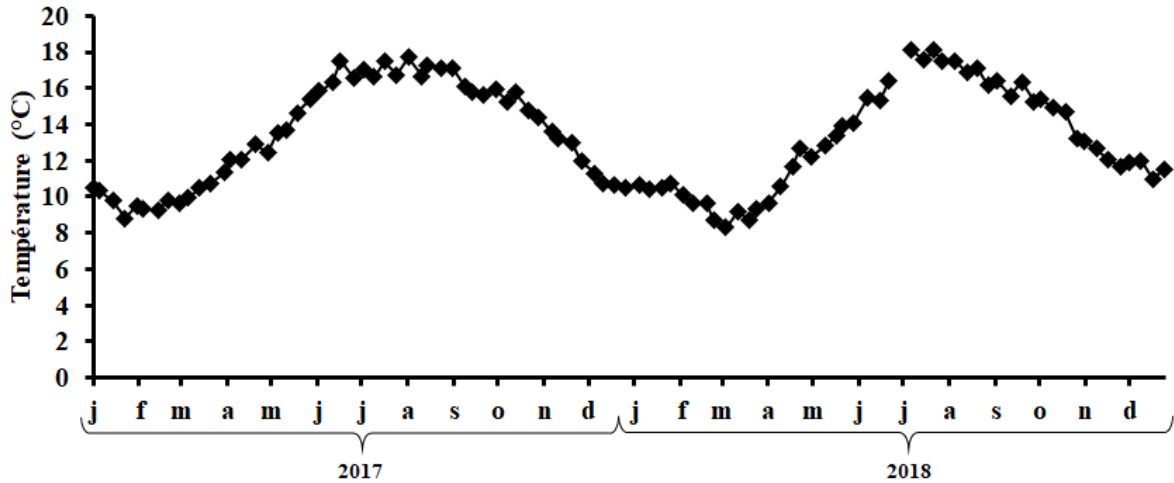


Figure V.2 : Evolution de la température de l'eau dans la rade de Brest en 2017 et 2018

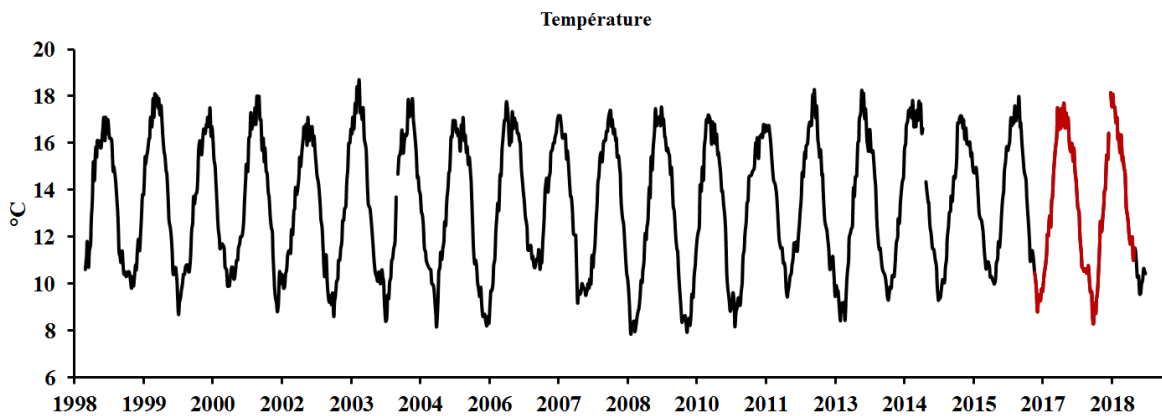


Figure V.3 : Evolution de la température dans la rade de Brest de 1999 à 2019.

V.2.1.3. Salinité

Les variations de la salinité dans la rade de Brest pour les années 2017 et 2018 sont présentées sur la figure V.4. A l'instar de la température, la salinité peut également être séparée en deux périodes distinctes. Elle est élevée à la fin de l'été et en automne avec des valeurs de l'ordre de 35. En hiver, une dessalure est visible entre Février et Mars pour l'année 2017 et entre Janvier et Mai en 2018. L'intensité de cette dessalure n'est pas la même sur les deux années. En 2017, la salinité ne descend pas en dessous de 34, tandis qu'en 2018, la valeur minimale est de 33,3 et est atteinte à la fin du mois de Janvier. Cette différence met en évidence l'influence des apports d'eau douce de l'Aulne et l'Elorn à la rade de Brest.

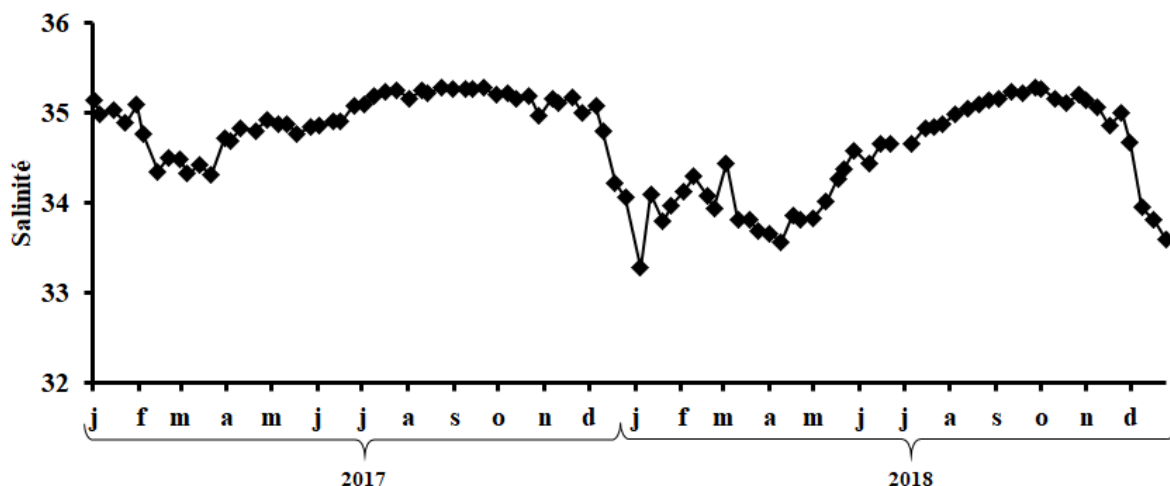


Figure V.4 : Evolution de la salinité dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

D'après l'évolution de la salinité sur les vingt dernières années présentée sur la figure V.5, l'année 2017 apparaît comme exceptionnellement faible. La dessalure de l'année 2018 est globalement de même ordre de grandeur que la majorité des dessalures observées ces vingt dernières années.

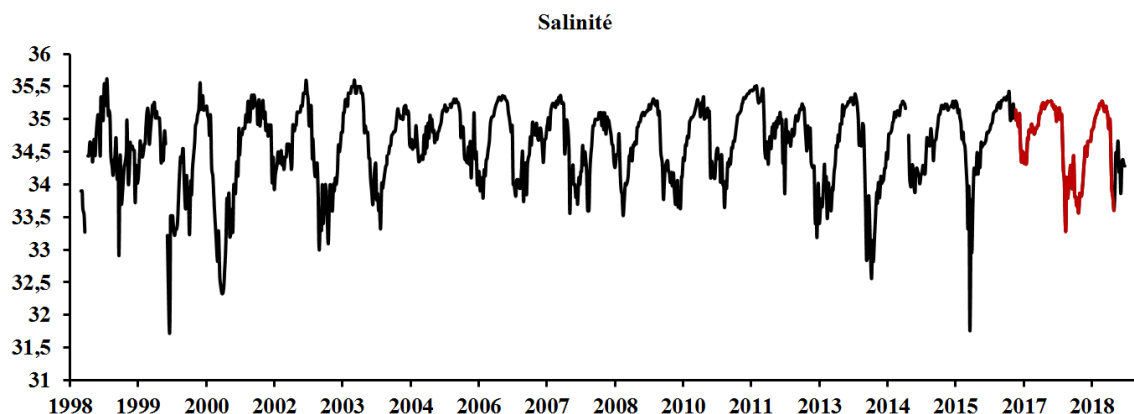


Figure V.5 : Evolution de la salinité ans la rade de Brest de 1999 à 2019.

L'évolution de la salinité aux autres stations SOMLIT est similaire à celle observée dans la rade de Brest. Les valeurs minimales et maximales sont les mêmes dans la plupart des stations côtières de la Manche et de l'Atlantique sauf pour celles situées dans des bassins semi-fermés (Antioche et Bassin d'Arcachon) ou dans les estuaires (Gironde). Pour les stations situées en Méditerranée, les salinités maximales enregistrées sont plus proches de 38 (Liénart et al., 2017).

V.2.1.4. Oxygène dissous (O₂)

La dynamique des concentrations en O₂ est présentée sur la figure V.6. Les teneurs en oxygène dissous varient de 5,2 à 7,4 mL.L⁻¹ avec une moyenne de $6,1 \pm 0,5$ mL.L⁻¹. Des teneurs minimales sont enregistrées à l’automne. Les concentrations augmentent en hiver, par effet de température, et atteignent leurs maxima au printemps au moment des blooms phytoplanctoniques.

Les maxima et minima des concentrations en oxygène dissous dans la rade de Brest sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés durant les vingt dernières années à cette station (figure V.7).

En comparaison avec les autres stations SOMLIT, l’évolution des concentrations en O₂ dans la rade est similaire avec celles mesurées aux autres stations de la façade atlantique.

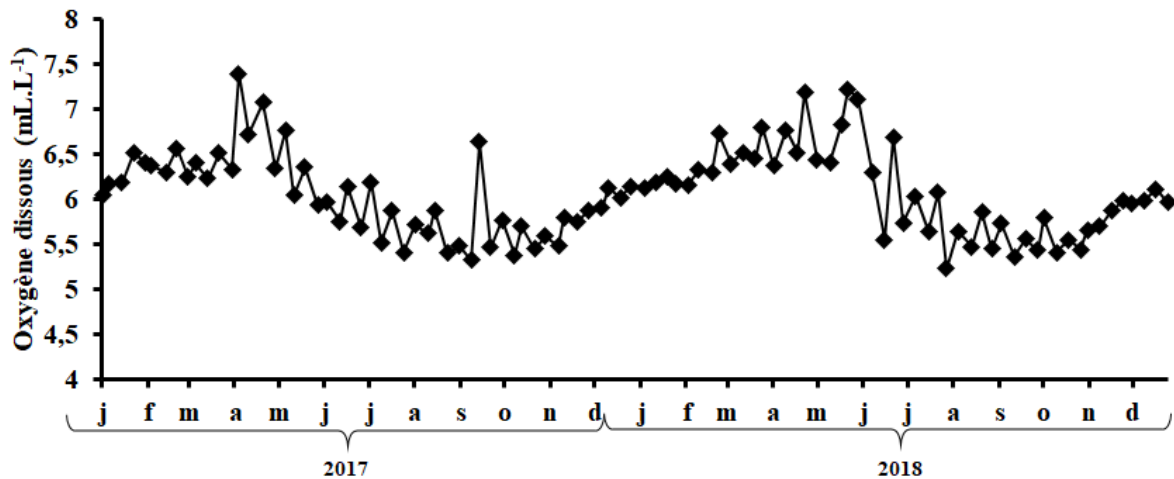


Figure V.6 : Evolution des concentrations en dioxygène dissous dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

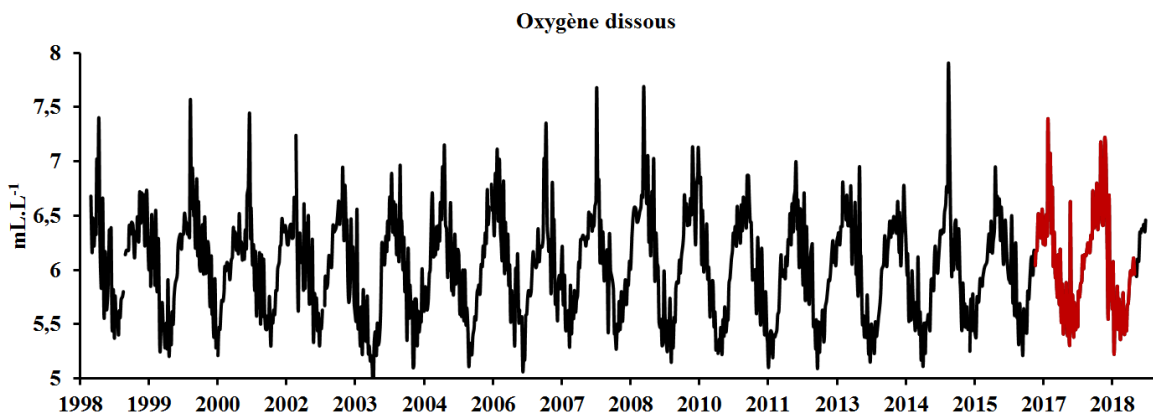


Figure V.7 : Evolution des concentrations en oxygène dissous dans la rade de Brest de 1999 à 2019.

V.2.1.5. Nutriments (NO_3^- ; SiOH_4^-)

Les variations des concentrations en nitrates et en silicates sont présentées sur la figure V.8 et V.9. Les concentrations en nitrates (NO_3^-) sont comprises entre 0,1 et 23,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec une moyenne sur la période étudiée de 6,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Au printemps (Mars-Avril), les concentrations chutent rapidement (3 – 6 semaines) des niveaux maximaux observés en hiver à ceux minimaux observés au printemps et en été. A l'automne, à partir du mois de Septembre, les concentrations augmentent à nouveau progressivement jusqu'à atteindre leurs teneurs maximales en hiver.

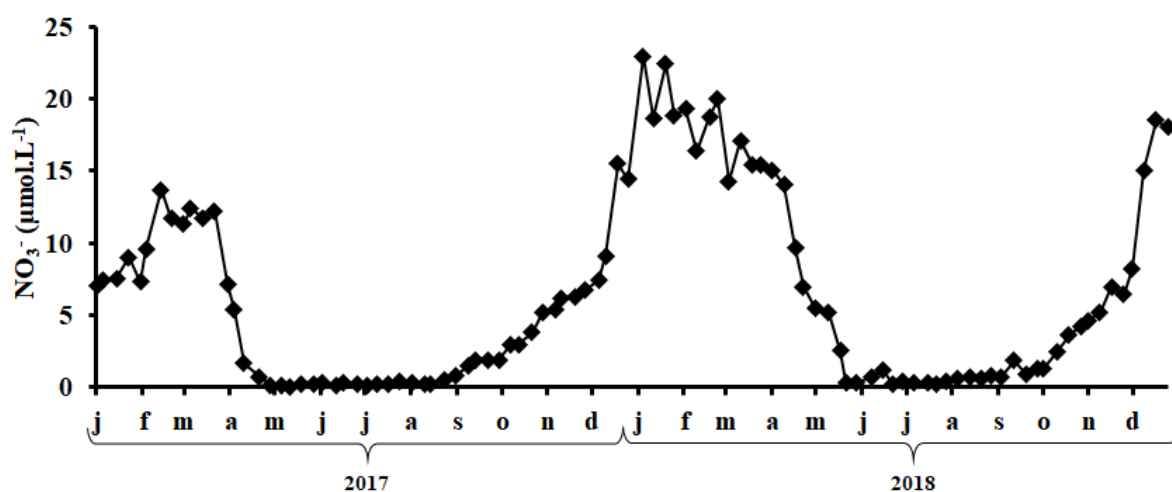


Figure V.8 : Variations des concentrations en nitrates dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

Les concentrations en silicates (SiOH_4^-) suivent la même dynamique. Leurs concentrations sont comprises entre 0,2 et 10,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ pour une moyenne de 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Comme pour les nitrates, les teneurs les plus élevées sont observées en hiver, chutent rapidement au printemps pour atteindre les niveaux les plus faibles. A la différence des nitrates l'augmentation des teneurs a lieu plus tôt, dès le mois de Juillet.

Les dynamiques annuelles des nitrates et des silicates sont similaires à celles observées durant les vingt dernières années dans la rade de Brest (figure V.10) avec des maxima observés en hiver et des minimas au printemps et en été. L'année 2017 est une année particulièrement pauvre en nitrates et en silicates ; elle présente les concentrations hivernales les plus faibles de la série temporelle. Cette particularité peut s'expliquer par de faibles débits qui n'ont pas permis une reconstitution « normale » des stocks de nutriments dans la rade de Brest.

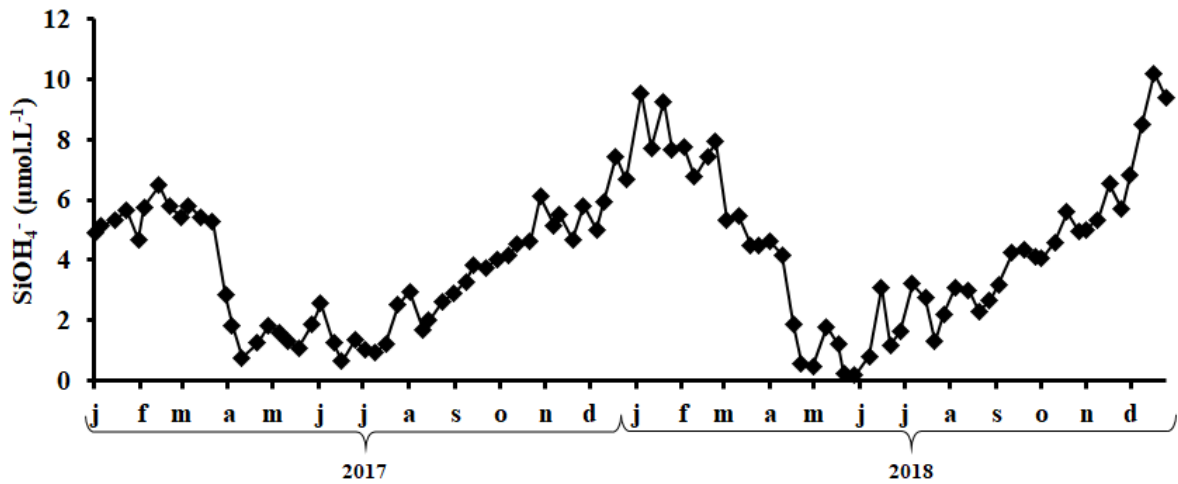


Figure V.9 : Variations des concentrations en silicates dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

Les concentrations en nutriments sont du même ordre de grandeur que celles observées dans les stations SOMLIT de Bizeux et de Antioche, toutes deux sous influences estuariennes de la Rance et de la Charente, respectivement ; ainsi qu'à la station Eyrac du Bassin d'Arcachon (Liénart, 2017). Les concentrations hivernales en nitrates dans la rade de Brest sont beaucoup plus élevées que celles mesurées aux stations méditerranéennes (e.g. Marseille ou Villefranche sur Mer) qui restent comprises en dessous de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Elles sont cependant inférieures à celles observées aux stations de Luc-sur Mer (Baie de Seine) et dans la Gironde où les concentrations peuvent atteindre des valeurs très élevées ($60 - 200 \mu\text{g.L}^{-1}$).

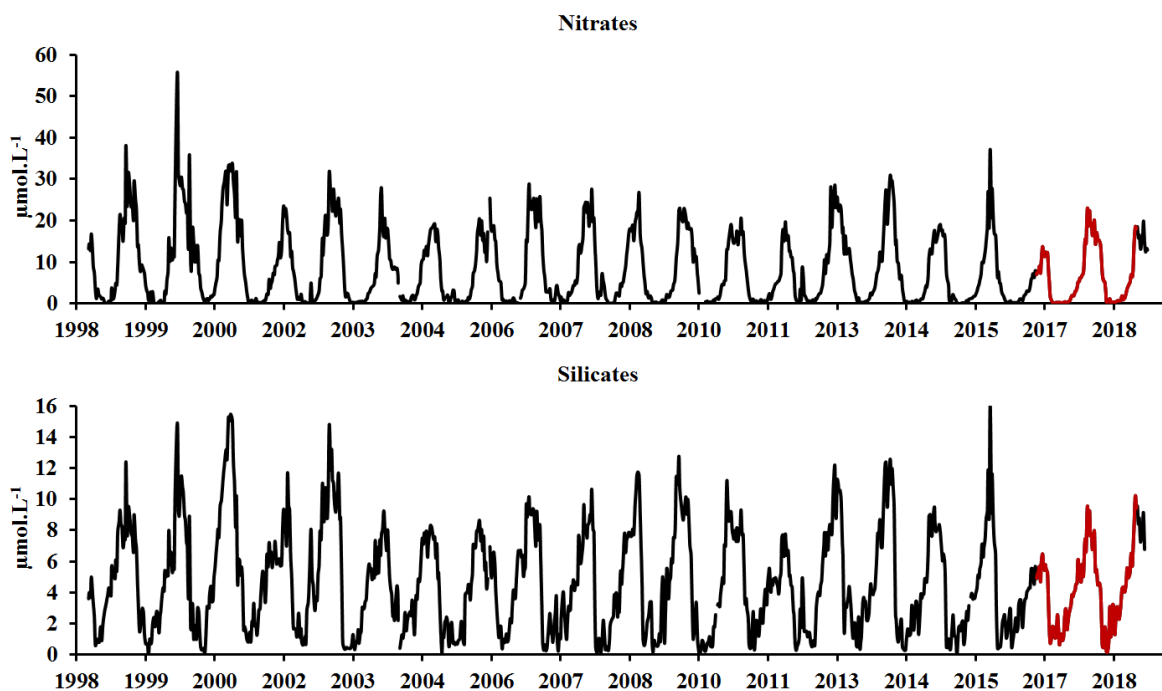


Figure V.10 : Evolution des concentrations en nitrates et en silicates de 1998 à 2019

V.2.1.6. Matières en suspension

Les concentrations en matière en suspension (MES) sont comprises entre 0,3 et 9,1 mg.L⁻¹ pour une moyenne de 1,6 mg.L⁻¹ (figure V.11). Les concentrations maximales sont observées durant la crue de Janvier 2018, au moment où l'apport des rivières est le plus important. Le reste de l'année les concentrations en MES sont inférieures à 2 mg.L⁻¹.

Les concentrations en MES observées en 2017 sont plus faibles que celles observées en 2018. Ces teneurs relativement basses ont aussi été mesurées précédemment entre 2009 et 2013 (figure V.12). Les concentrations mesurées en 2018 sont comparables aux années 2004, 2007, 2015 et 2016 (figure V.12).

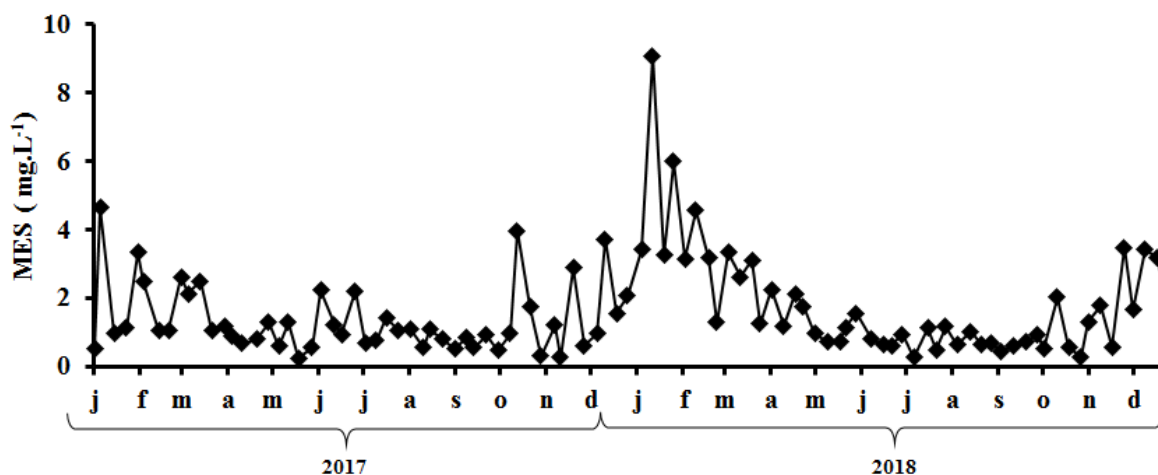


Figure V.11 : Matières en suspension dans la rade de Brest en 2017 et 2018

Les ordres de grandeur des concentrations en MES mesurées dans la rade de Brest sont comparables aux autres stations côtières Atlantiques et de la Manche. Aux stations soumises à des apports fluviaux importants comme celles de Luc sur Mer (Baie de Seine) et de la Gironde, les concentrations en MES peuvent atteindre des niveaux records jusqu'à 100 mg.L⁻¹ dans la Baie de Seine ou jusqu'à 1000 mg.L⁻¹ pour la Gironde (Liéart et al., 2016). Globalement, sur l'ensemble des stations, les MES présentent un maximum en hiver.

En revanche, les valeurs maximales ne sont pas atteintes en hiver mais au printemps pour les stations méditerranéennes et l'estuaire de la Gironde.

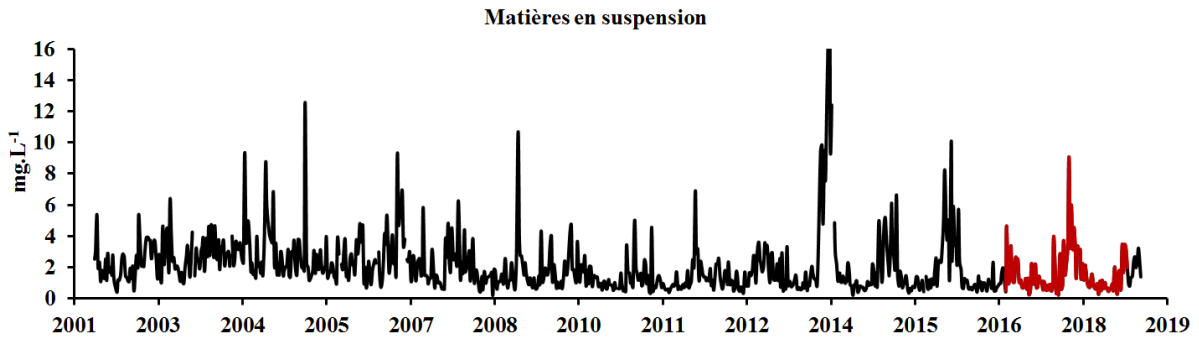


Figure V.12 : Evolution des concentrations en MES de 2001 à 2019

V.2.1.7. Chlorophylle a

La dynamique des concentrations en chlorophylle a est présentée sur la figure V.13. Les concentrations en chlorophylle a (Chl *a*) sont comprises entre 0,27 et 4,36 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Les pics de concentrations ($>1 \mu\text{g.L}^{-1}$) sont observés au printemps, en Avril et Mai en 2017 ; et d'Avril à Juin en 2018. Le reste de l'année les concentrations sont inférieures à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

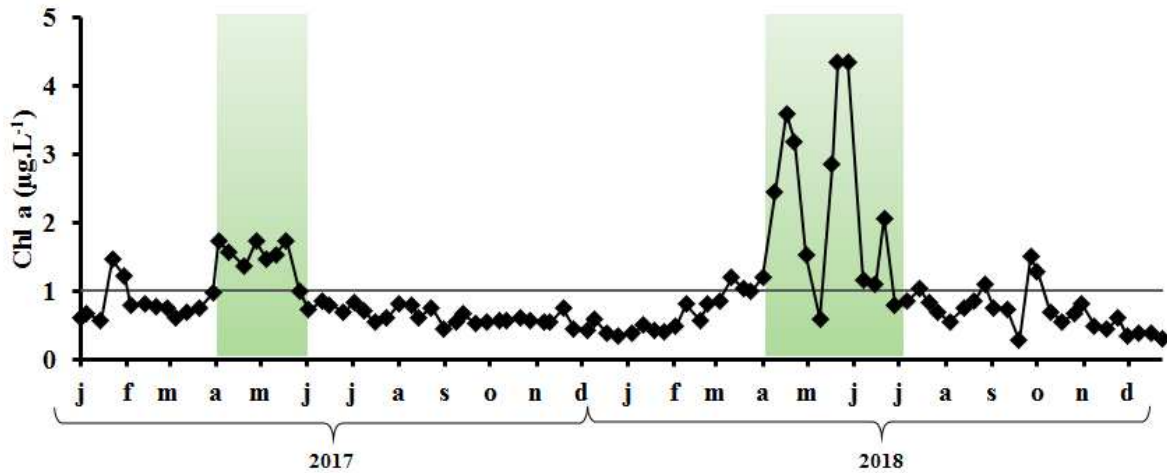


Figure V.13 : Evolution des concentrations en chlorophylle *a* dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

Les concentrations en Chl *a* présentent un maximum au printemps sur l'ensemble de la série temporelle (figure V.14). Dans la rade de Brest, les concentrations en Chl *a* de 2017 sont plus faibles ($< 2 \mu\text{g.L}^{-1}$) que celles observées en 2018 (maximum de 4,36 $\mu\text{g.L}^{-1}$).

L'ordre de grandeur des concentrations maximales en Chl *a* en 2017 avait déjà été observé en 2011 et 2013 malgré le fait que les stocks hivernaux de nutriments étaient plus importants. Le maximum de concentrations en Chl *a* de 2018 est le plus élevé mesuré dans la

rade de Brest depuis 2015. Néanmoins, les valeurs maximales n'atteignent pas les valeurs les plus élevées de la série temporelle mesurées dans les années 2000 ou en 2014 (figure V.14).

