

N° d'ordre : 2923

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Lilian VACHER**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

ÉTUDE PAR FLUORESCENCE DES PROPRIÉTÉS DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE DANS LES SYSTÈMES ESTUARIENS. CAS DES ESTUAIRES DE LA GIRONDE ET DE LA SEINE

Soutenue le 17 décembre 2004

Après avis de :

Mme Sylvie DERENNE, Directeur de Recherche CNRS, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris *Rapporteur*
Mme Claire RICHARD, Directeur de Recherche CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand *Rapporteur*

Devant la commission d'examen formée de :

M. Philippe GARRIGUES, Directeur de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1 *Président et rapporteur*

Mme Sylvie DERENNE, Directeur de Recherche CNRS, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris *Examineur*
Mme Claire RICHARD, Directeur de Recherche CNRS, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand *Examineur*
M. Gérard BLANC, Professeur, Université Bordeaux 1 *Examineur*
M. Louis Alexandre ROMANA, Directeur de Recherche IFREMER, Centre de La Seyne/Mer *Examineur*

Mme Edith PARLANTI, Chargé de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1 *Directeur de thèse*

M. Henri ETCHEBER, Chargé de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1 *Membre invité*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels dirigé par Monsieur Philippe GARRIGUES. Je tiens à lui exprimer tous mes remerciements pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire depuis la maîtrise et pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame Claire RICHARD et Madame Sylvie DERENNE qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, pour leurs commentaires avisés et la pertinence de leurs remarques sur ce mémoire.

Je tiens à remercier Monsieur Louis Alexandre ROMANA, directeur du programme SEINE AVAL 2, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de participer à ce jury de thèse.

Je remercie également Monsieur Gérard BLANC de sa participation à ce jury. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour m'avoir permis d'embarquer au cours des missions GIMET, pour avoir partagé ses connaissances du fonctionnement géochimique de l'estuaire de la Gironde et pour sa collaboration concernant le dosage des métaux traces.

Je remercie Monsieur Henri ETCHEBER de m'avoir fait le plaisir de faire partie de ce jury de thèse. Son expérience de la matière organique dans les estuaires, ses conseils et ses remarques m'ont toujours été d'une grande utilité. Je le remercie de m'avoir intégré au sein des missions GIMET et GIROX, pour sa collaboration lors des missions en Seine et pour les mesures de carbone.

Enfin, je souhaite remercier tout particulièrement Madame Edith PARLANTI qui a dirigé cette thèse et m'a initié à la recherche depuis la maîtrise. Je tiens à lui témoigner toute ma reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordé durant toutes ces années, pour l'expérience et l'ensemble des connaissances pluridisciplinaires que j'ai pu acquérir au cours de cette thèse et pour m'avoir permis de participer à des congrès scientifiques ainsi qu'aux diverses missions océanographiques.

Mes remerciements s'adressent également à de nombreuses personnes qui ont contribué de manière directe ou indirecte à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier tous les membres du LPTC et en particulier :

Je remercie Michel LAMOTTE pour sa disponibilité, ses conseils et pour avoir partagé son expérience de la spectroscopie de fluorescence. Je remercie également Marc EWALD qui est quelque part à l'origine des études par fluorescence de la MOD.

Je remercie Hélène BUDZINSKI qui m'a initié à la rigueur de l'étude des contaminants organiques depuis le DEA et m'a permis d'effectuer les études d'interactions. Un grand merci à Karyn LE MENACH et Laurent PELUHET pour leur aide précieuse.

Je remercie aussi Bénédicte MORIN pour les expériences d'électrophorèse capillaire.

Merci aussi à tous les étudiants que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ces années au laboratoire et je leur souhaite bonne chance pour la suite : Fabienne, Katharina, Marie-Hélène,

William, David, Laurent, Olivier G, Olivier M, Kévin, Pierre, Emilie, Anne, Nathalie et tous ceux que j'oublie...

Je remercie les membres du DGO avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et en particulier :

Gwénaël ABRIL auprès duquel j'aurais appris énormément concernant le fonctionnement des estuaires. Merci pour ces bons moments passés lors des missions de terrain en Gironde ou en Seine, je me rappellerai longtemps de la mission NUTS 2, des manips en musique dans le caisson avec Dominique et Nadège et des incubations la nuit avec Mathieu et Julien.

Je remercie également Emmanuelle LEMAIRE pour les expériences d'incubations à Arcachon et à Bordeaux, pour son aide, ses conseils et les bons souvenirs qui me restent des séjours au Havre et à Rouen.

Je remercie aussi Jörg SCHAEFER pour la collaboration concernant le dosage des métaux et Sébastien ROBERT qui m'a toujours trouvé une place durant les missions GIMET.

Je tiens également à remercier Stéphane MOUNIER, Cédric GARNIER et Dominique FEVRIER pour leur collaboration, leur sympathie et leur accueil à Toulon.

Je souhaite aussi remercier Robert LAFITE pour m'avoir permis de participer à la mission VASTEDEBA 4 et pour ses explications sur le fonctionnement de l'estuaire de la Seine. Je remercie André FICHT pour les prélèvements mensuels dans l'estuaire de la Seine. Merci aussi à Daniel LIOTARD pour la mise au point du programme de paramétrisation.

Je remercie également les membres de l'UMR Sisyphe de Jussieu pour leur collaboration dans le cadre de SEINE AVAL 2 et en particulier les étudiants rencontrés lors des missions et avec lesquels j'ai passé d'agréables moments : Mathieu, Maïté et Julien.

Je tiens aussi à remercier les équipages des navires océanographiques de L'INSU, Côte de la Manche et Côte d'Aquitaine, et de l'IFREMER, Thalia, sans lesquels les prélèvements n'auraient pu être effectués. Merci pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur aide durant la vie à bord.

Une pensée aussi pour toutes les personnes rencontrées à bord des navires, dans les différents labos ou au cours des congrès à Bordeaux, Arcachon, Rouen, Le Havre, Limoges, Nancy, Toulon, Clermont-Ferrand, Lille, Boston et avec qui j'ai passé de très bons moments.

Et enfin un énorme merci à ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu et surtout à Laurie, pour tout...

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
<u>CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	7
1- Les systèmes estuariens	9
1-1- Définition	9
1-2- Caractéristiques hydrodynamiques et hydrosédimentaires	10
1-3- Biogéochimie estuarienne	11
1-4- Cycle du carbone dans les estuaires	13
2- La Matière Organique Dissoute (MOD) des eaux naturelles	14
2-1- Origine de la MOD	15
2-2- Nature et composition de la MOD	17
2-3- Les substances humiques	21
3- Fluorescence des eaux naturelles	24
3-1- Propriétés de fluorescence de la MOD des eaux naturelles	25
3-2- La fluorescence pour l'étude des processus en milieu aquatique	29
4- Fractionnement par ultrafiltration	31
<u>CHAPITRE 2 : TECHNIQUES ANALYTIQUES</u>	37
1- Principe de la fluorescence	39
2- Extinction de fluorescence (Quenching)	45
3- Mesures de Carbone Organique Dissous (COD)	49
4- Principe de l'ultrafiltration	50
5- Présentation des sites d'étude : estuaires de la Seine et de la Gironde	54
5-1- Estuaire de la Gironde	54
5-2- Estuaire de la Seine	55
6- Stratégie d'échantillonnage	56
6-1- Estuaire de la Gironde	57
6-2- Estuaire de la Seine	57
7- Remarques préliminaires à l'interprétation des spectres de fluorescence	59

CHAPITRE 3 : <u>EVOLUTION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE LE LONG DE L'ESTUAIRE</u>	63
1- Estuaire de la Seine	65
1-1- Evolution du signal de fluorescence en fonction de la salinité dans l'estuaire aval	65
1-1-1- Mission de janvier 2001	65
1-1-2- Mission d'avril/mai 2001 (Vastedéba 4)	68
1-1-3- Mission d'août 2001 (Nuts 01)	71
1-1-4- Mission de septembre 2002 (Nuts 02)	79
1-2- Variations saisonnières des paramètres de fluorescence dans l'estuaire aval	82
1-3- Variations saisonnières du signal de fluorescence dans l'estuaire amont	86
2- Estuaire de la Gironde	98
2-1- Evolution du signal de fluorescence en fonction de la salinité dans l'estuaire	98
2-1-1- Mission de février 2002 (Girox 1)	98
2-1-2- Mission de septembre 2002 (Girox 2)	101
2-2- Variations saisonnières en fonction de la salinité de la MOD dans l'estuaire de la Gironde	103
3- Comparaison saisonnière des caractéristiques de la MOD des estuaires de la Seine et de la Gironde	107
3-1- Carbone organique dissous	107
3-2- Propriétés de fluorescence	108
3-2-1- Intensités et rapports d'intensités des bandes de fluorescence	108
3-2-2- Indices d'humification et source de la MOD	111
3-2-2-a- Indice f450/f500	111
3-2-2-b- Indice d'humification HIX	114
3-2-2-c- Indice de fluorescence relatif au fluorophore β	119
4- Conclusion	123
CHAPITRE 4 : <u>ETUDE DES PROPRIETES ET DES MODIFICATIONS DE LA MOD DANS LE SYSTEME BOUCHON VASEUX PAR ULTRAFILTRATION</u>	127
1- Estuaire de la Gironde	131
1-1- Caractérisation fluorimétrique des échantillons bruts	131
1-2- Fractionnement par ultrafiltration – Gimet 3 (juin 2001)	133
1-2-1- Distribution du carbone organique dissous	134
1-2-2- Propriétés de fluorescence	136
2- Estuaire de la Seine	144
2-1- Mission d'août 2001 (Nuts 01)	144
2-1-1- Distribution du carbone organique dissous	145
2-2-2- Propriétés de fluorescence	147
2-2- Mission de juillet 2002	154
2-2-1- Distribution du carbone organique dissous	155
2-2-2- Propriétés de fluorescence	156

2-3- Mission de septembre 2002 (Nuts 02)	159
2-3-1- Caractérisation des échantillons prélevés lors du point fixe	159
2-3-2- Fractionnement par ultrafiltration	163
2-3-2-a- Distribution du carbone organique dissous	163
2-3-2-b- Propriétés de fluorescence	165
3- Synthèse des résultats d'ultrafiltration	166
CHAPITRE 5 : <u>DEGRADATION DU PHYTOPLANCTON : APPORTS VERS LA PHASE ORGANIQUE DISSOUE FLUORESCENTE</u>	169
1- Influence de l'espèce phytoplanctonique et de la température	173
1-1- Expérience	173
1-2- Résultats et discussion	174
1-2-1- Chlorophycées	176
1-2-2- Diatomées	184
1-3- Synthèse des résultats	189
2- Effet des matières en suspension (MES)	191
2-1- Expérience	191
2-2- Résultats	193
3- Synthèse des résultats	204
CHAPITRE 6 : <u>PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOD</u>	207
1- Propriétés complexantes de la MOD vis à vis des métaux traces dans l'estuaire de la Gironde	210
2- Détermination des paramètres de complexation de la MOD vis à vis du cuivre par extinction de fluorescence	218
3- Conclusion	228
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	231
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	237
<u>ANNEXES</u>	255

Abréviations

BV : bouchon vaseux

COD : carbone organique dissous

COP : carbone organique particulaire

Da : Dalton

MES : matières en suspension

MM : masse moléculaire

MO : matière organique

MOD : matière organique dissoute

MOP : matière organique particulaire

PK : point kilométrique

INTRODUCTION GENERALE

Chaque année, les cours d'eau transportent environ $0,4 \cdot 10^{15}$ g de carbone organique depuis les continents vers le milieu océanique (Hedges et al., 1997). Le devenir de ce stock de carbone organique est d'un intérêt majeur pour la détermination des bilans de transfert de carbone entre les différents compartiments environnementaux.

Dans les milieux aquatiques, on distingue deux phases au sein de la matière organique: la phase particulaire et la phase dissoute qui inclut les espèces dites colloïdales. La fraction dissoute est dénommée matière organique dissoute (MOD) et elle est constituée d'un mélange hétérogène complexe de macromolécules présentant une grande variété de propriétés physico-chimiques. Elle représente une fraction importante du carbone organique contenu dans les eaux naturelles qu'elles soient d'origine continentale ou marine et elle intervient dans de nombreuses réactions physiques, chimiques et biologiques au sein des systèmes aquatiques.

Il est en particulier reconnu que dans les différents compartiments aquatiques, le transport, la stabilité et la biodisponibilité des polluants liés aux activités anthropiques (pesticides, hydrocarbures aromatiques, métaux) sont pour une large part influencés par ces substances (Mantoura et al. 1978 ; Scheunert et al., 1992 ; Christensen et al., 1996). Les mécanismes impliqués dans les processus de transport et de transformation de ces contaminants sont non seulement étroitement liés au type d'interaction mis en jeu mais également à la taille, la structure et la conformation des macromolécules. Il s'avère donc absolument primordial d'étudier plus précisément la nature et les propriétés des macromolécules organiques naturelles afin d'appréhender de façon plus juste la mobilité, la dispersion et le devenir des contaminants dans les systèmes aquatiques.

Ces études sont d'autant plus nécessaires dans les zones estuariennes qui sont à l'interface entre les continents et les océans et conditionnent le passage dans le milieu océanique des substances provenant du milieu continental. En effet, les estuaires peuvent être considérés comme des systèmes intégrateurs des bassins versants des fleuves en recueillant les substances naturelles ou d'origine anthropique qui sont drainées par les cours d'eau. Ils constituent donc à ce titre des zones d'intérêt particulier pour une meilleure connaissance des cycles biogéochimiques de nombreux composés.

De plus, ces systèmes complexes sont caractérisés par des variations importantes des facteurs environnementaux (salinité, pH, température) et également par la présence d'une zone de turbidité maximale appelée « bouchon vaseux » où les fortes teneurs en matière en suspension (MES) peuvent influencer les échanges entre les phases particulaire et dissoute.

Pendant de nombreuses années, la fraction organique dissoute a été considérée comme peu réactive en raison du caractère conservatif de la teneur en carbone organique dissous lors du mélange estuarien (Ittekkot et al., 1982 ; Mantoura et Woodward, 1983). Cependant, des travaux plus récents montrent que cette conservativité apparente cache en fait des phénomènes simultanés de production, de transformation et de disparition de composés organiques (Cifuentes et Eldridge, 1998 ; Moran et al., 1999) et surtout que la seule mesure de la teneur en COD ne permet pas de rendre compte des profondes modifications que peut subir la fraction organique dissoute sous l'effet des variations physico-chimiques du milieu.

Cependant, la caractérisation du matériel organique macromoléculaire dissous dans les eaux naturelles nécessite le recours à des techniques d'analyse diverses qui se heurtent depuis des décennies à la complexité de ces substances naturelles.

Parmi toutes les méthodes développées, la spectroscopie de fluorescence s'avère particulièrement adaptée à l'étude de la MOD dans les eaux naturelles (Mopper et Schultz, 1993 ; Coble, 1996 ; De Souza Sierra et al., 1997). Cette technique, qui présente le très grand avantage d'être très sensible, de ne nécessiter aucun traitement préalable et de n'entraîner aucune modification intrinsèque de l'échantillon, reste cependant une méthode globale et ne permet pas une caractérisation moléculaire précise des différents constituants de la MOD. Elle permet néanmoins, de suivre très facilement l'évolution du matériel organique dissous, tant sur le plan qualitatif que semi-quantitatif, et de distinguer et de quantifier proportionnellement parmi les bandes de fluorescence observées, celles dues à du matériel d'origine terrigène (substances humiques) de celles produites par le matériel provenant de la dégradation des organismes vivants (algues, phytoplancton, etc.).

L'objectif de cette thèse est d'appliquer la spectroscopie de fluorescence à l'étude de la MOD afin de progresser dans la caractérisation des macromolécules organiques naturelles et de leurs propriétés dans les zones estuariennes où elles sont soumises à de profondes variations des conditions environnementales.

Ainsi, les travaux réalisés s'inscrivent dans le cadre de deux programmes nationaux d'étude des systèmes estuariens :

- Le programme SEINE AVAL 2 (2001-2004), thème 3 : Eutrophisation, dégradation de la matière organique, rétention des nutriments dans l'estuaire de la Seine.

- Le GIS-ECOBAG soutenu par le programme LITEAU (2000-2003) de l'Agence de Bassin Adour Garonne, thème 3 : Devenir de la matière organique et qualité des eaux estuariennes de la Gironde.

Au sein de ces deux programmes nos objectifs étaient de mieux connaître la nature, l'évolution et le rôle de la fraction organique dissoute dans ces deux systèmes estuariens et notamment dans le fonctionnement biogéochimique du bouchon vaseux.

Pour cela, nous avons développé trois axes de recherche :

- La caractérisation par spectrofluorimétrie de la matière organique dissoute et colloïdale le long de l'estuaire et l'influence des facteurs environnementaux (salinité, effets saisonniers, activité biologique, eutrophisation, bouchon vaseux...).
- L'évaluation des apports de matière organique aux phases colloïdale et dissoute dus à la dégradation de matériel d'origine phytoplanctonique.
- La mise en évidence du rôle de la fraction colloïdale sur les transferts et la biodisponibilité des contaminants.

Les résultats concernant ces trois volets sont consignés dans ce mémoire qui s'articule en six chapitres :

Le chapitre 1 présente les caractéristiques de base des milieux estuariens et propose une synthèse bibliographique concernant la matière organique dissoute et les deux principales techniques que nous avons utilisées pour sa caractérisation : la spectroscopie de fluorescence et l'ultrafiltration.

Le chapitre 2 décrit les deux sites d'études, l'estuaire de la Seine et l'estuaire de la Gironde, les stratégies d'échantillonnage que nous avons utilisées et présente également le détail des techniques analytiques que nous avons employées durant ce travail.

Dans le chapitre 3 nous présentons les résultats concernant le premier axe de recherche décrit plus haut, à savoir la caractérisation par spectrofluorimétrie de la matière organique dissoute dans les deux estuaires en fonction des facteurs environnementaux.

Le chapitre 4 constitue un approfondissement de cette caractérisation par le couplage de la spectrofluorimétrie avec le fractionnement de la MOD en fonction de la taille moléculaire par ultrafiltration.

Le chapitre 5 concerne le deuxième axe de recherche et décrit le suivi par fluorescence de l'évolution de la MOD durant la dégradation de matériel phytoplanctonique au sein du bouchon vaseux estuarien. Ce volet a été réalisé en collaboration avec H. Etcheber, G. Abril et E. Lemaire du DGO (Département de Géologie et Océanographie, UMR EPOC 5805, Université Bordeaux 1)

Enfin, le sixième chapitre est consacré à l'étude des interactions entre les espèces colloïdales et les contaminants en milieu estuarien au travers de la spéciation des métaux traces dans l'estuaire de la Gironde qui a été effectuée en collaboration avec G. Blanc et J. Schäfer du DGO.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1- LES SYSTEMES ESTUARIENS

1-1- Définition

Les estuaires sont des zones d'interface entre continent et océan qu'il est difficile de caractériser en raison de la grande variabilité de leur géomorphologie ainsi que de leur comportement hydro-sédimentologique. Une définition globale a été introduite par Pritchard (1967) désignant un estuaire comme une entité d'eau côtière où se mélange les eaux de mer et les eaux douces issues du drainage des sols. Cependant, afin de caractériser de manière plus précises ces systèmes qui peuvent être très différents, deux classifications ont été introduites. Tout d'abord, la classification géomorphologique (Perillo, 1995) différencie plusieurs types d'estuaires en fonction de l'importance des apports sédimentaires par les fleuves et des caractéristiques hydrodynamiques du mélange des eaux douces et marines et permet donc de distinguer deltas, estuaires intérieurs, lagunes, fjords...

Une deuxième classification s'effectue en fonction de la structure saline des estuaires. Le mélange entre les eaux douces et salées se fait de façon plus ou moins intense sous l'effet des marées. Il en résulte une stratification variable des eaux qui est favorisée par le débit et atténuée par la marée. Un indice de cette stratification est donné par le nombre de Canter-Cremer qui est le rapport entre le prisme tidal (différence de volume d'eau contenu dans l'estuaire à marée haute et à marée basse) et le volume d'eau douce apportée par le fleuve durant un cycle de marée. On distingue ainsi trois types d'estuaires (Pritchard, 1967):

Les **estuaires très stratifiés** (nombre de Canter-Cremer ≈ 1)

Ils sont caractérisés par une faible amplitude de marée et par un débit fluvial fort. Il se produit donc une forte stratification verticale et l'on observe aussi la présence d'un coin salé stationnaire. L'eau douce, moins dense, circule au dessus de l'eau salée dont elle est séparée par une halocline.

Les **estuaires partiellement stratifiés** (nombre de Canter-Cremer de 10 à 100)

Des courants de marée plus forts augmentent la turbulence et favorisent le mélange vertical des eaux entraînant ainsi une stratification moins marquée.

Les estuaires bien mélangés (nombre de Canter-Cremer > à 1000)

Les courants de marée induisent une turbulence suffisamment importante pour permettre le mélange de l'ensemble de la colonne d'eau.

Cependant, il est important de noter que dans la réalité, la stratification n'est pas aussi bien définie et qu'elle peut présenter une variabilité spatio-temporelle. En effet, les estuaires macrotidaux (à forte amplitude de marée), dont font partie les estuaires de la Seine et de la Gironde, sont plus mélangés à l'amont qu'à l'embouchure. Ils peuvent être bien mélangés en période d'étiage et partiellement stratifiés en période de crue. Ils sont également mieux mélangés en période de vives-eaux qu'en période de mortes-eaux.

1-2- Caractéristiques hydrodynamiques et hydrosédimentaires

En raison de la différence de salinité entre l'amont et l'aval de l'estuaire, il se crée une circulation dirigée de l'amont vers l'aval en surface et de l'aval vers l'amont au fond (Allen, 1972). Cette circulation est appelée circulation de densité. Elle est favorisée par la stratification des eaux et elle est plus importante dans les estuaires microtidaux.

L'hydrodynamique des estuaires macrotidaux est largement dominée par les courants de marée dont les vitesses peuvent être de deux ordres de grandeurs supérieures à celles induites par le débit du fleuve (Officer, 1983). Ces courants favorisent le mélange des eaux et limitent donc la circulation de densité. La propagation de l'onde de marée à l'intérieur de l'estuaire est progressive, ainsi on observe un décalage dans le temps des phases de la marée entre l'embouchure et l'amont de celui-ci. De plus, sous l'effet de la diminution de la profondeur vers l'amont, l'onde de marée devient asymétrique entraînant un flot plus bref accompagné de vitesses plus élevées que le jusant (Allen, 1972).

L'asymétrie de l'onde de marée combinée avec les courants de densité provoque la rétention des matières en suspension à l'intérieur de l'estuaire qui forment alors une zone de turbidité maximum encore appelée « bouchon vaseux » (Allen et al., 1977 ; Sottolichio, 1999). Ce bouchon vaseux est principalement localisé dans les régions de faible salinité ou dans la rivière tidale (zone d'eau douce comprise entre la limite d'intrusion saline et la limite de la marée dynamique). Il est soumis à des migrations longitudinales et des cycles de sédimentation / remise en suspension, aux échelles de temps diurne, lunaire et saisonnière (Allen et al., 1980 ; Abril et al., 1999). Les particules déposées au fond forment alors une phase très turbide appelée crème de vase. Lors de crues exceptionnelles, le bouchon vaseux se

déplace vers l'aval de l'estuaire sous l'effet du débit et peut même être expulsé en grande partie sur le plateau continental. La turbidité ou concentration en matières en suspension (MES) dans le bouchon vaseux (BV) est liée à l'intensité de l'érosion mécanique sur les bassins versants qui conditionne l'apport de MES par le fleuve (Maneux, 1998) mais aussi à l'augmentation de la force ionique lors du mélange eaux douces / eaux salées qui entraîne la floculation de matériel colloïdal (McCarthy et al., 1996 ; Van Heemst et al., 2000 ; Benner et Opsahl, 2001) et donc la production de MES dans l'estuaire (Wollast, 1988).

La zone de turbidité maximum est caractérisée par une faible pénétration de la lumière qui limite la photosynthèse et donc la production primaire autochtone. Parallèlement, le bouchon vaseux est le siège d'une activité bactérienne hétérotrophe très intense qui est à l'origine de la minéralisation de la matière organique au sein de l'estuaire. Ces bactéries sont concentrées dans le bouchon vaseux où elles sont majoritairement fixées sur les particules d'où elles tirent leur nourriture. Cette activité hétérotrophe se traduit par un déficit en oxygène au niveau du BV qui limite le développement des espèces planctoniques. Ainsi on observera deux types de populations phytoplanctoniques. La première fluvatile en amont de la turbidité de l'estuaire et la deuxième d'origine marine en aval, dans l'embouchure de l'estuaire. Du point de vue hydrodynamique, le plancton se comporte de façon identique aux matières en suspension, il a donc tendance à s'accumuler dans le BV où il ne peut pas se développer à cause du manque de lumière et où donc il se dégrade sous l'effet de l'activité bactérienne.

1-3- Biogéochimie estuarienne

Les apports de matière organique ou inorganique à l'estuaire ont plusieurs origines. Ils peuvent provenir du bassin versant amont, du bassin versant estuarien ou encore du domaine côtier. Ils peuvent être également d'origine atmosphérique ou encore provenir de l'estuaire lui-même par la remise en suspension de matériel ayant sédimenté ou encore la production de matériel autochtone par la photosynthèse. Ces apports sont de natures diverses et scindés en deux groupes en fonction de la taille du matériel concerné. On distingue ainsi les matières en suspension (MES) des matières dissoutes par une filtration à 0.45 μm qui est donc une frontière analytique définie arbitrairement entre les domaines particulaire et dissous.

La phase dissoute comprend principalement les divers sels et sels nutritifs, des oxydes et hydroxydes, des polluants et la matière organique dissoute (MOD) qui est l'objet de cette étude et sur laquelle nous reviendront plus précisément ultérieurement. Les MES sont le support de nombreux éléments comme les polluants ou les bactéries et jouent un rôle majeur notamment au sein du système bouchon vaseux. Ces divers composés jouent des rôles clés au

sein des systèmes estuariens que ce soit en raison des échanges entre les deux phases ou bien de leur réactivité, de leur toxicité ou de leur impact sur le milieu.

Parmi tous les éléments, le carbone est l'élément biogène primordial à la surface du globe. Le cycle du carbone est au cœur des processus biogéochimiques et constitue un point central des préoccupations scientifiques actuelles (effet de serre). Les eaux naturelles constituent un des grands réservoirs de carbone de la planète. Au sein des milieux aquatiques le carbone est présent dans les phases particulaire et dissoute et on le distingue sous deux formes : organique et inorganique.

Le carbone inorganique est principalement issu de l'érosion et de la dissolution des roches sur les bassins versants. Il est présent dans les eaux naturelles majoritairement sous forme dissoute dont les formes chimiques sont en équilibre dans l'eau : dioxyde de carbone dissous ($\text{CO}_{2\text{aq}}$), acide carbonique (H_2CO_3), ions bicarbonates (HCO_3^-) et ions carbonates (CO_3^{2-}). Il se produit également des échanges atmosphériques avec le dioxyde de carbone gazeux. Sous forme particulaire, il se compose principalement de calcite ou aragonite (CaCO_3) et calcites magnésiennes ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(1-x)}\text{CO}_3$).

Le carbone organique permet d'évaluer la qualité et la quantité de la matière organique présente dans les eaux naturelles. Dans les milieux estuariens cette matière organique peut être d'origine allochtone ou autochtone. La matière organique particulaire (MOP, $>0,45\mu\text{M}$) provient soit de l'érosion des bassins versants ou de rejets domestiques, industriels et agricole soit elle est produite par la photosynthèse aquatique. La matière organique dissoute (MOD) qui inclut la matière organique colloïdale (comprise entre 1nm et $0,45\mu\text{m}$) est principalement composée de macromolécules organiques naturelles issues de la dégradation de substances animales ou végétales, terrestres ou aquatiques. Le tableau 1-1 présente les concentrations en carbone organique dans différents compartiments aquatiques.

Le caractère labile ou réfractaire de la matière organique constitue une notion fondamentale pour appréhender son rôle et son devenir au sein des processus biologiques, chimiques et physiques ayant lieu dans les eaux naturelles. Ce caractère dépend de la nature et donc de l'origine de ce matériel organique, il peut varier de façon saisonnière et en fonction des conditions environnementales. Les temps de résidence des particules dans les estuaires macrotidaux sont de l'ordre de plusieurs mois (Officer, 1983 ; Etcheber et al., 1999) ce qui va permettre la minéralisation de la majeure partie du carbone organique particulaire labile au sein de l'estuaire.

Teneur en Carbone Organique mg/l	Dissous	Particulaire	Total
Rivières	5-15	5-10	10-20
Océans			
Surface	1-1.5	0.01-1	1-2.5
Fond	0.5-08	0.003-0.01	0.5-0.8
Zone côtières	1-5	0.1-1	1-6
Estuaires	1-5	0.5-10	1.5-15

Tableau 1-1. Concentrations moyennes de COD dans les eaux naturelles (adapté de Burton et Liss, 1976)

En ce qui concerne la MOD, de nombreux auteurs ont mis en évidence le comportement conservatif de la teneur en carbone organique dissous le long de divers estuaires (Laane, 1980 ; Ittekkot et al., 1982 ; Mantoura et Woodward, 1983). Cependant des études plus récentes ont montré que ce comportement conservatif n'est qu'apparent et résulte de l'existence simultanée de sources et de puits de COD qui se compensent globalement et entraînent ainsi peu de variations de la teneur globale en COD (Cifuentes et Eldridge, 1998 ; Moran et al., 1999 ; Raymond et Bauer, 2000). Certains estuaires présentent cependant de façon nette des écarts à la conservativité (Abril et al., 2002) qui peuvent être en majeure partie reliés à une production autochtone importante lors de blooms phytoplanctoniques (Fisher et al., 1998 ; Chen 1999 ; Rochelle-Newall et Fisher, 2002b). De plus la teneur en COD comme seul paramètre ne permet absolument pas de rendre compte du rôle et des multiples transformations que peut subir la matière organique dissoute durant le passage des eaux continentales vers le milieu océanique, ce qui représente l'objet premier de cette étude.

1-4- Cycle du carbone dans les estuaires

Dans les estuaires, le cycle du carbone se traduit par une compétition entre activité autotrophe et activité hétérotrophe. En effet, la production primaire est assurée par les organismes marins photosynthétiques (principalement le phytoplancton) qui au travers de la photosynthèse transforment le carbone minéral (CO₂) en composés organiques plus ou moins complexes. Parallèlement, l'activité hétérotrophe est responsable de la minéralisation du carbone organique par les bactéries qui conduit donc à la production de CO₂.

La production primaire dans les estuaires est favorisée par des apports importants de sels nutritifs par les eaux douces. Cependant cette production est dans le même temps limitée par la faible pénétration de la lumière dans les eaux en raison de la turbidité. On distingue donc deux régions principales de production primaire dans les estuaires : l'une en amont du bouchon vaseux et l'autre en aval de celui-ci. Au sein du bouchon vaseux, le phytoplancton ne peut plus puiser la lumière nécessaire à sa photosynthèse et de plus il subit un stress osmotique (Ahel et al., 1996) dû au gradient de salinité qui entraîne une surmortalité et une minéralisation importante de ce matériel labile par les bactéries hétérotrophes du bouchon vaseux (Abril et al., 1999). Dans les estuaires, les communautés de bactéries attachées aux particules sont majoritaires par rapport aux bactéries libres et leur activité est plus importante (Crump et al., 1998). L'activité hétérotrophe se produit aussi bien en milieu aérobie qu'en milieu anaérobie, et la minéralisation s'effectue soit par hydrolyse exoenzymatique du COP et du COD en milieu oxygène soit par fermentation de la matière organique dans les sédiments anoxiques. Cependant, les systèmes estuariens connaissent des transitions oxygène/anoxique fréquentes (Abril et al., 1999) et il est très probable que des enzymes soient également présentes et actives dans des conditions anoxiques, notamment dans la colonne d'eau des bouchons vaseux où de forts déficits en oxygène sont fréquemment observés (Thouvenin et al., 1994). On peut également citer l'existence dans la partie aval des estuaires d'une photominéralisation du COD d'autant plus importante que le matériel organique concerné est récent (Skoog et al., 1996).

La balance entre activités autotrophe et hétérotrophe dans les estuaires macrotidaux turbides penche globalement en faveur de l'activité hétérotrophe (Heip et al., 1995) qui contribue à l'établissement d'un flux net de CO₂ des estuaires vers l'atmosphère (Frankignoulle et al., 1998).

2- LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUE DES EAUX NATURELLES

On désigne sous le nom de matière organique dissoute (MOD) un ensemble complexe et hétérogène de macromolécules organiques formées par la dégradation de matériel biologique animal ou végétal, d'origine terrestre ou aquatique. Cette fraction du matériel organique est une composante essentielle dans les processus photochimiques et photophysiques affectant l'ensemble des substances inorganiques ou organiques introduites dans l'environnement et elle représente un réservoir majeur (10-30%) de carbone organique présent dans les milieux aquatiques (Aiken et al., 1985). Dans les eaux naturelles, ce groupe de composés joue un rôle important dans les cycles biologiques et dans le transit du matériel

continental vers le milieu océanique au niveau des estuaires. Il est en effet reconnu que dans les différents compartiments aquatiques, le transport, la stabilité et la biodisponibilité des polluants d'origine anthropique (pesticides, polychlorobiphényles, hydrocarbures aromatiques, métaux lourds) peuvent être pour une large part influencés par ces composés macromoléculaires (Christensen et al., 1996 ; Scheunert et al., 1992 ; Senesi, 1992 ; Bollag et al. 1992 ; Mantoura et al. 1978, 1981). Ils doivent ce rôle à leurs caractéristiques chimiques et structurales qui leur donnent la possibilité de piéger ou de fixer des espèces chimiques variées minérales ou organiques.

Ces diverses propriétés dépendent de plusieurs paramètres comme les conditions environnementales mais aussi l'origine et la nature de la MOD qui vont conditionner les caractéristiques chimiques des macromolécules. D'un compartiment aquatique à l'autre, en fonction des conditions de pH ou de force ionique, leur structure et leurs caractéristiques chimiques peuvent varier et être profondément modifiées, entraînant des variations dans les processus d'interactions avec les polluants et par conséquent dans la répartition, le transport ou la dégradation de ces derniers. Ceci est particulièrement le cas dans les estuaires où les facteurs environnementaux varient de façon importante en fonction des saisons d'une part et sous l'effet des marées d'autre part qui conditionnent le mélange des masses d'eaux ayant des propriétés physico-chimiques différentes, mais aussi dans le bouchon vaseux qui présente des conditions particulières (successions de phases aérobie/anaérobie, pénétration de la lumière...).

2-1- Origine de la MOD

La MOD peut être d'origine autochtone ou bien allochtone, c'est à dire qui n'est pas issue des milieux aquatiques mais provient d'une origine terrestre.

On peut distinguer deux catégories de sources allochtones, tout d'abord la MOD provenant des sols et ensuite celle directement issue de la dégradation des plantes dans les litières. La principale différence chimique entre ces deux sources est que la matière organique issue des sols a subi une décomposition et des transformations plus importantes et possède un caractère beaucoup plus réfractaire vis à vis de l'activité hétérotrophe aquatique que celle provenant des litières. Cette matière organique d'origine terrestre est introduite dans le milieu aquatique par le lessivage des sols (Thurman, 1985).

En ce qui concerne les sources autochtones, la MOD est constituée pour l'essentiel de macromolécules formées par dégradation chimique, photochimique et bactérienne des substances libérées par le matériel biologique naturel (zooplancton, phytoplancton,

périphyton, macrophytes, débris végétaux...) soit durant leur activité biologique soit après leur disparition (Ittekkot, 1982 ; Suffet et MacCarthy, 1989 ; Seritti et al., 1994). Ce type de matériel est beaucoup plus labile et va donc être préférentiellement utilisé, dégradé et minéralisé par l'activité hétérotrophe (Sieburth et Jensen, 1969 ; Brophy et Carlson, 1989 ; Lara et Thomas, 1995).

L'exsudation du phytoplancton est une source importante de COD autochtone, puisque des concentrations élevées sont fréquemment associées à des maxima de chlorophylle (Mantoura et Woodward, 1983). Les résidus de membranes bactériennes peuvent également représenter une part importante du COD notamment dans le milieu océanique (McCarthy et al., 1993 ; Tanoue et al., 1995 ; Aluwihare et al., 1997). On peut également citer comme sources de COD l'activité exoenzymatique bactérienne (Hollibaugh et Azam, 1983, Arnosti et al., 2000) de même que les sédiments dans les estuaires très turbides puisque des concentrations plus élevées ont été observées lors de remises en suspension des sédiments (Cauwet et Mackenzie, 1993). De plus, l'exposition de composés réfractaires terrigènes aux rayons naturels ultraviolets peut également conduire à une photolyse et à la production de composés organiques labiles (acides acétiques, formique, citrique...) qui sont consommés par l'activité bactérienne (Kieber et al., 1989 ; Wetzel et al., 1995). Enfin, ces composés réfractaires peuvent également être dégradés par l'activité bactérienne (Moran et Hodson, 1990 ; Arvola et Tulonen, 1998) qui peut être exacerbée par une forte consommation de composés labiles, c'est le phénomène de cooxydation (Canfield, 1994).

La composition de la MOD varie fortement en fonction de son origine et du compartiment aquatique considéré. En effet, la MOD des eaux de rivières présente une origine terrigène très marquée avec des apports importants de carbone organique allochtone caractérisés par un matériel plus réfractaire et une composante autochtone algale tout de même relativement importante (Croué et al., 2003). Les eaux océaniques sont par contre caractérisées par une MOD quasiment entièrement issue de l'activité photosynthétique du phytoplancton (Gargosian et Lee, 1981) qui produit un type de matériel plus labile dont les processus de dégradation et de transformation vont être différents (McCarthy et al., 1996). Les estuaires se situent à l'interface de ces deux compartiments et la MOD présente va pouvoir résulter du mélange de deux types de matériels organiques bien distincts provenant spécifiquement de chacun des deux milieux aquatiques et dont l'importance relative est variable en fonction des conditions environnementales et des saisons. Outre la présence de MOD allochtone, au niveau de la zone de mélange des eaux douces et marines et donc dans le bouchon vaseux, deux types différents de matériel organique autochtone peuvent se trouver

simultanément, celui provenant du fleuve et celui d'origine océanique introduit dans l'estuaire par les marées. Ces deux types de matériels ont des caractéristiques chimiques distinctes puisque leurs sources diffèrent et peuvent donc présenter des propriétés différentes vis à vis de la dégradation ou des interactions avec d'autres substances.

2-2- Nature et composition de la MOD

La nature et la composition précise de la MOD dans les eaux naturelles sont encore mal définies aujourd'hui en raison de la grande diversité des composés qui la constituent.

La complexité de cette fraction du carbone organique a entraîné lors de ces dernières décennies le développement de nombreuses méthodes d'extraction et de séparation de la MOD afin de mieux la caractériser. Citons par exemple l'extraction par solvant et la lyophilisation (Shapiro, 1957), le fractionnement par ultrafiltration (Buffle et al., 1978), la concentration par osmose inverse (Stevens et al., 1990) ou par évaporation (Beck et al., 1974), la chromatographie d'exclusion sur gel (Gjessing et Lee, 1967), l'adsorption sur charbon actif (Dressler, 1979) ou sur polymères adsorbants non ioniques comme les résines XAD (Thurman et Malcolm, 1981), ou encore l'utilisation de résines échangeuses d'ions, anioniques ou cationiques (Leenheer, 1981 ; Zhou et al., 1990).

Parmi toutes ces méthodes, seule la technique d'extraction sur résines non ioniques XAD est reconnue et validée par l'International Humic Substances Society (IHSS) comme protocole standard d'extraction de la matière organique dissoute dans les eaux naturelles.

Historiquement ce protocole est basé sur les travaux de Thurman et Malcolm (1981) et repose sur les propriétés de solubilité (polarité, masse moléculaire) des composés organiques dans l'eau (Thurman et al., 1978). Il permet de distinguer les composés dits hydrophobes adsorbés sur résine XAD-8 à pH acide des composés dits hydrophiles qui ne sont pas adsorbés sur cette même résine. Plus récemment les travaux de Aiken et al. (1992), Malcolm et MacCarthy (1992), Croué et al. (1993) et Martin-Mousset et al. (1997) ont montré l'intérêt de la procédure d'extraction associant en série les résines XAD-8 et XAD-4. Ces résines sont des adsorbants macroporeux non ioniques. La résine XAD-8 de type ester acrylique est légèrement plus polaire que la résine XAD-4 dont la structure est de type styrène-divinylbenzène.

Ce protocole d'isolation permet d'effectuer une classification arbitraire de la MOD puisque elle est basée sur l'utilisation de techniques d'extraction sur résines non ioniques de type XAD et/ou sur résines échangeuses d'ions (Leenheer, 1981). Cette procédure

d'extraction permet donc la distinction de différentes classes de composés au sein de la matière organique dissoute :

-Les substances hydrophobes adsorbées sur résine XAD-8

-Les substances hydrophiles acides retenues sur résine XAD-4, fraction de polarité intermédiaire dénommée fraction « transphilique » (Croué et al., 2003).

-Les substances hydrophiles basiques et neutres non adsorbées (filtrat XAD-4).

Plusieurs méthodes analytiques spécifiques sont utilisées sur ces fractions afin de déterminer un maximum de caractéristiques chimiques et structurales, techniques de dégradations chimiques, techniques chromatographiques, spectroscopies UV, Infrarouge et fluorescence, résonance magnétique nucléaire du ^{13}C , spectrométrie de masse isotopique (Hayes et al., 1989 ; Croué et al., 2003). Il faut cependant noter que la mise en oeuvre de ce type de fractionnement est laborieuse et nécessite le traitement de très larges volumes afin d'obtenir une quantité suffisante de matière organique dissoute extraite permettant des analyses structurales. Ainsi ce protocole a jusqu'alors été uniquement appliqué à l'étude d'eaux douces (lacs ou rivières) présentant des teneurs conséquentes en COD et commence à peine à être appliqué à des eaux estuariennes ou marines ou la présence de sels gêne considérablement les étapes de préconcentration.

L'utilisation de cette panoplie de techniques analytiques permet d'avancer pas à pas dans l'identification de groupements fonctionnels, de morceaux de structures qui composent la MOD et de multiples propriétés physicochimiques.

Ainsi, à ce jour, seulement 20% de la MOD est représentée par des composés simples dont les structures sont facilement identifiables : sucres, acides aminés, acides carboxyliques, carbohydrates, phénols, tannins, pigments, hydrocarbures, analysables par des techniques spécifiques de type chromatographique (Thurman, 1985).

Les substances humiques représentent environ 50% de la MOD et représentent la majeure partie des substances hydrophobes retenues sur la résine de type XAD-8. Ces substances constituent un groupe complexe de macromolécules biochimiquement stables, relativement réfractaires à la dégradation biologique et dont les structures sont encore mal caractérisées en raison de leur grande hétérogénéité. Je reviendrai plus précisément sur ce groupe de composés dans le paragraphe suivant.

Les 30% restants de la MOD sont identifiés sous le nom d'acides hydrophiles et sont également très peu caractérisés. Les acides hydrophiles (fraction transphilique retenue sur XAD-4) représentent une fraction toute aussi hétérogène que les substances humiques. Selon

Leenheer (1981) cette fraction semble caractérisée par un ensemble d'acides organiques simples (acides gras volatils), de polyélectrolytes complexes riches en groupements hydroxyles et carboxyles, de sucres sous forme acide (acides uronique, aldonique, polyuronique) ainsi que des structures de type carbohydrate. Les récents travaux de Croué et al. (2003) mettent en évidence une plus grande proportion en polysaccharides au sein de cette fraction et de nombreux dérivés protéiniques caractérisant ainsi une origine biologique algale ou bactérienne fortement marquée.

Le tableau 1-2 regroupe les différents constituants des fractions extraites de MOD répertoriés dans la littérature.

	Fraction hydrophobe	Fraction hydrophile
Acides	Substances humiques (SH) : -acides humiques -acides fulviques Acides aromatiques simples Complexes carbohydrates-SH Polyphénols oxydés Acides gras Tannins Polyphénols Flavonoïdes Vanillines Protéines Phospholipides	Acides hydrophiles Acides carboxyliques simples Carbohydrates oxydés avec des groupements COOH Protéines Acides aminés Adénosine di- et tri-phosphates Inositol et autres sucres phosphatés
Neutres	Hydrocarbures Ethers Caroténoïdes Chlorophylle Cétones Alcools Substances humiques de faible acidité Protéines Phospholipides	Sucres simples Polysaccharides Alcools Cétones Ethers Protéines Acides aminés Urée
Bases	Peptides Protéines	Sucres aminés Pyrimidines Purines Acides aminés Peptides Protéines Amines de faible masse moléculaire

Tableau 1-2. Liste des principaux constituants de la MOD répertoriés dans la littérature (adapté de Tipping, 2002)

En raison de la grande variété de composés mis en jeu (Tableau 1-2) et de la multitude de réactions pouvant se produire dans les milieux naturels, plusieurs mécanismes réactionnels complexes permettent de rendre compte de la formation des substances humiques.

La figure 1-1 présente différents processus d'humification proposés pour décrire la formation des substances humiques à partir des différents constituants de la MOD.

En effet, les carbohydrates, protéines, acides aminés, lipides, lignines, tannins et pigments peuvent être dégradés en composés plus simples et très réactifs par des réactions enzymatiques microbiennes puis polymérisés, repolymérisés et condensés pour former les composés aromatiques et aliphatiques que sont les substances humiques (Stevenson, 1982 ; Rashid, 1985).

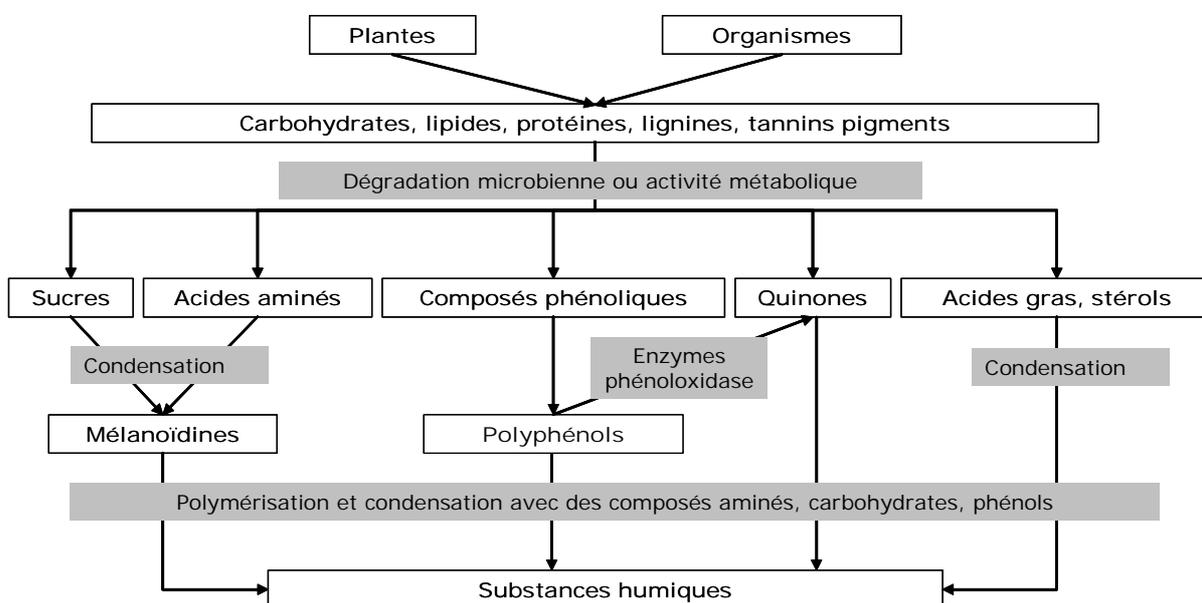


Figure 1-1. Schémas simplifiés de processus d'humification de la MOD proposés dans la littérature (Stevenson, 1982 ; Harvey et al., 1983 ; Rashid, 1985 ; Ishiwatari, 1992)

Parmi toutes les réactions possibles, le mécanisme principal qui est aujourd'hui communément admis comme aboutissant à la formation des composés humiques terrigènes met en jeu la réactivité des polyphénols et des quinones qui réagissent avec des composés azotés (protéines, peptides et acides aminés) ou des carbohydrates pour former les substances humiques.

En ce qui concerne la MOD d'origine marine plus spécifiquement, ce mécanisme est moins évident en raison de l'absence de lignine qui peut être un précurseur essentiel des composés phénoliques. Ainsi, les travaux de Harvey et al. (1983) mettent en avant un modèle de condensation et de polymérisation d'acides gras ou de lipides poly-insaturés pour expliquer

la formation de composés humiques marins. Nous pouvons également citer un autre mécanisme faisant intervenir les réactions de condensation entre les sucres et les acides aminés (mécanisme de type réaction de Maillard) qui seraient aussi susceptibles d'aboutir à la formation des composés humiques (Rashid, 1985 ; Stevenson, 1982 ; Ishiwatari, 1992).

Il faut également noter que les macromolécules organiques naturelles présentent dans certaines conditions un comportement micellaire et peuvent s'agréger afin de former des entités de très haut poids moléculaires désignées sous le terme de colloïdes organiques (Buffle et Leppard, 1995).

Les espèces organiques colloïdales peuvent représenter 50 à 70 % du COD (Benner et Hedges, 1993 ; Santschi et al., 1995) et sont principalement constitués de substances humiques ayant flocculé, de protéines, de polysaccharides et de peptidoglycanes (fragments de parois cellulaires) (Buffle et al., 1998). Les colloïdes jouent un rôle central dans le transport et la fixation des composés xénobiotiques au travers d'interactions électrostatiques, covalentes ou hydrophobes (Stumm et Morgan, 1996) que ce soit dans les eaux douces (Martin et al., 1995) ou les eaux marines (Guo et Santschi, 1997). Il faut cependant mettre en évidence toute la complexité de l'étude des colloïdes puisqu'ils peuvent parfois résulter de la floculation d'espèces organiques et minérales (oxydes, hydroxydes) et présenter ainsi des caractéristiques particulières (Buffle et al., 1998). Dans les estuaires, les variations des conditions de pH et de salinité vont entraîner des phénomènes de floculation/défloculation qui peuvent grandement influencer la distribution des différentes espèces et la spéciation des polluants, ce qui montre tout l'intérêt de l'étude des colloïdes au niveau de l'interface continent-océan.

2-3- Les substances humiques

Les composés humiques historiquement appelés Gelbstoff ou matière jaune (Duursma, 1965, Kalle, 1966) sont connus et étudiés depuis deux siècles environ, les écrits de Berzelius (1806) faisant partie des premiers sur le sujet. De nombreuses études ont porté sur les substances humiques contenues dans les sols qui sont largement associées à des matrices minérales et jouent un rôle important dans la géochimie des sols et leur fertilité (Aiken et al., 1985). L'étude des substances humiques aquatiques a connu un essor considérable dans les années 1970 et 1980 lorsqu'il a été montré que la chloration des eaux, principal procédé de désinfection dans le traitement des eaux de surface, entraîne la formation de composés organohalogénés (trihalométhanes, haloacides, halonitriles) dont certains sont carcinogènes suite à des réactions impliquant les substances humiques comme précurseurs (Coleman et al.,

1984). Cet essor a entraîné le développement de techniques de séparation de ces composés afin de faciliter leur caractérisation.

Ainsi, selon l'IHSS (International Humic Substances Society) les substances humiques aquatiques sont définies de manière opérationnelle comme étant des acides organiques polyélectrolytiques isolés d'une eau acidifiée par adsorption sur résines non-ioniques de type XAD-8 (Thurman, 1985) et élués de ces résines par de la soude (Croué et al., 1993) ou plus récemment par un mélange d'eau et d'acétonitrile (Croué, 2004).

La concentration et la distribution des composés humiques dans les différents milieux aquatiques dépendent fortement des divers facteurs écologiques et environnementaux qui vont contrôler leur formation et leur minéralisation. Ils sont considérés comme très résistants à la dégradation microbienne et peuvent rester très longtemps dans la colonne d'eau avant d'être minéralisés.

Les substances humiques constituent un mélange de macromolécules caractérisé par une grande variété de groupements fonctionnels et présentant une large gamme de propriétés physico-chimiques qui conditionnent leur comportement géochimique (Hayes et al., 1989). Elles présentent le caractère le plus aromatique de la MOD et des rapports C/H, C/O et C/N plus importants que les autres composés de la matière organique dissoute.

Elle possèdent un caractère amphiphile, c'est à dire qu'elles sont à la fois hydrophobes et hydrophiles, elles ne sont pas volatiles et leur composition élémentaire est approximativement 50% de carbone, 4 à 5% d'hydrogène, 35 à 40% d'oxygène, 1 à 2% d'azote et moins de 1% de soufre et de phosphore.

La distribution de masses moléculaires répertoriées dans la littérature varie généralement de 500 à 5000 Daltons (Thurman, 1985). De récents travaux portant sur les substances humiques des sols tendent à remettre en question la théorie généralement admise que ces substances sont des polymères liés entre eux de façon aléatoire par des liaisons covalentes formant ainsi des macropolymères (Ghosh et Schnitzer, 1980). En effet les résultats de Piccolo (2001) semblent indiquer que les substances humiques des sols sont composés de plus petites molécules liées par des liaisons faibles de type Van Der Waals, π - π , et CH- π et qu'elles possèderaient ainsi une structure supramoléculaire. On peut aisément imaginer le même type de comportement pour les substances humiques aquatiques et actuellement la communauté scientifique semble s'accorder petit à petit sur le fait que les composés humiques aquatiques sont de tailles plus modestes (quelques centaines à 2000 Daltons) que celles proposées par le passé (Croué, 2001). En effet, les composés humiques de

grande masse moléculaire identifiés dans le passé devait probablement correspondre à des agrégats (colloïdes) de substances humiques ou présentant un caractère humique.

Les substances humiques aquatiques sont des polyanions dont le degré d'ionisation dépend du pH du milieu. Elles sont classées selon leur solubilité en deux grandes catégories :

- les acides fulviques, solubles quelque soit le pH
- les acides humiques qui précipitent dans les solutions très acides (pH<2)

Généralement, les acides humiques regroupent des composés de plus grande masse moléculaire, d'acidité moindre et présentent une plus grande aromaticité (rapport C/H plus important). Les acides fulviques, plus solubles et plus petits présentent une plus grande proportion de groupements fonctionnels (Hayase et Tsubota, 1984).

Les différentes méthodes d'analyses appliquées à la caractérisation des substances humiques, notamment les techniques de dégradation chimique et de pyrolyse couplées à de la résonance magnétique nucléaire ou de la spectrométrie de masse ont permis d'accumuler des informations structurales sur la composition de ces composés. Les substances humiques d'eau douce et d'eau de mer ont des sources différentes et présentes des caractéristiques chimiques distinctes (Hedges et al., 1992) dont les structures ne sont pas encore pleinement définies actuellement (Hedges et al., 2000).

Cependant, les données structurales obtenues par les techniques citées précédemment ont été corrélées avec les résultats de mesures physico-chimiques afin de proposer des modèles de structures pour les acides fulviques et humiques de différentes origines.

Différents modèles ont été proposés parmi lesquels ceux de Schnitzer et Khan (1972), Schulten et Schnitzer (1995), Schulten et al. (1998) pour des substances humiques de sols et de Harvey et al. (1983) pour des composés humiques marins. La Figure 1-3 présente des modèles de structure de substances humiques.

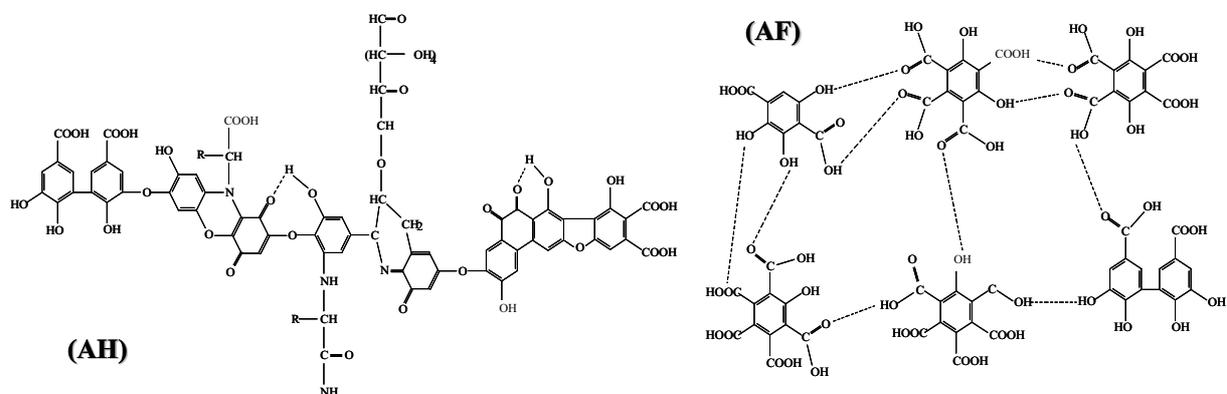


Figure 1-3. Modèles de structure de substances humiques: AH acide humique, AF acide fulvique (tirés de Schnitzer et Kahn, 1972)

Il faut bien garder à l'esprit que ces exemples de structures restent malgré tout des modèles et qu'ils ne représentent pas « la » structure d'une molécule précise d'acides fulviques ou humiques car les propriétés structurales et la proportion de groupements aromatiques et aliphatiques dépendent largement de la nature et de la composition du matériel d'origine. Il s'agit de modèles qui rendent compte des caractéristiques globales et moyennes de tout un ensemble de propriétés (composition élémentaire, masse moléculaire moyenne, polarité, type et proportion de groupements fonctionnels...). Ces modèles permettent cependant de mieux appréhender la nature complexe de ces substances et la multitude d'interactions qui vont pouvoir se produire dans les matrices environnementales, et ainsi permettre de mieux comprendre leur rôle. En effet, les progrès spectaculaires de la modélisation moléculaire appuyées par des données de RMN du ^{13}C ont permis de mettre en évidence le fait que selon les conditions de pH et de force ionique, les propriétés de surface des macromolécules peuvent varier et entraîner des modifications de conformation structurale. Les structures macromoléculaires peuvent ainsi se recroqueviller sur elles-mêmes et créer ainsi des zones hydrophobes à l'intérieur de leur structure qui pourraient faciliter le piégeage de diverses substances dont des composés xénobiotiques organiques (Hayes et al., 1989 ; Jones et Tiller, 1999 ; Schulten et Schnitzer, 1995).

Parmi toutes les propriétés des substances humiques, comme le rôle dans les cycles biogéochimiques, les interactions avec les contaminants organiques ou métalliques et le rôle comme initiateur de réactions photochimiques par absorption de la lumière et formation de radicaux hautement réactifs (Zafiriou et al., 1984), il est intéressant d'ajouter que ces substances comme d'ailleurs d'autres composés de la MOD donnent lieu à une émission de fluorescence caractéristique qui est la base de ce travail et que nous allons développer dans le paragraphe suivant.

3- FLUORESCENCE DES EAUX NATURELLES

Dans les eaux naturelles, une fraction très importante de la matière organique dissoute est colorée, c'est à dire qu'elle absorbe une partie du spectre (Harvey et Boran, 1981). L'absorption de cette fraction du carbone organique dissous est maximale dans l'ultraviolet et décroît jusqu'à une absorption proche de zéro dans la partie rouge du spectre. Suite à cette absorption lumineuse une des propriétés particulières de cette fraction de la MOD est d'émettre un signal de fluorescence qu'avait déjà observé Dienert (1910) au début du siècle dernier. Cette émission de fluorescence dont les composés humiques sont les principaux

responsables (Ewald et al., 1983) peut concerner environ 70% de la MOD (Laane et Koole, 1982).

La spectroscopie de fluorescence a donc été largement appliquée à l'étude des différents composés fluorescents qui constituent la MOD. Ces composés présentent une grande hétérogénéité et ils fluorescent dans différentes régions spectrales. C'est pourquoi la spectrofluorimétrie 3D est apparue comme une technique de choix pour l'étude de la fluorescence des eaux naturelles puisqu'elle permet d'observer l'ensemble d'une région spectrale (les principes de la fluorescence ainsi que les différentes techniques d'analyse sont développées dans le chapitre 2). Ainsi, même s'il s'agit d'une méthode globale qui ne permet pas une identification moléculaire précise des constituants de la MOD, la spectroscopie de fluorescence présente l'énorme avantage de ne nécessiter aucun traitement préalable de l'échantillon et permet d'obtenir des informations globales sur des caractéristiques moléculaires et les concentrations relatives des composés fluorescents. D'autre part elle permet également d'étudier les phénomènes de transformation, dégradation ou interaction ayant lieu dans les eaux naturelles.

3-1- Propriétés de fluorescence de la MOD des eaux naturelles

Les spectres de fluorescence des eaux naturelles sont composés de larges bandes de fluorescence qui représentent la contribution simultanée des spectres discrets de plusieurs fluorophores différents, ce qui rend difficile l'identification de ces fluorophores. En effet, La grande variété de structures qui composent la MOD et contribuent à la fluorescence dans les eaux naturelles ainsi que le nombre de paramètres (pH, force ionique, salinité) qui doivent être pris en compte dans les transitions électroniques d'un système si complexe rendent difficile l'application des règles de base d'absorption et luminescence pour caractériser les divers groupements fluorophoriques.

Dans un premier temps, les travaux ont porté sur la corrélation entre la teneur en carbone organique dissous et la fluorescence (Laane et Koole, 1982). En effet, l'émission de fluorescence est, sous certaines conditions (cf Chapitre 2) proportionnelle à la concentration de fluorophores, il s'agit donc d'une méthode semi-quantitative qui permet d'estimer la quantité de matériel organique dissous fluorescent. Cependant, la corrélation n'est pas si évidente puisque tout d'abord, la totalité du carbone organique dissous n'est pas fluorescent, ensuite, les rendements quantiques de fluorescence peuvent être variables d'un composé à un autre, et enfin des effets d'extinction de fluorescence (effets de filtres internes) peuvent occulter une partie du signal de fluorescence.

Ainsi, même si Laane et Koole (1982) ont montré une bonne corrélation dans un estuaire, d'autres auteurs ont obtenu des résultats plus mitigés dans des lacs ou les eaux côtières (De Haan et De Boer, 1987 ; Chen, 1999) puisque cette relation entre COD et fluorescence dépend fortement du type et de l'origine de la MOD (Mittenzwey et Reuter, 1995). En effet, comme cela a déjà été précisé dans le paragraphe 1-3 (Biogéochimie estuarienne), la teneur en COD, longtemps considérée comme l'unique paramètre nécessaire pour caractériser la MOD, ne permet pas d'expliquer les transformations que peut subir la MOD et des édifices moléculaires fluorescents peuvent se dégrader en des molécules organiques plus petites mais non fluorescentes sans que cela change la teneur en COD. Ainsi la fluorescence apparaît comme un outil particulièrement intéressant pour caractériser et différencier les masses d'eau en fonction de leur contenu organique dissous et Duursma (1974) l'a utilisé comme traceur des apports de carbone organique de rivière vers les océans. Les études suivantes ont permis de mettre en évidence grâce à cette technique la différence de source du matériel organique fluorescents (Donard et al., 1989, De Souza Sierra et al., 1997), des différences entre des eaux de surfaces et des eaux profondes (Cauwet et al., 1990), entre des substances humiques d'origines différentes (Mobed et al., 1996) et entre des acides humiques et des acides fulviques d'une même origine (Senesi et al., 1991).

Etant donné que ces différences d'émission de fluorescence s'étalent sur une large gamme du domaine spectral, la spectroscopie de fluorescence tridimensionnelle apparaît toute à fait intéressante puisqu'elle permet d'observer une large partie du spectre et contient au sein d'une seule matrice les informations relatives à la fois aux spectres d'excitation, aux spectres d'émission et aux spectres de fluorescence synchrones.

La spectrofluorimétrie 3D est donc une technique particulièrement adaptée à l'étude de la matière organique dissoute (MOD) dans les eaux naturelles (Mopper et Schultz, 1993 ; Coble, 1996). En effet, comme l'ont montré ces auteurs, l'analyse par fluorescence d'échantillons naturels montre des différences importantes en fonction de la nature des eaux (lacs, rivières, estuaires, eau de mer) et de leur provenance géographique. Les spectres 3D obtenus, également appelés matrices d'excitation-émission (EEM), présentent comme différences l'intensité et la position des maxima de fluorescence qui varient en fonction de l'origine des échantillons et dépendent des espèces moléculaires fluorescentes qu'ils contiennent. Ce sont ces données semi-quantitatives et qualitatives qui sont prises en compte pour effectuer la caractérisation des échantillons naturels. En effet, la position des maxima est liée à la nature et à la structure des fluorophores et l'intensité de fluorescence est liée à leur concentration dans l'échantillon. Les deux principaux groupes de composés fluorescents de la MOD sont d'un côté les composés humiques, et de l'autre, des composés de type protéiques

(Mopper et Schutlz, 1993). Cependant plusieurs fluorophores distincts participent au signal global de fluorescence et donnent lieu à différents maxima d'intensité. Ainsi les maxima d'intensité observés (appelés également bandes de fluorescence) sont attribués aux différents groupes de composés qui constituent la MOD (Parlanti et al., 2000a). Il faut savoir que la position de ces maxima est variable et dépend de la nature et de l'origine des composés analysés. Les différentes bandes de fluorescence observées et citées dans la littérature sont présentées dans le tableau 1-3. Ce sont ces bandes que nous allons utiliser tout au long de cette étude pour caractériser la MOD.

Bande de Fluorescence	λ_{exc} (nm) excitation	λ_{em} (nm) émission	Type de composés	Nomenclature également utilisée dans la littérature Coble (1996)
α	330-370	420-480	Substances humiques	C
α'	230-260	380-480	Substances humiques	A
β	310-320	380-420	Substances humiques "marines"	M
γ	270-280	300-340	Type tyrosine, protéine	B
δ	270-280	320-350	Type tryptophane, protéine, phénol	T

Tableau 1-3. Principales bandes de fluorescence de la MOD observées dans la littérature (Coble, 1996 ; Coble et al., 1998 ; Blough et Del Vecchio, 2002 ; Parlanti et al., 2000a ; Stedmon et al., 2003) avec les notations utilisées dans ce manuscrit ainsi que la nomenclature proposée par P.G. Coble.

La bande de fluorescence notée α est observée à des couples de longueurs d'ondes comprises entre 330 et 370 nm en excitation et entre 420 et 480 nm en émission. Cette bande est attribuée aux substances humiques, acides humiques et acides fulviques confondus. De nombreuses variations de la position des maxima ont été observées en fonction de la nature des échantillons considérés et quelques règles générales ont été émises. Ainsi, il a généralement été observé que les substances humiques issues de milieux d'eau douce (lacs, rivières) émettent dans le domaine de la bande α à de plus grandes longueurs que celles d'échantillons marins (Senesi, 1990). En ce qui concerne une même source, les acides humiques et fulviques séparés par extraction sur résines présentent des caractéristiques de fluorescence légèrement distinctes. Les acides humiques présentent une émission de fluorescence α à de plus longues longueurs d'ondes d'émission que les fulviques. Ce décalage vers le rouge de la fluorescence des acides humiques est attribué à la présence de composés de plus haut poids moléculaire présentant des caractéristiques aromatiques plus marquées et des degrés de conjugaison plus importants, tandis que la présence plus importante de groupements

donneurs d'électrons dans la structure des acides fulviques entraîne une émission de fluorescence à de plus courtes longueurs d'ondes (Mobed et al., 1996).

La bande α' (Exc. 230-260/ Em. 380-480) est, elle aussi attribuée aux substances humiques. Plusieurs études ont tenté d'attribuer cette bande à des composés plutôt de type fulvique (Mounier et al., 1999) en se basant sur son intensité relative plus importante dans des fractions de plus faibles poids moléculaires ou dans des échantillons marins où les acides fulviques sont en proportion plus importante. Cependant il n'est pas possible d'être aussi catégorique puisqu'en fait, les bandes α et α' sont systématiquement présentes ensembles sur tous les spectres d'échantillons d'eaux naturelles et également sur les spectres d'acides humiques ou d'acides fulviques extraits d'échantillons d'eau. En effet, il semble que ces bandes soient dues à deux types de fluorophores distincts, soit au sein d'une même macromolécule ou bien dans des molécules différentes (Coble et al., 1990 ; De Souza Sierra et al., 1994). Ces deux fluorophores sont communs aux deux groupes, humiques et fulviques et leurs concentrations relatives (intensités des bandes α et α') varient de façon indépendante en fonction de la nature et de l'origine de l'échantillon considéré.

La bande notée β a été attribuée à du matériel de type humique d'origine purement marine par Coble (1996) et a pu être observée dans le cas d'échantillons marins ou estuariens (De Souza Sierra et al., 1994) dans la zone du spectre allant de 310-320 nm en excitation et 380-420 nm en émission. Elle a également été isolée et observée dans une fraction chromatographique d'un échantillon d'eau côtière (Parlanti et al., 2002). Cette bande est rarement observée de façon très nette et il s'agit plus généralement d'un épaulement (décalage vers le bleu) qui se détache du massif des substances humiques α . L'origine de ce type de fluorophore a plus précisément été reliée à une activité biologique et notamment à des exsudats algaires puisqu'elle a été observée au cours d'expériences de dégradation de phytoplancton et de macro algues (Parlanti et al., 1997, Parlanti et al., 2000a). Cependant, son origine purement marine ne peut pas être affirmée de façon totalement catégorique puisque la présence de ce fluorophore dans des échantillons d'eaux douces continentales n'a peut-être tout simplement pas pu être mise en évidence jusqu'à présent. En effet, l'intensité de fluorescence des substances humiques dans les échantillons continentaux est très importante et peut totalement masquer le signal de la bande β ou d'autres fluorophores présents à de plus faibles concentrations. D'ailleurs, Stedmon et al. (2003) ont développé un modèle d'analyse des matrices de fluorescences qui a conduit à l'obtention de divers fluorophores théoriques dont l'un présente des caractéristiques proches de β bien que les données sur lesquelles s'appuie le modèle soient plutôt d'influence terrestre.