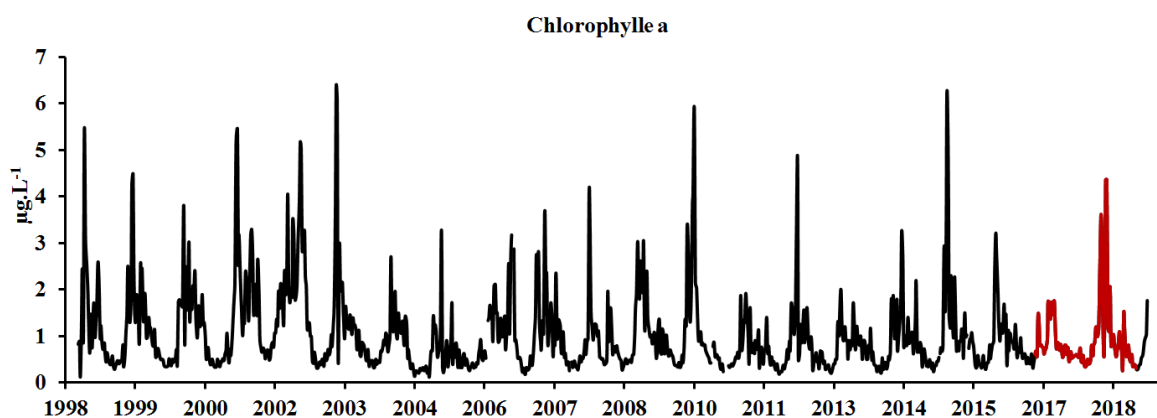


Figure V.14 : Evolution des concentrations en chlorophylle *a* de 1998 à 2019.

La dynamique printanière du paramètre Chl *a* est observée dans l'ensemble des stations du réseau SOMLIT. L'ordre de grandeur des concentrations maximales en Chl *a* observées dans notre étude sont aussi répertoriées dans la majorité des stations (Liénart et al., 20167. Néanmoins aux stations de Luc sur Mer et de la Gironde, les concentrations peuvent atteindre des niveaux record compris entre 10 et 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$, peut-être à cause des apports nutritifs importants dues aux fleuves tels que la Seine et la Gironde.

V.2.1.8. Rapport chlorophylle *a* / phaeopigment

L'évolution du rapport chlorophylle *a* sur celles en phéophytine (Chl*a*/phéo) permet d'évaluer l'état du phytoplancton. Des rapports élevés indiqueront un développement phytoplanctonique important (bloom). Des rapports proches de 1 signifient que les cellules phytoplanctoniques sont en phase stationnaire (sénescence) ou que la pression des brouteurs zooplanctoniques est importante (Welschmeyer et Lorenzen, 1985). Les rapports Chl*a*/phéo sont présentés sur la figure V.15 et sont compris entre 0,3 et 4. Des rapports supérieurs à 1 sont observés de Février à Juin en 2017 et de Février à Octobre en 2018. Le reste de l'année, les rapports sont faibles et compris en dessous de 1.

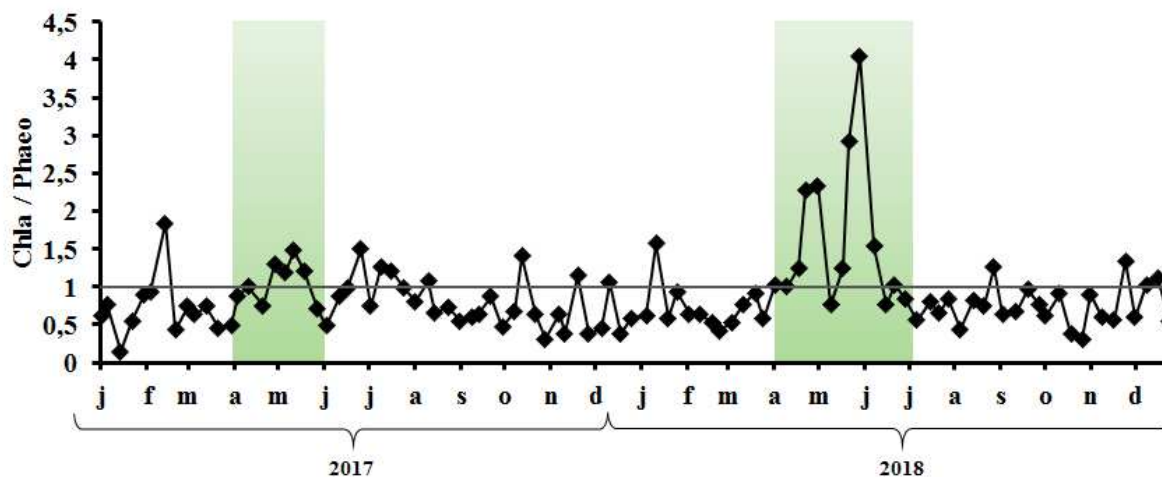


Figure V.15 : Evolutions des rapports Chl *a*/phaeo dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

L'évolution des rapports Chl *a* / Phéo sur les dix dernières années (figure V.16) corroborent les comparaisons effectuées précédemment. Les rapports maximaux plutôt faibles observés au printemps de l'année 2017 sont comparables avec ceux observés en 2011 et en 2013.

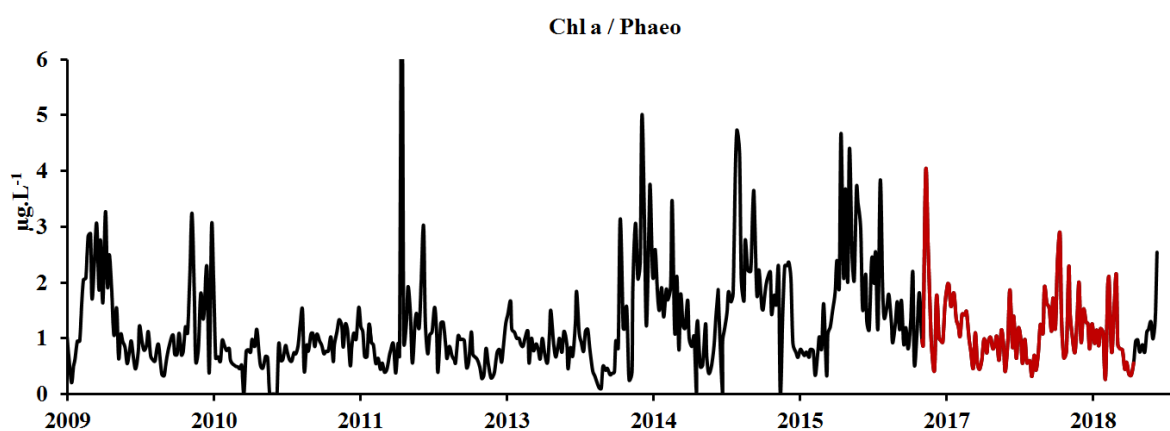


Figure V.16 : Evolution du rapport Chl*a*/phaeo dans la rade de Brest de 2009 à 2019.

V.2.1.9. Carbone organique particulaire

Les concentrations en carbone organique particulaire (COP) sont présentées sur la figure V.17.

Les concentrations en COP sont comprises entre 0 et 552 µg.L⁻¹. Les concentrations sont plus élevées au printemps et en été. Le maximum est observé en Juin 2018 au moment du

pic de Chl *a*. En hiver et en automne les concentrations sont minimales (< 200 µg.L⁻¹). Les concentrations en azote organique particulaire (NOP) suivent la même dynamique que le COP (données non présentées). Les concentrations en NOP sont comprises entre 0 et 76 µg.L⁻¹.

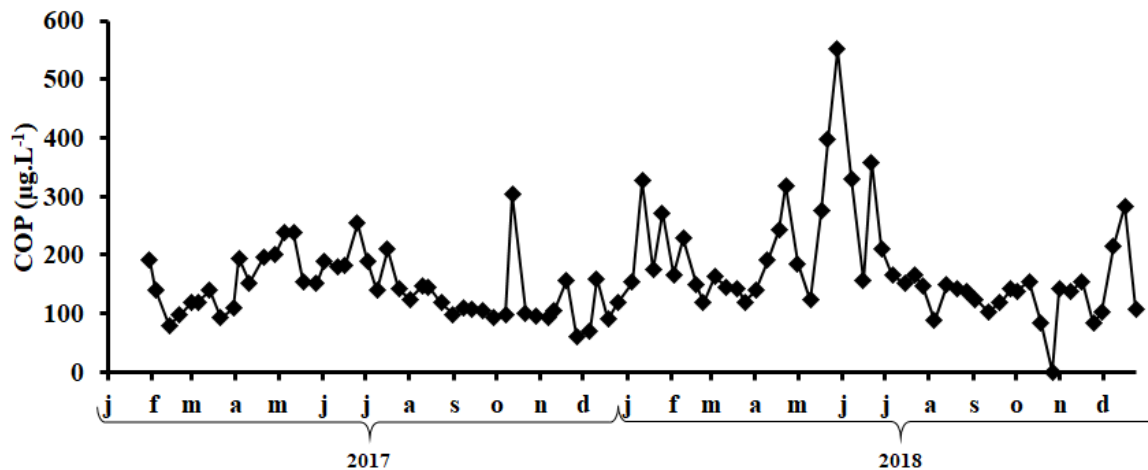


Figure V.17 : Evolution des concentrations en COP dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

La dynamique du COP suit globalement le même schéma qu'en 2017 et 2018 le long des vingt dernières années de mesures (figure V.18). Les teneurs maximales observées au printemps 2017 sont particulièrement basses et correspondent à ce qui avait pu être observé en 2013 et en 2004. Bien que l'année 2011 présente de faibles teneurs en Chl *a* (figure V.13), les teneurs en COP sont plus proches avec celles de l'année 2018 qui apparaît comme une année « normale ».

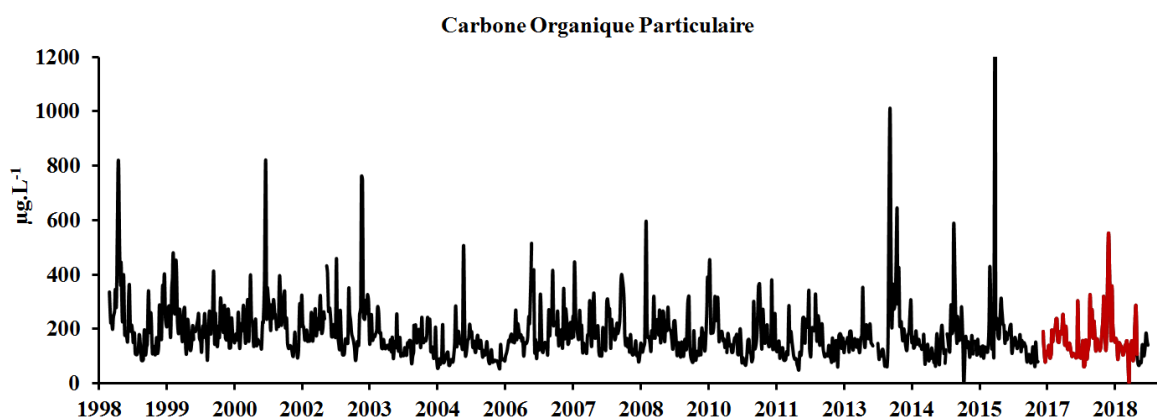


Figure V.18 : Evolution des concentrations en COP dans la rade de Brest entre 1998 et 2019.

Les concentrations en COP augmentent au printemps dans la majorité des stations SOMLIT. Néanmoins, les concentrations maximales sont aussi atteintes dès l'hiver et sont sans

doute des conséquences d'apports terrigènes importants. Les concentrations en COP dans la rade de Brest au printemps et en été sont du même ordre de grandeur que ce qui peut être observé dans les stations côtières de Roscoff et d'Antioche. Elles sont cependant presque dix fois inférieures à ce qui peut être observé en Baie de Seine, dans la Gironde et le Bassin d'Arcachon (milieux turbides). Le reste de l'année, les concentrations en COP plus faibles, observées dans la rade de Brest sont équivalentes à celles qui peuvent être observées dans l'ensemble des stations SOMLIT, à l'exception des trois milieux fortement turbides cités juste avant.

V.2.1.10. Rapport C/N de la MOP

Le rapport C/N de la MOP est compris entre 5,6 et 7,8 (figure V.19). Des valeurs inférieures à 7 sont observées sur toute la série temporelle sauf entre Novembre 2017 et Février 2018 où le C/N est supérieur à 7.

Ces rapports C/N mesurés dans la rade de Brest indiquent une MOP essentiellement contrôlée par la biomasse phytoplanctonique (Savoye et al., 2003). Ce contrôle du phytoplancton sur la MOP se retrouve dans l'ensemble des stations SOMLIT, peu importe la façade maritime concernée, à l'exception notable de la Gironde, contrôlée à plus de 90% par les apports terrigènes à forts C/N (Liénart et al., 2017).

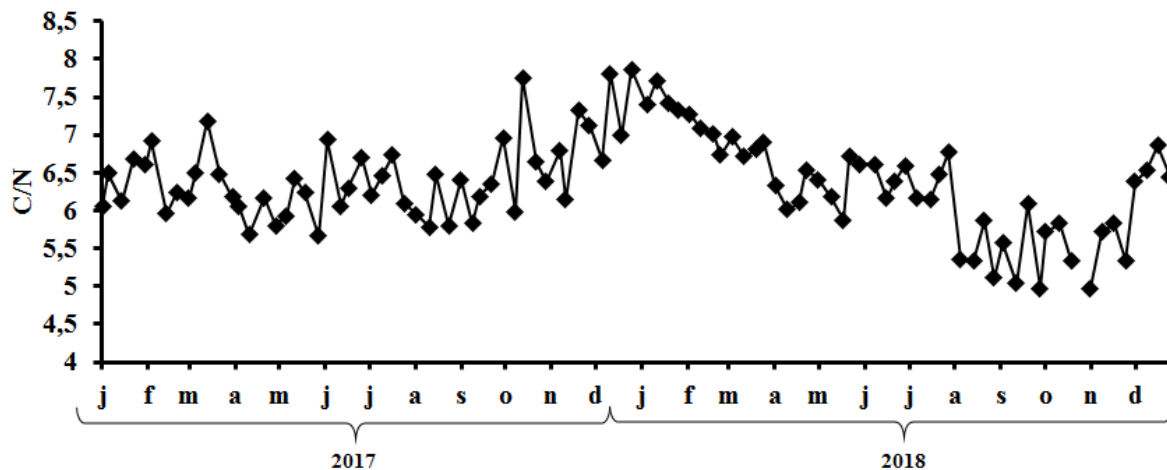


Figure V.19 : Evolution du rapport C/N de la MOP dans la rade de Bret en 2017 et 2018.

V.2.1.11. Evolution du rapport COP/Chl *a*

L'évolution du rapport COP/Chl *a* est présenté sur la figure V.20. Des rapports < 200 indiquent une MOP dominée par le phytoplancton (Savoie et al., 2013 ; Linéart et al., 2017), comme dans le cas de la période Mars-Avril-Mai de chaque année. En hiver les rapports sont largement supérieurs à 200 ce qui indique le contrôle de la MOP par les apports terrigènes et potentiellement par la biomasse hétérotrophique.

En Juin 2018, les rapports COP/Chl *a* sont plus élevés qu'au printemps mais restent de l'ordre de 200. Cette particularité pourrait indiquer la présence d'une MOP double, d'origine phytoplanctonique et hétérotrophique.

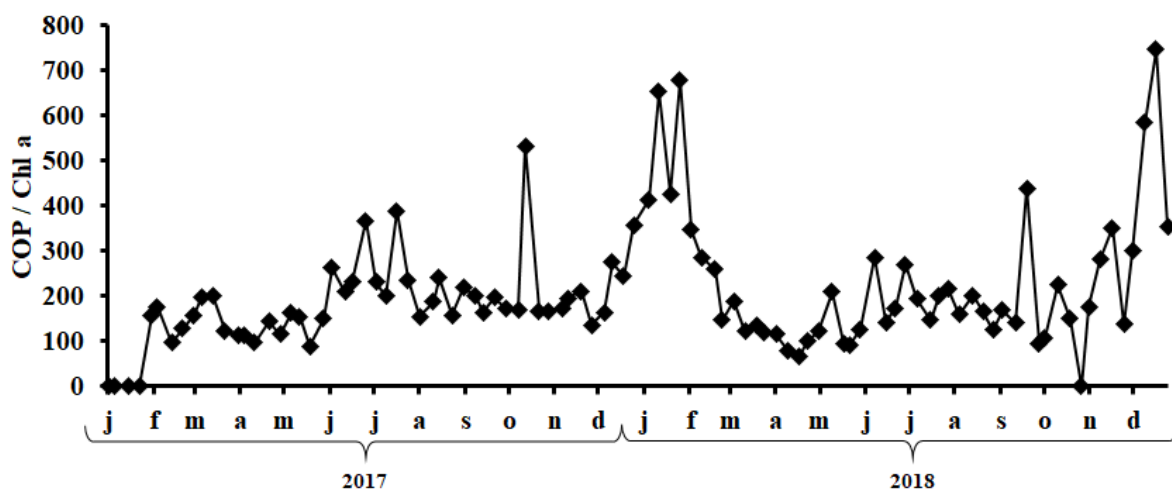


Figure V.20 : Evolution du rapport COP/Chl *a* dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

Malgré les différences interannuelles dans la dynamique des concentrations en Chl *a* dans la rade de Brest (figure V.13), les rapports COP/ Chl *a* présentent systématiquement des valeurs inférieures à 200 au printemps, signe de la prédominance de la MOP d'origine phytoplanctonique dans la MOP globale (figure V.21). Néanmoins, les années avant 2004 présentent des rapports bas au printemps mais aussi en été, prouvant ainsi que l'activité phytoplanctonique pouvait perdurer durant toute la saison estivale.

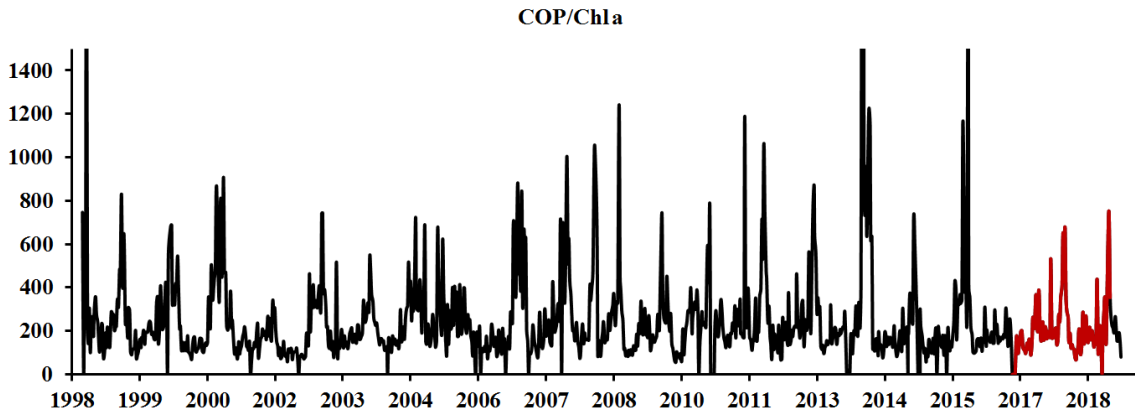


Figure V.21 : Evolution du rapport COP/Chl *a* dans la rade de Brest entre 1998 et 2019.

La moyenne des rapports COP/Chl *a* dans la rade de Brest (~ 269) est comparable avec certaines stations côtières qualifiées de mésotrophes comme celles de Tarnos/Biarritz, Luc sur Mer et le Bassin d'Arcachon. Ces moyennes sont supérieures pour les sites oligotrophes comme à Banyuls (382) et Villefranche sur mer (610) Dans les systèmes soumis à de forts apports en particules terrigènes comme l'estuaire de la Gironde, la moyenne des rapports est très supérieure à celle observée dans la rade de Brest et est comprise entre 400 et 10 000 (Liénart, 2017).

V.2.1.12. Comparaison entre les années 2017 et 2018

Deux phénomènes environnementaux majeurs peuvent être décelés et décrits à partir des paramètres physico-chimiques présentés juste avant : (i) les apports d'origine continentale et (ii) le développement phytoplanctonique.

L'augmentation du volume d'eau douce apportée par les fleuves (Aulne et Elorn) provoque une dessalure en hiver (figure V.2). Cet apport d'eau douce continentale est visible aussi sur les dynamiques de la MES (figure V.11) et du COP (figure V.17) qui présentent toutes deux des valeurs plus élevées en hiver. Cette prédominance de la matière d'origine continentale ne se traduit pas par des rapports C/N de l'ordre de 12 comme cela aurait pu être attendu (Savoye et al., 2003). Cependant, les rapports C/N augmentent légèrement (>7) par rapport à leurs valeurs des périodes d'étiage (figure V.19) et des rapports COP/Chl *a* supérieurs à 200 (figure V.20) (Savoye et al., 2003). De même, les apports continentaux contribuent au renouvellement du stock de nutriments de la rade de Brest comme le démontrent les

concentrations en nitrates et en silicates (figure V.8 et V.9) dont les concentrations maximales sont atteintes en hiver.

Ces stocks initiaux de nutriments sont consommés rapidement par le bloom phytoplanctonique au printemps, dès l'augmentation de la température (figure V.1). Les chutes des concentrations en nutriments interviennent en même temps qu'un pic dans les concentrations en Chl *a* (figure V.13), proxy traditionnel du développement phytoplanctonique. Des rapports COP/Chl*a* inférieurs à 200 (figure V.20) et des rapports Chl*a*/phaeo supérieurs à ceux mesurés en hiver sont les indicateurs de la prédominance de cellules phytoplanctoniques en bon état physiologiques dans la MOP (Savoie et al., 2003).

Ici les deux années étudiées sont différentes hydrologiquement. Les débits fluviaux moins importants de l'hiver 2017 n'ont pas permis une reconstitution « normale » des stocks de nutriments. Cette faiblesse des concentrations hivernale en nitrates explique en partie la faible intensité du bloom phytoplanctonique en 2017 avec des concentrations en chl *a* presque deux fois inférieures à ce qui est mesuré en 2018. La dessalure observée en 2018, plus forte qu'en 2017, est du même ordre de grandeur que celles observées entre 2005 et 2011 (figure V.5). Le renouvellement des stocks de nutriments est plus important permettant de soutenir une plus grande activité phytoplanctonique au printemps.

Dans la suite de ce chapitre, l'évolution des concentrations en MOD sera présentée en tenant compte de l'importante de ces deux processus que sont l'apport continental et le développement phytoplanctonique ; et de la différence interannuelle de leur intensité.

V.2.2. Variabilité du COD et des fractions de la MOD séparées par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection.

V.2.2.1. Carbone organique dissous

Les concentrations en carbone organique dissous (COD) sont présentées sur la figure V.22. Les concentrations sont comprises entre 700 et 2800 $\mu\text{gC.L}^{-1}$; avec une moyenne de 1216 $\mu\text{gC.L}^{-1}$. Les concentrations minimales sont observées en automne ainsi qu'en hiver pour l'année 2018. Les maxima de concentrations sont enregistrés en été.

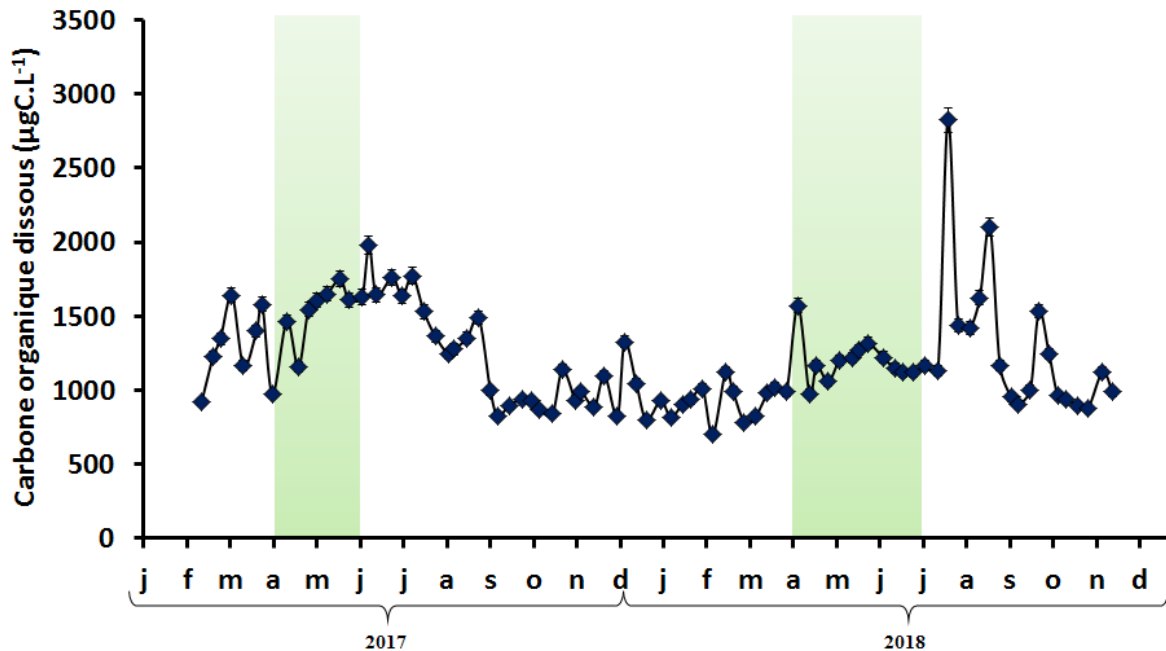


Figure V.22 : Evolution des concentrations en carbone organique dissous dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

L'évolution des concentrations en COD est similaire avec celle d'autres études en milieu côtier. (Penru et al., 2013 ; Danhiez, 2016). Les concentrations minimales et maximales observées dans la rade de Brest sont comparables avec celles de la Manche (722 - 1898 $\mu\text{gC.L}^{-1}$), de la côte Guyanaise (996 – 1800 $\mu\text{gC.L}^{-1}$), ou de la Mer du Viêtname (819 – 2280 $\mu\text{gC.L}^{-1}$) (Danhiez, 2016). Ces trois environnements sont sous l'influence d'estuaires drainant de l'eau continentale riche en MOD terrigène. En mer Méditerranée, les concentrations en MOD sont plus faibles et sont comprises entre 900 et 1300 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (Penru et al., 2013)

V.2.2.2. Biopolymères

Les concentrations en BP sont comprises entre 30 et 190 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (figure V.26). Les concentrations sont minimales en hiver et maximales en été. L'augmentation des concentrations commence aux mois de Mars au moment du bloom phytoplanctonique. En 2018, les concentrations atteignent leur maximum lors du bloom alors qu'en 2017, les concentrations en BP persistent et augmentent même légèrement. Les concentrations en BP sont du même ordre de grandeur que celles mesurées en mer Méditerranée par Baghoth et al., (2008). L'effet de l'activité biologique avait déjà été observé avec un doublement des concentrations entre l'hiver et le printemps (Penru et al., 2013).

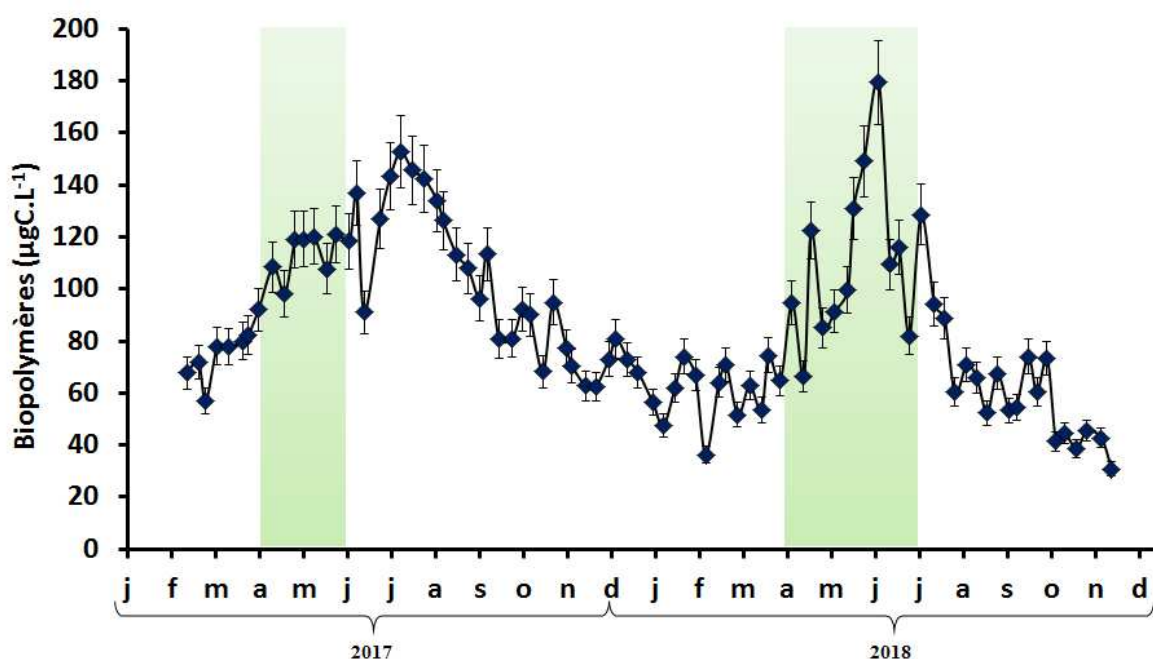


Figure V.23 : Evolution des concentrations en biopolymères dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

L'augmentation des concentrations en BP au moment du bloom phytoplanctonique est particulièrement visible en 2018. Sur la figure V.24, les corrélations entre les concentrations en BP et les concentrations en Chl *a* pour 2018 permettent de distinguer deux situations : (i) une situation hors bloom phytoplanctonique avec une pente faible et (ii) une situation avec bloom présentant une pente plus forte. Un test de corrélation de Pearson permet de préciser que ces données sont significativement corrélés à 99% lors du bloom phytoplanctonique ($pvalue = 0,001999$; $n = 11$; $R^2 = 0,59$) et pendant le reste de l'année 2018 malgré un coefficient de régression plus faible ($pvalue = 0,006751$; $n = 29$; $R^2 = 0,23$). Ces résultats suggèrent que les

teneurs en Chl *a* et donc l'intensité du bloom phytoplanctonique joue un rôle dans la production de BP.

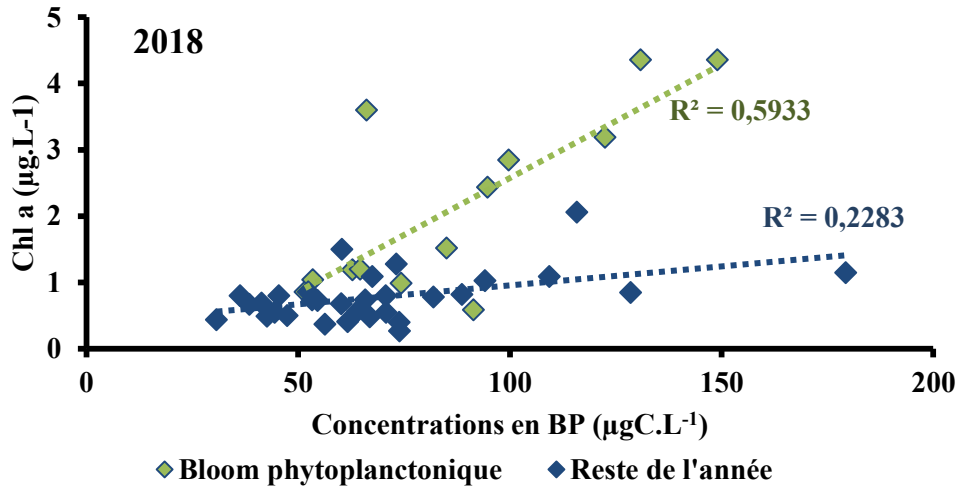


Figure V.24 : Corrélations entre BP et Chl *a* pour 2018. La régressions linéaire est calculée pour la période de bloom phytoplanctonique correspondant aux pics de concentrations en Chl *a*.

Néanmoins, l'augmentation des concentrations durant la période post-bloom en 2017 indique que d'autres processus que le seul développement phytoplanctonique pourrait être responsable de la dynamique des concentrations en BP dans la rade de Brest.

V.2.2.3. Substances Humiques

Les concentrations en SH sont comprises entre 380 et 611 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (figure V.25). Elles varient peu autour de 430 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ durant la quasi-totalité de l'année 2017. En 2018, les concentrations augmentent à partir de la mi-Février et atteignent leurs maxima durant le printemps, au moment du bloom phytoplanctonique. L'augmentation observée à partir du mois de Février 2018, non visible en 2017 pourrait être expliquée, en partie, par la différence des apports fluviaux entre les deux années mais aussi et surtout par une production autochtone de SH puisque les concentrations maximales sont observées au moment du bloom phytoplanctonique. Ce lien est confirmé par un test de Pearson qui permet d'affirmer que les concentrations en SH et en Chl *a* (figure V.26) sont corrélées significativement à 99% au moment du bloom 2018 ($pvalue = 0,001232$; $n = 11$; $R^2 = 0,63$) mais pas pendant le reste de l'année ($pvalue = 0,6$; $n = 29$; $R^2 = 0,01$).

Les ordres de grandeur des concentrations mesurées dans la rade de Brest correspondent à ce qui a pu être mesurée par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection en mer Méditerranée (400 – 600 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ Baghoth et al., 2008).

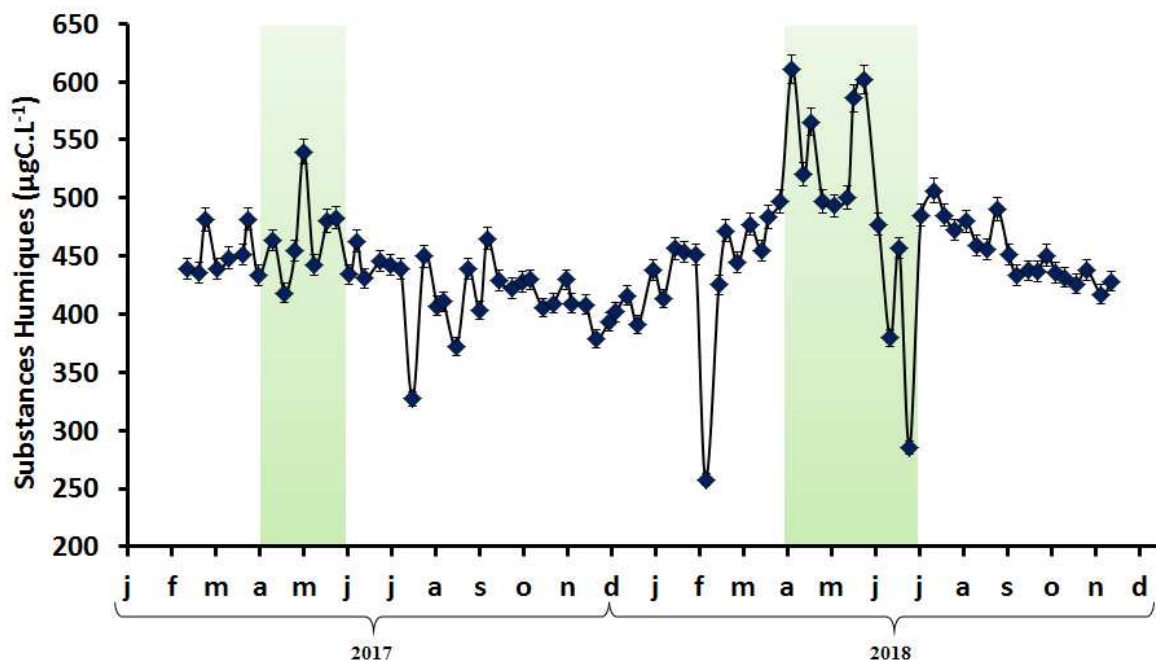


Figure V.25 : Evolution des concentrations en substances humiques dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

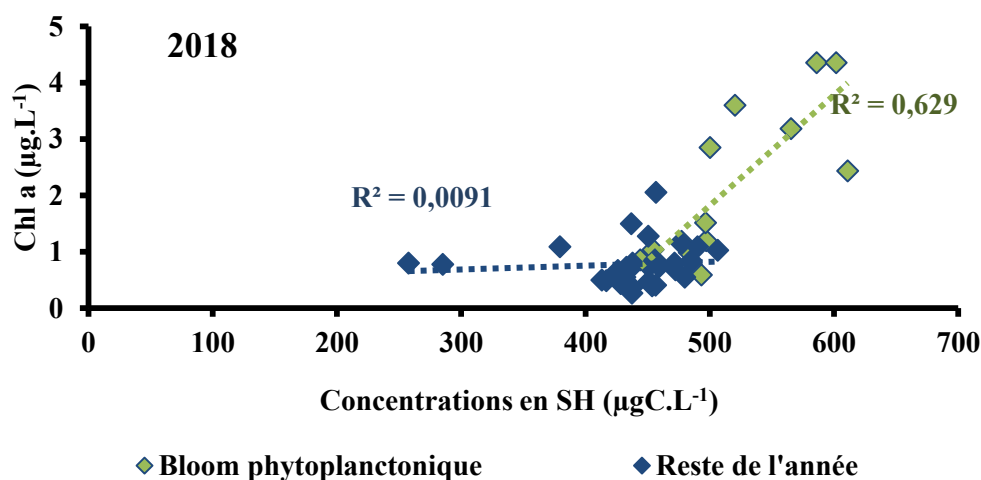


Figure V.26 : Corrélations entre SH et Chl *a* pour 2018. La régressions linéaire est calculée pour la période de bloom phytoplanctonique correspondant aux pics de concentrations en Chl *a*.

V.2.2.4. Building-Blocks

Les concentrations sont comprises entre 77 et 200 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (figure V.27). Les teneurs maximales sont observées au printemps, au moment du bloom phytoplanctonique, et durant la première moitié de l'été. A partir du mois d'Aout, les concentrations diminuent. Cette baisse est moins prononcée en 2017 ($\sim 120 \mu\text{gC.L}^{-1}$) qu'en 2018 ($\sim 80 \mu\text{gC.L}^{-1}$). Entre 2017 et 2018, une augmentation est observée en Décembre 2017 avant une chute brusque avec le minimum mesuré de 77 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ en Février – Mars 2018.

Les concentrations observées dans d'autres sites côtiers présentent des gammes de concentrations en BB comparables à ceux observés dans la rade de Brest (compris entre 50 et 300 $\mu\text{gC.L}^{-1}$) (Baghoth et al., 2008 ; Penru et al., 2013).

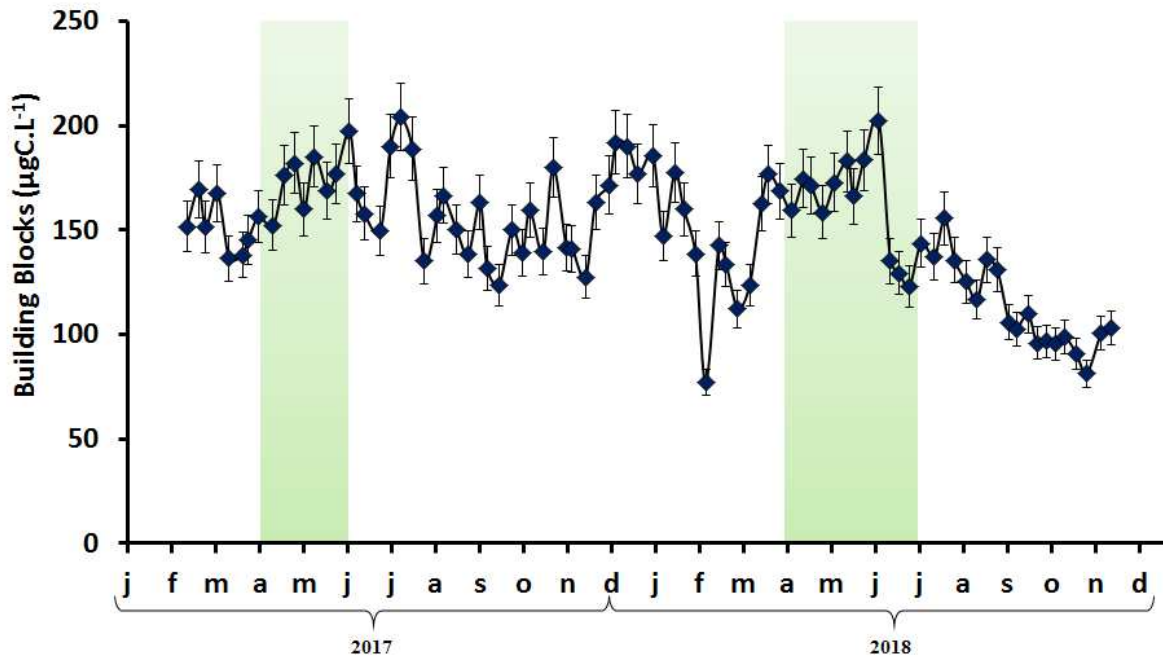


Figure V.27 : Evolution des concentrations en building-blocks en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

La figure V.28 présente les concentrations en Chl *a* en fonction de celles en BB pour les périodes de bloom 2017 et 2018 (vert) et le reste des échantillons (bleu). L'augmentation des concentrations en BB lors des blooms est significativement corrélée à 99% avec celle des concentrations en Chl *a* (*pvalue* = 0,000985 ; *n* = 24 ; *R*² = 0,37).

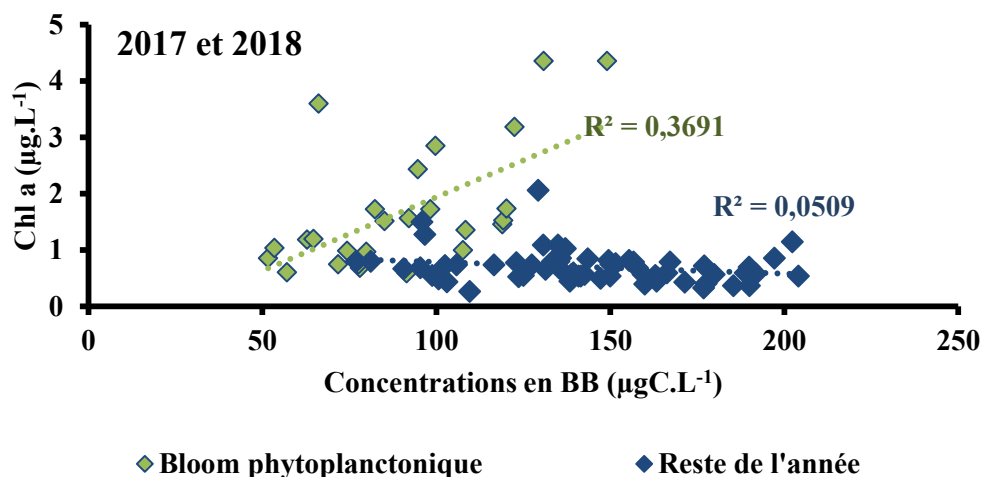


Figure V.28 : Corrélations entre BB et Chl *a* pour 2018. La régressions linéaire est calculée pour la période de bloom phytoplanktonique correspondant aux pics de concentrations en Chl *a*.

V.2.2.5. Molécules de petits poids moléculaires neutres

Les concentrations en LMWN sont comprises entre 110 et 700 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (figure V.29). Les teneurs maximales sont observées en été ($\sim 500 \mu\text{gC.L}^{-1}$) et les teneurs minimales dès l'automne jusqu'au début du printemps. Les concentrations augmentent de manière beaucoup plus marquée au printemps en 2018, peut être sous l'effet d'un bloom phytoplanktonique. Néanmoins, en 2017 et en 2018, des concentrations élevées en LMWN se maintiennent tout l'été voire pendant une partie de l'automne. De plus, aucune corrélation significative n'existe entre les concentrations en LMWN et celles en Chl *a* en 2018 ($pvalue = 0,4310$; $n = 11$; $R^2 = 0,06$).

Parmi les auteurs ayant déjà travaillé sur cette famille de composés en milieu marin, Penru et al (2013) observent une évolution similaire des concentrations avec des niveaux bas en hiver ($\sim 400 \mu\text{gC.L}^{-1}$) et des niveaux plus élevés en été ($\sim 600 \mu\text{gC.L}^{-1}$) dus à l'activité biologique. En mer Méditerranée occidentale, des niveaux de concentrations plus faibles ont aussi été observés (200 - 400 $\mu\text{gC.L}^{-1}$) mais la saison de prélèvement n'est pas précisée (Baghoth et al., 2008).

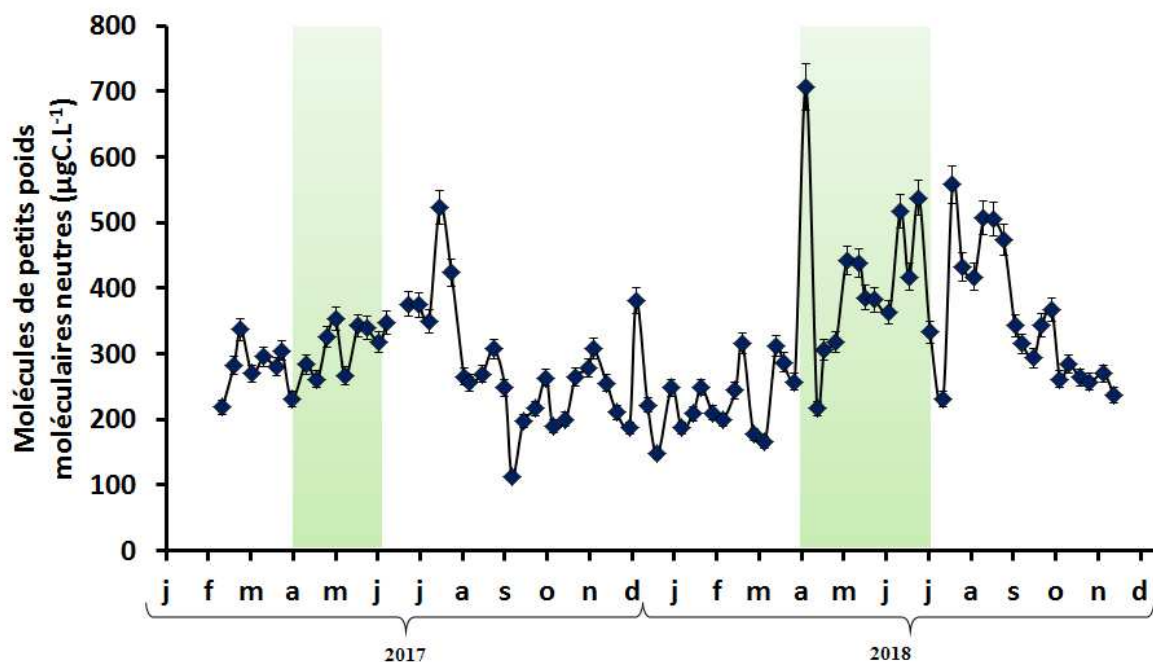


Figure V.29 : Evolution des concentrations en molécules de petits poids moléculaires neutres dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanktonique sont matérialisées en vert.

V.2.2.6. Molécules de petits poids moléculaires acides

A l'inverse des études ayant utilisé la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection en milieu marin, les LMWA n'ont pas été détectés dans plus de 95 % de nos échantillons. Seuls trois points ont pu être quantifiés, dont une mesure exceptionnelle de 91 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ le 25 Juin 2018.

V.2.2.7. Carbone organique hydrophobe

Les concentrations sont comprises entre 10 et 1537 $\mu\text{gC.L}^{-1}$ (figure V.29). Le COH est très faible voire non détecté en automne 2017, en hiver 2017-2018 et au printemps 2018. Les valeurs les plus fortes sont mesurées en été (1300 - 1600 $\mu\text{gC.L}^{-1}$) et au printemps en 2017 (~600 $\mu\text{gC.L}^{-1}$). L'occurrence de fortes concentrations intervenant après les blooms phytoplanktoniques indique l'intervention d'un autre forçage environnemental que l'activité des microalgues ou l'apport continental par les fleuves.

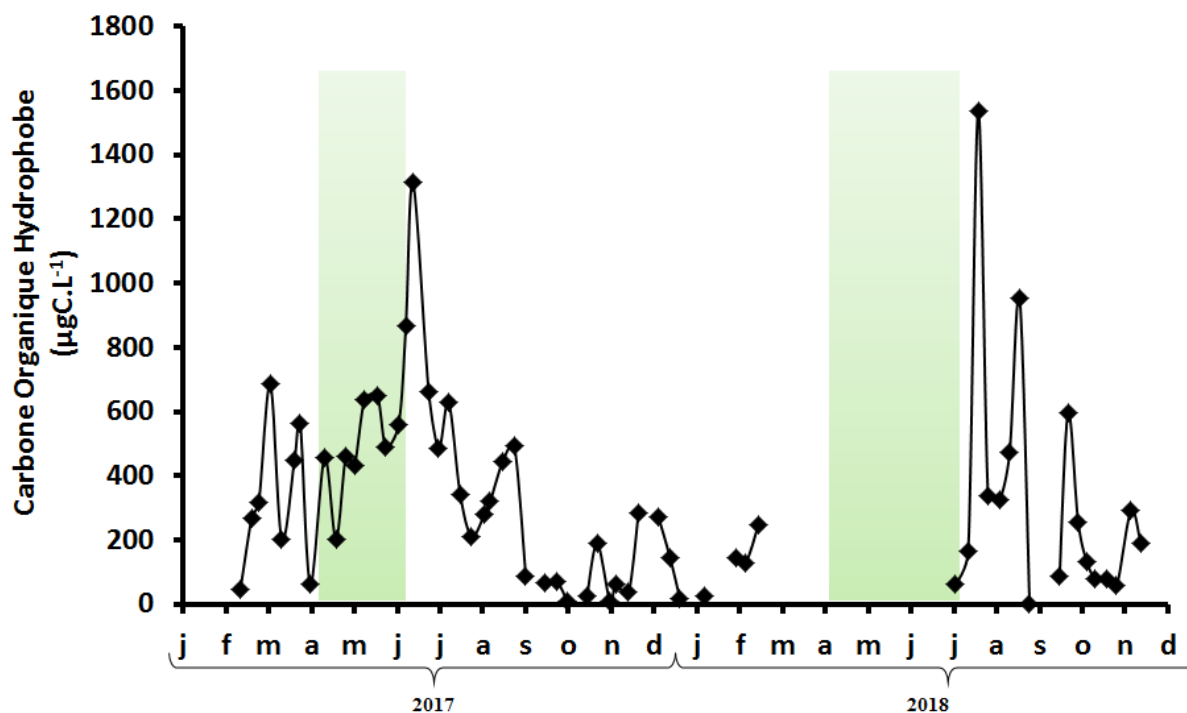


Figure V.30 : Evolution du carbone organique hydrophobe dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

V.3. Discussion

Le phytoplancton est un acteur majeur du cycle de la MO dans les zones côtières (Savoye et al., 2003; Lowe et al., 2014; Lebreton et al., 2016; Liénart et al., 2017). Dans cette étude, le cycle de développement phytoplanctonique impacte la majorité des distributions temporelles des fractions de la MOD. A l'instar des études menées dans la rade de Brest par Delmas et al. (1983) et Birrien et al., (1991), le bloom phytoplanctonique a lieu au printemps, aux mois d'Avril, Mai et Juin, comme le montrent les pics de Chl *a* (figure V.13) et de COP (figure V.17) en 2017 et 2018. Le rapport Chl *a*/COP inférieur à 200 à ces périodes indique la prédominance de la MOP phytoplanctonique par rapport à la biomasse hétérotrophe dans les eaux de la rade de Brest (Savoye et al., 2003; Cadier, 2016; Liénart et al., 2017).

V.3.1. Excrétion de MOD par les microalgues

La faible augmentation des concentrations en COD au moment des blooms phytoplanctoniques contraste avec l'augmentation significative des concentrations en BP, SH,

et BB en début de printemps, surtout en 2018. L'absorption UV spécifique à 254nm (SUVA) globale présente une variabilité qui suggère une production biologique de MOD (figure V.31). En effet, de Mars à Juin 2018, les valeurs de SUVA particulièrement faibles (< 2) indiquent d'une présence de composés particulièrement aliphatiques typiques de la MOD aquagénique (Mash et al., 2004).

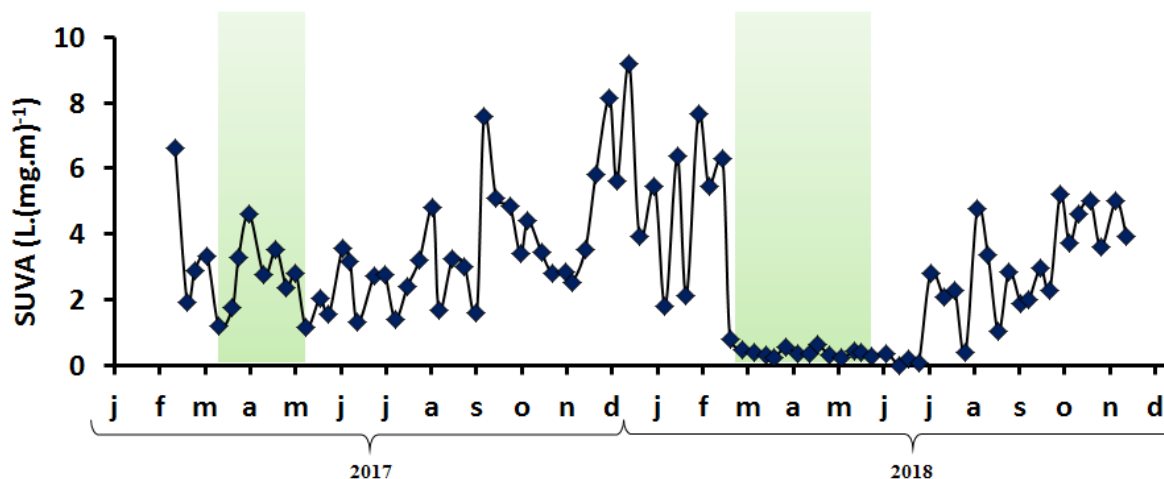


Figure V.31 : Evolution du SUVA dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les périodes de bloom phytoplanctonique sont matérialisées en vert.

Parmi les fractions de taille de la MOD séparées par l'appareillage, les BP sont constitués de composés majoritairement aliphatiques (Huber et al., 2011). Dans cette étude, les concentrations en BP augmentent de 160 % entre l'hiver et le printemps. Ces augmentations interviennent au moment des blooms phytoplanctoniques.

Plusieurs études ont démontré que le phytoplancton peut produire des biopolymères sous la forme de polysaccharides (Villacorte et al., 2015; Han et al., 2016) ou de protéines (Pivokonsky et al., 2006; Henderson et al., 2008). Durant la phase exponentielle du développement phytoplanctonique, jusqu'à 70 % de polysaccharides peuvent être excrétés sous la forme de BP dans les eaux de surface (Mykkestad, 1995). La formation de mucilage (ou TEP – *Transparent Exopolymeric Substances*) est l'une des conséquences principales de l'excrétion massive de polysaccharides (Villacorte et al., 2013). La sénescence des cellules phytoplanctoniques est aussi à l'origine d'une libération de MOD dans le milieu aquatique (Danhiez, 2016).

La production de BP a toutes les étapes du développement phytoplanctonique (croissance, phase stationnaire et sénescence) peut expliquer l'augmentation des concentrations au printemps, comme l'indique les corrélations BP/Chl *a* présentées sur la figure V.24.

Néanmoins, la deuxième augmentation des concentrations en BP à l'été 2017, en dehors de la période de bloom phytoplanctonique, met en évidence que d'autres microorganismes sont impliqués dans la production de BP extracellulaires. Ces pics dans les concentrations en BP, en décalage avec les maxima de Chl *a* semblent se produire dans les phases de diminution du rapport Chl *a*/phéo (figure V.32), après chaque bloom phytoplanctonique. Cela indique que les BP peuvent être libérés lors de la dégradation du bloom phytoplanctonique, en partie réalisée par les bactéries hétérotrophes.

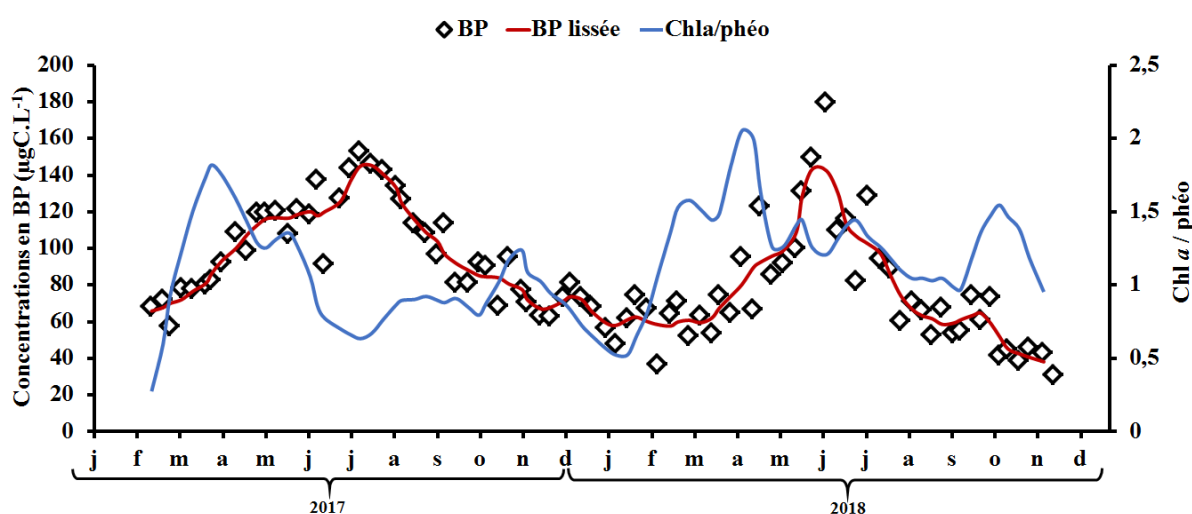


Figure V.32 : Evolution des concentrations en BP superposé à celle du rapport Chl *a* / phéo. La courbe de l'évolution du rapport Chl *a*/phéo a été lissée (lissage non-paramétrique de Loess).

V.3.2. Production de BP par dégradation bactérienne de la MOP

La persistance de concentrations élevées en BP dans la rade de Brest jusqu'à la fin des mois de Juillet de chaque année étudiée, c'est-à-dire après le bloom phytoplanctonique, peut être reliée à une dégradation de la MOP fraîche lors du développement de la population bactérienne. En effet, la majeure partie de la MOP phytoplanctonique est utilisable par les bactéries (Azam et Malfatti, 2007 ; Attermeyer et al., 2018). Un bloom phytoplanctonique entraîne simultanément ou en léger décalage (quelques semaines d'écart) une augmentation importante de la population bactérienne dans le milieu (Belzile et al., 2008). Cette dynamique est visible dans la rade de Brest (figure V.33). Le nombre total de bactéries est multiplié par 2 entre l'hiver, où leur nombre ne dépasse pas le million de cellules par mL, et le printemps-été (Avril - Juillet) où elles peuvent atteindre entre 1 et 1,6 millions de cellules par mL. Ensuite,

entre Septembre en Novembre, un deuxième développement bactérien intervient, plus important en 2017 qu'en 2018.