Les bandes δ et γ peuvent être observées pour une excitation comprise entre 270 et 280 nm et sont attribuées à des composés de types protéiques, des fragments de protéines présentant des caractéristiques structurales proches des acides aminés aromatiques tels que la tyrosine (γ) ou le tryptophane (δ) ou bien encore des phénols. Les composés dits de type tyrosine émettent entre 300 et 320 nm tandis que ceux de type tryptophane fluorescent entre 320 et 350 nm, et donc à de plus courtes longueurs d'ondes que ces mêmes acides aminés libres en raison de leur liaison avec des protéines dans les échantillons d'eaux naturelles (Determann et al., 1994). Ces fluorophores ont donc une origine biologique algale ou bactérienne récente, exsudats phytoplanctonique ou fragments de membranes cellulaires, et correspondent à une fraction très labile de la MOD (Determann et al., 1998). Ces bandes sont très proches l'une de l'autre et parfois difficiles à discerner en raison de la superposition des deux bandes et/ou d'interférences possibles avec la fluorescence des substances humiques. La fluorescence de ces acides aminés libres est bien connue mais leur mélange dans des échantillons d'eaux naturelles est plus difficile à résoudre. En effet, les protéines relativement intactes contenant à la fois des résidus de tyrosine ou de tryptophane montrent une fluorescence dominée par le tryptophane. La fluorescence de type tryptophane semble donc caractériser un matériel plus récemment dégradé (Mayer et al., 1999). La fluorescence de la tyrosine seule semble indiquer un matériel organique relativement plus dégradé puisque la tyrosine émet un signal de fluorescence de façon plus nette et intense sous forme monomère ou bien au sein de peptides ne contenant plus de tryptophane, celui-ci étant alors libre ou combiné dans des condensats de type humique. Le problème majeur pour arriver à ces conclusions concernant le niveau de dégradation des dérivés protéiques est de pouvoir dissocier chacune de ces deux bandes afin de les quantifier or cela est difficilement réalisable dans les échantillons bruts d'eaux naturelles (Yamashita et Tanoue, 2003).

3-2- La fluorescence pour l'étude des processus en milieu aquatique

Outre l'observation et l'attribution des différentes bandes de fluorescence décrites ci-dessus, la spectrofluorimétrie permet d'étudier divers processus au travers des intensités relatives et des variations de position des maxima de ces bandes.

Ainsi de nombreux auteurs se sont basés sur le signal de fluorescence de la MOD comme traceur lors du mélange de masses d'eau, notamment au niveau des estuaires (Duursma, 1974 ; De Souza Sierra et al., 1997).

Les travaux de Parlanti et al. (1997, 2000a) sur le suivi par fluorescence de la dégradation d'algues a permis de mettre en évidence la chronologie de formation des

composés fluorescents et de montrer la possibilité d'utiliser la fluorescence pour estimer l'activité biologique au sein d'un milieu. Ainsi, les résultats montrent que lors des premiers stades de dégradation ou d'exsudation, les bandes γ et δ apparaissent en premier confirmant bien les résultats de Mayer et al. (1999) sur l'origine récente de ce type de matériel. La bande β apparaît ensuite et provenant probablement de transformations des premiers composés formés, avant d'aboutir finalement à l'apparition de la bande de type α décalée vers les plus grandes longueurs d'onde d'émission, c'est à dire de composés humiques qui représentent le stade ultime de dégradation de la MOD ayant subi de nombreuses transformations. Par ailleurs, certains travaux montrent que le phytoplancton n'est pas une source directe de formation des composés humiques, ce que traduit la non corrélation entre la fluorescence des substances humiques et la teneur en chlorophyle A (De Granpré et al., 1996 ; Hoge et al., 1998 ; Rochelle-Newall et Fisher 2002b). Par contre Rochelle-Newall et Fisher (2002a) indiquent que la dégradation lumineuse du phytoplancton suivie de diverses transformations par les bactéries aboutissent à la formation des substances humiques, ce que précisait déjà le processus d'humification proposé par Rashid (1985) présenté dans le paragraphe 2-3 et qui souligne l'importance du rôle des bactéries sur les transformations de la MOD (Moran et Hodson, 1990 ; Tranvik, 1993 ; Rochelle-Newall et al., 1999).

L'évolution vers les plus grandes longueurs d'ondes d'émission (décalage vers le rouge) des maxima de fluorescence des substances humiques pour des longueurs d'onde d'excitation de 250 nm (α') et 370 nm (α) semblent de plus indiquer une plus forte dégradation car cela a conduit à l'introduction d'un indice d'humification qui permet de rendre compte de la maturation de la MOD dans les sols (Zsolnay et al., 1999 ; McKnight et al., 2001 ; Ohno, 2002).

La fluorescence permet également de suivre un autre phénomène : l'association ou la complexation d'une molécule fluorescente avec une autre molécule qui aura pour effet de modifier le signal de fluorescence de la première. Ce phénomène est appelé extinction de fluorescence (ou quenching) et il est basé sur le fait que lors de l'excitation lumineuse d'un composé fluorescent, celui-ci peut se désexciter sans émettre de signal de fluorescence s'il est lié ou associé à une autre molécule à laquelle il va transmettre son énergie (Parker, 1968). Ce phénomène permet ainsi d'observer la complexation de substances xénobiotiques organiques ou minérales par la matière organique dissoute (Gauthier et al., 1986 ; Ryan et Weber, 1982). Il sera expliqué plus en détail dans le chapitre 2 et appliqué dans le chapitre 6 à la détermination des propriétés complexantes de la MOD dans l'estuaire de la Gironde.

L'extinction de fluorescence peut en effet permettre de mieux comprendre le rôle et l'influence de la MOD sur le transport, le devenir et la biodisponibilité des polluants dans les milieux aquatiques et notamment au niveau des estuaires qui constituent la transition entre les continents et le milieu océanique, zone par laquelle va transiter la majeure partie des polluants introduits dans l'environnement.

4- FRACTIONNEMENT PAR ULTRAFILTRATION

Nous avons vu tout au long de ce chapitre toute la complexité de la matière organique dissoute dont la caractérisation a été mise en œuvre par un nombre important de techniques chimiques et spectroscopiques (Hayes et al., 1989) et qui malgré tout présente encore de nombreuses zones d'ombres concernant ses propriétés. Afin de pousser plus loin l'investigation de ce matériel complexe il s'avère donc indispensable de séparer ce matériel en ses différents constituants pour pouvoir les caractériser plus précisément par les diverses techniques analytiques disponibles. Dans cette optique, de nombreuses techniques de séparation ont été développées (Janoš, 2003) pour fractionner le matériel organique selon des critères très variés comme par exemple la polarité qui est à la base de la classification présentée dans le paragraphe 2-3. Outre la séparation sur résines de type XAD (Thurman et Malcolm, 1981), les caractéristiques de polarité de ces composés sont à la base de tous les fractionnements sur des phases inverses qui sont largement employées pour la séparation de la MOD par chromatographie liquide haute performance (Frimmel, 1992, Parlanti et al., 2002). La séparation de la MOD en fonction des propriétés électrostatiques par électrophorèse capillaire est actuellement en plein essor (Pompe et al., 1996 ; Schmitt-Kopplin et al., 1999 ; Parlanti et al., 2002). Enfin, la taille ou la masse moléculaire sont deux autres propriétés qui ont permis de séparer la MOD soit par chromatographie par perméation de gel (Huber et Frimmel, 1994), par dialyse ou par ultrafiltration (Shaw et al., 1994). Parmi toutes ces techniques, l'ultrafiltration est une des plus simples à mettre en œuvre et elle présente surtout l'énorme avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de solvant ou de solution tampon et de s'effectuer directement sur l'échantillon filtré (Burba et al., 1998).

L'ultrafiltration est une technique basée sur une filtration membranaire qui permet donc de séparer les composés en fonction de leur taille moléculaire. Les molécules plus petites que la taille des pores de la membranes passent au travers de celle-ci et constituent le filtrat (ou perméat), les molécules plus grosses sont retenues par la membrane et constituent le rétentat (ou concentrat).

Cette technique de séparation a été essentiellement développée et utilisée en biochimie pour la concentration et la purification d'organismes unicellulaires ou de biomacromolécules comme l'ADN ou les protéines (Benner, 1991).

Elle a été parallèlement utilisée pour le fractionnement de la matière organique naturelle (Buffle et al., 1978 ; Kilduff et al., 1992 ; Shaw et al., 1994 ; Cai, 1999).

Les membranes d'ultrafiltration présentent des diamètres de pores variant entre 1nm et 0,1µm ce qui permet de mieux caractériser la matière organique colloïdale. Cependant, il est nécessaire d'avoir à l'esprit que les distributions en masses vont dépendre du type de MOD concerné, et que chaque type de composés peut être présent dans plusieurs classes de tailles comme par exemple les fragments de protéines dont la taille dépend du degré de dégradation.

D'autre part, en ce qui concerne les substances humiques, même si les acides fulviques sont généralement décrits comme plus petits que les acides humiques il est difficilement envisageable de les séparer totalement par ultrafiltration, on peut seulement supposer que en dessous de 1000 Da, la fraction réfractaire sera composée majoritairement d'acides fulviques, la fraction supérieure à 1000 Da sera un mélange des deux. Au niveau de la fluorescence des fractions de tailles moléculaires, des tendances d'augmentation de l'intensité et des rendements quantiques de fluorescence ont été observés avec des diminutions de la taille (Belin et al. 1993). De plus, une augmentation de la taille semble également impliquer une augmentation (décalage vers le rouge) de la longueur d'onde des maxima d'émission (Berger, 1984 ; Alberts et al., 2002) ce qui traduirait une plus grande proximité des chromophores aromatiques présents dans les molécules et une plus grande probabilité de désactivation des états excités (Ewald et al., 1988).

L'utilisation successive de différentes membranes ayant des diamètres de pores différents pour fractionner un même échantillon permet d'isoler plusieurs classes de composés caractérisés par des masses moléculaires de même ordre et d'en déduire une distribution et une caractérisation en fonction de la taille de la matière organique dissoute. Cela a été réalisé dans divers environnements comme en particulier sur des eaux de rivières (Küchler et al., 1994 ; Mounier et al., 1999), des eaux de mer (McCarthy et al., 1996 ; Benner et al., 1997) ou d'estuaires (Mannino et Harvey, 1999). Pour les eaux océaniques, les fractionnements de la MOD ont montré que la fraction de COD de poids moléculaire supérieur à 1000 Da est principalement constituée de polysaccharides labiles, récemment formés par le phytoplancton et rapidement utilisés par les bactéries (McCarthy et al., 1996 ; Amon et Benner, 1996), tandis que dans les rivières la fraction colloïdale est majoritairement composée de substances humiques, d'agrégats de ces substances ou d'entités mixtes associant une phase organique et une phase minérale (Buffle et al., 1998). Dans les estuaires, se produit

le mélange de ces deux types de colloïdes. Mannino et Harvey (2000), Harvey et Mannino (2001) ont noté dans l'estuaire du Delaware une augmentation de COD dans la fraction de haut poids moléculaire dans la zone du bouchon vaseux et qu'ils ont expliqué par une désorption de composés organiques de haut poids moléculaires liés aux sédiments en suspension. Lorsque la salinité augmente un phénomène de floculation des composés humiques a été fréquemment observé (McCarthy et al., 1996 ; Van Heemst et al., 2000 ; Benner et Opsahl, 2001) sous le nom de pompage colloïdale qui tend à former des particules qui vont alors sédimenter. Ce phénomène qui tend à diminuer la teneur en COD est alors compensé dans les zones de plus fortes salinités par la présence croissante de composés labiles d'origine marine et issus du phytoplancton ce qui explique en partie la relative conservativité du COD en milieu estuarien (Hedges et Keil, 1999).

D'autre part les colloïdes sont reconnus comme jouant un rôle important dans la distribution de nombreux éléments dans les environnements aquatiques (Buffle, 1988) et notamment en contrôlant le transport et le devenir de nombreux contaminants organiques ou inorganiques (Mantoura et al., 1978 ; Gjessing et Berglind, 1981 ; Carter et Suffet, 1982 ; Dai et al., 1995). Ceci est particulièrement le cas dans les estuaires où ligands organiques et contaminants vont être soumis à des conditions environnementales tout à fait particulières (Santschi et al., 1999). Ainsi, l'ultrafiltration qui permet de séparer la phase colloïdale de la phase dissoute afin de séparer les composés libres en solution de ceux liés aux colloïdes a été largement utilisée pour l'étude des interactions entre les substances humiques et les métaux (Staub et al., 1984 ; Ephraïm et Marinsky, 1990 ; Pham et Garnier, 1998). Son utilisation est par contre difficilement applicable à l'étude des interactions avec un grand nombre de contaminants organiques en raison de leur très forte adsorption sur les membranes et les parois des systèmes d'ultrafiltration, rendant toute interprétation des résultats impossibles (Parlanti et al., 2000b).

En ce qui concerne les métaux, différentes études ont montré le rôle de la fraction colloïdale sur la spéciation des métaux dans différents systèmes aquatiques comme des rivières (Benedetti et al., 2002 ; Hill et Aplin, 2001), des estuaires (Garnier et al., 1996 ; Santschi et al., 1999) ou dans les eaux marines (Guo et al., 2000).

L'ultrafiltration permet donc de séparer les colloïdes des métaux libres dissous pour ensuite pouvoir doser ces métaux dans chacune des deux fractions. Le dosage des métaux est effectué soit par comptage γ des radionucléides (Garnier et al., 1996) soit par des méthodes de torches à plasma couplées à de la spectrométrie de masse ICP-MS (Guo et al., 2000) ou de la spectroscopie d'émission atomique ICP-AES (Benedetti et al., 2002). Ces différentes

études montrent que le comportement des métaux vis à vis des colloïdes organiques dépend principalement de l'affinité de chaque métal pour des types de composés organiques (Guo et al., 2000). Au niveau des estuaires, des comportements très différents suivant les métaux ont été observés en fonction des conditions physico-chimiques, puisque certains métaux peuvent se décomplexer des matrices minérales tandis que d'autres se complexent ou alors sont piégés par la floculation de colloïdes au sein de particules. Ces comportements sont directement liés aux caractéristiques des espèces colloïdales mises en jeu d'où encore l'importance d'une meilleure caractérisation de cette fraction pour une meilleure compréhension de son rôle sur le transport et le devenir des contaminants (Buffle et al., 1998).

Il est très important de préciser que la majeure partie des études consacrées à la séparation entre les métaux libres et ceux liés aux colloïdes par ultrafiltration ont utilisé la valeur 1000 Da comme étant la limite entre les espèces colloïdales et les espèces dites alors réellement dissoutes (Guo et al., 1997 ; Pham et Garnier, 1998 ; Burba et al., 1998). Il s'agit cependant d'une limite arbitraire qui a été utilisée par de nombreux auteurs pour des raisons de commodité analytique, les membranes de seuil de coupure 1000 Da sont en effet communément utilisées dans la littérature.

En ce qui nous concerne, cette valeur seuil de 1000 Da semble délicate à utiliser puisque nous avons précisé par exemple que les acides fulviques aquatiques sont majoritairement de tailles inférieures à 1000 Da. Ils ne seraient alors plus considérés comme des espèces colloïdales mais comme des molécules dissoutes alors même que leurs propriétés physico-chimiques présentent des caractéristiques colloïdales comme la complexation des polluants. Au cours de cette étude, nous avons utilisé une membrane de 500 Da qui nous a donc permis de fixer à 500 Da la limite entre les espèces que nous appellerons colloïdales et dissoutes.

Comme nous avons pu le voir l'ultrafiltration est une méthode de séparation en fonction de la taille qui permet de fractionner le matériel organique en vue d'une caractérisation plus poussée par d'autres techniques analytiques. Dans le cadre de ce travail nous avons utilisé cette technique dans deux optiques différentes. Tout d'abord nous avons fractionné des échantillons en utilisant plusieurs seuils de coupures (diamètres des pores de la membrane) différents (10, 3, 1 et 0,5 kDa) afin de mieux cerner la distribution en taille de la matière organique dissoute fluorescente et d'observer la modification de cette distribution notamment au niveau du bouchon vaseux (chapitre 4). Dans un deuxième temps, l'ultrafiltration a été utilisée pour déterminer les capacités de fixation des métaux traces sur des espèces colloïdales (chapitre 6).

En conclusion de ce chapitre de rappels bibliographiques il apparaît qu'une meilleure connaissance de la matière organique dissoute et de ses multiples propriétés dans les systèmes aquatiques permettrait une vision plus réaliste du cycle du carbone dans ces milieux et notamment dans les estuaires qui sont la zone tampon entre les continents et les océans et conditionnent le transfert du matériel terrestre (anthropique ou naturel) vers le milieu marin.

En effet, cette matière organique complexe est connue pour avoir une influence sur la disponibilité, le transport et la transformation de nombreux contaminants, notamment des métaux et des contaminants organiques (pesticides, herbicides, hydrocarbures). Elle occupe également une grande place dans les échanges à l'interface air/eau en modifiant les échanges gazeux, et en permettant la pénétration plus ou moins profonde de la lumière à l'origine des réactions photochimiques (Frimmel *et al.*, 1993). Néanmoins, la connaissance précise de la nature et de la composition de cette matière organique dissoute reste encore très limitée. Afin d'obtenir de plus amples renseignements sur les propriétés et la structure de cette matière organique dissoute il est absolument nécessaire de combiner plusieurs méthodes complémentaires. On ne doit bien entendu pas s'attendre à trouver "la" structure de la MOD, mais un but important est d'être capable de relier aux différents types d'environnements aquatiques des propriétés physico-chimiques caractéristiques.

CHAPITRE 2

TECHNIQUES ANALYTIQUES

1- PRINCIPE DE LA FLUORESCENCE

Toute espèce moléculaire possède des états d'énergie propres, correspondant aux énergies électroniques, vibrationnelles et rotationnelles (Fig. 2-1). Lorsqu'un rayonnement, matérialisé par un photon, transporte une énergie équivalente à celle qui existe entre deux niveaux d'énergie de la molécule, il existe une certaine probabilité pour qu'il y ait absorption de cette quantité d'énergie. La matière qui était dans l'état fondamental passe alors dans un état excité. La durée de vie de cet état excité est très courte. Les molécules se relaxent rapidement et peuvent perdre l'excédent d'énergie de manière radiative par l'émission d'un photon.

Le processus radiatif par lequel s'effectue le retour à l'état fondamental à partir du niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité singulet par émission d'un photon est appelé fluorescence (Parker, 1968).

La fluorescence d'un composé dépend en premier lieu de sa structure moléculaire et elle est presque toujours associée au système électronique π d'une molécule insaturée. En effet, les transitions électroniques $\pi-\pi^*$ sont moins énergétiques que les transitions $\sigma-\sigma^*$ car les électrons π ne sont pas situés entre les deux atomes contribuant à la liaison chimique et sont donc plus libres que les électrons σ . Les systèmes aromatiques linéaires donnent lieu à des spectres d'émission de fluorescence à des longueurs d'onde plus courtes que les systèmes aromatiques non linéaires (Senesi, 1990).

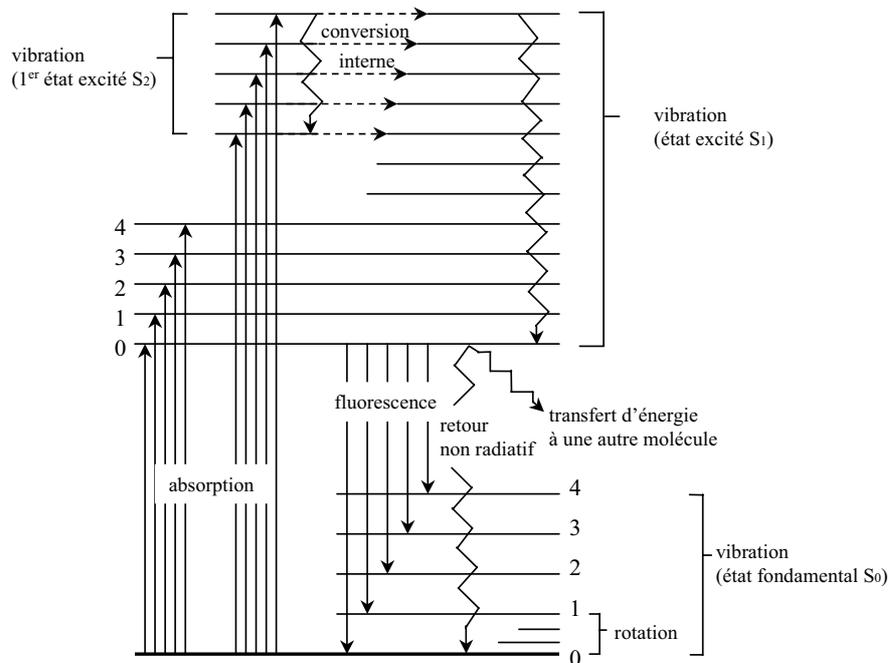


Figure 2-1. Diagramme de Perrin-Jablonski

Plusieurs phénomènes peuvent entrer en compétition avec l'émission de fluorescence : la conversion interne ou désactivation par collision des molécules, les transferts inter systèmes et la photo-décomposition des molécules fluorescentes. Ces phénomènes sont conditionnés par de nombreux facteurs comme la température, les effets des substituants et du solvant. L'augmentation de la température se traduit par une augmentation de la probabilité de collision entre les molécules à l'état excité, ce qui accroît la probabilité de conversions internes et diminue donc l'efficacité de fluorescence.

Les substituants composés de groupements donneurs d'électrons augmentent l'efficacité d'émission de fluorescence tandis que les accepteurs d'électrons diminuent l'intensité de fluorescence.

Les interactions soluté-solvant vont affecter le signal de fluorescence de façon variable en fonction du pH, du degré de solvation, de la possibilité de former des liaisons hydrogène, de la viscosité, de la force ionique ainsi que de la polarité du solvant.

Des phénomènes de diffusion de la lumière vont également contribuer à perturber les spectres de fluorescence, les diffusions Rayleigh, Tyndall et Raman. Les diffusions Rayleigh et Tyndall sont des diffusions élastiques de la lumière ce qui signifie sans changement de l'énergie des photons donc sans changement de la longueur d'onde par rapport à la lumière incidente. La diffusion Rayleigh est causée par des molécules de taille plus petite que la longueur d'onde du faisceau incident avec lequel elles interagissent, comme les molécules d'eau par exemple. La diffusion Tyndall est due à des édifices moléculaires de tailles colloïdales (0,05 à 0,2 μ m). La diffusion Raman est de type inélastique et provient de la diffusion par les molécules de solvant d'une partie de la lumière incidente. La longueur d'onde d'émission de la bande Raman dépend de la nature des molécules du solvant utilisé.

La spectroscopie de fluorescence permet d'obtenir deux principaux types de spectres. Les spectres d'émission qui consistent à fixer une longueur d'onde d'excitation du rayonnement incident et effectuer un balayage de la longueur d'onde d'émission en mesurant l'intensité de fluorescence pour chaque longueur d'onde d'émission. Les spectres d'excitation sont obtenus en fixant une longueur d'onde d'émission et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation.

Les spectres d'excitation et d'émission d'un mélange complexe sont continus et sont la résultante de la superposition des spectres discrets des fluorophores qui le composent.

Ainsi, les spectres de fluorescence synchrones ont été introduits plus récemment afin d'étudier des mélanges de fluorophores (Vo-Dinh, 1978). Ils consistent à effectuer un balayage simultané d'une plage spectrale de longueurs d'onde d'excitation et d'émission

présentant un écart ($\Delta\lambda$) constant. Ils permettent d'obtenir des spectres structurés à partir de mélanges dont les spectres classiques de fluorescence présentent des chevauchements de bandes de fluorescence non résolus.

Dans ce travail nous avons utilisé la spectrofluorimétrie 3D qui consiste à générer des matrices tridimensionnelles Excitation-Emission-Intensité. Ces spectres 3D contiennent simultanément les spectres d'excitation, d'émission et synchrones. Ils permettent donc de visualiser le domaine spectral dans son ensemble et d'observer les maxima de fluorescence caractéristiques des fluorophores qui composent l'échantillon.

Relations fondamentales:

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

- La loi de Beer-Lambert :

$$\text{Abs} = \log (I_0/I) = \epsilon.c.l$$

Où **Abs** est l'absorbance,

I₀ l'intensité incidente,

I l'intensité transmise,

ε le coefficient d'absorption molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

c la concentration du soluté (mol.L^{-1}),

l le chemin optique (cm).

- Intensité de fluorescence :

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

Où **I_f** est l'intensité de fluorescence,

K le facteur d'appareillage,

φ_F le rendement quantique de la fluorescence.

I_a = $I_0.2,3.\epsilon.c.l$ quand $\text{Abs} \ll 0,1$.

φ_F = nombre de photons émis par seconde / nombre de photons absorbés par seconde

RQ : Cette expression n'est valable que pour des valeurs d'absorbance faibles ($<0,1$). Il est donc nécessaire d'opérer dans un domaine de concentration faible afin d'avoir une relation linéaire entre **I_f** et **c**.

Présentation de l'appareil de mesure :

L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-22 SPEX-Jobin-Yvon dont le schéma est présenté sur la figure 2-2.

○ **Source :**

La source est une lampe à arc Xénon de 450 Watts, émettant un rayonnement polychromatique continu dans l'UV et dans le visible, entre 250 et 800 nm.

○ **Double monochromateur à l'excitation :**

Le double monochromateur comporte 2 réseaux de 1200 traits par mm, blasés à 250 nm ; il permet d'obtenir une lumière excitatrice de très haute pureté spectrale (grande réjection de la lumière blanche parasite au pied de la bande d'excitation).

○ **Compartiment échantillon :**

Ce compartiment est thermostaté à 20°C. Les échantillons sont placés dans des cuves en quartz de 1 cm de chemin optique. L'émission de fluorescence est observée à 90° par rapport à la lumière incidente afin d'éliminer les interférences entre la lumière émise par l'échantillon et la lumière excitatrice incidente.

○ **Double monochromateur à l'émission :**

Il comporte 2 réseaux de 1200 traits par mm, blasés à 500 nm, afin d'obtenir une sensibilité optimale pour l'étude du spectre de fluorescence.

○ **Photomultiplicateur (PM) :**

Il permet de convertir l'énergie lumineuse captée en signal électrique amplifié pour une meilleure détection. Les signaux produits sont traités par ordinateur à l'aide d'un logiciel approprié : DM3000F de Jobin-Yvon. Il présente un bon rendement quantique (ou réponse spectrale) dans un domaine de longueur d'onde compris entre 250 et 800nm. Afin de limiter le courant d'obscurité, le photomultiplicateur est refroidi par effet Peltier.

○ **Fentes :**

L'ouverture des fentes des 2 monochromateurs correspond à une bande passante comprise entre 0 et 16nm. Le choix de l'ouverture correspond à un compromis entre la résolution spectrale, la sensibilité et le rapport signal/bruit de fond permettant l'enregistrement d'un spectre satisfaisant. L'ouverture de fentes utilisée dans le cadre de notre étude correspond à une bande passante de 4 nm.

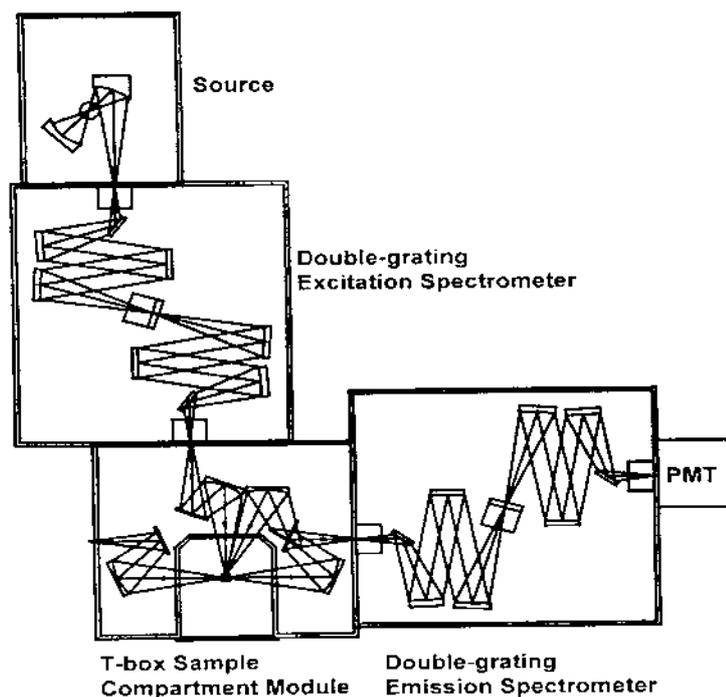


Figure 2-2. Schéma du trajet de la lumière dans le spectrofluorimètre Fluorolog FL3-22 SPEX-Jobin-Yvon

Préparation des échantillons :

Les échantillons d'eau prélevés ont été préalablement filtrés sous vide réduit (dépression inférieure à 300 mm de Hg) à l'aide de filtres Whatman GF/F en fibre de verre et de porosité moyenne 0.70 μm . Cette étape est nécessaire afin de supprimer toute la fraction particulaire de l'échantillon. Les échantillons filtrés sont ensuite stockés au froid et à l'abri de la lumière.

Conditions expérimentales :

Correction des spectres :

Il est nécessaire d'éliminer les bandes de diffusion résultant des effets Rayleigh, Raman et Tyndall afin d'obtenir un spectre net et des valeurs de fluorescence justes.

Pour éliminer la diffusion Rayleigh et Raman, il suffit de soustraire au spectre de l'échantillon le signal obtenu dans les mêmes conditions, pour le blanc, constitué par le solvant seul.

Cependant, la diffusion Raman est difficilement compensée sur les spectres corrigés, puisque le solvant utilisé est l'eau pure (Milli-Q, Millipore) alors que les échantillons sont des échantillons d'eau de mer.

Correction à l'excitation :

La correction à l'excitation porte sur les monochromateurs. Cependant, cette correction n'a pas été appliquée pendant l'étude, puisque les échantillons ont été traités sur le même spectrofluorimètre, et sont donc comparables les uns par rapport aux autres.

Correction à l'émission :

Cette correction permet de tenir compte des fluctuations, en fonction de la longueur d'onde, du photomultiplicateur et du monochromateur à l'émission. On utilise une lampe au tungstène comme étalon.

Fluctuations de la lampe :

Il existe aussi une photodiode, placée avant le compartiment échantillon, qui permet de corriger le signal en fonction des fluctuations de la lampe (mode S/R).

PROTOCOLE :

Nettoyage de la verrerie :

La verrerie utilisée, destinée à être en contact avec les échantillons, doit être impérativement propre, afin d'éviter toute contamination possible : en effet, beaucoup de composés naturels fluorescent, et pourraient provoquer une fluorescence parasite dans l'échantillon. Le nettoyage de la vaisselle s'effectue donc par des bains de détergent, le RBS 50, à une concentration de 2-3%. La propreté est ensuite testée par fluorescence avant utilisation de la verrerie.

Mesure de l'absorbance :

L'appareil de mesure utilisé est un spectrophotomètre d'absorption V560 de Jascow.

On mesure tout d'abord l'absorbance de l'eau pure utilisée comme solvant de référence. Cette mesure constituera le blanc. Puis, on procède à la mesure d'absorbance des

différents échantillons. Le spectre d'absorbance obtenu pour le blanc est ensuite soustrait des spectres d'absorbance de chacun des échantillons afin d'obtenir l'absorbance réelle de chaque échantillon.

Si l'absorbance est supérieure à 0,1 il est alors nécessaire de diluer l'échantillon jusqu'à une absorbance inférieure à 0,1 avant de réaliser la mesure de fluorescence. La valeur d'absorbance de 0,1 constitue la limite supérieure de validité de la relation linéaire entre intensité de fluorescence et concentration des composés fluorescents. De cette façon, cela nous permet également de nous affranchir des effets de filtre interne.

Mesure de la fluorescence :

Une fois que l'absorbance des échantillons est mesurée, on peut procéder à l'enregistrement des spectres de fluorescence 3D des échantillons à l'aide du logiciel DATAMAX. Les matrices tridimensionnelles sont générées par l'enregistrement successif de 17 spectres d'émission (260-700nm) à des longueurs d'ondes d'excitation prises tous les 10nm entre 250 et 410nm (Parlanti et al., 2000a). Le spectre de fluorescence totale est tracé en 1h15 environ.

Comme pour la mesure de l'absorbance on réalise préalablement un blanc en enregistrant le spectre de fluorescence 3D d'eau pure. Les spectres des échantillons sont ensuite enregistrés dans les mêmes conditions que le blanc.

Quand le spectre 3D d'un échantillon est tracé, on réalise la soustraction du spectre 3D du blanc au spectre tracé afin de visualiser la fluorescence réelle de l'échantillon.

Les spectres des échantillons ainsi obtenus sont ensuite traités avec le logiciel Excel.

2- EXTINCTION DE FLUORESCENCE (QUENCHING)

L'extinction de fluorescence repose sur le fait que la fluorescence de certains fluorophores est atténuée lorsqu'ils interagissent avec d'autres molécules. Il est possible de distinguer trois modes d'extinction en fonction du type d'interaction mis en jeu :

-L'extinction dite statique résulte de la formation d'un complexe non fluorescent entre des molécules à l'état fondamental.

-L'extinction dite dynamique provient d'une interaction (collision) entre le fluorophore et une molécule nommée « quencher » qui éteint la fluorescence pendant la durée de vie de l'état

excité du fluorophore. Celui-ci se désactive et revient à l'état fondamental sans émettre de rayonnement.

-On peut aussi définir une extinction dite apparente qui correspond à une atténuation du signal due à l'augmentation en concentration d'une espèce qui absorbe fortement le rayonnement, effet dit de filtre interne.

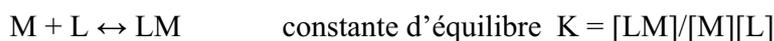
L'étude de ce phénomène a permis d'utiliser la fluorescence comme une technique analytique permettant d'observer la complexation par la matière organique dissoute de molécules d'intérêt particulier comme par exemple des contaminants organiques (pesticides (Fang et al., 1998), hydrocarbures aromatiques polycycliques (Gauthier et al., 1986)) ou des métaux (Ryan et Weber, 1982). L'approche va être différente en fonction des composés considérés. En effet, dans le cas des contaminants organiques fluorescents, la fluorescence de ces composés va être atténuée ou éteinte lorsqu'ils vont se trouver associés à des macromolécules de matière organique dissoute. Dans le cas des métaux, c'est la fluorescence de la MOD qui va être éteinte par la complexation avec les ions métalliques. Dans les deux cas, l'étude de cette extinction permet de déterminer des paramètres de complexation qui renseignent sur les propriétés complexantes de la MOD.

Dans le cadre de cette étude, le chapitre 6 présente l'application de cette technique pour l'étude de la complexation du cuivre par la matière organique dissoute de l'estuaire de la Gironde. Cette étude est basée sur la théorie proposée par Ryan et Weber (1982).

Le Modèle de Ryan et Weber (1982)

L'application de l'extinction de fluorescence à la détermination des propriétés complexante de la MOD vis à vis des métaux a conduit Ryan et Weber à proposer le modèle suivant :

L'équilibre chimique de complexation entre un ligand, un métal et le complexe ligand-métal est représenté par l'équation suivante :



M représente le métal, L représente le ligand organique, LM représente le complexe ligand-métal formé et K est la constante d'équilibre associée.

La méthode de titrage proposée par Ryan et Weber (1982) est basée sur l'extinction de fluorescence de la matière organique dissoute par la complexation avec des ions métalliques paramagnétiques. Cette méthode s'appuie néanmoins sur de nombreuses hypothèses et approximations :

- le matériel organique fluorescent est supposé représentatif du matériel organique total.
- le phénomène d'extinction est de type statique, c'est à dire que la complexation avec le métal se fait à l'état fondamental.
- tout le matériel agit comme un seul type de ligand caractérisé par les propriétés moyennes K et C_L (On appelle C_L la capacité complexante qui est la concentration totale de ligand disponible pour la complexation du métal).
- les complexes formés sont de type 1:1 et sont non fluorescents.

Dans ces conditions, le degré d'extinction est proportionnel au degré de complexation. Ainsi, l'intensité de fluorescence I mesurée en cours de titrage, donc en présence d'ion métallique, obéit à la relation

$$I = I_L + I_{ML}$$

dans laquelle I_L est l'intensité de fluorescence due aux sites complexables mais non encore complexés, et I_{ML} est l'intensité de fluorescence à la fin du titrage, c'est à dire la fluorescence résiduelle du matériel organique qui ne se complexe pas.

On peut également écrire dans le cas où seuls les sites non complexés donnent lieu à la fluorescence

$$[LM] \sim (I^\circ - I)$$

$$C_L \sim (I^\circ - I_{ML}) \quad \text{et} \quad X_{LM} = [LM] / C_L = (I^\circ - I) / (I^\circ - I_{ML})$$

où X_{LM} est défini comme la fraction de sites complexés et I° représente l'intensité de fluorescence initiale, c'est à dire sans métal ajouté.

D'après l'équilibre de complexation et si on appelle C_M la concentration totale en métal, on peut écrire

$$C_M = [M] + [LM]$$

$$C_L = [L] + [LM]$$

et d'après l'expression de la constante K on peut écrire que $[LM] = K[M][L]$; on en déduit que

$$X_{LM} = [LM]/C_L = K[M]/(1+K[M]) = K(C_M - X_{LM}C_L)/(1+K(C_M - X_{LM}C_L))$$

Cette dernière expression est une équation du second degré en X_{LM} qui admet une seule solution acceptable. Cette solution conduit à l'équation de Ryan et Weber (1982) permettant de calculer les paramètres de complexation (I_{ML} , K et C_L) à partir des données expérimentales :

$$I = [(I_{ML} - 100)/2KC_L] \times \{ (KC_L + KC_M + 1) - [(KC_L + KC_M + 1)^2 - 4K^2C_LC_M]^{1/2} \} + 100$$

Cette équation est obtenue en posant $I^\circ = 100$, les intensité I et I_{ML} sont alors exprimées en pourcentage de l'intensité de fluorescence initiale I° .

Les paramètres de complexation sont déterminés à partir des données obtenues au cours du titrage, c'est à dire intensité de fluorescence (I) en fonction de la concentration en métal (C_M), en effectuant un calcul de régression non-linéaire sur l'équation précédente.

Le programme de calcul par régression non-linéaire que nous avons utilisé dans ce travail à été réalisé par le Dr. Daniel Liotard du Laboratoire de physico-chimie moléculaire (LPCM, UMR 5803 CNRS, Université Bordeaux 1).

3- MESURES DE CARBONE ORGANIQUE DISSOUS (COD)

Les teneurs en carbone organique dissous ont été mesurées à l'aide d'un appareil Shimadzu TOC-V CSN. Le principe de la mesure consiste en une oxydation catalytique à haute température (680°C) du carbone organique contenu dans les échantillons filtrés, acidifiés (HCl 2N) à pH 2 et purgés pendant 6 minutes avec de l'air synthétique 5.5 pour éliminer le carbone inorganique. La teneur en carbone organique dissous transformé en CO₂ par l'oxydation est alors déterminée par un détecteur infrarouge. Le catalyseur utilisé est un catalyseur standard Shimadzu à base de platine contenu dans une matrice d'alumine.

Certaines mesures ont également été effectuées par H. Etcheber (UMR 5805 EPOC, Département de Géologie et d'Océanographie, DGO, Université Bordeaux 1) à l'aide d'un analyseur de carbone Shimadzu TOC 5000. Le principe des mesures est le même excepté l'utilisation d'acide phosphorique H₃PO₄ pour l'acidification des échantillons et d'oxygène ultra-pur comme gaz vecteur et gaz de purge.

Pour chaque échantillon le résultat donné est la moyenne d'au moins trois mesures satisfaisantes en terme d'écart type et de coefficient de variation. Les deux appareils sont étalonnés à l'aide d'une solution standard de phtalate de potassium C₆H₄(CCOK)(COOH) diluée à différentes concentrations. Différentes gammes d'étalonnage ont été utilisées en fonction de la teneur en COD des échantillons afin d'optimiser la précision des mesures.

Des mesures d'intercalibration entre les deux appareils ont été effectuées et ont conduit à des résultats tout à fait satisfaisant (mission GIROX 2).

La précision de la méthode en tenant compte des différentes étapes (filtration, conditionnement et mesure), est de l'ordre de 0,05mgC/l.

4- PRINCIPE DE L'ULTRAFILTRATION

L'ultrafiltration ou la filtration moléculaire est un processus de séparation physique utilisant une membrane ayant la capacité de séparer des molécules en solution en fonction de leur taille moléculaire. Les molécules de taille supérieure à la taille des pores de la membrane sont retenues et concentrées d'un côté de la membrane, alors que les molécules plus petites peuvent traverser la membrane et sont en équilibre des deux côtés de celle-ci. Chaque membrane possède donc un seuil de coupure spécifique qui correspond à la masse moléculaire maximale des molécules pouvant passer au travers des pores de la membrane. Cette technique offre donc la possibilité de séparer une solution en deux fractions, l'une appelée *filtrat* ou *perméat* contenant les molécules plus petites que le seuil de coupure de la membrane, et l'autre dénommée *rétenant* où se concentrent les molécules dont la masse moléculaire est supérieure à ce seuil. L'utilisation successive de membranes ayant des seuils de coupure progressivement décroissants permet de séparer un échantillon en une série de fractions contenant chacune des molécules de tailles moléculaires semblables. Cette technique appelée ultrafiltration en cascade est représentée sur la figure 2-3.

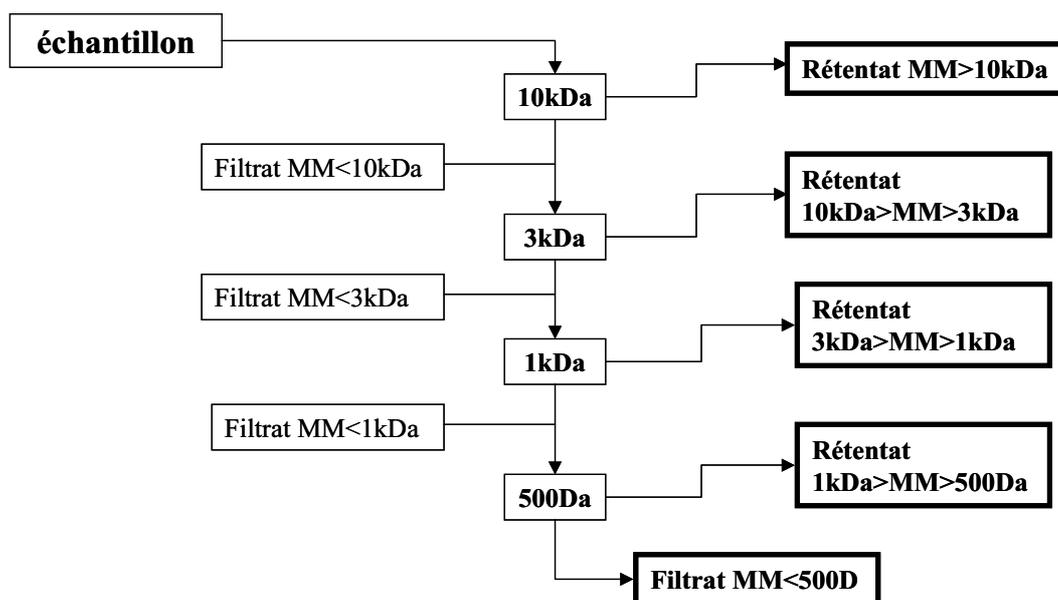


Figure 2-3. Principe de l'ultrafiltration en cascade. MM =masse moléculaire. Membranes ayant des seuils de coupure de 10000, 3000, 1000 et 500 Daltons (Da). Les fractions collectées apparaissent en gras.

Protocole et dispositifs expérimentaux

Au cours de ces travaux, le fractionnement de la matière organique dissoute par ultrafiltration a été effectué en utilisant des membranes possédant quatre différents seuils de coupure : 10000, 3000, 1000 et 500 Daltons (Da) afin d'effectuer des ultrafiltrations en

cascade (fig. 2-3) et obtenir ainsi pour chaque échantillon plusieurs fractions entre lesquelles se distribuent différentes classes de tailles moléculaires. Pour chaque échantillon, un témoin (ou blanc) d'expérience a été réalisé au préalable en faisant subir exactement la même procédure de fractionnement à un volume d'eau pure identique à celui de l'échantillon considéré.

Deux différents types de systèmes d'ultrafiltration ont été utilisés en fonction du volume d'échantillon à filtrer.

Nous avons utilisé un système MILLIPORE Prep/Scale™- TFF (Fig. 2-4) dont les membranes sont disposées à l'intérieur de cartouches interchangeables et permettent la filtration de larges volumes d'échantillons. Ces membranes sont constituées de cellulose régénérée et présentent une surface apparente de 900 cm². Les différentes cartouches utilisées sur ce système présentent des seuils de coupures de 10kDa, 3kDa et 1kDa.

La pompe péristaltique permet la circulation de l'échantillon sur la membrane. La pression appliquée en tête de cartouche conduit les molécules plus petites que les pores de la membrane au travers de celle-ci pour constituer le *perméat*. Les plus grosses molécules sont remises en circulation dans le réservoir d'échantillon et se concentrent au fur et à mesure de la filtration en constituant le *rétentat*.

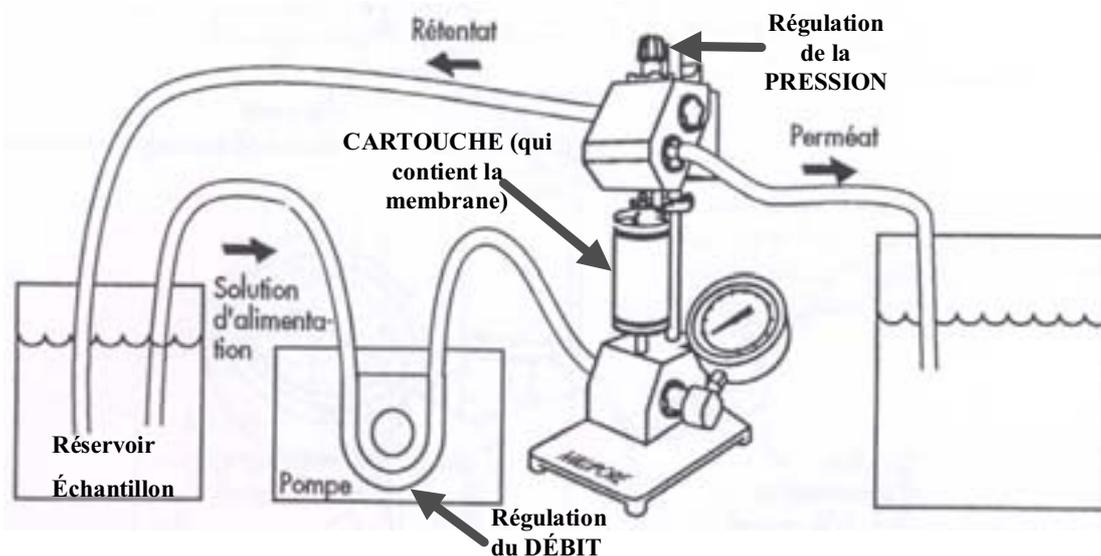


Figure 2-4. Schéma du système d'ultrafiltration Millipore Prep/Scale™ – TFF.

Le protocole de nettoyage des cartouches est le suivant : la membrane est d'abord rincée avec une solution de soude (0,1M) qui circule dans le système à 45°C pendant 1 heure afin d'éliminer d'éventuelles impuretés biologiques et organiques adsorbées. Elle est ensuite

rincée plusieurs fois avec de l'eau ultra pure (45°C) jusqu'à l'obtention d'un minimum de fluorescence résiduelle du filtrat et du rétentat de rinçage pour des excitations à 270 et 313 nm. La membrane est alors rincée avec une solution d'acide phosphorique (0,1M) à 45°C pendant une demi-heure pour éliminer les impuretés inorganiques. Elle est rincée une dernière fois avec de l'eau ultra pure et elle est soumise à un nouveau test de propreté par spectrofluorimétrie avant de procéder au fractionnement.

Lorsque les fractionnements ont été réalisés avant des dosages de métaux dans les fractions (Chapitre 6) la totalité de la verrerie et du flaconnage a été au préalable rincée avec de l'acide nitrique (10%).

Lors du fractionnement, la vitesse de circulation de la pompe ainsi que la pression appliquée sont réglées simultanément afin que le manomètre en entrée de cartouche indique une pression maximum de 20 psi (1,4 bar) afin d'éviter de forcer le passage de molécules plus grosses au travers de la membrane et provoquer son colmatage ou même une détérioration de la surface. Ces deux paramètres sont réglés de façon à trouver un compromis entre l'efficacité du fractionnement, la vitesse de circulation qui évite le colmatage de la membrane et la durée de la séparation. Le fractionnement est arrêté lorsque le volume de *perméat* obtenu divisé par le volume initial de l'échantillon correspond à un rapport 8:9 (Belin et al., 1993) et entraînant donc une concentration du matériel organique au niveau du rétentat d'un facteur 9 environ. Ce rapport a été choisi en fonction des considérations suivantes, tout d'abord il doit être suffisamment grand pour permettre à une quantité maximum de petites molécules de passer à travers la membrane. Ensuite il ne doit pas non plus être trop grand pour éviter la formation possible d'agrégats et empêcher le forçage et le colmatage de la membrane par les macromolécules normalement retenues (Buffle et al., 1978).

Un autre système d'ultrafiltration, AMICON TCF 10 (Fig. 2-5), a été utilisé pour des volumes d'échantillons plus faibles (<550 mL) ou bien pour utiliser un seuil de coupure de 500 Da (disponible uniquement sur ce système). Il s'agit d'un système d'ultrafiltration tangentielle qui fonctionne de façon légèrement différente par rapport au système Millipore. L'échantillon est introduit dans le réservoir puis mis sous une pression de 20 psi (1,4 bar) avec un flux d'azote (N₂ qualité 5.0). Sous l'effet de cette pression les petites molécules vont être poussées au travers de la membrane, tandis que la pompe péristaltique va assurer une circulation tangentielle de l'échantillon sur toute la surface de la membrane limitant ainsi de façon plus efficace le colmatage et remettant les molécules retenues par la membrane en circulation dans le réservoir. La vitesse de circulation ainsi que le débit d'azote sont réglés de manière à optimiser les paramètres de la séparation (efficacité, durée) de la même façon

qu'avec le système Millipore. Au fur et à mesure de la filtration, les petites molécules vont former le *filtrat* et celles qui ne passent pas au travers de la membrane vont se retrouver concentrés dans le réservoir. Le fractionnement est arrêté comme dans le cas du système Millipore lorsque le volume de *filtrat* obtenu divisé par le volume initial de l'échantillon correspond à un rapport 8:9. Le matériel organique dissous au niveau du *rétenant* a donc été concentré d'un facteur 9 environ et peut alors être récupéré en vidant le réservoir.

Des membranes Millipores YM10, YM3, YM1 et YC05 présentant des seuils de coupures respectifs de 10 kDa, 3 kDa, 1 kDa et 500 Da ont été utilisées. Ces membranes se présentent sous la forme de disques d'une surface de 64 cm². Les membranes de type YM sont également constituées de cellulose régénérée donc le nettoyage est aussi réalisé à l'aide de soude (0,1M) avant un rinçage avec de l'eau Milli-Q. La membrane YC05 est en cellulose acétate et son nettoyage s'effectue avec du NaCl (1-2M) suivi d'un rinçage à l'eau Milli-Q. La propreté des membranes et du système est également testée par spectrofluorimétrie.

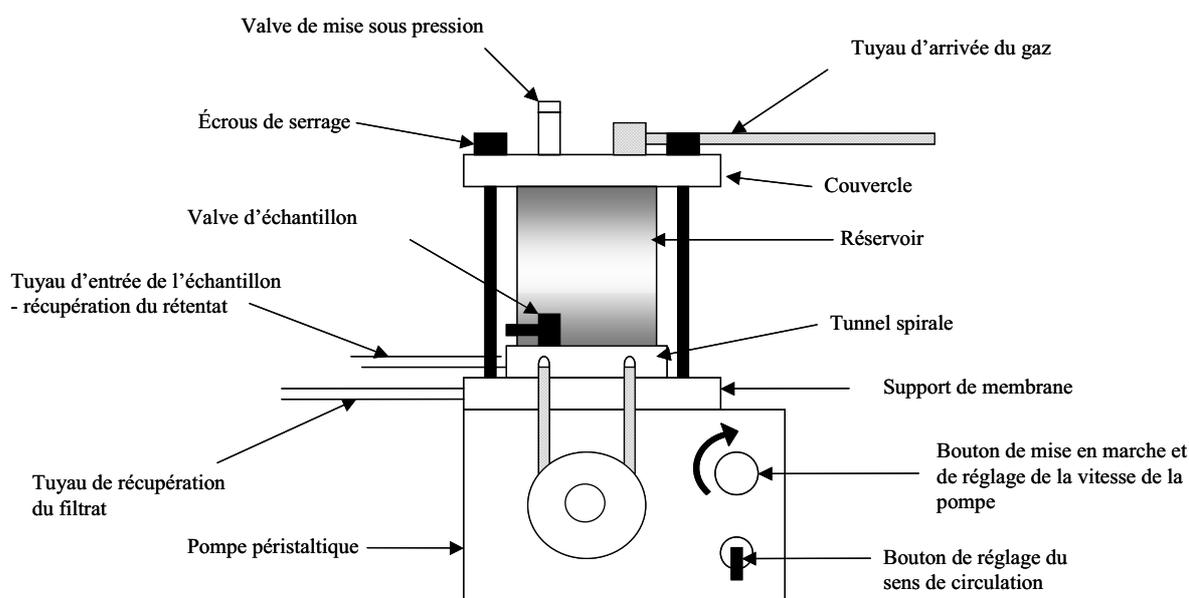


Figure 2-5. Schéma du système d'ultrafiltration Amicon TCF 10

5- PRESENTATION DES SITES D'ETUDE : ESTUAIRES DE LA SEINE ET DE LA GIRONDE

5-1- Estuaire de la **Gironde** fig. (2-6)

L'estuaire de la Gironde s'étend sur une centaine de kilomètres entre le point kilométrique 0 (PK 0) qui est le Pont de Pierre à Bordeaux et le PK 100 qui est localisé à l'embouchure, entre Royan et le Platin de Grave. On peut distinguer quatre zones principales :

- l'estuaire fluvial, du Bec d'Ambès (PK 25), confluence de la Garonne et de la Dordogne, jusqu'à la limite amont de l'influence de la marée dynamique dans les fleuves (Pessac-sur-Dordogne pour la Dordogne et La Réole pour la Garonne)
- l'estuaire amont entre le Bec d'Ambès et Saint-Christoly (PK 65)
- l'estuaire aval entre Saint-Christoly et la Pointe de Grave (PK 93)
- l'embouchure, en aval de la Pointe de Grave

La Gironde est un estuaire macrotidal à débit modéré et forte turbidité. Il est caractérisé par un bouchon vaseux très étendu généralement entre Pauillac (PK 45) en aval et, d'une part l'amont de Libourne sur la Dordogne, d'autre part Bordeaux sur la Garonne. Lors des crues hivernales le bouchon vaseux se déplace vers l'aval.

Le bassin versant de la Gironde est considéré comme relativement peu pollué et sa densité de population est de 75 hab.km⁻². Les caractéristiques hydrosédimentaires sont données dans le tableau 2-1, en comparaison avec celles de l'estuaire de la Seine qui sera présenté dans le paragraphe suivant.

Estuaire	Surface (km ²)	Bassin versant (km ²)	Débit (m ³ .s ⁻¹)	Marnage (m)	Temps de résidence des particules (j)	MES (mg.l ⁻¹)
Gironde	442	79000	1000	4	60-90	350
Seine	50	71000	410	5	30	30

Tableau 2-1. Caractéristiques hydrodynamiques de la Gironde et de la Seine. (Adapté de Lemaire, 2002)

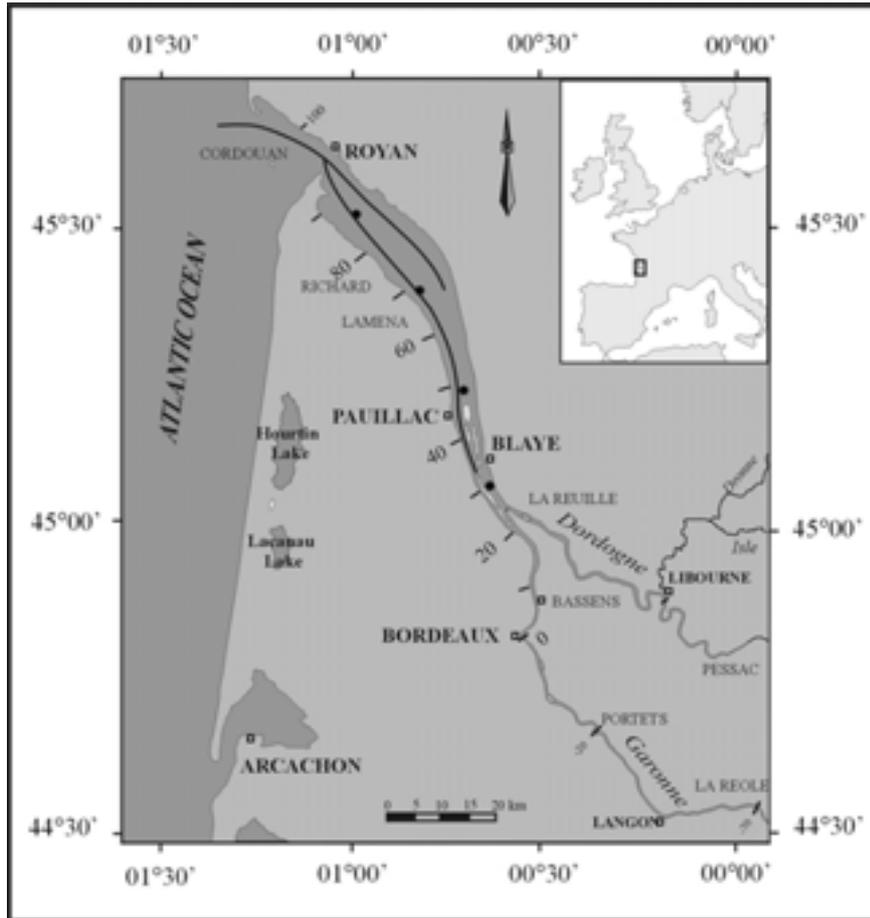


Figure 2-6. Carte de l'estuaire de la Gironde.

5-2- Estuaire de la Seine (fig. 2-7)

Le point kilométrique 0 de l'estuaire de la Seine est situé à Paris. La limite amont de l'influence de la marée dynamique est le barrage de Poses (PK 202). L'embouchure est située au PK 360 environ à l'entrée du port du Havre. Cet estuaire est caractérisé par une forte pression anthropique et une industrialisation importante de son bassin versant avec la présence de nombreuses raffineries depuis Rouen jusqu'au Havre.

Le bouchon vaseux de la Seine est périodique (Avril à Octobre) et se situe principalement à l'étiage entre Tancarville (PK 337) et Honfleur (PK 355). Lors des crues, le bouchon vaseux est poussé vers l'aval et peut même être expulsé en Baie de Seine. La turbidité y est beaucoup moins importante que dans l'estuaire de la Gironde et l'eutrophisation est par contre importante en raison de la quantité importante de nutriments drainés par le fleuve et dus aux rejets d'origine industrielle, agricole ou urbaine.

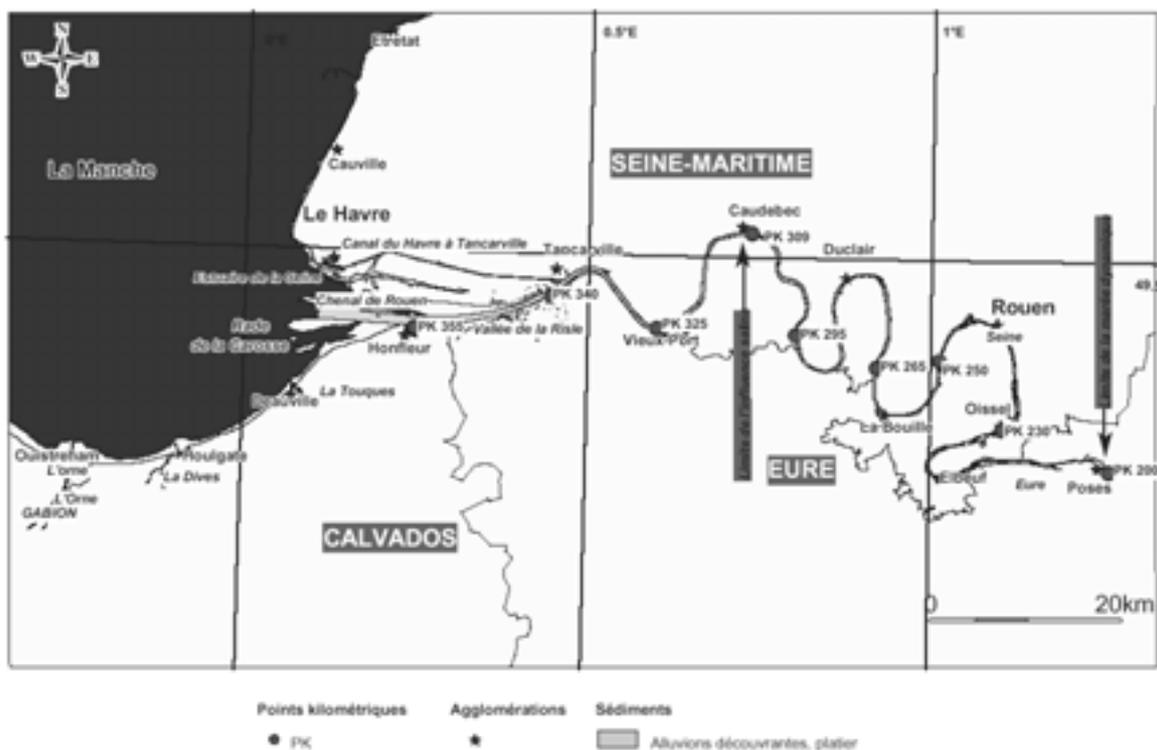


Figure 2-7. Carte de l'estuaire de la Seine

6- STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

Les travaux réalisés s'inscrivent dans le cadre de deux programmes nationaux d'étude des systèmes estuariens regroupant plusieurs laboratoires de recherches et s'intéressant à de multiples thématiques :

- Le programme SEINE AVAL 2 (2001-2004), thème 3 : Eutrophisation, dégradation de la matière organique, rétention des nutriments dans l'estuaire de la Seine.
- Le GIS-ECOBAG soutenu par le programme LITEAU (2000-2003) de l'Agence de Bassin Adour Garonne, thème 3 : Devenir de la matière organique et qualité des eaux estuariennes de la Gironde.

Au sein de ses deux programmes nos objectifs étaient de mieux connaître la nature, l'évolution et le rôle de la fraction organique dissoute dans ces deux systèmes estuariens et notamment dans le fonctionnement biogéochimique du bouchon vaseux.

Plusieurs campagnes de prélèvements in situ ont donc été réalisées à bord de navires océanographiques et sont recensées dans le tableau 2-2. Les prélèvements d'eau ont été effectués à l'aide de bouteilles de type Niskin et partagés entre les différentes équipes

scientifiques participantes. La plupart des échantillons sont donc communs et ont fait l'objet d'analyses diverses et correspondantes à de multiples problématiques ce qui permet d'obtenir un grand nombre d'informations complémentaires relatives à une campagne d'échantillonnage.

6-1- Estuaire de la Gironde

Les campagnes de prélèvements in situ sur l'estuaire de la Gironde (GIMET et GIROX) ont été effectuées à bord du navire océanographique « Côte d'Aquitaine » (INSU) en collaboration avec les équipes de G. Blanc et H. Etcheber (Département de Géologie et Océanographie (DGO), UMR EPOC 5805, Université Bordeaux 1). Dans le cadre des missions GIMET nos prélèvements se sont axés sur l'étude du bouchon vaseux avec des prélèvements en amont, dans le bouchon vaseux et en aval de celui-ci afin d'observer l'évolution de la matière organique dissoute lors du mélange entre les eaux douces et les eaux marines. De plus, ces prélèvements ont été effectués à trois profondeurs différentes afin d'observer cette évolution dans la colonne d'eau. En plus de cette étude particulière du bouchon vaseux, des prélèvements suivant un profil fin (ou gradient) de salinité ont été effectués lors des missions GIROX.

Plusieurs paramètres physico-chimiques ont été mesurés pour chaque échantillon à l'aide de sondes classiques (salinité, température, oxygène, pH). De plus, outre nos mesures de fluorescence et les diverses analyses que nous avons effectuées et qui sont présentées dans ce manuscrit, les équipes du DGO ont également déterminé les teneurs en MES, en carbone organique particulaire (COP) et carbone organique dissous (COD) qui sont présentées en annexe (Annexe 15).

6-2- Estuaire de la Seine

Les campagnes d'échantillonnage sur la Seine ont été effectuées à bord de diverses embarcations océanographiques : « Côte d'Aquitaine » en Janvier 2001, « Thalia » (IFREMER) pour NUTS 01 et « Côte de la Manche » (INSU) pour VASTEDEBA 4 et NUTS 02. La mission VASTEDEBA 4 a été réalisée en collaboration avec les équipes de R. Lafite (Laboratoire de Morphodynamique Continentale et Côtière, M2C, UMR 6143 CNRS, Université de Rouen) et de F. Petit (Laboratoire de Microbiologie du Froid, UPRESA 2123, Université de Rouen) qui intervenaient dans des thèmes différents au sein du programme Seine Aval 2. Les missions NUTS étaient spécifiques au thème 3 (Eutrophisation, dégradation

de la matière organique, rétention des nutriments) du programme Seine Aval 2 et regroupaient les équipes de J. Garnier et G. Billen (UMR Sisyphe 6169, Université P.& M. Curie, Jussieu, Paris), S. Mounier (Laboratoire RCMO, Recherche en Chimie Marine des Organométalliques, Université de Toulon et du Var), P. Servais (Ecologie des Systèmes Aquatiques, Université Libre de Bruxelles) et H. Etcheber et G. Abril (DGO, UMR EPOC 5805, Université Bordeaux 1). Lors de ces campagnes de nombreux paramètres ont été mesurés par chacune de ces équipes (éléments nutritifs, MES, COD, COP, chlorophylle et autres pigments, activité des bactéries...).

Les prélèvements ont été effectués lors de gradients de salinité ou bien en « ciblant » le bouchon vaseux, soit selon la méthode décrite précédemment, soit en effectuant des « points fixes ». Les points fixes (ou stations fixes) consistent à rester positionné au même endroit et prélever des échantillons à différents temps d'un cycle de marée.

De plus, au cours de l'année 2002, A. Ficht de la Cellule Antipollution du Service de Navigation de la Seine (SNS Rouen) nous a gracieusement prélevé des échantillons lors de chacune de ses missions mensuelles de suivi de la qualité des eaux de la Seine durant lesquelles de très nombreux paramètres physico-chimiques sont déterminés. Ceci nous a permis de réaliser un suivi saisonnier très resserré sur toute la zone de l'estuaire.

Estuaire	Mission	Date	Types de prélèvements
Gironde	GIMET 2	Mars 2001	Etude BV (Amont/BV/Aval)
	GIMET 3	Juin 2001	Etude BV (Amont/BV/Aval)
	GIMET 4	Septembre 2001	Etude BV (Amont/BV/Aval)
	GIROX 1	Février 2002	Gradient de salinité
	GIROX 2	Septembre 2002	Gradient de salinité
Seine	Mission n°1	Janvier 2001	Gradient de Salinité
	VASTEDEBA 4	Avril-Mai 2001	Gradient de salinité
	NUTS 01	Août 2001	2 Gradients de salinité
	NUTS 02	Septembre 2002	1 Gradient de salinité + 1 point fixe
	André Ficht	Année 2002	Suivi de la Cellule Antipollution du Service de Navigation de la Seine

Tableau 2-2. Liste des campagnes d'échantillonnage.

7- REMARQUES PRELIMINAIRES A L'INTERPRETATION DES SPECTRES DE FLUORESCENCE

Ce travail de thèse a consisté à étudier par spectrofluorimétrie les caractéristiques de la matière organique dissoute dans les eaux naturelles des estuaires de la Seine et de la Gironde.

Comme cela a déjà été précisé dans le protocole analytique, les spectres d'absorption UV-visible de chacun des échantillons ont été enregistrés préalablement à toute mesure de fluorescence afin de s'assurer de la linéarité de la relation entre l'intensité de fluorescence et la concentration des composés fluorescents. Les spectres d'absorption obtenus sont relativement semblables et leur exploitation n'a pas permis de montrer des caractéristiques particulières d'évolution de la MOD dans les estuaires de la Seine et de la Gironde. Nous ne présenterons donc pas ces spectres d'absorption dans ce manuscrit.