Pour leur développement les bactéries hétérotrophes utilisent préférentiellement le réservoir de carbone particulaire issu de la biomasse sénescente (Koch et al., 2014). Les bactéries hétérotrophes se développent principalement sur la MOP et la dégrade à l'aide d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (Arnosti, 2011; Arnosti et al., 2018; Yang et al., 2019). Cette hydrolyse permet la production de composés biodisponibles tels que des dérivés de polysaccharides et de protéines (Kujawinski, 2011; Mangal et al., 2016). Les bactéries hétérotrophes sont ensuite capables de reminéraliser ces produits de dégradation. Une partie de ces produits de dégradation échappe à la minéralisation directe et est relarguée dans le milieu sous forme de MOD labile de haut poids moléculaire (Benner et Amon, 2015). Ces molécules de haut poids moléculaires composent majoritairement la famille des BP.

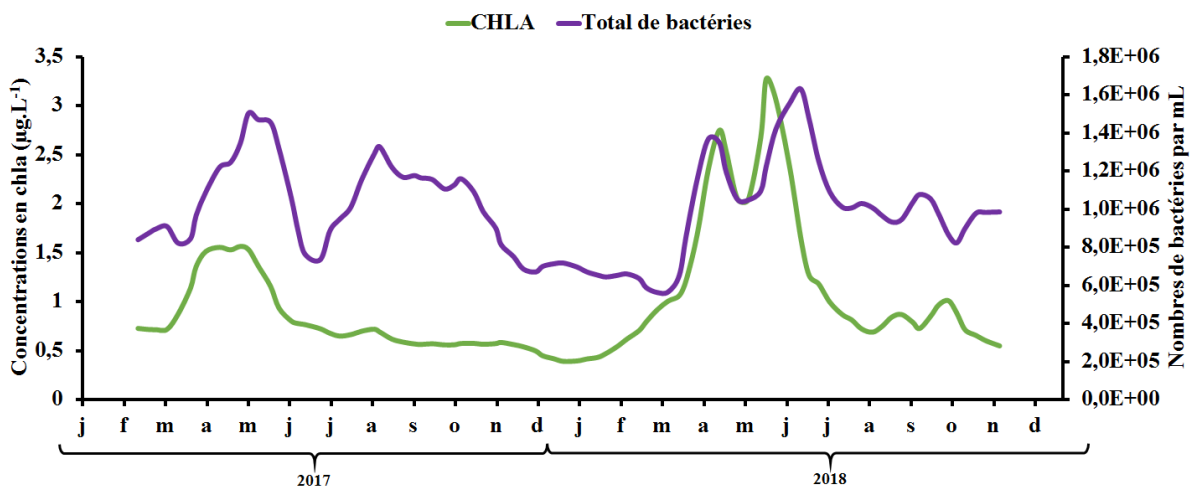


Figure V.33 : Evolution des concentrations en Chl a et du nombre de bactéries dans la rade de Brest en 2017 et 2018. Les courbes ont été traitées selon un lissage non paramétrique de Loess.

L'évolution des concentrations en BP ainsi que les variations annuelles du nombre total de bactéries sont présentés sur la figure V.34. L'augmentation des concentrations en BP jusqu'à leurs maxima annuels peut être associée avec une augmentation de l'activité bactérienne en 2017 mais aussi avec un pic dans le développement bactérien en 2018. Ensuite, à partir des mois de Juillet, les concentrations en BP diminuent alors que le nombre de bactéries reste relativement grand jusqu'à la fin de l'automne (~1 à 1,2 millions de bactéries par mL).

La deuxième vague de développement bactérien qui intervient surtout à partir des mois de Juillet de chaque année, semble liée à la fois à l'augmentation des concentrations en BP mais

aussi à leur chute puisque le nombre de cellules reste relativement élevé pendant plusieurs mois (Août – Octobre).

Ces résultats permettent de mieux définir la dynamique saisonnière des BP en milieu côtier. L'augmentation des concentrations en BP au printemps ne semble pas s'expliquer exclusivement par une excrétion active de BP lors du développement phytoplanctonique mais plutôt par une combinaison d'activité autotrophique et hétérotrophique. En effet, bien qu'une petite fraction des BP puisse être excrétée, il semble que les BP soient principalement produits, dès la fin du printemps, par dégradation bactérienne de la MOP fraîche produite au cours du bloom printanier. Par ailleurs la diminution des concentrations en BP au mois d'Août indique que les BP issus de la dégradation de la MOP phytoplanctonique peuvent être utilisés comme source de nutriments utilisés par les bactérie hétérotrophes (Koch et al., 2014; Lechtenfeld et al., 2015; Kinsey et al., 2018; Shields et al., 2019)

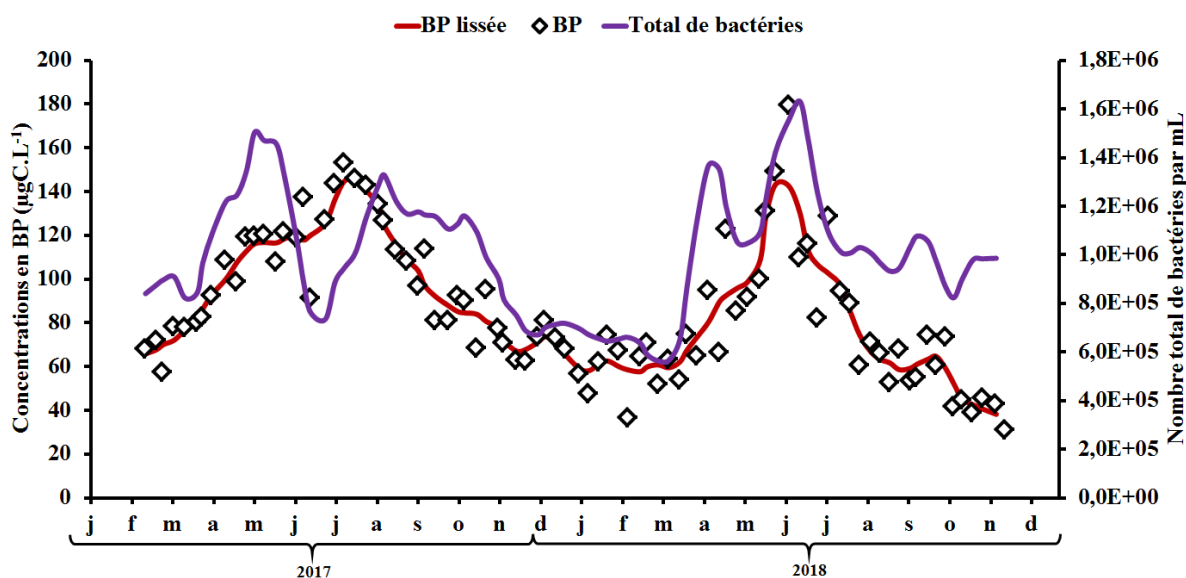


Figure V.34 : Evolution des concentrations en BP et du nombre total de bactéries dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

V.3.3. Production autochtone de LMWN

Les concentrations en LMWN augmentent en parallèle des concentrations en BP (figure V.36) en 2017 et en 2018. Cependant, alors qu'elles suivent la tendance des concentrations en BP en 2017, en 2018 les concentrations en LMWN persistent au-delà du pic de concentrations en BP jusqu'à fin Septembre.

A l'instar des BP, l'augmentation des LMWN pourrait avoir plusieurs origines. Elle pourrait être d'origine algale. Villacorte et al., (2013), observent une augmentation des concentrations de ces composés de petits poids moléculaire lors de la sénescence des cellules phytoplanctoniques. La dégradation bactérienne de composés de plus haut poids moléculaires pour les rendre assimilable métaboliquement pourrait aussi expliquer une part de l'augmentation des concentrations en LMWN. En effet, l'assimilation des composés par les bactéries est contrainte par la taille des molécules (Amon et Benner, 1996). Ces dernières doivent être inférieures à 500 Da pour permettre le passage au travers de la membrane bactérienne (Kirchman et al., 2012).

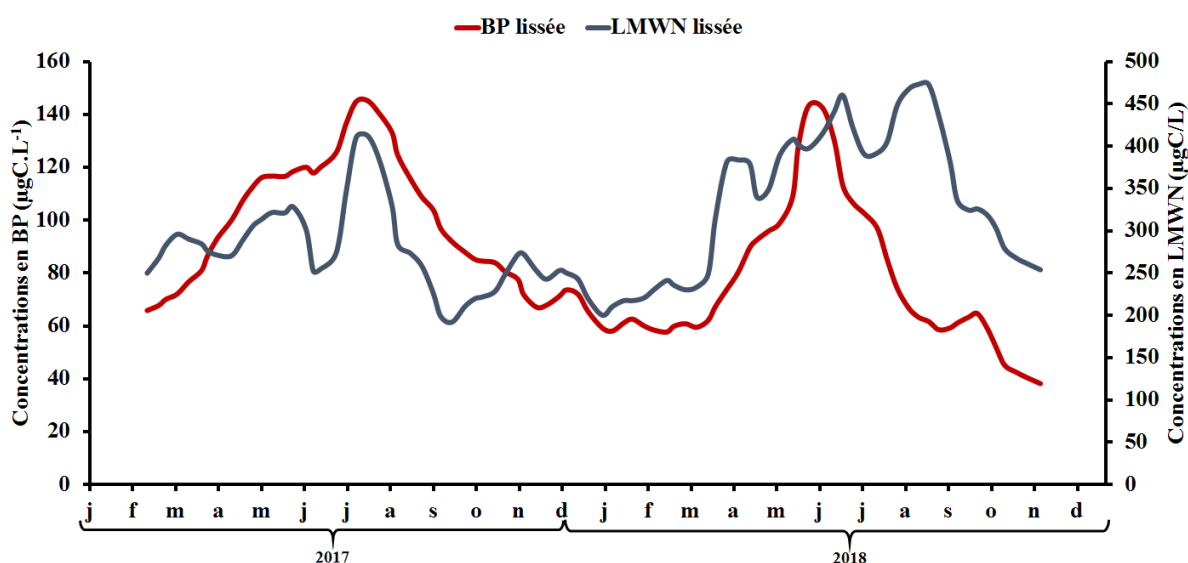


Figure V.35 : Evolution des concentrations lissées (Loess) en BP et en LMWN dans la rade de Brest en 2017 et 2018.

Les concentrations en LMWN commencent à augmenter au moment des pics de Chl *a* (figure V.36a). Les concentrations maximales en LMWN sont observées durant la seconde période de développement bactérien, en Juillet pour 2017 et de Juillet à Septembre pour 2018 (figure V.36b).

Ces résultats, associés à ceux de la figure V.35 sur l'augmentation parallèle des concentrations en LMWN et en BP, semblent indiquer que les bactéries sont impliquées dans la production de LMWN, probablement sur la base d'une hydrolyse des BP. La diminution des concentrations en LMWN dès le mois d'Août 2017 pourrait être le signe d'une utilisation de cette fraction de la MOD par les bactéries. Néanmoins, en 2018, les concentrations en LMWN persistent jusqu'à l'automne.

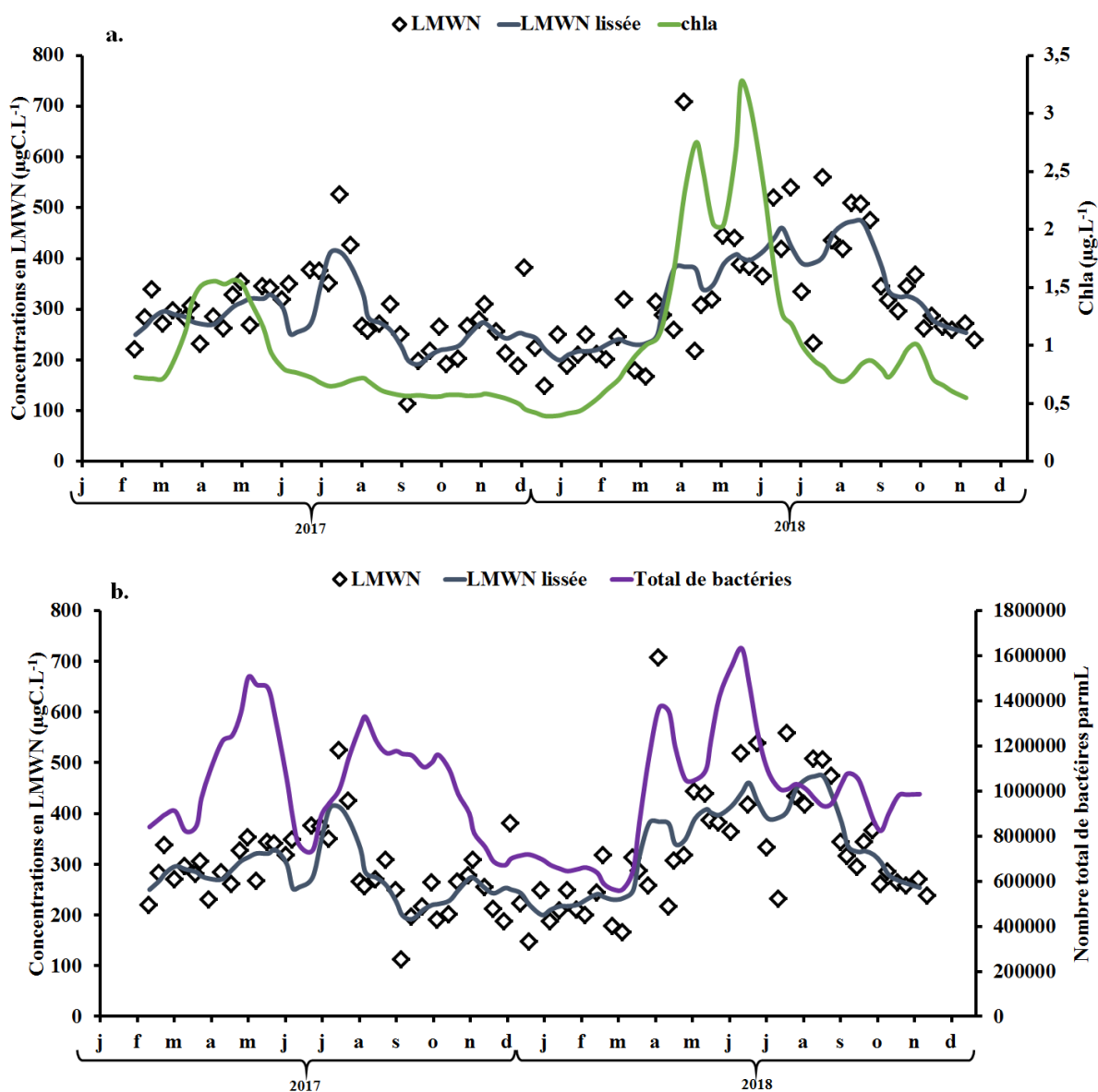


Figure V.36 : Evolution des concentrations brutes et lissées en LMWN dans la rade de Brest en 2017 et 2018 superposées avec : a. les concentrations en chlorophylle a ; et b. le nombre total de bactéries.

Malgré que les bactéries hydrolysent les BP pour produire des LMWN assimilables, les concentrations en LMWN persistent à des niveaux élevés durant plusieurs semaines. L'accumulation des LMWN dans les eaux de surface peut être expliquée par deux hypothèses :

- Il existerait un découplage entre les cinétiques d'hydrolyse des BP et d'assimilation des LMWN par les bactéries (Burdige et Komada, 2015). Ce genre de comportement a déjà été observé dans d'autres études lors d'une faible disponibilité en nutriments (Church et al., 2008) ou lorsque la pression du zooplancton est trop importante sur les communautés bactériennes (Thingstad et al., 1997).

- Les composés de la fraction des LMWN observés sont en réalité des molécules réfractaires à la dégradation. En effet, selon le continuum de réactivité liée à la taille proposé par Amon et Benner (1996), les composés de petits poids moléculaires ont des temps de séjour dans la colonne d'eau plus importants que les composés de hauts poids moléculaires. Ainsi, hormis les acides aminés, et les sucres libres, la plupart des composés de petits poids moléculaires peuvent être qualifiés de réfractaires (Dittmar et Kattner, 2003). Cette caractéristique s'explique par le paradigme du continuum taille-réactivité (Benner et Amon, 2015) dans lequel les microorganismes transforment la MOD labile de hauts poids moléculaires en MOD réfractaire de faibles poids moléculaires (Jiao et al., 2010; Osburn et al., 2019).

V.3.4. Production autochtone de SH et de BB

Les SH sont considérées comme des composés terrigènes et réfractaires à la dégradation (Aiken, 1985). Les BB sont opérationnellement définis comme une fraction de taille plus petite que les SH mais ils sont aussi soupçonnés d'être des produits de dégradation des SH (Huber et al., 2011) d'où parfois l'appellation commune des deux fractions réunies « SH-like » (Her et al., 2016).

Pourtant, à part l'augmentation des concentrations en Janvier-Février 2018 que l'on pourrait attribuer à l'apport de MOD par les rivières, les concentrations atteignent leur maximum au printemps, plus ou moins au même moment que le bloom phytoplanctonique. Les tests de Pearson présentés dans la section « Résultats » ont démontré la corrélation significative des concentrations en Chl *a* avec celles en SH (2018) et en BB (2017 et 2018) au moment des blooms.

Les SH peuvent être produites de matière autochtone sur la base de la dépolymérisation des BP. En effet, l'utilisation des protéines pour la production de composés assimilables par les bactéries pourrait être la source de composés de type SH présents dans l'eau (Chu et al., 2015; Osburn et al., 2019). Une deuxième hypothèse est l'agrégation de composés de petits poids moléculaires comme les LMWN, dont les concentrations augmentent à ce moment de l'année. (Piccolo et al., 2001 ; Romera Castillo et al., 2014).

Pour ce qui est des BB, la variabilité des concentrations présente une augmentation au printemps 2018 en même temps que l'augmentation des BP ou des LMWN. Ceci pourrait être expliqué par la taille de cette fraction. En effet, les BB sont des composés de taille inférieure à

500 Da, soit la taille limite pour l'assimilation des composés par les bactéries (Arnosti et al., 2011). Ainsi, l'augmentation de $200 \mu\text{g.C.L}^{-1}$ observée au printemps pourrait être expliquée par un apport de MOD autochtone *via* l'hydrolyse de composés de plus hauts poids moléculaire de type BP avant leur assimilation. Une autre hypothèse pourrait être celle de l'excrétion directe par les microorganismes ou la libération dans la colonne d'eau par broutage du zooplancton.

Sur la base de la théorie de la formation des SH par agrégats supramoléculaires de composés de plus petits poids moléculaires (Piccolo et al., (2001), on peut aussi imaginer que des composés comme les BB puissent s'associer par interaction non-covalente pour former des SH de plus hauts poids moléculaires. Néanmoins, l'absence de corrélation signification entre les concentrations en BB et en SH au moment du bloom phytoplanctonique de 2018 sont contraires à ce scénario (*p-value* : 0,1315 ; $n = 11$; $R^2 = 0,2$).

V.3.5.Mise en évidence de descripteurs de l'activité biologique

Une analyse par composante principale (ACP) des séries temporelles concernant les concentrations en carbone des fractions et des données SOMLIT utilisées dans cette étude est présentée sur la figure V.37.

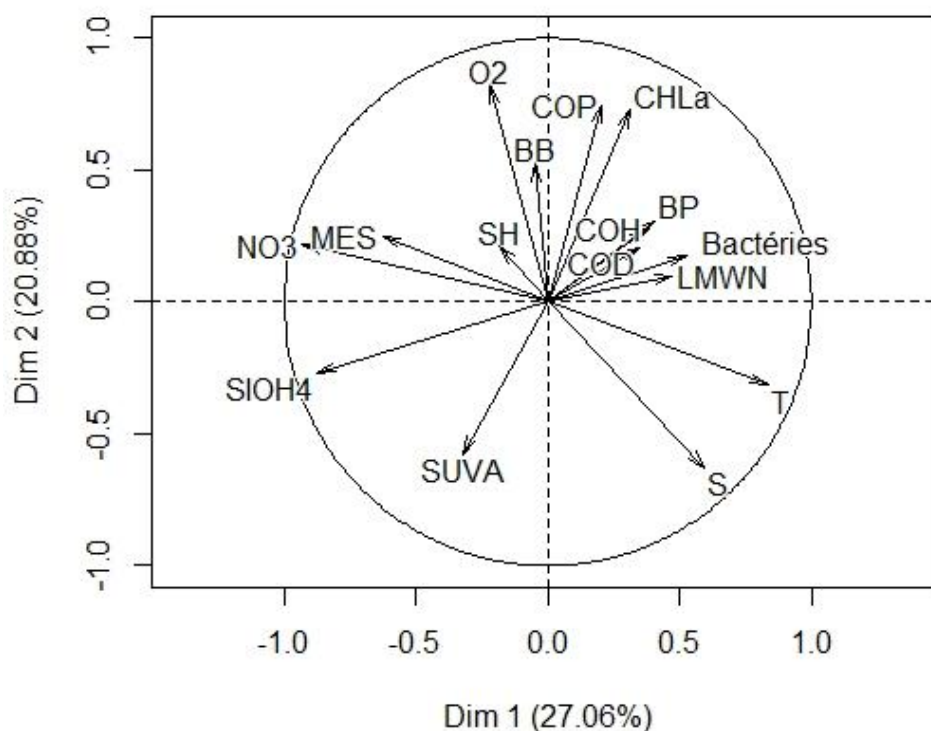


Figure V.37 : Analyse par composante principale des données SOMLIT et de la MOD analysées par SEC-mDEC.

La variabilité des données est expliquée à 27,06% par la composante principale 1 (Dim1) et à 20,88 % par la composante 2 (Dim2). Au vu de la répartition des paramètres présentés ici, la Dim1 correspond à la dessalure annuelle avec les nutriments (nitrates, silicates) et la MES d'un côté, anti-corrélés avec la salinité et la température. La Dim2 peut être associée avec le bloom phytoplanctonique annuelle avec l'association des paramètres Chl *a*, COP et O₂ (oxygène dissous).

Le SUVA est anti-corrélé avec le bloom phytoplanctonique, ce qui est cohérent avec sa variabilité présentée sur la figure V.31 où les valeurs faibles de SUVA étaient mesurées lors du bloom phytoplanctonique 2018.

Les SH et les BB sont à une position intermédiaire entre les paramètres représentatifs des apports continentaux (MES, NO₃⁻) et ceux de l'activité phytoplanctonique (COP, Chl *a*). La variabilité des SH n'est que très peu expliquée par l'ACP (< 10%). En revanche, pour les BB, cette position sur l'ACP pourrait être expliquée à la fois par l'augmentation de leurs concentrations au moment du bloom phytoplanctonique mais aussi par un apport hivernal d'origine probablement continental (Décembre 2017 – Janvier 2018 (figure V.26).

Pour mieux discriminer les différences entre production autotrophe et hétérotrophe, une deuxième ACP a été réalisée en éliminant les paramètres liés aux apports continentaux (salinité, nutriments, MES). Elle est présentée sur la figure V.38.

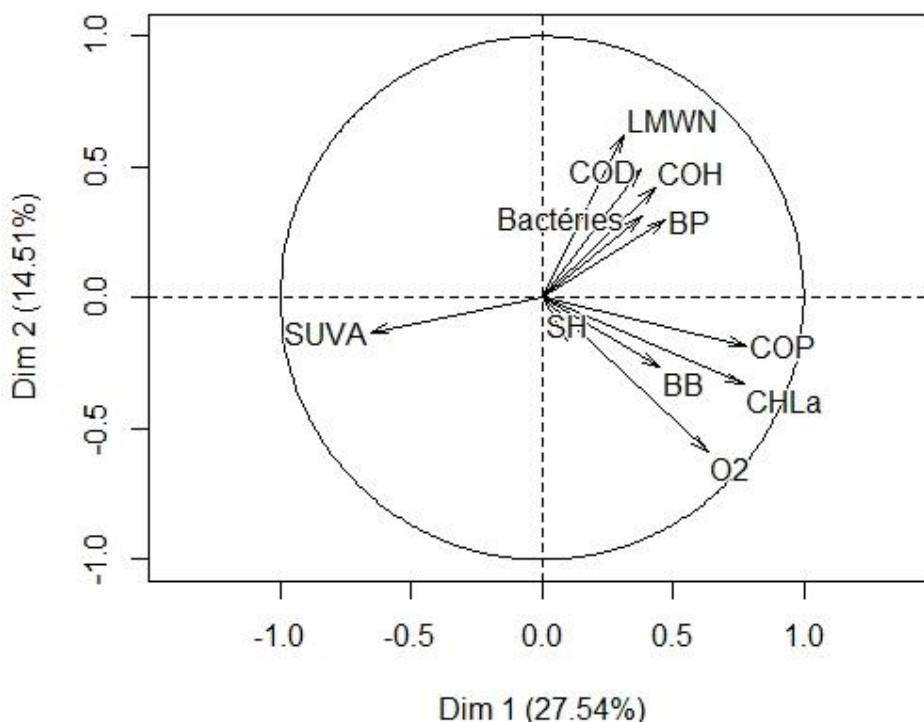


Figure V.38 : Analyse par composante principale des différentes familles de composés de la MOD en fonction des paramètres SOMLIT proxys de la production autotrophe et hétérotrophe.

Sur cette figure, il apparaît clairement que les BP et les LMWN sont associés à l'activité bactérienne tandis que les BB, ainsi que les SH dans une moindre mesure, sont plutôt associés à l'activité phytoplanctonique (Chl *a*).

Ce résultat met en avant l'importance de la biodégradation par les bactéries dans la production de BP et de LMWN. Ainsi, l'association de ces deux composés de taille différentes pourraient mettre en évidence l'hydrolyse enzymatique par les bactéries des composés de haut poids moléculaires (BP) vers les composés de plus petits poids moléculaires (LMWN) (Šantić et al., 2012; He et al., 2016), en accord avec le concept de taille-réactivité.

Le diagramme des individus (figure V.39) permet de projeter les échantillons sur l'ACP afin d'identifier des groupes dont la dynamique serait contrôlé par les variables utilisées pour la détermination des composantes principales. Ici, les échantillons du suivi hebdomadaire sont répartis entre 1 (24/02/2017) et 86 (17/11/2018). Sur la figure V.39, les échantillons ont pu être regroupés par saison. En effet, il semble que les échantillons printaniers (Mars-Avril-Mai) soient associés avec le bloom phytoplanctonique durant lequel MOP et BB sont produits. Les échantillons estivaux (Juin – Juillet –Août) sont quant à eux contrôlés par la dynamique des bactéries et l'excrétion de BP et de LMWN. Le cycle temporel fait apparaître les BP avant les LMWN, ce qui est cohérent avec les mécanismes de dégradation de la MOP phytoplanctonique discutés précédemment. Enfin, les échantillons d'automne (Septembre – Octobre –Novembre) et d'hiver (Décembre – Janvier – Février) sont regroupés mais ne sont pas expliqués que par le SUVA, sur cet exemple, ce qui est révélateur d'une association avec de la matière plus aromatique (et terrigène) que celle qui définit les échantillons estivaux (aliphatique). Par extrapolation, on peut supposer que ces échantillons sont plutôt associés avec les apports continentaux (nitrates, MES...), ce qui correspond bien à ce qui a été observé dans cette étude.

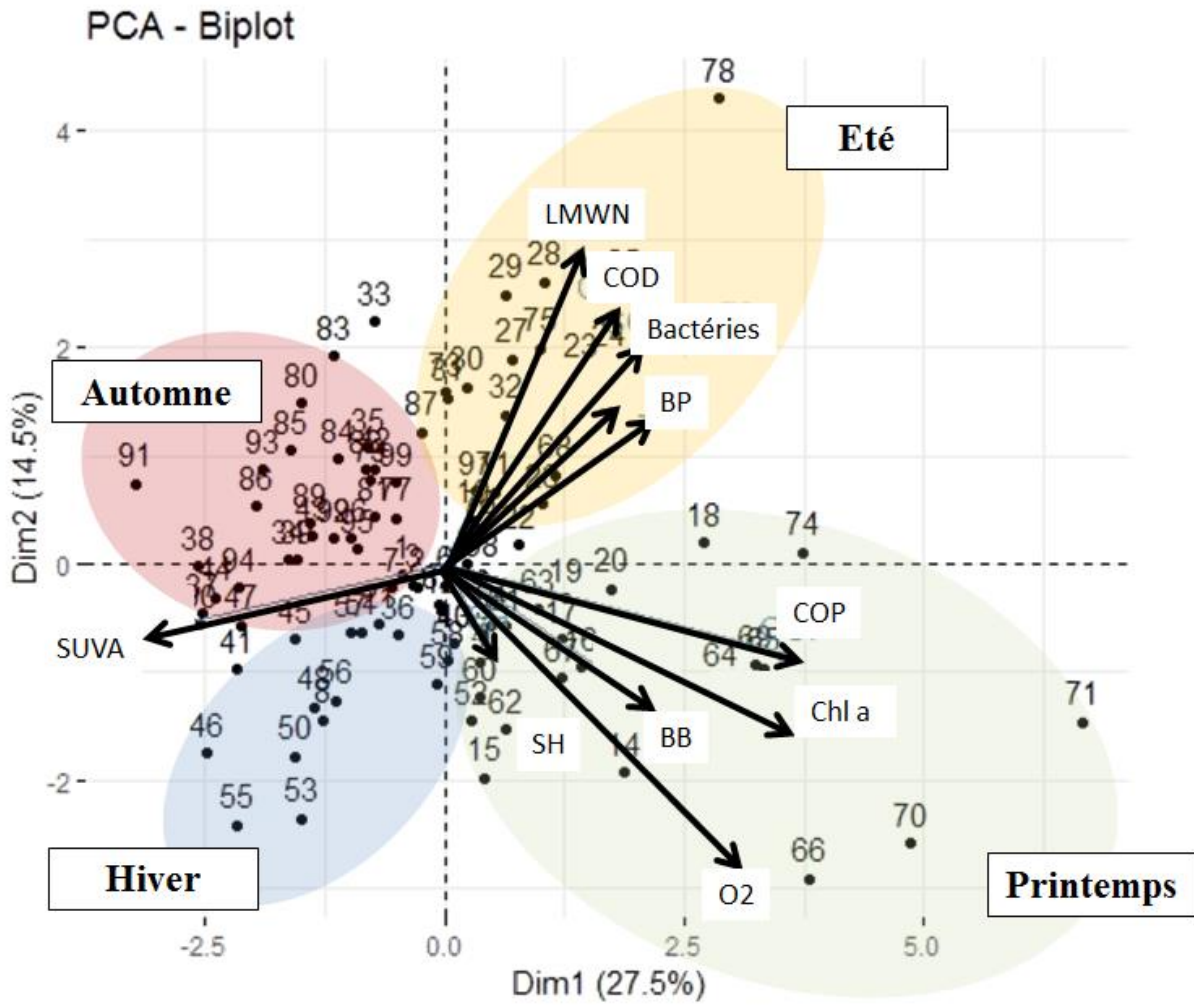


Figure V.39 : Diagramme des individus de l'ACP des données SOMLIT correspondant aux activités autotrophes et hétérotrophes et de la MOD analysée par SEC-mDEC. Les numéros correspondent aux échantillons. Ils sont rangés par ordre croissant du 24 Février 2017 (n°1) au 17 Novembre 2018 (n°86). Les zones colorées représentent les saisons. En vert : printemps (Mars – Avril – Mai) ; en jaune : été (Juin – Juillet – début Août) ; en rouge : automne (fin Août - Septembre – Octobre – Novembre) ; en bleu : hiver (Décembre – Janvier – Février).

V.4. Conclusion

Grâce à un suivi hebdomadaire des paramètres physico-chimiques des eaux de la rade de Brest, deux périodes de développement phytoplanctonique d'intensité différente ont été mise en évidence. Sur la base de ce cycle biologique, l'étude de la MOD et de ses différentes fractions a permis de mettre en évidence que plusieurs fractions de tailles sont directement liées à l'activité des microorganismes autotrophes et/ou hétérotrophes.

L'analyse par composante principale a permis d'éclairer la relation entre les différentes fractions de taille de la MOD et les microorganismes subdivisés en deux entités distinctes : phytoplancton (défini à partir des concentrations en Chl *a*) et bactéries. Sur la base de ces résultats et de ceux des séries temporelles présentées dans ce chapitre, il apparaît que l'activité bactérienne joue un rôle prépondérant dans la dynamique des BP et des LMWN. En effet, les BP, molécules de haut poids moléculaires, semblent être produits principalement lors de la dégradation bactérienne du bloom phytoplanctonique printannier. Cette même dégradation bactérienne peut aboutir à la production de LMWN par hydrolyse enzymatique des BP. La diminution des concentrations en LMWN indique aussi une potentielle utilisation par les bactéries.

Enfin, l'augmentation des concentrations en SH et en BB lors des blooms phytoplanctoniques indiquent une source autochtone de ces composés dans la rade de Brest alors qu'ils sont plus souvent décrits comme terrigènes et réfractaires à la biodégradation. Dans le cas des SH, cette augmentation pourrait être liée à la réaction d'hydrolyse des composés de plus haut poids moléculaires (BP). Pour ce qui est des BB, l'association forte avec la Chl *a* sur l'ACP suggère une origine plus phytoplanctonique, peut être par excrétion directe.

Un schéma récapitulatif des différents mécanismes impliquant les microorganismes et les fractions de taille de la MOD est présenté sur la figure V.40. Il constitue un continuum de taille et de réactivité permettant de mieux appréhender l'impact des microorganismes sur la composition de la MOD dans les eaux côtières de la rade de Brest. Les descripteurs proposés sont :

- Les biopolymères : descripteurs de dégradation de la biomasse phytoplanctonique
- Les molécules de petits poids moléculaires neutres (LMWN) : descripteurs de l'activité bactérienne par la dégradation des BP et l'utilisation/production des LMWN

- Les building-blocks (BB) : descripteurs de l'activité phytoplanctonique par excréation directe
- Les Substances Humiques : descripteurs indirects de la dégradation de la MOD de plus haut poids moléculaires (BP)

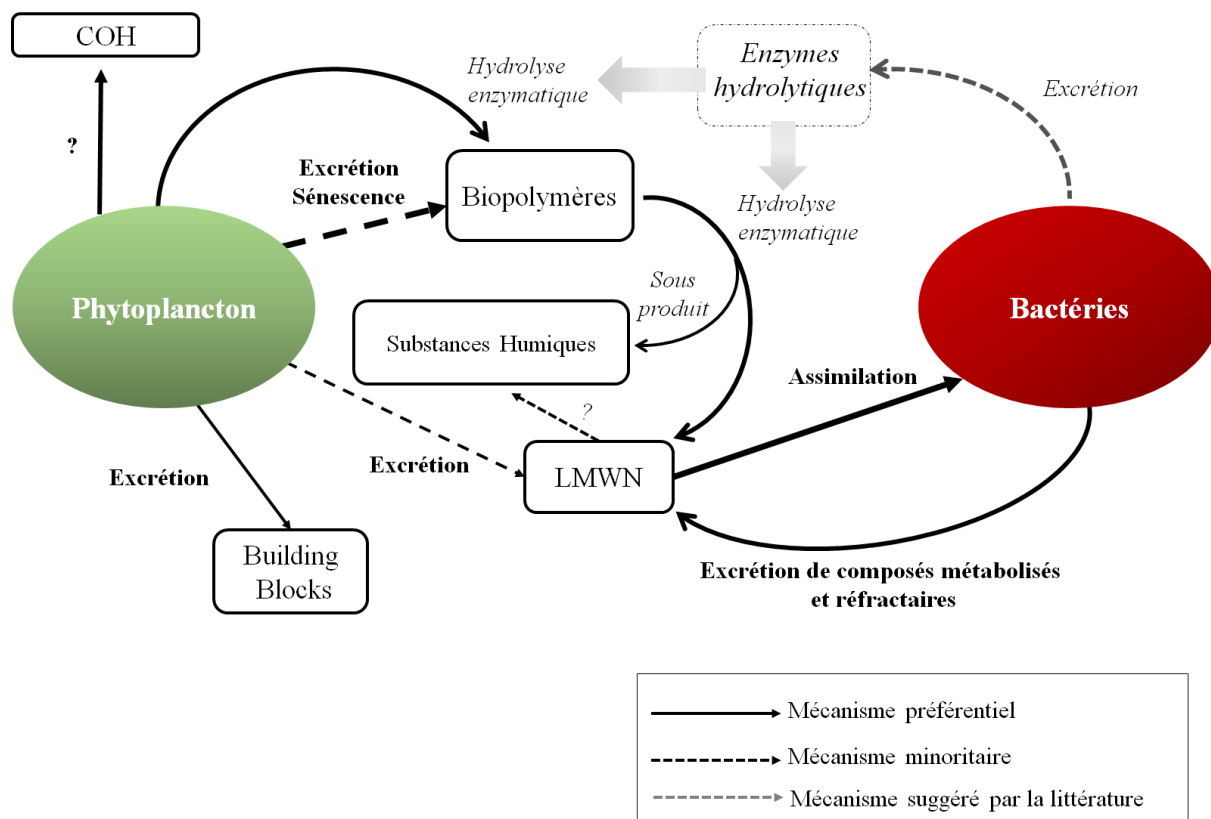


Figure V.40 : Schéma des différents mécanismes impliquant le phytoplancton et les bactéries dans la dynamique des fractions de taille de la MOD. Les pourcentages indiqués en bleu sont extraits de la table de corrélation de Pearson.

Ce chapitre propose une voie intéressante d'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection dans l'analyse des eaux côtières puisqu'il apparaît qu'au moins trois des familles de composés séparées sont liées directement ou indirectement au bloom phytoplanctonique. Néanmoins, l'absence d'estimation de l'activité enzymatique, comme cela avait été réalisée par Villacorte et al. (2015) ou le peu d'informations que nous disposons sur l'effet du zooplancton ne permettent pas d'approfondir cet aperçu des relations entre MOD et microorganismes en zone côtière. Parmi les autres perspectives associées à ces résultats, des analyses génomiques des bactéries hétérotrophes pourraient mettre en évidence un lien entre la diversité génétique bactérienne et les concentrations en BP et LMWN. En effet, le changement d'abondance des espèces bactériennes dans la rade de Brest, durant le cycle annuel, pourrait

expliquer la dynamique des fractions de composés liées à la dégradation bactérienne Un résultat anticipé pourrait être le changement d'abondance des bactéries dominantes de type SAR11 dans la rade de Brest (spécialisées dans l'utilisation des composés de type LMWN) pour d'autres espèces plus adaptées à l'utilisation de composés de haut poids moléculaire comme les BP, ce qui expliquerait la diminution de leurs concentrations dès la fin de l'été (Lemonnier, 2019). L'analyse de la MOD à d'autres stations SOMLIT, comme celles de la Méditerranée où la boucle microbienne est importante, pourrait permettre de préciser le rôle des fractions de taille étudiées ici.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Lors de ce travail, **la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection (SEC-mDEC)** a été choisie pour étudier la spéciation de la MOD en milieu estuarien et côtier. L'intérêt principal de cet outil provient du caractère global et semi-spécifique de la SEC-mDEC. En effet, cette technique permet à la fois l'analyse du COD global de l'échantillon et la séparation de la MOD en six fractions de taille et de nature différente caractérisées par trois détecteurs (carbone, azote, UV). Cela permet de s'affranchir des biais analytiques engendrés par une analyse uniquement globale (peu de résolution) ou spécifique (non représentative).

L'étude a été réalisée dans deux écosystèmes différents : l'estuaire de l'Aulne et le système côtier de la rade de Brest.

Devant le peu d'informations concernant les performances et les limitations de la SEC-mDEC pour l'analyse des milieux à salinité variable, il est apparu nécessaire de vérifier que la méthode était applicable à l'analyse des eaux estuariennes et côtières. Une analyse préliminaire des chromatogrammes des échantillons en provenance du gradient de salinité de l'Aulne ont permis l'identification de plusieurs interférences analytiques sur l'ensemble des détecteurs de la SEC-mDEC.

Ces interférences ont été confirmées par des expériences en laboratoire sur de l'eau ultrapure enrichie en sel et sur de l'eau de mer irradiée. La présence de sels dans la matrice analysée entraîne une mésestimation des concentrations en carbone de certaines fractions de composés (COD et LMWN) et de l'absorption aux longueurs d'onde de travail des détecteurs UV et d'azote. **Un nouveau protocole d'analyse a donc été proposé.** Celui-ci a consisté, entre autre, dans l'élaboration de plusieurs gammes d'étalonnage réalisée à des salinités différentes. Cette méthode adaptée a été validée par :

- Une intercomparaison de la mesure de COD dans les eaux estuariennes avec la technique couramment utilisée pour l'analyse du COD.
- L'analyse du COD d'un standard international marin faiblement concentré en carbone ($\sim 500 \mu\text{gC.L}^{-1}$).

Les valeurs de limites de détections (LODs) et de répétabilité qui suivent sont données pour l'eau de mer. La limite de détection du COD est de $27 \mu\text{gC.L}^{-1}$. Les LODs des concentrations en carbone sont inférieures à $12 \mu\text{gC.L}^{-1}$ pour les biopolymères (BP), les substances humiques (SH), les building-blocks (BB) et les molécules de petits poids moléculaires acides (LMWA). La LOD des molécules de petits poids moléculaires neutres (LMWN) est de $35 \mu\text{gC.L}^{-1}$.

Pour les détecteurs d'azote et d'UV, les LODs résultent principalement de l'intégration du bruit de la ligne de base. Les LODs des paramètres déterminés par le détecteur UV sont de $0,63 \text{ m}^{-1}$ pour l'absorbance globale (SUVA) et de $0,04 \text{ m}^{-1}$ pour l'absorbance des BP et des SH. Les LODs du détecteur d'azote sont de $3 \mu\text{gN.L}^{-1}$.

La répétabilité est inférieure à 10% pour la détermination des concentrations en carbone (COD et fractions de taille). La détermination du poids moléculaire et de l'absorbance des SH présente des répétabilités, de 2 et 4% respectivement

Cette première étape validée, la méthode d'analyse a été appliquée à l'étude de la spéciation de la MOD en milieu estuarien et côtier.

L'étude menée dans l'estuaire de l'Aulne a été réalisée à des périodes contrastées du cycle hydrologique et biologique. Au total, cela représente sept campagnes de 18 échantillons chacune. Les analyses réalisées par SEC-mDEC mais aussi par fluorescence 3D ont permis la quantification et la caractérisation de six fractions de taille et de nature différentes. La dynamique de ces fractions et de leurs propriétés associées a été expliquée par plusieurs phénomènes environnementaux.

La rivière de l'Aulne est la principale source de MOD dans l'estuaire. Les diagrammes de mélange des différentes fractions de la MOD présentent des concentrations plus élevées à salinité 0 que dans la partie marine de l'estuaire. Cette source prédominante est caractérisée par des apports allochtones importants en SH, BB et COH ; et des apports autochtones minoritaires en BP et LMWN. Les concentrations atteignent leurs maxima au début de la crue annuelle, soulignant l'effet de purge des pluies automnales sur l'ensemble de la MOD.

La MOD fluviale peut être distinguée de la MOD marine par les propriétés de la fraction des substances humiques. Sur la base des concentrations en carbone, de l'aromaticité, des rapports C/N et des indices de fluorescence HIX et BIX de la fraction des SH, les sources fluviales et marines de MOD à l'estuaire ont pu être tracées. Les SH d'origine fluviale sont des

acides fulviques terrigènes et allochtones, aromatiques et pauvres en azote. Les SH d'origine marine sont plutôt aliphatiques, riches en azote et peuvent être qualifiées d'autochtone et/ou d'origine microbienne par les indices de fluorescence.

Le long du gradient halin, les SH fluviales sont altérées chimiquement ou flocculent. Dans la partie marine de l'estuaire ($S > 30$), le caractère terrigène des SH a disparu au profit de substances plus labiles.

L'activité des microorganismes a un impact sur les propriétés de la MOD. Une fraction de MOD autochtone à l'estuaire est révélée par la présence de composés protéiques (fluorescence du tryptophane) dans les BP et les SH. Cette fraction semble être originaire de la biodégradation de la MOP phytoplanctonique (rapports C/N correspondants compris entre 6 et 8) par les bactéries hétérotrophes.

L'activité des bactéries hétérotrophes est aussi visible dans la zone de turbidité maximale (MTZ), identifiée *via* les concentrations maximales en carbone organique particulaire (COP). Les anomalies négatives dans les diagrammes de mélange des BP et des LMWN (fractions biodisponibles) indiquent l'utilisation accrue de la MOD dans cette zone spécifique de l'estuaire.

La MOD réfractaire floccule dans la zone de turbidité maximale. Les anomalies négatives dans les diagrammes de mélange des fractions des SH, BB et COH correspondent à l'emplacement de la MTZ. Ces anomalies négatives correspondent à un pic dans les concentrations en COP, suggérant un effet d'absorption sur les particules.

La remise en suspension des sédiments estuariens lors d'une période de vives eaux pourrait expliquer les anomalies positives dans les diagrammes de mélange du COD ainsi que la fluorescence particulièrement intense du tryptophane correspondante. Ces composés protéiques seraient libérés dans la colonne d'eau à partir de la libération des eaux interstitielles.

Ce travail a permis, pour la première fois, de montrer que **l'utilisation des seules concentrations en carbone organique dissous (COD) n'est pas suffisante pour décrire l'ensemble de la MOD**, comme le démontrent la variabilité entre les diagrammes de mélange des différentes fractions de taille.

En milieu estuarien, l'impact de processus allochtones sur la dynamique de la MOD est très important. De ce fait, la mise en évidence du rôle des processus biologiques autotrophes et hétérotrophes n'est pas évidente à déceler. Dans l'idée de mieux discriminer les fractions de la MOD impliquées dans l'activité des microorganismes, un suivi hebdomadaire de deux ans visant à couvrir l'ensemble d'un cycle annuel a été réalisé dans la rade de Brest. La fréquence d'échantillonnage, calquée sur celle du réseau d'Observation du Milieu Littoral (SOMLIT) a permis l'utilisation d'un ensemble de paramètres physico-chimiques pour caractériser les différentes périodes de productivité. Les résultats mettent en évidence que la totalité des formes de MOD séparées sur SEC-mDEC sont impliquées dans le cycle de développement des microorganismes.

Les biopolymères (BP) sont associées au développement phytoplanctonique. L'augmentation des concentrations en BP en lien avec la dynamique de la Chl *a* et du rapport Chl *a*/phaeo indique que les BP sont excrétés lors de la dégradation de la biomasse. L'association de cette fraction de taille de la MOD avec les bactéries sur l'analyse par composante principale induit que le mécanisme préférentiel de libération de ces composés dans l'eau soit une hydrolyse enzymatique.

Les molécules de petits poids moléculaires neutres (LMWN) sont fortement liées à l'activité bactérienne. Les pics de concentrations des LMWN correspondent aux maxima bactériens. Plusieurs processus peuvent expliquer ce lien entre LMWN et hétérotrophes :

- L'hydrolyse des BP par des enzymes extracellulaires conduirait à une augmentation des concentrations en LMWN. Ces composés ne seraient pas assimilés dans l'immédiat, ce qui expliquerait l'augmentation des concentrations pendant quelques semaines avant leur diminution plus tard dans l'été. Cette augmentation des concentrations en LMWN correspond à une diminution des concentrations en BP, utilisés lors du processus de dépolymérisation enzymatique.
- Les bactéries excrètent des LMWN réfractaires. Ce mécanisme pourrait expliquer la persistance des concentrations en LMWN pendant plusieurs semaines après la fin du bloom phytoplanctonique.

Les Building-Blocks (BB) sont « excrétés » par le phytoplancton. La forte association de cette fraction de taille avec la Chl *a* indique que les BB sont excrétés lors de la phase de croissance du bloom phytoplanctonique.

Les Substances Humiques (SH) sont un sous-produit de l'hydrolyse enzymatique des BP. L'augmentation des concentrations en SH au même moment que le bloom phytoplanctonique suggère un lien évident avec le développement du phytoplancton. D'après la littérature, cette fraction de composés pourrait être un sous-produit de la dépolymérisation de macromolécules comme les protéines (BP), qui a lieu lors de la dégradation bactérienne. Cependant, les concentrations en SH ne sont pas bien représentées par les différentes analyses statistiques présentées dans ce travail.

Perspectives

Axe analytique

Installation d'autres détecteurs

Dans cette étude, l'utilisation d'une autre technique analytique, en l'occurrence ici la fluorescence 3D, a permis d'apporter des informations complémentaires à l'utilisation seule de la chromatographie d'exclusion stérique. Techniquement, la SEC-mDEC possède des circuits préinstallés permettant l'installation d'un fluorimètre en série. Dans les conditions d'analyse actuelles, une matrice d'excitation-émission (EEM) requiert 20 min d'enregistrement. Il faudrait donc arrêter la pompe au moment du passage de la fraction ciblée pour obtenir une matrice bien résolue. Ce délai de 20 min d'enregistrement peut être réduit si les paramètres d'analyse sont modifiés ou si le fluorimètre est programmé pour ne fonctionner qu'à une longueur d'onde de travail. Cette dernière option permettrait d'obtenir des chromatogrammes à des longueurs d'ondes d'excitation-émission préétablies comme celles des fluorophores utilisées dans cette étude.

Un autre détecteur qui pourrait être intéressant et plus facile à mettre en œuvre serait l'infrarouge. La spectrométrie infrarouge apporte des informations sur les structures chimiques qui composent la MOD. Par exemple, les bandes d'absorption des groupes – OH ou C – O indiquent la présence de polysaccharides tandis que la bande – CH₂ correspondrait aux lipides (Villacorte et al., 2013). Cette nouvelle caractérisation de la MOD pourrait indiquer la présence de composés « invisibles » aux détecteurs utilisés dans cette étude. Entre autre, la présence de polysaccharides ou de lipides, cités à plusieurs reprises au travers des chapitres, pourrait être prouvée par ces mesures.

Dosage par la fluorescence

Le dosage par fluorescence nécessite des approfondissements méthodologiques. En effet, les tâches de fluorescence dans nos échantillons correspondent à des structures type. Par exemple, la fluorescence du tryptophane-like est souvent liée à la présence de l'acide aminé tryptophane à l'intérieur de structures protéiques alors que celle de la tyrosine est souvent plus révélatrice de l'acide aminé tyrosine. De même, le dosage par fluorescence peut devenir compliqué du fait de l'impact (*quenching*) que peuvent avoir les tâches de fluorescence les

unes sur les autres (Wang et al., 2016). La fabrication de standards locaux ou l'utilisation de standards internationaux adaptés, purs ou en mélange pourrait s'avérer nécessaire. Un vrai travail de développement analytique est nécessaire sur cette question et le travail présenté ici n'en a apporté que les prémices.

Utilisation d'une technique électrochimique

La DP-CSV (*differential pulse cathodic stripping voltammetry*) est une technique électrochimique permettant de doser les substances humiques. Une méthode adaptée par l'équipe Chimie Marine du LEMAR (Pernet-Coudrier et al., 2013) permet de doser simultanément deux groupes de composés soufrés réduits (type glutathione et type thioacétamide). Ces deux familles de composés semblent être impliquées dans les efflorescences phytoplanctoniques. L'utilisation de la DP-CDV aux environnements côtiers permettrait d'apporter de nouvelles informations sur les processus propres aux environnements côtiers.

Séparation sur les colonnes d'exclusion stérique

De la même manière que notre système d'analyse comporte deux colonnes chromatographiques afin de mieux séparer la MOD, les paramètres d'analyse de la SEC-mDEC, comme le débit ou la taille des pores de la colonne, pourraient être modifiés afin de permettre une meilleure séparation de certaines fractions de composés. Par exemple, une augmentation de la taille des pores des colonnes d'exclusion stérique devrait permettre une meilleure séparation des composés de plus hauts poids moléculaires comme les BP.

D'autres études portant sur l'hydrodynamique des composés lors de la séparation sur SEC estiment que les temps de rétention sont plus définis par l'hydrodynamisme des molécules (Conte et Piccolo, 1999 ; Cameron et al., 1972). Ainsi, prétraiter les échantillons en les chauffant ou en changeant la force ionique de la phase mobile influencerait leur temps de rétention. Ce constat a déjà été réalisé dans le chapitre III puisque l'augmentation de la salinité a un effet direct sur le temps de rétention de la fraction des SH. Ces dernières sont supposées se replier légèrement sur elles-mêmes, réduisant leur diamètre et sortant plus tard sur le chromatogramme. Cependant, à l'inverse de l'augmentation de la force ionique, chauffer les échantillons pourrait entraîner une dénaturation profonde des substances organiques qu'ils contiennent.

Axe environnemental

Détermination du contenu de la fraction du carbone organique hydrophobe (COH)

La détermination du contenu de la fraction du carbone organique hydrophobe est une problématique intéressante puisque cette fraction constitue la deuxième fraction en termes de pourcentages dans les eaux estuariennes, surtout dans la première moitié de l'estuaire. Dans cette étude, il a été suggéré comme hypothèse que le COH était : (i) des substances humiques particulièrement aromatiques et réfractaires ou, (ii) des lipides. Du fait de la détermination de cette fraction par soustraction entre la valeur de COD et la somme des cinq fractions éluées par la colonne, il est impossible de présenter un autre paramètre permettant de mieux caractériser cette fraction.

La désorption des substances adsorbées sur les colonnes et leur récupération *via* le collecteur de fraction utilisé lors des extractions de BP et de SH pour leur analyse en fluorescence pourrait être une solution. Le constructeur de l'appareillage (DOC Labor[®]) ayant recommandé au laboratoire de faire un nettoyage par la soude 0,5M afin d'éluier tous les composés adsorbés des colonnes, un essai d'extraction du COH pourrait être réalisé selon le même principe. Après récupération de la fraction, d'autres procédures d'analyse que la SEC-mDEC devront être utilisées pour la caractériser. La fluorescence 3D pourrait servir à déterminer la présence de substances humiques. Pour le contenu lipidique de la fraction, les procédures d'analyse peuvent s'avérer lourdes : utilisation de solvants organiques tels l'éthanol ou le dichlorométhane ; passage sur Soxhlet... (Volkman et al., 2006) mais l'analyse finale par GC-MS est une procédure classique de la plateforme Lipides-Océan du LEMAR. Une autre technique analytique plus facile de mise en œuvre pourrait être l'IRTF.

Analyse de la MOP

La MOP peut être minéralisée sous forme dissoute *via* une attaque à la soude. Ce traitement particulier a déjà été utilisée dans le cadre d'analyse de la matière biogénique pour analyser le contenu intracellulaire du phytoplancton et des hétérotrophes (Villacorte et al., 2013 ; Kinsey et al., 2018). Ce genre d'expérimentations sur des cultures d'algues pourraient

être envisagées pour mieux connaître les temps de rétention des composés intracellulaires et prévoir leur apparition extracellulaire dans la colonne d'eau.

Un tel traitement à la soude pourrait aussi être appliqué à une matière plus terrigène comme celle présente dans la MTZ en amont de l'estuaire. Un bilan des formes dissoutes et particulaires en amont de l'estuaire de l'Aulne pourrait être réalisée pour se rendre compte de l'impact des processus de floculation sur les différentes fractions de taille de la MOD.

Approfondir le lien entre MOD et microorganismes

Comme cela a été démontré dans la thèse, les microorganismes sont responsables de la production d'une grande partie de composés aux tailles variées. Alors que l'activité phytoplanctonique peut être facilement observée *via* les concentrations en chlorophylle *a*, l'activité bactérienne nécessite des comptages. Le développement de nouveaux descripteurs chimiques permettant de suivre le développement des microorganismes seraient donc appréciables.

De nouvelles données de génétique sur les communautés bactériennes de la Mer d'Iroise ont permis de mettre en évidence une succession annuelle des espèces hétérotrophes (Lemonnier, 2019). La comparaison entre l'évolution de la diversité génétique des bactéries et l'évolution des concentrations des différentes fractions de taille de la MOD au moment du bloom phytoplanctonique et de la biodégradation de celui-ci par les bactéries pourrait permettre de mieux expliquer la variabilité chimique de la MOD et de découvrir des traceurs plus fins de mécanismes de production de MOD. L'idée étant de discriminer les communautés bactériennes spécialisées dans l'hydrolyse de la MOD de haut poids moléculaires (type BP) ou sur l'assimilation des composés de petits poids moléculaires (type LMWN).

Ce genre d'étude pourrait être réalisé *via* des cultures en laboratoire avec des espèces isolées de leur milieu naturel ; ou bien être réalisée à plus grande échelle sur la base d'échantillonnage hebdomadaire, voire journalier au moment des pics d'activité biologique, à la station SOMLIT utilisée dans cette étude.

Application de la méthode à d'autres environnements : eaux souterraines

L'impact de la rivière est important dans l'estuaire. Or, jusqu'à 70% de l'eau de l'estuaire est apporté par la nappe phréatique en période de sécheresse (voir chapitre II). L'apport de MOD par les eaux souterraines a déjà été observées dans d'autres études (Huguet

et al., 2010). Des analyses succinctes menées par SEC-mDEC sur des échantillons provenant d'une zone humide du Morbihan (Naizin – échantillons fournis par Géosciences Rennes) ont permis d'observer que les chromatogrammes ne présentent pas la même allure que ceux de la rivière ou du milieu côtier. En effet, la MOD est composée majoritairement de substances de petits poids moléculaires. L'utilisation de la SEC-mDEC aux milieux souterrains et au transfert sol-rivière permettrait d'apporter des informations importantes sur les apports de MOD surtout dans les périodes où les échanges sont les plus importants. Néanmoins, ce genre d'expérimentations à l'échelle de l'Aulne est problématique du fait de son ampleur et des forages nécessaires à l'échantillonnage de ces eaux.