Par contre, la technique que nous avons utilisée pour caractériser tous les échantillons est la spectrofluorimétrie tridimensionnelle qui permet d'obtenir l'ensemble des paramètres de fluorescence (intensités, longueurs d'onde d'excitation et d'émission des maxima) relatifs à un échantillon sur tout le domaine spectral considéré.

Les différences entre les spectres de fluorescence 3D permettent d'observer les modifications du matériel organique au travers de la variation des intensités de fluorescence, des décalages de la position des maxima et de l'absence ou de la présence de certaines bandes ou épaulements (fig. 2-8).

Cependant, afin de mieux appréhender et apprécier de façon semi-quantitative les modifications du matériel organique dissous nous avons plus particulièrement suivi l'évolution de l'intensité de fluorescence de quatre des principales bandes de fluorescence de la matière organique dissoute présentées au chapitre 1 : les bandes α , α' , β et γ qui sont d'ailleurs désignées sur la figure 2-8.

Comme nous l'avons déjà vu sur le tableau 1-3 (page 27), ces principales bandes de fluorescence ont été observées selon la littérature dans des domaines spectraux relativement vastes en fonction de la nature et de l'origine des échantillons concernés. Ainsi, afin de nous affranchir de cette grande variabilité des positions des maxima de fluorescence et pouvoir comparer plus clairement l'ensemble de nos échantillons, nous avons délibérément choisi d'observer et déterminer l'intensité de fluorescence de ces bandes à des longueurs d'onde d'excitation fixes.

Ainsi, en ce qui concerne la bande α' nous avons décidé de toujours l'observer à la longueur d'onde d'excitation caractéristique de 250 nm et de lui attribuer l'intensité de fluorescence maximale observée pour cette longueur d'onde d'excitation.

Nous avons déterminé l'intensité de la bande α selon le même principe mais en considérant parallèlement deux longueurs d'onde d'excitation, 340 et 370 nm, étant donné la plage du domaine spectral dans lequel elle est observée. Les résultats ayant été fondamentalement similaires pour ces deux longueurs d'onde, nous présentons dans l'ensemble de ce manuscrit uniquement les résultats relatifs à la bande α déterminée pour une excitation à 370 nm afin d'éviter les redondances. De plus, en considérant la longueur d'onde d'excitation de 370 nm, la bande α est alors moins susceptible de subir une possible influence des autres bandes et épaulements avoisinants.

Les bandes α et α' relatives aux substances humiques sont généralement facilement identifiables sur les spectres de fluorescence 3D. Il n'en est pas de même pour les bandes β et γ qui ne sont pas clairement définies sur de nombreux spectres soit en raison de l'absence des composés qu'elles représentent, soit parce que leur signal de fluorescence est masqué par celui des substances humiques. En effet, dans de nombreux cas, la fluorescence très intense des substances humiques à des concentrations élevées peut couvrir le signal de fluorescence des autres composés présents à de beaucoup plus faibles concentrations. Cependant, même si les bandes β , γ et δ n'ont pas été systématiquement observées, nous avons tout de même suivi l'évolution des intensités de fluorescence aux couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission caractéristiques de ces bandes afin d'appréhender leur contribution ou non à la fluorescence globale, leur apparition ou leur disparition.

Compte tenu de la difficulté de différencier les signaux de fluorescence des types δ et γ , nous avons choisi de regrouper sous le terme de bande γ le signal de tous les composés de type protéiques qui fluorescent dans le domaine spectral compris entre les longueurs d'onde d'excitation 270 à 290 nm et d'émission 300 à 350 nm. Pour cela nous avons choisi de définir l'intensité maximale de fluorescence de cette bande γ comme étant l'intensité de fluorescence associée au couple de longueur d'onde d'excitation/émission 280nm/335nm qui se trouve au centre du domaine spectral décrit précédemment.

Pour la bande ou plutôt l'épaulement caractérisant le fluorophore de type β nous avons choisi de déterminer l'intensité de fluorescence associée au couple de longueur d'onde d'excitation/émission 310nm/400nm qui est au cœur du domaine spectrale où ce fluorophore est généralement observé dans la littérature (tableau 1-3, page 27).

Au-delà de la simple mesure de l'intensité des différentes bandes de fluorescence, et comme nous allons le voir tout au long de ce travail, les rapports d'intensité entre les différentes bandes de fluorescence permettent de mettre en évidence la présence et l'évolution de toutes les bandes, les unes par rapport aux autres et ainsi d'observer les modifications du matériel organique dissous fluorescent. Ainsi nous avons décidé dans la totalité de ce travail de prendre la bande α comme référence et d'observer l'évolution des autres bandes par rapport à celle-ci au travers des rapports d'intensité de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α} qui seront présentés dans les chapitres suivants.

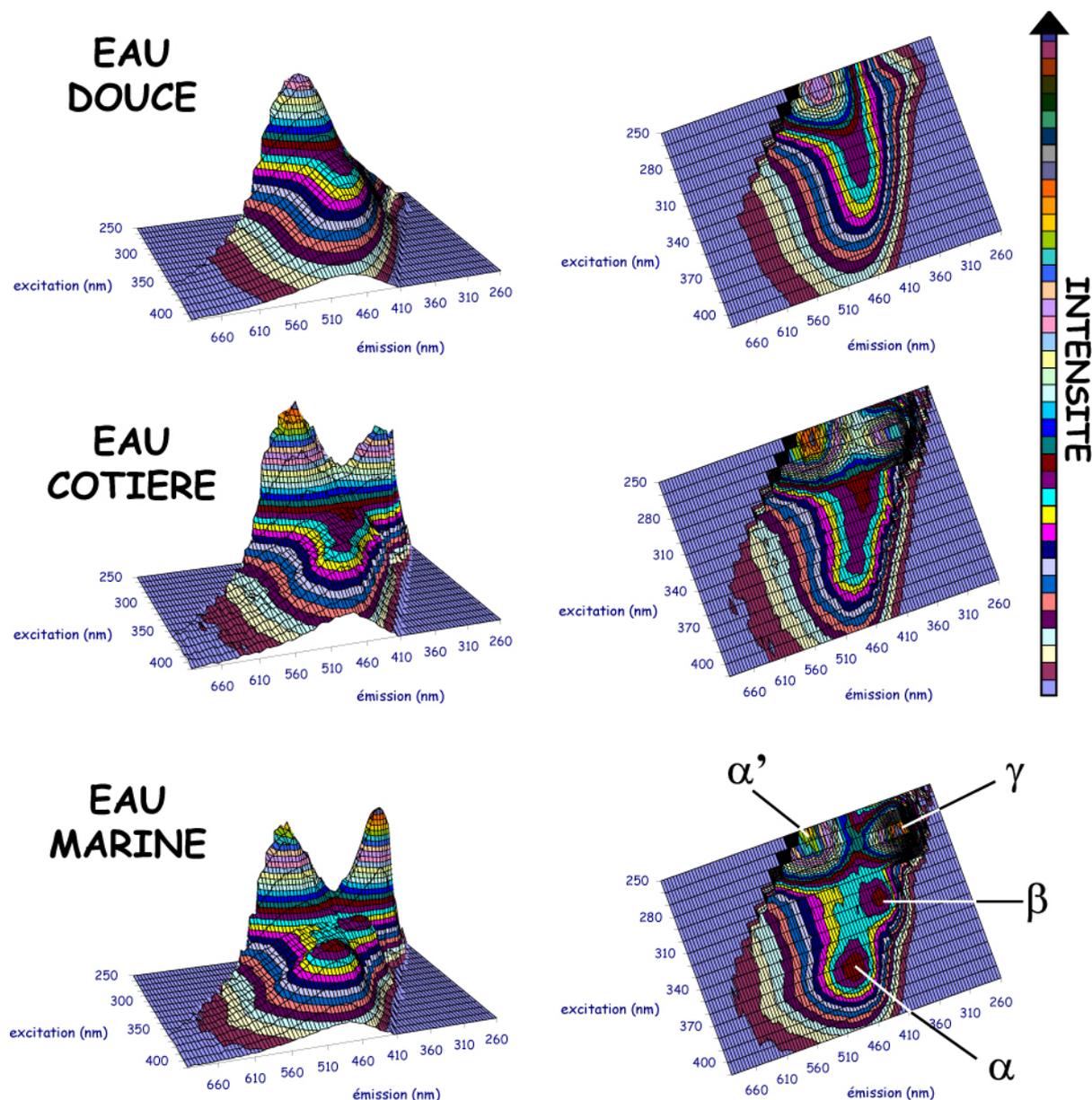


Figure 2-8. Spectres de fluorescence 3D d'échantillons d'eaux naturelles et leurs projections dans le plan.

CHAPITRE 3

EVOLUTION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE LE LONG DE L'ESTUAIRE

Ce chapitre présente les résultats concernant le suivi par spectrofluorimétrie 3D de l'évolution du signal de fluorescence de la matière organique dissoute sur toute la zone des deux estuaires concernés (Seine et Gironde) et de façon saisonnière.

Lors des diverses missions effectuées sur la Seine et la Gironde, les prélèvements ont été réalisés durant des gradients de salinité, c'est à dire en prélevant des échantillons à des salinités différentes le long de ces estuaires dans la zone d'influence saline.

Tous les échantillons prélevés ont été analysés par spectrofluorimétrie 3D afin de mettre en évidence toute la variabilité spatio-temporelle de la matière organique dissoute (MOD) fluorescente dans un système aussi complexe qu'un estuaire qui est marqué par de profondes variations des conditions environnementales.

1- ESTUAIRE DE LA SEINE

1-1- Evolution du signal de fluorescence en fonction de la salinité dans l'estuaire aval

1-1-1 Mission de Janvier 2001

Lors de la mission de janvier 2001, peu de différences qualitatives ont été observées entre les différents échantillons. La figure 3-1 montre les projections dans le plan des spectres 3D de quatre échantillons pris comme exemple. La principale tendance observée est la diminution logique de l'intensité de fluorescence et donc de la concentration en MOD avec l'augmentation de la salinité qui traduit la dilution du matériel organique continental dans la masse d'eau salée. Une autre tendance observée est l'évolution de la position du maximum de fluorescence α avec la salinité. Lorsque la salinité augmente, on remarque en effet un décalage du maximum α vers les plus grandes longueurs d'onde d'émission lorsque la longueur d'onde d'excitation augmente aux fortes salinités. Les travaux de Parlanti et al. (2000a) ont montré que le matériel humique marin présente une bande α très décalée vers le rouge par rapport aux substances humiques d'origine continentale. Ce décalage bathochrome (vers le rouge) peut être expliqué par la floculation des composés humiques de hautes masses moléculaires (De Souza Sierra et al., 1994 ; Coble et al., 1990).

La dilution du matériel fluorescent continental dans les eaux salées apparaît sur la figure 3-2 qui présente l'intensité des différentes bandes de fluorescence considérées en fonction de la salinité. On remarque bien une tendance grossièrement linéaire de la décroissance d'intensité avec l'augmentation de la salinité.

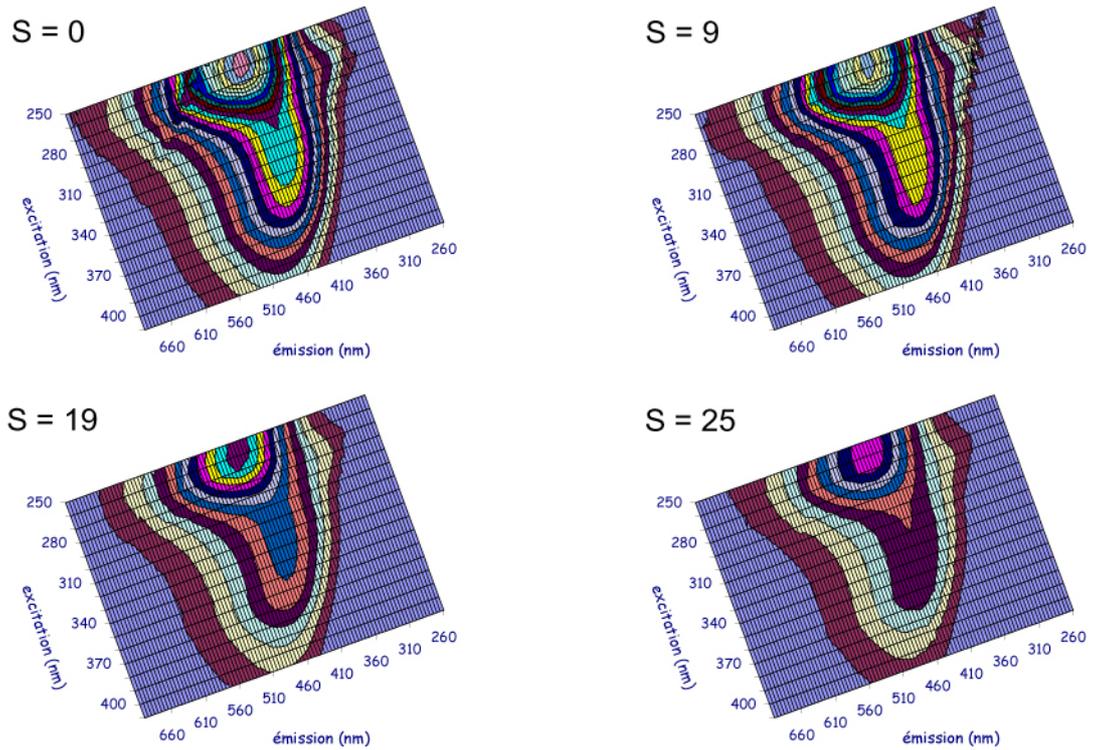


Figure 3-1. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes durant la mission de janvier 2001 sur l'estuaire de la Seine.

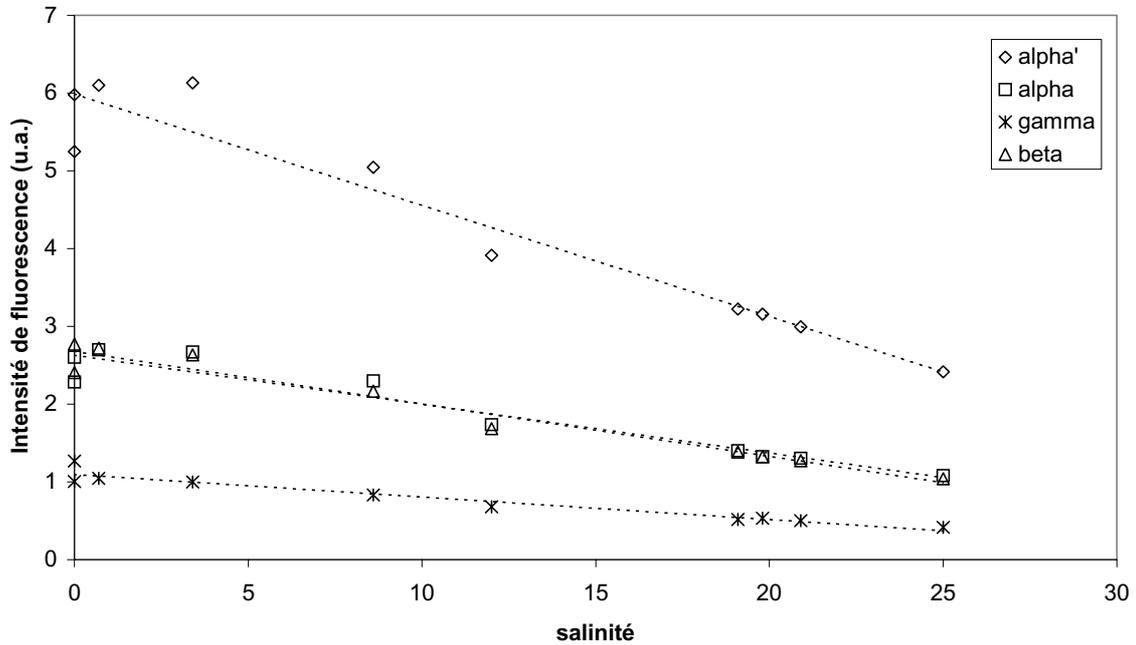


Figure 3-2. Intensité de fluorescence en fonction de la salinité (Seine, janvier 2001).

On peut remarquer sur la figure 3-2 la superposition quasi parfaite des courbes pour les fluorophores α et β . Ceci montre en fait le que le fluorophore β n'est pas présent dans ces

échantillons et que les intensités prises en compte pour ce fluorophore font partie du massif de fluorescence α .

Par contre aucune corrélation n'est observée entre l'intensité de fluorescence et la teneur en carbone organique dissous (fig. 3-3) qui présente lui aussi une décroissance en fonction de la salinité (fig. 3-4).

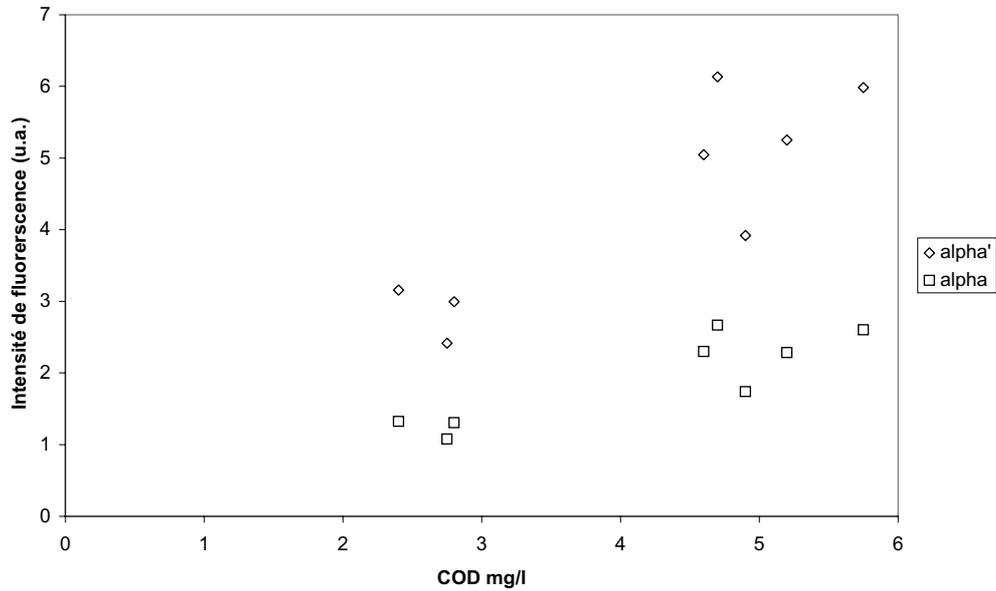


Figure 3-3. Intensité de fluorescence en fonction de la teneur en COD (Seine, janvier 2001).

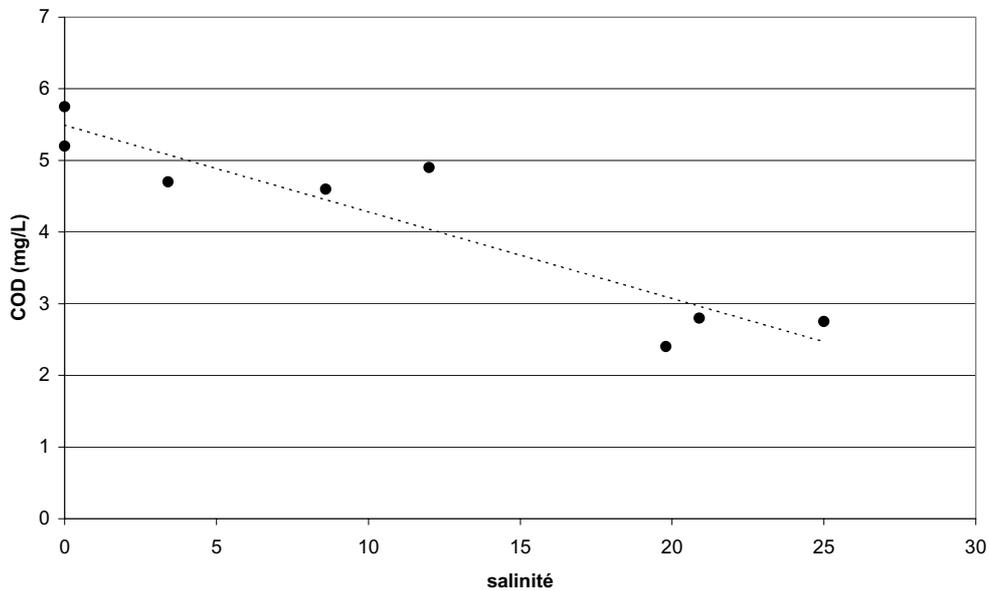


Figure 3-4. Teneur en carbone organique dissous (COD) en fonction de la salinité (Seine, janvier 2001).

Si maintenant l'on s'intéresse au rapport d'intensité des différentes bandes de fluorescence par rapport à la bande α , on remarque qu'ils n'évoluent quasiment pas en fonction de la salinité (figure 3-5).

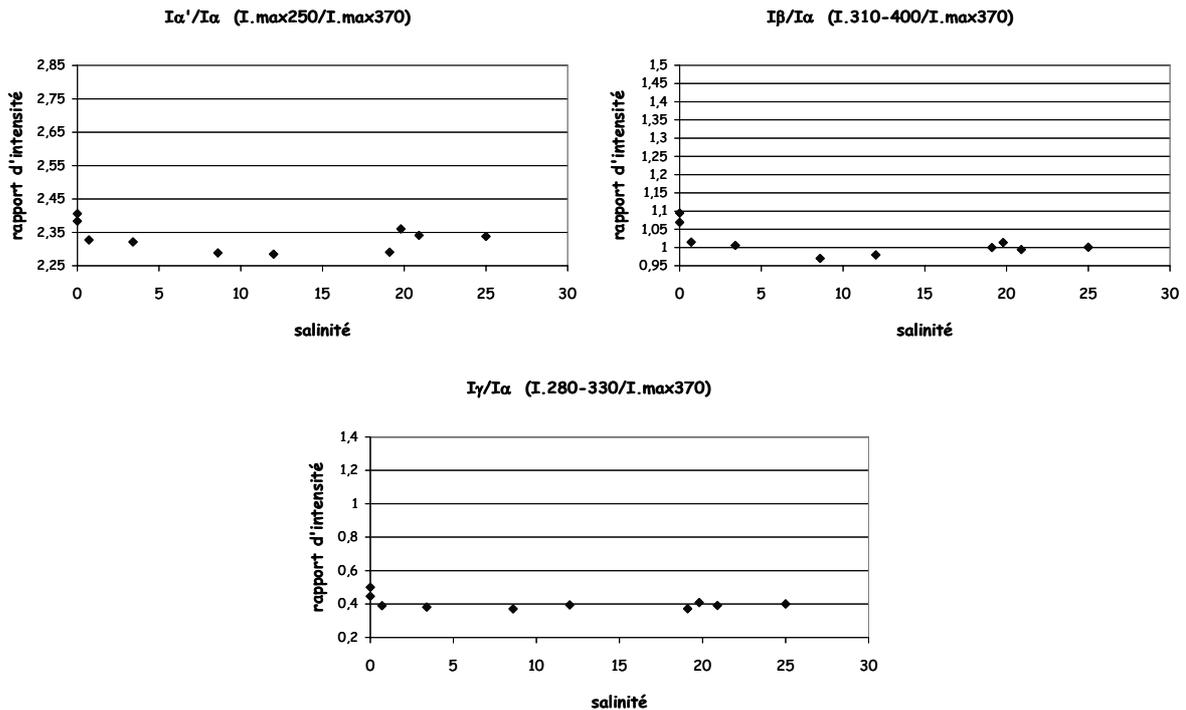


Figure 3-5. Rapports d'intensités de fluorescence des différentes bandes ($I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , et I_{γ}/I_{α}) en fonction de la salinité (Seine, janvier 2001).

Les résultats de cette mission hivernale montrent une situation caractéristique d'une période de fortes crues hivernales avec des teneurs en COD relativement importantes (2,40 à 5,75 mgC/L). La matière organique dissoute présente des caractéristiques humiques très marquées et donc une origine continentale quasi exclusive comme le montre les spectres de fluorescence 3D dominés uniquement par les bandes α et α' . En effet, la bande γ ne s'observe quasiment pas ou alors sous la forme d'un très léger épaulement. Le matériel organique est donc de façon prépondérante d'origine allochtone. En ce qui concerne son évolution le long de l'estuaire en fonction de la salinité on ne peut pas remarquer de tendance très précise.

1-1-2 Mission d'Avril/Mai 2001 (Vastedeba 4)

Comme pour la mission de janvier, l'intensité de fluorescence globale diminue avec l'augmentation de salinité traduisant le phénomène de dilution de la MOD lors du mélange des eaux douces et marines. Par contre, aucune tendance n'a pu être mise en évidence entre intensité de fluorescence et COD dont l'analyse des teneurs a donné de fortes fluctuations aléatoires et des valeurs très élevées dont nous pensons qu'elles sont dues à un problème de pollution lors de l'analyse. Ces données ne sont donc pas présentées ici. La figure 3-6

présente la projection dans le plan de quatre spectres 3D. On peut remarquer plus de différences entre les différents échantillons.

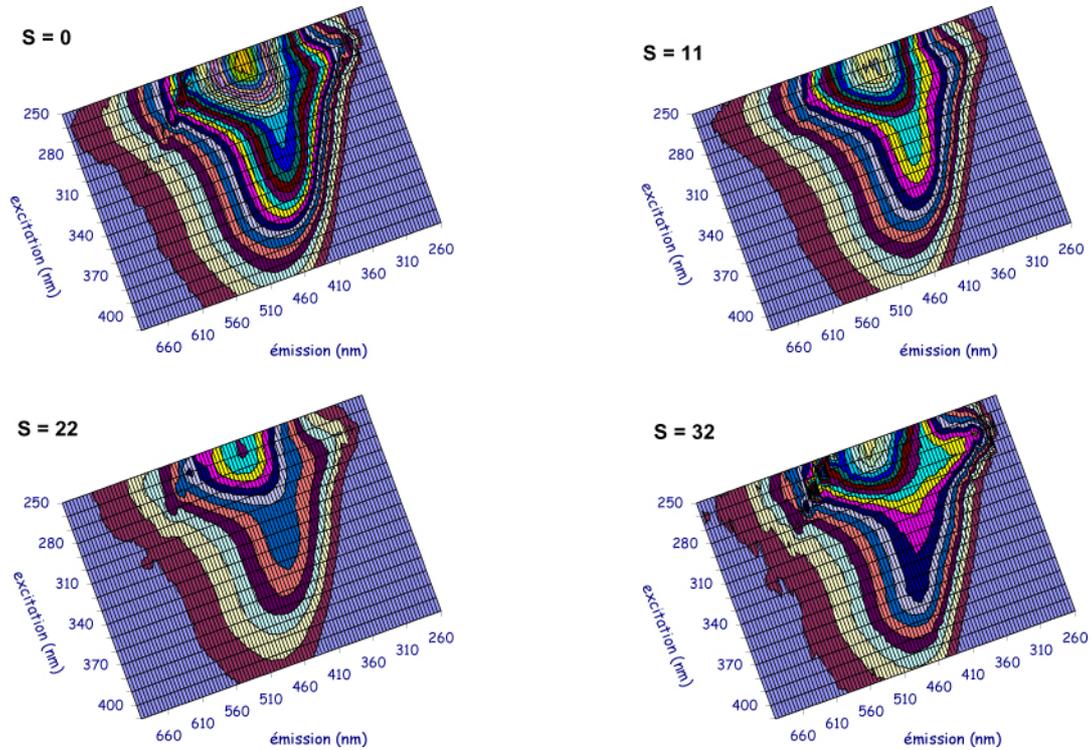


Figure 3-6. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes (Seine, Vastedéba 4, avril 2001)

En effet, l'échantillon de salinité 30 présente un élargissement du spectre pour une excitation à 310 nm, élargissement caractéristique de la présence du fluorophore β (fig. 3-7).

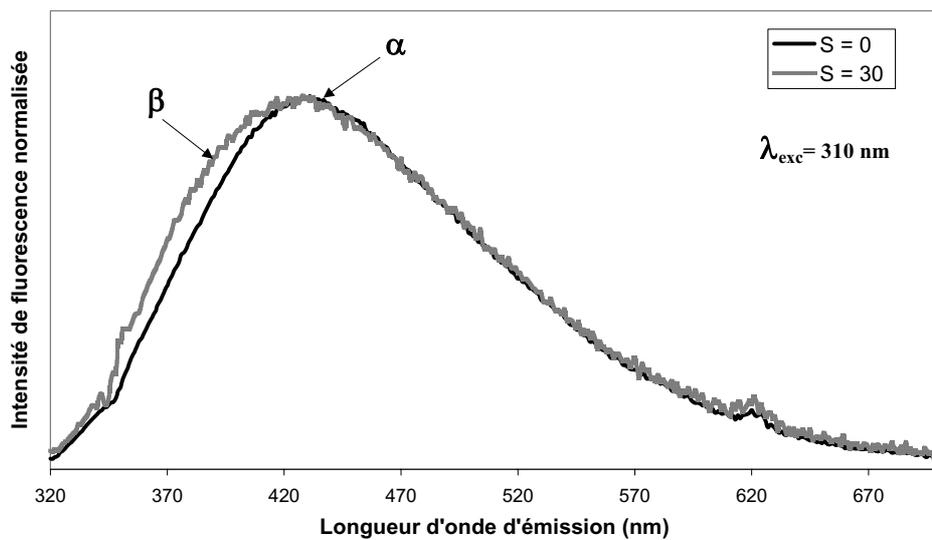


Figure 3-7. Spectres d'émission normalisés des échantillons de salinité 0 et 30 (Seine, Vastedéba 4, avril 2001) pour une longueur d'onde d'excitation de 310 nm

Les intensités de fluorescence des différentes bandes diminuent également de façon linéaire quand la salinité augmente (fig. 3-8).

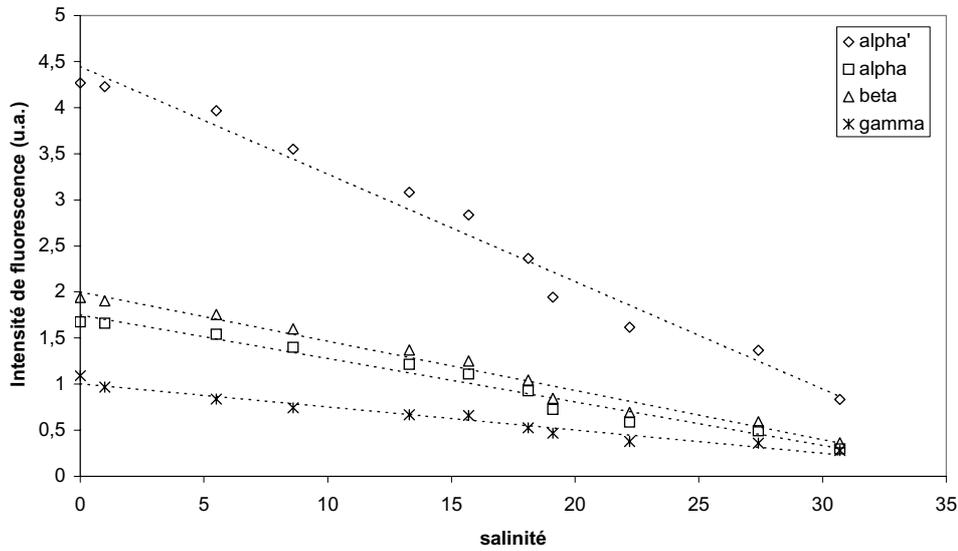


Figure 3-8. Intensité de fluorescence en fonction de la salinité (Seine, Vastedéba 4, avril 2001).

Les rapports d'intensités montrent par contre une évolution différente par rapport au mois de janvier (fig. 3-9).

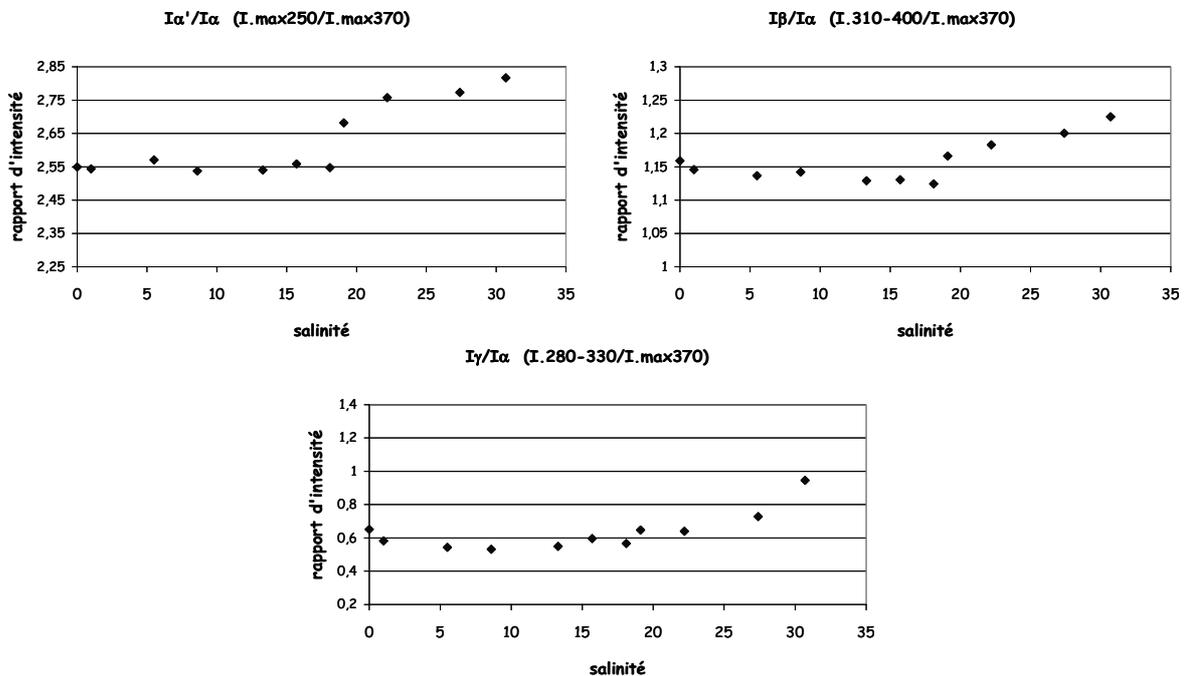


Figure 3-9. Rapports d'intensités de fluorescence des différentes bandes ($I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , et I_{γ}/I_{α}) en fonction de la salinité (Seine, janvier 2001).

En effet, à partir de la salinité 19 les rapports d'intensités des bandes α' , β et γ par rapport à α ont tendance à augmenter avec la salinité. Ceci traduit une variation de la

distribution relative des fluorophores entre les échantillons. Le matériel organique dissous est plus homogène entre les salinités 0 et 18.

1-1-3- Mission d'Août 2001 (NUTS 01)

Lors de cette mission NUTS 01, deux types de gradients de salinité ont été effectués, le premier en partant à l'étale de pleine mer (PK 364, S=31) et l'autre après l'étale de basse mer (PK 385, S=32) en remontant dans le fleuve avec la marée. L'intérêt d'effectuer cette double approche était de mettre en évidence la présence ou non du bouchon vaseux. La figure 3-10 montre pour ces deux gradients l'évolution de la teneur en matières en suspension (MES) en fonction de la salinité. Il est clair que le Bouchon Vaseux était présent lors du gradient de Basse Mer pour des salinités de l'ordre de 3 et 4 comme l'indiquent les fortes turbidités. Par contre, il était totalement absent lors du gradient de Pleine Mer probablement en raison d'un phénomène de sédimentation du bouchon vaseux durant l'étale de pleine mer comme cela a été rapporté par Texier et al. (1993).

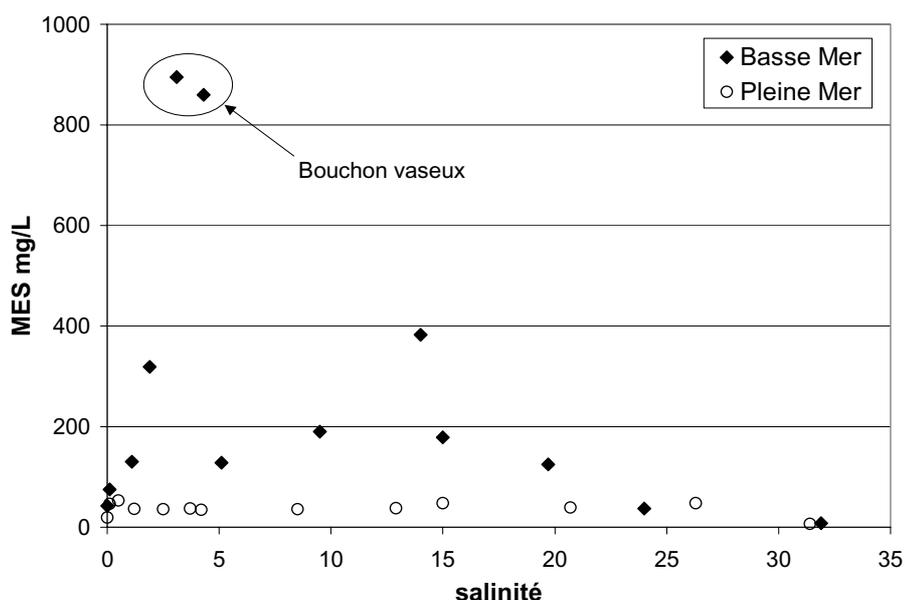


Figure 3-10. Teneur en matière en suspension en fonction de la salinité (Seine, Nuts 01, août 2001)

Les figures 3-11 et 3-12 présentent pour chacun de ces gradients (Pleine Mer et Basse Mer) la projection dans le plan de quatre spectres de fluorescence 3D pour des échantillons prélevés en surface. Sur cette figure les échelles d'intensité de fluorescence sont comparables pour les échantillons de salinité 32 et 31, mais différentes des autres échantillons qui sont comparables entre eux. L'élargissement des spectres d'émission pour une excitation à 310 nm est à nouveau clairement visible pour les salinités les plus fortes.

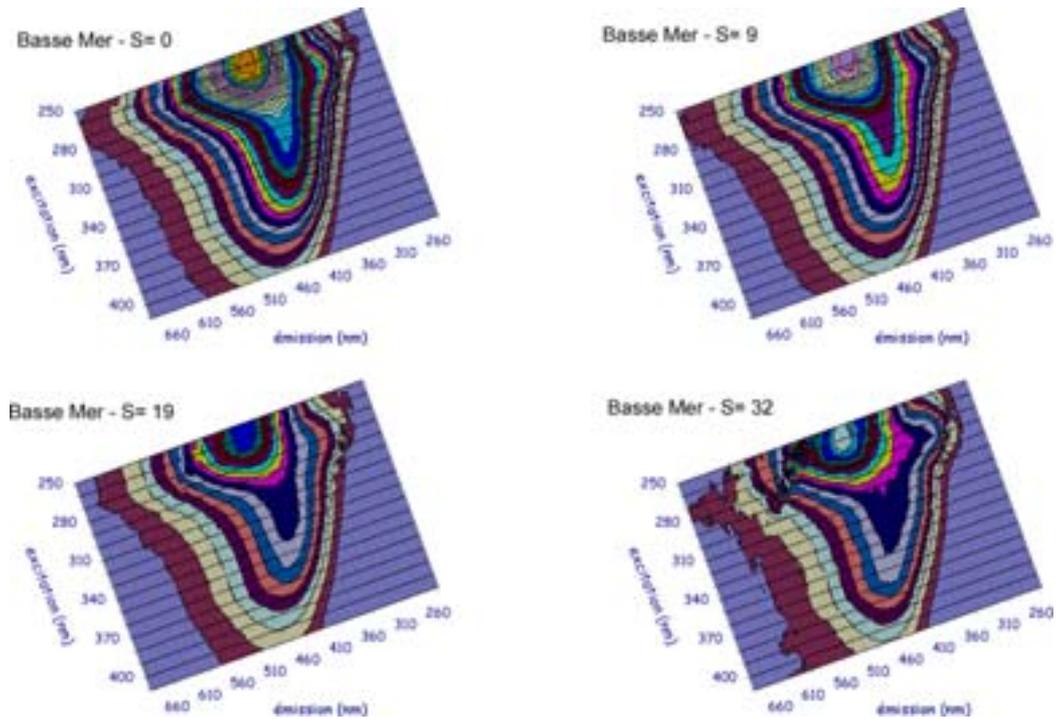


Figure 3-11. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes (Seine, Nuts 01, août 2001).

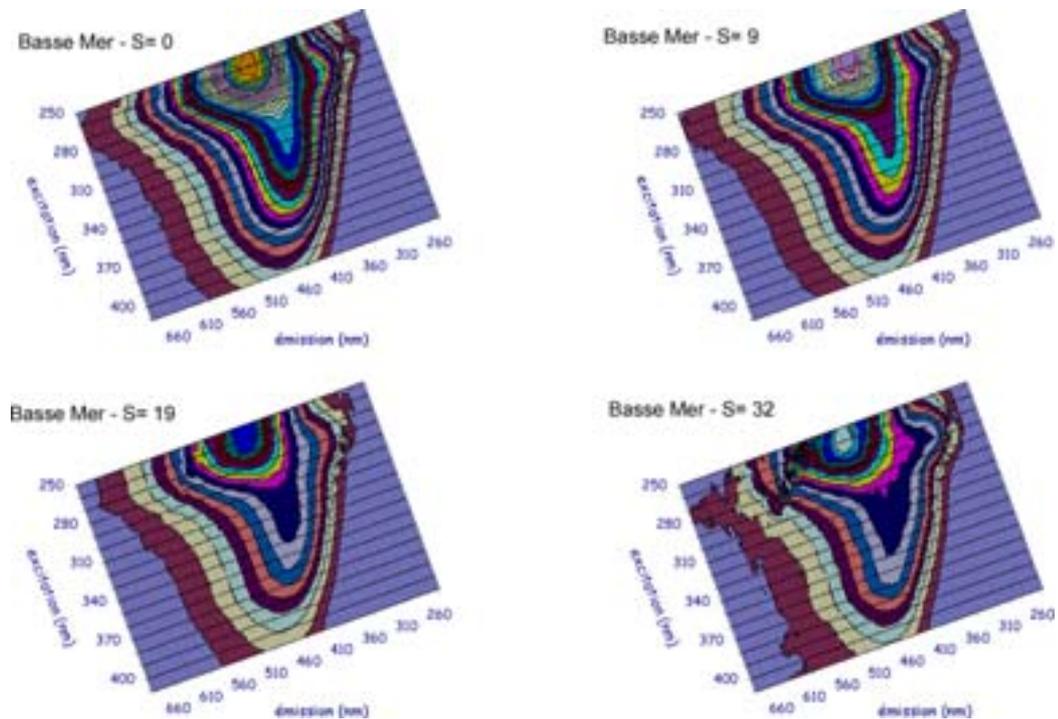


Figure 3-12. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes (Seine, Nuts 01, août 2001).

On peut d'ailleurs observer encore mieux cette différence sur la figure 3-13 qui montre que les spectres d'émission à 310 nm des échantillons de pleine et basse mer sont parfaitement superposés pour une salinité nulle alors que pour des salinités au-delà de 30, le

décalage dû à la présence de fluorophores de type β est très net. Ce décalage est d'autant plus marqué pour l'échantillon de pleine mer.

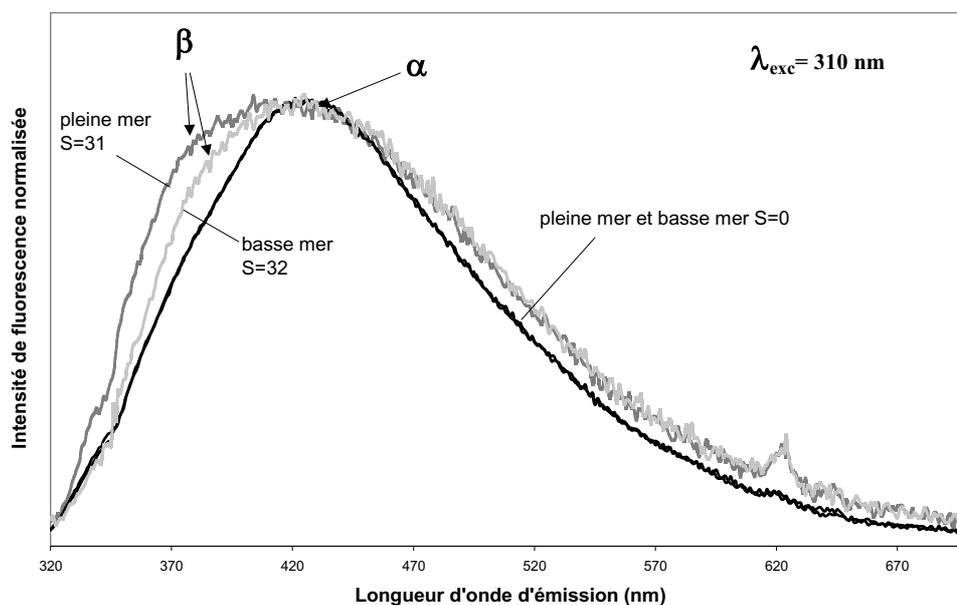


Figure 3-13. Spectres d'émission normalisés (excitation 310 nm) des échantillons de salinité 0 et de salinité 31 et 32 prélevés lors des gradients de Pleine Mer et de Basse Mer respectivement (Seine, Nuts 01, août 2001).

En effet, Coble et al. (1990) ont attribué une origine marine au fluorophore β et plusieurs études postérieures ont lié sa présence à une activité biologique dans des environnements marins côtiers (De Souza Sierra, 1994 ; Parlanti et al., 2000a). Ceci s'accorde donc bien avec les résultats présentés ici qui montrent une présence plus marquée de ce type de composés lors du gradient de Pleine Mer, c'est à dire lorsque la pénétration et donc l'influence de la masse d'eau marine dans l'estuaire est maximale. D'autre part, on remarque sur le spectre de l'échantillon de salinité 31 du gradient de Pleine Mer (fig. 3-12) la présence d'une bande atypique pour une excitation à 280 nm et qui émet à 365 nm environ. En effet, cette bande est différente du type de bande γ ou δ que l'on observe généralement pour cette même longueur d'onde d'excitation mais généralement à des longueurs d'onde d'émission plus courtes (300-350nm). D'autre part, cette bande est totalement absente du spectre de l'échantillon de salinité 32 du gradient de Basse Mer (figure 3-11). Il est difficile de conclure quant à la nature des composés à l'origine de cette bande. Il serait cependant vraisemblable qu'il s'agisse d'un type de composés d'origine marine ayant été amené par la marée et probablement résultant de l'activité biologique dans ce milieu. En effet, cette bande ne correspond pas à la fluorescence de composés d'origine humique aquatique que l'on peut trouver dans la littérature et il semble peu probable qu'il s'agisse d'une pollution par un composé chimique particulier comme cela sera confirmé dans le paragraphe suivant. D'autre part, le domaine spectral dans lequel ces composés fluorescent est relativement proche de

celui des composés protéiques de type δ et γ ainsi que de la bande β et ils pourraient alors correspondre à des composés produits par l'exsudation de macro algues qui peut donner lieu à ce type de fluorescence (Parlanti et al., 2000a). Une autre tendance qui peut être observée sur les figures 3-11 et 3-12 est l'évolution de la position du maximum de fluorescence α avec la salinité. En effet, lorsque la salinité augmente, on remarque un décalage du maximum α vers les plus grandes longueurs d'onde d'émission lorsque la longueur d'onde d'excitation augmente. Ceci est plus net sur la figure 3-14 qui présente le spectre d'émission à 370nm des deux échantillons de salinités limites (0 et 32).

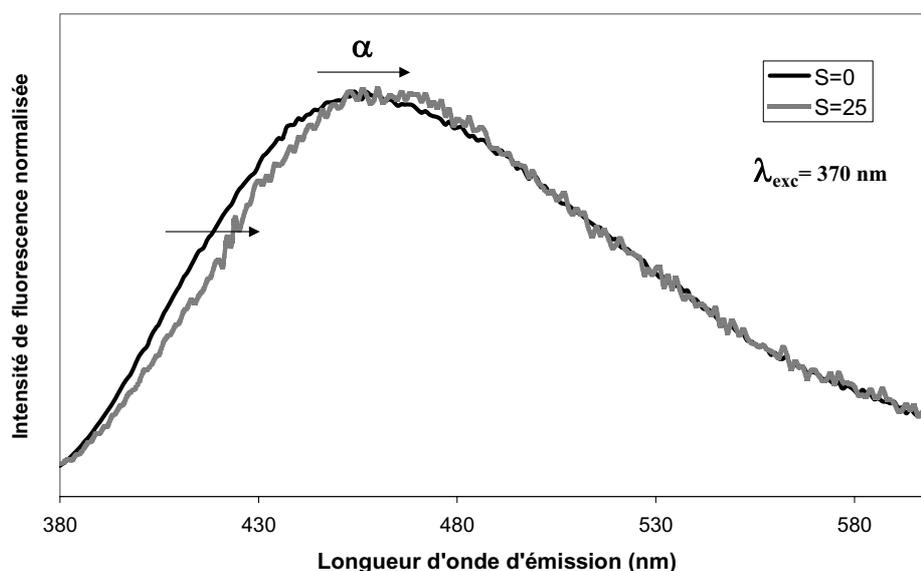


Figure 3-14. Spectres d'émission normalisés (excitation 370 nm) des échantillons de salinité 0 et 32 prélevés lors du gradient de basse mer (Seine, Nuts 01, août 2001).

Ce décalage bathochrome (vers le rouge, $\Delta\lambda = 8$ nm) est tout à fait caractéristique des spectres d'échantillons de fortes salinités et il était déjà observable sur les spectres de salinité élevée des missions de janvier et d'avril même si nous ne l'avons pas signalé. Tous les échantillons de très fortes salinités que nous avons traités au cours de cette étude montrent ce décalage et il a également été noté par de nombreux auteurs (Coble, 1996 ; De Souza Sierra et al., 1994) sans qu'on lui ait attribué une origine précise. En effet, plusieurs hypothèses peuvent être émises. Il peut s'agir tout d'abord d'un effet induit par la floculation des composés humiques de hautes masses moléculaires lorsque la salinité augmente (McCarthy et al., 1996) puisqu'une augmentation de la taille moléculaire entraîne un tel décalage (Berger, 1984 ; Alberts et al., 2002). Il peut également s'agir d'un effet lié à la modification de structure des composés humiques sous l'effet des variations de pH et de force ionique durant le transit estuarien. Enfin, les expériences de Parlanti et al. (2000a) ont conduit à l'observation d'un maximum de fluorescence légèrement décalé vers le rouge par rapport aux maxima de

type α généralement observés. Ainsi le décalage observé sur les échantillons fortement salés pourrait également provenir du recouvrement de la bande humique α avec un autre type de fluorophore lié à une activité biologique autochtone, soit spécifique du milieu marin, ou bien trop peu intense vis à vis de la fluorescence des substances humiques pour être observable dans les eaux continentales. La figure 3-15 montre l'intensité des différentes bandes de fluorescence en fonction de la salinité pour les deux profils considérés. On peut noter la linéarité de la décroissance de l'intensité de fluorescence résultant de la dilution du matériel organique fluvial dans les eaux marines.

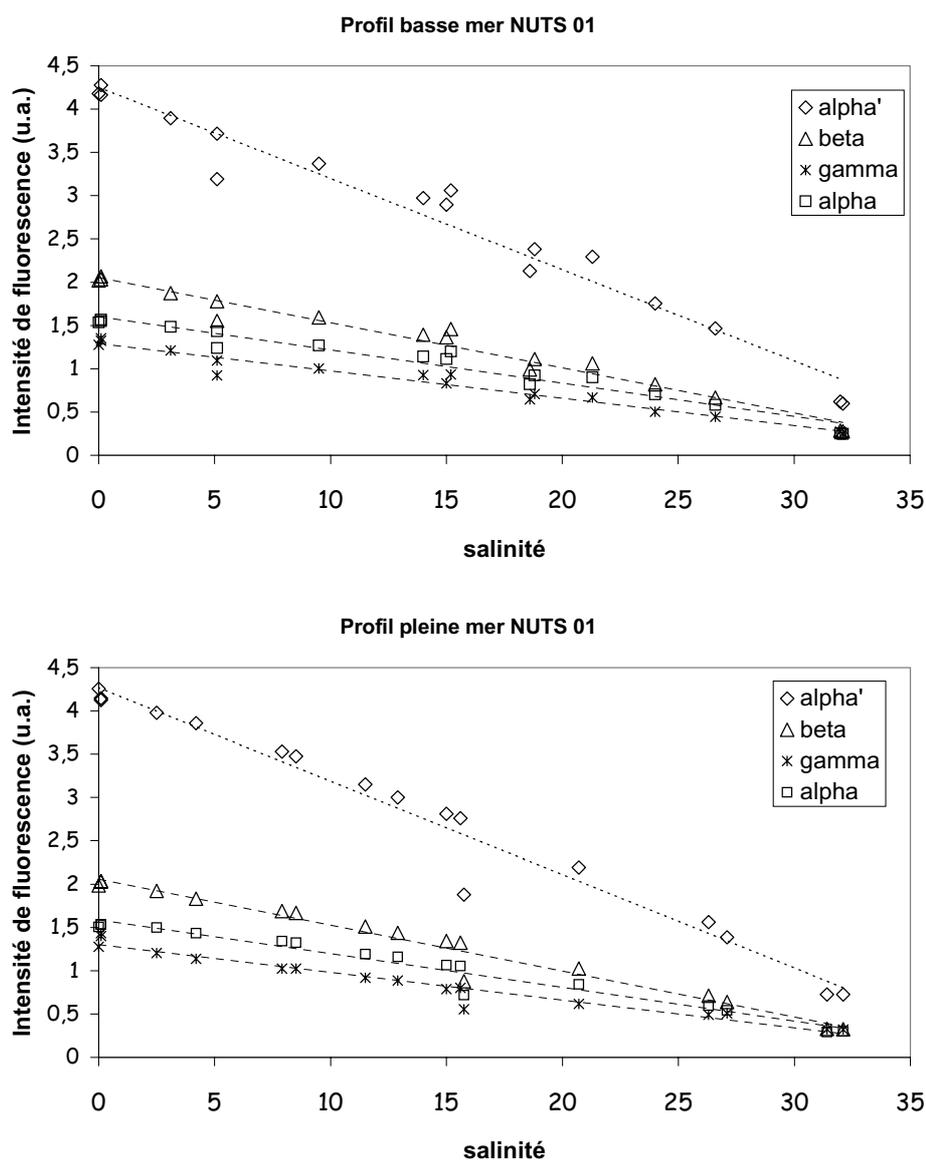


Figure 3-15. Intensité de fluorescence en fonction de la salinité pour les gradients de basse mer (en haut) et de pleine mer (en bas). (Seine, Nuts 01, août 2001).

Lors de ces transects, certains prélèvements ont été échantillonnés au fond de la colonne d'eau afin d'observer des différences de distribution verticale de la MOD

fluorescente et donc, si l'on distingue les échantillons prélevés en surface de ceux prélevés au fond (fig. 3-16 et 3-17), on peut remarquer que l'intensité de fluorescence est relativement bien corrélée avec le COD pour les échantillons de surface, tandis que les échantillons de fond qui sont caractérisés par des teneurs en COD plus importantes ne montrent aucune corrélation.

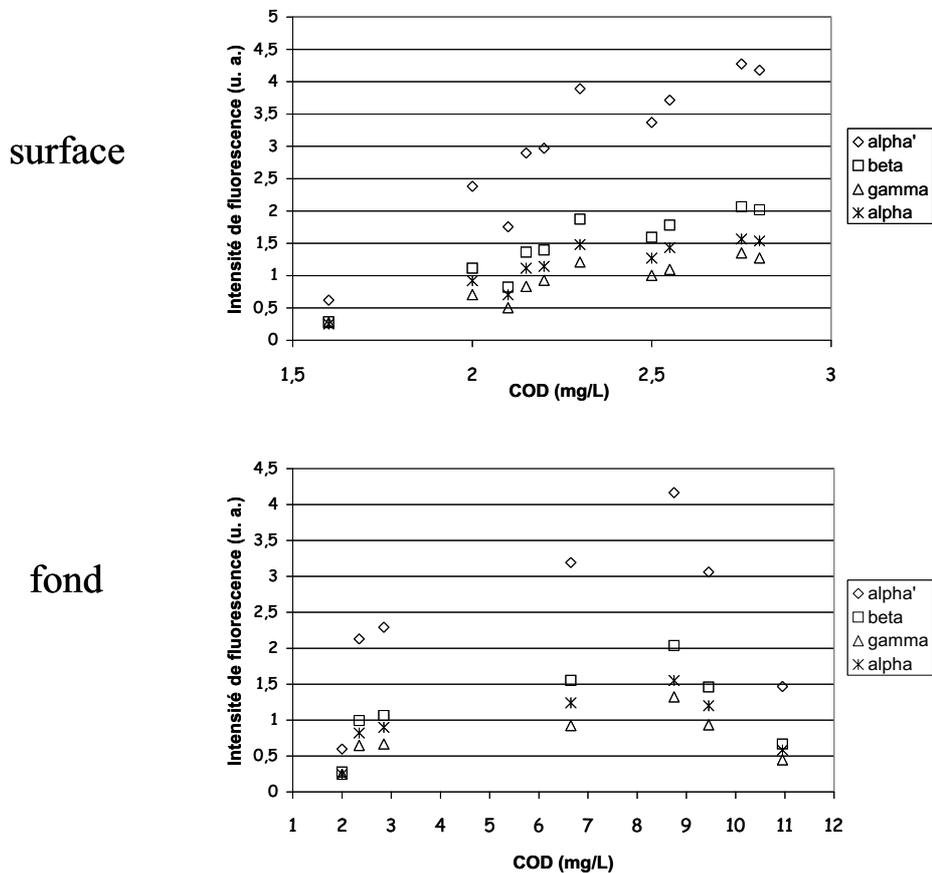


Figure 3-16. Intensités de fluorescence en fonction de la teneur en COD dans les échantillons de surface (en haut) et de fond (en bas) pour le gradient de basse mer (Seine, Nuts 01, août 2001).

Il semble donc que certains échantillons soient caractérisés par une fraction plus importante de carbone organique dissous non fluorescent. Il est fortement possible que cette non-corrélation soit attribuable à la remise en suspension du sédiment par les courants de marées. Lors de cette remise en suspension, il est possible que du matériel organique dissous soit libéré dans la colonne d'eau augmentant ainsi la teneur globale en COD. Ce matériel serait alors de nature différente de celui initialement présent dans la colonne d'eau puisqu'il présenterait une plus faible proportion de composés fluorescents. Cependant, de grandes incertitudes pèsent sur ces quelques valeurs de COD élevées (des valeurs anormales ont été obtenues pour certains échantillons marins dont nous n'avons pas tenu compte ici) et dont nous n'excluons pas qu'elles aient subi une contamination lors du conditionnement ou de

l'analyse, d'autant plus que seules des valeurs de surface ont pu être corroborées par les analyses de Pierre Servais (Université Libre de Bruxelles) sur certains de ces prélèvements.

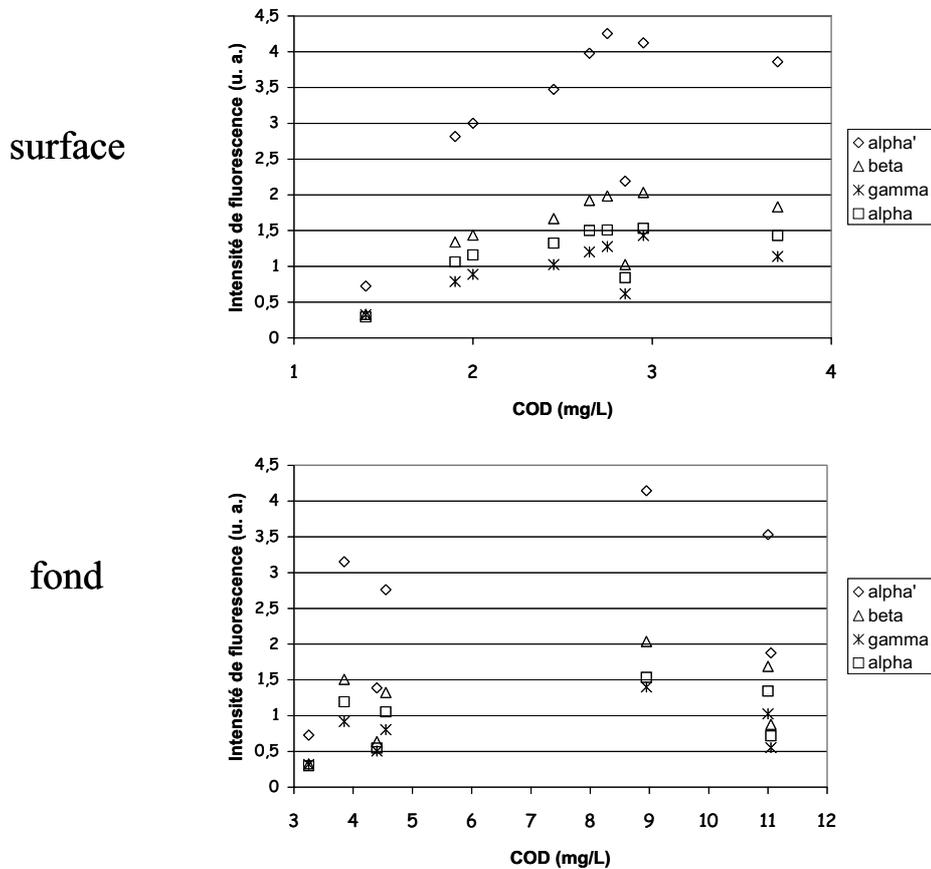


Figure 3-17. Intensités de fluorescence en fonction de la teneur en COD dans les échantillons de surface (en haut) et de fond (en bas) pour le gradient de pleine mer (Seine, Nuts 01, août 2001).

Si l'on s'intéresse aux rapports d'intensité des différentes bandes de fluorescence (fig. 3-18 et 3-19) on remarque peu de différences flagrantes entre les deux situations Pleine Mer et Basse Mer. On peut noter la diminution des rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ et I_{β}/I_{α} , tandis que le rapport I_{γ}/I_{α} augmente au delà de la salinité 25, cette augmentation étant plus importante pour le profil de Pleine Mer ce qui souligne l'influence du matériel organique d'origine marine sur l'évolution de ce paramètre. On peut donc supposer que la masse d'eau marine entrant dans l'estuaire lors de la marée introduise des composés de type protéique et/ou dérivant de l'activité biologique en Baie de Seine dans l'estuaire. De plus, l'absence de signal concernant des composés issus de l'activité biologique autochtone dans la partie fluviale sur les spectres de faible salinité peut indiquer deux phénomènes qui peuvent être distincts ou concomitants. Soit ces composés sont présents mais leur fluorescence est totalement masquée par le signal très intense des composés réfractaires humiques dans la partie fluviale, soit, comme ils présentent un caractère

fortement labile, ils sont dégradés dans l'estuaire amont et en particulier dans le bouchon vaseux qui est apparu aux faibles salinités lors du gradient de Basse Mer. Cependant, aucun effet majeur dû à la présence du bouchon vaseux n'a pu être mis en évidence sur l'évolution de la fluorescence de la MOD lors de ces deux transects puisque les résultats obtenus lors des gradients de Pleine Mer et de Basse Mer sont relativement semblables.

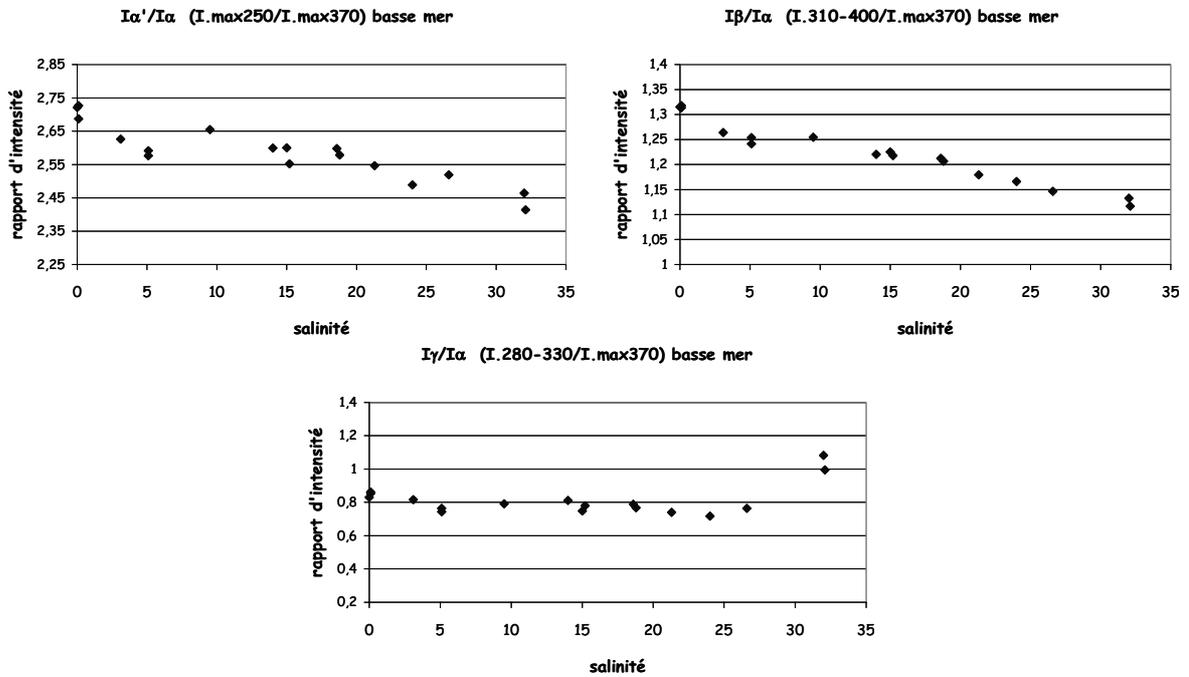


Figure 3-18. Rapports d'intensités de fluorescence des différentes bandes ($I\alpha'/I\alpha$, $I\beta/I\alpha$, et $I\gamma/I\alpha$) en fonction de la salinité pour le gradient Basse Mer (Seine, Nuts 01, août 2001).

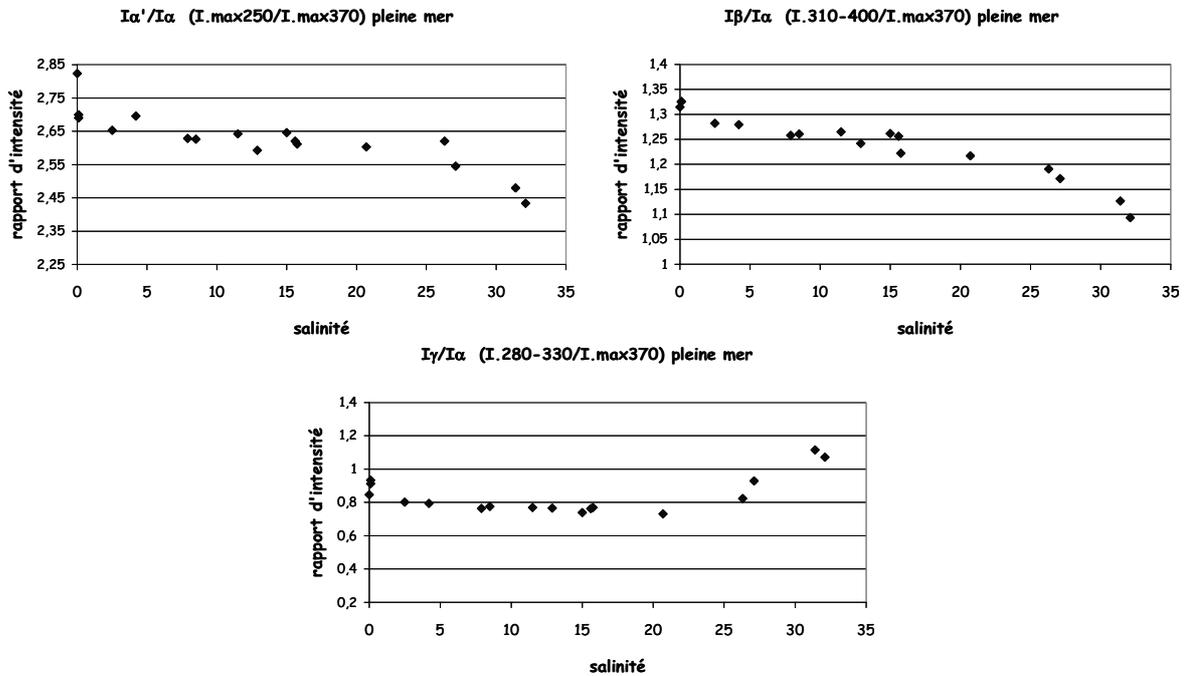


Figure 3-19. Rapports d'intensités de fluorescence des différentes bandes ($I\alpha'/I\alpha$, $I\beta/I\alpha$, et $I\gamma/I\alpha$) en fonction de la salinité pour le gradient Pleine Mer (Seine, Nuts 01, août 2001).

1-1-4 Mission de Septembre 2002 (NUTS 02)

Durant la mission NUTS 02 de septembre 2002, un seul gradient de salinité a été effectué en partant de l'étale de Pleine Mer (PK 370, S=32) et le bouchon vaseux n'était pas présent lors de ces prélèvements puisque les teneurs en MES mesurées n'ont pas dépassées les 30 mg/l. Il est fort probable que le bouchon vaseux avait alors totalement sédimenté au fond durant l'étale (Texier et al., 1993) comme c'était le cas lors du gradient de Pleine Mer de la mission Nuts 1 en août 2001.

Les spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés le long du gradient de salinité lors de cette mission sont présentés sur la figure 3-20. Les projections des spectres pour les échantillons de salinités S = 0, 11 et 22 sont à la même échelle, tandis que pour la salinité S = 32 qui présentait une intensité moindre, l'échelle a été ramenée à une valeur appropriée et identique à celles des échantillons de salinité S = 31 et 32 de la mission Nuts 1 d'août 2001 (fig. 3-11 et 3-12, page 70).

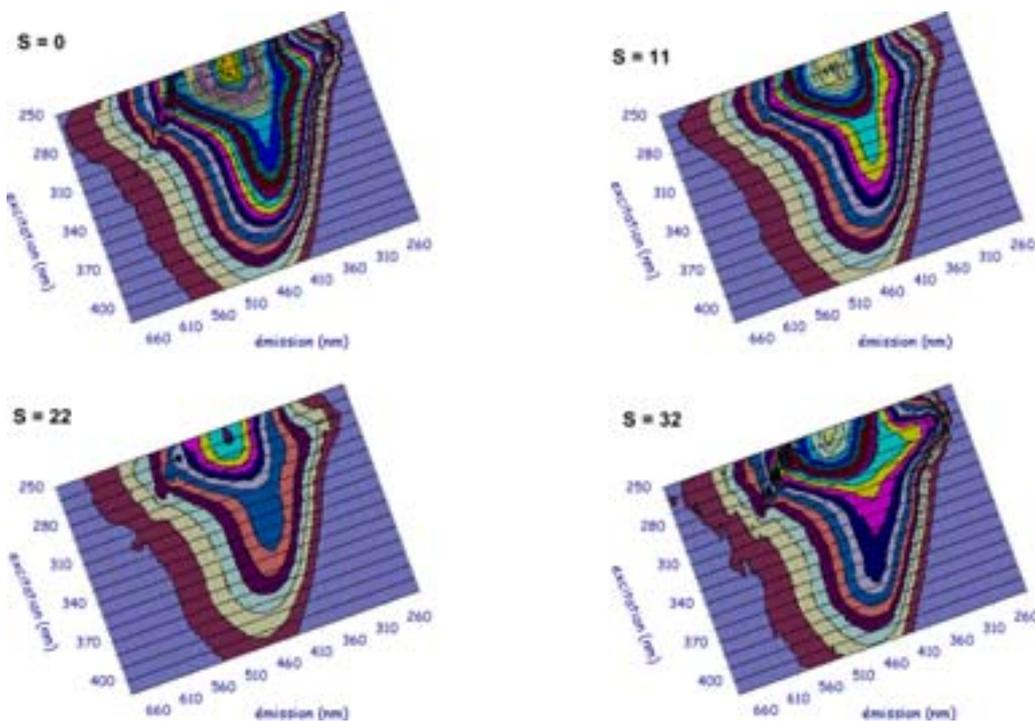


Figure 3-20. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes (Seine, Nuts 02, septembre 2002).

Encore une fois on remarque bien la dilution du matériel organique le long du gradient de salinité puisque l'intensité de fluorescence diminue avec l'augmentation de la salinité. On remarque également l'élargissement du spectre aux fortes salinités pour une excitation de 310

nm et une émission de l'ordre de 400-410 nm. Il s'agit à nouveau de l'apparition d'un épaulement dû à la présence de composés donnant lieu à une fluorescence de type β .

En ce qui concerne le spectre de salinité 32 on peut noter l'apparition d'une petite bande bien définie émettant à une courte longueur d'onde (305 nm) pour une excitation à 270 nm traduisant la présence de composés de type protéiques (type tyrosine) qui fluorescent au sein de cette bande de fluorescence γ .

On peut également noter l'élargissement du spectre par un épaulement pour une excitation à 280 nm dans la région d'émission correspondant à 360-380 nm. Cet épaulement correspond exactement à la bande atypique observée lors du gradient de Pleine Mer durant la mission d'Août 2001 et décrite dans le paragraphe précédent. On peut définitivement éliminer l'hypothèse d'une pollution spécifique de l'échantillon par un composé fluorescent. Cette observation semble indiquer qu'il s'agit bien d'un type de composés organiques particuliers et spécifiques de la partie aval extrême de l'estuaire de la Seine puisque cette bande a été observée à la même période de l'année (Août 2001 et Septembre 2002) pour des échantillons de salinité de l'ordre de 32.

Les travaux de Parlanti et al. (2000a) avaient consisté à effectuer le suivi de dégradation de macro-algues et de comparer les signaux de fluorescence obtenus avec ceux d'échantillons provenant de la Baie de la Fresnaye qui est une zone caractérisée par une forte eutrophisation. Au cours de ces expériences de dégradation, des signaux relativement proches avaient été obtenus durant des stades intermédiaires de la dégradation du matériel algal. Il serait donc possible que cette bande qui émet un signal de fluorescence pour un couple d'excitation/émission 280nm/365nm puisse être interprété comme résultant du signal de composés provenant de la dégradation de matériel algal ou phytoplanctonique et intermédiaires entre des composés de type protéiques (γ et δ) et des composés de type β .

La figure 3-21 montre que l'intensité de fluorescence des différentes bandes suit bien une tendance linéaire de décroissance avec la salinité montrant la dilution du matériel organique.

Par contre, encore une fois, aucune corrélation n'apparaît entre le COD et l'intensité de fluorescence (figure 3-22) indiquant à nouveau que la teneur en carbone organique dissous ne permet pas de rendre compte des modifications moléculaires du matériel organique de façon aussi précise que la fluorescence et ne suffit pas à elle seule à rendre compte du comportement de la matière organique dissoute.

En ce qui concerne les rapports d'intensité des différentes bandes (figures 3-23), les rapports $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ et I_{β}/I_{α} présentent une diminution générale qui devient plus marquée à partir

de la salinité 25 tandis que dans le même temps le rapport I_{γ}/I_{α} est relativement stable durant le gradient avant d'augmenter fortement à partir de cette même salinité 25.

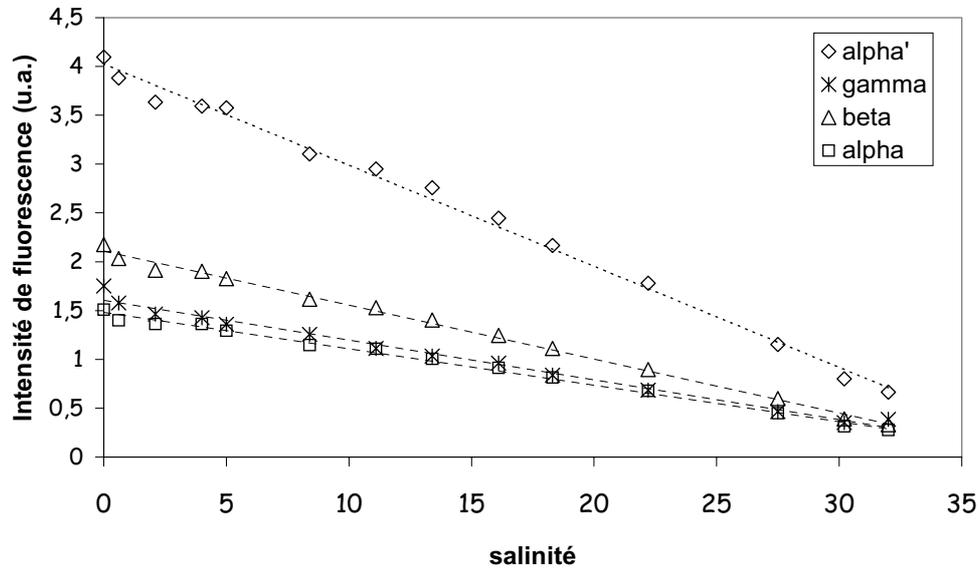


Figure 3-21. Intensité de fluorescence en fonction de la salinité (Seine, Nuts 02, septembre 2002).

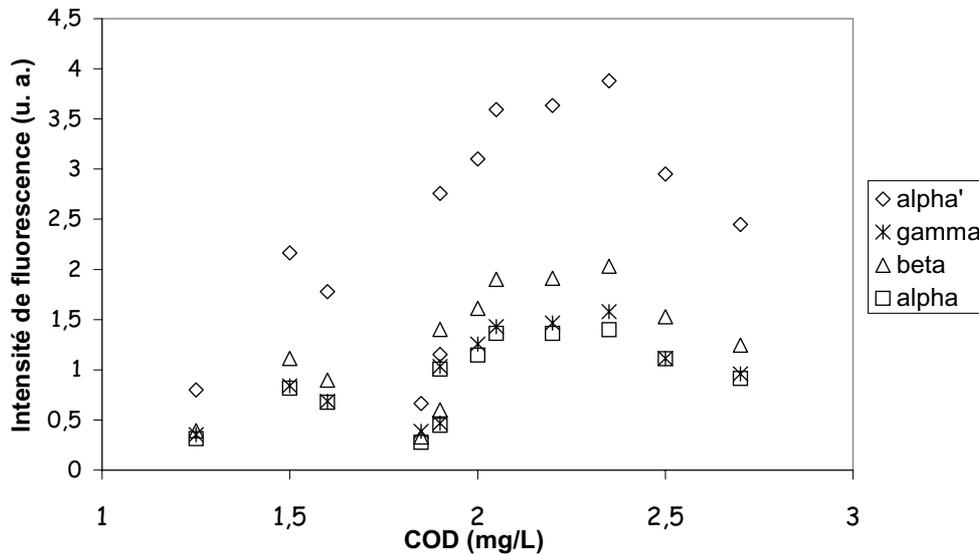


Figure 3-22. Intensité de fluorescence en fonction de la teneur en COD (Seine, Nuts 02, septembre 2002).

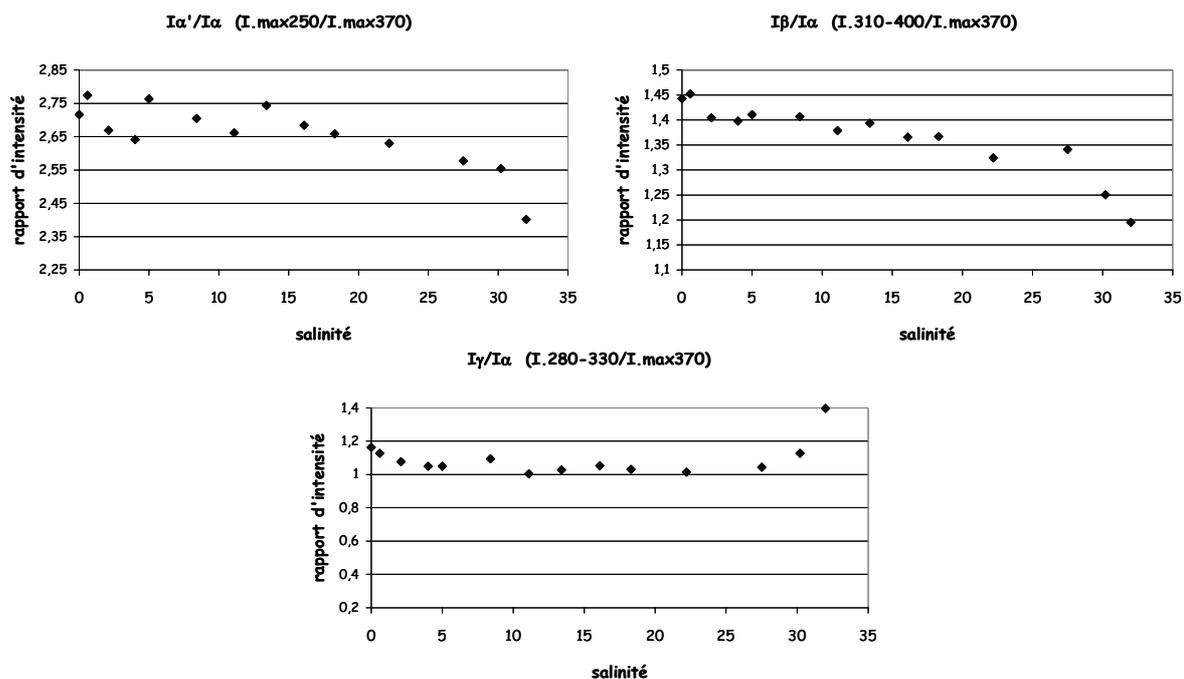


Figure 3-23. Rapport d'intensité de fluorescence des différentes bandes ($I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , et I_{γ}/I_{α}) en fonction de la salinité (Seine, Nuts 02, septembre 2002).

1-2- Variations saisonnières des paramètres de fluorescence dans l'estuaire aval.

Dans ce paragraphe nous avons regroupé les résultats des différentes missions présentées dans le paragraphe précédent afin d'observer les variations saisonnières de la matière organique dissoute fluorescente. La figure 3-24 présente les variations en fonction de la salinité des intensités de fluorescence des quatre bandes principales (α , α' , β , γ) que nous avons considérées dans ce travail pour chacune des périodes étudiées : l'hiver (janvier 2001), le printemps (Avril-Mai 2001), et l'été (Août 2001 et septembre 2002). En ce qui concerne tout d'abord les bandes α et α' attribuées aux substances humiques, on remarque que les variations en fonction de la salinité sont quasiment identiques. L'intensité de fluorescence est maximale en hiver, ce qui caractérise une concentration plus importante due à des apports continentaux plus importants durant cette période en raison des crues hivernales.

Ensuite, l'intensité, donc la concentration en substances humiques est plus faible en avril 2001. Durant la période d'été, l'intensité des bandes α et α' est encore plus faible mais légèrement plus importante en août 2001 qu'en septembre 2002. En effet, l'année 2001 a été une année exceptionnelle du point de vue climatique et marquée par des précipitations importantes entraînant des périodes de crues intenses et même des débits liquides importants durant l'été 2001 par rapport à l'été 2002 qui était réellement une période d'étiage.

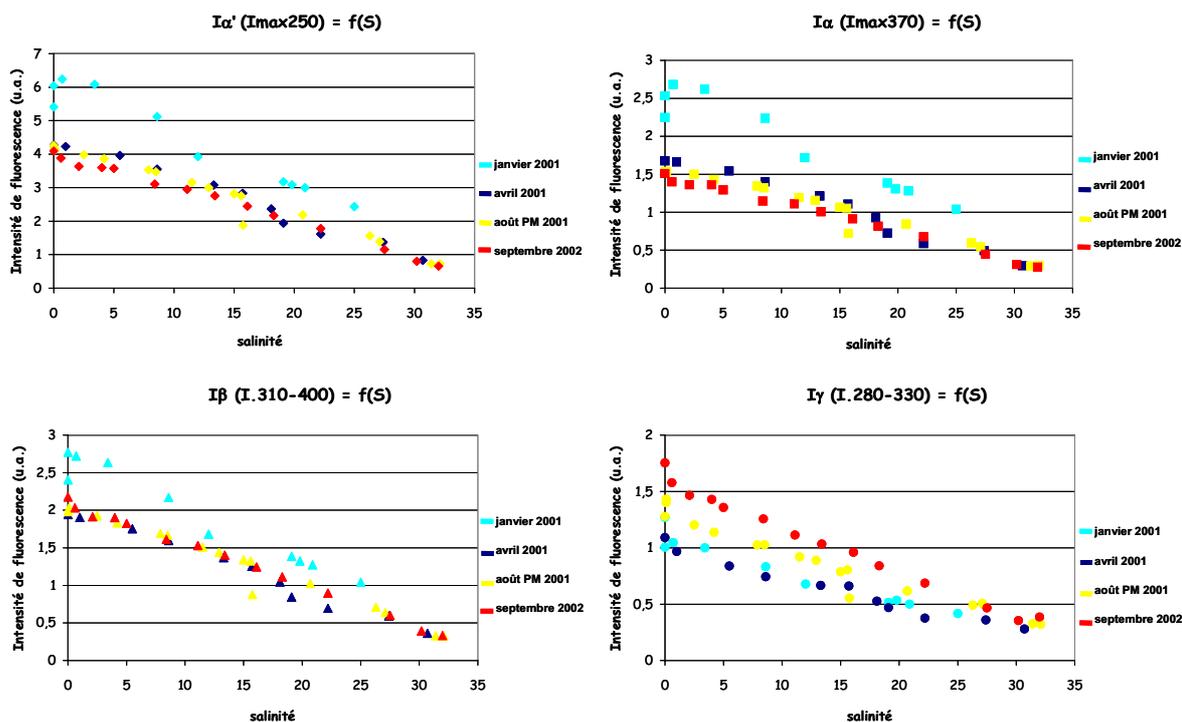


Figure 3-24. Intensité de fluorescence des différentes bandes (α , α' , β , γ) en fonction de la salinité aux différentes saisons étudiées sur l'estuaire de la Seine.

Si l'on s'intéresse maintenant à la bande β , on remarque qu'elle suit également la même tendance que les bandes α et α' et comme nous l'avons déjà expliqué dans le paragraphe précédent, cette bande β a pu être observé uniquement sous la forme d'un épaulement pour les échantillons de salinité élevée. Pour des salinités plus faibles la présence de cette bande est masquée par le signal de fluorescence très intense des substances humiques.

La bande γ qui est relative aux composés de type protéique présente un comportement différent. Son intensité de fluorescence est minimale en hiver et en avril tandis qu'elle est maximale en été, période où la dégradation de la matière organique est plus intense et donc propice à la production de ce type de fluorophore.

L'observation des rapports d'intensités des différentes bandes de fluorescence ($I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α}) permet de mettre en évidence une évolution qualitative saisonnière de la matière organique dissoute (fig. 3-25).

Tout d'abord, tous les rapports d'intensités sont plus faibles en hiver que durant les autres périodes de l'année. Ceci traduit une prédominance du fluorophore α en période hivernale qui s'accorde bien avec une présence plus marquée de substances humiques provenant du lessivage des sols plus important en cette saison.

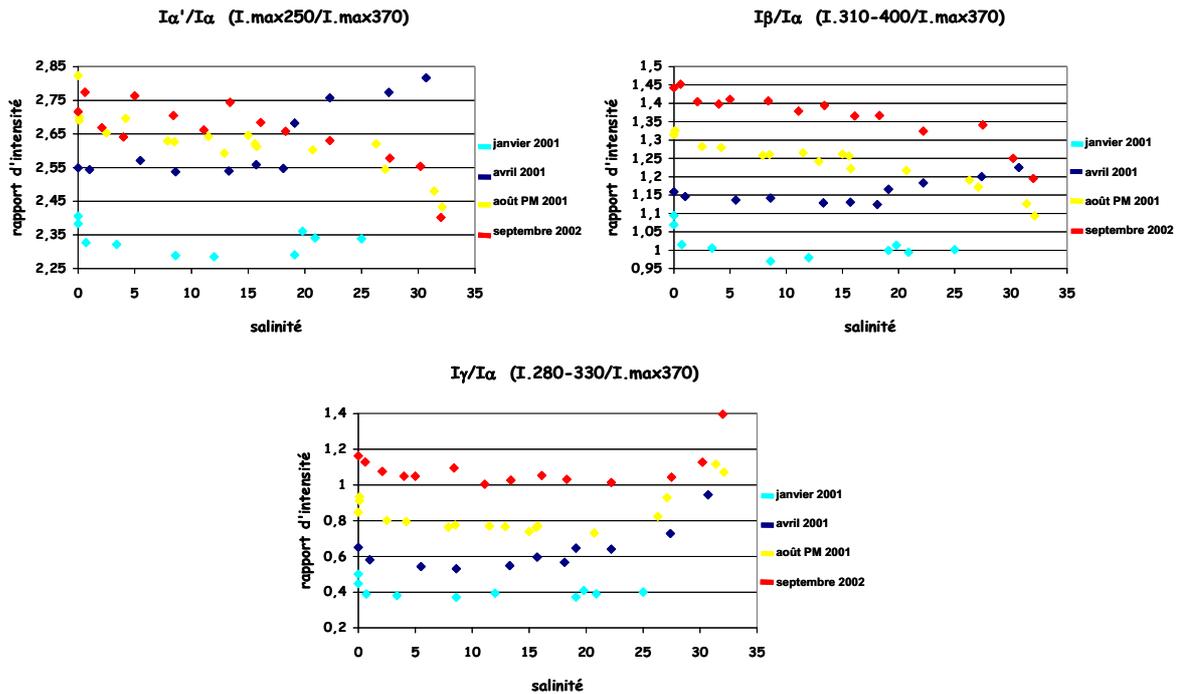


Figure 3-25. Rappports d'intensités de fluorescence entre les différentes bandes ($I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α}) en fonction de la salinité aux différentes saisons étudiées sur l'estuaire de la Seine

D'autre part les valeurs des trois rapports considérés sont relativement constantes durant l'hiver ce qui montre qu'il ne se produit pas de modification qualitative particulière de la MOD en cette période. Cependant, il faut noter qu'aucun échantillon de salinité supérieure à 25 n'a été prélevé lors de cette mission hivernale et il est donc difficile de conclure pour la partie aval extrême de l'estuaire.

En ce qui concerne les autres saisons, des variations particulièrement intéressantes peuvent être observées.

On peut tout d'abord noter que le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ varie en fonction de la salinité. En effet, il est généralement difficile de dissocier les fluorophores α et α' qui sont simultanément présents sur les spectres des échantillons naturels d'autant plus que l'évolution de leurs intensités respectives le long de l'estuaire semble relativement identique (fig. 3-24). Or, le fait que le rapport d'intensité de ces deux fluorophores varie indique qu'il y a soit une augmentation soit une diminution de la concentration d'un de ces fluorophores par rapport à l'autre en fonction de la salinité. Ceci prouve que ces deux fluorophores sont distincts et que leur présence au sein du matériel organique macromoléculaire est influencée par les conditions environnementales.

L'évolution du rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ est différente entre le printemps (mission d'avril 2001) et l'été (missions d'août 2001 et septembre 2002). Pour la période d'avril, le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ est relativement constant jusqu'à la salinité 18 à partir de laquelle il se produit une

forte augmentation. Au contraire, durant la période estivale, le rapport diminue sensiblement jusqu'à la salinité 25 après laquelle il décroît fortement et ceci pour les deux missions effectuées. Le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ peut s'apparenter à un indice d'humification qui donnent une idée de la maturation de la matière organique dissoute. En effet le fluorophore α' a parfois été décrit comme relatif à de la MOD plus récente que celle caractérisée par une prédominance du fluorophore α (Mounier et al., 1999). Dans ce cas, l'évolution du rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ peut provenir de la modification du matériel humique présent dans les eaux de la Seine au cours des saisons. Au printemps, la partie aval de l'estuaire est caractérisée par la production de matériel biologique au travers de l'activité phytoplanctonique qui produit du matériel organique dissous susceptible de conduire au travers des processus d'humification à des composés humiques présentant alors une prédominance du fluorophore α' . En été, ce matériel humique peut présenter un état de maturation plus avancé en raison de phénomènes de dégradation plus intenses (luminosité et bouchon vaseux) qui impliquent une plus grande influence du fluorophore α .

Si l'on considère maintenant le rapport I_{β}/I_{α} , on peut remarquer que sa tendance est identique à $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$. Ceci est principalement dû au fait que l'épaule caractéristique β n'a été observé que pour les salinités supérieures à 30 tandis que pour des salinités inférieures son intensité propre est indiscernable du massif fluorescent humique. Par contre, les valeurs du rapport I_{β}/I_{α} de septembre 2002 sont plus élevées que celles d'août 2001. Ceci peut à nouveau s'expliquer par les caractéristiques climatiques particulières de l'année 2001.

Le même constat s'applique en ce qui concerne le rapport I_{γ}/I_{α} qui présente des valeurs croissantes de l'hiver jusqu'à l'été et plus précisément en septembre 2002. La tendance de ce rapport en fonction de la salinité est différente des deux autres puisqu'il subit une forte augmentation au printemps et en été à partir de la salinité 25 alors que pour des salinités inférieures sa valeur est relativement constante.

A partir du printemps, l'activité biologique devient relativement intense en raison de blooms phytoplanctoniques dans la partie aval de l'estuaire et contribue à la formation de matériel organique récemment dégradé caractérisé par la fluorescence de type γ . Cette activité se poursuit également durant tout l'été où la composante γ devient encore plus prépondérante en raison encore une fois de phénomènes de dégradation plus intenses.

La figure 3-26 montre les variations de la teneur en carbone organique dissous pour les différentes saisons considérées. Comme nous l'avons déjà précisé, les valeurs anormalement

élevées obtenues au mois d'avril 2001 sont sujettes à caution et nous n'en tiendrons donc pas compte ici.

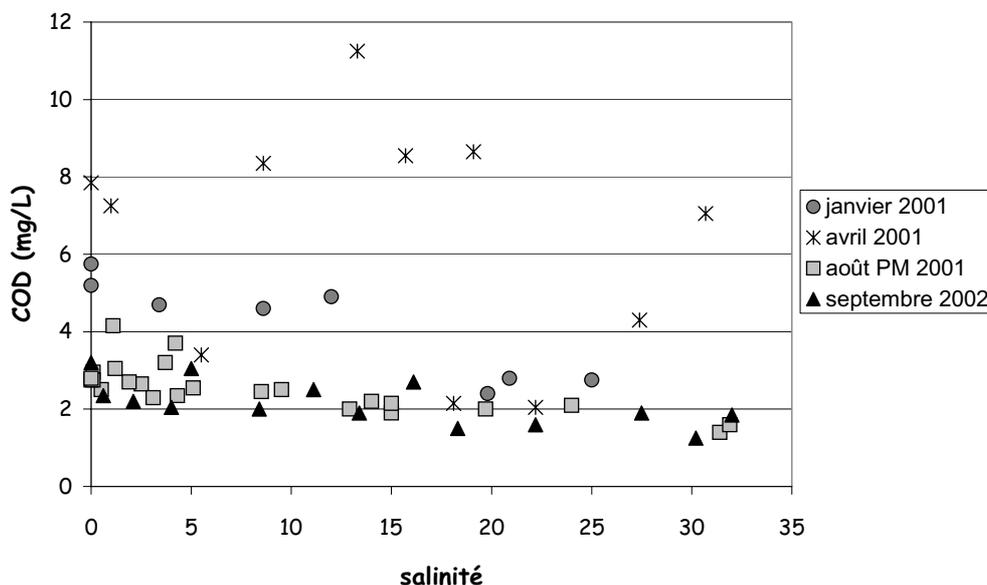


Figure 3-26. Teneur en carbone organique dissous (COD) en fonction de la salinité pour les différentes saisons étudiées sur l'estuaire de la Seine

On remarque que la teneur en COD est plus importante durant la saison hivernale qui est caractérisée par un lessivage des sols important et donc des apports massifs de matière organique dissoute d'origine terrigène. Ceci est en accord avec les intensités plus importantes observées pour les bandes de fluorescence α et α' relatives aux substances humiques durant l'hiver (figure 3-24). Les valeurs de COD sont relativement semblables entre les deux périodes d'été considérées (Août 2001 et Septembre 2002).

Il est également intéressant de noter que si la tendance globale de la teneur en COD est la diminution le long du gradient de salinité, cette diminution n'est que grossièrement linéaire et il est difficile de conclure quant aux variations observées qui peuvent être significatives d'apports ponctuels ou de déplétions. Ceci montre encore une fois l'insuffisance de la seule mesure de la teneur en carbone organique dissous pour décrire le comportement et les modifications du stock de matière organique dissoute comme en témoignent les variations des intensités de fluorescence des différents fluorophores caractéristiques de la MOD.

1-3- Variations saisonnières du signal de fluorescence dans l'estuaire amont

Les différentes missions présentées dans les deux paragraphes précédents concernaient l'étude de la matière organique dissoute dans l'estuaire de la Seine en fonction de la salinité.

Cependant, l'influence de la salinité dans l'estuaire ne se propage que jusqu'aux environs de Caudebec (fig. 3-27) qui a été pour toutes ces missions précédentes le point « amont » de référence (salinité 0). Ainsi, afin de connaître et d'observer les caractéristiques spectroscopiques de la MOD qui entre dans le système estuarien et dont l'origine est terrestre ou fluviale sans aucune influence marine, nous avons pu bénéficier de prélèvements réalisés par Mr. André Ficht de la Cellule Antipollution du Service de Navigation de la Seine (SNS) de Rouen.

Les résultats présentés ici concernent la période de mars 2002 à décembre 2002. Les prélèvements ont été réalisés mensuellement à raison de 8 à 25 échantillons par mois (tableau 3-1) et ceci sur toute la zone fluviale de l'estuaire présenté sur la figure 3-27, c'est à dire de la limite amont de l'influence de la marée dynamique (le barrage de Poses) jusqu'à l'entrée de l'estuaire (Honfleur). La liste des points de prélèvements est donnée dans le tableau 3-2.

Chacun de ces échantillons filtrés a été analysé par spectrofluorimétrie 3D et chaque spectre obtenu a été dépouillé afin d'obtenir l'intensité de fluorescence des différentes bandes caractéristiques α' , α , β et γ . Ceci est représenté schématiquement sur la figure 3-28 qui représente l'estuaire de la Seine et les divers points de prélèvements pour lesquels les intensités des différentes bandes de fluorescence sont obtenues à partir des spectres 3D pour la série de prélèvements effectués en mai 2002.

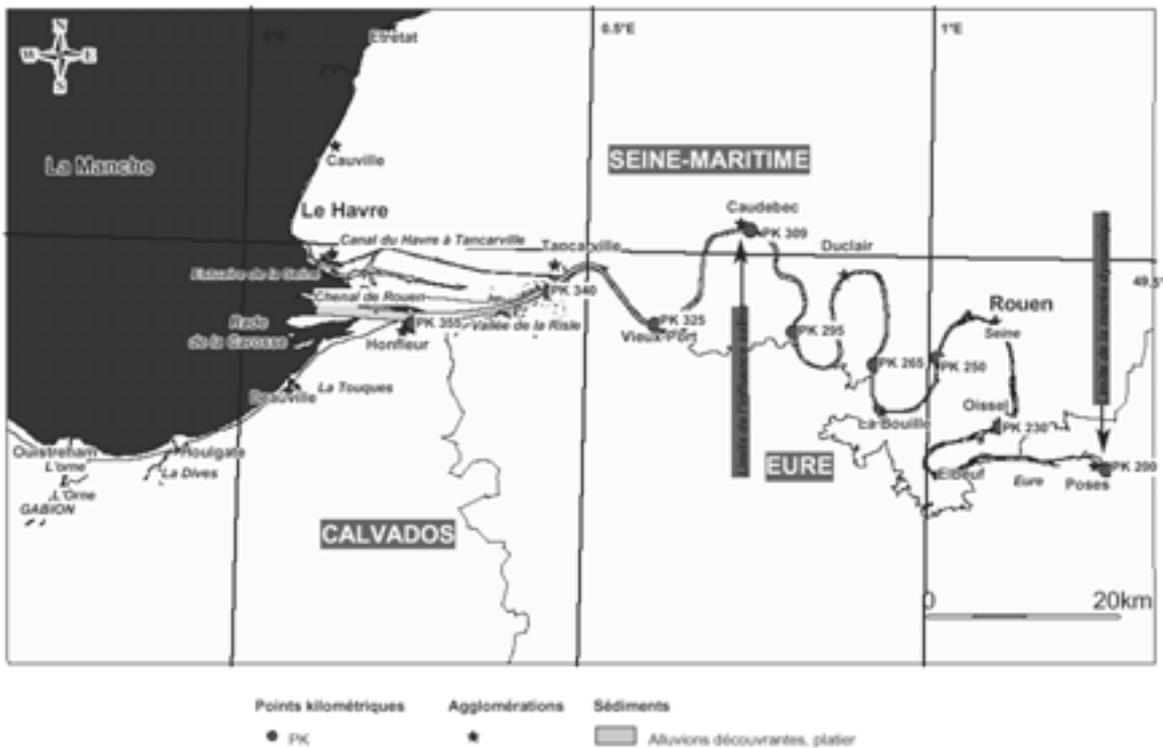


Figure 3-27. Carte de l'estuaire de la Seine.

Prélèvements 2002	Suivi 3 stations Honfleur, La Bouille, Poses	Suivi 5 stations Honfleur, Tancarville, Caudebec, La Bouille, Poses	Suivi complet 22 stations
Mai			20/03/2002
Avril	03/04/2002	17/04/2002	
Mai	02 et 29/05/2002		15/05/2002
Juin	26/06/2002	12/06/2002	
Juillet	24/07/2002		11/07/2002
Août		21/08/2002	
Septembre	04/09/2002		25/09/2002
Octobre	09/10/2002	23/10/2002	
Novembre	06/11/2002		25/11/2002
Décembre		12/12/2002	

Tableau 3-1. Liste des missions de prélèvement de la Cellule Antipollution de Rouen pour l'année 2002.

n°	stations	pk
1	Honfleur	355,8
2	Berville	346
3	Tancarville	337
4	Courval	326
5	Vatteville	318
6	Caudebec	310,5
7	La Mailleraye	303
8	Heurteauville	397,6
9	Mesnil/Jumièges	286
10	Duclair	278
11	Val des Leux	265,5
12	La Bouille	259,5
13	Grand Couronne	255,5
14	Bassin des Docks	251,5
15	Croisset	246,5
16	Rouen Port	243
17	Oissel	229,5
18	Elbeuf	219
19	Pont de l'Arche Rive Gauche	207,5
20	Pont de l'Arche Rive droite	207,5
21	Poses Aval	202,1
22	Poses Amont	202

Tableau 3-2. Liste des points de prélèvement de la Cellule Antipollution de Rouen.

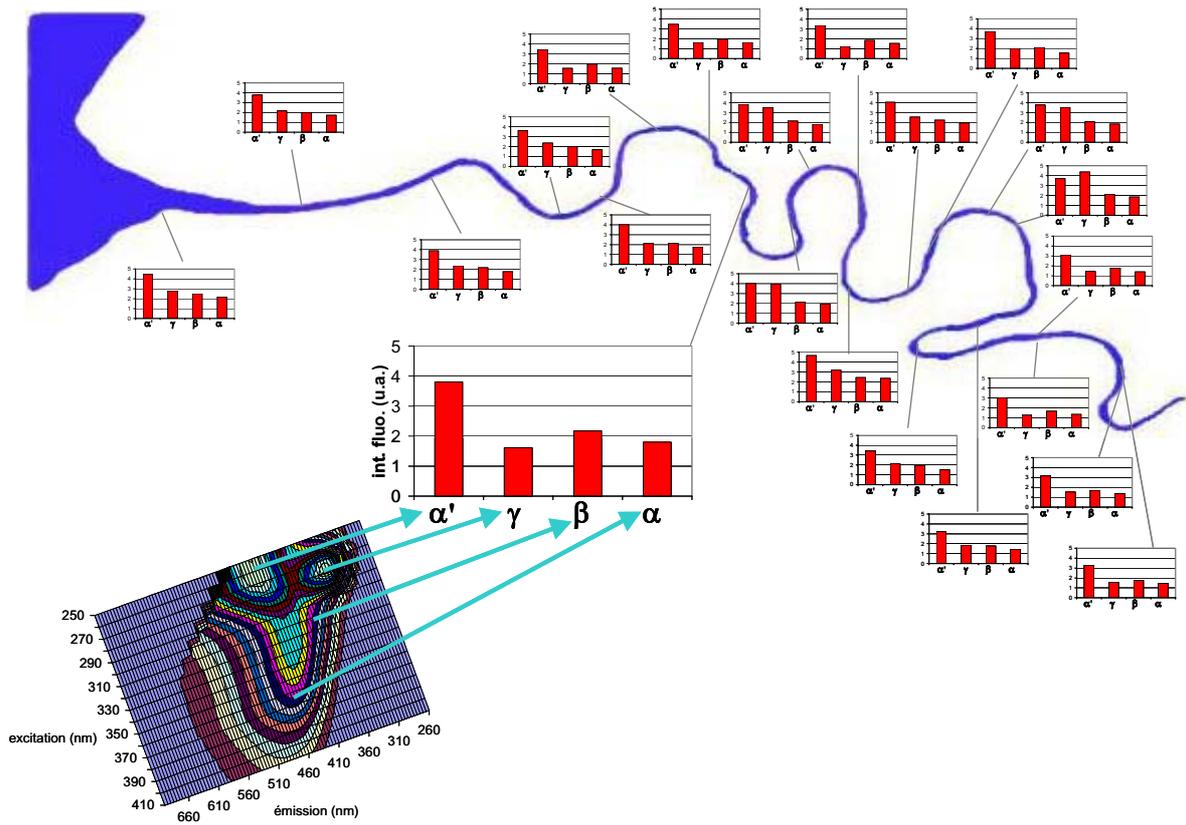


Figure 3-28. Points de prélèvements sur l'estuaire de la Seine et intensité des différentes bandes de fluorescence obtenues à partir des spectres de fluorescence 3D pour le mois de mai 2002.

Cette étude a permis d'observer des différences spectrales qui traduisent des différences qualitatives et quantitatives de la MOD fluorescente contenue dans les différents échantillons traités le long du système estuarien fluvial au cours de l'année. Ceci est mis en évidence sur la figure 3-29 qui présente comme exemple les spectres de fluorescence 3D des échantillons prélevés en deux points de l'estuaire, Caudebec (pk 310) et La Bouille (pk 259) à différentes périodes de l'année 2002. Ces échantillons présentent des variabilités à la fois saisonnières et spatiales que ce soit en terme d'intensité de fluorescence ou bien de présence de certaines bandes de fluorescence. Les différents échantillons prélevés à Caudebec montrent peu de variations qualitatives mais par contre des intensités de fluorescence variables en fonction des saisons. En ce qui concerne les échantillons prélevés à La Bouille, on remarque des variations des intensités de fluorescence des bandes α' et α relatives aux substances humiques mais surtout la présence très marquée de la bande γ relative à des composés d'origine protéique ou bactérienne dans les échantillons de mai et d'octobre alors que cette bande n'est pas visible en mars ni au mois de juillet. Ceci doit être probablement dû à des apports ponctuels de matériel organique de type γ .

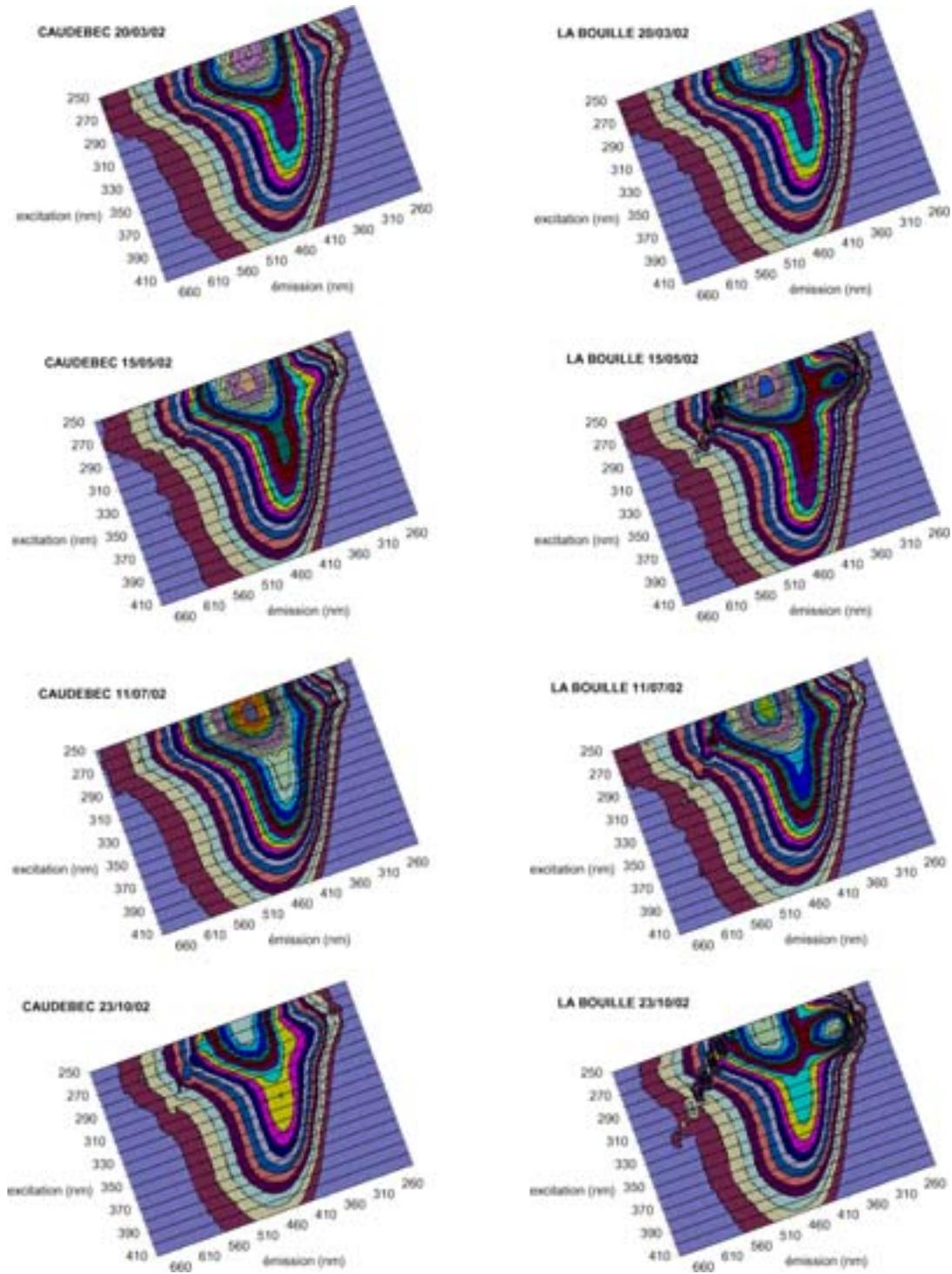


Figure 3-29 Projection dans le plan des spectres de fluorescence 3D des échantillons prélevés à Caudebec (à gauche) et à la Bouille (à droite) à différentes dates au cours de l'année 2002.

Au-delà de cet exemple, la figure 3-30 montre l'évolution au cours de l'année 2002 des intensités des bandes de fluorescence caractéristiques de la matière organique dissoute aux cinq sites de prélèvement suivants dispersés le long de l'estuaire de l'amont vers l'aval : Poses, La Bouille, Caudebec, Tancarville et Honfleur. Comme remarques générales, on peut noter à première vue que les intensités des bandes de fluorescence varient au cours du temps, ce qui traduit une évolution des concentrations des différents fluorophores au cours des saisons. D'autre part, on peut remarquer également que ces variations diffèrent d'un site de prélèvement à l'autre comme nous l'avons déjà noté dans le cas des exemples de Caudebec et La Bouille (figure 3-29).

Si l'on rentre maintenant un peu plus dans les détails, on remarque que les intensités des bandes α' et α présentent sensiblement la même évolution. En effet, même si ces deux fluorophores sont distincts, ils sont toujours présents dans les échantillons d'eaux naturelles et peuvent donc parfois présenter le même comportement. De même, en ce qui concerne la bande β (fig. 3-30), l'évolution de son intensité est sensiblement identique à celle des bandes α' et α et il semble plutôt s'agir de l'évolution de l'intensité de l'extrémité du massif fluorescent humique que de celle d'une bande β bien distincte à proprement parler.

Par contre l'évolution de ces intensités dépend à chaque fois du site de prélèvement considéré. Entre mars et avril, les intensités des bandes α' et α diminuent. Ceci est peut être dû à la diminution des apports en MOD terrigène par le lessivage des sols durant les fortes crues hivernales. En effet, la figure 3-31 présente l'évolution des débits de la Seine au cours de l'année 2002 et montre une forte diminution du débit entre le mois de mars et d'avril.

Au mois de mai (fig. 3-30) on note une forte augmentation des intensités de toutes les bandes observées pour les échantillons de Honfleur, Tancarville et La Bouille. Ces intensités diminuent par la suite jusqu'en juillet avant d'augmenter progressivement jusqu'au maximum qui se situe en décembre. Pour les échantillons de Poses et Caudebec, ce maximum en mai n'est pas présent et l'augmentation se fait de façon plus régulière jusqu'en juillet avant de chuter légèrement en fin de période estivale et ré-augmenter à nouveau jusqu'à l'intensité maximale de décembre.

Ainsi, comme cela a déjà été signalé dans le paragraphe précédent pour les transects en fonction de la salinité, l'intensité de fluorescence des bandes α' et α est maximale durant la période hivernale. Ceci indique des apports terrigènes plus importants en hiver en raison du lessivage des sols durant cette période de fortes crues (figure 3-31). Par contre les augmentations ponctuelles des intensités en mai et juillet ne peuvent pas être expliquées par ce phénomène d'autant plus qu'elles sont différentes en fonction des sites de prélèvements.

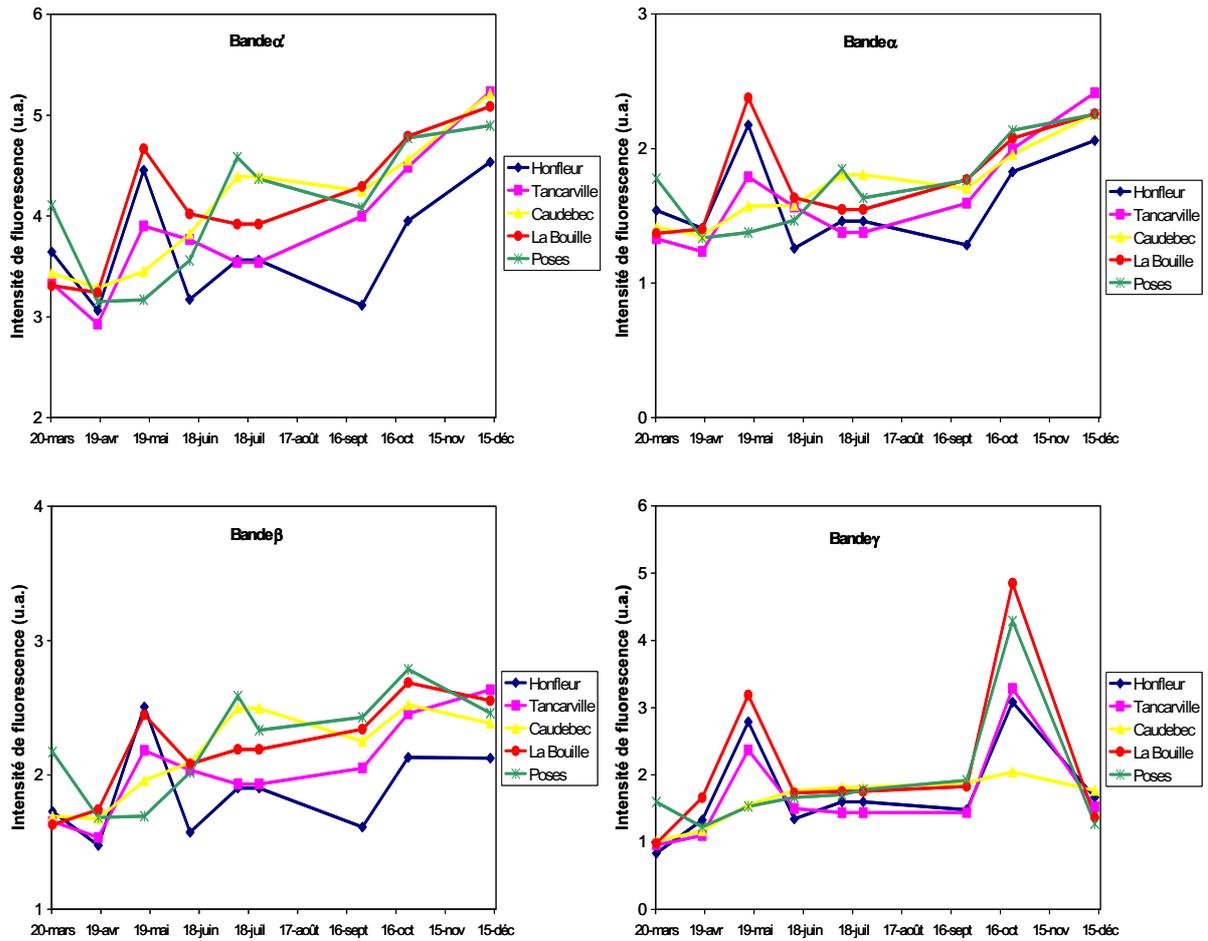


Figure 3-30. Evolution des bandes de fluorescence caractéristiques (α , α' , β , γ) au cours de l'année 2002 en cinq points de l'estuaire de la Seine

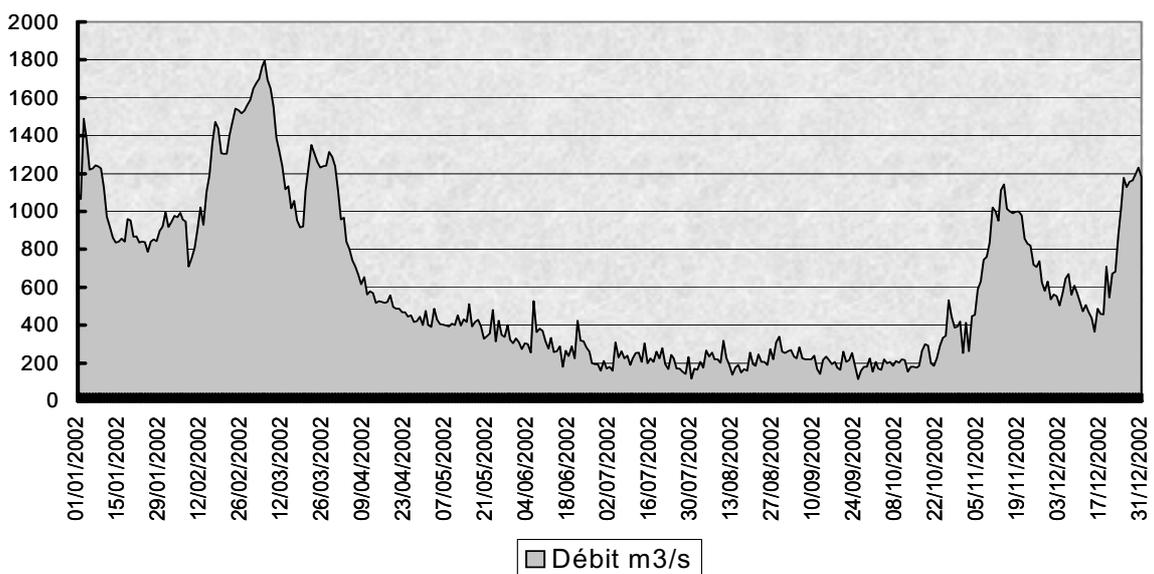


Figure 3-31. Débits journaliers mesurés au barrage de Poses en 2002.

Ainsi il est intéressant de noter que ces variations d'intensités, qui traduisent donc des variations de la concentration en fluorophores, sont liées à des variations parallèles des teneurs en carbone organique dissous (fig. 3-32). Malheureusement, très peu de données relatives aux teneurs en COD sont disponibles concernant ces échantillons.

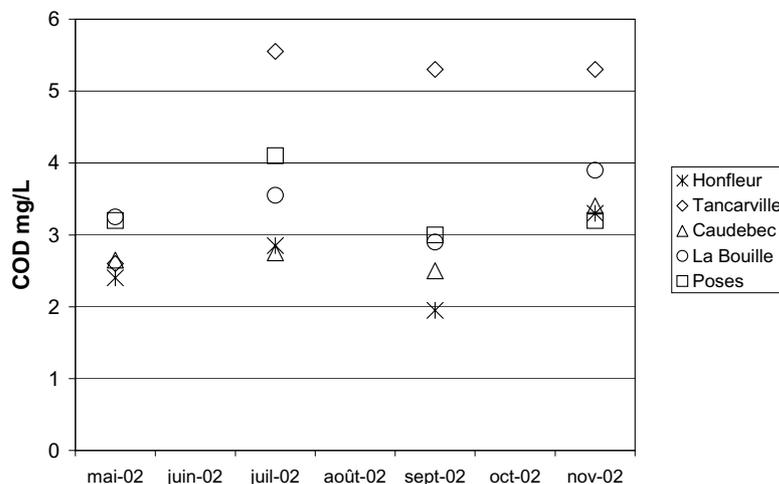


Figure 3-32. Variations des teneurs en COD au cours de l'année 2002 en cinq points de l'estuaire de la Seine.

Les teneurs en COD oscillent entre 2 et 4 mg/l entre mai et décembre sauf pour la station de Tancarville qui est au dessus de 5 mg/l de juillet à décembre. Globalement l'évolution du COD montre une augmentation entre mai et juillet avant une légère chute des valeurs en septembre qui augmentent à nouveau en décembre. Cette description correspond relativement bien aux variations des intensités de fluorescence pour les échantillons de poses et caudebec, par contre elle ne permet pas d'expliquer les variations d'intensité des échantillons de La Bouille, Tancarville et Honfleur. De plus cela montre que l'augmentation du COD en juillet pour ces échantillons et notamment Tancarville ne concerne pas du matériel organique fluorescent et provient donc d'une source différente de carbone organique.

En ce qui concerne la bande γ relative à des composés d'origine protéique ou bactérienne, l'évolution de son intensité est tout à fait remarquable (figure 3-30). En effet, on peut noter la présence de deux pics d'intensité très nets en mai et de façon relativement surprenante pour ce type de composés en octobre. Le reste de l'année ne présente pas de variations particulières.

Ces fortes augmentations des intensités de la bande γ traduisent des phénomènes importants de dégradation de matière organique d'origine autochtone phytoplanctonique principalement. Elles auraient donc comme origine des blooms phytoplanctoniques qui produiraient ensuite ce type de composés suite à l'activité biologique du phytoplancton ou à l'activité de dégradation bactérienne. Cette explication semble valable pour le mois de mai

qui présente des teneurs élevées en chlorophylle A (données de la Cellule Antipollution, SNS Rouen) traduisant la présence d'une importante biomasse dans l'estuaire fluvial. Par contre aucune explication ne permet d'interpréter la présence importante de la bande γ au mois d'octobre.

Plusieurs facteurs peuvent alors entrer en ligne de compte. Tout d'abord pour Honfleur et Tancarville une influence marine peut se faire sentir puisque l'intrusion de la salinité se produit jusqu'aux environs de Caudebec. D'autre part cette zone de faible salinité connaît également des valeurs de turbidité importantes en raison de la présence du bouchon vaseux qui concentre une forte population bactérienne susceptible d'activités de dégradation intense du matériel organique. Enfin, la présence d'une station d'épuration à Tancarville peut aussi conduire à des apports importants de COD (fortes teneurs en COD non fluorescent à Tancarville) qui peut alors également se dégrader à certains endroits bien distincts de l'estuaire.

Les rapports d'intensité des différentes bandes de fluorescence sont portés sur la figure 3-33 pour quatre profils complets d'échantillonnage (22 points). La mission de novembre 2002 n'est pas représentée puisqu'en raison de conditions climatiques difficiles, le cycle d'échantillonnage n'a été que partiel.

Comme considérations générales on remarque tout d'abord que le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ diminue entre mars et mai et qu'il augmente ensuite en juillet et septembre.

Le rapport I_{γ}/I_{α} est plus faible en mars et il est maximum en mai comme le montraient déjà les variations d'intensité. Ce rapport est identique et légèrement plus faible en juillet et septembre. Il est particulièrement intéressant de noter que la variabilité des rapports est très importante au mois de mai comme montre plus précisément la figure 3-34, notamment en ce qui concerne le rapport I_{γ}/I_{α} en certains points de la zone d'étude, comme plus précisément à l'aval de la ville de Rouen au niveau des sites comme Duclair, Mesnil/Jumièges, le port de Rouen ou Croisset.

Ceci peut s'expliquer par l'influence probable d'apports anthropiques au niveau de stations d'épuration issues de la ville de Rouen qui pourraient contribuer la formation de composés organiques dissous fluorescents au travers de phénomènes de dégradation. La localisation bien définie de maxima indique donc également la présence de zones particulièrement propices à ces processus de dégradation et production.

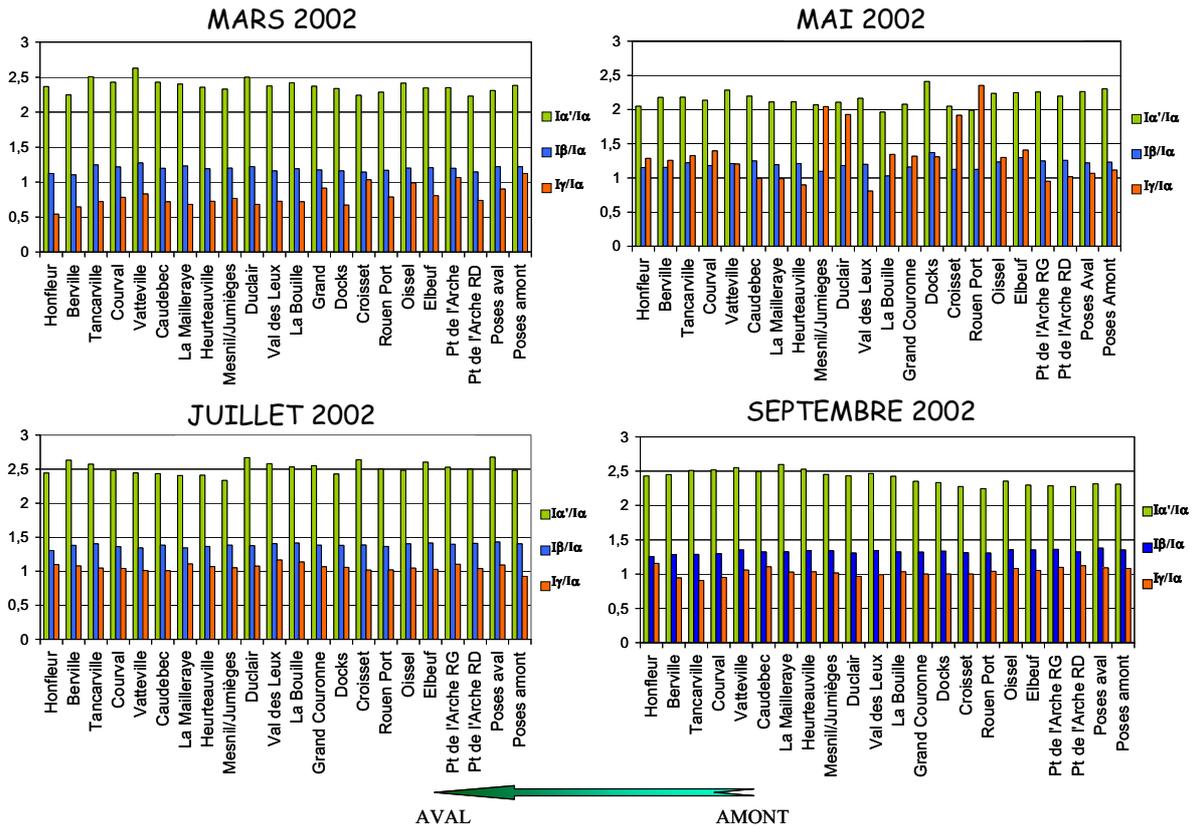


Figure 3-33. Evolution des rapports d'intensité $I\alpha'/I\alpha$, $I\beta/I\alpha$, et $I\gamma/I\alpha$ entre Honfleur et Poses.

MAI 2002

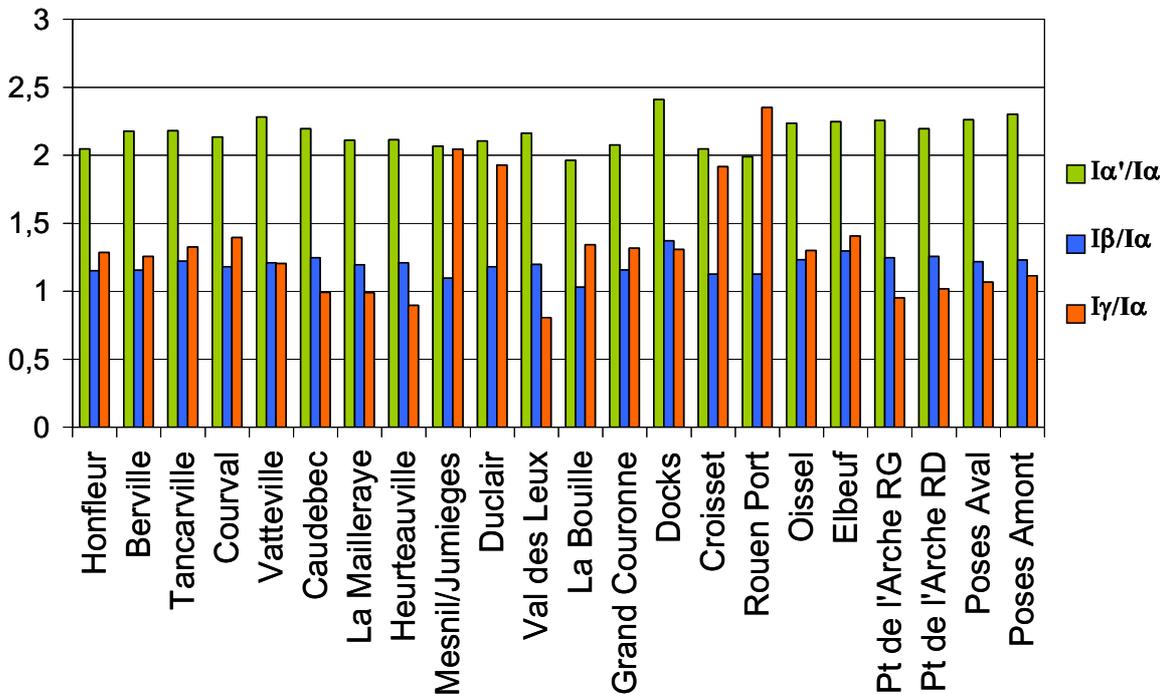


Figure 3-34. Evolution des rapports d'intensité $I\alpha'/I\alpha$, $I\beta/I\alpha$, et $I\gamma/I\alpha$ au mois de mai 2002.

La figure 3-35 présente les rapports d'intensités de fluorescence concernant uniquement les 5 points du suivi bimensuel dont les intensités ont été décrites précédemment sur la figure 3-30.

On remarque bien à nouveau la chute du rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ en mai puis son augmentation en juin pour ensuite décroître faiblement jusqu'en décembre

Le rapport I_{β}/I_{α} , montre de très faibles variations mais tout de même une légère augmentation en été montrant ainsi la présence, certes faible de ce type de composés bien que noyés dans le signal du massif humique.

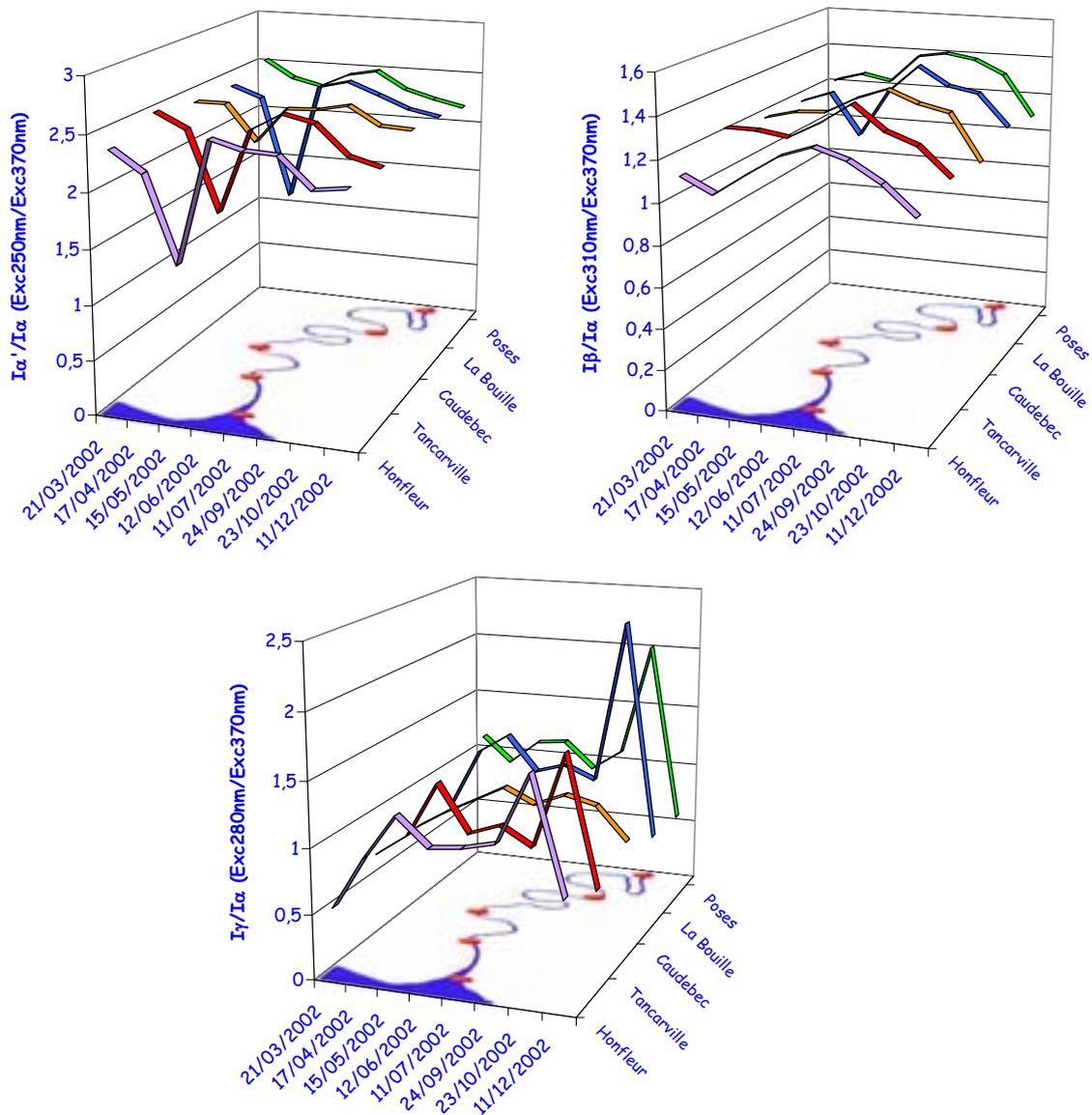


Figure 3-35. Variation des rapports d'intensité de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , et I_{γ}/I_{α} au cours de l'année 2002 en cinq points de l'estuaire de la Seine.

Le rapport I_{γ}/I_{α} présente une augmentation en mai et en octobre comme le laisse envisager l'intensité importante de la bande γ à ces périodes. L'augmentation semble plus marquée en amont de la zone étudiée en octobre tandis qu'en mai c'est dans la partie aval que le rapport est le plus important traduisant peut-être une influence des eaux marines.

Le site de Caudebec semble subir le moins de variations du matériel organique dissous fluorescent. Il semble constituer une zone moins réactive de l'estuaire marquant une limite entre la partie amont fluviale caractérisée par une forte biomasse et des apports anthropiques importants favorisant localement des processus de dégradation et la partie aval subissant l'influence des masses d'eaux marines.

Ainsi, pour un même site de prélèvement mais à des périodes de l'année différentes, les caractéristiques spectrales de la MOD vont être variables le long de l'estuaire. Ceci traduit des différences concernant la nature et la quantité des apports de MOD dans les eaux fluviales en fonction des saisons. En effet, les conditions environnementales varient en fonction des saisons et influencent fortement des facteurs comme par exemple le lessivage des sols et l'activité biologique dans les eaux qui conditionnent tout particulièrement les caractéristiques de la MOD. D'autre part, si l'on considère une même date de prélèvement, il s'avère que les échantillons prélevés à des endroits différents le long du fleuve présentent entre eux des propriétés spectrales différentes. Ceci implique donc l'existence de sources ponctuelles de matière organique dissoute ainsi que de zones bien définies de dégradation de ce matériel. De la MOD labile semble donc produite temporairement à certains endroits de l'estuaire comme l'atteste la prépondérance de la bande γ à certaines périodes et dans des sites bien localisés.

2- ESTUAIRE DE LA GIRONDE

2-1- Evolution du signal de fluorescence en fonction de la salinité dans l'estuaire

Deux missions d'échantillonnage le long du gradient de salinité ont été réalisées dans l'estuaire de la Gironde. Ces deux campagnes nommées GIROX 1 et 2 ont été menées respectivement en février et en septembre 2002 en collaboration avec les équipes de G. Blanc, H. Etcheber et G. Abril du Département de Géologie et Océanographie (DGO, université Bordeaux 1). Lors de ces deux campagnes des profils fins de salinité ont été effectués et les prélèvements réalisés ont été analysés par spectrofluorimétrie 3D. Les teneurs en carbone organique dissous ont également été mesurées pour chaque échantillon.

2-1-1 Mission GIROX 1 (février 2002)

Peu de différences qualitatives ont été observées entre les échantillons de salinités différentes lors de cette mission GIROX 1. La figure 3-36 présente les projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités variables. Les spectres des échantillons de salinité 0, 9 et 20,5 sont à la même échelle. On peut remarquer qu'il n'y a quasiment aucune différence qualitative ni même quantitative entre les échantillons de salinité 0 et 9. Le spectre de l'échantillon de salinité 20 est beaucoup moins intense ce qui traduit une diminution de la concentration en matériel organique dissous lors de la dilution avec les eaux marines. Le spectre du prélèvement de salinité 33,8 n'est pas à la même échelle car il présente une très faible intensité de fluorescence due à une forte dilution de la MOD fluorescente dans les eaux marines. Cependant il est intéressant de noter l'élargissement du spectre d'émission pour une longueur d'onde d'excitation de 310 nm. Cet épaulement qui traduit la présence marquée du fluorophore β qui apparaît pour les fortes salinités comme dans le cas de la Seine décrit dans les paragraphes précédents.

La figure 3-37 présente l'intensité de fluorescence en fonction de la salinité pour toutes les bandes caractéristiques de la MOD.