Références bibliographiques

-
- Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E., Brogueira, M.J., 2002. Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 54, 241–262. <https://doi.org/10.1006/ecss.2001.0844>
- Aiken, G.R., 1985. Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization.
- Aiken, G.R., Malcolm, R.L., 1987. Molecular weight of aquatic fulvic acids by vapor pressure osmometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 51, 2177–2184.
- Aiken, G.R., Thurman, E.M., Malcolm, R.L., Walton, H.F., 1979. Comparison of XAD Macroporous Resins for the Concentration of Fulvic Acid from Aqueous Solution. *Analytical Chemistry* 51, 1799–1803. <https://doi.org/10.1021/ac50047a044>
- Alberts, J.J., Takács, M., Schalles, J., 2004. Ultraviolet-visible and fluorescence spectral evidence of natural organic matter (NOM) changes along an estuarine salinity gradient. *Estuaries* 27, 296–310. <https://doi.org/10.1007/BF02803386>
- Allen, G.P., Salomon, J.C., Bassoullet, P., Du Penhoat, Y., de Grandpré, C., 1980. Effects of tides on mixing and suspended sediment transport in macrotidal estuaries. *Sedimentary Geology*. [https://doi.org/10.1016/0037-0738\(80\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0037-0738(80)90006-8)
- Altazin-Pichon, A., 1981. Application d'un modèle de thermocline à la formation du front thermique en mer d'Iroise: Confrontation des résultats avec des mesures" in situ.
- Aluwihare, L.I., Repeta, D.J., Chen, R.F., 1997. A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface sea water. *Nature* 387, 166.
- Álvarez-Salgado, X.A., Miller, A.E.J., 1999. Dissolved organic carbon in a large macrotidal estuary (the Humber, UK): Behaviour during estuarine mixing. *Marine Pollution Bulletin* 37, 216–224. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00156-8)
- Aminot, A., El-Sayed, M.A., Kerouel, R., 1990. Fate of natural and anthropogenic dissolved organic carbon in the macrotidal Elorn estuary (France). *Marine Chemistry* 29, 255–275. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(90\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0304-4203(90)90017-7)
- Aminot, A., Kérouel, R., 2004. Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. IFREMER.
- Amo, M., Suzuki, N., Kawamura, H., Yamaguchi, A., Takano, Y., Horiguchi, T., 2010. Sterol composition of dinoflagellates: different abundance and composition in heterotrophic species and resting cysts. *Geochemical Journal* 44, 225–231.
- Amon, R.M.W., Benner, R., 1996. Bacterial utilization of different size classes of DOM.pdf. *Limnology and Oceanography* 41, 41–51.
- Amon, R.M.W., Benner, R., 1994. Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature* 369, 549–552. <https://doi.org/10.1038/369549a0>
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726.
- Andrade-Eiroa, Á., Canle, M., Cerdá, V., 2013a. Environmental applications of excitation-emission spectrofluorimetry: an in-depth review II. *Applied Spectroscopy Reviews* 48, 77–141.
- Andrade-Eiroa, Á., Canle, M., Cerdá, V., 2013b. Environmental applications of excitation-emission spectrofluorimetry: an in-depth review I. *Applied Spectroscopy Reviews* 48, 1–49.
- Aoki, S., Fuse, Y., Yamada, E., 2004. Determinations of Humic Substances and Other Dissolved Organic Matter

-
- and Their Effects on the Increase of COD in Lake Biwa. *Analytical Sciences* 20, 159–164. <https://doi.org/10.2116/analsci.20.159>
- Arnosti, C., 2011. Microbial Extracellular Enzymes and the Marine Carbon Cycle. *Annual Review of Marine Science* 3, 401–425.
- Arnosti, C., Reintjes, G., Amann, R., 2018. A mechanistic microbial underpinning for the size-reactivity continuum of dissolved organic carbon degradation. *Marine Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2018.09.008>
- Arrieta, J.M., Mayol, E., Hansman, R., L., Herndl, G., J., Dittmar, T., Duarte, C., M., 2015. Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science* 348, 331–333.
- Asmala, E., Autio, R., Kaartokallio, H., Stedmon, C.A., Thomas, D.N., 2014. Processing of humic-rich riverine dissolved organic matter by estuarine bacteria: Effects of predegradation and inorganic nutrients. *Aquatic Sciences* 76, 451–463. <https://doi.org/10.1007/s00027-014-0346-7>
- Asmala, Eero, Bowers, D.G., Autio, R., Kaartokallio, H., Thomas, D.N., 2014. Qualitative changes of riverine dissolved organic matter at low salinities due to flocculation. *Journal of Geophysical Research G: Biogeosciences* 119, 1919–1933. <https://doi.org/10.1002/2014JG002722>
- Asmala, E., Haraguchi, L., Markager, S., Massicotte, P., Riemann, B., Staehr, P.A., Carstensen, J., 2018. Eutrophication Leads to Accumulation of Recalcitrant Autochthonous Organic Matter in Coastal Environment. *Global Biogeochemical Cycles* 32. <https://doi.org/10.1029/2017GB005848>
- Attermeyer, K., Catalán, N., Einarsdottir, K., Freixa, A., Groeneveld, M., Hawkes, J.A., Bergquist, J., Tranvik, L.J., 2018. Organic Carbon Processing During Transport Through Boreal Inland Waters: Particles as Important Sites. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 123. <https://doi.org/10.1029/2018JG004500>
- Aukes, P.J.K., 2012. Use of Liquid Chromatography–Organic Carbon Detection to Characterize Dissolved Organic Matter from a Variety of Environments.
- Azam, F., Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology* 5, 782–791. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1747>
- Baalousha, M., Motelica-Heino, M., Coustumer, P. Le, 2006. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 272, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.07.010>
- Baghoth, S.A., Maeng, S.K., Salinas Rodríguez, S.G., Ronteltap, M., Sharma, S., Kennedy, M., Amy, G.L., 2008. An urban water cycle perspective of natural organic matter (NOM): NOM in drinking water, wastewater effluent, storm water, and seawater. *Water Science and Technology: Water Supply* 8, 701–707. <https://doi.org/10.2166/ws.2008.146>
- Baghoth, S.A., Sharma, S.K., Amy, G.L., 2011. Tracking natural organic matter (NOM) in a drinking water treatment plant using fluorescence excitation–emission matrices and PARAFAC. *Water Research* 45, 797–809. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.005>
- Baines, S.B., Pace, M.L., 1991. The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: Patterns across marine and freshwater systems. *Limnology and Oceanography* 36, 1078–1090. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.6.1078>
- Baker, A., 2005. Thermal fluorescence quenching properties of dissolved organic matter. *Water Research* 39,
-

4405–4412. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.08.023>

- Baker, A., Spencer, R.G.M., 2004. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment* 333, 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.013>
- Baltar, F., Arístegui, J., Sintés, E., Van Aken, H.M., Gasol, J.M., Herndl, G.J., 2009. Prokaryotic extracellular enzymatic activity in relation to biomass production and respiration in the meso- and bathypelagic waters of the (sub)tropical Atlantic. *Environmental Microbiology* 11, 1998–2014. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01922.x>
- Barofsky, A., Simonelli, P., Vidoudez, C., Troedsson, C., Nejstgaard, J.C., Jakobsen, H.H., Pohnert, G., 2010. Growth phase of the diatom *Skeletonema marinoi* influences the metabolic profile of the cells and the selective feeding of the copepod *Calanus* spp. *Journal of Plankton Research* 32, 263–272. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbp121>
- Bassoulet, P., 1979. Etude de la dynamique des sédiments en suspension dans l'estuaire de l'Aulne (rade de Brest).
- Bauer, J.E., 2002. Carbon isotopic composition of DOM., in: In: Hansell, D., Carlson, C. (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press., pp. 405–453.
- Bauer, J.E., Bianchi, T.S., 2012. Dissolved Organic Carbon Cycling and Transformation, *Treatise on Estuarine and Coastal Science*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374711-2.00502-7>
- Bauer, J.E., Bianchi, T.S., 2011. Bauer, J. E. & Bianchi, T. S. 7–67 (Academic, 2011)., in: In *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, Vol. 5 (Eds Wolanski, E. & McLusky, D. S.). pp. 7–67.
- Bauer, J.E., Cai, W.J., Raymond, P.A., Bianchi, T.S., Hopkinson, C.S., Regnier, P.A.G., 2013. The changing carbon cycle of the coastal ocean. *Nature* 504, 61–70. <https://doi.org/10.1038/nature12857>
- Bauer, J.E., Williams, P.J., Druffel, E.R.M., 1992. ¹⁴C activity of dissolved organic carbon fractions in the north-central Pacific and Sargasso Sea. *Nature* 357, 667–670.
- Belzile, C., Brugel, S., Nozais, C., Gratton, Y., Demers, S., 2008. Variations of the abundance and nucleic acid content of heterotrophic bacteria in Beaufort Shelf waters during winter and spring. *Journal of Marine Systems* 74, 946–956. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.12.010>
- Benner, R., 2002. Chemical composition and reactivity., in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. pp. 56–90.
- Benner, R., Amon, R.M.W., 2015. The Size-Reactivity Continuum of Major Bioelements in the Ocean. *Annual Review of Marine Science* 7. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135126>
- Benner, R., Opsahl, S., 2001. Molecular indicators of the sources and transformations of dissolved organic matter in the Mississippi river plume. *Organic Geochemistry* 32, 597–611. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00197-2](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00197-2)
- Bianchi, T.S., 2011. The role of terrestrially derived organic carbon in the coastal ocean: A changing paradigm and the priming effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19473–19481. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017982108>
- Bianchi, T.S., Bauer, J.E., 2011. Bianchi, T. S. & Bauer, J. E. 2011. 69–117 (Academic, 2011). in *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, Vol. 5 (eds Wolanski, E. & McLusky, D. S.) 69–117.
- Biber M., V., Gulacar, F., O., Buffle, J., 2012. Seasonal variations in principal groups of organic matter in a eutrophic lake using pyrolysis/GC/MS. *Environmental Science & Technology* 30, 3501–3507.

-
- Billett, M.F., Deacon, C.M., Palmer, S.M., Dawson, J.J.C., Hope, D., 2006. Connecting organic carbon in stream water and soils in a peatland catchment. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 111, 1–13. <https://doi.org/10.1029/2005JG000065>
- Birrien, J.L., Wafar, M.V.M., Corre, P.L., Riso, R., 1991. Nutrients and primary production in a shallow stratified ecosystem in the Iroise Sea. *Journal of Plankton Research* 13, 721–742. <https://doi.org/10.1093/plankt/13.4.721>
- Blackburn, T.H., Hall, P.O.J., Hulth, S., Landén, A., 1996. Organic-N loss by efflux and burial associated with a low efflux of inorganic N and with nitrate assimilation in Arctic sediments (Svalbard, Norway). *Marine Ecology Progress Series* 141, 283–293. <https://doi.org/10.3354/meps141283>
- Blasioli, S., Braschi, I., Pinna, M., V., Pusino, A., Gessa, C., E., 2008. Effect of undesalted dissolved organic matter from composts on persistence, adsorption, and mobility of cyhalofop herbicide in soils. 4102–4111. *Journal of agricultural and food chemistry* 56, 2008.
- Bloom, P.R., Leenheer, Jerry, A., 1989. Vibrational, electronic, and high-energy spectroscopic methods for characterizing humic substances. *Search of Structure* 409–446.
- Borch, N.H., Kirchman, D.L., 1999. Protection of protein from bacterial degradation by submicron particles. *Aquatic Microbial Ecology* 16, 265–272. <https://doi.org/10.3354/ame016265>
- Borcier, E., Morvezen, R., Boudry, P., Miner, P., Charrier, G., Laroche, J., Hegaret, H., 2017. Effects of bioactive extracellular compounds and paralytic shellfish toxins produced by *Alexandrium minutum* on growth and behaviour of juvenile great scallops *Pecten maximus*. *Aquatic Toxicology* 184, 142–154. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.009>
- Bordovskiy, O.K., 1965. Accumulation and transformation of organic substances in marine sediments. *Mar. Geol.* 3, 3–114.
- Boyd, T.J., Osburn, C.L., 2004. Changes in CDOM fluorescence from allochthonous and autochthonous sources during tidal mixing and bacterial degradation in two coastal estuaries. *Marine Chemistry* 89, 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.02.012>
- Boyle, E., Collier, R., Dengler, A.T., Edmond, J.M., Ng, A.C., Stallard, R.F., 1974. On the chemical mass-balance in estuaries. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 38, 1719–1728. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(74\)90188-4](https://doi.org/10.1016/0016-7037(74)90188-4)
- Brenon, I., Le Hir, P., 1999. Modelling the Turbidity Maximum in the Seine Estuary (France): Identification of Formation. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 19, 525–544.
- Bridgeman, J., Bieroza, M., Baker, A., 2011. The application of fluorescence spectroscopy to organic matter characterisation in drinking water treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 10, 277–290. <https://doi.org/10.1007/s11157-011-9243-x>
- Brown, A., McKnight, D.M., Chin, Y.P., Roberts, E.C., Uhle, M., 2004. Chemical characterization of dissolved organic material in Pony Lake, a saline coastal pond in Antarctica. *Marine Chemistry* 89, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.02.016>
- Buffle, J., Chalmers, R., A., 1988. Complexation reactions in aquatic systems.
- Burdige, D., J., 2007. Preservation of organic matter in marine sediments: controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? *Chemical Reviews* 107, 467–485.
- Burdige, D.J., 2006. *Geochemistry of Marine Sediment*.
-

-
- Burdige, D.J., Kline, S.W., Chen, W., 2004. Fluorescent dissolved organic matter in marine sediment pore waters. *Marine Chemistry* 89, 289–311.
- Burdige, D.J., Komada, T., 2015. Sediment Pore Waters, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. pp. 537–577.
- Burdige, D.J., Zheng, S., 1998. The biogeochemical cycling of dissolved organic nitrogen in estuarine sediments. *Limnology and Oceanography* 43, 1796–1813. <https://doi.org/10.4319/lo.1998.43.8.1796>
- Burnett, W.C., Bokuniewicz, H., Huettel, M., Moore, W.S., Taniguchi, M., 2003. Groundwater and pore water inputs to the coastal zone. *Biogeochemistry* 66, 3–33. <https://doi.org/10.1023/B:BIOG.0000006066.21240.53>
- Cadier, M., 2016. Diversité des communautés phytoplanctoniques en relation avec les facteurs environnementaux en mer d'Iroise : approche par la modélisation 3D.
- Cadier, M., Gorgues, T., LHelguen, S., Sourisseau, M., Memery, L., 2017. Tidal cycle control of biogeochemical and ecological properties of a macrotidal ecosystem. *Geophysical Research Letters* 44, 8453–8462. <https://doi.org/10.1002/2017GL074173>
- Cai, W.-J., 2011. Estuarine and Coastal Ocean Carbon Paradox: CO₂ Sinks or Sites of Terrestrial Carbon Incineration? . *Annual Review of Marine Science* 3, 123–145. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142723>
- Calleja, M.L., Batista, F., Peacock, M., Kudela, R., McCarthy, M.D., 2013. Changes in compound specific $\delta^{15}\text{N}$ amino acid signatures and d/l ratios in marine dissolved organic matter induced by heterotrophic bacterial reworking. *Marine Chemistry* 149, 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2012.12.001>
- Carlson, C., A., 2002. Production and removal processes., in: In: Hansell, D.A., Carlson, C.A. (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, Elsevier., p. 91.
- Carlson, C., A., Del Giorgio, P.A., Herndl, G., J., 2007. Microbes and the Dissipation of Energy and Respiration: From Cells to Ecosystems, in: *A Sea of Microbes*. pp. 89–100.
- Carstea, E.M., 2012. Fluorescence spectroscopy as a potential tool for in-situ monitoring of dissolved organic matter in surface water systems. *Water Pollution* 1.
- Cauwet, G., 2002. DOM in the Coastal Zone, in: Carlson, D.A.H. and C.A. (Ed.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, San Diego, pp. 579–609.
- Cava, F., Lam, H., De Pedro, M.A., Waldor, M.K., 2011. Emerging knowledge of regulatory roles of d-amino acids in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 817–831. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0571-8>
- Chanudet, V., Filella, M., 2007. The fate of inorganic colloidal particles in Lake Brienz. *Aquatic Sciences* 69, 199–211. <https://doi.org/10.1007/s00027-007-0877-2>
- Chen, J., LeBoeuf, E.J., Dai, S., Gu, B., 2003. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 50, 639–647. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00616-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00616-1)
- Chen, M., Hur, J., 2015. Pre-treatments, characteristics, and biogeochemical dynamics of dissolved organic matter in sediments: A review. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.04.018>
- Chen, M., Jaffé, R., 2014. Photo- and bio-reactivity patterns of dissolved organic matter from biomass and soil leachates and surface waters in a subtropical wetland. *Water Research* 61, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.075>
-

-
- Chen, X., Lohrenz, S.E., Wiesenburg, D.A., 2000. Distribution and controlling mechanisms of primary production on the Louisiana–Texas continental shelf. *Journal of Marine Systems* 25, 179–207.
- Chin, W.-C., Orellana, M. V, Quesada, I., Verdugo, P., 2004. Secretion in unicellular marine phytoplankton: demonstration of regulated exocytosis in *Phaeocystis globosa*. *Plant and cell physiology* 45, 535–542.
- Chin, Y.-P., Aiken, G., O’Loughlin, E., 1994. Molecular Weight, Polydispersity, and Spectroscopic Properties of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science & Technology* 28, 1853–1858. <https://doi.org/10.1021/es00060a015>
- Chu, H., Yu, H., Tan, X., Zhang, Y., Zhou, X., Yang, L., Li, D., 2015. Extraction procedure optimization and the characteristics of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) from *Chlorella pyrenoidosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 125, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.007>
- Church, M.J., Björkman, K.M., Karl, D.M., Saito, M.A., Zehr, J.P., 2008. Regional distributions of nitrogen-fixing bacteria in the Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography* 53, 63–77.
- Clair, T., A., Sayer, B., G., Kramer, J., R., Eaton, D., R., 1996. Seasonal variation in the composition of aquatic organic matter in some Nova Scotian brownwaters. A nuclear magnetic resonance approach. *Hydrobiologia* 317, 141–150.
- CNEXO, R., 1977. CNEXO/ISTPM, 1977 Inventaire des sites potentiels pour l’aquaculture sur le littoral du Finistère. Première phase. Secteur V : Rade de BREST.
- Coble, P.G., 2007. Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. *Chemical reviews* 107, 402–418.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, 325–346. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(95\)00062-3](https://doi.org/10.1016/0304-4203(95)00062-3)
- Coble, P.G., Del Castillo, C.E., Avril, B., 1998. Distribution and optical properties of CDOM in the Arabian Sea during the 1995 Southwest Monsoon. *Deep Sea Research Part II: Topical studies in Oceanography* 45, 2195–2223.
- Cole, J.J., Prairie, Y.T., Caraco, N.F., McDowell, W.H., Tranvik, L.J., Striegl, R.G., Duarte, C.M., Kortelainen, P., Downing, J.A., Middelburg, J.J., Melack, J., 2007. Plumbing the global carbon cycle: Integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* 10, 171–184. <https://doi.org/10.1007/s10021-006-9013-8>
- Conmy, R.N., Coble, P.G., Chen, R.F., Gardner, G.B., 2004. Optical properties of colored dissolved organic matter in the Northern Gulf of Mexico. *Marine Chemistry* 89, 127–144.
- Cooper, M.B., Smith, A.G., 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology* 26, 147–153.
- Covino, T., 2017. Hydrologic connectivity as a framework for understanding biogeochemical flux through watersheds and along fluvial networks. *Geomorphology* 277, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2016.09.030>
- Creach, V., 1995. Origines et transferts de la matière organique dans un marais littoral: utilisation des compositions isotopiques naturelles du carbone et de l’azote.
- Creed, I.F., McKnight, D.M., Pellerin, B.A., Green, M.B., Bergamaschi, B.A., Aiken, G.R., Burns, D.A., Findlay, S.E.G., Shanley, J.B., Striegl, R.G., Aulenbach, B.T., Clow, D.W., Laudon, H., McGlynn, B.L., McGuire,

-
- K.J., Smith, R.A., Stackpoole, S.M., 2015. The river as a chemostat: fresh perspectives on dissolved organic matter flowing down the river continuum. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72, 1272–1285. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0400>
- Croué, J.P., Korshin, G. V., Benjamin, M.M., 2000. Characterization of natural organic matter in drinking water. American Water Works Association.
- Crump, B.C., Baross, J.A., Simenstad, C.A., 1998. Dominance of particle-attached bacteria in the Columbia River estuary, USA. *Aquatic Microbial Ecology* 14, 7–18.
- D’Andrilli, J., Junker, J.R., Smith, H.J., Scholl, E.A., Foreman, C.M., 2019. DOM composition alters ecosystem function during microbial processing of isolated sources. *Biogeochemistry* 142, 281–298. <https://doi.org/10.1007/s10533-018-00534-5>
- Dai, M., Yin, Z., Meng, F., Liu, Q., Cai, W.J., 2012. Spatial distribution of riverine DOC inputs to the ocean: An updated global synthesis. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 4, 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.03.003>
- Dalzell, B.J., Filley, T.R., Harbor, J.M., 2007. The role of hydrology in annual organic carbon loads and terrestrial organic matter export from a midwestern agricultural watershed. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 1448–1462. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.12.009>
- Danhiez, F.-P., 2016. Relations entre les propriétés optiques de la matière organique dissoute colorée et le carbone organique dissous dans des eaux côtières aux caractéristiques contrastées.
- De Souza Sierra, M.M., Donard, O.F.X., Lamotte, M., 1997. Spectral identification and behaviour of dissolved organic fluorescent material during estuarine mixing processes. *Marine Chemistry* 58, 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00025-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00025-X)
- Del Vecchio, R., Blough, N. V., 2004. Spatial and seasonal distribution of chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in the Middle Atlantic Bight. *Marine Chemistry* 89, 169–187. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2004.02.027>
- Delmas, R., 1981. Etude de l’évolution saisonnière des sels nutritifs dans la rade de Brest en fonction des apports fluviaux et des échanges avec l’Iroise. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- DELMAS, R., TREGUER, P., 1983. Evolution saisonnière des nutriments dans un écosystème eutrophe d’Europe occidentale (la rade de Brest). *Interactions marines et terrestres. Oceanologica acta* 6, 345–356.
- Determann, S., Lobbes, J. örg M., Reuter, R., Rullkötter, J. ürgen, 1998. Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Marine Chemistry* 62, 137–156. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(98\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(98)00026-7)
- Determann, S., Reuter, R., Wagner, P., Willkomm, R., 1994. Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: method of measurement and near-surface distribution. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 41, 659–675.
- Detty, J.M., McGuire, K.J., 2010. Topographic controls on shallow groundwater dynamics: Implications of hydrologic connectivity between hillslopes and riparian zones in a till mantled catchment. *Hydrological Processes* 24, 2222–2236. <https://doi.org/10.1002/hyp.7656>
- Dittmar, T., Kattner, G., 2003. Recalcitrant dissolved organic matter in the ocean: major contribution of small amphiphilics. *Marine Chemistry* 82, 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(03\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(03)00068-9)
- Dulaquais, G., Breitenstein, J., Waeles, M., Marsac, R., Riso, R., 2018. On the application of size exclusion liquid

-
- chromatography with organic carbon, UV and nitrogen detections to dissolved organic matter characterization in estuarine and marine waters. *Environmental Chemistry*.
- Einsiedl, F., Mayer, B., Schäfer, T., 2008. Evidence for incorporation of H₂S in groundwater fulvic acids from stable isotope ratios and sulfur K-edge X-ray absorption near edge structure spectroscopy. *Environmental Science and Technology* 42, 2439–2444. <https://doi.org/10.1021/es7025455>
- Elliott, M., McLusky, D.S., 2002. The need for definitions in understanding estuaries. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 55, 815–827.
- Ertel, J.R., Hedges, J.I., Devol, A.H., Richey, J.E., Ribeiro, M. de N.G., 1986. Dissolved humic substances of the Amazon River system. *Limnology and Oceanography* 31, 739–754. <https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.4.0739>
- Esteves da Silva, J.C.G., 1998. Fluorescence quenching of anthropogenic fulvic acids by Cu (II), Fe (III) and UO₂²⁺. *Talanta* 45, 1155–1165.
- FAGANELI, J., MALEJ, A., PEZDIČ, J., MALAČIČ, V., 1988. C: N: P ratios and stable C isotopic tttkk. *Oceanol. Acta* 11, 377–382.
- Fagerbakke, K.M., Heldal, M., Norland, S., 1996. Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 10, 15–27.
- Fellman, J.B., Hood, E., D'Amore, D. V., Edwards, R.T., White, D., 2009. Seasonal changes in the chemical quality and biodegradability of dissolved organic matter exported from soils to streams in coastal temperate rainforest watersheds. *Biogeochemistry* 95, 277–293. <https://doi.org/10.1007/s10533-009-9336-6>
- Fellman, J.B., Hood, E., Spencer, R.G.M., 2010. Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and Oceanography* 55, 2452–2462. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.6.2452>
- Feng, W., Liu, S., Li, C., Li, X., Song, F., Wang, B., Chen, H., Wu, F., 2019. Algal uptake of hydrophilic and hydrophobic dissolved organic nitrogen in the eutrophic lakes. *Chemosphere* 214, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.070>
- Filella, M., 2009. Freshwaters: Which NOM matters? *Environmental Chemistry Letters* 7, 21–35. <https://doi.org/10.1007/s10311-008-0158-x>
- Filella, M., Quentel, F., Chanudet, V., 2014. From Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Materials, in: Perminova, Irinia, V., Kulikova, Natalia, A. (Eds.), *From Molecular Understanding to Innovative Applications of Humic Substances Proceedings - Volume I*. pp. 151–158. <https://doi.org/10.1515/ci.2009.31.3.30>
- Frenette, J.J., Arts, M.T., Morin, J., Gratton, D., Martin, C., 2006. Hydrodynamic control of the underwater light climate in fluvial Lac Saint-Pierre. *Limnology and Oceanography* 51, 2632–2645. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.6.2632>
- Frenette, J.J., Massicotte, P., Lapierre, J.F., 2012. Colorful niches of phytoplankton shaped by the spatial connectivity in a large river ecosystem: A riverscape perspective. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035891>
- Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., 1999. Basic characterization of reference NOM from Central Europe - Similarities and differences. *Environment International* 25, 191–207. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00116-0](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00116-0)
- Fuhrman, 1987. Close coupling between release and uptake of dissolved free amino acids in seawater studied by
-

-
- an isotope dilution approach. *Marine Ecology Progress Series* 37, 45–52.
- Garnier, J., Billen, G., Némery, J., Sebilo, M., 2010. Transformations of nutrients (N, P, Si) in the turbidity maximum zone of the Seine estuary and export to the sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 90, 129–141.
- Goffin, A., Guérin, S., Rocher, V., Varrault, G., 2017. Caractérisation de l'évolution de la matière organique dissoute de l'amont à l'aval de l'agglomération parisienne pendant une année hydrologique par spectrométrie de fluorescence 3D 1–25.
- Gong, W., Browne, J., Hall, N., Schruth, D., Paerl, H., Marchetti, A., 2017. Molecular insights into a dinoflagellate bloom. *ISME Journal* 11, 439–452. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.129>
- Goñi, M.A., Teixeira, M.J., Perkeya, D.W., 2003. Sources and distribution of organic matter in a river-dominated estuary (Winyah Bay, SC, USA). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57, 1023–1048. [https://doi.org/10.1016/S0272-7714\(03\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0272-7714(03)00008-8)
- Gonsior, M., Peake, B.M., Cooper, W.T., Podgorski, D., D'Andrilli, J., Cooper, W.J., 2009. Photochemically induced changes in dissolved organic matter identified by ultrahigh resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 43, 698–703. <https://doi.org/10.1021/es8022804>
- Goosen, N.K., Kromkamp, J., Peene, J., Van Rijswijk, P., Van Breugel, P., 1999. Bacterial and phytoplankton production in the maximum turbidity zone of three European estuaries: The Elbe, Westerschelde and Gironde. *Journal of Marine Systems* 22, 151–171. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(99\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(99)00038-X)
- Goto, S., Tada, Y., Suzuki, K., Yamashita, Y., 2017. Production and reutilization of fluorescent dissolved organic matter by a marine bacterial strain, *Alteromonas macleodii*. *Frontiers in microbiology* 8, 507.
- Goutx, M., Guigue, C., Aritio, D., Ghiglione, J.F., Pujó-Pay, M., Raybaud, V., Duflos, M., Prieur, L., 2009. Short term summer to autumn variability of dissolved lipid classes in the Ligurian sea (NW Mediterranean). *Biogeosciences* 6, 1229–1246. <https://doi.org/10.5194/bg-6-1229-2009>
- Graeber, D., Gelbrecht, J., Pusch, M.T., Anlanger, C., von Schiller, D., 2012. Agriculture has changed the amount and composition of dissolved organic matter in Central European headwater streams. *Science of the Total Environment* 438, 435–446. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.087>
- Granum, E., Kirkvold, S., Mykkestad, S.M., 2002. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: Diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series* 242, 83–94. <https://doi.org/10.3354/meps242083>
- Griffith, D.R., Raymond, P.A., 2011. Multiple-source heterotrophy fueled by aged organic carbon in an urbanized estuary. *Marine Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2010.11.003>
- Grossart, H.P., Simon, M., 2007. Interactions of planktonic algae and bacteria: Effects on algal growth and organic matter dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* 47, 163–176. <https://doi.org/10.3354/ame047163>
- Guéguen, C., Guo, L., Wang, D., Tanaka, N., Hung, C.C., 2006. Chemical characteristics and origin of dissolved organic matter in the Yukon River. *Biogeochemistry* 77, 139–155. <https://doi.org/10.1007/s10533-005-0806-1>
- Guggenberger, G., Zech, W., 1984. Composition of dissolved carbohydrates and lignin-degradation products in two coniferous forests. *Soil Biol. Biochem.* 26, 19–27.
- Guo, L., Santschi, P.H., Warnken, K.W., 1995. Dynamics of dissolved organic carbon (DOC) in oceanic
-