On remarque une décroissance de l'intensité de fluorescence avec la salinité qui indique une diminution de la concentration et donc la dilution du matériel organique fluorescent.

Cependant, contrairement au cas de la Seine, cette décroissance n'est pas linéaire excepté en ce qui concerne la bande γ qui n'a d'ailleurs jamais été clairement identifiée comme une bande bien définie mais seulement comme un épaulement.

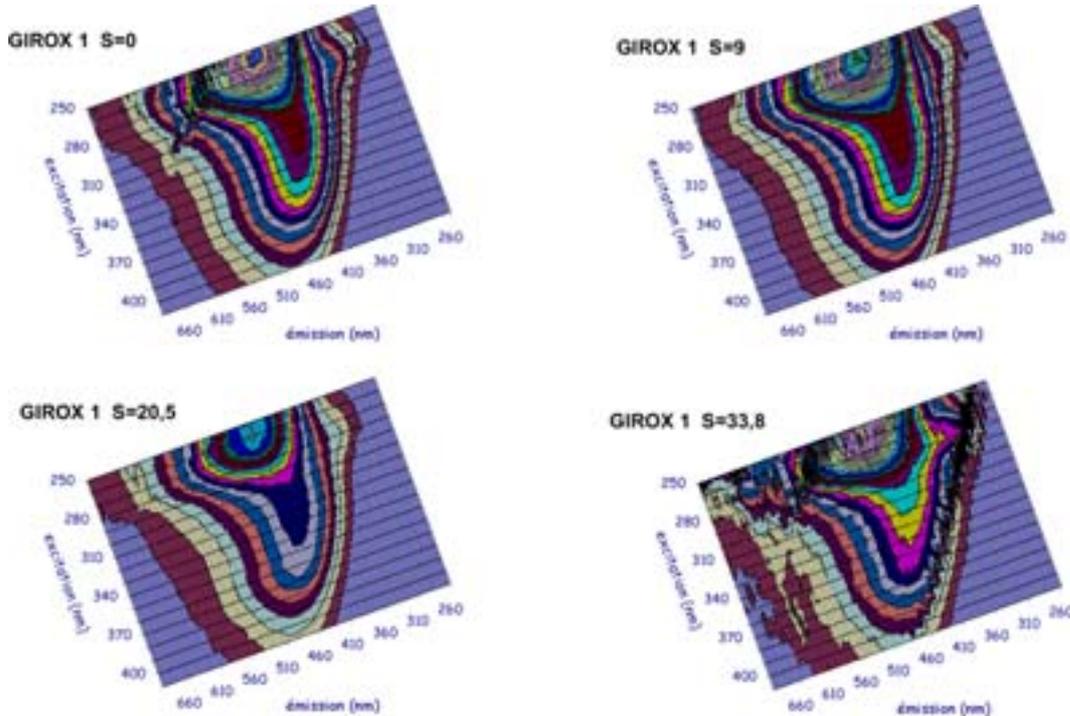


Figure 3-36. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes durant la mission Girox 1 (février 2002).

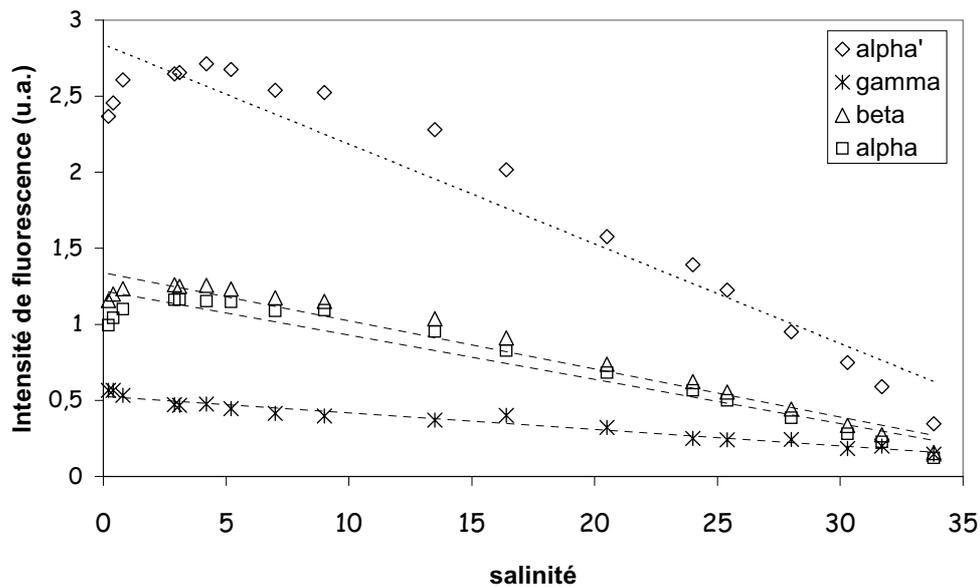


Figure 3-37. Intensité de fluorescence en fonction de la salinité (Gironde, Girox 1, février 2002)

L'intensité des bandes de fluorescence α' , α , et β augmente dans un premier temps jusqu'à une salinité d'ordre 5 avant de décroître par la suite. Ce type d'évolution du matériel organique dissous fluorescent en fonction de la salinité montre que sa dilution n'est pas conservative le long de l'estuaire. En effet, la figure 3-38 présente les différents cas de dilution d'un paramètre au cours d'un mélange. La droite théorique représente la dilution d'un constituant qui ne subit pas d'apport ou de perte lors du mélange entre les deux points limites.

Si l'on considère ce schéma et qu'on le compare au graphique de la figure 3-37, on peut voir qu'il se produit un phénomène d'addition de matériel organique fluorescent en fonction de la salinité lors du mélange entre les eaux douces et les eaux marines.

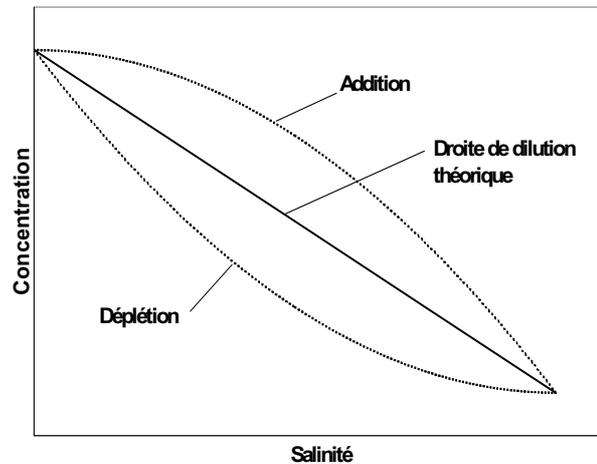


Figure 3-38 Dilution d'un composé lors d'un mélange estuarien. Concentration en fonction de la salinité.

L'observation de l'évolution de la teneur en carbone organique dissous en fonction de la salinité pour ces mêmes échantillons (figure 3-39) montre un comportement tout à fait différent. En effet, le carbone organique ne subit pas lui non plus une dilution conservative mais semble plutôt montrer une appauvrissement au milieu de l'estuaire due probablement soit à la dégradation et la minéralisation du COD, soit à des phénomènes de flocculation. Cependant cette dégradation doit également conduire à des composés fluorescents qui viennent alors s'ajouter au cortège des composés organiques fluorescents.

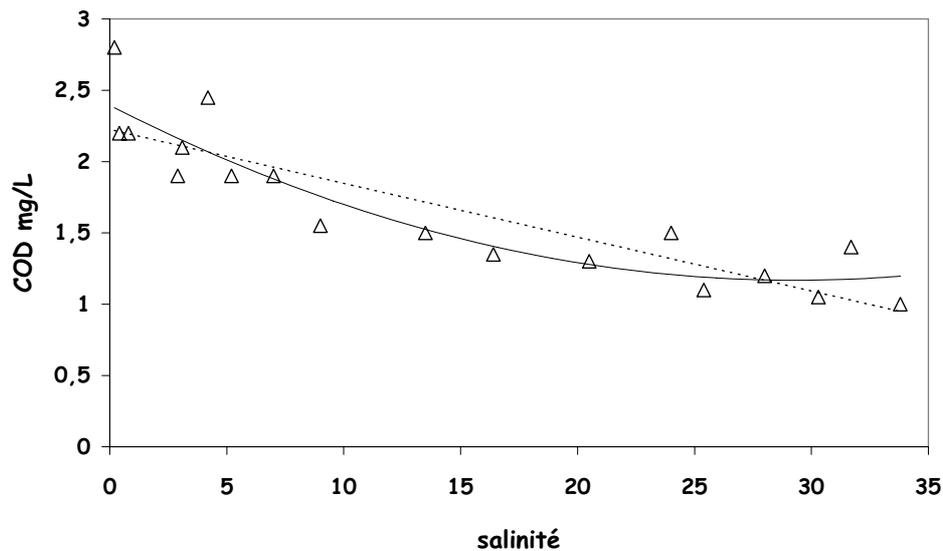


Figure 3-39. Teneur en carbone organique dissous en fonction de la salinité (Gironde, Girox 1, février 2002).

2-1-2 Mission GIROX 2 (septembre 2002)

Comme dans le cas de la mission GIROX 1, peu de différences qualitatives de MOD fluorescente ont été observées en septembre 2002 en fonction de la salinité. La figure 3-40 présente les projections dans le plan des spectres de fluorescence de quatre échantillons prélevés à des salinités différentes.

Tout comme dans le cas de février 2002 il n'y a quasiment aucune différence qualitative ni quantitative significative entre les échantillons de salinité 0 et 10. Ensuite, la fluorescence de l'échantillon de salinité 21 est moins intense mais son spectre est relativement semblable aux deux précédents. En ce qui concerne l'échantillon de salinité 33, il présente un élargissement de type β pour une excitation à 310 nm ainsi que l'apparition d'un épaulement de type γ pour une excitation à 280 nm.

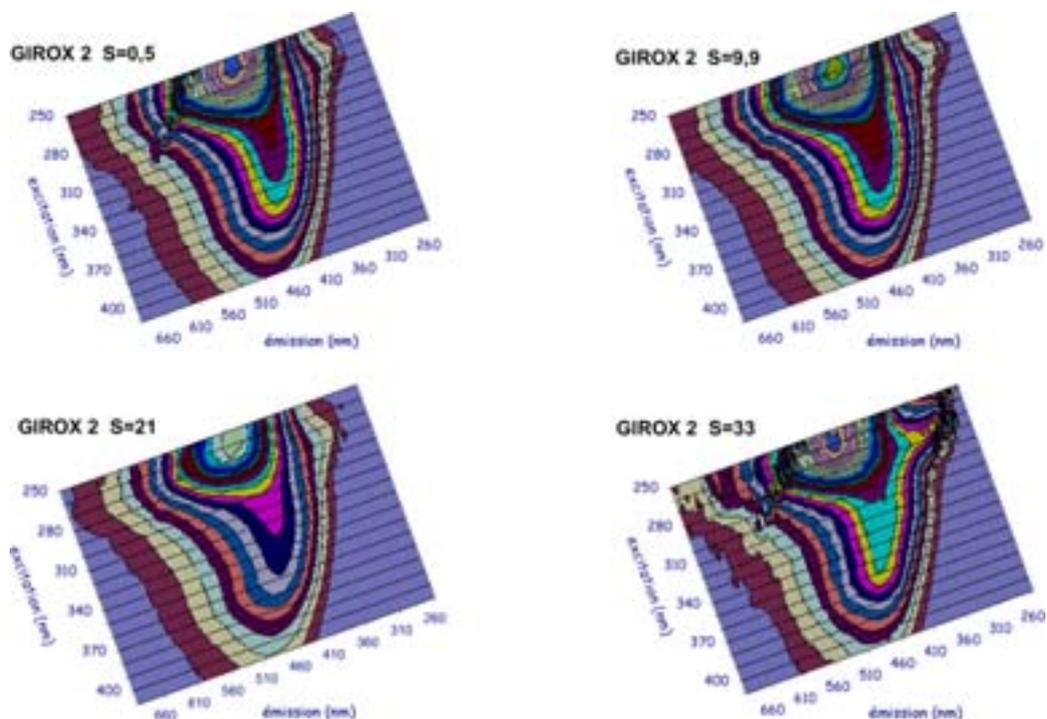


Figure 3-40. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D de quatre échantillons prélevés à des salinités (S) différentes durant la mission Girox 2 (septembre 2002).

Les intensités des différentes bandes de fluorescence de tous les échantillons en fonction de la salinité présentent également les mêmes évolutions que lors de la mission de février 2002 avec une nouvelle fois la présence d'un phénomène d'addition de matériel organique fluorescent au milieu de l'estuaire (figure 3-41).

Par contre l'évolution des teneurs en COD en fonction de la salinité (figure 3-42) est l'opposé de celle observée lors de la mission GIROX 1. En effet, on note cette fois une addition de COD par rapport à la courbe de dilution théorique (figure 3-38).

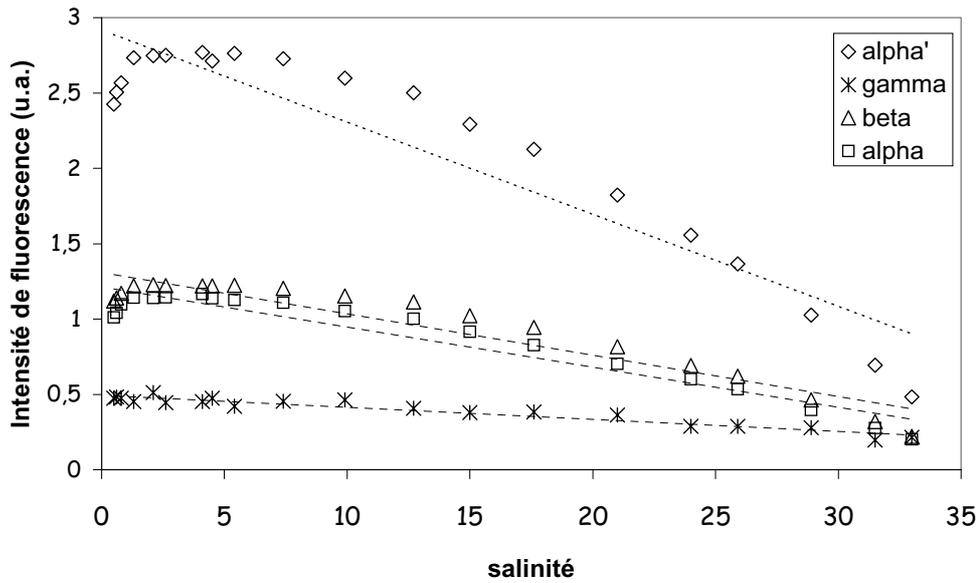


Figure 3-41. Intensité de fluorescence en fonction de la salinité (Gironde, Girox 2, septembre 2002).

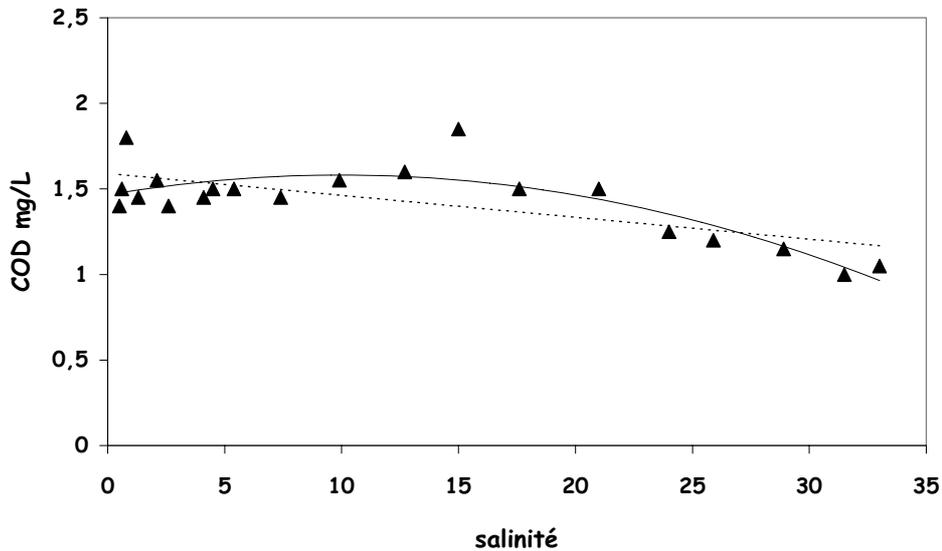


Figure 3-42. Teneur en carbone organique dissous en fonction de la salinité (Gironde, Girox 2, septembre 2002).

Cette augmentation de la teneur en COD dissous dans l'estuaire peut provenir d'un transfert de matière organique du pool particulaire vers la phase dissoute soit au travers de la dégradation de matériel particulaire par l'activité biologique, soit au travers de la désorption de composés dissous préalablement associés à des édifices particulaires. Parmi les composés organiques dissous ainsi formés ou libérés, certains peuvent alors participer à l'augmentation du signal global de fluorescence par rapport à la droite de dilution théorique observée à partir de la salinité 5 (figure 3-41).

2-2- Variations saisonnières en fonction de la salinité de la MOD dans l'estuaire de la Gironde

La comparaison des résultats des deux campagnes effectuées sur la Gironde permet de mettre en évidence deux comportements particuliers du carbone organique dissous en fonction de la saison qui témoignent de la non-conservativité du COD durant le mélange estuarien. En effet, la figure 3-43, qui présente les deux profils de la teneur en COD en fonction de la salinité pour les deux missions considérées, montre clairement cette différence saisonnière.

Durant la période hivernale, la teneur en COD est plus forte en amont pour les faibles salinités, et s'équilibre à partir de la salinité 12 avec les valeurs obtenues pour les prélèvements estivaux. Mais il est plus particulièrement intéressant de noter que la zone de l'estuaire comprise entre les salinités 12 et 30 environ agit comme un puits de carbone organique dissous en hiver où la diminution de la teneur en COD due à la dilution est accentuée par un phénomène de « consommation » du matériel organique. Alors que cette même zone constitue une aire de production de COD durant la période estivale.

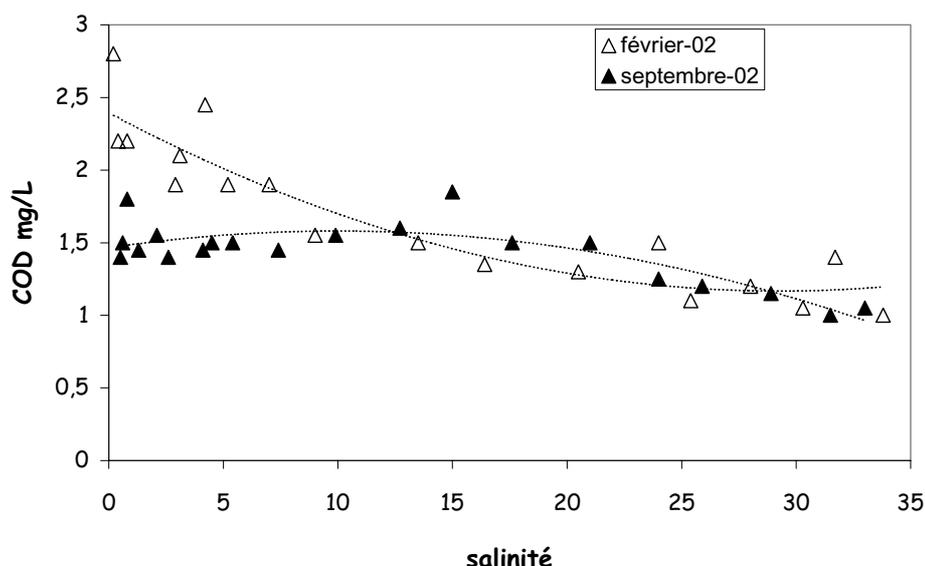


Figure 3-43. Teneurs en COD en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde (février et septembre 2002)

Les travaux de Miller (1999) montrent exactement la même évolution saisonnière du COD sur l'estuaire de la rivière Tamar (Angleterre) avec en hiver une consommation de carbone organique dissous dans la partie soumise à des salinités moyennes et au contraire une production de COD dans cette zone durant la période allant de juin à octobre. De la même façon, les résultats de Abril et al. (2002) montrent également le même type de comportement du COD en période estivale pour les estuaires de la Gironde, du Sado (Portugal) et de l'Ems (Pays Bas) pour les périodes de juin, septembre et juillet 1997 respectivement. Ces auteurs ont

mis en avant des phénomènes de désorption de composés organiques liés aux particules du bouchon vaseux ou lors de la remise en suspension de sédiments pour expliquer ces écarts à la conservativité.

La simple observation des intensités de fluorescence des différentes bandes caractéristiques de la MOD ne permet pas réellement de rendre compte d'un quelconque comportement saisonnier (figure 3-44) puisque les intensités sont quasiment identiques et se comportent de façon similaire en fonction de la salinité quelle que soit la saison, si ce n'est une intensité de fluorescence légèrement supérieure en septembre compatible avec une teneur en COD plus élevée. Les variations de COD observées sur la figure 3-43 ne semblent donc pas concerner du matériel fluorescent. On peut cependant remarquer quelque soit la saison une nette augmentation des bandes α et α' pour les faibles salinités qui peut être liée avec les très fortes valeurs de turbidité observées pour ces salinités (figure 3-46).

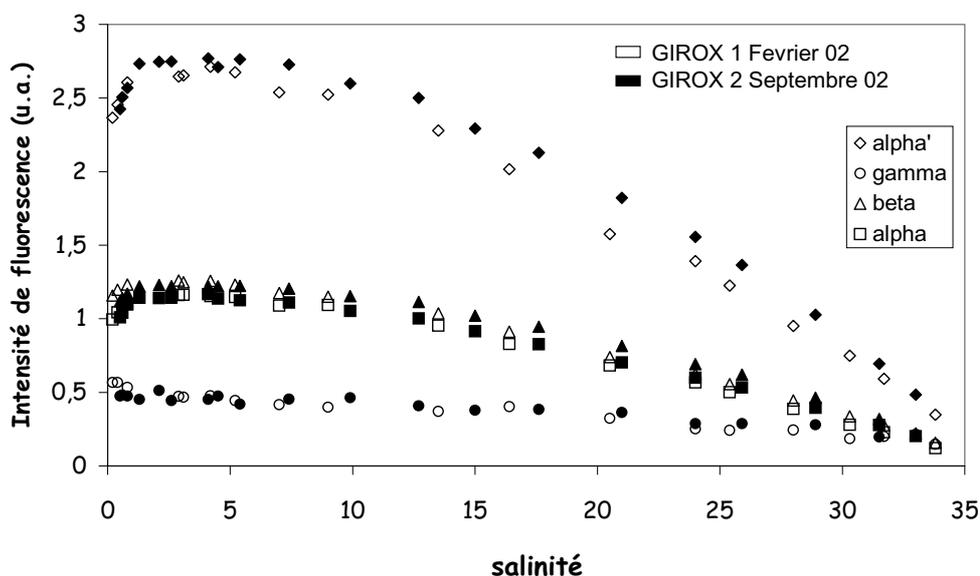


Figure 3-44. Intensité de fluorescence des différentes bandes en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde en février et septembre 2002.

Par contre, les rapports d'intensité entre ces différentes bandes de fluorescence permettent eux d'observer une tendance saisonnière (fig. 3-45). En effet le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ augmente en septembre le long de l'estuaire jusqu'à la salinité 25 environ au-delà de laquelle sa valeur chute. En février l'augmentation est moins marquée au départ mais elle se poursuit par contre sur toute la gamme de salinité en s'accroissant même au delà de la salinité 25. Le rapport I_{β}/I_{α} présente la même évolution.

Le rapport I_{γ}/I_{α} quant à lui reste relativement constant jusqu'à la salinité 25 avant d'augmenter fortement au-delà et ceci en été comme en hiver. La bande γ est représentative de composés de type protéique ou de dérivés issus de la dégradation de matériel biologique

principalement d'origine phytoplanctonique, et rend ainsi compte d'une forte activité biologique. Le fait que le rapport I_{γ}/I_{α} augmente intensément au-delà de la salinité 25 indique donc une forte activité dans la partie aval de l'estuaire et donc une origine principalement marine des composés de type γ concernés. L'évolution du rapport I_{γ}/I_{α} témoigne que cette activité est toute aussi intense en février qu'en septembre. En effet, le mois février 2002 a connu des conditions climatiques particulièrement clémentes en Gironde et propices au développement de blooms phytoplanctoniques hivernaux (Gohin et al., 2003 ; Labry et al., 2001) qui sont en adéquation avec les résultats observés.

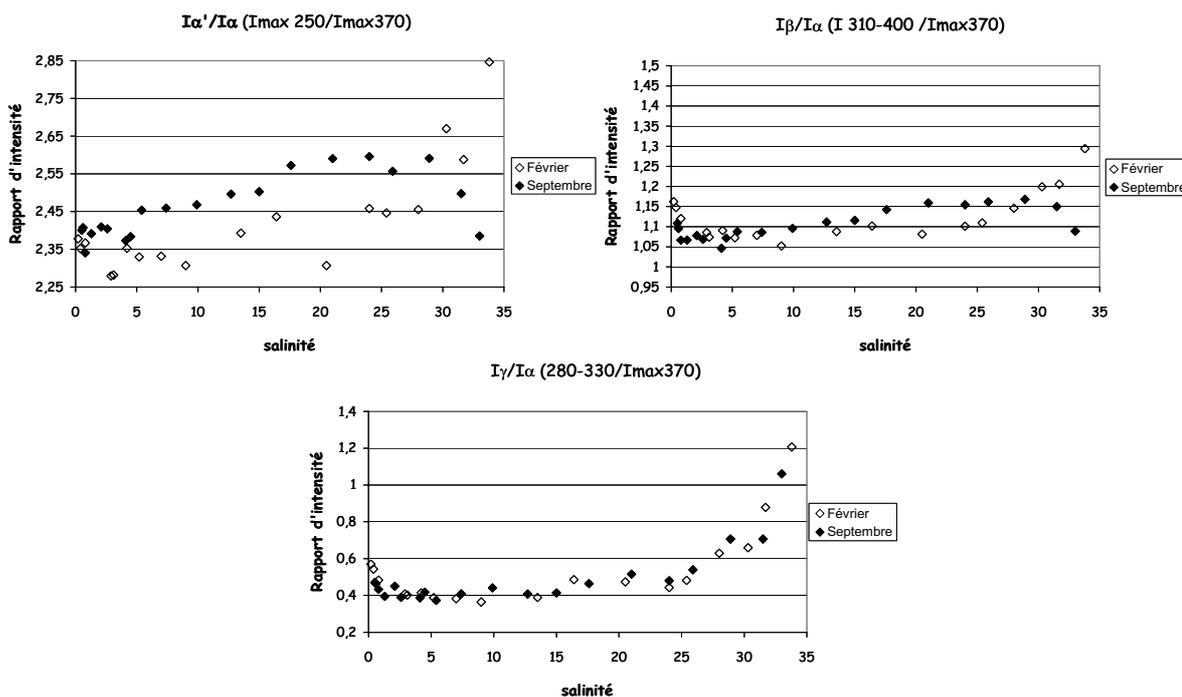


Figure 3-45. Rapport d'intensité de fluorescence entre les différentes bandes ($I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α}) en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde en février et septembre 2002.

D'autre part, la valeur quasiment constante du rapport I_{γ}/I_{α} jusqu'à la salinité 25 indique que l'activité biologique phytoplanctonique est très limitée dans la majeure partie de l'estuaire et cela probablement à cause de la faible pénétration de la lumière dans la colonne d'eau en raison d'une forte turbidité. En effet, les teneurs en matières en suspension sont relativement importantes dans le domaine des faibles salinités caractérisant ainsi la présence d'un bouchon vaseux très turbide (fig. 3-46). En février 2002, le bouchon vaseux se localise dans la zone de salinités inférieures à 10. En septembre, le bouchon vaseux est beaucoup plus étendu. Il est alors caractérisé par des turbidités très importantes dans la zone de salinités comprises entre 0 et 5. Il s'étire ensuite quasiment jusqu'à la salinité 25 avec des concentrations en MES de l'ordre de 400 mg/l.

La diminution des rapports I_{γ}/I_{α} et I_{β}/I_{α} dans la zone des faibles salinités provient de l'augmentation de l'intensité des bandes α et α' dans cette zones de fortes turbidités.

En septembre, l'estuaire semble être divisé en trois zones où la MOD présente des caractéristiques distinctes et est soumise à des processus bien différents. La zone de faibles salinité ($S < 4$) est caractérisée par un bouchon vaseux très turbide comme en témoigne les très fortes concentrations en MES observées. On note dans cette zone une augmentation très nette des intensités des bandes α et α' relatives aux composés humiques. La zone comprise entre 4 et 25 de salinité est toujours soumise à la présence du bouchon vaseux mais avec des teneurs en MES relativement plus faibles (~ 400 mg/L). Peu de production y est observée même si les teneurs en COD augmentent dans cette zone. Il s'agit alors très vraisemblablement de phénomènes de dégradation et de modification de matériel organique mettant en cause des composés plus anciens et déjà partiellement dégradés ainsi que, probablement, des transferts de la phase particulaire vers la phase organique dissoute par désorption de composés macromoléculaires liés aux particules.

La zone de fortes salinités (> 25) présente une influence marine marquée avec la présence de composés de type γ importante traduisant une activité biologique intense de production et de dégradation. Ces deux phénomènes contribuent alors à l'augmentation de la teneur en COD et influent donc sur l'évolution de la fluorescence des bandes α et α' comme en témoigne le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ (figure 3-45). Les composés de type α et α' relatifs aux substances humiques semblent bien être alors liés aux évolutions du COD et subir certaines modifications dans la zone du bouchon vaseux.

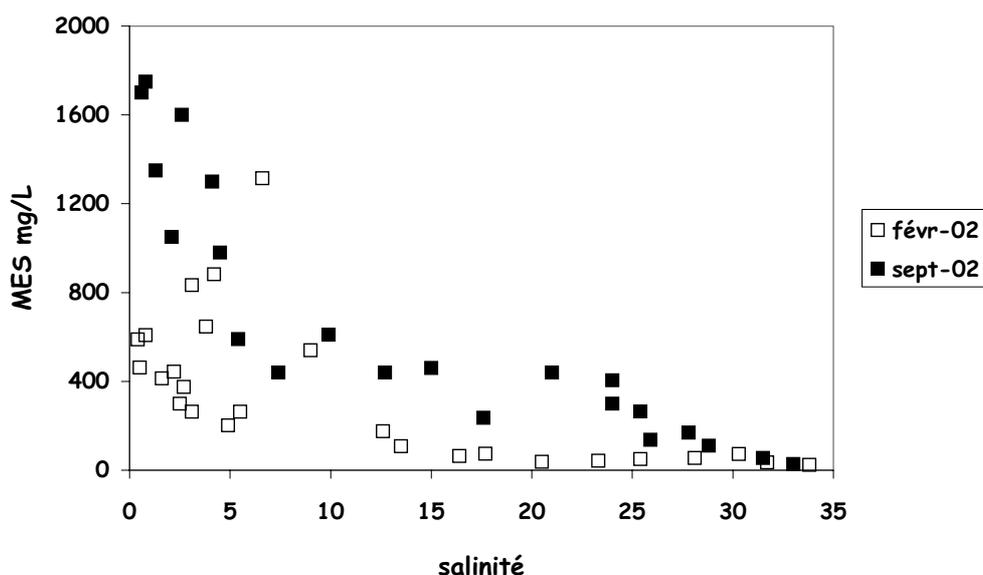


Figure 3-46. Teneur en matière en suspension (MES) en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde en février et septembre 2002.

3- COMPARAISON SAISONNIERE DES CARACTERISTIQUES DE LA MOD DES ESTUAIRES DE LA SEINE ET DE LA GIRONDE

Pour clore ce chapitre nous allons effectuer dans ce paragraphe la comparaison des résultats obtenus pour les estuaires de la Seine et de la Gironde et mettre ainsi en évidence les différences majeures ainsi que les similarités de caractéristiques et de comportement de la matière organique dissoute au cours des saisons.

3-1- Carbone organique dissous

En ce qui concerne tout d'abord le carbone organique dissous (fig. 3-47), la Seine présente des valeurs légèrement supérieures à la Gironde et plus particulièrement en hiver. D'autre part la décroissance de ces teneurs en fonction de la salinité est relativement aléatoire pour la Seine et il est difficile de dire si les variations observées sont significatives ou bien si elles sont dues à des incertitudes liées à l'analyse, puisque de telles erreurs ont été notées dans les résultats de la mission d'avril 2001. On peut cependant noter une évolution saisonnière de la teneur en COD avec des valeurs plus fortes observées en hiver en raison probablement d'un important lessivage des sols à cette période et donc des apports plus importants en substances terrigènes principalement de type humique.

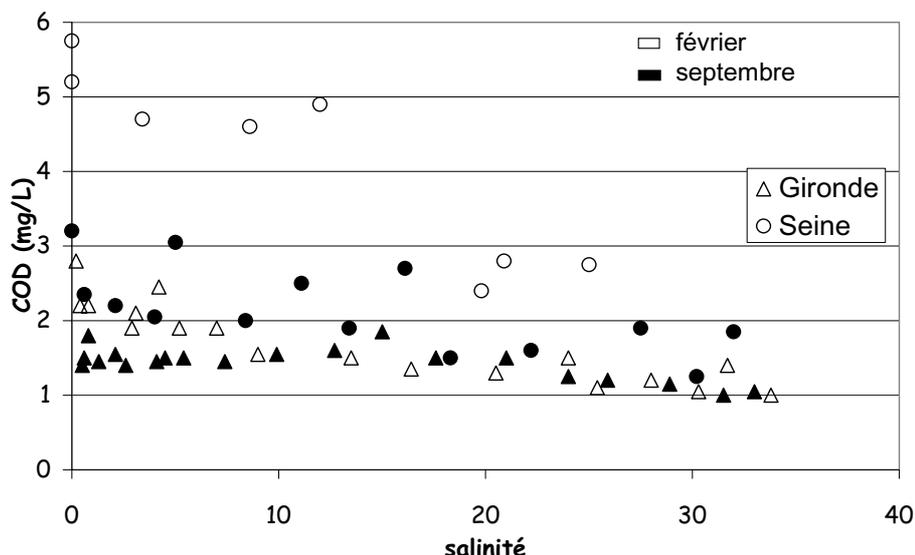


Figure 3-47 Comparaison des teneurs en COD dans les estuaires de la Seine et de la Gironde.

Dans le cas de la Gironde, il n'y a pas à proprement parler de différences significatives des valeurs de COD entre les deux saisons concernées puisque les teneurs sont relativement

semblables entre l'hiver et l'été même si en hiver des valeurs légèrement plus importantes sont observées dans la région des faibles salinité (0 à 10). Par contre, l'évolution de ces teneurs en fonction de la salinité présente deux comportements saisonniers très marqués avec des phénomènes de diminution de COD en hiver et d'addition en été. Ces phénomènes pouvant être principalement expliqués par des échanges entre les phases dissoute et particulaire sous l'influence de phénomènes de dégradation du matériel organique ou de phénomènes physiques (désorption ou floculation) résultant des variations des conditions physico-chimiques lors du mélange des eaux douces et marines. La présence d'un bouchon vaseux très turbide tout au long de l'année peut en effet favoriser ce type de phénomènes en raison de très fortes teneurs en matières en suspension et d'un important cortège de bactéries liées à ces particules qui participent activement à la dégradation du matériel organique labile.

Le bouchon vaseux se trouve à l'interface entre les eaux douces et marines et peut subir des conditions de salinités variées au gré des marées. Ces variations des conditions environnementales peuvent alors être propices aux phénomènes d'adsorption et désorption à la surface des particules (Abril et al., 2002).

3-2- Propriétés de fluorescence

3-2-1- Intensités et rapports d'intensité des bandes de fluorescence

Dans l'estuaire de la Gironde, les intensités de fluorescence des différentes bandes caractéristiques (fig. 3-48) sont semblables pour les deux saisons considérées, ce qui indique des concentrations relativement identiques des divers constituants de la MOD en été comme en hiver. Il est par contre tout à fait intéressant de noter que la décroissance de la fluorescence n'est pas linéaire en fonction de la salinité, traduisant ainsi la non-conservativité du carbone organique dissous fluorescent lors du mélange des eaux douces et marines. Ceci montre encore une fois qu'il existe alors des phénomènes d'apport ou de consommation de ces composées organiques dans l'estuaire comme le laissent envisager les résultats concernant les teneurs en COD.

La Seine présente des intensités de fluorescence plus importantes que celles observées dans la Gironde ce qui est en adéquation avec les résultats de COD. Par contre, contrairement à la Gironde l'intensité de fluorescence des différentes bandes varie en fonction des saisons. L'intensité des bandes relatives aux substances humiques est plus importante en hiver tandis que la bande γ issue des composés protéiques est plus intense en été. Ceci montre des apports plus importants en été de matériel organique provenant de l'activité biologique autochtone

probablement en raison de blooms phytoplanctoniques estivaux. D'autre part, la décroissance de l'intensité des différentes bandes en fonction de la salinité est linéaire et indique à priori une dilution conservative du matériel organique principalement d'origine terrigène dans les eaux salées.

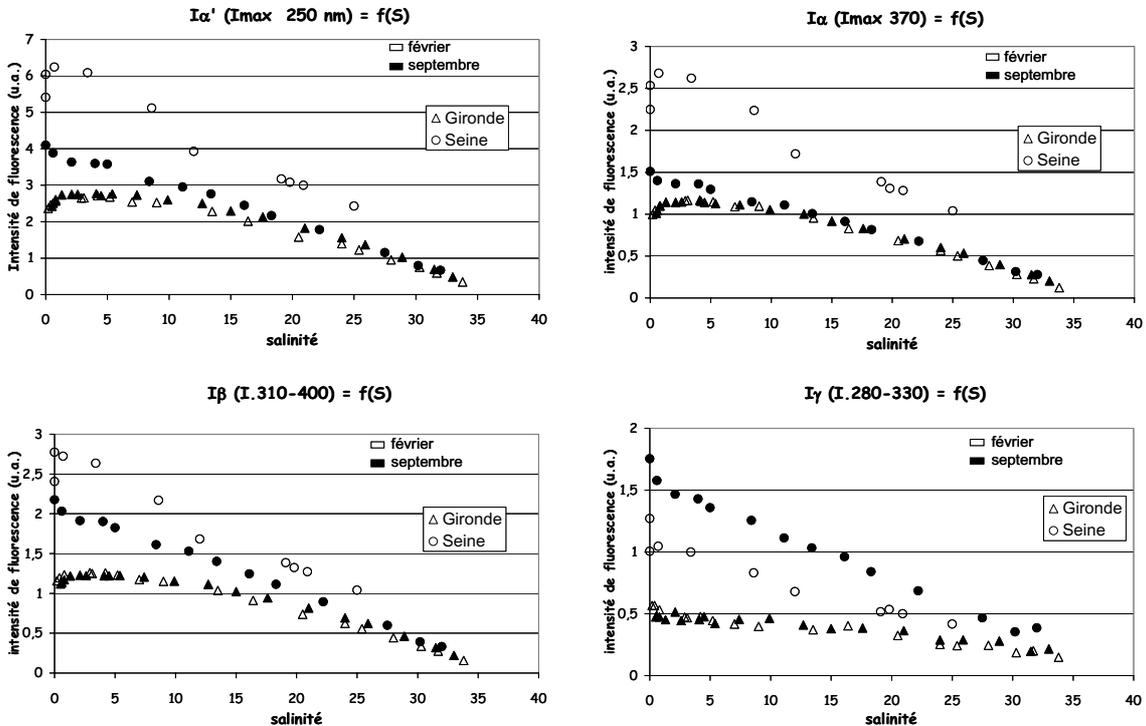


Figure 3-48 Comparaison des intensité de fluorecence des différentes bandes (α' , α , β et γ) en fonction de la salinité dans les estuaires de la Seine et de la Gironde.

Si l'on s'intéresse maintenant aux rapports d'intensité de fluorescence entre les différentes bandes (fig. 3-49), plusieurs tendances sont à noter. Tout d'abord, les rapports d'intensité sont toujours plus importants dans le cas de la Seine que dans la Gironde ce qui traduit bien une différence de concentration entre les différents fluorophores et suggère donc qu'il existe une différence de composition de la MOD, c'est à dire que même si les constituants sont relativement identiques, les proportions de ces constituants au sein des échantillons sont différents.

D'autre part les rapports montrent dans le cas de la Gironde un effet saisonnier que ne laissent pas entrevoir les variations d'intensité. En effet, les rapports $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ et I_{β}/I_{α} augmentent à partir de la salinité 25 en hiver et décroissent à partir de cette même salinité en été. Cette même tendance est observée dans le cas de la Seine où on note également cette diminution des rapports pour les deux missions estivales et inversement, l'augmentation des rapports en avril. Malheureusement, l'absence d'échantillons de salinité supérieure à 25 en hiver ne permet pas d'observer de tendance réellement hivernale sur la Seine.

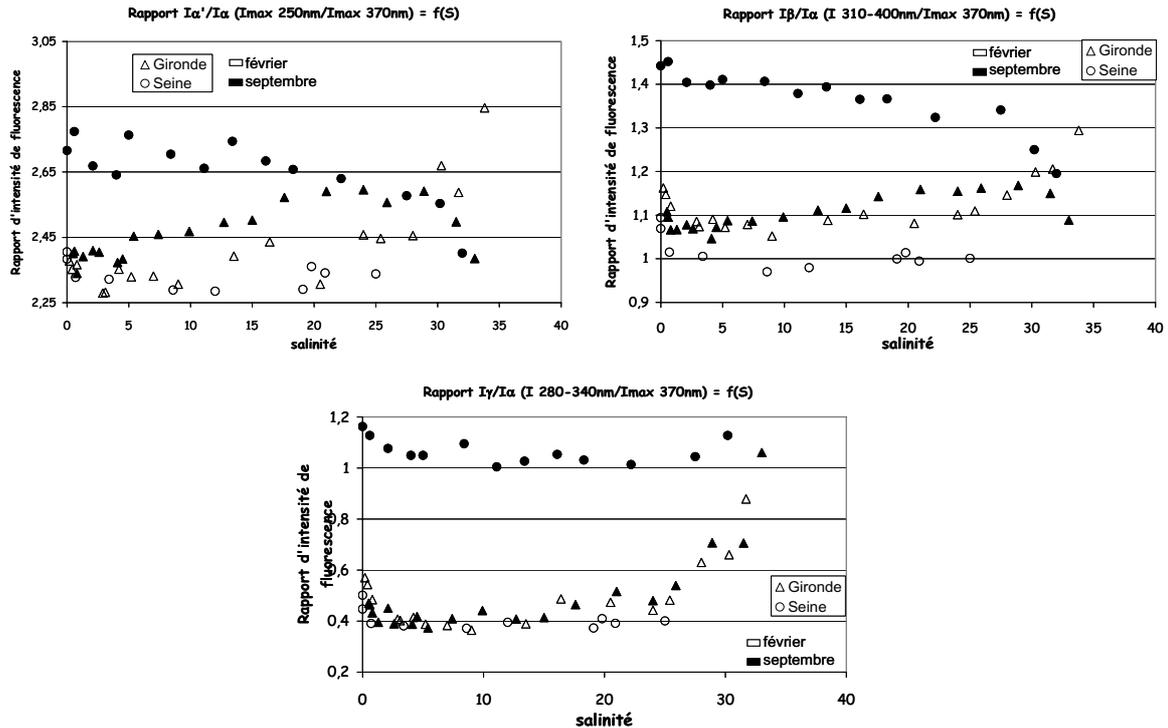


Figure 3-49. Comparaison des rapports d'intensité de fluorescence entre les différentes bandes ($I\alpha'/I\alpha$, $I\beta/I\alpha$ et $I\gamma/I\alpha$) en fonction de la salinité dans les estuaires de la Seine et de la Gironde.

Cette tendance saisonnière peut être interprétée par des caractéristiques différentes de la matière organique en fonction des saisons notamment dans la zone aval des deux estuaires (salinités > 25). Ceci peut permettre de mettre en évidence le rôle important joué par l'activité biologique plus intense en été dans cette zone et qui aboutit donc à la formation de composés organiques à des niveaux de dégradation et de maturation différents de ceux drainés par les fleuves qui sont eux prépondérants durant la période hivernale.

En ce qui concerne le rapport $I\gamma/I\alpha$, il est identique en février comme en septembre sur la Gironde et présente une augmentation à partir de la salinité 25 pour les deux saisons, traduisant la présence d'une activité biologique intense dans cette zone de fortes salinités. Cette activité biologique étonnamment intense en février peut s'expliquer par des conditions climatiques clémentes et un bel ensoleillement en février 2002 qui sont favorables au développement de blooms phytoplanctoniques hivernaux (Gohin et al., 2003 ; Labry et al., 2001).

La même tendance est observée dans le cas de la Seine avec l'augmentation de ce rapport à partir de la salinité 25 quelle que soit la saison. Cependant, les valeurs du rapport sont plus importantes en été tout au long du gradient de salinité indiquant une proportion de composés de type γ plus importante à cette période dans toute la zone soumise à l'influence de la salinité.

3-2-2- Indices d'humification et source de la MOD

Les caractéristiques de fluorescence de la matière organique dissoute sont également utilisées afin d'indiquer la source et la maturation de la MOD au travers de divers indices d'humification calculés à partir des spectres de fluorescence (Battin, 1998 ; Zsolnay et al., 1999). La détermination de ces indices est basée sur le fait que l'avancement des processus d'humification est associé à une augmentation du rapport C/H (Stevenson, 1982) et que cette augmentation se traduit par un déplacement du spectre de fluorescence vers les plus grandes longueurs d'onde d'émission (Ewald et al., 1988 ; Senesi et al., 1989). En se basant sur ces observations, deux principaux indices de fluorescence ont été introduits, f_{450}/f_{500} et HIX.

3-2-2-a Indice f_{450}/f_{500}

McKnight et al. (2001) ont introduit l'indice f_{450}/f_{500} pour les eaux naturelles qui correspond au rapport des intensités de fluorescence entre les couples de longueur d'ondes d'excitation/émission 370/450 et 370/500 nm (fig. 3-50). Ces auteurs proposent cet indice pour indiquer une origine plutôt terrestre (valeur de référence terrestre $f_{450}/f_{500} = 1,3$) ou bien aquatique/microbienne pour des eaux naturelles présentant des valeurs plus importantes de f_{450}/f_{500} (valeur de référence aquatique/microbienne $f_{450}/f_{500} = 1,9$).

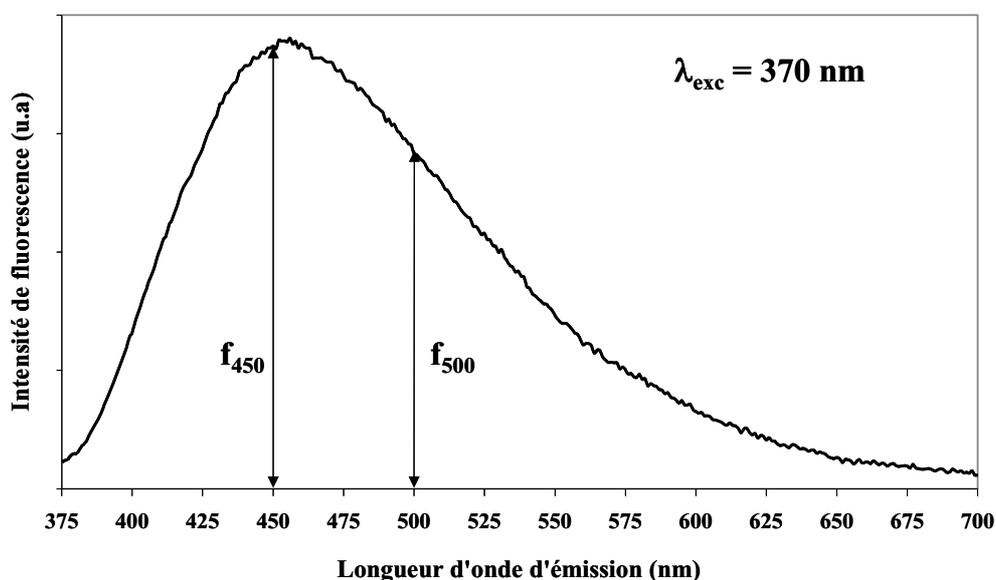


Figure 3-50. Spectre d'émission schématique pour une excitation à 370nm montrant le calcul de l'indice f_{450}/f_{500} .

Nous avons donc calculé cet indice pour les échantillons prélevés lors des gradients de salinité réalisés sur la Seine et sur la Gironde.

L'estuaire de la Seine (fig. 3-51) présente des valeurs de f_{450}/f_{500} comprises entre 1,16 et 1,31. L'évolution saisonnière de cet indice sur la Seine montre des valeurs plus faibles en janvier et durant le mois d'avril tandis que les valeurs estivales sont légèrement plus élevées. Ceci corrobore bien nos résultats précédents montrant une influence terrestre plus marquée durant la période hivernale en raison d'un fort lessivage des sols et des apports de matière organique dissoute allochtone plus important.

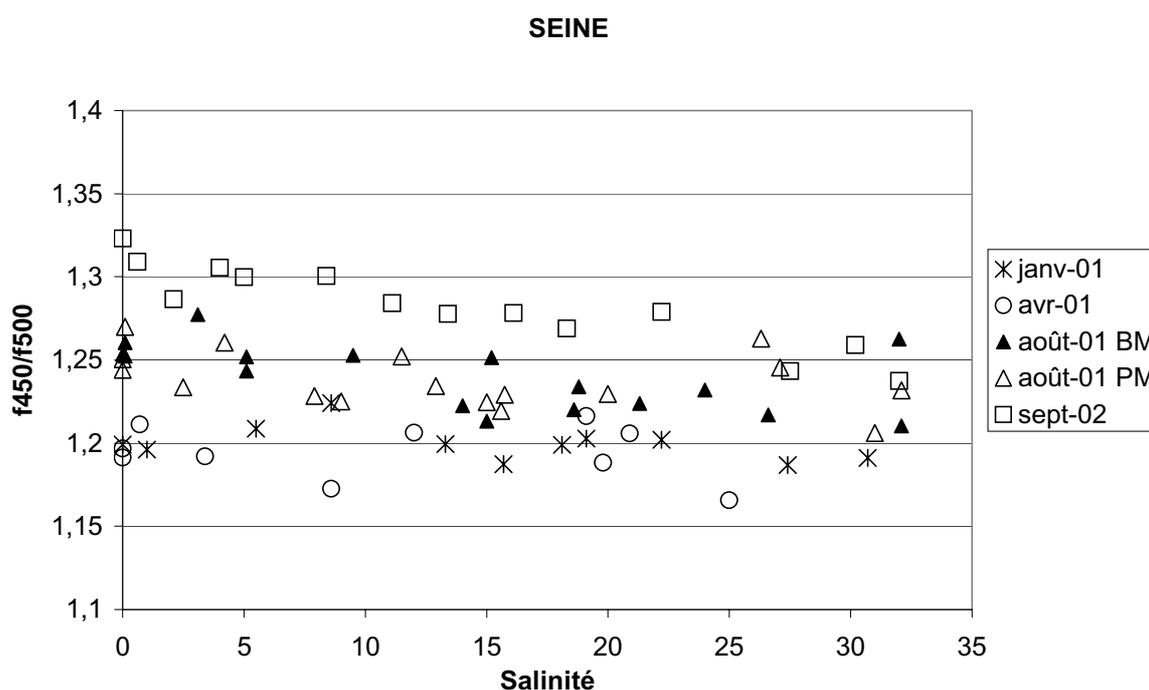


Figure 3-51. Indice de maturité de la MOD f_{450}/f_{500} en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Seine.

L'estuaire de la Gironde (fig. 3-52) présente des valeurs globalement comprises entre 1,11 et 1,22 donc légèrement plus faibles que celles obtenues sur la Seine traduisant ainsi une origine terrestre plus marquée du matériel organique. Comme dans le cas des intensités de fluorescence, il n'y a pas de différence notable entre les valeurs de f_{450}/f_{500} de la saison hivernale et celles de la saison estivale sur la Gironde.

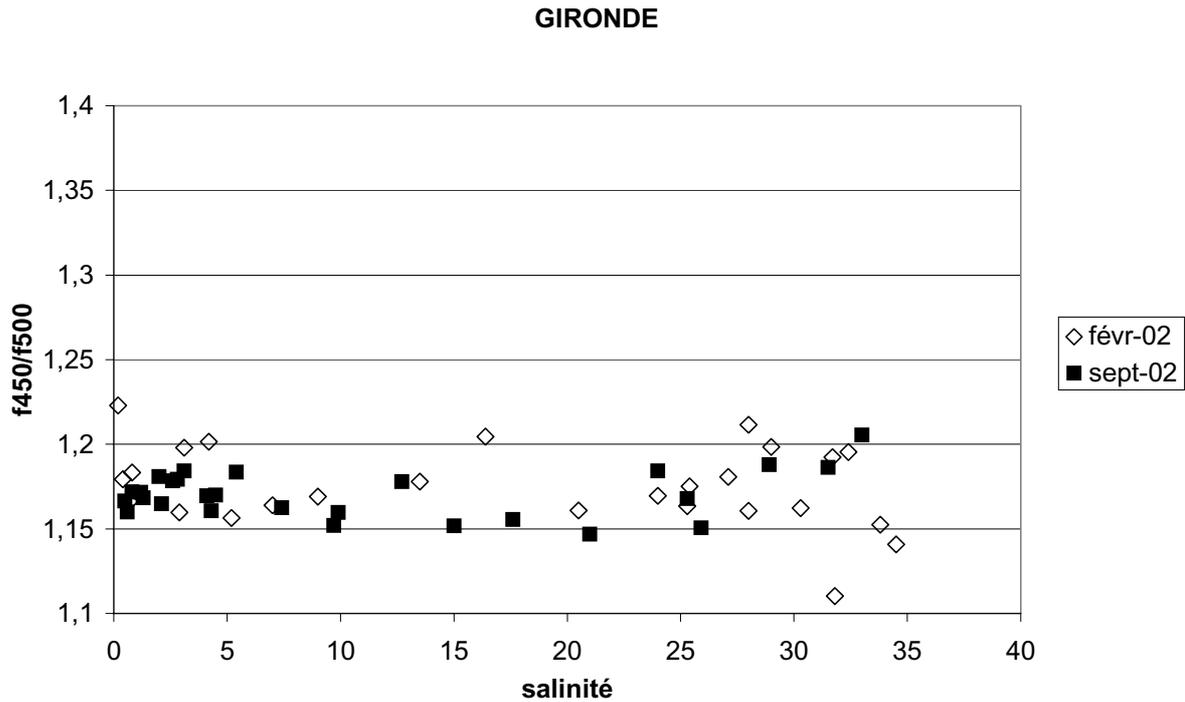


Figure 3-52. Indice de maturité de la MOD f_{450}/f_{500} en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde.

On peut noter que l'indice f_{450}/f_{500} a globalement tendance à décroître avec l'augmentation de la salinité. Ceci voudrait dire que plus l'échantillon est salé, donc d'influence marine, plus le matériel organique qu'il contient est d'origine terrestre. D'autre part, les valeurs que nous obtenons sont proches de celles trouvées par Battin (1998) pour la rivière du bassin amazonien mais sont toutes inférieures à la limite terrestre de cet indice fixée par McKnight et al. (2001).

Ces constatations permettent de définir la limite d'utilisation de cet indice. En effet, l'indice f_{450}/f_{500} a au départ été développé par McKnight et al. (2001) à partir de données concernant des acides fulviques et leurs propriétés de fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de 370nm. Ainsi, cet auteur a comparé la valeur de f_{450}/f_{500} des acides fulviques de référence IHSS Suwannee River ($f_{450}/f_{500} = 1,3$) et celle des acides fulviques extraits d'un lac antarctique totalement dominé par une source algale de matière organique ($f_{450}/f_{500} = 1,9$) afin de fixer les deux limites respectivement terrestre et aquatique de ce paramètre. Ensuite, McKnight et al. (2001) se sont basés sur cette échelle afin de caractériser directement des échantillons d'eaux naturelles.

Cette extrapolation semble à notre avis difficile à appliquer dans le cas d'échantillons naturels bruts puisque plusieurs phénomènes peuvent alors entrer en ligne de compte dans le calcul de cet indice. En effet, le déplacement du maximum d'émission de fluorescence vers les plus grandes longueurs d'onde (effet bathochrome) peut avoir plusieurs origines. Comme

cela a été dit précédemment, l'augmentation du rapport C/H peut provoquer un tel déplacement spectral. Cependant, une augmentation de la taille moléculaire peut également impliquer une augmentation de la longueur d'onde des maxima d'émission (Berger, 1984 ; Alberts et al., 2002). De nombreux auteurs ont parallèlement mis en évidence des phénomènes de floculation de composés humiques lorsque la salinité augmente (McCarthy et al., 1996 ; Van Heemst et al., 2000 ; Benner et Opsahl, 2001). Ces phénomènes de floculation peuvent alors entraîner un effet bathochrome sur les spectres de fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation de l'ordre de 340 à 370 nm dans le cas des échantillons estuariens.

D'ailleurs, nous avons observé cet effet bathochrome sur les spectres de fluorescence 3D des échantillons prélevés lors des gradients de salinités sur la Seine et la Gironde présentés dans les premières parties de ce chapitre. Les échantillons de fortes salinités présentaient à chaque fois un décalage vers les plus grandes longueurs d'onde d'émission pour une excitation à 370nm. Cependant comme nous l'avons déjà précisé il n'est pas possible de conclure définitivement sur l'origine de cet effet bathochrome entre la floculation du matériel humique et la présence d'un nouveau type de fluorophore lié à une activité biologique et émettant à de plus grandes longueurs d'onde dans ces échantillons.

Considérant que plusieurs phénomènes peuvent donc conduire à des variations de la longueur d'onde d'émission de fluorescence pour une excitation à 370 nm, il nous semble alors tout à fait délicat d'utiliser le paramètre f_{450}/f_{500} pour caractériser sans ambiguïté une source prédominante de la MOD dans des échantillons bruts d'eaux estuariennes. D'ailleurs, Jaffé et al. (2004) qui ont utilisé ce paramètre dans une zone de mangrove en ont tiré quasiment les mêmes conclusions en soulignant également l'effet que peut avoir l'irradiation UV sur l'évolution de ce paramètre. Ainsi, il semble plus judicieux de limiter l'utilisation de ce paramètre de fluorescence à la caractérisation des substances humiques extraites d'eaux naturelles pour lesquelles il a été développé initialement (acides fulviques en particulier) puisqu'il semble peu adapté à la caractérisation globale d'échantillons présentant une fraction potentiellement importante de composés non humiques et soumis à des sources de MOD aussi diverses et variés que les systèmes estuariens.

3-2-2-b Indice d'humification HIX

De la même façon, Zsolnay et al. (1999) ont introduit un indice d'humification de la MOD dans les sols noté HIX qui permet de comparer des échantillons en terme de maturation de la MOD. Cet indice est calculé en effectuant le rapport des aires entre les domaines H et L

du spectre d'émission pour une excitation à 254nm (fig. 3-53). Ces deux domaines sont délimités entre les longueurs d'ondes d'émission 300 et 345nm pour L et entre 435 et 480 nm pour H. La valeur de HIX est alors donnée par le rapport H/L. Des fortes valeurs de HIX indiquent une prédominance de composés émettant à de plus grandes longueurs d'ondes et donc présentant un rapport C/H plus élevé qui traduit alors un matériel organique plus humifié.

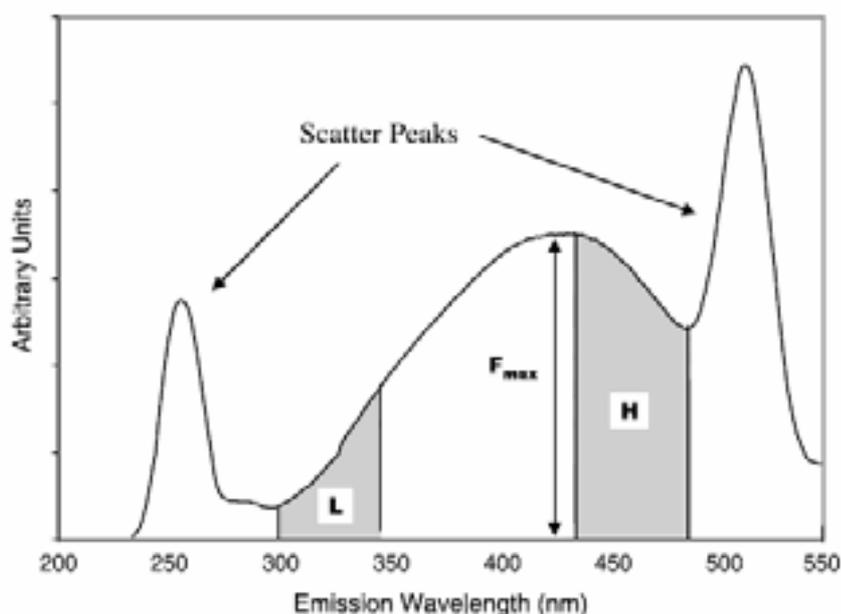


Figure 3-53. Spectre d'émission schématisé pour une excitation à 254nm permettant le calcul de l'indice HIX (adapté de Zsolnay, 2003).

L'indice d'humification HIX permet ainsi de différencier les sources de MOD par exemple entre des produits de lyses de cellules microbiennes et des composés plus humifiés (Zsolnay et al., 1999 ; Zsolnay, 2003). De même, Kalbitz et al. (2003a) ont montré que l'indice HIX permet de juger de la complexité et du degré de condensation de la MOD et que ce paramètre donne une indication sur la relative stabilité des composés organiques vis à vis de l'activité microbienne.

Cependant, l'indice HIX a toujours été utilisé jusqu'à présent dans le cadre de l'étude de la MOD issue des sols (Zsolnay et al., 1999 ; Kalbitz et al., 2000 ; Cox et al., 2000 ; Marshner et Kalbitz, 2003, Kalbitz et al., 2003b) et la figure 3-54 présente les valeurs obtenus pour différents types d'échantillons. Cet indice HIX n'a jusqu'à présent jamais été déterminé dans le cas d'échantillons provenant de systèmes aquatiques tels que des rivières, des estuaires ou des eaux marines et nous avons donc tenté de calculer cet indice pour les échantillons prélevés lors des gradients de salinités que nous avons effectués sur les estuaires de la Seine et de la Gironde.

La figure 3-55 présente l'évolution de l'indice d'humification HIX en fonction de salinité pour les quatre missions d'échantillonnage réalisées sur l'estuaire de la Seine.

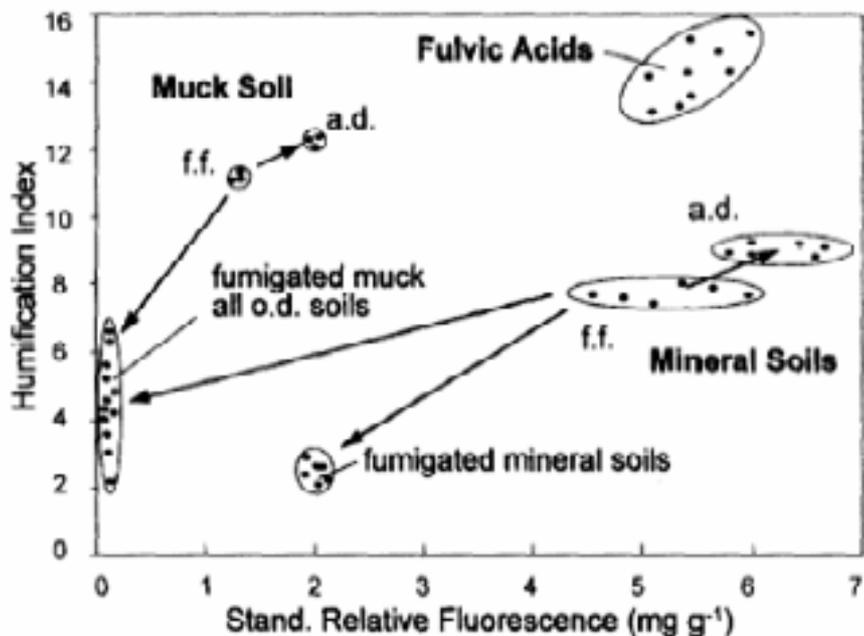


Figure 3-54. Valeurs de l'indice HIX pour différents types de sols (adapté de Zolnay et al., 1999)

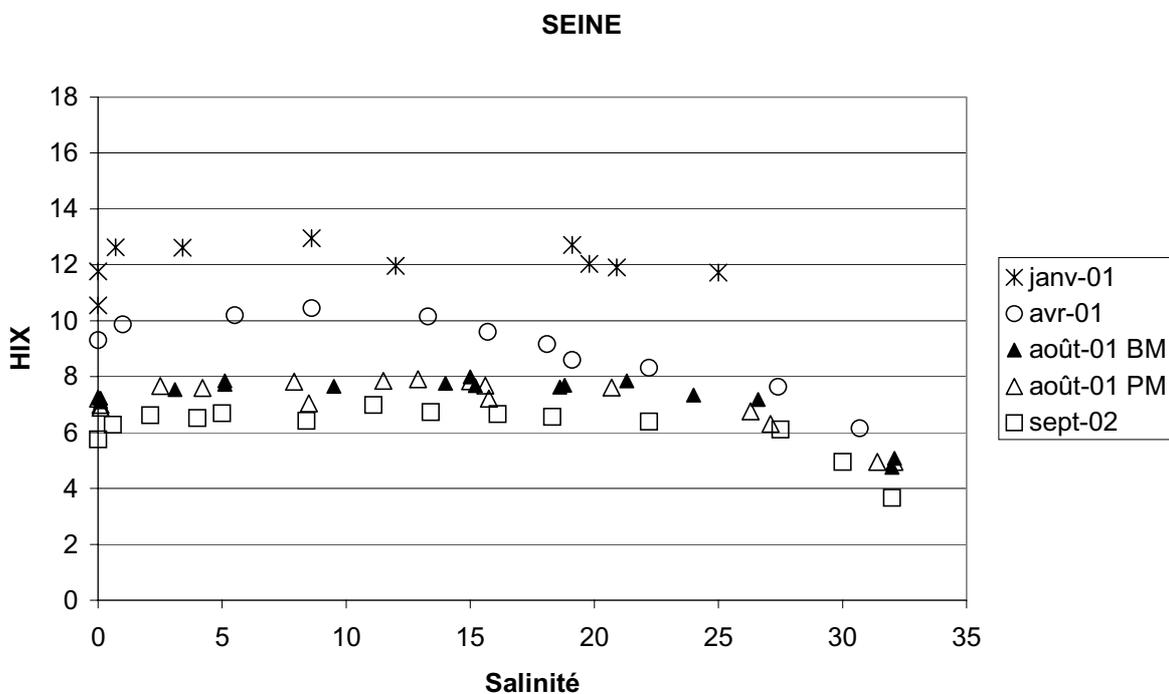


Figure 3-55. Indice d'humification HIX en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Seine.

Les valeurs de cet indice sont maximales en ce qui concerne la période de janvier 2001 et sont relativement constantes aux alentours de 12 quelque soit la salinité. Cela indique des composés plus humifiés durant la période hivernale ayant probablement une origine principalement due au lessivage des sols plus important en cette période. En avril, les valeurs sont un peu plus faibles, de l'ordre de 10 jusqu'à la salinité 15 puis diminuent progressivement pour les salinités plus élevées. Ceci indique qu'à partir de la salinité 15 les composés organiques provenant de la partie fluviale commencent à se mélanger à d'autres composés moins humifiés qui sont soit produits dans l'estuaire, soit proviennent d'une origine marine. En période estivale, les valeurs de HIX sont encore plus faibles attestant de la présence composés moins humifiés probablement en raison d'une activité biologique plus intense sur toute la zone de l'estuaire comme nous l'avons fait remarquer dans la partie précédente. Les valeurs sont comprises entre 7 et 8 pour l'été 2001 avant de chuter au delà de la salinité 25 indiquant alors une influence marine plus marquée et l'apport d'un matériel organique d'origine biologique peu humifié. Il est à noter qu'aucune différence significative n'apparaît entre les valeurs relatives aux conditions de pleine mer et celles de basse mer. Pour l'été 2002, les valeurs de HIX sont encore plus faibles (6 à 7) et chutent de la même façon qu'en 2001 pour les salinités supérieures à 25 et atteignent également des valeurs comprises entre 4 et 5.

Les résultats concernant l'estuaire de la Gironde sont présentés sur la figure 3-56. La tendance est relativement la même que celle observée sur la Seine, c'est à dire des valeurs de HIX relativement stables dans la partie amont, qui décroissent ensuite progressivement à partir de la salinité 25 environ.

Les valeurs de HIX sont globalement supérieures (≥ 10 jusqu'à la salinité 25) à celles observées sur la Seine, ce qui indique un matériel organique fluorescent plus humifié dans l'estuaire de la Gironde. Ceci est d'autant plus marqué que dans les deux estuaires, les échantillons de plus fortes salinités présentent des valeurs similaires de l'indice HIX comprises entre 4 et 5.

Nous avons calculé parallèlement cet indice HIX pour un échantillon purement marin prélevé au milieu de l'océan Atlantique dont la MOD est caractéristique d'une origine phytoplanctonique ou bactérienne. Le spectre 3D de cet échantillon d'eau marine est présenté dans la figure 1 (p. 61) de la partie concernant les « remarques préliminaires à l'interprétation des spectres de fluorescence ». La valeur obtenue est de 2,81 et permet de donner ainsi une valeur limite d'un HIX « marin ».

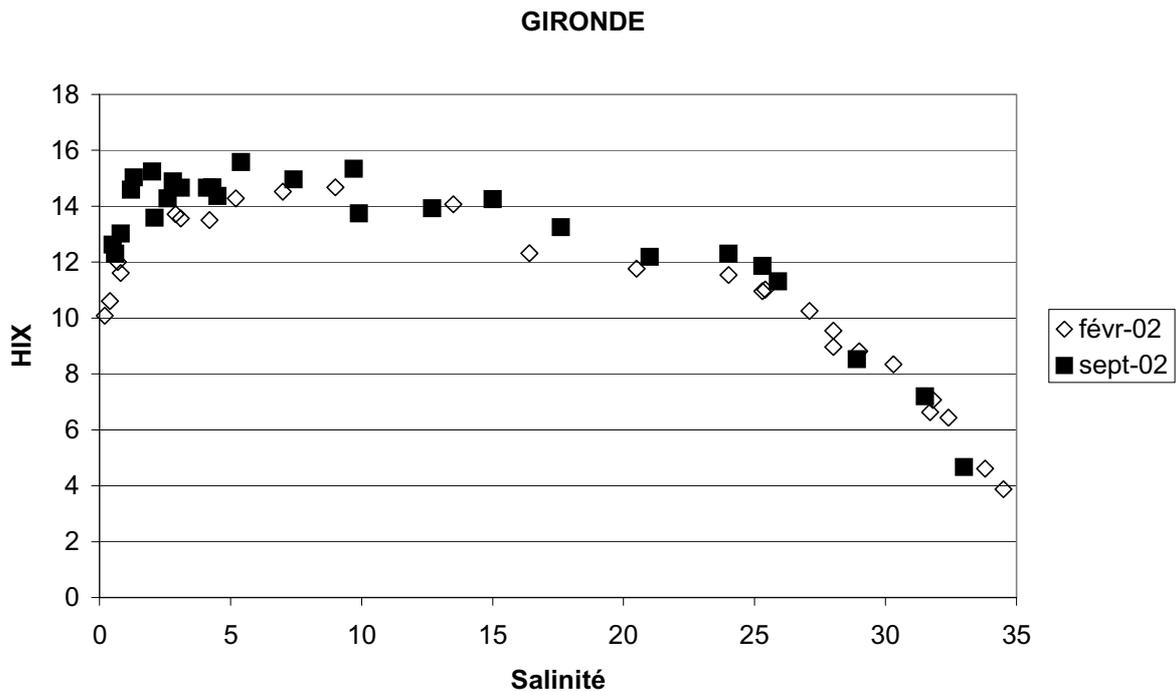


Figure 3-56. Indice d'humification HIX en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde.

Les échantillons de la Seine et de la Gironde pour les plus fortes salinités présentent des valeurs de l'indice HIX de l'ordre de 4 qui sont au dessus de cette valeur marine. Il s'agit donc bien d'échantillons présentant un caractère marin très marqué avec également une très légère composante humique terrigène. L'utilisation de l'indice HIX semble donc bien adapté à la détermination de l'origine de la MOD.

Comme dans le cas des intensités de fluorescence et contrairement à l'estuaire de la Seine, l'indice HIX ne présente pas de différence entre les deux saisons étudiées si ce n'est dans la partie des faibles salinités. En effet, les valeurs de HIX en février sont plus faibles que celles de septembre entre les salinités 0 et 5. Ceci peut s'expliquer par la présence du bouchon vaseux dans cette partie de l'estuaire en septembre. La MOD fluorescente du bouchon vaseux semble donc caractérisée par un matériel plus humique, ce qui correspond bien aux conclusions que nous avons formulées dans les parties précédentes.

Il nous faut également signaler que Ohno (2002) a proposé une correction au calcul de cet indice HIX afin de s'affranchir des effets de filtre interne. Nous avons effectué cette correction mais nous ne présentons pas ici ces résultats puisque l'utilisation de cet indice HIX corrigé nous a conduit exactement aux mêmes profils d'évolution de l'indice en fonction de la salinité. Ceci est dû au fait que nous contrôlons l'absorbance des échantillons afin qu'elle soit inférieure à 0,1 u.a. préalablement à chaque mesure de fluorescence. Cette condition permet d'éliminer les effets de filtre interne et elle est absolument indispensable lors des analyses par

fluorescence afin d'évoluer dans un domaine de linéarité entre intensité de fluorescence et concentration des composés.

L'utilisation de l'indice d'humification HIX défini par Zsolnay semble donc utile pour caractériser globalement et de façon simple et rapide le degré d'humification et donc le caractère plus ou moins réfractaire du contenu organique des échantillons d'eaux naturelles.

Il est malheureusement impossible pour l'instant de comparer nos valeurs de HIX avec d'autres données de la littérature puisqu'elles concernent toutes de la MOD issues des sols et que notre étude est la première à considérer le paramètre HIX au niveau d'échantillons issus des systèmes aquatiques naturels.

De plus, il est important de noter que cet indice s'attache en fait à l'étude d'un seul fluorophore (α' , $\lambda_{\text{ex}} = 230$ à 260 nm, $\lambda_{\text{em}} = 380$ à 480 nm) et ne rend pas compte de l'intégralité des différents composants de la MOD contenus dans un échantillon.

Cette constatation est d'autant plus vraie que si l'on compare les valeurs de HIX entre les conditions de basse mer et de pleine mer de la mission d'août 2001 sur la Seine on remarque qu'elles sont identiques en ce qui concerne les échantillons les plus salés ($S > 30$). Or, on peut se rappeler que les spectres d'émission de ces mêmes échantillons pour une excitation à 310 nm (fig. 3-57) présentaient une très nette différence en terme d'influence de la composante β . Ceci nous permet d'imaginer l'introduction d'un nouvel indice pour juger de la présence du fluorophore β , préalablement attribué à l'activité biologique autochtone.

3-2-2-c Indice de fluorescence relatif au fluorophore β

Si l'on considère la figure 3-57, et donc le spectre d'émission à 310 nm, on peut imaginer suivre l'influence relative du fluorophore β en divisant l'intensité de fluorescence émise à 380 nm par celle émise à 430 nm qui correspond à l'influence de la bande α en se basant sur le fait de l'élargissement vers les plus courtes longueurs d'ondes du spectre d'émission lors de la présence de l'épaule β (De Souza Sierra, 1994 ; Coble, 1996 ; Parlanti et al., 2000a).

Ce type de paramètre peut éventuellement être plus représentatif que le rapport I_{β}/I_{α} utilisé précédemment, puisqu'il ne s'agit plus ici de rapport de contribution relative entre deux fluorophores mais de l'influence de l'épaule β au sein du massif fluorescent à 310 nm.

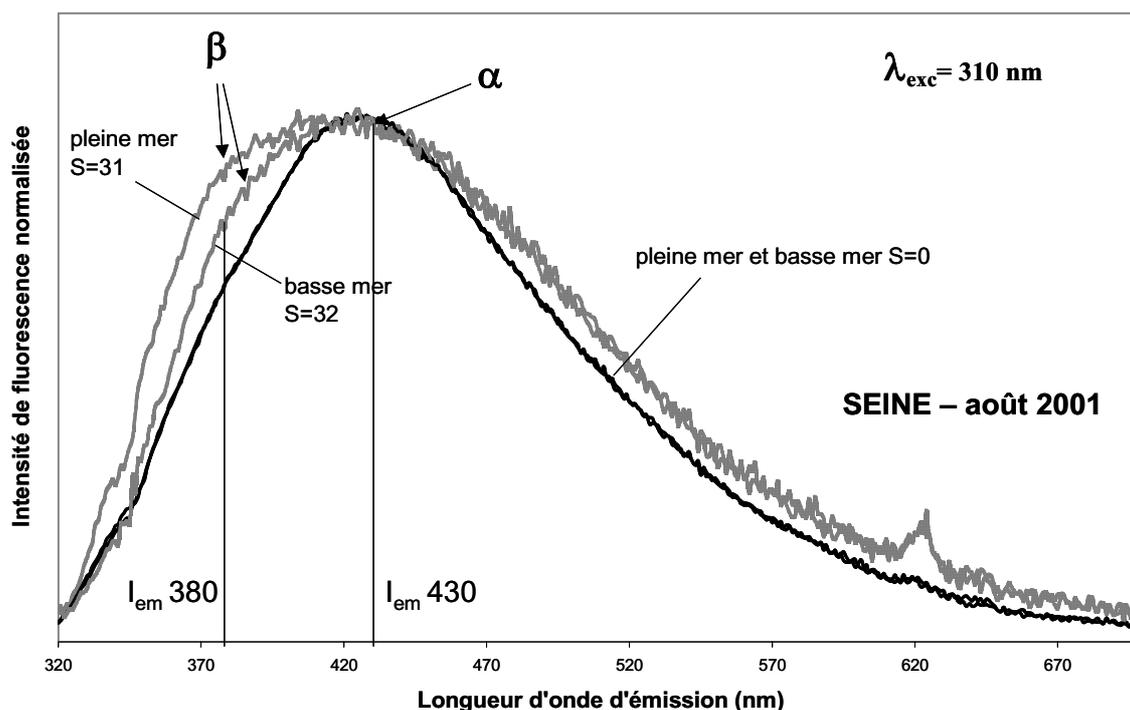


Figure 3-57. Spectres d'émission normalisés (excitation 310nm) des échantillons de salinité 0 et de salinité 31 et 32 prélevés lors des gradients de pleine mer et de basse mer respectivement (Seine, Nuts 01, août 2001).

Les figures 3-58 et 3-59 présentent donc ce rapport d'intensités $I_{em} 380 / I_{em} 430$ pour une excitation à 310 nm calculé pour l'estuaire de la Seine et celui de la Gironde respectivement et que nous allons noter dorénavant **f380/f430**.

Pour la Seine (fig. 3-58), la saison hivernale est caractérisée par de faibles valeurs identiques à celles observées dans le cas de la Gironde (fig. 3-59). En avril, les valeurs sont un peu plus élevées notamment à partir de la salinité 10. Durant la période estivale, les valeurs sont encore plus élevées et ceci sur toute la gamme de salinités considérées. Ceci confirme les résultats que nous avons présentés précédemment concluant à une activité biologique plus intense sur la Seine et ceci sur toute la zone de l'estuaire. De même ceci montre une nouvelle fois que la composante β est clairement rattachée à une activité biologique et non uniquement à du matériel marin puisqu'il y a une augmentation de cette composante entre l'hiver et l'été pour la salinité 0. Pour les échantillons de fortes salinités on note une très forte augmentation du rapport f380/f430 indiquant une présence plus marquée du fluorophore β . Ceci provient d'une part de la dilution du matériel humique dans les eaux marines et d'autre part de la plus forte activité biologique dans le milieu marin. D'ailleurs les valeurs les plus fortes sont

obtenues pour les conditions de pleine mer d'août 2001 (salinité 32) qui montrent ainsi une différence avec les conditions de basse mer, ce qui n'était pas visible avec l'indice HIX.

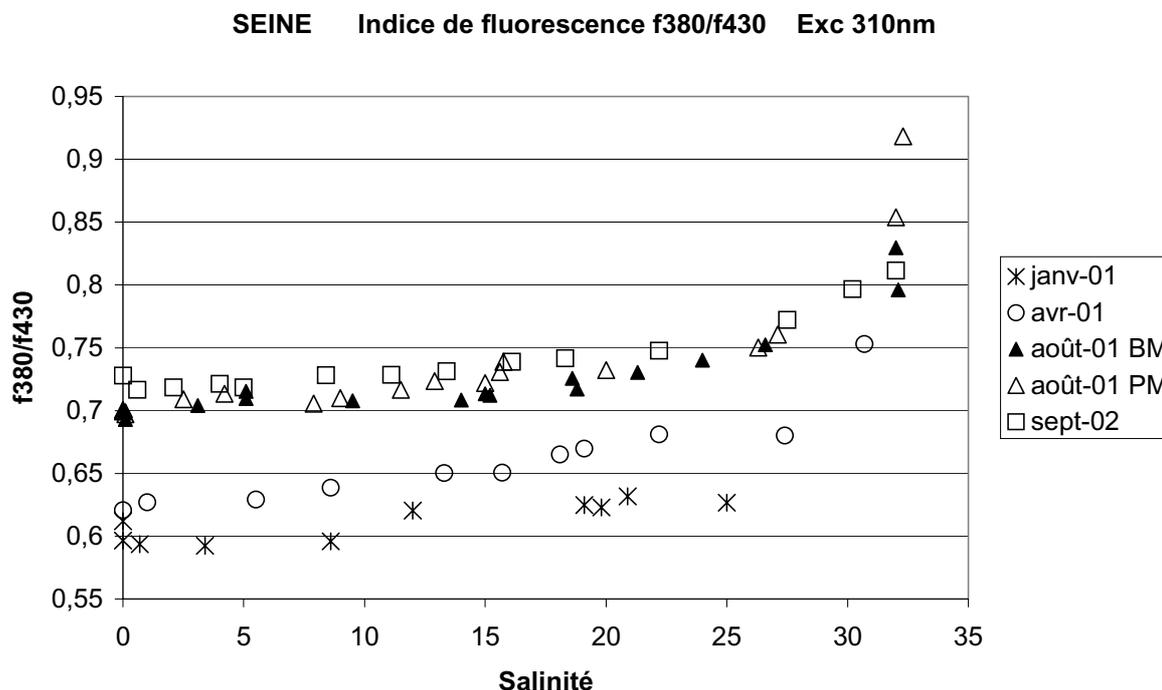


Figure 3-58. Indice de fluorescence f380/f430 en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Seine.

Dans le cas de la Gironde (fig. 3-59) on ne remarque à nouveau aucune différence saisonnière notable tandis que pour la Seine l'effet saisonnier se traduit par une augmentation des valeurs du rapport entre l'hiver et l'été. Les valeurs du rapport f380/f430 sont globalement plus faibles sur la Gironde que sur la Seine indiquant donc une plus faible activité de la bande β dans la Gironde. Les valeurs du rapport sont relativement constantes jusqu'à la salinité 20 environ et augmentent fortement par la suite traduisant la présence d'une composante biologique plus marquée dans les eaux marines.

De la même façon que pour l'indice HIX nous avons calculé la valeur de f380/f430 pour le même échantillon d'eau marine (fig. 2-8, p. 61) qui présentait une bande β très nette. Pour cet échantillon, la valeur obtenue pour f380/f430 est de 1,10. Cette valeur est bien supérieure à celles obtenues pour la Seine et la Gironde aux fortes salinités. Cet indice de fluorescence semble également bien adapté pour estimer globalement la composante biologique autochtone au sein des échantillons d'eaux naturelles.

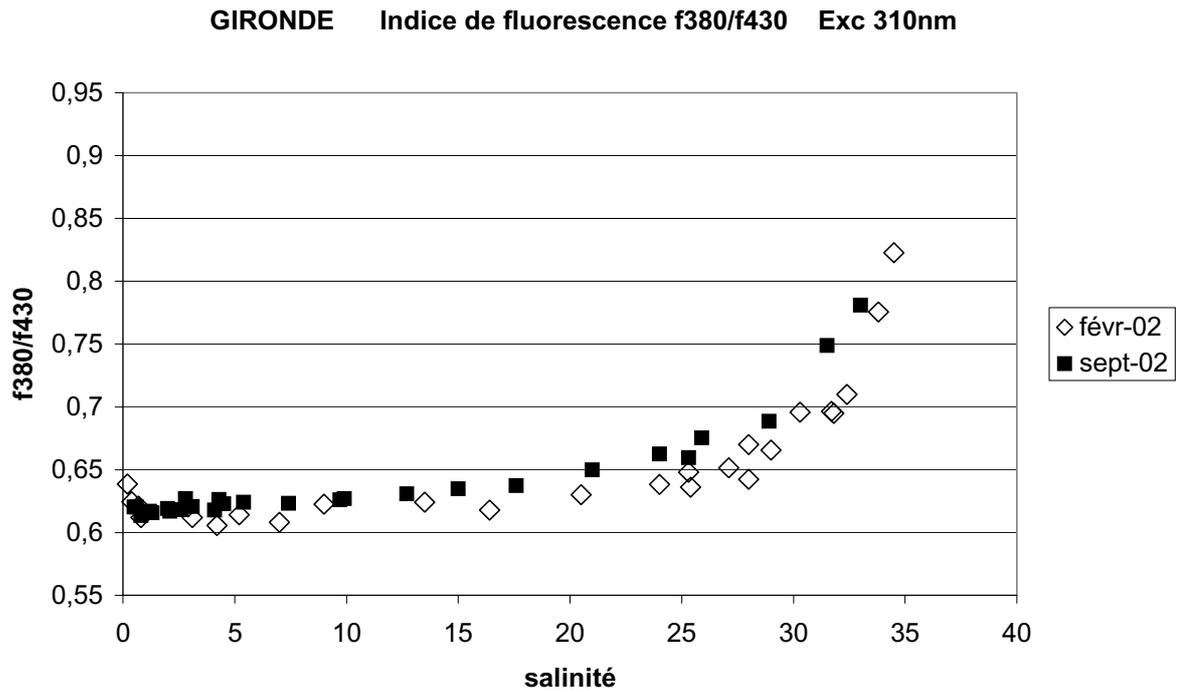


Figure 3-59. Indice de fluorescence f380/f430 en fonction de la salinité dans l'estuaire de la Gironde.

4- CONCLUSION

Les estuaires de la Seine et de la Gironde présentent donc des différences marquées de caractéristiques et de concentrations de la MOD fluorescente en fonction des saisons bien que l'étude des rapports d'intensité de fluorescence ait permis de mettre en évidence des similitudes d'évolution de la MOD en fonction de la salinité commune aux deux estuaires.

Les composés γ de type protéiques semblent être principalement liés tout au long de l'année à l'activité biologique marine puisque prépondérants dans les eaux de salinité supérieure à 25. Néanmoins, l'étude de la partie amont de l'estuaire de la Seine (paragraphe 1-3) a montré qu'il existe une grande variabilité des apports en MOD en fonction des saisons et des sites considérés, mettant en avant la présence de sources ponctuelles de matériel organique dissous de ce type.

La zone de salinités comprises entre 0 à 25 semble être moins réactive vis à vis de la production et de la dégradation de ce matériel labile sauf en été dans le cas de la Seine. Il se peut que cette différence soit liée à la présence et à l'influence du bouchon vaseux comme cela a été suggéré au cours de ce chapitre. En effet, le bouchon vaseux de la Seine est saisonnier. Il se forme au début du printemps pour disparaître à la fin de l'automne avec l'arrivée des fortes précipitations et des crues hivernales. De son côté, la Gironde possède un bouchon vaseux très étendu et très turbide tout au long de l'année qui limite fortement la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau.

Ainsi, afin de mettre en évidence de façon plus précise le rôle du bouchon vaseux dans le fonctionnement estuarien, les chapitres suivants vont s'attacher à mieux comprendre l'influence du bouchon vaseux sur les caractéristiques de la matière organique dissoute lors du mélange des eaux fluviales et marines.

Par ailleurs, Bien que la fluorescence de la MOD de la Seine et de la Gironde soit dominée par les signaux relatifs aux substances humiques, l'utilisation des rapports d'intensités et des indices de fluorescence HIX et f380/450 a permis de distinguer encore plus précisément la MOD fluorescente des deux estuaires.

Le rapport d'intensités $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ est le plus communément utilisé dans la littérature pour caractériser l'évolution relative des fluorophores caractéristiques des substances humiques α et α' (Patel-Sorrentino et al., 2002 ; Mounier et al., 1999, De Souza Sierra et al., 1994 ; Coble

et al., 1990, 1996). Il est utilisé comme indicateur du caractère plutôt juvénile ou bien mature du matériel humique au sein d'échantillons d'eaux naturelles (Patel-Sorrentino et al., 2002).

Les résultats que nous avons obtenus dans ce chapitre montrent une grande variabilité de ce rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ dans les estuaires de la Seine et de la Gironde en fonction des conditions environnementales (saison, salinité). Ainsi, même si une tendance d'évolution saisonnière globale de ce paramètre en fonction de la salinité peut être mise en évidence (fig. 3-49) dans chacun de ces estuaires, il est difficile d'associer les valeurs obtenues à des caractéristiques particulières de la MOD dans les systèmes estuariens. Il convient donc d'utiliser le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ avec précaution pour caractériser la MOD fluorescente des échantillons estuariens et d'associer la mesure de ce paramètre avec la détermination de l'indice HIX pour discuter de l'état de maturation de la MOD.

Le rapport I_{γ}/I_{α} et les indices de fluorescence HIX et f_{380}/f_{450} , semblent être bien adaptés à la caractérisation de matériel organique dissous dans les estuaires. Nous avons regroupé dans le tableau 3-3 les gammes de valeurs obtenues pour ces trois indices de fluorescence et les caractéristiques de la MOD associées à ces valeurs. Ce tableau pourrait ainsi servir de base pour proposer un diagnostic simple des caractéristiques de la MOD à partir de la mesure de ces indices dans des échantillons d'eaux estuariennes ou côtières.

En effet, les valeurs élevées de l'indice HIX traduisent les caractéristiques d'un matériel organique fortement humifié témoignant d'une origine terrigène prépondérante. Les valeurs les plus faibles de cet indice indiquent un matériel organique peu mature donc une origine récente et autochtone de la MOD quasi exclusive. Les valeurs intermédiaires traduisent donc le mélange de ces deux composantes.

Le fluorophore β est associé à l'activité biologique autochtone et l'indice f_{380}/f_{430} permet donc de juger de l'intensité de cette activité. Les fortes valeurs de cet indice indiquent une très forte activité biologique et donc une origine autochtone prépondérante de la MOD.

Le rapport d'intensité I_{γ}/I_{α} renseigne lui aussi sur le caractère autochtone récent de la MOD puisque le fluorophore γ est attribué à des composés labiles mais distincts des composés de type β , tandis que α est associé à des composés humiques donc plus matures.

Il faut également noter la complémentarité entre ces différents indices et rapports. Les indices HIX et f_{380}/f_{430} renseignent sur les caractéristiques d'un échantillon dans sa globalité (caractère humique ou origine biologique récente prépondérante) et permettent la

comparaison avec d'autres échantillons. Les rapports d'intensités de fluorescence permettent d'estimer les rapports de concentrations entre les composés au sein d'un même échantillon, et les modifications des proportions de ces composés d'un échantillon à un autre.

Indice de fluorescence	Ordre de grandeur	Caractéristiques de la MOD	Localisation
HIX	16 - 10	Caractère humique fort - apports terrigènes importants	Estuaire turbide ou en période hivernale, lessivage des sols
	10 - 6	Composante humique importante + composante autochtone récente	Zone estuarienne (S<30) en période estivale
	6 - 4	Caractère humique terrigène faible + composante autochtone récente importante	Zone aval des estuaires - S>30
	<4	Origine biologique ou bactérienne aquatique	Eaux marines
f380/f430	0,6 - 0,7	Faible activité biologique	Estuaire turbide ou en période hivernale
	0,7 - 0,8	Activité biologique moyenne	Estuaire en période estivale
	0,8 - 1	Forte activité biologique	Zone aval des estuaires
	>1	Origine biologique ou bactérienne aquatique	Eaux marines
Rapport I_γ/I_α	<0,75	Caractère humique dominant	Estuaire turbide ou en période hivernale
	0,75 - 1,4	Composante autochtone : composés organiques labiles	Estuaire en période estivale ou zones en aval (S>25)
	>1,4	Origine biologique ou bactérienne aquatique	Eaux marines

Tableau 3-3. Origine et caractéristiques de la MOD associées aux gammes de valeurs obtenues pour les indices de fluorescence (HIX, f380/450 et I_γ/I_α) dans les estuaires de la Seine et de la Gironde.

CHAPITRE 4

ETUDE DES PROPRIETES ET DES MODIFICATION DE LA MOD DANS LE SYTEME BOUCHON VASEUX PAR ULTRAFILTRATION

Lors des rappels bibliographiques du chapitre 1 nous avons donné un aperçu de la complexité de la matière organique dissoute dans les systèmes aquatiques naturels et précisé que l'effort de caractérisation de ces substances entamé depuis des décennies se poursuit toujours.

Parmi toutes les techniques analytiques qui ont été utilisées et développées pour la caractérisation de la MOD, la méthode spectrofluorimétrique que nous avons utilisée dans le chapitre précédent donne des informations globales qui rendent compte de propriétés particulières de fluorescence des échantillons à relier à des caractéristiques structurales, mais elle ne permet pas une identification moléculaire précise des constituants de la MOD. D'un autre côté, les méthodes de caractérisation moléculaire classiques (RMN, GC-MS) se heurtent au caractère hétérogène complexe de la MOD qui rend difficile l'interprétation des résultats ainsi qu'aux faibles concentrations dans les eaux.

Ainsi, le couplage de diverses techniques d'extraction, de séparation et d'analyse semble aujourd'hui totalement indispensable afin de progresser dans la caractérisation de la MOD que ce soit en terme de structure moléculaire, de propriétés physico-chimiques ou de rôle dans l'environnement.

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le comportement de la matière organique dissoute fluorescente le long des estuaires de la Seine et de la Gironde. Nous avons pu observer les modifications des propriétés de fluorescence des échantillons en fonction de la salinité durant le mélange des eaux fluviales et marines et suivant les différentes saisons de prélèvement. Ceci nous a permis de mettre en évidence des caractéristiques particulières et propres à chacun des deux estuaires étudiés. Les résultats obtenus ont par ailleurs permis d'apprécier toute la complexité des systèmes estuariens et notamment du bouchon vaseux qui joue un rôle majeur dans le fonctionnement biogéochimique de ces systèmes.

Ainsi, afin de mieux préciser l'influence de cette zone de turbidité maximale sur les modifications de la MOD durant le mélange estuarien, nous allons tâcher dans ce chapitre de caractériser de façon plus précise les propriétés des composés organiques dissous au sein du bouchon vaseux en couplant l'étude par spectrofluorimétrie avec le fractionnement des échantillons par ultrafiltration tangentielle.

L'ultrafiltration est une technique de séparation permettant d'isoler des composés en solution en fonction de leur taille moléculaire. Le choix de la taille moléculaire comme critère de séparation est motivé par le fait qu'elle constitue déjà le principal critère de classification de la matière organique au sein des systèmes aquatiques puisque elle permet d'établir la limite (arbitraire) entre les domaines dissous et particulaire (0.2, 0.45 ou 0.7 μm). De la même façon, elle permet au sein de la fraction dissoute de différencier les espèces colloïdales en

fonction de leur tailles en permettant l'obtention de diverses fractions concentrées au sein des phases colloïdale et dissoute grâce à l'utilisation de membranes ayant des seuils de coupures variés (500Da, 1kDa, 3kDa, 10kDa). De plus l'ultrafiltration présente l'avantage majeur de s'effectuer sur les échantillons bruts filtrés et ne nécessite aucun solvant ni aucune étape de purification ou acidification qui pourraient modifier la nature et les propriétés des composés. Les échantillons sont donc séparés de la façon la plus naturelle possible puisque le fractionnement s'effectue en maintenant un équilibre (pH, salinité, force ionique) entre les deux côtés de la membrane (voir le protocole analytique, chapitre 2).

Ainsi, nous avons réalisé des prélèvements ciblés sur le bouchon vaseux, en amont et en aval de celui-ci, au cours des diverses missions d'échantillonnage que nous avons effectuées. Ces échantillons ont alors été analysés par spectrofluorimétrie 3D et fractionnés par ultrafiltration. Chaque fraction obtenue a alors été à nouveau analysée par fluorescence afin de déterminer dans chaque fraction de taille moléculaire la distribution des fluorophores caractéristiques de la MOD dans les deux estuaires.

Nous avons également réalisé préalablement à chaque échantillon un blanc d'expérience qui consiste à fractionner par ultrafiltration un volume identique d'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore). Toutes les fractions de blancs d'expérience ont subi une analyse par spectrofluorimétrie 3D et les matrices obtenues ont ainsi été soustraites des matrices des fractions de chaque échantillon.

Pour déterminer la distribution en fonction de la taille moléculaire du carbone organique dissous, nous avons mesuré les teneurs en COD de chaque fraction auxquelles ont été soustraites les teneurs en COD mesurées des fractions correspondantes des blancs d'expérience. Les fractionnements ont été effectués en respectant pour chaque seuil de coupure un facteur de concentration de l'ordre de 9 pour le rétentat. Le bilan massique a alors été effectué en multipliant les teneurs en COD obtenues par les volumes récupérés. Les pertes ont été déterminées par différence avec la quantité de carbone mesurée dans les échantillons initiaux.

1- ESTUAIRE DE LA GIRONDE

L'échantillonnage sur l'estuaire de la Gironde a consisté à prélever des échantillons d'eau en amont, en aval et au cœur du bouchon vaseux (BV) afin de mieux apprécier les modifications de la MOD fluviale lors de son transit au travers du BV et donc de son mélange avec la masse d'eau marine.

De plus, nous avons également différencié nos prélèvements entre les échantillons de surface, de fond et intermédiaires afin de rendre compte de différents paramètres tels que l'éclairement lumineux, les gradients de salinité et de turbidité, les phénomènes de floculation, sédimentation et remise en suspension dans la colonne d'eau.

1-1- Caractérisation fluorimétrique des échantillons bruts

L'étude des propriétés de fluorescence de la MOD au sein du bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde a été effectuée au cours de trois missions d'échantillonnages réalisées en collaboration avec H. Etcheber et G. Blanc (DGO, université Bordeaux 1). Ces trois missions dénommées GIMET 2, 3 et 4 ont eu lieu respectivement en mars, juin et septembre 2001. Les spectres de fluorescence 3D des échantillons correspondant à ces trois missions sont présentés dans l'annexe 1 et montrent des caractéristiques relativement similaires. Ceci rejoint les résultats observés dans le chapitre précédent montrant une homogénéité globale dans l'estuaire de la Gironde de la fluorescence de la MOD qui est principalement dominée par le signal relatif aux substances humiques caractérisé par les bandes α et α' .

D'autres part, comme dans le cas de l'année 2002, aucune modification saisonnière particulière n'a été observée en terme de concentration du matériel fluorescent dissous puisque les intensités de fluorescence sont relativement semblables pour les trois saisons considérées.

On remarque comme caractéristiques générales une intensité de fluorescence plus importante dans le bouchon vaseux qu'en amont de celui-ci comme ceci avait déjà été montré dans le chapitre précédent et ensuite l'intensité diminue en aval en raison de la dilution du matériel organique dans les eaux marines.

En ce qui concerne l'évolution dans la colonne d'eau, les échantillons de l'amont sont parfaitement homogènes tandis que dans le bouchon vaseux, l'intensité est beaucoup plus importante au fond pour les mois de mars et juin 2001 principalement. Ce phénomène résulte vraisemblablement de la remise en suspension de sédiment lors du renversement de marée (Abril et al., 1999) qui entraîne la libération de matériel organique dissous fluorescent

provenant soit de l'eau interstitielle, soit de la défloculation de macromolécules organiques liées aux particules de sédiment.

Le suivi de la teneur en carbone organique dissous (fig. 4-1) rend bien compte de cette très forte augmentation de la surface vers le fond pour le bouchon vaseux au le mois de juin par rapport au mois de septembre. Ceci concorde bien avec les travaux de Abril et al. (1999) qui ont montré l'augmentation de la teneur en COD dans la crème de vase et au fond de la colonne d'eau lors de la remise en suspension de matériel particulaire dans l'estuaire de la Gironde. L'homogénéité dans la colonne d'eau des échantillons de septembre provient du fait que les prélèvements ont été réalisés à un moment du cycle de marée (étale de pleine mer) où une partie importante des matières en suspension a sédimenté.

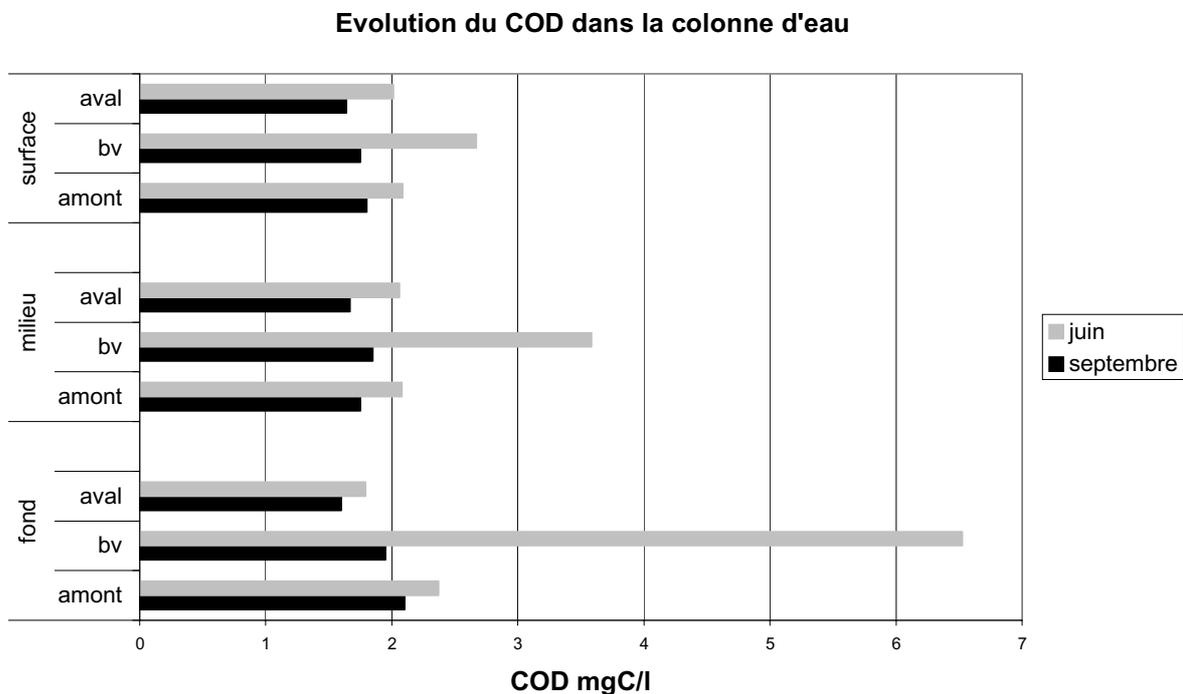


Figure 4-1. Teneurs en COD des échantillons prélevés en 2001 sur l'estuaire de la Gironde durant les missions GIMET 3 (Juin) et GIMET 4 (Septembre).

En aval du bouchon vaseux on remarque une très légère diminution de l'intensité de fluorescence qui s'accompagne d'une légère diminution du COD (fig. 4-1). Ceci s'explique par une dilution du matériel organique plus importante au fond qu'en surface que traduit un gradient de salinité croissant de la surface ($S=18$) vers le fond ($S=26$) en aval du BV. Le rapport d'intensité des bandes de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ présenté sur la figure 4-2 montre encore une fois les particularités du bouchon vaseux et notamment de l'échantillon du fond de juin 2001 qui indique alors des propriétés de fluorescence différentes de la MOD libérée lors de la remise en suspension de sédiment par rapport à celle se trouvant dans la colonne d'eau. Au

regard de ces résultats et afin de définir plus précisément les caractéristiques de la MOD au niveau du bouchon vaseux nous avons décidé de fractionner par ultrafiltration les échantillons prélevés lors de la mission GIMET 3 de juin 2001.

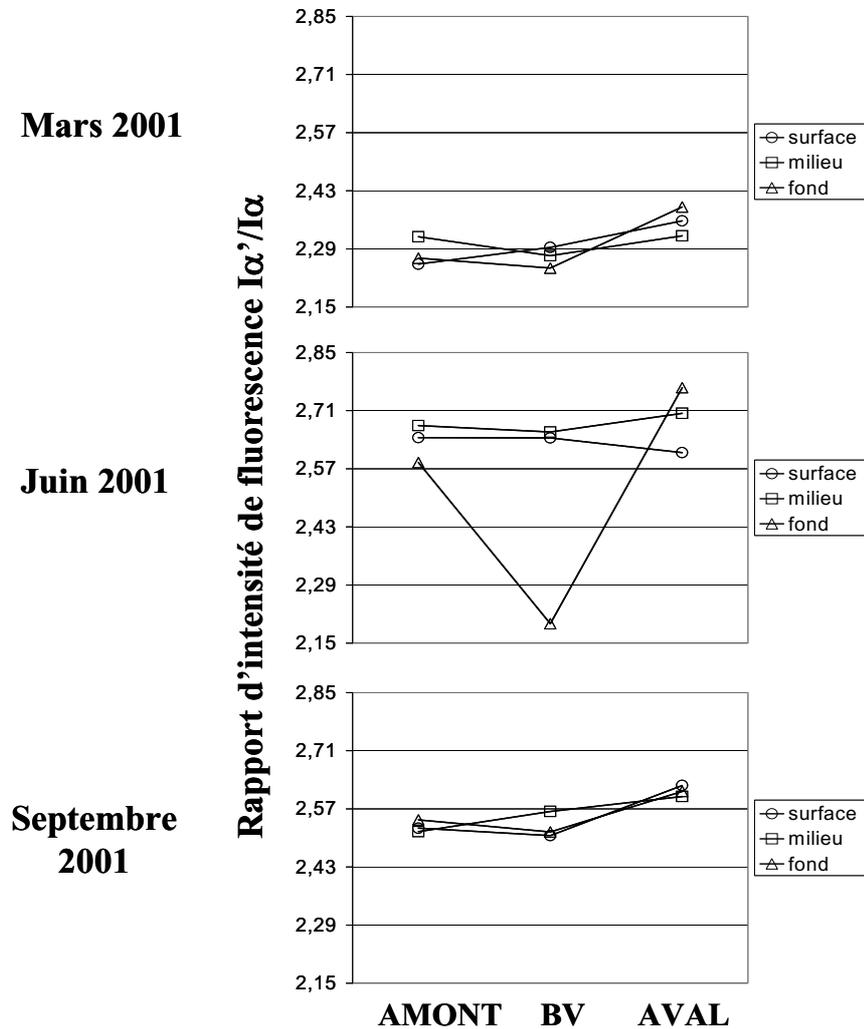


Figure 4-2. Rapports d'intensités de fluorescence Iα'/Iα pour les échantillons prélevés durant les missions Gimet 2, 3 et 4 de l'année 2001.

1-2- Fractionnement par ultrafiltration – GIMET 3 (juin 2001)

Les neuf échantillons prélevés lors de la mission GIMET 3 ont été fractionnés par ultrafiltration tangentielle avec le système Amicon TCF-10 selon le protocole présenté dans le chapitre 2 et chaque fraction obtenue a ensuite été analysée par spectrofluorimétrie 3D.

1-2-1- Distribution du carbone organique dissous

Le tableau 4-1 présente le bilan massique de COD obtenu lors du fractionnement par ultrafiltration tangentielle des échantillons prélevés dans l'estuaire de la Gironde lors de la mission GIMET 3 au mois de juin 2001. Les volumes initiaux étaient de 100 mL.

On peut remarquer en amont une plus grande homogénéité des teneurs entre la surface et le fond de la colonne d'eau pour chacune des fractions. Dans le bouchon vaseux, on remarque par contre une grande disparité entre la surface et le fond. Il y a une augmentation de la quantité de COD au fond pour les trois fractions de tailles supérieures à 1 kDa en raison probablement de la remise en suspension de sédiment qui semble donc libérer des composés organiques dissous de grande taille. Le rétentat 0,5 kDa du BV présente par contre une teneur en COD plus importante en surface. En ce qui concerne l'échantillon prélevé en aval du BV, les quantités de carbones dans les fractions sont plus fortes au fond de la colonne d'eau sauf dans le cas des plus petites molécules ($MM < 0,5$ kDa).

Fraction	Masse Moléculaire (kDa)	Carbone Organique Dissous (μg)					
		AMONT		BV		AVAL	
		surface	fond	surface	fond	surface	fond
Rétentat 10 kDa	$MM > 10$	41,5	46,1	39,22	69,4	25,8	28,2
Rétentat 3 kDa	$10 > MM > 3$	26,9	28,0	27,0	44,0	20,7	32,5
Rétentat 1 kDa	$3 > MM > 1$	33,2	27,1	31,7	40,3	26,8	38,5
Rétentat 0,5 kDa	$1 > MM > 0,5$	12,5	19,6	33,3	27,4	16,8	23,2
Filtrat 0,5 kDa	$0,5 > MM$	75,0	89,1	61,0	83,7	67,2	59,0
Pertes totales		20,1	26,9	16,4	19,3	36,7	19,9

Tableau 4-1. Masses de COD dans les différentes classes de taille moléculaire de l'estuaire de la Gironde (mission GIMET 3, juin 2001) pour 100 mL d'échantillon fractionné.

Le bilan massique effectué à partir des facteurs de concentration fait état de pertes de l'ordre de 1 à 18% de carbone. Ces pertes ont pour origines l'adsorption des composés organiques sur la membrane d'ultrafiltration et la soustraction du blanc d'expérience. En effet, les membranes d'ultrafiltration sont connues pour adsorber certains composés organiques mais également pour relarguer de façon aléatoire ces composés (Berger, 1984). Les blancs

d'expérience permettent de rendre compte de cette libération de composés organiques mais de façon quelque peu surestimée ce qui explique des pertes de l'ordre de 10% en moyenne suite à la soustraction des teneurs en COD.

Afin de mieux appréhender la distribution du COD dans les différentes fractions, la figure 4-3 présente les mêmes résultats que le tableau 4-1 mais cette fois en pourcentage massique du COD des échantillons bruts initiaux.

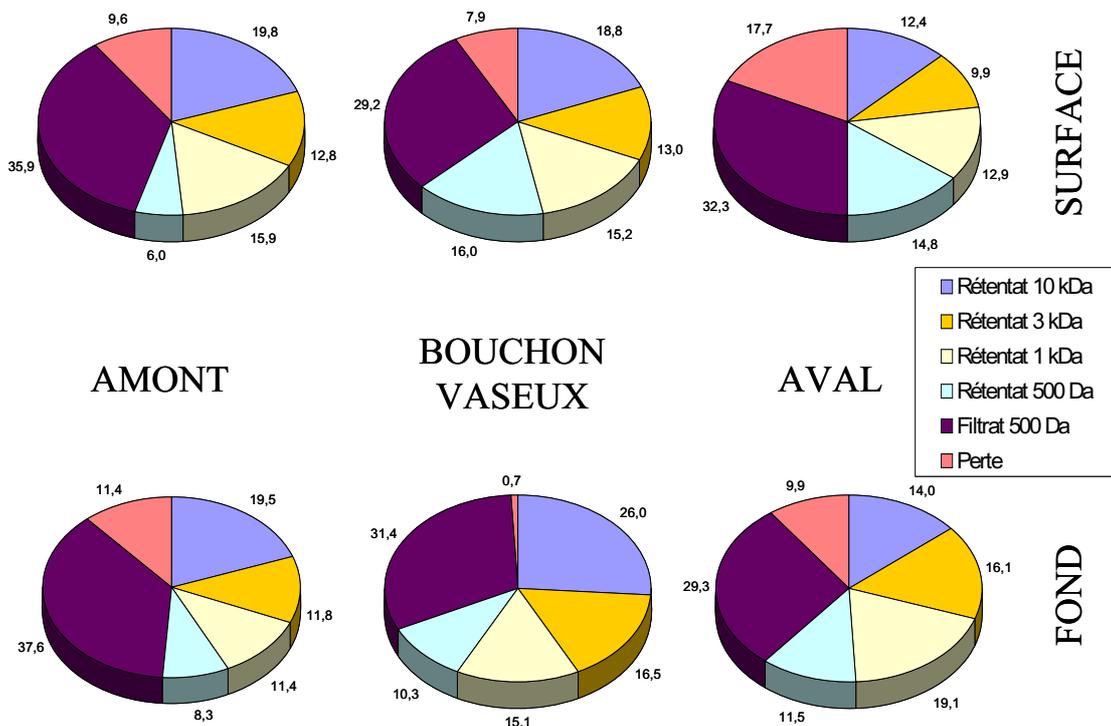


Figure 4-3. Distribution du COD dans les différentes classes de taille moléculaire de l'estuaire de la Gironde entre la surface et le fond. Résultats donnés en pourcentage massique du COD des échantillons initiaux.

Si l'on observe l'évolution le long de l'estuaire de la distribution du COD en fonction des différentes classes on remarque que la proportion de composés de haute masse moléculaire est relativement identique entre l'amont et le BV en surface alors qu'elle augmente fortement au fond du BV en raison de la remise en suspension. Cette proportion diminue en aval. Les proportions des composés organiques de taille intermédiaire (fractions comprises entre 10 et 1 kDa) sont relativement équivalentes en surface alors qu'elles augmentent de l'amont vers l'aval au fond probablement à cause du début de floculation des composés humique avec l'augmentation de la salinité qui est plus importante au fond de la colonne d'eau en aval.

Enfin, la proportion des composés de taille comprise entre 500 et 1000 Da augmente légèrement lors du passage dans le BV au détriment de la fraction contenant les plus petites molécules (filtrat 500 Da).

Pour résumer maintenant l'évolution dans la colonne, on peut dire que les échantillons en amont du BV présentent une distribution relativement homogène entre la surface et le fond. Au niveau du bouchon vaseux, on remarque au fond de la colonne d'eau une proportion plus importante de composés de haute taille moléculaire. Ceci peut être la marque de la libération de composés organiques dissous de taille importante lors de la remise en suspension de sédiment.

En aval du bouchon vaseux la surface semble caractérisée par une plus forte proportion en composés de petite taille (< 500 Da) par rapport au fond où toutes les fractions de tailles supérieures sont légèrement plus prépondérantes. Cependant les pertes lors de l'expérience sont relativement différentes entre la surface et le fond pour les échantillons d'aval et peuvent fausser cette conclusion.

1-2-2- Propriétés de fluorescence

La figure 4-4 présente à titre d'exemple les projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration obtenues pour l'échantillon prélevé au fond de la colonne d'eau en aval du bouchon vaseux. Les spectres de fluorescence 3D des fractions de tous les autres échantillons sont donnés en annexe (annexes 2, 3 et 4).

Il est tout à fait frappant à première vue que les spectres des différentes fractions sont relativement semblables. Ceci met en évidence le caractère fractal de la matière organique dissoute et le fait que les fluorophores caractéristiques de la MOD se retrouvent dans toutes les classes de taille moléculaire.

En effet, les travaux de Piccolo (2001) tendent à prouver le caractère supramoléculaire des substances humiques qui sont selon cet auteur composées d'un assemblage de petites molécules. Il semble alors tout à fait vraisemblable de retrouver les groupements fluorophoriques distribués dans toutes les tailles moléculaires.

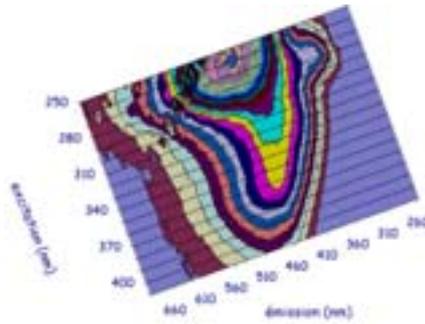
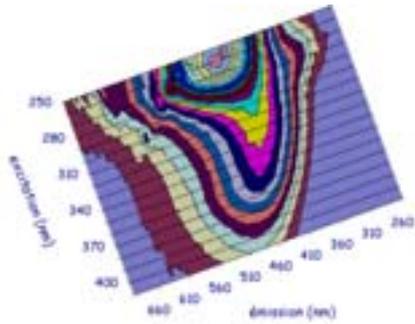
Si par contre on étudie plus précisément sur ces spectres 3D, on peut remarquer que la bande de fluorescence γ (ex./em. 280/340nm) relative aux composés d'origine protéique est très bien définie dans le cas des quatre fractions les plus petites (< 10 kDa) tandis que sur le spectre de l'échantillon initial on devinait à peine un léger épaulement. Le fractionnement par ultrafiltration permet donc d'affiner l'étude par spectrofluorimétrie en observant des

fluorophores qui n'étaient au départ pas discernables de ceux relatifs aux substances humiques.

Echantillon AVAL fond

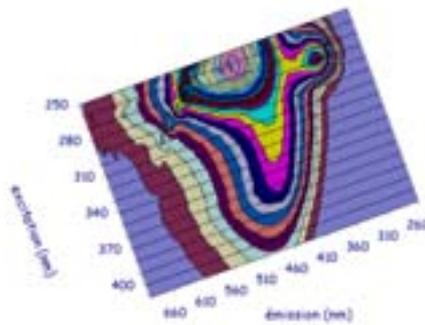
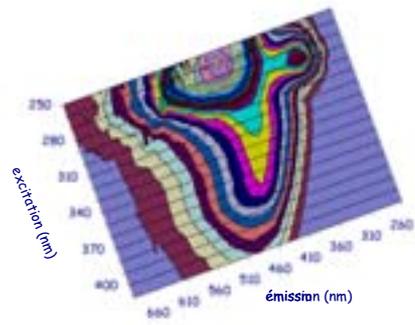
Echantillon initial

Rétentat 10 kDa



Rétentat 3 kDa

Rétentat 1 kDa



Rétentat 0,5 kDa

Filtrat 0,5 kDa

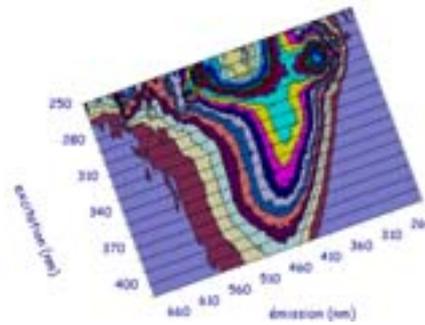
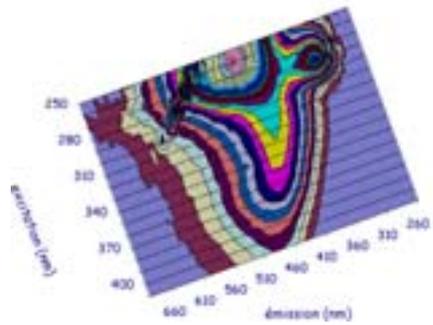


Figure 4-4. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon prélevé au fond de la colonne d'eau en AVAL du bouchon vaseux (Gimet 3, juin 2001).

La figure 4-5 montre les spectres d'émission normalisés de ces fractions pour une excitation à 280 nm. On remarque bien sur cette figure que la bande γ est bien présente dans les fractions alors qu'elle n'est pas visible sur le spectre de l'échantillon initial.

Cependant il est encore plus intéressant de noter que l'intensité de fluorescence de cette bande γ varie en fonction des fractions par rapport à la bande α' qui a servi à la normalisation. Ceci indique que la proportion relative des fluorophores γ varie d'une fraction à l'autre et qu'ils ne sont donc pas distribués de façon homogène dans chacune des classes de taille moléculaire.

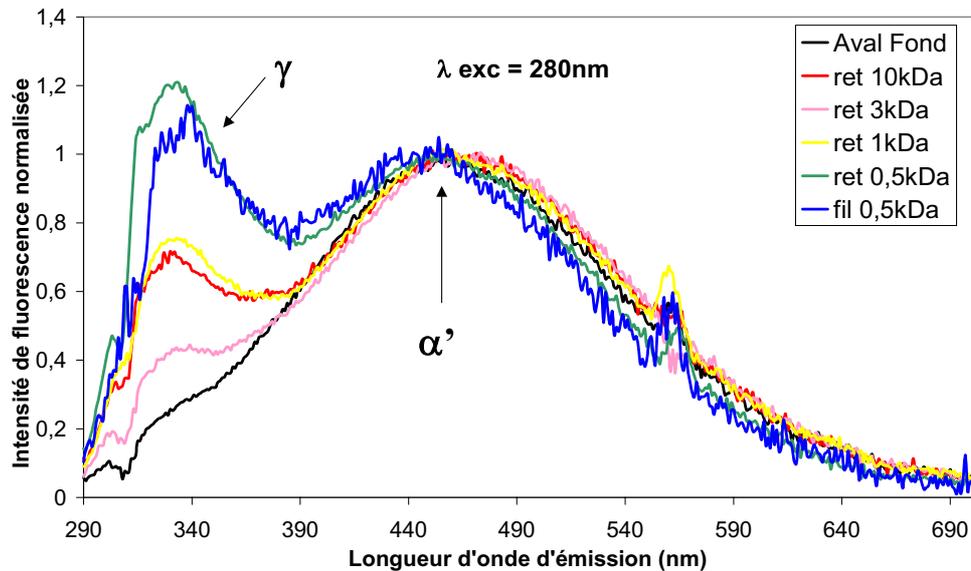


Figure 4-5. Spectres d'émission normalisés (excitation 280nm) des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon prélevé au fond de la colonne d'eau en aval du bouchon vaseux (Gimet 3, Juin 2001).

Ainsi la figure 4-6 montre l'évolution du rapport I_{γ}/I_{α} entre l'amont, le BV et l'aval dans chacune des fractions et pour les trois profondeurs considérées. On remarque ainsi qu'entre l'amont et l'aval du BV la distribution des composés γ en fonction de la masse moléculaire est variable et qu'elle varie également dans la colonne d'eau.

Si on prend l'exemple de l'aval du bouchon vaseux au fond de la colonne d'eau, on remarque que la proportion relative de fluorophore γ est plus faible dans la fraction de grande taille moléculaire (> 10 kDa) et elle augmente progressivement au fur et à mesure que la taille des fractions diminue. En surface et au milieu de la colonne d'eau, la proportion la plus faible de composés γ se trouve dans le filtrat contenant les plus petites molécules tandis que le rétentat 0,5 kDa (1 kDa $>$ MM $>$ 500 Da) possède la plus forte proportion.

De la même façon, la figure 4-7 présente le rapport d'intensité entre les bandes β et α pour les fractions des échantillons prélevés au milieu de la colonne d'eau uniquement car le fond et le mi-fond ont donné exactement les mêmes profils.

Rapport d'intensité de fluorescence I_{γ}/I_{α}

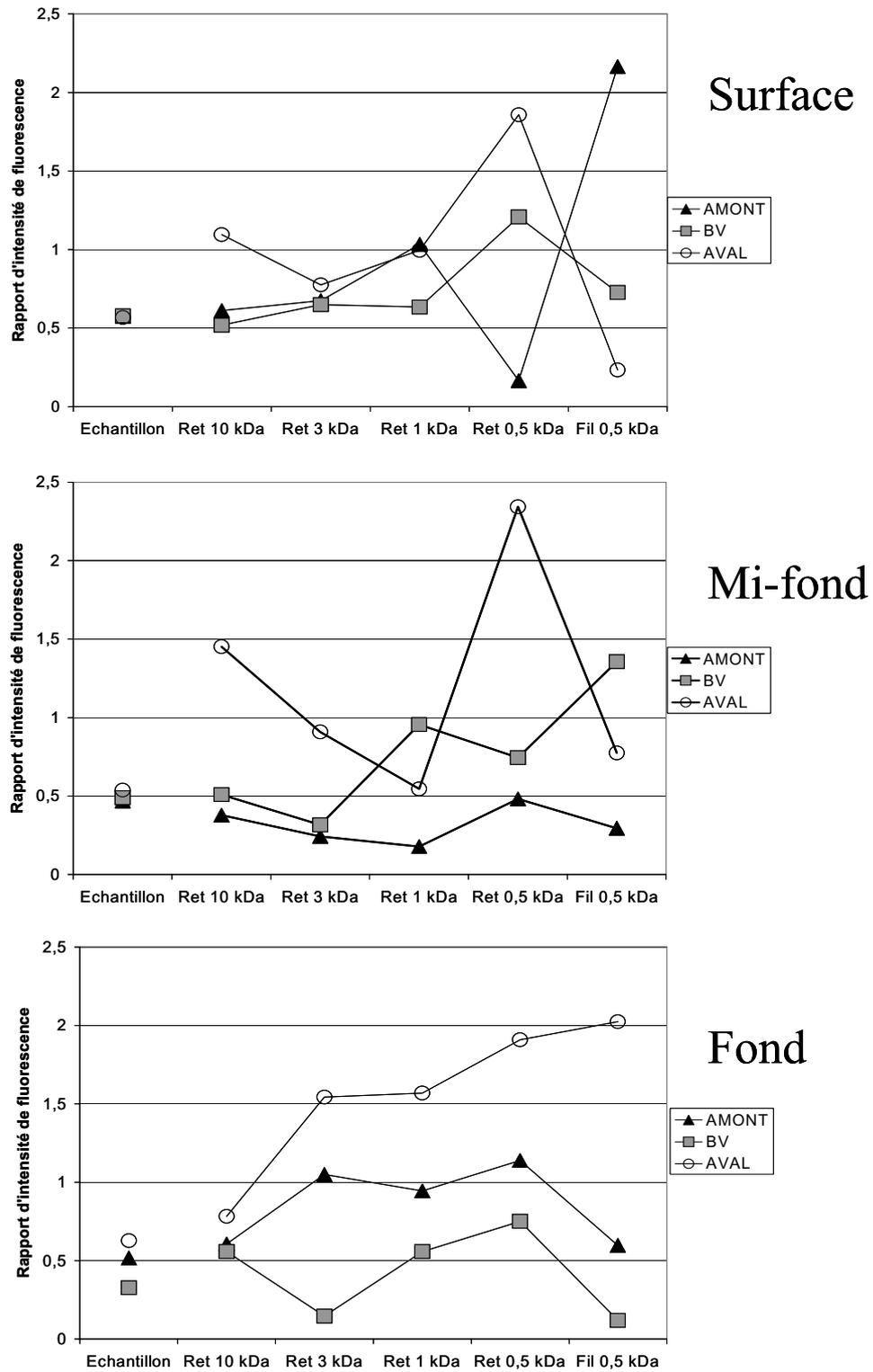


Figure 4-6. Rapports d'intensités de fluorescence I_{γ}/I_{α} dans les différentes fractions d'ultrafiltration des échantillons prélevés durant la mission Gimet 3 (juin 2001).

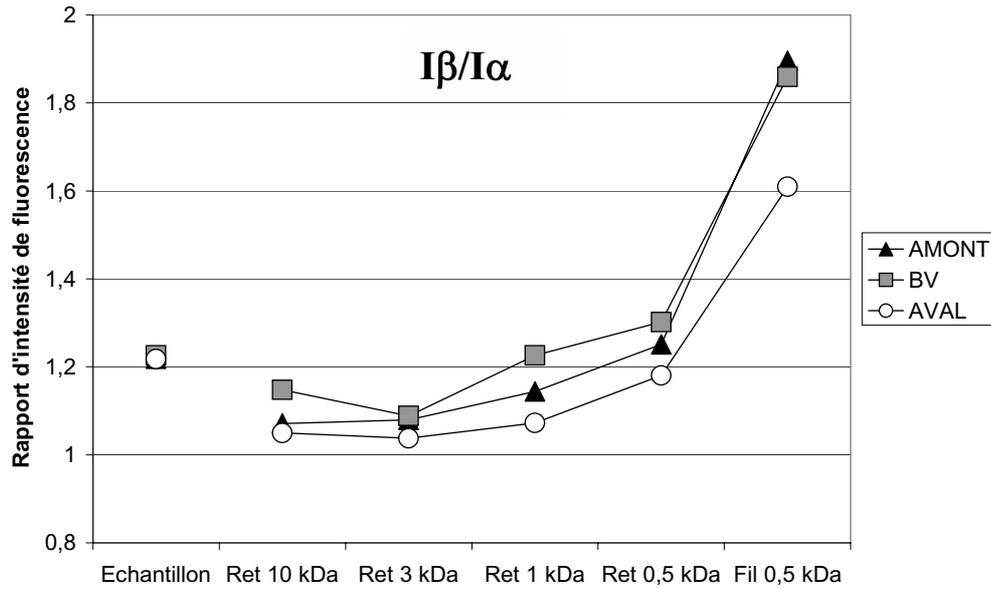


Figure 4-7. Rapports d'intensités de fluorescence $I\beta/I\alpha$ dans les différentes fractions d'ultrafiltration des échantillons prélevés au milieu de la colonne d'eau durant la mission Gimet 3 (juin 2001).

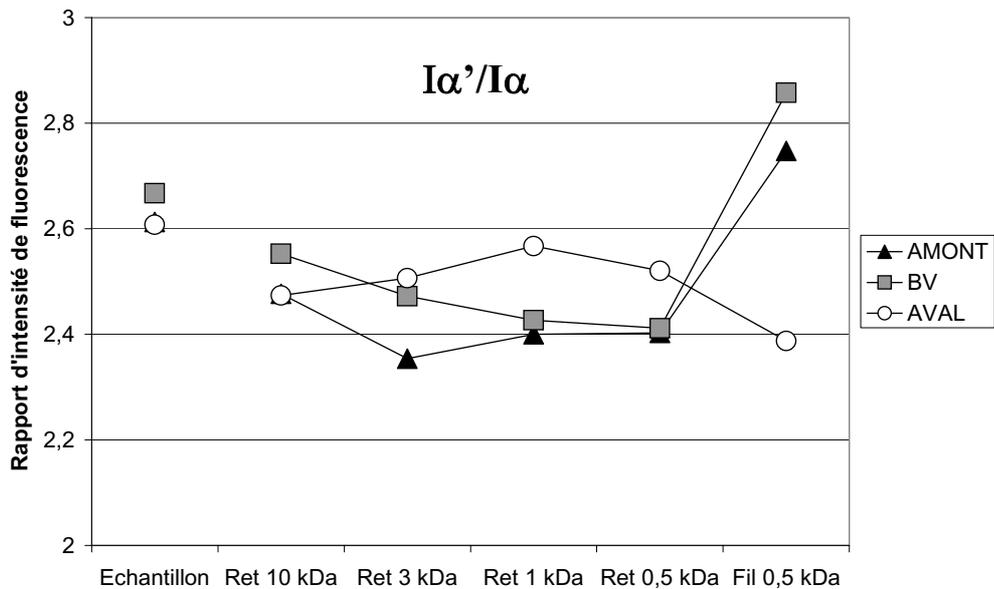


Figure 4-8. Rapports d'intensités de fluorescence $I\alpha'/I\alpha$ dans les différentes fractions d'ultrafiltration des échantillons prélevés au milieu de la colonne d'eau durant la mission Gimet 3 (juin 2001).

En ce qui concerne le rapport $I\alpha'/I\alpha$ (fig. 4-8), celui-ci varie aussi au sein des fraction en étant plus important au sein des plus petites molécules dans le BV et en amont ainsi que dans les fractions de tailles intermédiaires à l'aval. Les rapports sont quasiment identiques, juste un tout petit peu plus faibles en aval, par contre on note une augmentation de ce rapport avec la diminution de la taille et en particulier dans le filtrat 500 Daltons.

En effet, cette observation rend compte du décalage des spectres d'émission (pour une excitation à 310 nm) vers les plus courtes longueurs d'onde avec la diminution de la taille des molécules comme ceci est généralement observé (Belin et al., 1993). Ce phénomène est d'autant plus visible sur la figure 4-9 qui présente les spectres d'émission des fractions de l'échantillon de bouchon vaseux à mi-profondeur. On remarque clairement que les spectres du rétentat 500 Da et surtout du filtrat 500 Da sont décalés vers les plus courtes longueurs d'onde.

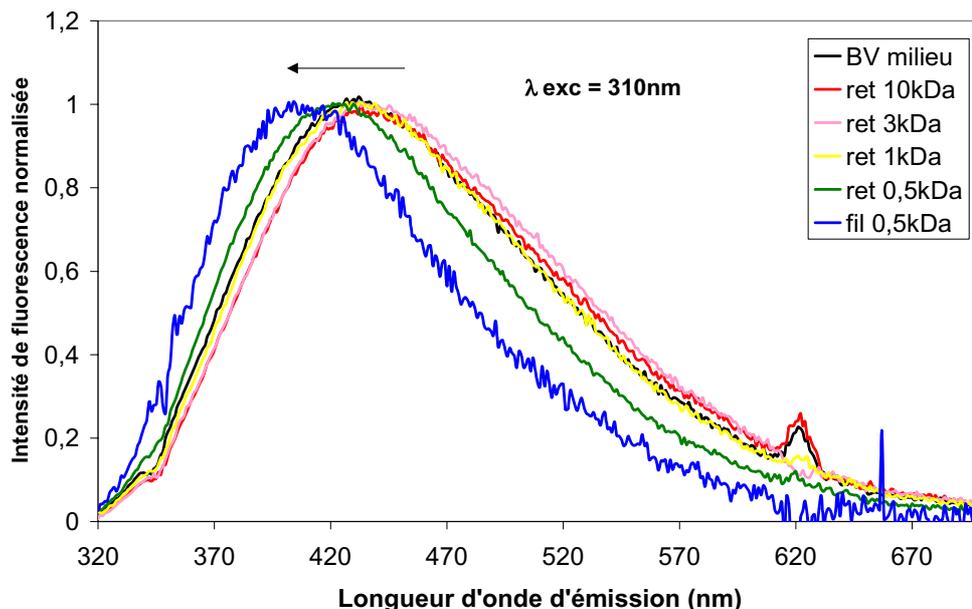


Figure 4-9. Spectres d'émission normalisés (excitation 310nm) des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon prélevé au milieu de la colonne d'eau dans le bouchon vaseux (Gimet 3, Juin 2001).

Il n'est pas évident de dire que c'est sans aucun doute dû à la présence de la bande β puisqu'il s'agit bien d'un décalage complet du spectre d'émission en relation avec une modification de la taille des fluorophores et non de l'apparition réelle d'un nouveau type de fluorophore sous la forme d'un épaulement comme nous l'avons observé dans le chapitre 3 (fig. 3-57, p.120).

Cependant on ne peut pas exclure le fait que les fluorophores de type β puissent justement caractériser ces molécules de plus petite taille et en plus faible concentration que les substances humiques et qui seraient précurseurs de la fluorescence de type α (Parlanti et al., 2000a). En effet, la bande β a jusqu'à présent été uniquement observé dans le cas d'échantillons marins ou côtiers et attribuée à une activité biologique dans ces milieux. Il serait cependant possible que tous les échantillons d'eau naturelle présentent cette composante biologique mais à de trop faible concentrations pour être observable comme nous l'avons montré à la fin du chapitre précédent. L'ultrafiltration permettrait donc d'isoler la bande

β dans les fractions de plus petite taille ce que traduirait le décalage vers les plus petites longueurs d'onde du spectre d'émission pour une excitation à 310 nm observé par Ewald et al. (1988) dans le cas d'acides fulviques d'origine microbienne.

Nous avons représenté sur la figure 4-10 l'indice de fluorescence relatif au fluorophore β (f_{380}/f_{430}) que nous avons introduit dans le chapitre précédent et qui consiste à diviser l'intensité de fluorescence émise à 380 nm par celle émise à 430 nm pour une excitation à 310 nm. Comme nous l'avons précisé, ce type de paramètre peut éventuellement être plus représentatif que le rapport I_{β}/I_{α} utilisé précédemment, puisqu'il ne s'agit plus ici de rapport de concentrations relatives entre deux fluorophores mais de l'influence de l'épaulement β au sein du massif fluorescent à 310 nm. Les résultats ont été moyennés sur les trois valeurs de la colonne d'eau puisque les valeurs sont relativement équivalentes.

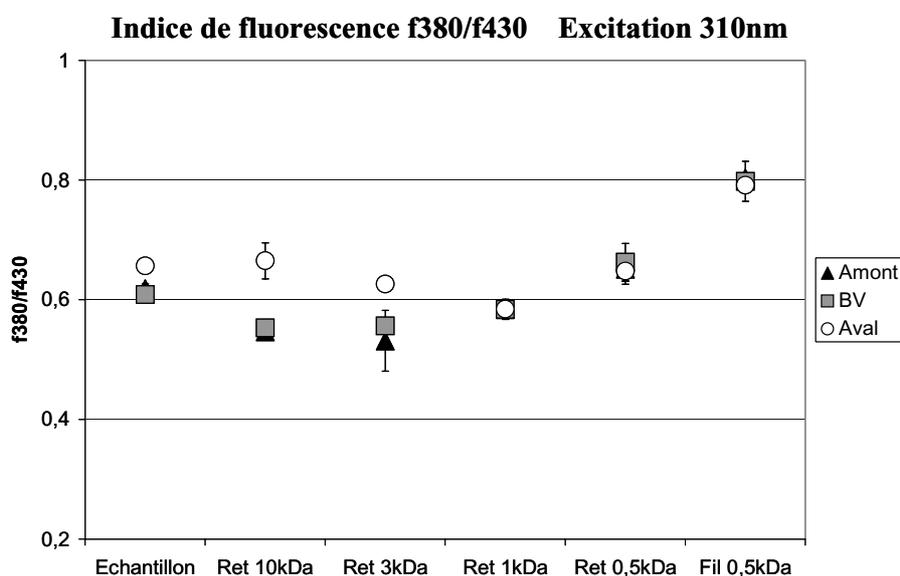


Figure 4-10. Indice de fluorescence f_{380}/f_{430} dans les différentes fractions d'ultrafiltration (Gimet 3, juin 2001). Résultats moyennés sur la colonne d'eau.

Les valeurs obtenues pour les échantillons bruts concordent bien avec celles observées sur la Gironde aux faibles salinités (Chap. 3, fig. 3-59, p.122) comme celles des échantillons étudiés ici. La valeur f_{380}/f_{430} de l'échantillon aval est légèrement supérieure à celles du BV et de l'amont. En ce qui concerne les fractions contenant les plus grosses molécules (rétentat 10 et 3 kDa), les valeurs de f_{380}/f_{430} pour le bouchon et l'amont sont quasiment identiques et plus faibles que celle de l'échantillon aval qui montre donc dans ces fraction une très légère influence de la composante β . Ceci peut être également mis en parallèle avec la présence de matériel de type γ dans ces mêmes fractions de l'échantillons aval comme le montre le rapport d'intensité I_{γ}/I_{α} (figure 4-6). On remarque ensuite que les valeurs du rapport sont absolument

identiques dans les fractions de taille inférieure à 3 kDa et augmente d'autant plus que la taille des molécules diminue. Pour la fraction de filtrat 500 Da contenant les plus petites molécules, l'indice f380/f430 atteint la valeur de 0,8 qui avait été observé pour les échantillons marins (S>30) dans le chapitre précédent. Ceci indique clairement que le type de fluorophore β est principalement isolé par ultrafiltration dans la fraction de plus petite taille moléculaire.