-
- environments. *Limnol. Oceanogr.* 40, 1392–1403.
- Han, L., XU, B., Qi, F., Chen, Z., 2016. Effect of nitrogen/phosphorus concentration on algal organic matter generation of the diatom *Nitzschia palea*: total indicators and spectroscopic characterization. *Journal of Environmental Sciences* 47, 130–142.
- Hansell, D. A. and Carlson, C.A., 2002. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, Academic Press, London.
- Hansell, D., Carlson, C., 2015. Dissolved Organic Matter in the Ocean Carbon Cycle. *Eos* 96, 549–552. <https://doi.org/10.1029/2015eo033011>
- Hansell, D.A., 2013. Recalcitrant Dissolved Organic Carbon Fractions. *Annual Review of Marine Science* 5, 421–445. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100757>
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., 2014. *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*. Academic Press.
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., 1998. Deep-ocean gradients in the concentration of dissolved organic carbon. *Nature* 395, 263. <https://doi.org/10.1016/b978-012256371-3/50020-2>
- Hansell, D.A., Carlson, C.A., Repeta, D.J., Schlitzer, R., 2009. Dissolved organic matter in the ocean: A controversy stimulates new insights. *Oceanography* 22, 202–211.
- Hansen, A.M., Kraus, T.E.C., Pellerin, B.A., Fleck, J.A., Downing, B.D., Bergamaschi, B.A., 2016. Optical properties of dissolved organic matter (DOM): Effects of biological and photolytic degradation. *Limnology and Oceanography* 61, 1015–1032. <https://doi.org/10.1002/lno.10270>
- Harmelin-Vivien, M., Dierking, J., Bănar, D., Fontaine, M.F., Arlhac, D., 2010. Seasonal variation in stable C and N isotope ratios of the Rhone River inputs to the Mediterranean Sea (2004–2005). *Biogeochemistry* 100, 139–150.
- Harvey, H.R., Dyda, R.Y., Kirchman, D.L., 2006. Impact of DOM composition on bacterial lipids and community structure in estuaries. *Aquatic Microbial Ecology* 42, 105–117. <https://doi.org/10.3354/ame042105>
- He, W., Chen, M., Schlautman, M.A., Hur, J., 2016. Dynamic exchanges between DOM and POM pools in coastal and inland aquatic ecosystems: A review. *Science of the Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.031>
- Hedges, J.I., 1992. Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Marine Chemistry* 39, 67–93.
- Hedges, J.I., Clark, W.A., Come, G.L., 1988. Organic matter sources to the water column and surficial sediments of a marine bay. *Limnology and Oceanography* 33, 1116–1136. <https://doi.org/10.4319/lo.1988.33.5.1116>
- Hedges, J.I., Keil, R.G., Benner, R., 1997. What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic Geochemistry* 27, 195–212. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(97\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(97)00066-1)
- Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2008. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Research* 42, 3435–3445. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.032>
- Henen, W., Lauwers, M., 1996. Organic sulfur compounds resulting from the interaction of iron sulfide, hydrogen sulfide and carbon dioxide in an anaerobic aqueous environment. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 26, 131–150.
- Herman, P.M.J., Heip, C.H.R., 1999. Biogeochemistry of the MAXimum TURbidity Zone of Estuaries (MATURE): Some conclusions. *Journal of Marine Systems* 22, 89–104. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(99\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(99)00034-2)
-

-
- Hernes, P.J., Benner, R., 2006. Terrigenous organic matter sources and reactivity in the North Atlantic Ocean and a comparison to the Arctic and Pacific oceans. *Marine Chemistry* 100, 66–79.
- Hernes, P.J., Robinson, A.C., Aufdenkampe, A.K., 2007. Fractionation of lignin during leaching and sorption and implications for organic matter “freshness.” *Geophysical Research Letters* 34, 1–6. <https://doi.org/10.1029/2007GL031017>
- Hmelo, L.R., Mincer, T.J., Van Mooy, B.A.S., 2011. Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environmental Microbiology Reports* 3, 682–688. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00281.x>
- Huber, S.A., Balz, A., Abert, M., Pronk, W., 2011. Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography – organic carbon detection – organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Research* 45, 879–885. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2010.09.023>
- Huber, S.A., Frimmel, F.H., 1994. Direct Gel Chromatographic Characterization and Quantification of Marine Dissolved Organic Carbon Using High-Sensitivity DOC Detection. *Environmental Science & Technology* 28, 1194–1197. <https://doi.org/10.1021/es00055a035>
- Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D., 2007. Editorial. *River Research and Applications* 23, 631–649. <https://doi.org/10.1002/rra>
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M., Parlanti, E., 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Organic Geochemistry* 40, 706–719. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.03.002>
- Huguet, A., Vacher, L., Saubusse, S., Etcheber, H., Abril, G., Relexans, S., Ibalot, F., Parlanti, E., 2010. New insights into the size distribution of fluorescent dissolved organic matter in estuarine waters. *Organic Geochemistry* 41, 595–610. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2010.02.006>
- Humbert, G., Jaffrezic, A., Fovet, O., Gruau, G., Durand, P., 2015. Dry-season length and runoff control annual variability in stream DOC dynamics in a small, shallow groundwater-dominated agricultural watershed. *Water Resources Research* 51, 7860–7877. <https://doi.org/10.1002/2015WR017200.A>
- Hunt, J.F., Ohno, T., 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, 2121–2128. <https://doi.org/10.1021/jf063336m>
- Iilina, S.M., Drozdova, O.Y., Lapitskiy, S.A., Alekhin, Y. V., Demin, V. V., Zavgorodnyaya, Y.A., Shirokova, L.S., Viers, J., Pokrovsky, O.S., 2014. Size fractionation and optical properties of dissolved organic matter in the continuum soil solution-bog-river and terminal lake of a boreal watershed. *Organic Geochemistry* 66, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2013.10.008>
- Jacq, E., Quéguiner, B., Prieur, D., Tréguer, P., 1985. Modification de l’aspect des peuplements bactériens en relation avec un bloom phytoplanctonique en rade de Brest. *Oceanis* 11, 213–222.
- Jaffé, R., McKnight, D., Maie, N., Cory, R., McDowell, W.H., Campbell, J.L., 2008. Spatial and temporal variations in DOM composition in ecosystems: The importance of long-term monitoring of optical properties. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 113, 1–15. <https://doi.org/10.1029/2008JG000683>
- Jahnke, R.A., 2010. Chapter 16 : Global Synthesis, in: *Carbon and Nutrient Fluxes in Continental Margins: A Global Synthesis*. p. 597.
-

-
- Janoš, P., 2003. Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A* 983, 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01687-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01687-4)
- Jencso, K.G., McGlynn, B.L., 2011. Hierarchical controls on runoff generation: Topographically driven hydrologic connectivity, geology, and vegetation. *Water Resources Research* 47, 1–16. <https://doi.org/10.1029/2011WR010666>
- Jiao, N., Herndl, G.J., Hansell, D.A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S.W., Kirchman, D.L., Weinbauer, M.G., Luo, T., Chen, F., Azam, F., 2010. Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: Long-term carbon storage in the global ocean. *Nature Reviews Microbiology* 8, 593–599. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2386>
- Jobbagy, Esteban, G., Jackson, Robert, B., 2000. the Vertical Distribution of Soil Organic Carbon and Its. *America* 10, 423–436.
- Jumars, P.A., Penry, D.L., Baross, J.A., Perry, M.J., Frost, B.W., 1989. Closing the microbial loop: dissolved carbon pathway to heterotrophic bacteria from incomplete ingestion, digestion and absorption in animals. *Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers* 36, 483–495. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(89\)90001-0](https://doi.org/10.1016/0198-0149(89)90001-0)
- Jurado, E., Dachs, J., Duarte, C., M., 2008. Atmospheric deposition of organic and black carbon to the global oceans. *Atmospheric Environment* 42, 7931–7939.
- Kaiser, K., Benner, R., 2009. Biochemical composition and size distribution of organic matter at the Pacific and Atlantic time-series stations. *Marine Chemistry* 113, 63–77. <https://doi.org/10.1016/J.MARCHEM.2008.12.004>
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., 2004. Changes in Dissolved Lignin-Derived Phenols , Neutral Sugars , Uronic Acids , and Amino Sugars with Depth in Forested Haplic Arenosols and Rendzic Leptosols Author (s): Klaus Kaiser , Georg Guggenberger and Ludwig Haumaier Published by: Springer Stable. *Biogeochemistry* 70, 135–151.
- Kaiser, K., Guggenberger, G., Haumaier, L., Zech, W., 2002. The composition of dissolved organic matter in forest soil solutions: Changes induced by seasons and passage through the mineral soil. *Organic Geochemistry* 33, 307–318. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(01\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(01)00162-0)
- Kaiser, K., Kalbitz, K., 2012. Cycling downwards - dissolved organic matter in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 52, 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.04.002>
- Kaiser, K., Zech, W., 1999. Release of natural organic matter sorbed to oxides and a subsoil. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1157–1166.
- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J., H., Michalzik, B., Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in sols : a review. *Soil Science* 165, 277–304.
- Kalbitz, K., Zuber, T., Park, J.-H., Matzner, E., 2004. Environmental Controls on Concentrations and Fluxes of Dissolved Organic Matter in the Forest Floor and in Soil Solution BT - *Biogeochemistry of Forested Catchments in a Changing Environment: A German Case Study*, in: Matzner, Egbert (Ed.), . Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 315–337. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06073-5_19
- Keil, R.G., Mayer, L.M., Quay, P.D., Richey, J.E., Hedges, J.I., 1997. Loss of organic matter from riverine particles in deltas. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 1507–1511. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(97\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(97)00044-6)
-

-
- Kellerman, A.M., Kothawala, D.N., Dittmar, T., Tranvik, L.J., 2015. Persistence of dissolved organic matter in lakes related to its molecular characteristics. *Nature Geoscience* 8, 454–457.
- Kinsey, J.D., Corradino, G., Ziervogel, K., Schnetzer, A., Osburn, C.L., 2018. Formation of Chromophoric Dissolved Organic Matter by Bacterial Degradation of Phytoplankton-Derived Aggregates. *Frontiers in Marine Science* 4. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00430>
- Kirchman, D.L., 2012. Degradation of organic material, in: *Processes in Microbial Ecology* (Chapter 5). pp. 1–43.
- Klotzbücher, T., Kaiser, K., Filley, T.R., Kalbitz, K., 2013. Processes controlling the production of aromatic water-soluble organic matter during litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 67, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.003>
- Koch, B.P., Kattner, G., Witt, M., Passow, U., 2014. Molecular insights into the microbial formation of marine dissolved organic matter: Recalcitrant or labile? *Biogeosciences* 11. <https://doi.org/10.5194/bg-11-4173-2014>
- Köhler, H., Meon, B., Gordeev, V., V., Sptizy, A., Amon, R., M., W., 2003. Dissolved organic matter (DOM) in the estuaries of Ob and Yenisei and the adjacent Kara Sea, Russia. *Proceedings in arine Sceince* 6, 281–310.
- Komada, T., Burdige, D.J., Crispo, S.M., Druffel, E.R.M., Griffin, S., Johnson, L., Le, D., 2013. Dissolved organic carbon dynamics in anaerobic sediments of the Santa Monica Basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 110, 253–273. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2013.02.017>
- Komada, T., Reimers, C.E., 2001. Resuspension-induced partitioning of organic carbon between solid and solution phases from a river - Ocean transition. *Marine Chemistry* 76, 155–174. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00055-X)
- Korshin, G. V., Kumke, M.U., Li, C.-W., Frimmel, F.H., 1999. Influence of chlorination on chromophores and fluorophores in humic substances. *Environmental science & technology* 33, 1207–1212.
- Kracht, O., 2000. Origin and genesis of dissolved organic matter : A study by Py-GC / MS-IRMS. Max Planck Institut für biogeochemie.
- Kujawinski, E.B., 2011. The impact of microbial metabolism on marine dissolved organic matter, *Annual review of marine science*.
- Kujawinski, E.B., Longnecker, K., Barott, K.L., Weber, R.J.M., Kido Soule, M.C., 2016. Microbial community structure affects marine dissolved organic matter composition. *Frontiers in Marine Science* 3, 45.
- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1363–1371. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003>
- Labanowski, J., 2004. Matière organique naturelle et anthropique : vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation. *Science* 199.
- Lakowicz, J.R., 2013. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media.
- Lambert, T., Teodoru, C.R., Nyoni, F.C., Bouillon, S., Darchambeau, F., Massicotte, P., Borges, A. V., 2016. Along-stream transport and transformation of dissolved organic matter in a large tropical river. *Biogeosciences* 13. <https://doi.org/10.5194/bg-13-2727-2016>
- Lanciné, D., Seidel, J., Batiot, C., Bamory, K., Ligban, R., Biemi, J., 2009. Using fluorescence spectroscopy EEM to evaluate the efficiency of organic matter removal during coagulation – flocculation of a tropical surface water (Agbo reservoir) 172, 693–699. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.052>
- Landén-Hillmeyr, A., 1998. Nitrogen cycling in continental margin sediments with emphasis on dissolved organic

nitrogen and amino acids.

- Laraque, A., Bricquet, J., P., Pandi, A., Olivry, J., C., 2009. A review of material transport by the Congo River and its tributaries. *Hydrological Processes* 23, 3216–3224.
- Laruelle, G.G., Dürr, H.H., Lauerwald, R., Hartmann, J., Slomp, C.P., Goossens, N., Regnier, P.A.G., 2013. Global multi-scale segmentation of continental and coastal waters from the watersheds to the continental margins. *Hydrology and Earth System Sciences* 17, 2029–2051. <https://doi.org/10.5194/hess-17-2029-2013>
- Le Jehan, S., Tréguer, P., 1985. The Distribution of Inorganic Nitrogen, Phosphorus, Silicon and Dissolved Organic Matter in Surface and Deep Waters of the Southern Ocean BT - Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs, in: Siegfried, W.R., Condy, P.R., Laws, R.M. (Eds.), . Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 22–29.
- Lebreton, B., Pollack, J.B., Blomberg, B., Palmer, T.A., Adams, L., Guillou, G., Montagna, P.A., 2016. Origin, composition and quality of suspended particulate organic matter in relation to freshwater inflow in a South Texas estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 170, 70–82.
- Lechtenfeld, O.J., Hertkorn, N., Shen, Y., Witt, M., Benner, R., 2015. Marine sequestration of carbon in bacterial metabolites. *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7711>
- Leenheer, Jerry, A., Croué, J.-P., 2003. Aquatic Organic Matter, in: *Environmental Science & Technology*. pp. 18A-26A.
- Lemonnier, C., 2019. Effet des changements environnementaux sur la dynamique des communautés microbiennes : évolution et adaptation des bactéries et des archées dans le cadre du développement d'un Observatoire Microbien en rade de Brest et Mer d'Iroise.
- Li, S., Winters, H., Jeong, S., Emwas, A.H., Vigneswaran, S., Amy, G.L., 2016. Marine bacterial transparent exopolymer particles (TEP) and TEP precursors: Characterization and RO fouling potential. *Desalination* 379, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.10.005>
- Liénart, C., Savoye, N., Bozec, Y., Breton, E., Conan, P., David, V., Feunteun, E., Grangeré, K., Kerhervé, P., Lebreton, B., Lefebvre, S., L'Helguen, S., Mousseau, L., Raimbault, P., Richard, P., Riera, P., Sauriau, P.G., Schaal, G., Aubert, F., Aubin, S., Bichon, S., Boinet, C., Bourasseau, L., Bréret, M., Caparros, J., Cariou, T., Charlier, K., Claquin, P., Cornille, V., Corre, A.M., Costes, L., Crispi, O., Crouvoisier, M., Czamanski, M., Del Amo, Y., Derriennic, H., Dindinaud, F., Durozier, M., Hanquiez, V., Nowaczyk, A., Devesa, J., Ferreira, S., Fornier, M., Garcia, F., Garcia, N., Geslin, S., Grossteffan, E., Gueux, A., Guillaudeau, J., Guillou, G., Joly, O., Lachaussée, N., Lafont, M., Lamoureux, J., Lecuyer, E., Lehodey, J.P., Lemeille, D., Leroux, C., Macé, E., Maria, E., Pineau, P., Petit, F., Pujon-Pay, M., Rimelin-Maury, P., Sultan, E., 2017. Dynamics of particulate organic matter composition in coastal systems: A spatio-temporal study at multi-systems scale. *Progress in Oceanography* 156, 221–239. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2017.03.001>
- Liu, S., Lim, M., Fabris, R., Chow, C., Drikas, M., Amal, R., 2010. Comparison of photocatalytic degradation of natural organic matter in two Australian surface waters using multiple analytical techniques. *Organic Geochemistry* 41, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.08.008>
- Liu, Z., Lee, C., 2007. The role of organic matter in the sorption capacity of marine sediments. *Marine Chemistry* 105, 240–257. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.02.006>
- Lobbés, J.M., Fitznar, H.P., Kattner, G., 2000. Biogeochemical characteristics of dissolved and particulate organic matter in Russian rivers entering the Arctic Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 2973–2983.

-
- Lønborg, C., Doyle, J., Furnas, M., Menendez, P., Benthuyssen, J.A., Carreira, C., 2017. Seasonal organic matter dynamics in the Great Barrier Reef lagoon: Contribution of carbohydrates and proteins. *Continental Shelf Research* 138, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2017.01.010>
- Longnecker, K., Kujawinski, E.B., 2011. Composition of dissolved organic matter in groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75, 2752–2761. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2011.02.020>
- Louis, Y., Pernet-Coudrier, B., Varrault, G., 2014. Implications of effluent organic matter and its hydrophilic fraction on zinc(II) complexation in rivers under strong urban pressure: Aromaticity as an inaccurate indicator of DOM-metal binding. *Science of the Total Environment* 490, 830–837. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.123>
- Lowe, A.T., Galloway, A.W.E., Yeung, J.S., Dethier, M.N., Duggins, D.O., 2014. Broad sampling and diverse biomarkers allow characterization of nearshore particulate organic matter. *Oikos* 123, 1341–1354.
- MacCarthy, P., Rice, J.A., 1985. Spectroscopic Methods for Determining Functionality in Humic Substances. *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*. GR Aiken.
- Maguer, J.F., L’Helguen, S., Madec, C., Le Corre, P., 1999. Seasonal patterns of ammonium regeneration from size-fractionated microheterotrophs. *Continental Shelf Research* 19, 1755–1770. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(99\)00037-0](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(99)00037-0)
- Mangal, V., Stock, N.L., Guéguen, C., 2016. Molecular characterization of phytoplankton dissolved organic matter (DOM) and sulfur components using high resolution Orbitrap mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 1891–1900. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9295-9>
- Mannino, A., Harvey, H.R., 1999. Lipid composition in particulate and dissolved organic matter in the Delaware Estuary: Sources and diagenetic patterns. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63, 2219–2235. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(99\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(99)00128-3)
- Mantoura, R.F.C., Woodward, E.M.S., 1983. Conservative behaviour of riverine dissolved organic carbon in the Severn Estuary: chemical and geochemical implications. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 1293–1309. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(83\)90069-8](https://doi.org/10.1016/0016-7037(83)90069-8)
- Marić, D., Frka, S., Godrijan, J., Tomažić, I., Penezić, A., Djakovac, T., Vojvodić, V., Precali, R., Gašparović, B., 2013. Organic matter production during late summer-winter period in a temperate sea. *Continental Shelf Research* 55, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2013.01.008>
- Marie, L., 2016. Composition, transfert et dynamique de la matière organique dissoute (MOD) dans les eaux fluviales et estuariennes : impact des activités agricoles 208.
- Marie, L., Pernet-Coudrier, B., Waeles, M., Gabon, M., Riso, R., 2015. Dynamics and sources of reduced sulfur, humic substances and dissolved organic carbon in a temperate river system affected by agricultural practices. *Science of the Total Environment* 537, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.089>
- Marie, L., Pernet-Coudrier, B., Waeles, M., Riso, R., 2017. Seasonal variation and mixing behaviour of glutathione, thioacetamide and fulvic acids in a temperate macrotidal estuary (Aulne, NW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 184, 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.11.018>
- Mariette, V., 1983. Effets des échanges atmosphériques sur la structure thermique marine: application à des zones du large et à une zone côtière.
- Markager, S., Stedmon, C.A., Søndergaard, M., 2011. Seasonal dynamics and conservative mixing of dissolved organic matter in the temperate eutrophic estuary Horsens Fjord. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92,
-

-
- 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.01.014>
- Martone, P.T., Estevez, J.M., Lu, F., Ruel, K., Denny, M.W., Somerville, C., Ralph, J., 2009. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. *Current biology* 19, 169–175.
- Mash, H., Westerhoff, P.K., Baker, L.A., Nieman, R.A., Nguyen, M.-L., 2004. Dissolved organic matter in Arizona reservoirs: assessment of carbonaceous sources. *Organic Geochemistry* 35, 831–843.
- Matilainen, A., Gjessing, E.T., Lahtinen, T., Hed, L., Bhatnagar, A., Sillanpää, M., 2011. An overview of the methods used in the characterisation of natural organic matter (NOM) in relation to drinking water treatment. *Chemosphere* 83, 1431–1442.
- Mayer, L.M., Schick, L.L., Skorko, K., Boss, E., 2006. Photodissolution of particulate organic matter from sediments. *Limnology and Oceanography* 51, 1064–1071. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.2.1064>
- McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K., 2004. Analytical chemistry of freshwater humic substances. *Analytica Chimica Acta* 527, 105–124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.011>
- McKenna, J.H., 2004. DOC dynamics in a small temperate estuary: Simultaneous addition and removal processes and implications on observed nonconservative behavior. *Estuaries* 27, 604–616. <https://doi.org/10.1007/BF02907648>
- McKnight, D.M., Andrews, E.D., Spaulding, S.A., Aiken, G.R., 1994. Aquatic fulvic acids in algal-rich antarctic ponds. *Limnology and Oceanography* 39, 1972–1979. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.8.1972>
- McKnight, Diane M, Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of aquatic fulvic acid for determination of precursor organic material and general structural properties. *Limnology and Oceanography* 46, 38–48.
- McKnight, D M, E. W. Boyer, P. K. Westerhoff, P. T. Doran, T. Kulbe, Anderson, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *L&O* 46, 38–48. <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.1.0038>
- Meng, F., Huang, G., Yang, X., Li, Z., Li, J., Cao, J., Wang, Z., Sun, L., 2013. Identifying the sources and fate of anthropogenically impacted dissolved organic matter (DOM) in urbanized rivers. *Water Research* 47, 5027–5039. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.043>
- Middelboe, M., Lyck, P.G., 2002. Regeneration of dissolved organic matter by viral lysis in marine microbial communities. *Aquatic Microbial Ecology* 27, 187–194. <https://doi.org/10.3354/ame027187>
- Middelburg, J.J., Herman, P.M.J., 2007. Organic matter processing in tidal estuaries. *Marine Chemistry* 106, 127–147. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.02.007>
- Mikutta, R., Mikutta, C., Kalbitz, K., Scheel, T., Kaiser, K., Jahn, R., 2007. Biodegradation of forest floor organic matter bound to minerals via different binding mechanisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 2569–2590. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.03.002>
- Milori, D.M.B.P., Martin-Neto, L., Bayer, C., Mielniczuk, J., Bagnato, V.S., 2002. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* 167, 739–749.
- Minor, E., Stephens, B., 2008. Dissolved organic matter characteristics within the Lake Superior watershed. *Organic Geochemistry* 39, 1489–1501.
- Minor, E.C., Simjouw, J.P., Mulholland, M.R., 2006. Seasonal variations in dissolved organic carbon concentrations and characteristics in a shallow coastal bay. *Marine Chemistry* 101, 166–179. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.02.005>
-

-
- Mitra, S., Bianchi, T.S., Guo, L., Santschi, P.H., 2000. Terrestrially derived dissolved organic matter in the Chesapeake Bay and the middle Atlantic bight. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64, 3547–3557. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(00\)00450-6](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(00)00450-6)
- Mobed, J.J., Hemmingsen, S.L., Autry, J.L., McGown, L.B., 1996. Fluorescence characterization of IHSS humic substances: total luminescence spectra with absorbance correction. *Environmental Science & Technology* 30, 3061–3065.
- Møller, E.F., Riemann, L., Søndergaard, M., 2007. Bacteria associated with copepods: Abundance, activity and community composition. *Aquatic Microbial Ecology* 47, 99–106. <https://doi.org/10.3354/ame047099>
- Montagnes, D.J.S., Berges, J.A., Harrison, P.J., Taylor, F.J.R., 1994. Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll a from volume in marine phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 39, 1044–1060. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.5.1044>
- Mopper, K., Kieber, D.J., Stubbins, A., 2014. Marine Photochemistry of Organic Matter: Processes and Impacts. Processes and Impacts., in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00008-X>
- Mopper, K., Schultz, C.A., 1993. Fluorescence as a possible tool for studying the nature and water column distribution of DOC components. *Marine Chemistry* 41, 229–238. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(93\)90124-7](https://doi.org/10.1016/0304-4203(93)90124-7)
- Moran, M.A., Sheldon, W.M., Sheldon, J.E., 1999. Biodegradation of Riverine Dissolved Organic Carbon in Five Estuaries of the Southeastern United States. *Estuaries* 22, 55. <https://doi.org/10.2307/1352927>
- Moran, M.A., Zepp, R.G., 1997. Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 42, 1307–1316. <https://doi.org/10.4319/lo.1997.42.6.1307>
- Morin, P., Birrien, J.L., Le Corre, P., 1989. The frontal systems in the Iroise Sea: Development of *Gyrodinium aureolum* Hulbert on the inner front. *Sci. Mar.* 53, 215–221.
- Morin, P., Wafar, M.V.M., Le Corre, P., 1993. Estimation of nitrate flux in a tidal front from satellite-derived temperature data. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 98, 4689–4695.
- Mounier, S., Patel, N., Quilici, L., Benaim, J.Y., Benamou, C., 1999. Fluorescence 3D de la matiere organique dissoute du Fleuve Amazone. *Water Research* 33, 1523–1533. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00347-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00347-9)
- Murphy, K.R., Stedmon, C.A., Waite, T.D., Ruiz, G.M., 2008. Distinguishing between terrestrial and autochthonous organic matter sources in marine environments using fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry* 108, 40–58. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.10.003>
- Myklestad, S.M., 2000. Dissolved organic carbon from phytoplankton, in: *Marine Chemistry*. Springer, pp. 111–148.
- Myklestad, S.M., 1999. Phytoplankton extracellular production and leakage with considerations on the polysaccharide accumulation. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 35, 401–404.
- Myklestad, S.M., 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides. *Science of the total Environment* 165, 155–164.
- Nagao, S., Matsunaga, T., Suzuki, Y., Ueno, T., Amano, H., 2003. Characteristics of humic substances in the Kuji River waters as determined by high-performance size exclusion chromatography with fluorescence
-

-
- detection. *Water Research* 37, 4159–4170. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00377-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00377-4)
- Nagata, T., 2008. Organic matter–bacteria interactions in seawater., in: *In Microbial Ecology of the Oceans*, Ed. DL Kirchman., pp. 207–42.
- Nagata, T., 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter, in: Kirchman, D.G. (Ed.), *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Liss, New York, pp. 121–152.
- Nagata, T., Kirchman, D.L., 1996. Bacterial degradation of protein adsorbed to model submicron particles in seawater. *Marine Ecology Progress Series* 132, 241–248. <https://doi.org/10.3354/meps132241>
- Nagata, T., Kirchman, D.L., 1992. Release of macromolecular organic complexes by heterotrophic marine flagellates. *Marine Ecology Progress Series* 83, 233–240. <https://doi.org/10.3354/meps083233>
- Nagorski, S.A., Moore, J.N., McKinnon, T.E., Smith, D.B., 2003. Geochemical response to variable streamflow conditions in contaminated and uncontaminated streams. *Water Resources Research* 39. <https://doi.org/10.1029/2001WR001247>
- Nippgen, F., McGlynn, B.L., Emanuel, R., 2015. The spatial and temporal evolution of contributing areas. *Water Resources Research* 51, 4550–4573. <https://doi.org/10.1002/2015WR017200.A>
- Oeurng, C., Sauvage, S., Coynel, A., Maneux, E., Etcheber, H., Sánchez-Pérez, J.M., 2011. Fluvial transport of suspended sediment and organic carbon during flood events in a large agricultural catchment in southwest France. *Hydrological Processes* 25, 2365–2378. <https://doi.org/10.1002/hyp.7999>
- Opsahl, S., Benner, R., 1997. Distribution and cycling of terrigenous dissolved organic matter in the ocean. *Nature* 386, 480–482.
- Opsahl, S., Benner, R., Amon, R.M.W., Dec, N., 2007. Major Flux of Terrigenous Dissolved Organic Matter Through the Arctic Ocean Major flux of terrigenous dissolved organic matter through the Arctic Ocean. *Limnology* 44, 2017–2023.
- Osburn, C.L., Kinsey, J.D., Bianchi, T.S., Shields, M.R., 2019. Formation of planktonic chromophoric dissolved organic matter in the ocean. *Marine Chemistry* 209. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2018.11.010>
- Osterholz, H., Kirchman, D.L., Niggemann, J., Dittmar, T., 2016. Environmental Drivers of Dissolved Organic Matter Molecular Composition in the Delaware Estuary. *Frontiers in Earth Science* 4. <https://doi.org/10.3389/feart.2016.00095>
- Osterholz, H., Niggemann, J., Giebel, H.A., Simon, M., Dittmar, T., 2015. Inefficient microbial production of refractory dissolved organic matter in the ocean. *Nature Communications* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8422>
- Panagiotopoulos, C., Sempéré, R., Para, J., Raimbault, P., Rabouille, C., Charrière, B., 2012. The composition and flux of particulate and dissolved carbohydrates from the Rhone River into the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 9, 1827–1844. <https://doi.org/10.5194/bg-9-1827-2012>
- Parlanti, E., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone 31, 1765–1781. [https://doi.org/10.1016/S0146-6380\(00\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S0146-6380(00)00124-8)
- Parlanti, E., Sourzac, M., Baratelli, F., Varrault, G., Flipo, N., 2018. Propriétés optiques de la matière organique dissoute (MOD) : traçage de ses sources et dynamique dans la plaine de la Bassée.
- Paul, C., Barofsky, A., Vidoudez, C., Pohnert, G., 2009. Diatom exudates influence metabolism and cell growth
-