La figure 4-11 présente de la même façon l'indice d'humification HIX dans chacune des fractions. Les valeurs de cet indice ont également été moyennées sur la colonne d'eau. Les importantes barres d'erreur observées sont liées aux échantillons prélevés à mi-profondeur.

L'échantillon Aval présente dans chaque fraction des valeurs plus faible de HIX indiquant un matériel organique moins humifié qu'en amont ou dans le BV. En effet, l'échantillon initial de bouchon vaseux est plus humifié que ceux d'amont et d'aval. Le fractionnement par ultrafiltration nous permet de montrer plus particulièrement que la fraction de rétentat 3 kDa du BV contenant les molécules de taille comprise entre 10 et 3 kDa présente le plus fort degré d'humification.

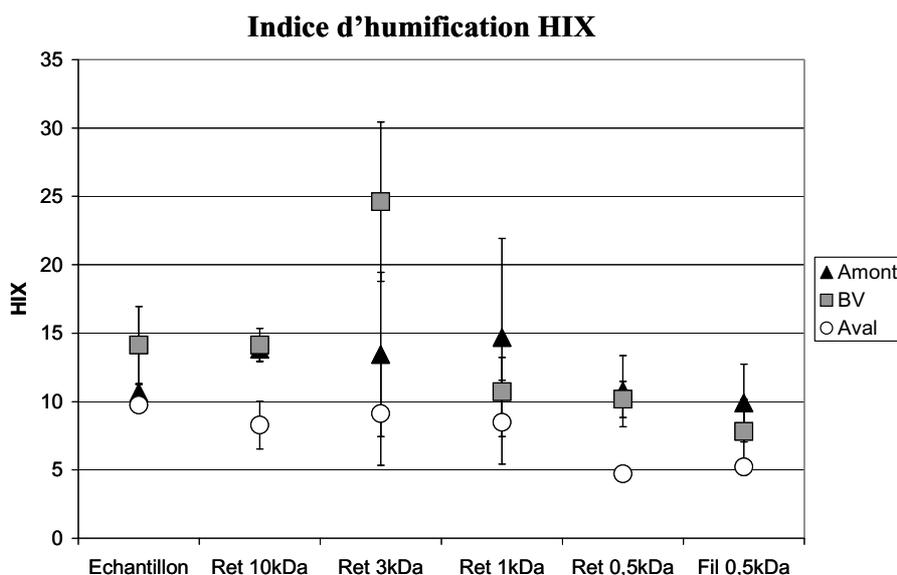


Figure 4-11. Indice d'humification HIX dans les différentes fractions d'ultrafiltration (Gimet 3, juin 2001). Résultats moyennés sur la colonne d'eau.

2- ESTUAIRE DE LA SEINE

L'étude par ultrafiltration des caractéristiques propres de la MOD fluorescente du bouchon vaseux de l'estuaire de la Seine a été effectuée dans le cadre de trois missions estivales en raison du caractère saisonnier du bouchon vaseux de l'estuaire de la Seine. Les prélèvements ont été effectués en août 2001 (Nuts1), juillet 2002 et septembre 2002 (Nuts 2).

2-1- Mission NUTS 1 (Août 2001)

Durant la mission Nuts 01, nous avons vu dans le chapitre précédent que le bouchon vaseux était très bien localisé entre les salinités 3 et 4 lors du gradient de salinité effectué après l'étalement de basse mer. Nous avons donc décidé de fractionner par ultrafiltration certains des échantillons prélevés durant ce transect « Basse Mer » afin d'observer les modifications en fonction de la taille moléculaire de la MOD fluorescente au cours du transit estuarien et d'étudier l'influence du bouchon vaseux sur ces modifications.

La figure 4-12 montre le gradient des teneurs en MES relevées lors de ce transect ainsi que les noms des six échantillons choisis pour être fractionnés. Ces six échantillons nous permettent d'appréhender de façon globale toute la zone d'influence saline de l'estuaire depuis l'échantillon « amont » de salinité nulle, en passant par le bouchon vaseux « BV » en considérant l'amont et l'aval immédiats de ce BV, puis deux autres points pris en aval, un de salinité de l'ordre de 20 et l'autre étant le point le plus « marin » (salinité 32).

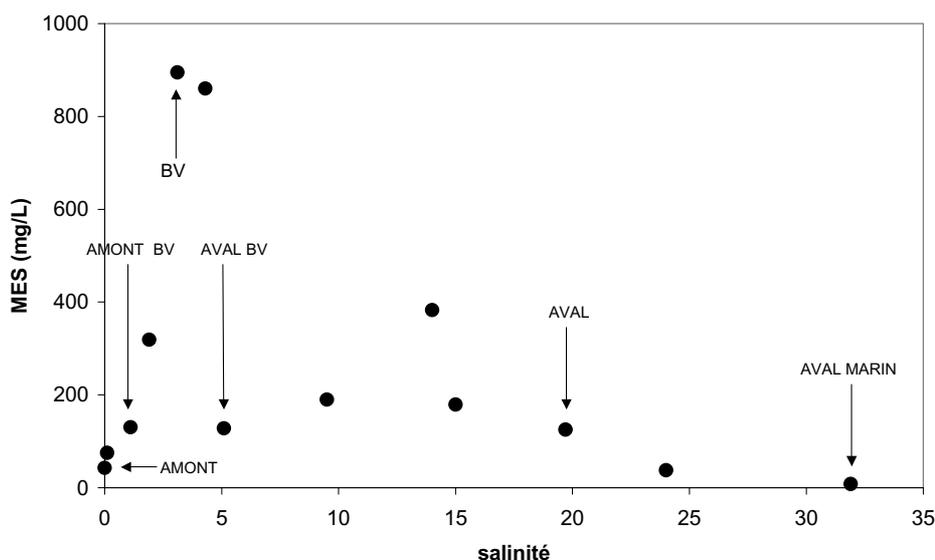


Figure 4-12. Teneur en MES en fonction de la salinité durant le gradient Basse Mer de la Mission Nuts1 (août 2001) et liste des échantillons choisis pour être fractionnés par ultrafiltration.

Les prélèvements ont été effectués en surface mais lorsque cela a été possible nous avons également prélevé au fond de la colonne d'eau et fractionné ces échantillons de fond. Malheureusement les points « Amont » et « BV » n'ont pas pu être échantillonnés au fond de la colonne d'eau. Le fractionnement par ultrafiltration a été mené de façon identique au fractionnement réalisé dans le cadre de la mission GIMET 3 en utilisant le système AMICON TCF 10 et des membranes de seuils de coupure 10, 3, 1 et 0,5 kDa.

2-1-1- Distribution du carbone organique dissous (COD)

Suite au fractionnement par ultrafiltration, les teneurs en carbone organique dissous ont été déterminées dans chacune des fractions obtenues. Les valeurs ont ensuite été corrigées avec les teneurs obtenues pour chacune des fractions des différents blancs d'expérience. Le tableau 4-2 regroupe les résultats concernant la distribution massique du COD dans les différentes fractions le long de l'estuaire. Les volumes initiaux des échantillons étaient de 200 mL.

Fraction	Masse Moléculaire (kDa)	Carbone Organique Dissous (µg)						
			AMONT	AMONT BV	BV	AVAL BV	AVAL	AVAL MARIN
Rétentat 10 kDa	MM > 10	surface	99,0	76,8	90,2	70,1	46,8	38,4
		fond	-	64,8	-	57,2	51,6	47,3
Rétentat 3 kDa	10 > MM > 3	surface	99,8	86,9	86,0	68,4	53,5	31,0
		fond	-	78,0	-	53,2	50,0	33,6
Rétentat 1 kDa	3 > MM > 1	surface	92,8	88,4	109,8	93,6	69,7	37,5
		fond	-	102,6	-	90,9	94,1	75,0
Rétentat 0,5 kDa	1 > MM > 0,5	surface	48,3	77,2	95,0	81,3	122,5	119,8
		fond	-	85,2	-	78,0	150,3	122,5
Filtrat 0,5 kDa	0,5 > MM	surface	62,0	77,2	72,0	61,0	59,5	60,0
		fond	-	61,0	-	82,6	78,0	75,0
Pertes totales		surface	18,2	80,6	7,0	45,4	47,9	31,3
		fond	-	28,2	-	58,1	45,6	24,0

Tableau 4-2. Masses de COD dans les différentes classes de taille moléculaire de l'estuaire de la Seine (mission NUTS 1) pour 200 mL d'échantillon fractionné.

On peut remarquer comme tendance générale, la diminution de la quantité de COD dans les fractions de hautes tailles moléculaires (rétentats 10 et 3 kDa) de l'amont vers l'aval et en surface comme au fond de la colonne d'eau. Pour les molécules de tailles comprises entre 1 et 3 kDa, la quantité de COD qu'elles représentent augmente de l'amont jusque dans le BV et diminue par la suite. En ce qui concerne le rétentat 500 Da, la masse de COD augmente dans le BV par rapport à l'amont et l'aval de celui-ci. On remarque ensuite une très forte augmentation dans la partie aval. Dans le filtrat 500 Da, la quantité de COD augmente jusque dans le BV et se stabilise dans la zone aval de l'estuaire.

Il faut cependant noter que les légères augmentations de la proportion de COD dans certaines fractions du BV par rapport à l'amont et l'aval immédiats ne sont peut être pas significatives pour être prises en compte en raison des différences de pertes constatées.

En effet, le bilan massique fait état de pertes allant de 1 à 13% du COD en moyenne et pour les mêmes raisons que celles décrites dans le paragraphe précédent.

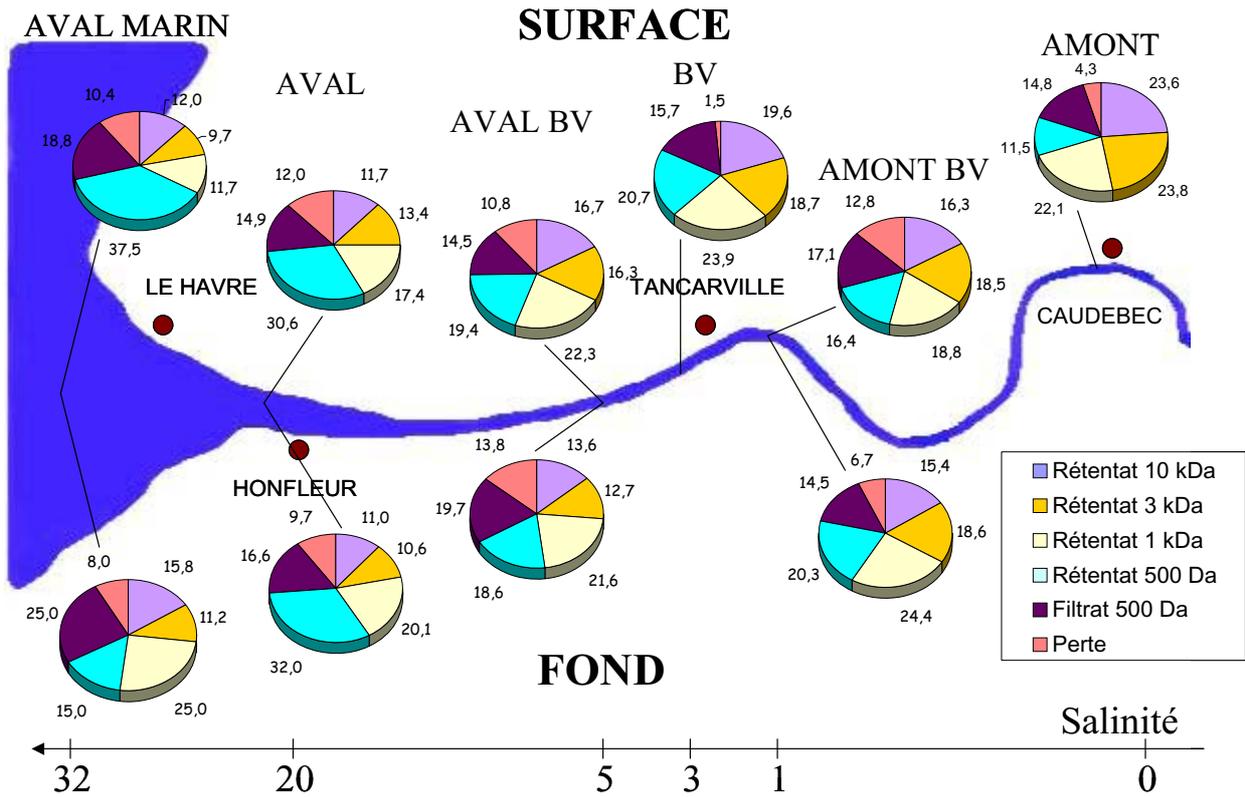
La figure 4-13 présente la distribution du COD dans la colonne d'eau le long de l'estuaire. Les résultats sont donnés en pourcentage massique du COD contenu dans les échantillons initiaux.

On remarque deux tendances générales. Tout d'abord, la diminution de l'amont vers l'aval de la proportion de COD dans les fractions de hautes tailles moléculaires (rétentats 10 et 3 kDa). Ensuite, on note alors de façon inverse que les plus petites molécules représentent une fraction de plus en plus importante du carbone organique dissous au fur et à mesure que l'on se déplace vers l'aval de l'estuaire.

Ces modifications des proportions relatives de COD s'accompagnent simultanément de la diminution massique de COD dans les fractions de grandes tailles et de l'augmentation de la masse de COD dans le rétentat 0,5 kDa.

Ainsi, ces tendances rendent compte de deux phénomènes se produisant le long de l'estuaire. Tout d'abord, la floculation et la sédimentation des composés de taille supérieure à 3 kDa et ensuite la production de composés organiques de petites tailles (principalement $0,5 < MM < 1 \text{ kDa}$) par l'activité biologique dans la partie aval de l'estuaire.

En ce qui concerne l'évolution dans la colonne d'eau, on peut remarquer que la distribution est relativement bien homogène entre la surface et le fond pour tous les échantillons concernés excepté pour l'échantillon « marin » qui présente de très nettes différences. En effet, cet échantillon présente en surface une proportion très importante de COD dans la fraction contenant les molécules de taille comprise entre 500 et 1000 Da alors qu'au fond cette proportion est beaucoup plus faible au profit de toutes les autres fractions.



2-1-2- Propriétés de fluorescence

Les projections dans le plan des spectres de fluorescence sont présentées de façon exhaustive dans la partie annexe de ce manuscrit (annexes 5, 6, 7, 8 et 9). Comme dans le cas des échantillons de la Gironde présentés au début de ce chapitre, le fractionnement par ultrafiltration des échantillons estuariens de la Seine met en évidence le caractère fractal de la MOD fluorescente, c'est à dire que l'on retrouve des groupements fluorophoriques donc des motifs de structure semblables à différentes échelles de taille moléculaire. En effet les spectres de fluorescence sont globalement semblables entre les différentes fractions et montrent que les fluorophores caractéristiques de la MOD sont globalement présents dans toutes les fractions.

Les spectres des fractions des échantillons « aval » et « aval marin » présentent des caractéristiques tout à fait particulières tandis que le passage dans le bouchon vaseux ne semble pas modifier profondément la distribution des fluorophores puisque les spectres 3D ne montrent pas de différences notables entre les fractions et sont dominés par la fluorescence des substances humiques. Les spectres des échantillons « aval BV » et « amont BV » sont du

reste qualitativement identiques à ceux du BV si l'on considère des fractions de tailles similaires.

Il existe tout de même des différences qui concernent principalement les fractions de petites tailles (rétentat et filtrat 500 Da). Tout d'abord on peut préciser qu'une caractéristique générale est que la longueur d'onde d'excitation ($\lambda_{\text{ex max}}$) du maximum de fluorescence de la bande α' est bien définie et de l'ordre de 260 - 270 nm pour les fractions de taille supérieure à 1 kDa alors que dans les deux fractions de petite taille $\lambda_{\text{ex max}}$ est plus courte (250 nm et parfois moins).

Ensuite, on remarque sur la figure 4-14 que les spectres des fractions de rétentat 500 Da des échantillons « amont » et « aval » présentent une bande γ bien marquée alors que cette bande n'est pas visible dans le cas du BV. Ceci vient à nouveau mettre en évidence une activité biologique au sein de la partie fluviale de la Seine en amont du bouchon vaseux comme cela a été montré dans le chapitre 3 (§ 1-3) ainsi qu'en aval tandis que cette activité est totalement absente de la zone du bouchon vaseux probablement en raison des fortes turbidités et des déficits en oxygène qui limitent le développement phytoplanctonique.

Il est parallèlement très intéressant de noter que cette bande γ est très bien isolée dans la fraction de tailles allant de 500 à 1000 Da et qu'elle est à peine perceptible sous la forme d'un très léger épaulement sur les spectres des autres fractions et des échantillons bruts correspondants.

Les spectres des filtrats 500 Da (fig. 4-14) montrent tous trois caractéristiques particulières. Tout d'abord la longueur d'onde d'excitation du maximum α' est toujours inférieure à 250 nm. On remarque également pour une excitation à 280 nm la présence de la bande γ mais cette fois très décalée par vers les plus longues longueurs d'onde d'émission ($\lambda_{\text{em max}} = 370$ nm). Cette bande γ commune aux trois échantillons semble donc caractériser un matériel d'origine protéique ou microbienne différent de celui présent dans les échantillons de rétentat puisque leurs caractéristiques de fluorescence sont distinctes.

Enfin, il y a toujours dans le cas des filtrats un décalage vers les plus courtes longueurs d'ondes d'émission pour une excitation à 310 nm qui est caractéristique de la fluorescence de type β comme en témoigne la figure 4-15 dans le cas de l'échantillon de bouchon vaseux.

Ceci est vrai dans le cas des filtrats de tous les échantillons et les spectres d'émission normalisés à 310 nm de la figure 4-16 montrent bien que l'on a isolé dans cette fraction de petites molécules (filtrat 500 Da) le fluorophore β responsable du décalage hypsochrome observé dans les eaux marines ou côtières. La superposition des spectres d'émission des échantillons bruts « amont » et « aval marin » montre bien ce décalage.

Ceci semble confirmer à nouveau le fait que la fluorescence de type β soit liée à une catégorie de molécules qui n'est pas uniquement présente dans les eaux marines mais également dans les eaux douces où la fluorescence très intense des substances humiques empêche son identification nette et précise.

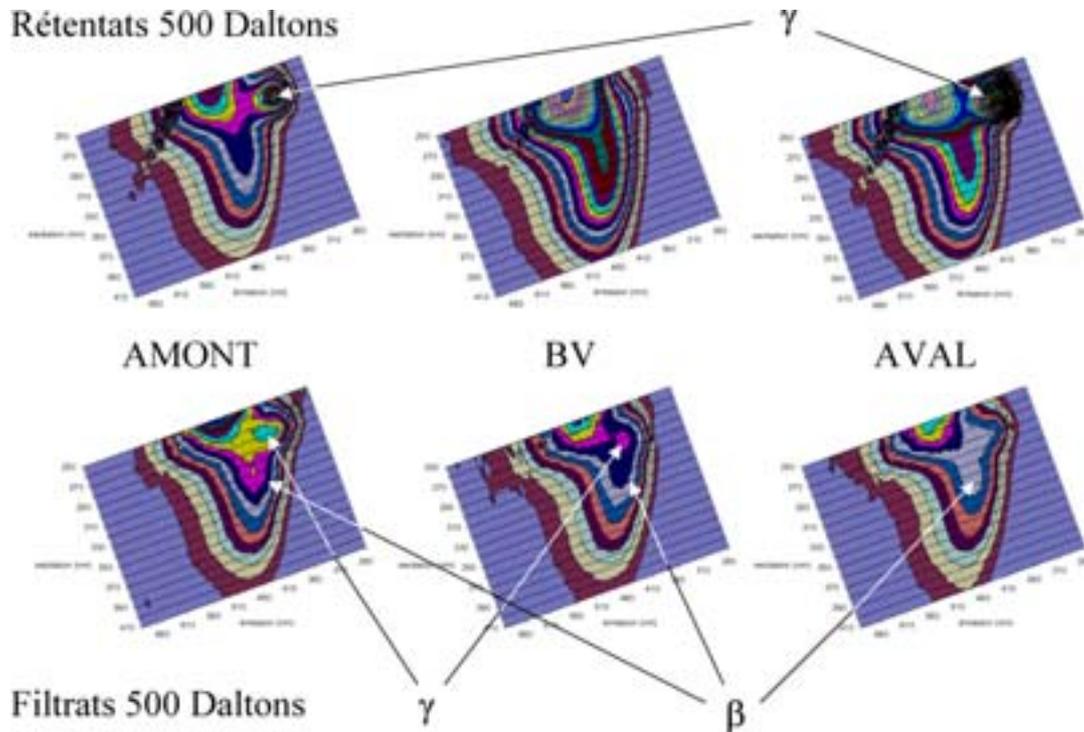


Figure 4-14 Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des rétentats et filtrats 500 Da des échantillons Amont, Aval et BV de surface.

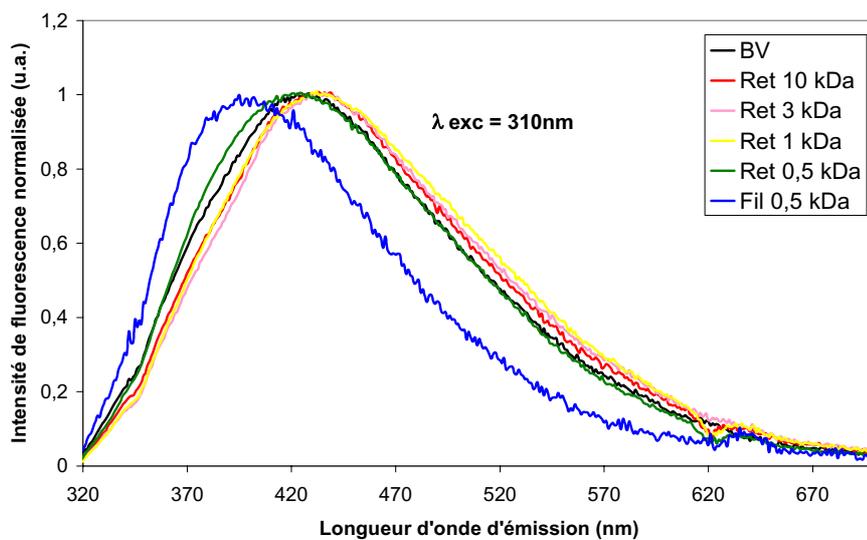


Figure 4-15. Spectres d'émission normalisés (excitation 310 nm) des fractions de l'échantillon bouchon vaseux surface (Nuts 01).

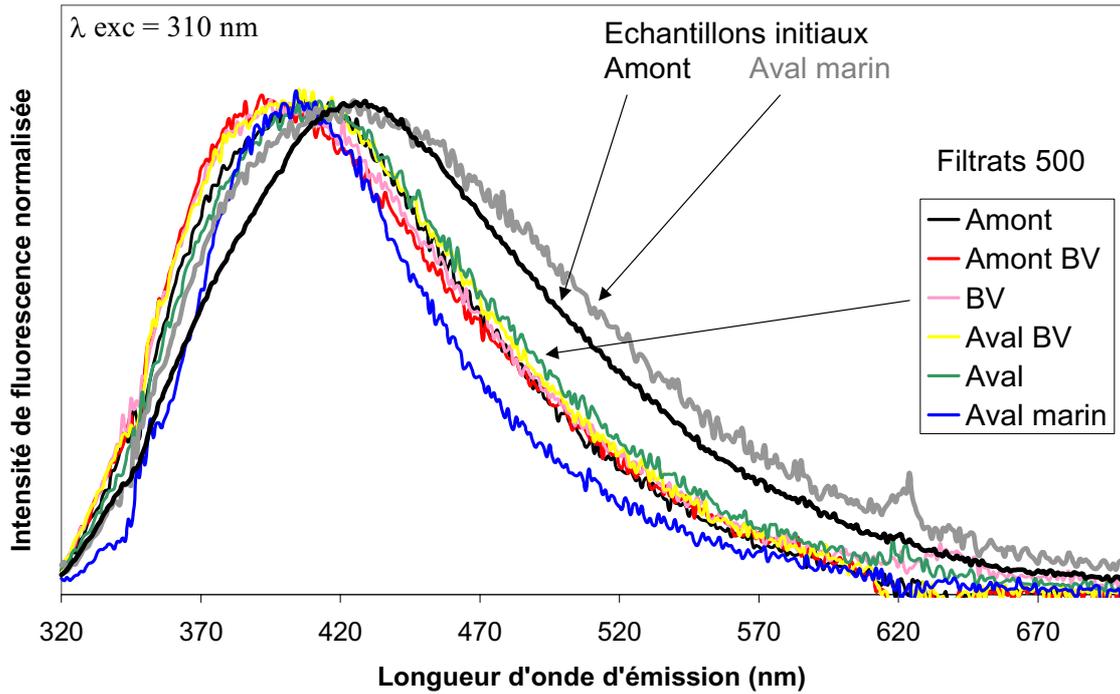


Figure 4-16. Spectres d'émission normalisés (excitation 310nm) des filtrat 500Da de tous les échantillons de surface (Nuts 01) et des échantillons initiaux «amont» et «aval marin».

Il est cependant très intéressant de noter que dans le cas de l'échantillon « aval marin » le fluorophore β est nettement présent dans toutes les fractions et plus particulièrement dans le filtrat et le rétentat 500 Daltons où il apparaît sous la forme d'une bande très bien définie et bien dissociée du fluorophore α (fig. 4-17).

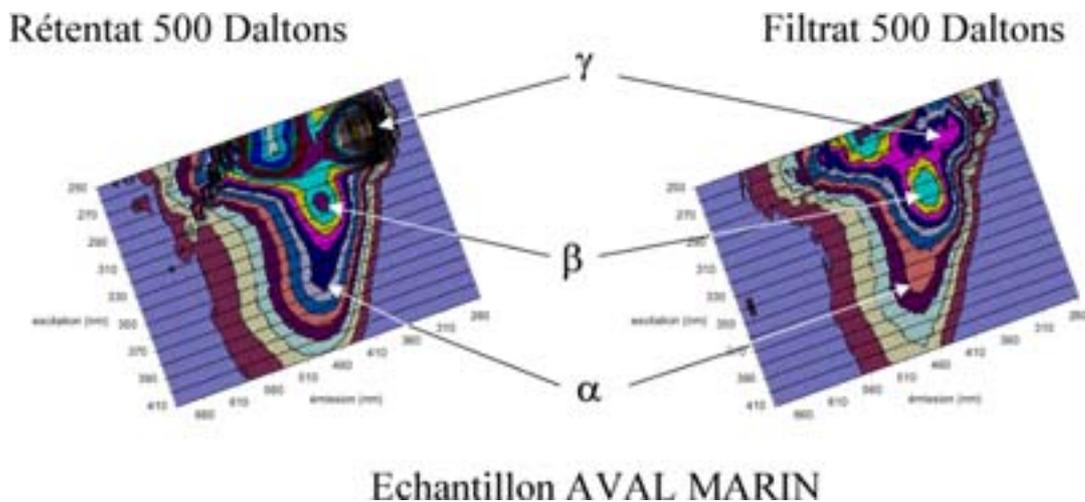


Figure 4-17. Projections dans le plan des matrices de fluorescence du filtrat et du rétentat 500Da de l'échantillon « aval marin » de surface (Nuts 01).

L'échantillon « aval marin » présente dans toutes ses fractions des caractéristiques particulières et en plus différentes de l'échantillon prélevé au même endroit mais au fond de la colonne d'eau. En effet, la bande β , n'est pas aussi bien définie au fond même si l'épaule est très marqué et bien dissocié du massif humique notamment dans le rétentat 10 kDa.

D'autre part la distribution dans les différentes classes de taille moléculaire n'est pas la même pour la bande γ entre la surface et le fond. Ces différences concordent bien avec les différences de distribution du COD observées dans le paragraphe précédent et il semble bien que les variations de COD soient en relation avec la présence de la bande γ dans certaines fractions.

Pour tous les autres échantillons l'homogénéité des distributions de COD dans la colonne d'eau est confirmée par l'homogénéité des spectres de fluorescence des différentes fractions entre la surface et le fond.

Si l'on s'intéresse maintenant aux rapports d'intensité des bandes de fluorescence qui traduisent les rapports de concentrations des fluorophores dans les différentes fractions, on remarque que le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ diminue de l'amont vers l'aval de l'estuaire dans toutes les fractions (fig. 4-18a). Entre les différentes fractions on peut remarquer que ce rapport est plus élevé dans les fractions de haute taille moléculaire ($MM > 3$ kDa) et dans la fraction contenant les plus petites molécules ($MM < 500$ Da). Ce rapport indique grossièrement le caractère juvénile des composés humiques terrigènes contenus dans les fractions. Le fait qu'il diminue de l'amont vers l'aval indique bien qu'en amont la fraction humique est relativement plus jeune et sa maturation va se faire progressivement dans le bouchon vaseux.

La figure 4-18b présente également l'évolution du rapport des composés protéiques de type γ sur les composés humiques de type α . Ce rapport I_{γ}/I_{α} montre une très faible proportion de composés protéiques dans les rétentats 10, 3 et 1 kDa pour les échantillons « amont », « bv » et « aval ». On remarque tout de même une valeur du rapport légèrement plus élevée dans le rétentat 10 kDa pour le BV et l'aval. Dans les deux plus petites fractions, le rapport est plus important indiquant que ces composés sont majoritairement de taille inférieure à 1000 Da. La fraction contenant les molécules de taille comprise entre 500 et 1000 Da présente les valeurs les plus importantes de ce rapport en amont et aval mais pas dans le bouchon vaseux qui, comme nous l'avons déjà précisé plus haut, limite l'activité biologique du phytoplancton principalement responsable de la formation de ces composés γ dans les eaux naturelles.

Pour l'échantillon aval marin, le rapport est beaucoup plus important dans toutes les fractions et plus particulièrement dans les petites fractions (rétenant et filtrat 0,5 kDa) mais

aussi dans la fraction des composés de haute taille moléculaire ($MM > 10$ kDa). Ce résultat est en adéquation avec de nombreux travaux qui ont montré une proportion importante de composés de type protéiques de haute masse moléculaire dans les eaux marines (Tanoue, 1995 ; McCarthy et al., 1996).

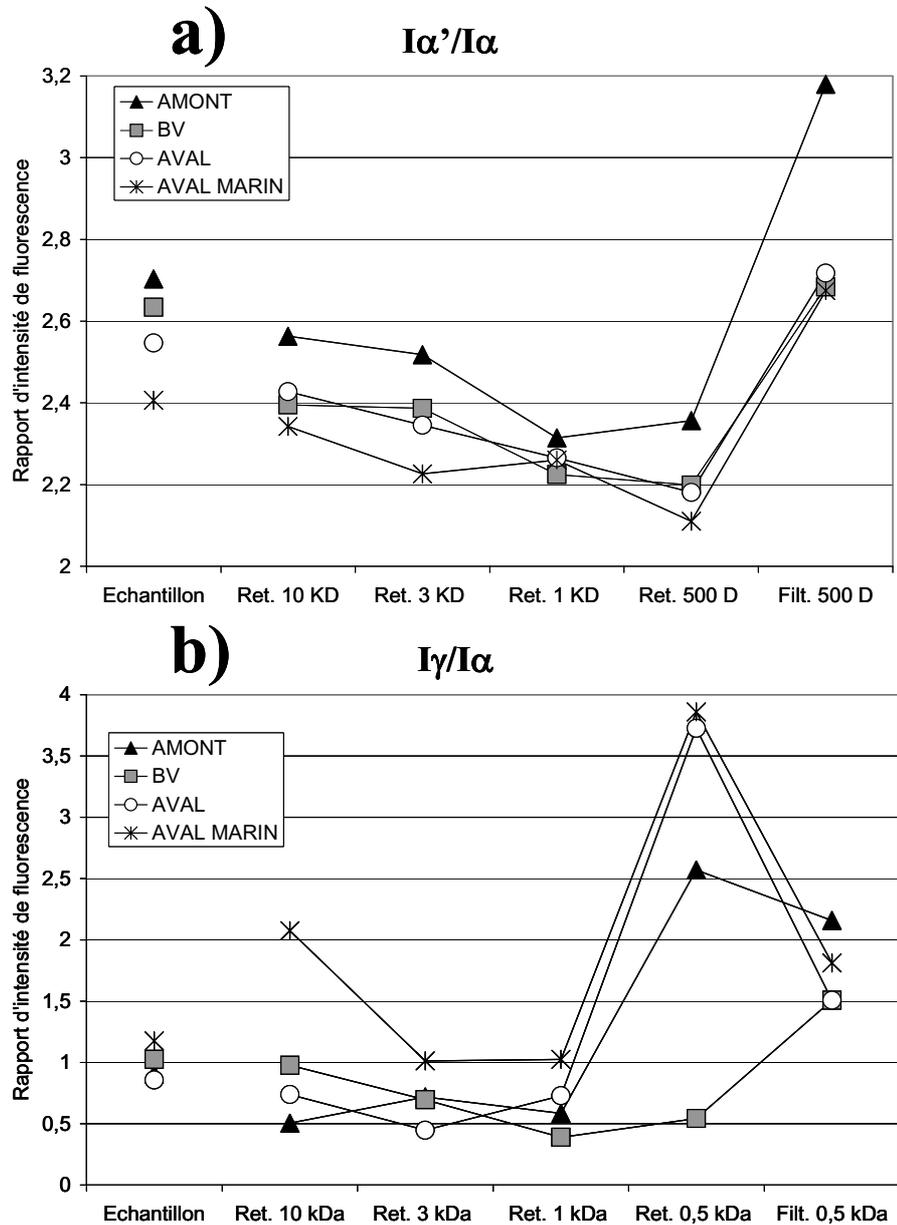


Figure 4-18. Rapports d'intensité de fluorescence a) $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ et b) I_{γ}/I_{α} dans les différentes fractions d'ultrafiltration (Nuts 01).

Afin de suivre l'évolution de l'influence du fluorophore β , nous avons déterminé les valeurs de l'indice f_{380}/f_{430} que nous avons introduit précédemment (fig. 4-19a). En amont, on remarque que cet indice augmente progressivement avec la diminution de la taille des molécules, ce qui indique que ce fluorophore est principalement représenté par des molécules

de petite taille. Ce comportement est quasiment le même dans le BV et en aval sauf que dans ces deux cas le rétentat 10 kDa présente une valeur légèrement plus élevée. C'est également ce que nous avons observé plus haut dans le cas du rapport I_{γ}/I_{α} et ceci indique à nouveau clairement que le fluorophore β est bien lié à une activité biologique et notamment à la présence des composés de type protéiques γ .

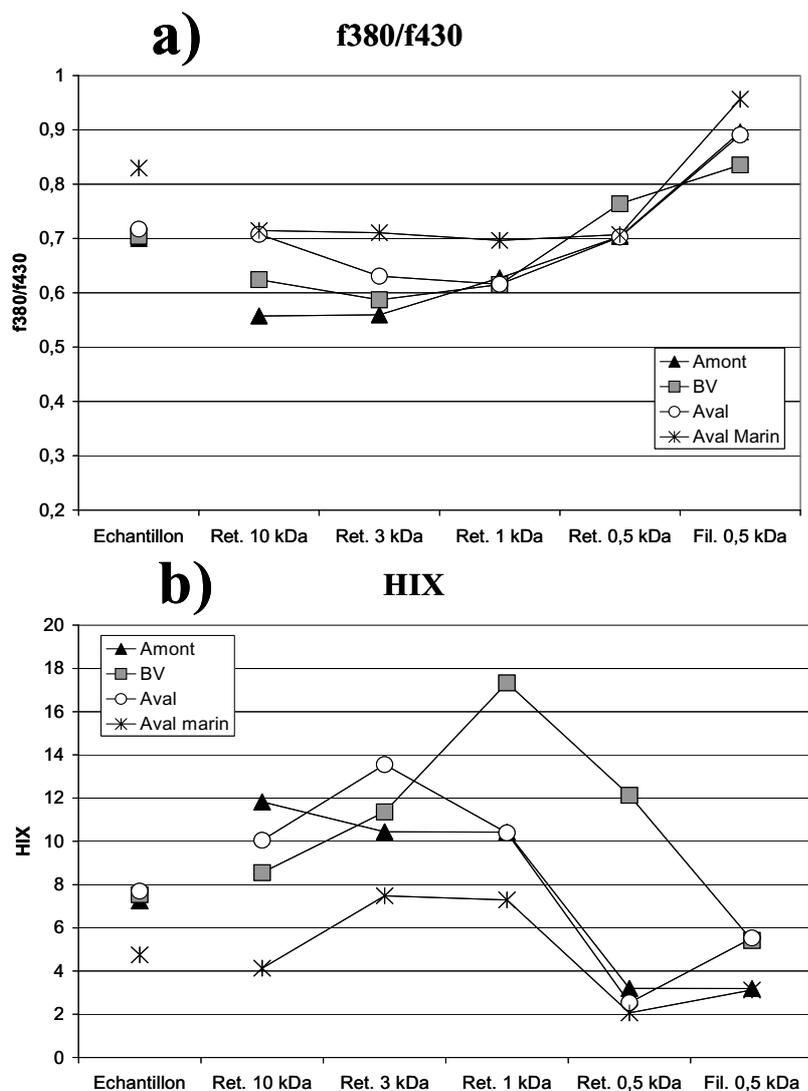


Figure 4-19. a) Indice de fluorescence f380/f430 et b) indice d'humification HIX dans les différentes fractions d'ultrafiltration (Nuts 01).

Ceci est encore confirmé dans le cas de l'échantillon « aval marin » où la valeur de l'indice est plus importante et identique dans tous les rétentats montrant que ce fluorophore est distribué dans toutes les classes de taille moléculaire comme le fluorophore γ . Mais c'est surtout et encore dans la classe des plus petites molécules que l'indice est le plus élevé.

Enfin nous avons également déterminé l'indice d'humification HIX (fig. 4-19b) qui présente une augmentation entre l'amont et le bouchon vaseux puis diminue ensuite vers l'aval et les eaux marines. Le BV est donc constitué d'un matériel organique plus humifié que l'amont et l'aval qui présentent eux une composante labile récente. D'autre part, les plus grandes valeurs de l'indice d'humification sont observées dans les rétentats 1 kDa pour le BV et 3 kDa pour les autres échantillons. On peut noter une valeur relativement forte de l'indice d'humification pour le rétentat 3 kDa de l'échantillon « aval ». Ainsi, les indices d'humification les plus forts sont trouvés pour des molécules dont la taille est comprise entre 1000 et 3000 Da ce qui correspond bien à l'ordre de grandeur de la fourchette donnée pour les masses moléculaires des substances humiques aquatiques (Croué, 2001).

2-2 Mission de juillet 2002

En juillet 2002, trois prélèvements ont été effectués en collaboration avec l'équipe de S. Mounier (Laboratoire RCMO-PROTEE, Université de Toulon et du Var) dans le cadre de l'étude du fonctionnement du bouchon vaseux vis à vis de la complexation des métaux.

Le but de cette étude était de coupler nos méthodes de fractionnement et d'analyse par spectrofluorimétrie 3D avec des titrations potentiométriques afin d'appréhender les modifications des propriétés de complexation de la MOD et de les relier à des caractéristiques particulières en terme de taille moléculaire et de propriétés de fluorescence.

Cette mission préliminaire devait servir de test avant la mission NUTS 2 de septembre 2002 durant laquelle nous avons prévu de réaliser la même étude sur un plus grand nombre d'échantillon.

Nous avons convenu de limiter le fractionnement à trois seuils de coupure : 10 kDa, 1kDa et 500 Da. Les fractionnements à 10 et 1 kDa ont été réalisés avec le système d'ultrafiltration MILLIPORE Prep/ScaleTM- TFF, tandis que le seuil de coupure 500 Da a été réalisé avec le système AMICON TCF 10. Les fractionnements ont été effectués à partir de volumes initiaux de 1L d'échantillons.

Nous présenterons ici uniquement les résultats relatifs aux ultrafiltrations et à la caractérisation de la MOD par fluorescence puisque malheureusement les titrations acido-basiques n'ont pas pu être réalisées.

Les caractéristiques des trois échantillons prélevés sont données dans le tableau 4-3.

Les trois points de prélèvement permettent de cibler le bouchon vaseux, puisque à Basse Mer le bouchon vaseux se trouvait à Honfleur, Tancarville représente alors le point en

amont du bouchon vaseux et le prélèvement à Honfleur a été fait lors de la Pleine Mer dans la masse d'eau marine donc en aval du BV.

	AMONT	BV	AVAL
Point de Prélèvement	Tancarville	Honfleur BM (Basse Mer)	Honfleur PM (Pleine Mer)
MES mg/L	119	295	43
COD mgC/L	2,75	2,85	2,65

Tableau 4-3. Caractéristiques des points de prélèvements

2-2-1- Distribution du carbone organique dissous

Le tableau 4-4 donne les résultats concernant la distribution massique du COD dans les différentes fractions. Les résultats obtenus montrent que la fraction de haut poids moléculaire est très importante et qu'elle diminue de l'amont vers l'aval. Les proportions de COD dans les fractions de petite taille, filtrat 500 Da et rétentat 500 Da, sont semblables entre l'amont et le BV tandis que pour la fraction de rétentat 1 kDa, la masse de COD augmente pour le bouchon vaseux. En aval, la fraction contenant les molécules de taille inférieure à 500 Da (filtrat) devient prépondérante.

Il nous faut cependant faire remarquer que les pertes en carbone ont été très importantes durant ces expériences et nous pensons que la raison est probablement une adsorption sur les membranes d'ultrafiltration de 10 et 1 kDa du système Millipore qui étaient alors neuves.

Pour s'affranchir de ce phénomène, il est fait état dans la littérature de la technique de pré-conditionnement des cartouches d'ultrafiltration (Belin et al., 1993 ; Mounier et al., 1999) qui consiste à saturer la cartouche en carbone en faisant circuler la solution d'échantillon pendant un certain temps en suivant l'évolution du COD ou de l'absorbance en sortie de système. La récupération des fractions se fait une fois que la circulation se fait sans quasiment aucune perte. Cependant cette technique nécessite un très large volume d'échantillon et elle est très difficilement applicable dans le cas d'un fractionnement en cascade comme nous avons procédé ici. De plus elle ne permet pas d'effectuer des blancs d'expérience et elle est

difficilement maîtrisable concernant la libération de carbone par la membrane durant le fractionnement comme en témoigne les rendements de l'ordre de 110 à 175 % relatés dans la littérature (Belin et al., 1993 ; Mounier et al., 1999).

Fraction	Masse Moléculaire (kDa)	Carbone Organique Dissous (μg)		
		AMONT	BV	AVAL
Rétentat 10 kDa	MM > 10	1075,0 (39,7)	890,0 (31,2)	516,2 (19,5)
Rétentat 1 kDa	3 > MM > 1	244,0 (9,0)	791,7 (27,8)	334,4 (12,6)
Rétentat 0,5 kDa	1 > MM > 0,5	378,5 (14,0)	389,8 (13,7)	472,0 (17,8)
Filtrat 0,5 kDa	0,5 > MM	423,6 (15,3)	458,9 (16,1)	846,0 (31,9)
Pertes totales		628,8 (22,0)	319,5 (11,2)	481,4 (18,1)

Tableau 4-4. Masses de COD dans les différentes classes de taille moléculaire de l'estuaire de la Seine (mission juillet 2002) pour 1L d'échantillon fractionné. Les résultats donnés entre parenthèse sont exprimés pourcentage massique du COD des échantillons initiaux.

2-2-2- Propriétés de fluorescence

Les spectres 3D des différents échantillons sont présentés dans l'annexe 10. Les rétentrats 10 et 1 kDa ne montrent pas de différence notable par rapport aux échantillons initiaux. Le rétentrat 500 Da montre la présence nette de la bande γ pour l'amont et l'aval mais pas dans le BV. Ceci rejoint ce que nous avons précédemment observé. Enfin les filtrats 500 Da montrent la présence d'une bande γ mais émettant à une plus grande longueur d'onde d'émission.

Il faut également noter que sur le spectre du rétentrat 500 Da de l'échantillon de Tancarville nous avons observé une bande relativement atypique pour un couple d'excitation / émission 385/465 nm qui s'est avéré répétable après vérification. Cette bande ne s'accompagne pas d'une valeur de COD anormale et il est difficile de conclure quant à sa nature et compte tenu de son caractère unique puisque nous ne l'avons jamais observé une

autre fois il nous semble fortement probable qu'il s'agisse d'une contamination lors du fractionnement.

En ce qui concerne les rapports d'intensités de fluorescence (fig. 4-20), ils montrent que $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ et I_{β}/I_{α} ont une évolution quasiment identiques entre les fractions avec une très légère différence dans les filtrats 500 Da pour I_{β}/I_{α} qui est plus intense, traduisant ainsi une présence plus importante des composés de type β parmi les plus petites molécules des trois échantillons.

Le rapport I_{γ}/I_{α} présente une très légère augmentation avec la diminution de la taille en amont et dans le BV et une très forte augmentation dans le rétentat 500 Da en aval.

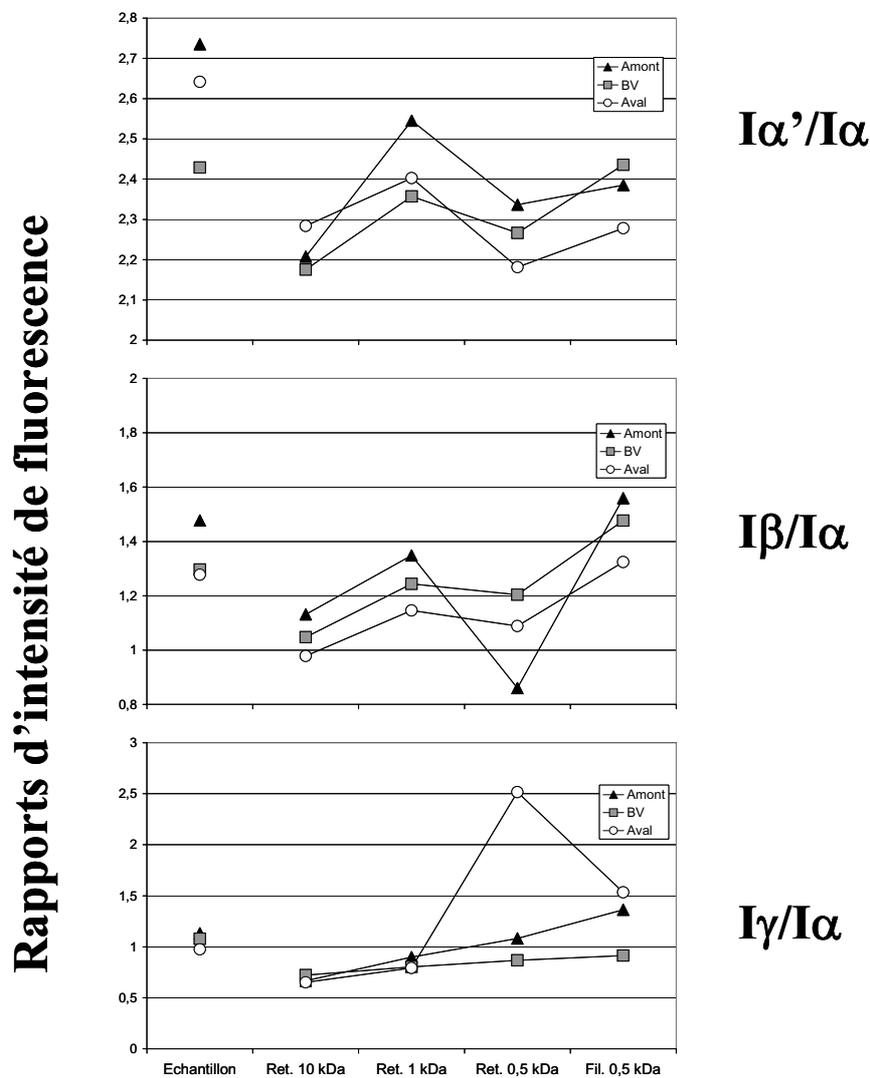


Figure 4-20. Rapports d'intensité de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α} dans les différentes fractions d'ultrafiltration (Seine, juillet 2002).

Les indices HIX et f380/f430 sont présentés sur la figure 4-21. Le rapport f380/f430 (figure 4-21a) montre une augmentation avec la diminution de la taille moléculaire indiquant que la présence du fluorophore β est d'autant plus marquée que la taille des molécules est petite.

L'indice d'humification HIX (figure 4-21b) est identique pour les trois réténats 10 kDa indiquant la nature similaire des composés de haute taille moléculaire. Pour les autres fractions l'indice est plus important dans le BV qu'en amont et en aval comme nous l'avons déjà observé auparavant.

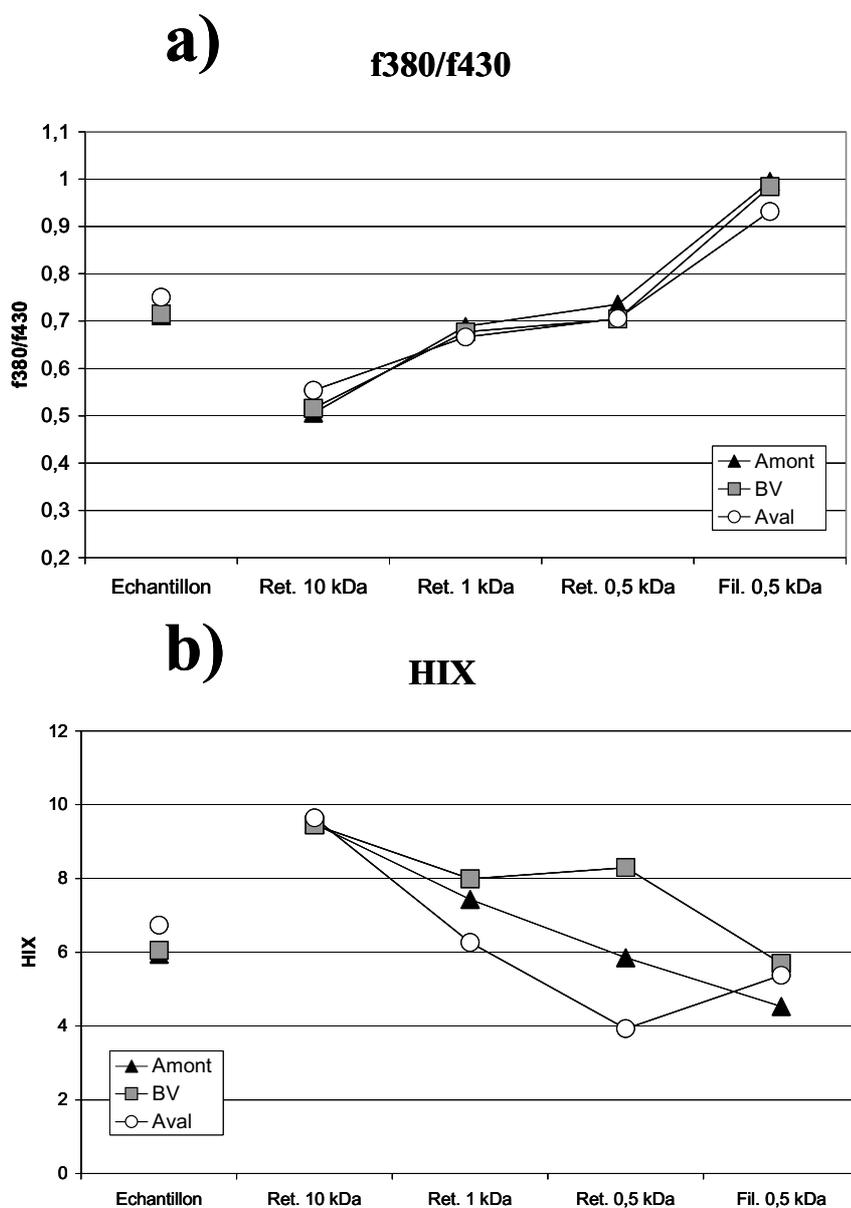


Figure 4-21. a) Indice de fluorescence f380/f430 et b) indice d'humification HIX dans les différentes fractions d'ultrafiltration (Seine, juillet 2002).

2-3- Mission NUTS 2 (Septembre 2002)

Lors de la mission NUTS 2, les prélèvements concernant le bouchon vaseux sur l'estuaire de la Seine ont été réalisés dans le cadre du suivi d'un cycle de marée en station fixe. Pour cela, nous nous sommes positionnés et ancrés très légèrement en aval du bouchon vaseux lors de l'étale de Pleine Mer et nous avons effectué des prélèvements à différents temps du cycle de marée.

Au début du cycle, nous nous trouvions dans la masse d'eau qui est donc en aval du BV (salinité ≈ 20). Durant le jusant, le bouchon vaseux s'est déplacé vers l'aval jusqu'à l'étale de Basse Mer et nous nous sommes trouvés à ce moment là dans la limite amont du BV avec une salinité de l'ordre de 3. Ensuite le courant s'est renversé, la masse d'eau marine a progressé à l'intérieur de l'estuaire et notre dernier prélèvement avait une salinité de l'ordre de 20 également. En effet, le bouchon vaseux de la Seine est relativement peu étendu et un gradient de salinité peut être effectué sur une faible distance en comparaison de l'estuaire de la Gironde dans lequel ce type d'échantillonnage en station fixe ne permet pas de couvrir une aussi large gamme de salinité.

2-3-1- Caractérisation des échantillons prélevés lors du point fixe

La position de la station fixe était la bouée 19 en amont du pont de Normandie. Nous avons donc échantillonné durant un cycle de marée à six temps différents du cycle en surface et au fond de la colonne d'eau. La figure 4-22 présente les différents temps auxquels les échantillons ont été prélevés ainsi que les données de salinité, COD et MES.

On remarque tout d'abord que les valeurs de COD et de MES semblent corrélées jusqu'à l'étale de basse mer (temps T4).

En effet, en surface, ces deux valeurs augmentent jusqu'au deuxième prélèvement de jusant (T3) et diminuent par la suite. Au fond de la colonne d'eau, le COD et les MES augmentent jusqu'à l'étale de basse mer (T4). Les divergences apparaissent lors du flot (T5), puisqu'en surface le COD et les MES continuent de diminuer avec l'augmentation progressive de la salinité tandis qu'au fond, le COD reste constant alors que les MES montrent une très forte augmentation. Ce comportement indique que le bouchon vaseux sédimente au fond de la colonne d'eau durant l'étale de basse mer et que le flot remet en suspension du sédiment. Il est cependant intéressant de noter que cette remise en suspension ne s'accompagne pas d'une augmentation particulière de la teneur en COD au fond comme nous l'avons observé sur la Gironde.

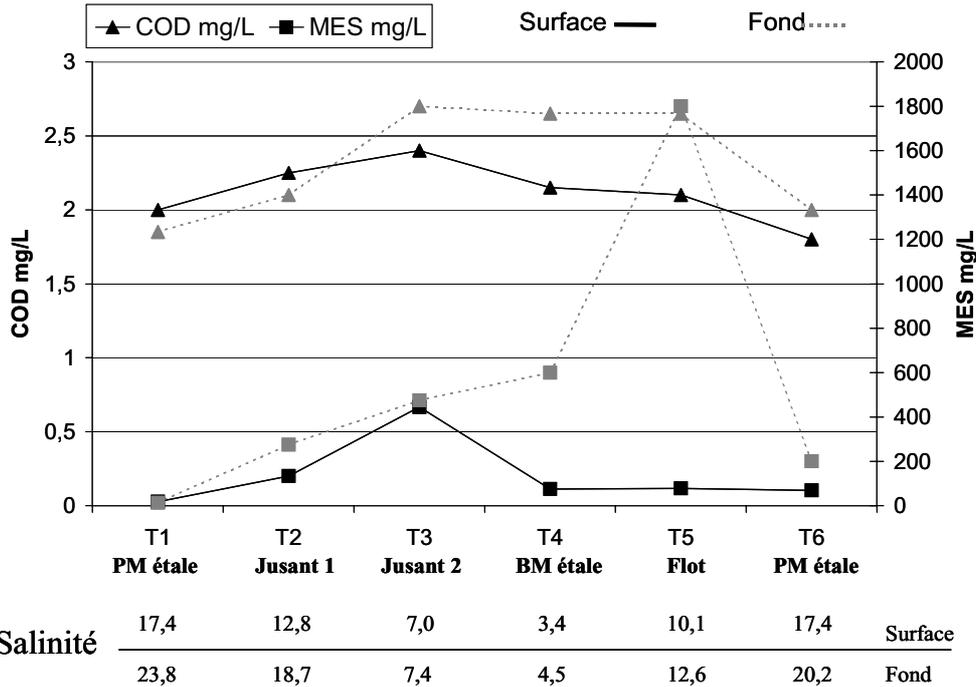


Figure 4-22. Teneurs en COD et MES aux différents temps de prélèvement à la station fixe de la mission Nuts 02 (septembre 2002).

Les spectres de fluorescence 3D des 12 échantillons présentent uniquement les deux bandes de fluorescence α' et α . Ils ne sont pas présentés ici car ils ne montrent aucune différence notable les uns vis à vis des autres si ce n'est en terme d'intensité de fluorescence. Ainsi la figure 4-23 présente les intensités des différentes bandes caractéristiques de fluorescence de la MOD pour les échantillons de surface.

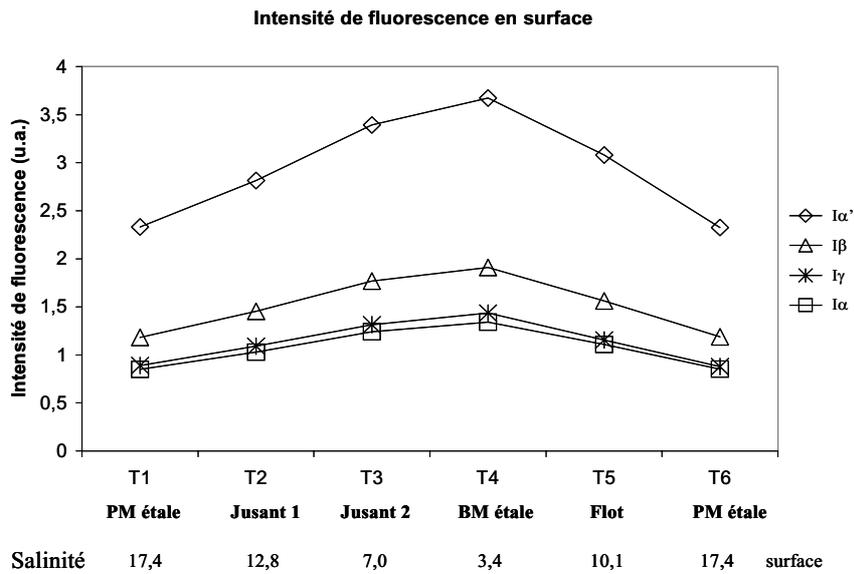


Figure 4-23. Intensité de fluorescence des bandes α' , α , β et γ aux différents temps de prélèvements (station fixe, Nuts 02, septembre 2002)

Les quatre bandes présentent exactement les mêmes variations à la fois en surface et au fond de la colonne d'eau. En effet, les bandes β et γ n'étaient pas discernables de la fluorescence des fluorophores humiques α' et α sur les spectres 3D. L'évolution de l'intensité de fluorescence n'est pas totalement corrélée au COD en surface puisque le maximum de fluorescence a été obtenu au temps T4 (étiage de basse mer) alors que le COD était maximum au temps T3. Il est difficilement possible de fournir une explication à ce décalage puisque aucune singularité de la MOD fluorescente n'est apparue sur les matrices 3D comme en témoigne l'évolution des rapports d'intensité de fluorescence (fig. 4-24).

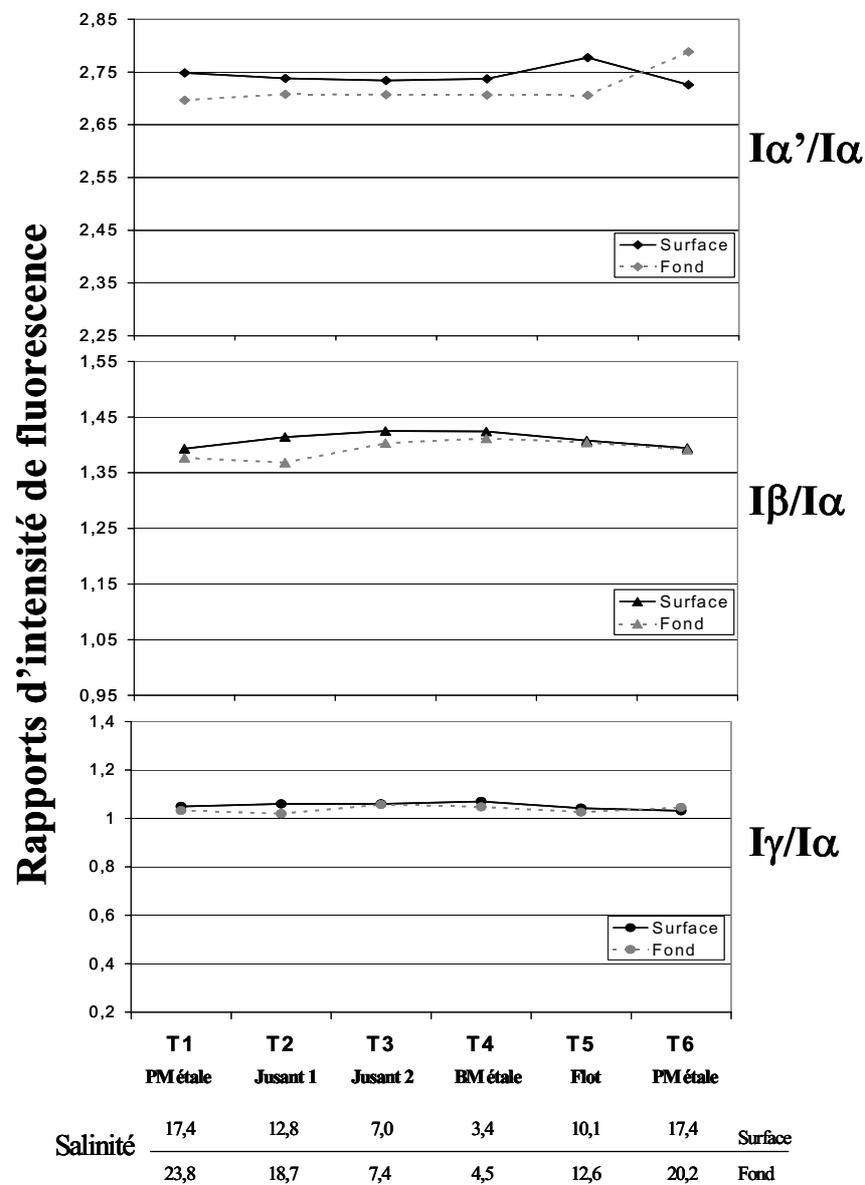


Figure 4-24. Rapports d'intensités de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α} aux différents temps de prélèvement (station fixe, Nuts 02, septembre 2002).

D'ailleurs les indices HIX et f380/f430 (fig. 4-25) ne présentent également aucune variation significative si ce n'est une très légère diminution de f380/f430 dans le BV. Les valeurs sont bien dans la gamme de celles obtenues pour des salinités semblables lors du transect effectué à l'occasion de la même mission (chapitre 3, paragraphe 3, figure 7).

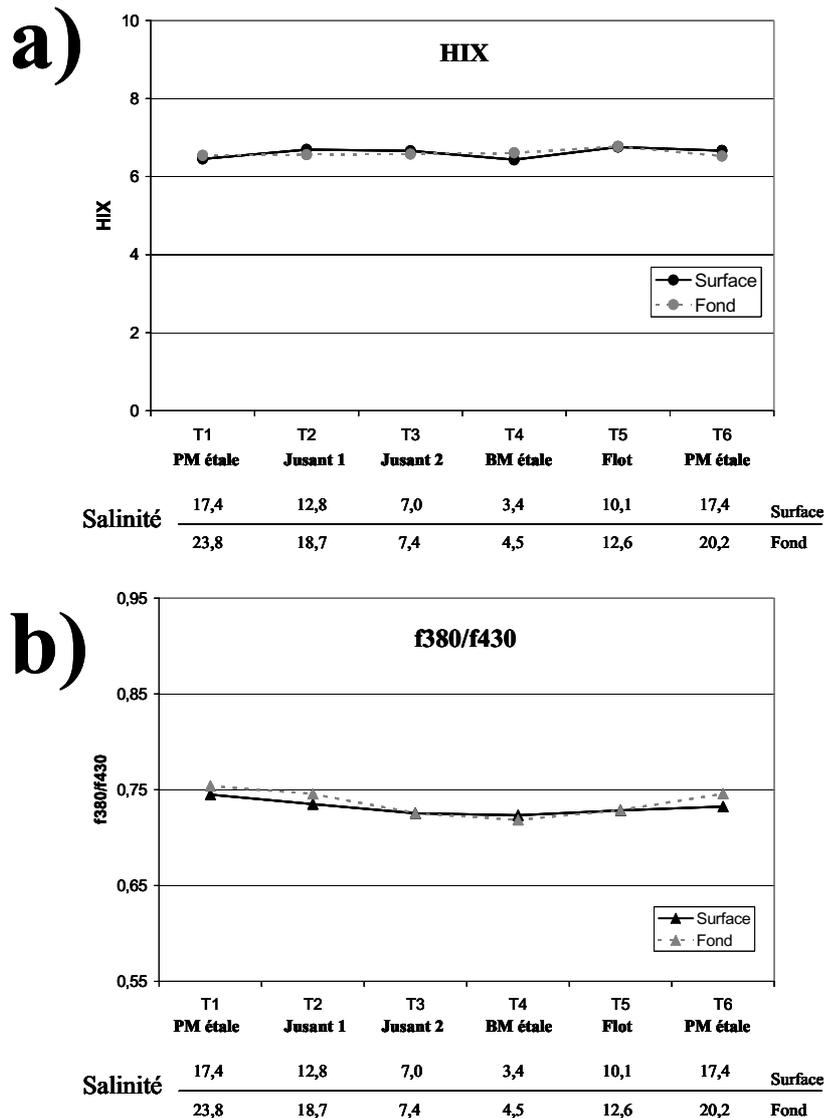


Figure 4-25. a) Indice d'humification HIX et b) indice de fluorescence f380/f430 aux différents temps de prélèvement (station fixe, Nuts 02, septembre 2002).

Cependant, malgré la forte homogénéité des propriétés de fluorescence de ces échantillons nous avons tout de même réalisé le fractionnement par ultrafiltration des échantillons prélevés aux temps T1, T3 et T5 qui rendent compte respectivement de la

position aval lors de l'étalement de pleine mer, de la présence du bouchon vaseux en surface lors du jusant et de la remise en suspension au fond de la colonne d'eau durant le flot.

2-3-2 Fractionnement par ultrafiltration

Comme nous l'avons précisé, pour la mission de juillet 2002, les fractionnements ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire RCMO de Toulon et les seuils de coupure retenus étaient de 10, 1 et 0,5 kDa avec les mêmes systèmes d'ultrafiltrations que décrits précédemment. Les titrations potentiométriques n'ont pas pu être réalisées et nous présenterons ici seulement les résultats concernant le COD et les propriétés de fluorescence.

2-3-2-1- Distribution du COD

Le tableau 4-5 regroupe les résultats des mesures de COD dans les différentes fractions. Les fractionnements ont été réalisés avec 1L de chaque échantillon initial.

Fraction	Masse Moléculaire (kDa)		Carbone Organique Dissous (μg)		
			T1 PM étalement	T3 Jusant 2	T5 Flot
Rétentat 10 kDa	MM > 10	surface	288,6	390,5	538,2
		fond	236,5	539,0	426,3
Rétentat 1 kDa	3 > MM > 1	surface	144,3	1012,3	467,1
		fond	407,0	1076,4	627,2
Rétentat 0,5 kDa	1 > MM > 0,5	surface	656,8	388,1	392,2
		fond	492,1	259,8	356,4
Filtrat 0,5 kDa	0,5 > MM	surface	872,5	542,1	488,8
		fond	630,2	694,6	823,5
Pertes totales		surface	37,8	67,0	213,2
		fond	84,5	280,1	416,6

Tableau 4-5. Masses de COD dans les différentes classes de taille moléculaire de l'estuaire de la Seine (mission NUTS 2) pour 1L d'échantillon fractionné.

Les pertes en COD sont plus faibles que lors du fractionnement des échantillons de la mission de juillet et montrent un meilleur conditionnement des cartouches et une plus grande maîtrise du protocole analytique.

On remarque ensuite que les distributions sont globalement homogènes entre la surface et le fond (figure 4-26). Lors de l'étale de pleine mer (T1) les distributions montrent des caractéristiques correspondantes à un point relativement aval de l'estuaire avec une prépondérance de composés < 1 kDa. Dans le bouchon vaseux (T3), qui au jusant est bien homogène dans la colonne d'eau (fig. 4-22), les distributions montrent une prépondérance des fractions colloïdales > 1 kDa et en particulier de la fraction contenant les macromolécules de taille comprise entre 1 et 10 kDa. Ainsi l'augmentation du COD observée à ce moment là dans le BV (fig. 4-22) est dû à une présence plus importante de composés humiques de haut poids moléculaires (principalement entre 1 et 10 kDa) comme en témoigne parallèlement l'augmentation de la fluorescence (fig. 4-23) et l'augmentation de la masse de carbone organique dissous dans le rétentat 1 kDa. Enfin, lors du flot on remarque que le COD est relativement bien réparti dans chacune des fractions avec tout de même une prédominance des plus petites molécules (filtrat 500 Da) au fond de la colonne d'eau.