-
- of co-cultured diatom species. *Marine Ecology Progress Series* 389, 61–70.
<https://doi.org/10.3354/meps08162>
- Pellerin, B.A., Hernes, P.J., Saraceno, J., Spencer, R.G.M., Bergamaschi, B.A., 2010. Microbial degradation of plant leachate alters lignin phenols and trihalomethane precursors. *Journal of environmental quality* 39, 946–954.
- Penru, Y., Simon, F.X., Guastalli, A.R., Esplugas, S., Llorens, J., Baig, S., 2013. Characterization of natural organic matter from Mediterranean coastal seawater. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA* 62, 42–51. <https://doi.org/10.2166/aqua.2013.113>
- Perdue, E. M., Ritchie, J., D., n.d. Dissolved organic matter in freshwaters. *Treatise on geochemistry* 5, 605.
- Perdue, E.M., Koprivnjak, J.-F., 2007. Using the C/N ratio to estimate terrigenous inputs of organic matter to aquatic environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 73, 65–72.
- Perillo, G.M.E., 1995. Definitions and geomorphologic classifications of estuaries. Elsevier, London 17–47.
- Pernet-coudrier, 2008. Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte perturbation urbaine.
- Pernet-coudrier, B., Clouzot, L., Varrault, G., Tusseau-vuillemin, M.H., Verger, A., Mouchel, J.M., 2008. Dissolved organic matter from treated effluent of a major wastewater treatment plant: Characterization and influence on copper toxicity. *Chemosphere* 73, 593–599.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.064>
- Pernet-Coudrier, B., Varrault, G., Saad, M., Croue, J.P., Dignac, M.F., Mouchel, J.M., 2011. Characterisation of dissolved organic matter in Parisian urban aquatic systems: Predominance of hydrophilic and proteinaceous structures. *Biogeochemistry* 106, 89–106. <https://doi.org/10.1007/s10533-010-9480-z>
- Pettersson, C., Allard, B., Borén, H., 1997. River discharge of humic substances and humic-bound metals to the Gulf of Bothnia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 44, 533–541. <https://doi.org/10.1006/ecss.1996.0159>
- Peuravuori, J., Lehtonen, T., Pihlaja, K., 2002. Sorption of aquatic humic matter by DAX-8 and XAD-8 resins: Comparative study using pyrolysis gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 471, 219–226.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00931-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00931-5)
- Piccolo, A., 2001. Traditional Paradigms in Humus Chemistry 166, 810–832.
- Pivokonsky, M., Kloucek, O., Pivokonska, L., 2006. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water research* 40, 3045–3052.
- Plaza, C., Hernández, D., García-Gil, J.C., Polo, A., 2004. Microbial activity in pig slurry-amended soils under semiarid conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1577–1585.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.017>
- Pomeroy, L.R., Darwin, C., 2007. The microbial loop. *Oceanography* 20, 28–33.
- Preston, M.R., Riley, J.P., 1982. The interactions of humic compounds with electrolytes and three clay minerals under simulated estuarine conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 14, 567–576.
- Qu, F., Liang, H., He, J., Ma, J., Wang, Z., Yu, H., Li, G., 2012. Characterization of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) of *Microcystis aeruginosa* and their impacts on UF membrane fouling. *Water research* 46, 2881–2890.
- Rashid, M.A., 1985. *Geochemistry of Marine Humic Compounds*.
- Raymond, P.A., Bauer, J.E., 2000. Bacterial consumption of DOC during transport through a temperate estuary.
-

-
- Aquatic Microbial Ecology 22, 1–12. <https://doi.org/10.3354/ame022001>
- Raymond, P.A., Hopkinson, C.S., 2003. Ecosystem Modulation of Dissolved Carbon Age in a Temperate Marsh-Dominated Estuary. *Ecosystems* 6, 694–705. <https://doi.org/10.1007/s10021-002-0213-6>
- Raymond, P.A., Spencer, R.G.M., 2014. Riverine DOM, in: *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405940-5.00011-X>
- Regnier, P.A.G., Al., E., 2013. Anthropogenic perturbation of the carbon fluxes from land to ocean. *Nature Geosciences* 6, 597–607.
- Rehman, Z.U., Jeong, S., Tabatabai, S.A.A., Emwas, A.-H., Leiknes, T., 2017. Advanced characterization of dissolved organic matter released by bloom-forming marine algae. *Desalination and Water Treatment* 69, 1–11. <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.0444>
- Reintjes, G., Arnosti, C., Fuchs, B.M., Amann, R., 2017. An alternative polysaccharide uptake mechanism of marine bacteria. *The ISME journal* 11, 1640.
- Renjith, K.R., Joseph, M.M., Ghosh, P., Rahman, K., Kumar, C.R., Chandramohanakumar, N., 2013. Biogeochemical facsimile of the organic matter quality and trophic status of a micro-tidal tropical estuary. *Environmental Earth Sciences* 70, 729–742.
- Repeta, D.J., Aluwihare, L.I., 2006. Radiocarbon analysis of neutral sugars in high-molecular-weight dissolved organic carbon: Implications for organic carbon cycling. *Limnology and Oceanography* 51, 1045–1053. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.2.1045>
- Repeta, D.J., Quan, T.M., Aluwihare, L.I., Accardi, A., 2002. Chemical characterization of high molecular weight dissolved organic matter in fresh and marine waters. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66, 955–962. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(01\)00830-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(01)00830-4)
- Reynolds, D.M., 2003. Rapid and direct determination of tryptophan in water using synchronous fluorescence spectroscopy. *Water Research* 37, 3055–3060. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00153-2)
- Richey, J.E., 2004. Pathways of atmospheric CO₂ through fluvial systems., in: In: Field, C.B., Raupach, M.R. (Eds.) *The Global Carbon Cycle*, SCOPE. Island Press, Washington, DC, pp. 329–340.
- Rochelle-Newall, E.J., Fisher, T.R., 2002. Chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in Chesapeake Bay. *Marine Chemistry* 77, 23–41. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00073-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00073-1)
- Romera-Castillo, C., Chen, M., Yamashita, Y., Jaffé, R., 2014. Fluorescence characteristics of size-fractionated dissolved organic matter: Implications for a molecular assembly based structure? *Water Research* 55, 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.017>
- Rosenstock, B., Zwisler, W., Simon, M., 2005. Bacterial consumption of humic and non-humic low and high molecular weight DOM and the effect of solar irradiation on the turnover of labile DOM in the Southern Ocean. *Microbial Ecology* 50, 90–101. <https://doi.org/10.1007/s00248-004-0116-5>
- Royer, T. V., David, M.B., 2005. Export of dissolved organic carbon from agricultural streams in Illinois, USA. *Aquatic Sciences* 67, 465–471. <https://doi.org/10.1007/s00027-005-0781-6>
- Rutledge, H., Andersen, M.S., Baker, A., Chinu, K.J., Cuthbert, M.O., Jex, C.N., Marjo, C.E., Markowska, M., Rau, G.C., 2015. Organic characterisation of cave drip water by LC-OCD and fluorescence analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 166, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.05.042>
- Sah, R.N., 1994. Nitrate-nitrogen determination—a critical review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 25, 2841–2869.
-

-
- Sanderman, J., Lohse, K., A., Baldock, J., A., Amundson, R., 2008. Linking soils and streams: Sources and chemistry of dissolved organic matter in a small coastal watershed. *Water Resources Research*, 45.
- Šantić, D., Krstulović, N., Šolić, M., Kušpilić, G., 2012. HNA and LNA bacteria in relation to the activity of heterotrophic bacteria. *Acta Adriatica* 53, 25–40.
- Santos, I.R., Burnett, W.C., Chanton, J., Mwashote, B., Suryaputra, I.G.N.A., Dittmar, T., 2008. Nutrient biogeochemistry in a Gulf of Mexico subterranean estuary and groundwater-derived fluxes to the coastal ocean. *Limnology and Oceanography* 53, 705–718. <https://doi.org/10.4319/lo.2008.53.2.0705>
- Satterberg, J., Arnarson, T.S., Lessard, E.J., Keil, R.G., 2003. Sorption of organic matter from four phytoplankton species to montmorillonite, chlorite and kaolinite in seawater. *Marine Chemistry* 81, 11–18. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(02\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(02)00136-6)
- Savoie, N., Aminot, A., Tréguer, P., Fontugne, M., Naulet, N., Kérouel, R., 2003. Dynamics of particulate organic matter $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ during spring phytoplankton blooms in a macrotidal ecosystem (Bay of Seine, France). *Marine Ecology Progress Series* 255, 27–41. <https://doi.org/10.3354/meps255027>
- Savoie, N., David, V., Morisseau, F., Etcheber, H., Abril, G., Billy, I., Charlier, K., Oggian, G., Derriennic, H., Sautour, B., 2012. Origin and composition of particulate organic matter in a macrotidal turbid estuary: The Gironde Estuary, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 108, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.12.005>
- Savoie, N., Dehairs, F., Elskens, M., Cardinal, D., Koczczyńska, E.E., Trull, T.W., Wright, S., Baeyens, W., Griffiths, F.B., 2004. Regional variation of spring N-uptake and new production in the Southern Ocean. *Geophysical Research Letters* 31.
- Schäfer, T., Buckau, G., Artinger, R., Kim, J.I., Geyer, S., Wolf, M., Bleam, W.F., Wirick, S., Jacobsen, C., 2005. Origin and mobility of fulvic acids in the Gorleben aquifer system: implications from isotopic data and carbon/sulfur XANES. *Organic Geochemistry* 36, 567–582. <https://doi.org/10.1016/J.ORGGEOCHEM.2004.10.011>
- Seo, D.J., Kim, Y.J., Ham, S.Y., Lee, D.H., 2007. Characterization of dissolved organic matter in leachate discharged from final disposal sites which contained municipal solid waste incineration residues. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.027>
- Shang, P., Lu, Y.H., Du, Y.X., Jaffé, R., Findlay, R.H., Wynn, A., 2018. Climatic and watershed controls of dissolved organic matter variation in streams across a gradient of agricultural land use. *Science of the Total Environment* 612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.322>
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., 2006. Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water research* 40, 1233–1239.
- Shields, M.R., Bianchi, T.S., Osburn, C.L., Kinsey, J.D., Ziervogel, K., Schnetzer, A., Corradino, G., 2019. Linking chromophoric organic matter transformation with biomarker indices in a marine phytoplankton growth and degradation experiment. *Marine Chemistry* 214. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2019.103665>
- Sholkovitz, E.R., 1976. Flocculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 40, 831–845. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(76\)90035-1](https://doi.org/10.1016/0016-7037(76)90035-1)
-

-
- Sierra, M.M.D., Giovanela, M., Parlanti, E., Soriano-Sierra, E.J., 2005. Fluorescence fingerprint of fulvic and humic acids from varied origins as viewed by single-scan and excitation/emission matrix techniques. *Chemosphere* 58, 715–733. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.09.038>
- Simon, C., Roth, V.-N., Dittmar, T., Gleixner, G., 2018. Molecular Signals of Heterogeneous Terrestrial Environments Identified in Dissolved Organic Matter: A Comparative Analysis of Orbitrap and Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometers. *Frontiers in Earth Science* 6. <https://doi.org/10.3389/feart.2018.00138>
- Skoog, A., Benner, R., 1997. Aldoses in various size fractions of marine organic matter: implications for carbon cycling. *Limnology and Oceanography* 42, 1803-1813.
- Smith, D.C., Simon, M., Alldredge, A.L., Azam, F., 1992. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359, 139.
- Spaak, G., 2014. Investigating the potential of dissolved organic matter (DOM) induced denitrification in Dutch groundwater.
- Spencer, R.G.M., Ahad, J.M.E., Baker, A., Cowie, G.L., Ganeshram, R., Upstill-Goddard, R.C., Uher, G., 2007. The estuarine mixing behaviour of peatland derived dissolved organic carbon and its relationship to chromophoric dissolved organic matter in two North Sea estuaries (U.K.). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.03.032>
- Spencer, R.G.M., Stubbins, A., Hernes, P.J., Baker, A., Mopper, K., Aufdenkampe, A.K., Dyda, R.Y., Mwamba, V.L., Mangangu, A.M., Wabakanghanzi, J.N., Six, J., 2009. Photochemical degradation of dissolved organic matter and dissolved lignin phenols from the Congo River. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 114, 1–12. <https://doi.org/10.1029/2009JG000968>
- Sposito, G., 1981. Trace metals in contaminated waters. *Environmental Science and Technology* 15, 396–403. <https://doi.org/10.1021/es00086a003>
- Stedmon, C.A., Cory, R.M., 2014. Biological origins and fate of fluorescent dissolved organic matter in aquatic environments. *Aquatic organic matter fluorescence* 278–299.
- Stedmon, Colin A., Markager, S., 2005. Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter by fluorescence analysis. *Limnology and Oceanography* 50, 1415–1426. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.5.1415>
- Stedmon, Colin A, Markager, S., 2005. Resolving the variability in dissolved organic matter fluorescence in a temperate estuary and its catchment using PARAFAC analysis. *Limnology and Oceanography* 50, 686–697.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry : genesis, composition, reaction*. John Wiley and Sons, USA.
- Suttle, C. a, 2005. 03 - Reading - Viruses in the sea. *Nature* 437, 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature04160>
- Swarczewski, P.W., Orem, W.H., McPherson, B.F., Baskaran, M., Wan, Y., 2006. Biogeochemical transport in the Loxahatchee River estuary, Florida: The role of submarine groundwater discharge. *Marine Chemistry* 101, 248–265. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2006.03.007>
- Świetlik, J., Dąbrowska, A., Raczyk-Stanisławiak, U., Nawrocki, J., 2004. Reactivity of natural organic matter fractions with chlorine dioxide and ozone. *Water Research* 38, 547–558. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.034>
- Tagliapietra, D., Sigovini, M., Ghirardini, A.V., 2009. A review of terms and definitions to categorise estuaries, lagoons and associated environments. *Marine and Freshwater Research* 60, 497–509.

<https://doi.org/10.1071/MF08088>

- Thibault, A., Derenne, S., Parlanti, E., Anquetil, C., Sourzac, M., Budzinski, H., Fuster, L., Laverman, A., Roose-Amsaleg, C., Viollier, E., Huguet, A., 2019. Dynamics of organic matter in the Seine Estuary (France): Bulk and structural approaches. *Marine Chemistry* 212, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2019.04.007>
- Thingstad, T.F., Hagström, Å., Rassoulzadegan, F., 1997. Accumulation of degradable DOC in surface waters: Is it caused by a malfunctioning microbialloop? *Limnology and Oceanography* 42, 398–404.
- Thorn, K.A., Folan, D.W., MacCarthy, P., 1989. Characterization of the International Humic Substances Society standard and reference fulvic and humic acids by solution state carbon-13 (¹³C) and hydrogen-1 (¹H) nuclear magnetic resonance spectrometry. *Water-Resources Investigations Report* 89, 1–93.
- Thornton, S.F., McManus, J., 1994. Application of organic carbon and nitrogen stable isotope and C/N ratios as source indicators of organic matter provenance in estuarine systems : evidence from the Tay Estuary, Scotland. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 38, 219–233.
- Thurman, E., M., 1985. *Organic Geochemistry of Natural Waters.*, Nijhoff/Junk Publishers, Boston.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science and Technology* 15, 463–466. <https://doi.org/10.1021/es00086a012>
- Tipping, E., Chamberlain, P., M., Fröberg, M., Hanson, P., J., Jardine, P., M., 2012. Article (refereed) - postprint. *Biogeochemistry* 108, 91–107.
- Tiquia, S.M., Tam, N.F.Y., Hodgkiss, I.J., 1997. Effects of turning frequency on composting of spent pig-manure sawdust litter. *Bioresource Technology* 62, 37–42.
- Tranvik, L.J., 1993. Microbial transformation of labile dissolved organic matter into humic-like matter in seawater. *FEMS Microbiology Ecology* 12, 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1993.tb00030.x>
- Tremblay, L., Gagné, J.P., 2009. Organic matter distribution and reactivity in the waters of a large estuarine system. *Marine Chemistry* 116, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2009.09.006>
- Turbidity, M., The, Z., Abril, G., Etcheber, H., Hir, P. Le, Bassoullet, P., Boutier, B., Abrill, G., France, F.-T., Fran, I., 1999. Oxidic / anoxic oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde , France) Pierre Le Hir and Plzilippe Bassoullet. *Limnology* 44, 1304–1315.
- Uher, G., Hughes, C., Henry, G., Upstill-Goddard, R.C., 2001. Non-conservative mixing behavior of colored dissolved organic matter in a humic-rich, turbid estuary. *Geophysical Research Letters* 28, 3309–3312.
- Ulu, F., Barişçi, S., Kobya, M., Sillanpää, M., 2015. An evaluation on different origins of natural organic matters using various anodes by electrocoagulation. *Chemosphere* 125, 108–114.
- Urban-Rich, J., McCarty, J.T., Fernández, D., Acuña, J.L., 2006. Larvaceans and copepods excrete fluorescent dissolved organic matter (FDOM). *Journal of experimental marine biology and ecology* 332, 96–105.
- Vacher, L., 2004. Étude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens: cas des estuaires de la Gironde et de la Seine.
- Valeur, B., 2003. Molecular fluorescence. *digital Encyclopedia of Applied Physics* 477–531.
- Verdugo, P., 2011. Marine Microgels. *Annual Review of Marine Science* 4, 375–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142759>
- Vernet, M., Lorenzen, C.J., 1987. Pheophytin a in Temperate Marine Waters '. *Limnology and Oceanography* 32, 352–358.
- Villacorte, L.O., Ekowati, Y., Neu, T.R., Kleijn, J.M., Winters, H., 2015. ScienceDirect Characterisation of algal

-
- organic matter produced by bloom-forming marine and freshwater algae. *Water Research* 73, 216–230. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.028>
- Villacorte, L.O., Ekowati, Y., Winters, H., Amy, G.L., Schippers, J.C., Kennedy, M.D., 2013. Characterisation of transparent exopolymer particles (TEP) produced during algal bloom : a membrane treatment perspective. *Desalination and Water Treatment* 51, 1021–1033.
- Vraspir, J.M., Butler, A., 2009. Chemistry of Marine Ligands and Siderophores. *Annual Review of Marine Science* 1, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163712>
- Waeles, M., Riso, R., Pernet-Coudrier, B., Quentel, F., Durrieu, G., Tissot, C., 2013. Annual cycle of humic substances in a temperate estuarine system affected by agricultural practices. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 106, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2012.12.040>
- Wafar, M.V.M., Le Corre, P., Birrien, J.L., 1983. Nutrients and primary production in permanently well-mixed temperate coastal waters. *Estuarine, coastal and shelf science* 17, 431–446.
- Walker, B.D., Beaupré, S.R., Guilderson, T.P., McCarthy, M.D., Druffel, E.R.M., 2016. Pacific carbon cycling constrained by organic matter size, age and composition relationships. *Nature Geoscience* 9. <https://doi.org/10.1038/ngeo2830>
- Wang, Z., Cao, J., Meng, F., 2015. Interactions between protein-like and humic-like components in dissolved organic matter revealed by fluorescence quenching. *Water Research* 68, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.10.024>
- Wear, E.K., Carlson, C.A., Windecker, L.A., Brzezinski, M.A., 2015. Roles of diatom nutrient stress and species identity in determining the short-and long-term bioavailability of diatom exudates to bacterioplankton. *Marine Chemistry* 177, 335–348.
- Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B.A., Fram, M.S., Fujii, R., Mopper, K., 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental science & technology* 37, 4702–4708.
- Welschmeyer, N.A., Lorenzen, C.J., 1985. Chlorophyll budgets: Zooplankton grazing and phytoplankton growth in a temperate fjord and the Central Pacific Gyres. *Limnology and Oceanography* 30, 1–21. <https://doi.org/10.4319/lo.1985.30.1.0001>
- Whitman, W., B., Coleman, D., C., Wiebe, W., J., 1998. Prokaryotes : The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578–6583.
- Wilson, H.F., Xenopoulos, M.A., 2009. Effects of agricultural land use on the composition of fluvial dissolved organic matter. *Nature Geoscience* 2, 37–41. <https://doi.org/10.1038/ngeo391>
- Wu, J., Ma, Y., Qi, H., Zhao, X., Zhang, X., Xie, X., Du, Y., Zhao, Y., Wei, Z., 2017. The Effect of Bacteria on the Formation and Polymerization of Humic Substance Precursors During Different Composting Periods State key laboratory of environment Criteria and Risk Assessment , Chinese Research Academy of Agricultural Products Quality and S 6, 22–27.
- Wünsch, U.J., Bro, R., Stedmon, C.A., Wenig, P., Murphy, K.R., 2019. Emerging patterns in the global distribution of dissolved organic matter fluorescence. *Analytical Methods* 11. <https://doi.org/10.1039/c8ay02422g>
- Wünsch, U.J., Geuer, J.K., Lechtenfeld, O.J., Koch, B.P., Murphy, K.R., Stedmon, C.A., 2018. Quantifying the impact of solid-phase extraction on chromophoric dissolved organic matter composition. *Marine Chemistry* 207. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2018.08.010>
-

-
- Yamashita, Y., Cory, R.M., Nishioka, J., Kuma, K., Tanoue, E., Jaffé, R., 2010. Fluorescence characteristics of dissolved organic matter in the deep waters of Okhotsk Sea and the northwestern North Pacific Ocean. *Deep-sea research. Part1. Oceanographic Research Papers* 57, 1478.
- Yang, Z., Hou, J., Miao, L., Yang, Y., You, G., Jia, D., Gao, M., 2019. Removing specific extracellular organic matter from algal bloom water by Tanfloc flocculation: Performance and mechanisms. *Separation and Purification Technology* 212, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.11.008>
- Zhang, W., Tang, X.-Y., Xian, Q.-S., Weisbrod, N., Yang, J.E., Wang, H.-L., 2016. A field study of colloid transport in surface and subsurface flows. *Journal of hydrology* 542, 101–114.
- Zhou, Q., Cabaniss, S.E., Maurice, P.A., 2000. Considerations in the use of high-pressure size exclusion chromatography (HPSEC) for determining molecular weights of aquatic humic substances. *Water Research* 34, 3505–3514. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00115-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00115-9)
- Zhou, S., Shao, Y., Gao, N., Deng, Y., Li, L., Deng, J., Tan, C., 2014. Characterization of algal organic matters of *Microcystis aeruginosa*: biodegradability, DBP formation and membrane fouling potential. *Water research* 52, 199–207.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38, 45–50.

**Publications et
Communications
scientifiques**

Publications

« **On the application of size exclusion liquid chromatography with organic carbon, UV et nitrogen detections to dissolved organic matter characterization in estuarine et marine waters** », Gabriel Dulaquais, Johann Breitenstein, Matthieu Waeles, Rémi Marsac et Ricardo Riso; *Environmental Chemistry* (EN18108, Accepted 23 August 2018).

« **Links between the size fractionation, the chemical speciation of dissolved copper and the chemical speciation of dissolved organic matter in the Loire estuary** », Gabriel Dulaquais, Matthieu Waeles, Johann Breitenstein, Joël Knoery et Ricardo Riso; *Environmental Chemistry* (EN19137.R2, Accepted 4 October 2019).

In preparation: «**Coupling size exclusion chromatography and Excitation-Emission fluorescence for studying DOM in estuarine waters**», Johann BREITENSTEIN, Gabriel DULAQUAIS, Philippe GIAMARCHI, Matthieu WAELES, Ricardo RISO; *Journal of Biological and Chemical Luminescence*.

Communication par poster

« **Dynamique de la matière organique dissoute déterminée par LC-OCD-OND-UVD dans la rade de Brest** », Johann BREITENSTEIN, Gabriel DULAQUAIS, Ricardo RISO, Matthieu WAELES, Jean François Maguer, Peggy Rimmelin-Maury, Emilie Grossteffan, Stéphane L'Helguen. *EVolution à Long terme des Ecosystèmes COtiers : Vers une mise en évidence des forçages et des processus associés. Bordeaux (France) 5 – 7 décembre 2017*.

Communications orales

Coupling LC-OCD et 3D Fluorescence for studying DOM in estuarine waters , Johann BREITENSTEIN, Gabriel DULAQUAIS, Philippe GIAMARCHI, Matthieu WAELES, Ricardo RISO ; *XVIII International Symposium on Luminescence Spectrometry, Brest June 2018.*

Seasonal Monitoring of Dissolved Organic Matter In A Macrotidal Estuary : Using Size Exclusion Chromatography Associated With Fluorescence, Johann BREITENSTEIN, Gabriel DULAQUAIS, Philippe GIAMARCHI, Matthieu WAELES, Ricardo RISO, *2019 Workshop on Applications of Multi-scale Approaches in Environmental chemistry (AMARE 2019) 22-28 April 2019 Rennes, France*

« Dynamique de la matière organique dissoute dans la rade de Brest par chromatographie d'exclusion stérique », Johann BREITENSTEIN, Peggy Rimmelin-Maury, Gabriel DULAQUAIS, Ricardo RISO, Matthieu WAELES, Emilie Grossteffan,, *Journée scientifique – Exercice d'Intercomparaison SOMLIT 2019, Roscoff, 8 - 10 Octobre 2019*

« The physico-chemical speciation of dissolved copper in the Loire estuary in relation to humic substances distributions », Gabriel DULAQUAIS, Matthieu WAELES, Pierre Yves DERRIEN, Johann BREITENSTEIN, Ricardo RISO, Joël KNOERY ; *XVIII International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay, Anglet (France) 5 – 7 juin 2018.*

«Spéciation physico-chimique du cuivre dissous en Loire», G.Dulaquais, M. Waeles, P-Y Derrien, J. Breitenstein, J. Knoery R., Riso ; *6 Septembre 2018, Nantes*

Titre : Spéciation de la matière organique dissoute dans les écosystèmes estuarien et côtier par chromatographie d'exclusion stérique multi-détection

Mots clés : matière organique dissoute, chromatographie d'exclusion stérique, estuaires, océan côtier,

Résumé : La matière organique dissoute (MOD) est un des principaux vecteurs de carbone à l'océan. Cependant, elle est profondément altérée lors de son transit dans les eaux estuariennes et son séjour en milieu côtier. L'objectif de cette thèse est d'apporter de nouveaux éléments sur la composition, le rôle dans les cycles biogéochimiques le long du transfert terre-mer et le devenir dans l'océan côtier de la MOD. L'analyse de la MOD a été réalisée à l'aide d'une technique d'analyse globale et semi-spécifique : la chromatographie d'exclusion stérique multi-détection (SEC-mDEC), qui permet de séparer la MOD en six fractions de tailles aux propriétés diverses. La dynamique de ces composés a été étudiée de manière saisonnière dans l'estuaire de l'Aulne et la rade de Brest. Dans l'estuaire, le couplage de la SEC-mDEC avec la fluorescence 3D a aussi été étudié.

Initialement conçue pour l'analyse des eaux douces, la SEC-mDEC adaptée à l'analyse des milieux à salinité variable a permis de démontrer que la MOD est impliquée dans de nombreux processus biogéochimiques. Dans l'estuaire de l'Aulne, elle permet de tracer les apports terrigènes et marins. Des modifications substantielles sont apportées à la MOD par le développement des microorganismes et les processus de flocculation en amont du gradient halin. Dans la rade de Brest, l'ensemble des fractions de taille permet de dessiner un continuum de réactivité autour de la dégradation bactérienne du bloom phytoplanctonique. Ces résultats démontrent que l'utilisation du seul carbone organique dissous global des échantillons n'est pas suffisante pour contraindre la dynamique de la MOD dans le continuum terre-mer

Title : Dissolved organic matter speciation in estuarine and coastal ecosystems by size exclusion chromatography multi-detection.

Keywords : dissolved organic matter, size exclusion chromatography, estuaries, coastal ocean.

Abstract : Dissolved organic matter (DOM) is one of the most important vector of carbon to the ocean. However, DOM is deeply altered during its transit through estuarine waters and its residence time in coastal waters. The purpose of this thesis is to bring new insights on the DOM composition, role in biogeochemical cycles during land-sea transfer and fate in coastal areas. DOM analysis was performed with a global and semi-specific tool: size-exclusion chromatography multi-detection (SEC-mDEC), which allow the separation of DOM into six size fractions of different nature. Dynamics of these compounds were studied seasonally in the Aulne estuary and the bay of Brest. The coupling between SEC-mDEC and 3D fluorescence was studied in the estuary.

Initially design for freshwater analysis, the adapted SEC-mDEC for estuarine and marine water analyses permitted the demonstration that DOM is involved in several biogeochemical processes. In the Aulne estuary, DOM tracks the contribution of both riverine and marine sources. Substantial changes are made to the DOM by microorganisms and flocculation processes upstream. In the Bay of Brest, all fractions enable to design a reactivity continuum from the bacterial degradation of the phytoplanktonic bloom. Results demonstrate that the single use of the global dissolved organic carbon is not enough to constrain DOM dynamic in the land-sea continuum.