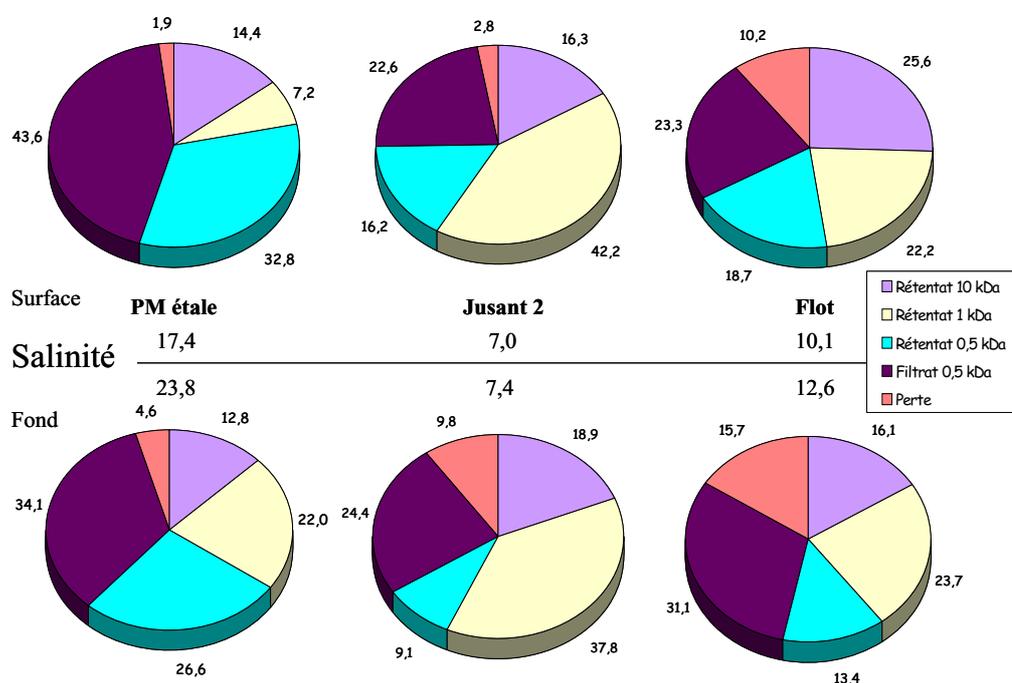


Figure 4-26 Distribution du COD dans les fractions d'ultrafiltration le long de l'estuaire de la Seine (Nuts 02). Résultats donnés en pourcentage massique du COD des échantillons initiaux.

2-3-2-2- Propriétés de fluorescence

Les spectres de fluorescence 3D des différentes fractions obtenues sont présentés en annexe (annexes 11, 12 et 13). Les spectres des fractions des temps T3 et T5 sont très semblables entre eux et présentent les mêmes caractéristiques que les échantillons initiaux rappelant le caractère fractal de la MOD fluorescente. Seuls les filtrats 500 Da se distinguent par le décalage du spectre d'émission vers les plus courtes longueurs d'onde pour une excitation à 310 nm dont nous avons déjà parlé précédemment. Les spectres des fractions de l'échantillon prélevé lors de l'étale de pleine mer sont similaires entre la surface et le fond et présentent les mêmes caractéristiques qui ont déjà été observées pour l'échantillon d'une salinité de l'ordre de 20 lors de la mission NUTS 1, c'est à dire la présence d'une bande γ très marquée dans le rétentat 500 Da et absente des fractions de tailles supérieures, ainsi que le décalage hypsochromique à 310 nm et la présence d'une bande γ un peu moins marquée et émettant à de plus longues longueurs d'onde dans les filtrats.

En ce qui concerne les rapports d'intensité des bandes de fluorescence (fig. 4-27), on peut noter que les fractions des échantillons T3 (BV) et T5 (flot) ont les mêmes valeurs des rapports ce qui indique que la distribution des fluorophores dans les différentes fractions ne varie pas entre ces deux temps du cycle de marée. De plus ces rapports ne varient quasiment pas entre la surface et le fond. Le rapport $I\alpha'/I\alpha$ (fig. 4-27a) est plus faible dans les fractions de l'échantillon de pleine mer (T1) ce qui tendrait à dire que les substances humiques qu'elles contiennent sont légèrement moins juvéniles. Le rapport $I\gamma/I\alpha$ (fig.4-27b) est légèrement plus important dans le BV que lors du flot, ce qui montre une plus forte proportion de composés protéiques dans le BV. Mais c'est principalement dans le rétentat 1 kDa et dans une moindre mesure dans le filtrat 500 Da de l'échantillon de pleine mer (T1) que ces composés protéiques sont en plus forte proportion.

Enfin, le rapport $I\beta/I\alpha$ donne exactement les mêmes informations que l'indice de fluorescence f_{380}/f_{430} (fig. 4-28a) qui montre une augmentation de la proportion de composés β avec la diminution de la taille moléculaire.

L'indice d'humification HIX (fig. 4-28b) montre que les fractions de haut poids moléculaires de l'échantillon de pleine mer présente un caractère plus humifié contrairement aux fractions de petites tailles (< 1 kD) qui ont de très faibles valeurs de HIX. Cet indice dans les fractions des échantillons T3 et T5 présente la même évolution en fonction de la taille moléculaire mais avec des valeurs légèrement plus élevées lors du flot.

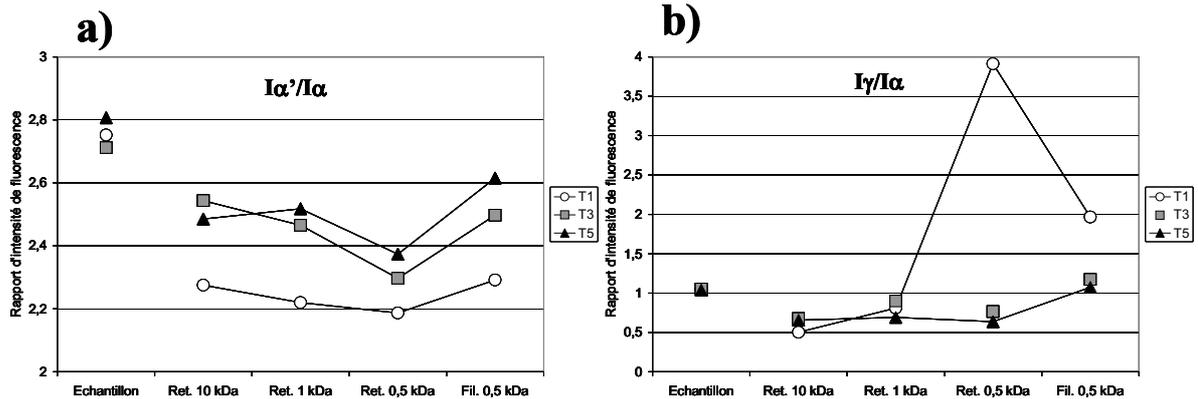


Figure 4-27. Rapports d'intensité de fluorescence a) $I\alpha'/I\alpha$ et b) $I\gamma/I\alpha$ dans les fractions d'ultrafiltration des échantillons prélevés en surface aux temps T1, T3 et T5 (station fixe, Nuts 02, septembre 2002).

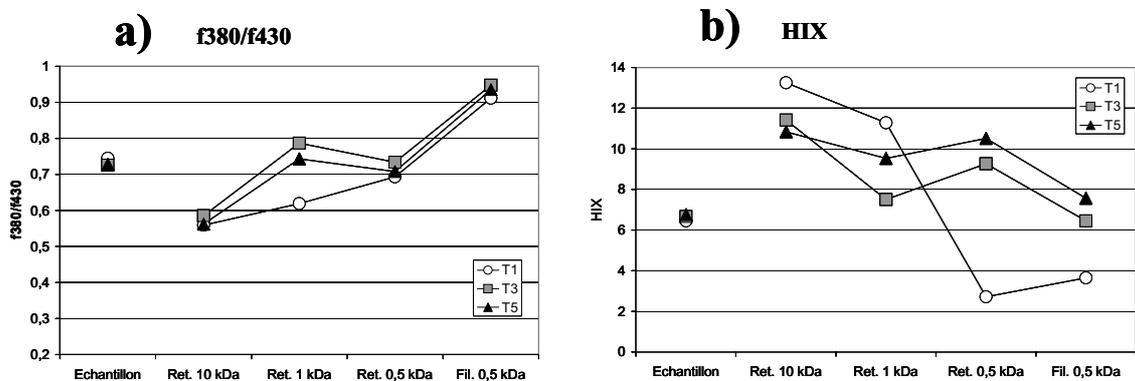


Figure 4-28. a) Indice de fluorescence $f380/f430$ et b) indice d'humification HIX dans les fractions d'ultrafiltration des échantillons prélevés en surface aux temps T1, T3 et T5 (station fixe, Nuts 02, septembre 2002).

3- SYNTHÈSE DES RESULTATS D'ULTRAFILTRATION

L'ensemble des fractionnements par ultrafiltration de la MOD des estuaires de la Seine et de la Gironde ont permis de mettre en évidence plusieurs caractéristiques particulières concernant la nature et les modifications des composés organiques dissous lors du transit estuarien et notamment dans le bouchon vaseux de ces estuaires. En effet, le comportement grossièrement conservatif qui a été attribué jusqu'à récemment au carbone organique dissous dans les estuaires cache en fait de profondes modifications de ses propriétés lors du mélange des eaux fluviales et marines.

L'étude des teneurs en carbone organique dissous dans les fractions d'ultrafiltration montre que la distribution du COD dans les différentes classes de taille moléculaire varie entre l'amont et l'aval de chacun des deux estuaires mais que cette distribution est également différente entre les deux estuaires.

Ainsi, si les distributions de COD dans la partie aval des deux estuaires sont relativement identiques, la phase dissoute dans le BV et en amont de celui-ci dans l'estuaire de la Seine est principalement constituée de composés de plus hautes tailles moléculaires au détriment des molécules de très petites tailles (< 1kDa) tandis que sur l'ensemble de l'estuaire de la Gironde ces petites molécules concernent globalement la même fraction du COD.

Ceci permet de rendre compte de la différence des apports fluviaux à ces deux estuaires. L'estuaire de la Seine semble drainer une plus grande proportion de macromolécules organiques de grande taille moléculaire (>1kDa), ce qui pourrait être lié aux plus fortes teneurs en COD généralement observées dans l'estuaire de la Seine (chapitre 3).

La MOD de l'estuaire de la Gironde semble caractérisé par une fraction importante du COD composée de petites molécules (<500Da) malgré des teneurs en COD élevées pour l'échantillon de bouchon vaseux fractionné dans cette étude.

D'autre part, des phénomènes de remise en suspension de sédiment et de floculation des composés dissous ont pu être mis en évidence lors de cette étude. Il est particulièrement intéressant de noter que la remobilisation du sédiment s'est accompagnée d'une libération de COD dans le fond de la colonne d'eau dans la Gironde alors que pour la Seine, la phase organique dissoute n'a pas été affectée par la remise en suspension.

En ce qui concerne les propriétés de fluorescence de la MOD, le fractionnement par ultrafiltration a mis en évidence plusieurs phénomènes caractéristiques. Tout d'abord, le caractère fractal de la matière organique fluorescente est traduit par le fait que les fluorophores caractéristiques de la MOD se retrouvent dans toutes les classes de taille moléculaire. Cependant la distribution de ces fluorophores entre les différentes fractions varie le long de l'estuaire mais également dans la colonne d'eau. De plus, le fractionnement par ultrafiltration a permis d'observer et d'isoler des fluorophores qui n'étaient pas discernables au sein des matrices de fluorescence des échantillons bruts.

Ainsi, le fluorophore γ de type protéique n'est pas toujours clairement observable sur les spectres des échantillons initiaux et il a été nettement isolé dans certaines fractions. Il est en effet intéressant de noter que dans la Seine sa présence est nette en amont et en aval du BV et qu'il est principalement associé à des composés de tailles comprises entre 500 et 1000 Da. Dans la partie « marine » de l'estuaire, il est présent dans toutes les classes de taille moléculaire et elle est clairement reliée à des modifications de la distribution de COD qui indiquent que ces composés constituent une part très importante du COD des eaux marines.

De plus, dans cet échantillon noté « aval marin » nous avons pu observer l'adéquation entre la présence de la bande γ et de l'épaulement β qui confirme bien que ce dernier est lié à

l'activité biologique. D'autre part, dans tous les échantillons, d'amont comme d'aval, nous avons pu isoler dans la fraction de plus petite taille (< 500 Da) le fluorophore qui semble être responsable de cette fluorescence de type β . Le fluorophore β avait été jusqu'à présent uniquement observé dans des échantillons marins et les résultats présentés ici semblent confirmer l'hypothèse que nous avons déjà émise dans le chapitre 3, à savoir que ces composés d'origine biologique sont également présents dans les eaux douces mais en des proportions trop faibles pour être discernables en comparaison du signal très intense des composés humiques.

Il apparaît alors clairement que l'activité biologique au sein des systèmes aquatiques jouent un rôle majeur dans la production de composés organiques dissous fluorescents et il est troublant de constater que les bouchons vaseux des deux estuaires ne semblent pas montrer des proportions importantes de ce type de composés bien que le BV soit considéré comme le siège d'importants cycles de dégradation biologique de la matière organique sous l'effet d'une forte population bactérienne attachée aux particules. Il est possible que le signal de fluorescence très intense des substances humiques dans le bouchon vaseux empêche l'observation de ces phénomènes. Nous allons donc étudier dans le chapitre 5 la production de composés organiques fluorescents dissous associée à la dégradation de cellules phytoplanctoniques dans les bouchons vaseux de la Seine et de la Gironde.

D'autre part, ces expériences d'ultrafiltration ont montré de nettes modifications de la MOD le long des deux estuaires au travers de la distribution du carbone organique et des fluorophores en fonction de la taille moléculaire. Il semble alors tout à fait important de savoir si ces modifications vont influencer les propriétés de la MOD et c'est ce que nous étudierons au chapitre 6 dans le cadre des propriétés de complexation dans l'estuaire de la Gironde.

CHAPITRE 5

DEGRADATION DU PHYTOPLANCTON : APPORTS VERS LA PHASE ORGANIQUE DISSOUE FLUORESCENTE

Nous avons vu dans les chapitres de rappels bibliographiques que le phytoplancton est une composante essentielle de la fraction organique au sein des systèmes estuariens. En effet, le phytoplancton représente une part importante de la matière organique particulaire, il présente un caractère majoritairement labile et forme donc l'essentiel du matériel organique qui est minéralisé dans l'estuaire. La fraction phytoplanctonique représente à ce titre une source majeure de carbone organique dissous au travers de son exsudation et de sa dégradation par l'activité hétérotrophe.

Les deux chapitres précédents ont montré au travers de la fluorescence qu'il se produit des modifications notables des caractéristiques de la MOD le long des estuaires et plus particulièrement au niveau du bouchon vaseux. Ces modifications peuvent provenir de la transformation de la matière organique fluviale, de nouveaux apports d'origine marine ou encore de la dégradation de matériel organique particulaire ou dissous d'origine phytoplanctonique ou bactérienne.

Les apports importants de sels nutritifs par les fleuves favorisent le développement du phytoplancton en amont et en aval du bouchon vaseux car les fortes turbidités limitent la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau et donc la production primaire au niveau du bouchon vaseux. Parallèlement, l'abondance de bactéries hétérotrophes attachées aux particules dans le bouchon vaseux (Crump et al., 1998) entraîne une activité de dégradation intense du matériel phytoplanctonique et de ses produits d'exsudation qui stimule la croissance bactérienne (Ittekkot, 1982 ; Hambach et al., 1993).

Il apparaît donc tout à fait intéressant d'étudier ces processus de dégradation et de suivre les modifications de la fraction organique dissoute fluorescente que peut entraîner la dégradation du matériel particulaire phytoplanctonique.

Pour cela nous avons bénéficié de la collaboration de H. Etcheber, G. Abril et E. Lemaire (UMR 5805 EPOC, Département de Géologie et d'Océanographie, DGO, Université Bordeaux 1) qui ont réalisé des études portant sur l'analyse des pigments pour suivre les cinétiques et les voies de dégradation du phytoplancton. Les détails de leurs travaux et du mode opératoire sont décrits par Lemaire (2002 ; et al., 2002). Ces travaux ont consisté à appréhender par une modélisation *in vitro* les processus de dégradation du matériel phytoplanctonique dans le bouchon vaseux au travers du dosage de divers pigments phytoplanctoniques et de leurs produits de dégradations (phéopigments).

En ce qui nous concerne, cette étude a consisté à suivre la production de matériel organique dissous fluorescent en fonction de la cinétique de dégradation du phytoplancton.

L'influence de deux paramètres environnementaux, la température et la teneur en MES, a été étudiée.

Dans la première partie de ce chapitre sera présenté l'étude en fonction de la température de la dégradation de deux espèces phytoplanctoniques dans un échantillon de bouchon vaseux de la Gironde. L'influence de la teneur en MES sur les modifications de la MOD lors de la dégradation du phytoplancton sera présentée dans la partie suivante et concerne l'estuaire de la Seine.

1- INFLUENCE DE L'ESPECE PHYTOPLANCTONIQUE ET DE LA TEMPERATURE

1-1- Expérience

Le but de cette étude était de déterminer l'influence de la température sur la production de matière organique dissoute fluorescente due à la dégradation de matériel phytoplanctonique particulaire issu de deux espèces différentes.

Cette expérience s'est insérée dans le cadre des travaux de thèse d'E. Lemaire sur la dégradation des pigments qui a mis en place des systèmes d'incubations *in vitro* sommairement décrits ici. Il s'agit de quatre réacteurs d'un volume de 5 litres chacun dans lesquels ont été disposés un prélèvement de bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde dont la teneur en MES est de 440 mg/l. Par la suite, des cultures d'algues phytoplanctoniques ont été introduites dans ces réacteurs (figure 5-1).

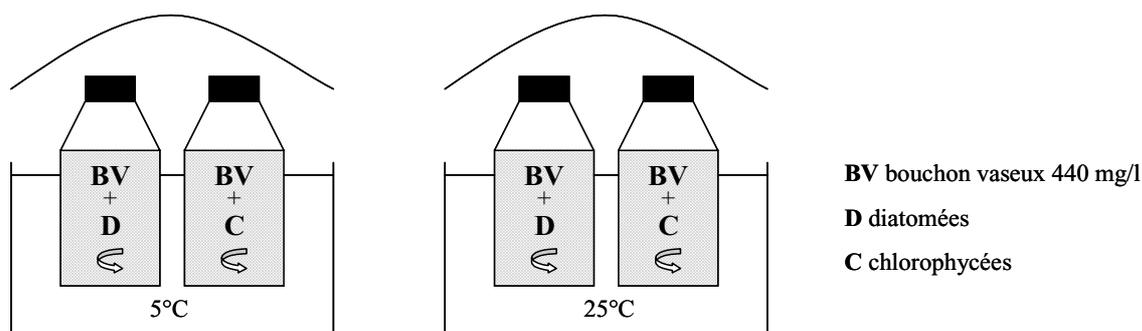


Figure 5-1. Schéma des systèmes d'incubations *in vitro* pour l'étude de l'influence de la température et de l'espèce phytoplanctonique.

Deux souches algales différentes ont été utilisées dans cette expérience : des diatomées (*Asterionella formosa*) et des chlorophycées (*Scenedesmus suspicatus*). Ces deux espèces sont bien représentées dans l'estuaire de la Gironde (Etcheber, 1983) et aussi dans l'estuaire (Garnier et al., 1993). Ces deux souches algales ont été cultivées sur milieu Dauta (Annexe 14) composé de divers sels minéraux jusqu'à leurs phases exponentielles de croissance. La culture de diatomées a part ailleurs été enrichie en silice durant sa période de culture.

Ainsi, les chlorophycées ont été introduites dans deux réacteurs et les diatomées dans les deux autres. La concentration en chlorophylle A était de 0,3µg/L avant introduction des algues, de 135µg/L après inoculation dans les réacteurs contenant les chlorophycées et de 1 µg/L dans les réacteurs contenant les diatomées. Les réacteurs ont alors été disposés par couples (chlorophycées et diatomées) dans deux bacs d'eau thermostatée à 5 et 25°C respectivement ce qui couvre la gamme de température existante sur les estuaires de la

Gironde et de la Seine tout au long de l'année. Une agitation continue a été maintenue dans les réacteurs qui ont été incubés pendant trois semaines à l'obscurité afin de simuler la faible pénétration de la lumière dans le bouchon vaseux de la Gironde et de s'affranchir des phénomènes de photo-oxydation.

Les échantillonnages ont été effectués par E. Lemaire à 0, ½, 3, 7, 14 et 22 jours. Ces échantillonnages ont consisté à prélever 100 mL de chaque réacteur afin de permettre les différentes analyses. Chaque prélèvement a été filtré sur filtre GF/F (Whatman) 0,7 µm pour effectuer les divers dosages particuliers (pigments, COP) et nous avons utilisé le filtrat afin d'étudier par fluorescence 3D l'évolution de la matière organique dissoute lors de ces incubations.

1-2- Résultats et discussion

Les spectres de fluorescence 3D ont été enregistrés selon le protocole classique décrit au chapitre 3. La figure 5-2 présente les spectres de fluorescence de l'échantillon initial de bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde ainsi que les spectres des cultures d'algues filtrés.

Il est tout à fait intéressant de voir que ces deux cultures présentent des caractéristiques de fluorescence très différentes et donc que l'activité biologique de ces deux communautés phytoplanctoniques conduit la formation de composés fluorescents distincts au sein de la fraction organique dissoute.

A titre d'exemple, les figures 5-3 et 5-4 présentent le type d'évolution des spectres de fluorescence 3D que nous avons pu observer durant ces expériences d'incubations.

Ces spectres présentent globalement les caractéristiques propres de l'échantillon de bouchon vaseux (figure 5-2) ainsi que des caractéristiques particulières liées à l'évolution du matériel organique dissous fluorescent. On peut notamment remarquer (fig. 5-3 et 5-4) l'évolution de la bande γ (Exc. 280nm / Em. 335nm), relative aux composés de type protéique et leurs dérivés, dont l'intensité augmente de façon très importante entre 0 et 7 jours avant de diminuer progressivement par la suite. La bande α relative aux substances humiques augmente par contre de façon progressive tout au long de l'expérience. L'élargissement perceptible du spectre pour une excitation à 310nm traduit la présence de la bande β d'ailleurs très marquée dans le cas des chlorophycées (fig. 5-3) aux temps $t = 7$ et 14 jours.

Il est également remarquable de noter que ces variations d'intensité de fluorescence s'accompagnent de modifications de la structure des spectres qui apparaissent sous la forme d'un élargissement pour une excitation à 370 nm par exemple. Cet élargissement correspond à

l'effet bathochrome que nous avons observé sur les spectres des échantillons de fortes salinités dans le chapitre 3.

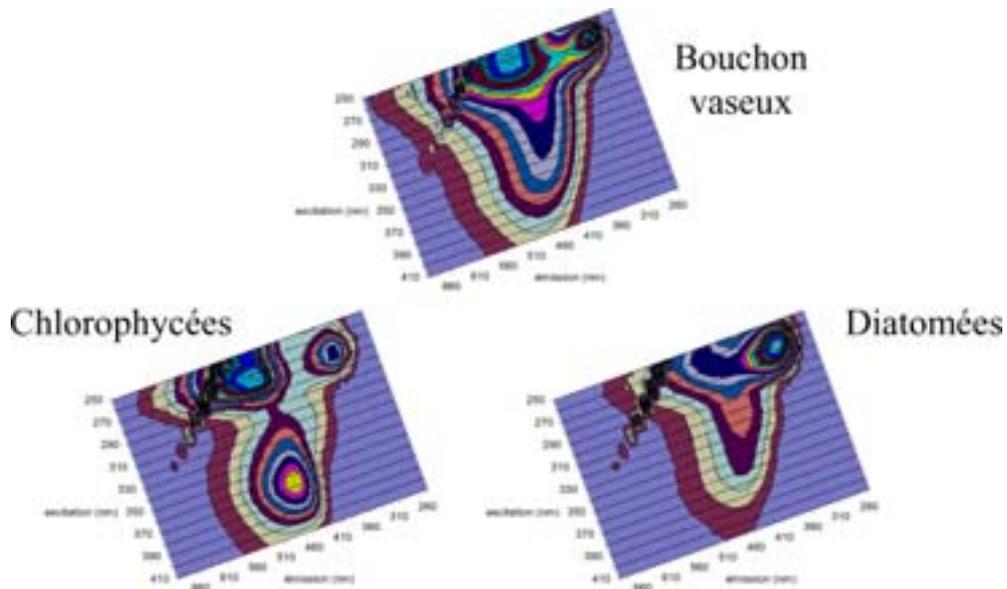


Figure 5-2. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D du bouchon vaseux et des milieux de cultures de cellules phytoplanctoniques filtrés.

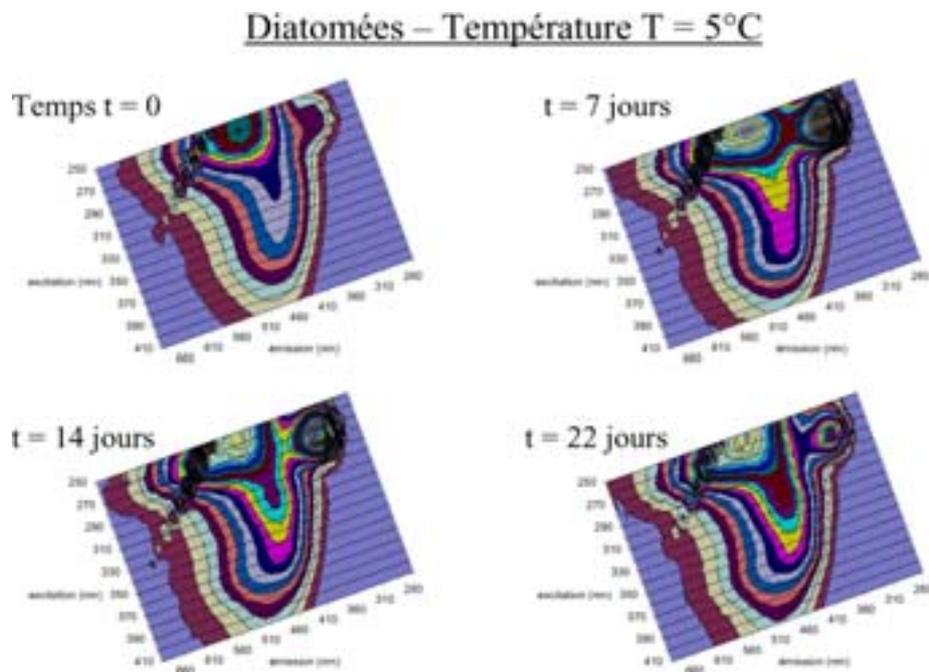


Figure 5-3. Projection dans le plan des spectres de fluorescence 3D de l'incubation à T = 5°C du bouchon vaseux de la Gironde avec la culture de diatomées pour des temps de 0, 7, 14 et 22 jours. Les échelles d'intensité des spectres sont comparables.

Nous avons alors émis plusieurs hypothèses concernant ce décalage vers les plus grandes longueurs d'onde du spectre d'émission. Il est clair que nous pouvons maintenant

éliminer ici celles relatives à un effet de salinité, de force ionique ou de pH sur la floculation ou la structure des macromolécules humiques. Ceci implique donc la présence d'autres types de fluorophores probablement directement liés à l'activité biologique au sein du système que ce soit la dégradation du phytoplancton ou bien des composés liés à l'activité des communautés bactériennes du BV. Cependant ces fluorophores sont en concentration trop faible pour ressortir clairement de la matrice humique.

Chlorophycées - Température T = 5°C

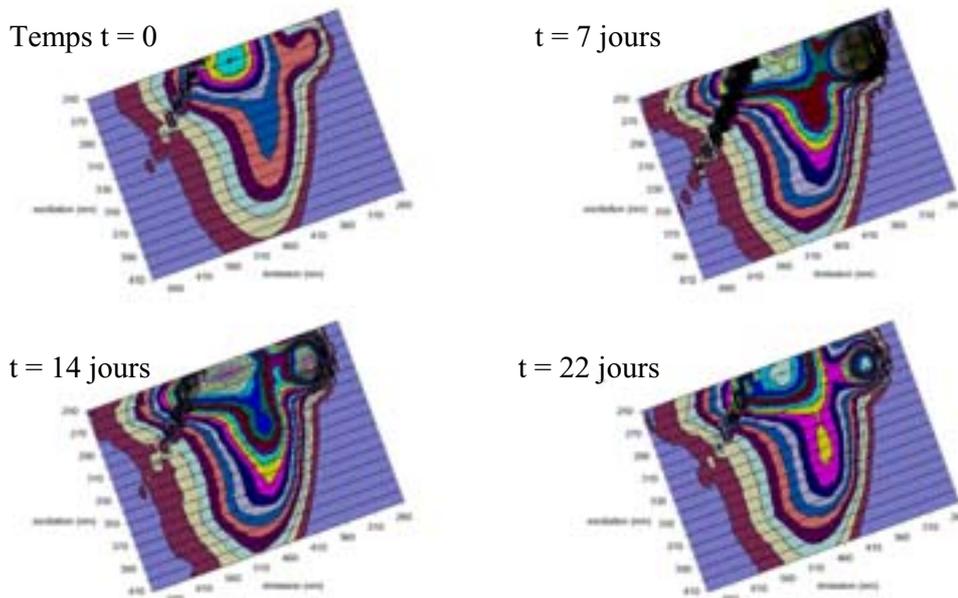


Figure 5-4. Projection dans le plan des spectres de fluorescence 3D de l'incubation à T = 5°C du bouchon vaseux de la Gironde avec la culture de chlorophycées pour des temps de 0, 7, 14 et 22 jours. Les échelles d'intensité des spectres sont comparables.

Comme le montrent les figures 5-3 et 5-4, l'intensité des différentes bandes de fluorescence considérées évolue de façon différente en fonction des deux espèces phytoplanctoniques étudiées que nous allons donc considérer séparément pour présenter les résultats obtenus.

1-2-1- Chlorophycées

La figure 5-5 montre l'évolution en fonction du temps de l'intensité des bandes de fluorescence caractéristiques de la MOD aux différentes températures dans le cas de l'incubation mettant en jeu des chlorophycées..

Les intensités des bandes α et α' présentent sensiblement la même évolution en fonction de la température. Cette évolution se caractérise par une augmentation de l'intensité de fluorescence qui semble se produire en deux temps. Ainsi, on peut noter une très nette

augmentation dans les trois premiers jours de l'incubation et plus marquée à 25°C qu'à 5°C. Ensuite, l'intensité de fluorescence diminue légèrement dans les jours suivants avant d'atteindre un nouveau maximum au bout de 14 jours d'incubation.

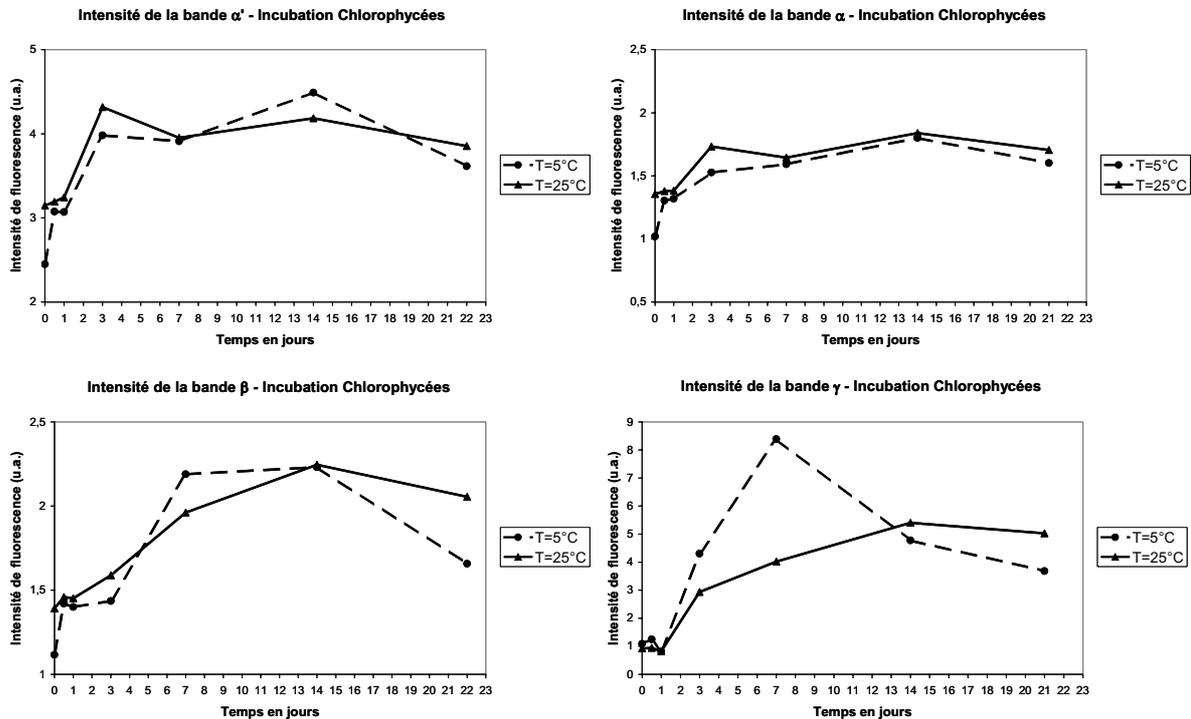


Figure 5-5. Evolution en fonction du temps de l'intensité de fluorescence des bandes α , α' , β et γ durant l'incubation de chlorophycées.

L'intensité de fluorescence de la bande β augmente jusqu'au quatorzième jour pour les deux températures et elle diminue ensuite de façon plus forte à 5°C qu'à 25°C.

La bande γ présente une différence de comportement entre les deux températures. L'intensité augmente très fortement durant la première semaine d'incubation et atteint un maximum au bout du septième jour avant de décroître progressivement par la suite dans le cas de l'expérience à 5°C. A la température de 25°C, l'augmentation de l'intensité est plus douce et se poursuit pendant les deux premières semaines.

Si l'on s'intéresse maintenant aux rapports d'intensité de fluorescence (figure 5-6) on peut constater que le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ augmente durant les trois premiers jours avant de diminuer progressivement par la suite traduisant tout d'abord une présence relativement plus importante de composés de type α' au début de l'incubation et ensuite une diminution de ces composés par rapport à ceux de type α . L'effet de la température sur l'évolution de ce rapport se traduit par une valeur plus importante de $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ à 5°C qu'à 25°C.

Le rapport I_{β}/I_{α} diminue au début de l'incubation à 5°C avant d'augmenter très fortement entre le troisième et le septième jour. Il diminue ensuite linéairement jusqu'à la fin

de l'incubation. A 25°C, après une très légère augmentation durant le premier jour, le rapport I_{β}/I_{α} augmente également entre le troisième et le septième jour mais reste ensuite constant jusqu'à la fin de l'incubation indiquant ainsi un rapport de concentration constant entre les deux fluorophores.

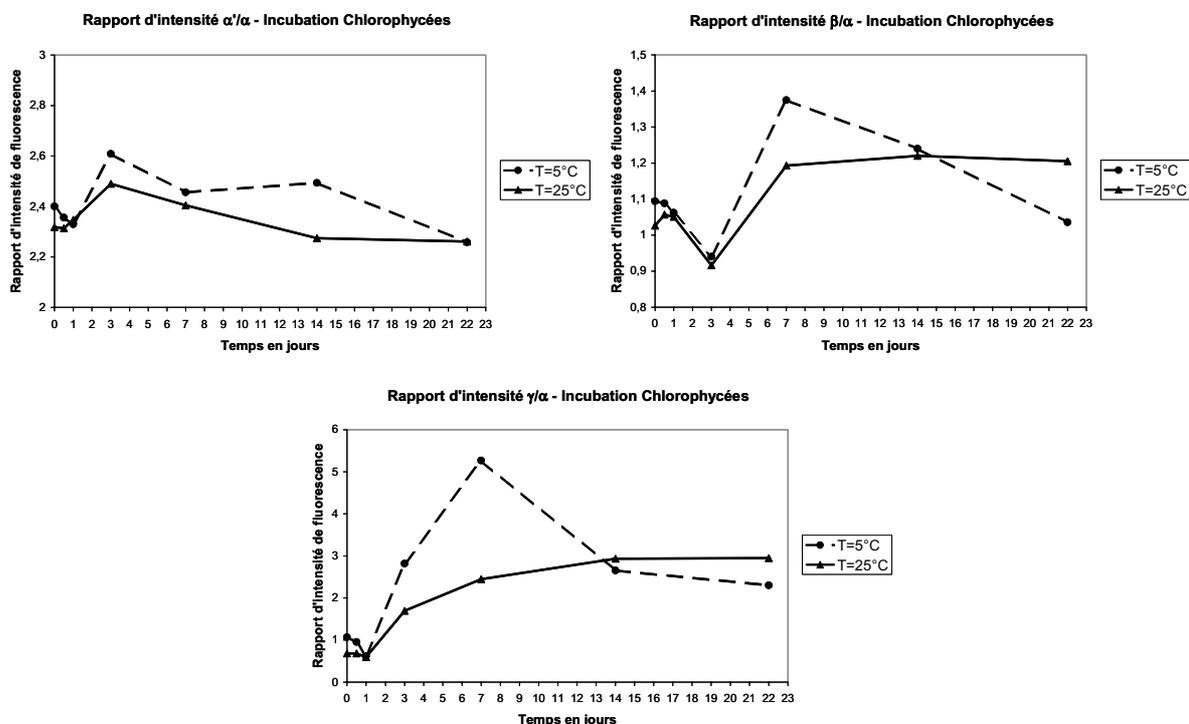


Figure 5-6. Evolution en fonction du temps des rapports d'intensité de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α} durant l'incubation de chlorophycées.

Le rapport I_{γ}/I_{α} à 5°C augmente très fortement durant la première semaine avant de diminuer ensuite alors qu'à 25°C le rapport augmente progressivement tout au long des quinze premiers jours de l'expérience et se stabilise durant la dernière semaine. Ceci indique une apparition très marquée des composés de type protéiques au début de l'expérience à faible température qui disparaissent par la suite tandis qu'à 25°C cette production semble s'amplifier progressivement au cours du temps.

Comme nous l'avons précisé, les spectres des figures 5-3 et 5-4 présentent principalement les caractéristiques de la MOD du bouchon vaseux qui est fortement majoritaire mais ils permettent quand même d'observer l'apparition et l'évolution d'autres fluorophores comme par exemple la bande γ dont la prépondérance facilite le suivi.

Afin de mieux observer l'évolution réelle des fluorophores tout au long de l'incubation nous avons effectué la soustraction des matrices de fluorescence 3D entre le temps t et le temps $t=0$. Ceci permet de rendre compte plus clairement du matériel fluorescent réellement apparu et de ses modifications par rapport au début de l'incubation.

Les figures 5-7 et 5-8 présentent les résultats de ces soustractions de matrices aux temps $t = 3, 7, 14$ et 22 jours pour les deux températures 5 et 25°C .

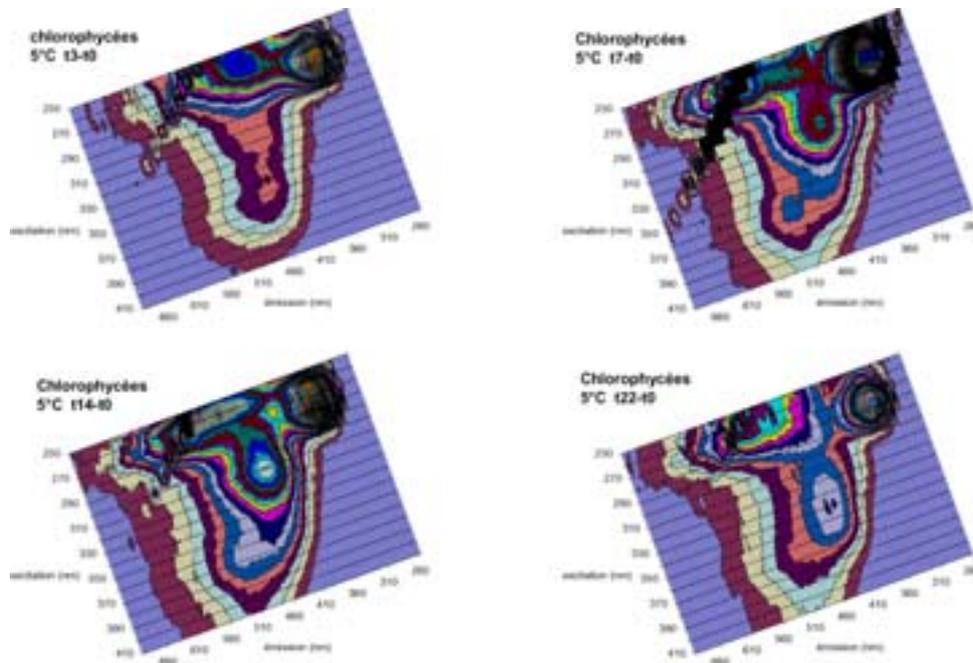


Figure 5-7 Projections dans le plan résultant de la soustraction des matrices de fluorescence aux temps $t = 3, 7, 14$ et 22 jours pour l'incubation des chlorophycées à 5°C .

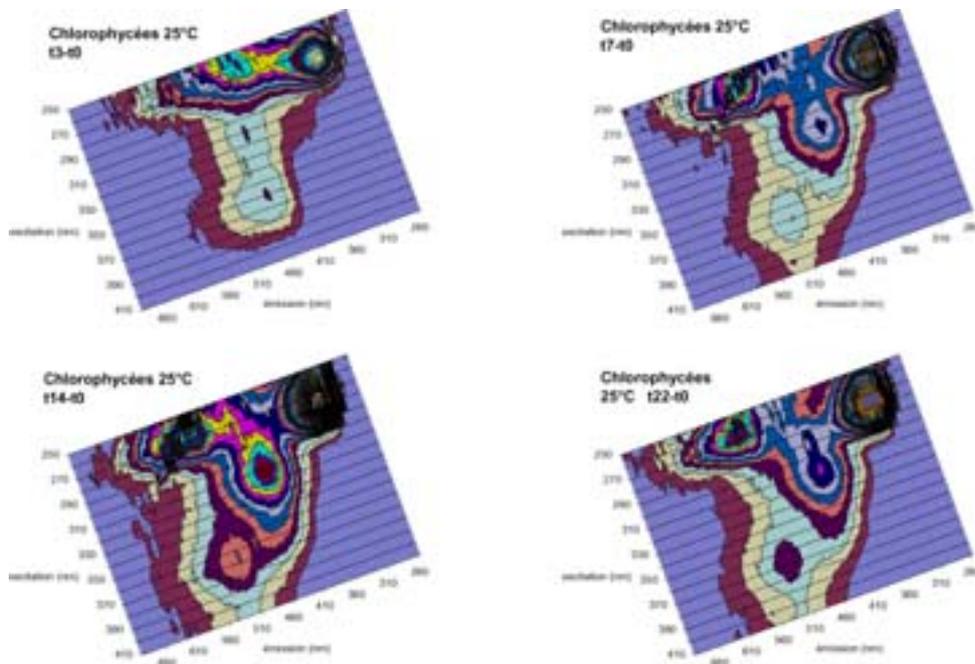


Figure 5-8 Projection dans le plan résultant de la soustraction des matrices de fluorescences aux temps $t = 3, 7, 14$ et 22 jours pour l'incubation des chlorophycées à 25°C .

Sur la figure 5-7 la soustraction de la matrice à $t = 0$ du spectre à $t = 3$ jours montre clairement qu'il y a eu production de composés de type α' , α et surtout γ durant les trois

premiers jours de l'incubation à 5°C comme nous l'avait déjà indiqué le suivi des intensités et des rapports d'intensité de fluorescence. Au septième jour de cette même incubation, l'intensité de la bande γ est à son maximum et elle diminue par la suite tout en restant très intense. Il est très intéressant de noter au septième jour l'apparition d'un maximum de fluorescence bien marqué au couple de longueurs d'ondes d'excitation/émission 310/425nm dont l'intensité augmente encore entre 7 et 14 jours avant d'avoir complètement disparu au 22^{ème} jour au profit d'une bande de type α . Ce résultat rejoint les observations de Parlanti et al. (2000a) qui ont mis en évidence la production de composé de type β qui se décomposent ensuite pour donner lieu à une émission de fluorescence de type α lors d'expériences de dégradation d'algues.

Il est cependant difficile d'attribuer de façon certaine cette bande à des composés de type β comme ceux observés dans des échantillons d'origine marine car ceux-ci émettent généralement à de plus courtes longueurs d'onde (Coble, 1996). Mais il est fortement probable qu'il s'agisse de composés relativement semblables mais présentant des caractéristiques spectrales différentes puisque l'espèce phytoplanctonique utilisée ici est différente de celle utilisée par Parlanti et al. (2000a), et nous avons vu que chaque espèce présente des caractéristiques de fluorescence propres (fig. 5-2).

D'autre part, les conditions d'incubation sont également différentes puisqu'il s'agit ici d'un échantillon de bouchon vaseux de la Gironde ayant une très faible salinité. Nous appellerons tout de même cette bande β puisqu'elle présente des caractéristiques relativement similaires à la bande β observée dans les échantillons de forte salinité. Il est intéressant de noter que cette bande n'apparaît pas de façon nette sur les spectres 3D bruts mais elle est par contre bien définie suite à la soustraction de la matrice de l'échantillon de bouchon vaseux originel (figures 5-7 et 5-8).

Il apparaît donc clairement ici que la bande β est totalement liée à une activité biologique mais pas uniquement dans les eaux marines. En effet cette bande particulière avait jusqu'à présent été observée principalement dans des échantillons purement marins. Comme nous l'avons souvent déjà rappelé dans les précédents chapitres les échantillons estuariens d'influence continentale de faible salinité sont dominés par une fluorescence de type humique qui masque entièrement la présence d'autres fluorophores en plus faibles concentrations.

Parallèlement à l'évolution de cette bande β on peut également noter sur la figure 5-7 pour l'expérience menée à 5°C la présence d'une autre bande particulière qui n'apparaît nettement qu'au bout du septième jour pour une excitation à 365nm et une émission à 520nm. Par la suite, cette bande ne représente plus qu'un épaulement et semble également se fondre

dans le massif α . Cette bande n'a jamais été décrite dans la littérature à notre connaissance et il n'est pas possible de conclure à priori sur la nature des composés qu'elle représente si ce n'est le fait qu'ils sont issus de l'activité biologique au sein de l'incubateur. La présence de cette bande ou épaulement semble également s'accompagner d'un allongement du spectre vers les plus grandes longueurs d'onde d'excitation pour la longueur d'onde d'émission de 520nm.

La figure 5-8 présente les soustractions de matrices pour l'incubation des chlorophycées réalisée à 25°C. L'évolution du signal de fluorescence est sensiblement différente même si elle présente de nombreuses similitudes.

Tout d'abord au bout de trois jours comme à la température de 5°C il y a production de composés de types α' , α et γ mais en concentrations plus faibles car les intensités de fluorescence sont moindres. La bande γ augmente progressivement tout au long de l'expérience comme nous l'indiquait déjà le rapport $I\gamma/I\alpha$. La bande β apparaît également de façon nette au bout du septième jour, elle est encore plus intense au 14^{ème} jour et elle est toujours présente mais plus faiblement au 22^{ème} jour.

A nouveau, on remarque au septième jour la bande déjà observée à 5°C pour le couple d'excitation/émission 370/525m et son prolongement vers les plus grandes longueurs d'onde d'excitation. Cette fois-ci, cette bande est à son maximum au quatorzième jour et elle est toujours nettement présente au 22^{ème}. Enfin, on peut également noter la présence d'une nouvelle bande qui se trouve malheureusement perturbée par la soustraction de la diffusion Rayleigh au second ordre mais qui est très nettement visible sur le spectre t22-t0 pour le couple d'excitation/émission 260/530nm. Encore une fois cette bande n'a jamais été répertoriée dans la littérature à notre connaissance et il est difficile de conclure quant aux composés qu'elle représente.

Il ressort de cette expérience que la dégradation de chlorophycées dans le bouchon vaseux de la Gironde conduit à la production de matériel organique dissous fluorescent particulier. Cependant les différents types de fluorophores caractéristiques produits présentent des cinétiques d'apparition distinctes en fonction de la température.

En effet, l'évolution de ces fluorophores est plus rapide et plus intense à 5°C qu'à 25°C comme en témoigne l'évolution de l'intensité de la bande γ . De même, la bande β est encore présente en fin d'incubation à 25°C tandis qu'elle disparaît au profit de la bande α à la fin de l'incubation à 5°C. La température de 5°C semble globalement favoriser la production de composés organiques dissous fluorescents en terme de vitesse d'évolution des fluorophores

et de leur intensité de fluorescence. Ce phénomène peut éventuellement s'expliquer par le fait que la plus basse température (5°C) inflige aux algues un stress important qui pourrait conduire à une mortalité précoce ou à la production intense par le phytoplancton de composés organiques en raison d'une adaptation aux nouvelles conditions (Ittekkot, 1982). Ceci peut donc expliquer une dégradation plus rapide des cellules tandis que la température de 25°C plus propice à leur survie semble caractérisée par un processus plus lent et progressif de dégradation des cellules phytoplanctoniques. Malheureusement, l'expérience d'incubation n'a duré que 22 jours et il aurait été intéressant de poursuivre encore plus longtemps cette expérience afin de valider cette hypothèse quant à la formation plus tardive d'une bande α bien nette à 25°C.

La bande atypique que nous avons observée (Ex/Em 370/525nm) montre également le même comportement puisque sa présence se prolonge tout au long de l'incubation à 25°C alors qu'elle semble disparaître progressivement après le septième jour à 5°C.

Si on ne tient pas compte du facteur temps, quelle que soit la température considérée, la dégradation et l'évolution des fluorophores semblent suivre le même processus que celui décrit par Parlanti et al. (2000a) qui ont observé la formation consécutive de composés tout d'abord de type γ puis de type β pour aboutir finalement à la formation de composés de type humiques α et α' . Il est un peu surprenant d'observer ici la formation de composés humiques en tout début d'incubation. En effet les bandes de fluorescence α et α' semblent connaître deux processus distincts de formation. On note tout d'abord une forte augmentation de ces composés durant les trois premiers jours et plus particulièrement pour les composés de type α' , puis une nouvelle période de production en fin de deuxième semaine d'incubation montrant cette fois-ci une prépondérance de la formation de composés de types α puisque même si les intensités des deux bandes α et α' augmentent toutes deux, le rapport $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ diminue à ce moment là. Cette présence des composés de type α est moins marquée et moins intense en fin d'incubation à 25°C qu'à 5°C.

Pour expliquer cette évolution en deux temps des composés de type humique au cours de cette expérience, il est tout d'abord possible que ces composés humiques proviennent de la dégradation de composés organiques provenant de la culture des algues. En effet, sur la figure 5-2, le spectre de fluorescence de la culture de chlorophycées filtrée montre déjà la présence de composés fluorescents provenant vraisemblablement de l'exsudation du phytoplancton. Il semble donc fortement probable que ces composés organiques soient alors préférentiellement dégradés par la communauté bactérienne du bouchon vaseux de la Gironde dès le début de l'inoculation et parallèlement à la dégradation du matériel phytoplanctonique. Ces produits

d'exsudation étant déjà partiellement dégradés, le processus d'humification conduit donc à la formation de composés humiques de type α' souvent attribué à du matériel humique d'origine plus récente durant les premiers jours de l'incubation. Ensuite, la communauté bactérienne poursuit son activité de dégradation à proprement parler des cellules phytoplanctoniques qui conduit à la formation de composés de type γ et β .

Une autre hypothèse peut être que l'apparition de composés de type α et α' dans les trois premiers jours de l'expérience provienne de la dégradation par les bactéries de composés organiques dissous ou particuliers présents dans l'échantillon de bouchon vaseux. Cependant il est difficile d'argumenter plus avant puisque les valeurs de COD ne sont pas connues et il est donc difficile de savoir si les très légères diminutions du COP observées par Lemaire (2002) rendent compte de ce phénomène. D'autre part il est regrettable qu'il y ait pas eu de « blanc » d'expérience avec un échantillon de bouchon vaseux sans ajout de phytoplancton mis à incuber à 5 et 25°C qui aurait pu nous permettre d'identifier plus clairement l'origine de ces composés humiques dans les premiers jours de l'expérience.

Nous avons porté sur la figure 5-9 l'évolution de l'indice d'humification HIX au cours de l'incubation. Un petit effet de température est visible au niveau de l'indice puisque après un pic au bout du premier jour d'incubation, HIX diminue jusqu'au septième jour à 5°C et jusqu'au quatorzième jour à 25°C avant d'augmenter progressivement par la suite.

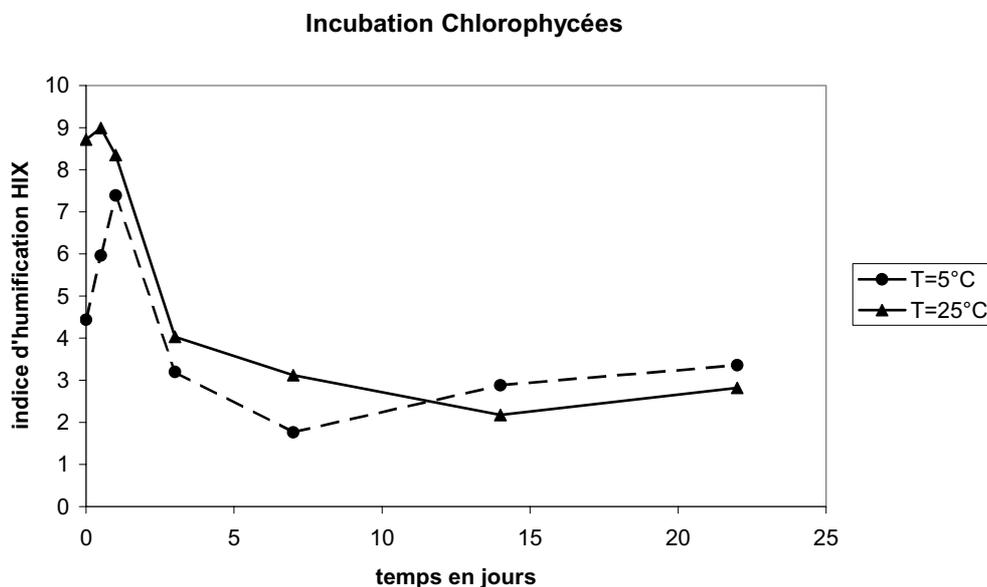


Figure 5-9. Evolution de l'indice d'humification HIX en fonction du temps d'incubation (chlorophycées).

L'évolution de l'indice HIX semble également corroborer nos observations précédentes sur une évolution en deux temps de la dégradation. Tout d'abord le pic intense en

début d'incubation pourrait bien correspondre à l'augmentation des composés humiques durant les premiers jours que nous avons attribués soit à la dégradation par les bactéries de composés présents dans les cultures d'algues ou dans l'échantillon de bouchon vaseux. Ensuite, la chute de l'indice pourrait bien correspondre à la réelle dégradation des cellules phytoplanctoniques et donc à la production de composés labiles récents et donc très peu humifiés qui vont alors commencer à être progressivement dégradés dans la dernière partie de l'incubation comme l'indique la légère augmentation de l'indice.

1-2-2- Diatomées

Les spectres de fluorescence 3D concernant l'incubation de diatomées (fig. 5-3) ont montré des caractéristiques distinctes par rapport à l'expérience mettant en jeu des chlorophycées (fig. 5-4) à 5°C. Il en est de même pour la température de 25°C. En effet, l'évolution en fonction du temps des intensités et des rapports d'intensités de fluorescence des différentes bandes est différente de celle observée dans le cas des chlorophycées et présente une dépendance vis à vis de la température plus marquée (figures 5-10 et 5-11).

Ainsi l'intensité de la bande α' augmente très fortement après le premier jour pour atteindre son maximum au bout de 3 jours d'incubation avant de décroître par la suite dans le cas de l'expérience à 5°C (fig. 5-10). A la température de 25°C l'augmentation de l'intensité de fluorescence se fait plus progressivement et durant toute la première semaine puis l'intensité diminue ensuite.

L'évolution de l'intensité de la bande α présente exactement les mêmes caractéristiques que pour α' pour les deux températures considérées et si l'on s'intéresse au rapport d'intensité $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$ (fig. 5-11), on peut noter que celui-ci est quasiment constant à 5°C tandis qu'il diminue aux alentours du septième jour d'incubation à 25°C traduisant alors une prépondérance des apports en fluorophores de type α par rapport à ceux de type α' .

L'intensité de la bande β (fig. 5-10) augmente entre le premier et le troisième jour avant de se stabiliser par la suite pour l'expérience à 5°C tandis que l'augmentation se poursuit jusqu'au quatorzième jour à 25°C et l'intensité diminue ensuite indiquant la disparition progressive de ce type de fluorophores. La valeur du rapport I_{β}/I_{α} (fig. 5-11) présente justement une augmentation au quatorzième jour qui est plus marquée à 25°C et traduit à ce moment là un apport plus significatif de ce type de composés avant de décroître par la suite. A 5°C, le rapport qui avait diminué au départ présente une augmentation linéaire et progressive à partir du troisième jour.

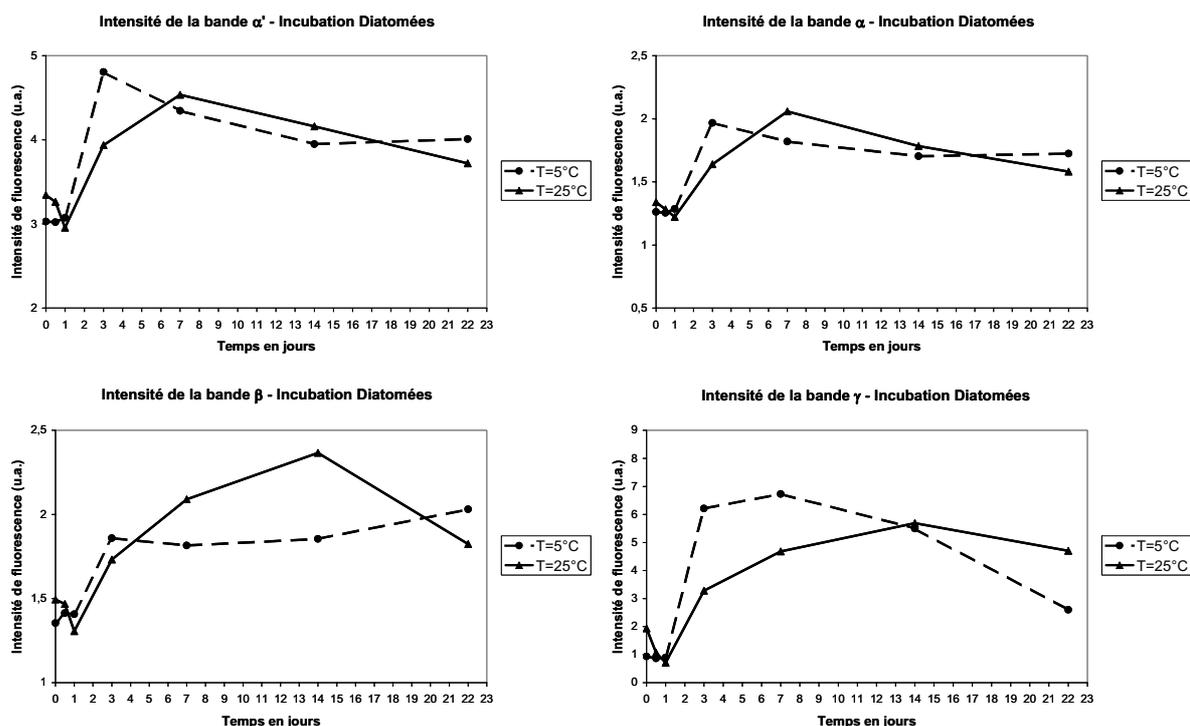


Figure 5-10. Evolution en fonction du temps de l'intensité de fluorescence des bandes α , α' , β et γ durant l'incubation de diatomées.

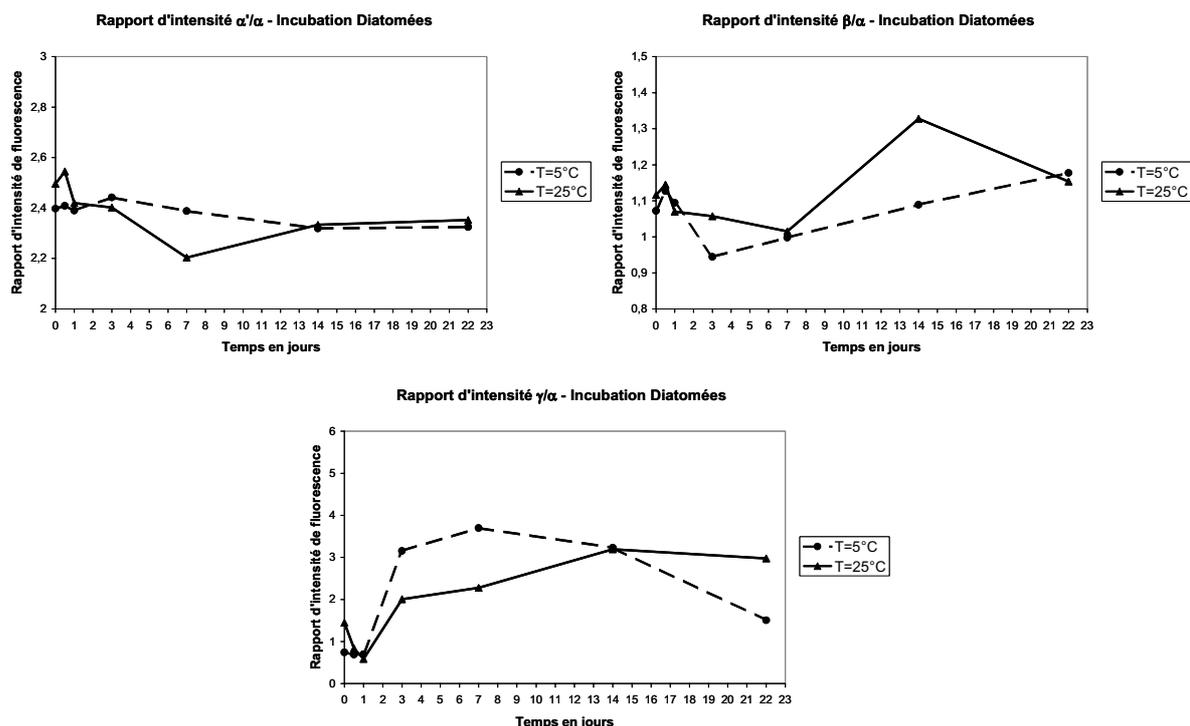


Figure 5-11. Evolution en fonction du temps des rapports d'intensité de fluorescence $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} et I_{γ}/I_{α} durant l'incubation de diatomées.

Les composés de type protéique γ apparaissent de façon relativement importante entre le premier et le troisième jour de l'incubation à 5°C comme en témoigne l'intensité de la bande γ qui reste très importante jusqu'au quatorzième jour d'incubation avant de diminuer

par la suite. Dans le cas de l'expérience à 25°C cette augmentation se fait plus progressivement et atteint le maximum d'intensité au bout du quatorzième jour, la diminution de l'intensité par la suite est également plus modérée qu'à 5°C. Le rapport d'intensité I_{γ}/I_{α} présente les mêmes caractéristiques que les variations de l'intensité indiquant une présence plus importante et une apparition plus rapide à 5°C tandis que cette apparition est plus progressive à plus haute température.

Une profonde différence est ainsi mise en évidence par rapport à l'incubation portant sur des chlorophycées puisque dans le cas des diatomées, l'augmentation de la concentration en substances humiques que traduit l'augmentation de l'intensité des bandes α et α' ne se produit pas en deux temps distincts puisque qu'il n'y a qu'un seul maximum d'intensité de fluorescence (figure 5-10). De plus, on peut noter un effet de la température sur le processus d'humification puisque l'apparition des composés humiques semble plus rapide à 5°C qu'à 25°C.

L'évolution de l'indice d'humification HIX au cours de l'incubation (figure 5-12) est identique à celle observée dans le cas des chlorophycées. Ceci indique que dans le cas des deux espèces phytoplanctoniques, les produits de dégradation sont relativement identiques et que l'avancement de cette dégradation (humification) se fait de la même façon. On remarque à nouveau un petit effet de la température sur l'indice HIX.

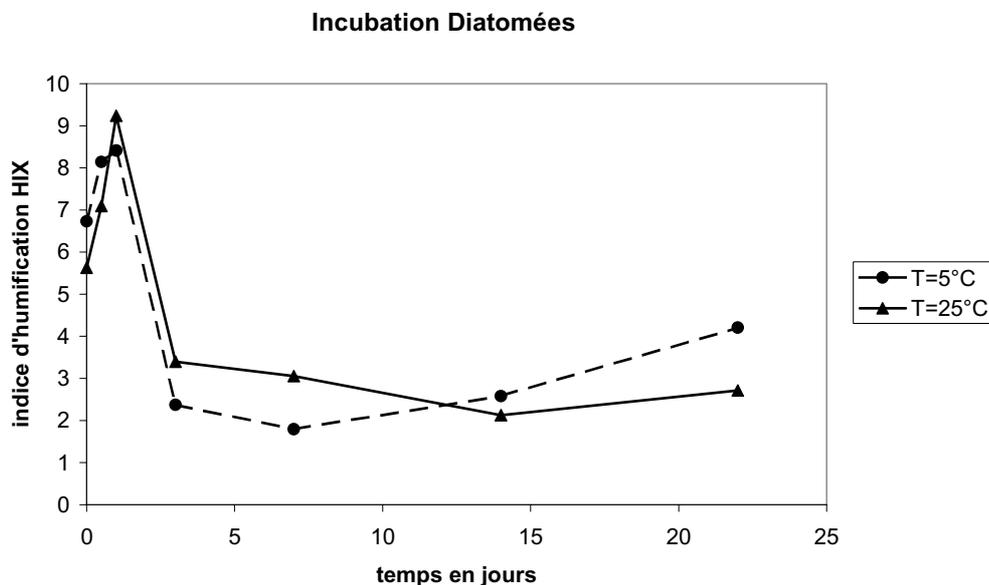


Figure 5-12 Evolution de l'indice d'humification HIX en fonction du temps d'incubation (diatomées)

Les valeurs de l'indice HIX sont faibles à partir du troisième jour d'incubation alors même que l'on remarque parallèlement que les bandes α et α' augmentent jusqu'au

quatorzième jour (figure 5-10). En effet, l'indice d'humification HIX donne une information globale sur l'échantillon en terme d'origine de la MOD. Ainsi, la présence de composés de type α et α' considérés comme bien humifiés est contrebalancée par la présence importante d'autres composés issus de l'activité biologique comme par exemple les composés de type γ . Au niveau global les échantillons présentent donc des valeurs de HIX très faibles qui rendent bien compte de l'origine phytoplanctonique récente de la majorité du matériel organique fluorescent.

Les composés de type protéique γ se comportent de façon totalement identique à celle observée lors de l'expérience relative aux chlorophycées. Ceci semble indiquer que la production de ce type de matériel organique dissous ne semble pas dépendre de l'espèce phytoplanctonique considérée mais laisse par contre apparaître une influence de la température puisque que leur présence est plus marquée à 5°C qu'à 25°C. Il est à nouveau possible d'émettre la même hypothèse que dans le cas des chlorophycées à savoir que cet effet de température soit consécutif à un stress provoquant une dégradation plus rapide des cellules algales et donc une apparition plus rapide et plus intense de composés de type protéique. Il faut également tenir compte du fait que les composés de type protéique peuvent aussi provenir des bactéries qui libèrent ce type de composés durant leur croissance ou leur décomposition (Tanoue et al., 1995 ; Kalbitz et al., 2003b ; Yamashita et Tanoue, 2003).

Comme dans le cas des chlorophycées nous avons procédé à la soustraction des matrices de fluorescence 3D des diatomées entre un temps t et le temps $t=0$ afin de rendre compte plus précisément du matériel fluorescent réellement apparu et de ses modifications par rapport au début de l'incubation. Les projections dans le plan des spectres 3D résultant de ces soustractions sont présentées sur les figures 5-13 et 5-14 pour les température de 5 et 25°C respectivement.

Ces figures montrent globalement la présence des mêmes fluorophores que dans le cas des chlorophycées mais leur évolution dans le temps est différente.

La bande γ est très intense dès le troisième jour de l'incubation à 5°C et décroît par la suite tandis qu'à 25°C son augmentation est progressive comme l'a montré l'évolution de l'intensité de fluorescence de cette bande (fig. 8).

La bande β est bien marquée cette fois-ci tout au long de l'incubation quelque soit la température et plus particulièrement au quatorzième jour à 25°C.

On peut également observer à nouveaux la présence des deux bandes atypiques que nous avons observées dans le cas des chlorophycées aux couples de longueurs d'onde d'excitation/émission 260/530nm et 370/525nm. Cette dernière est présente dès le troisième

jour de l'incubation à 25°C et de façon plus intense qu'à 5°C. En effet elle semble plus longue à apparaître à 5°C puisqu'elle n'est clairement définie qu'au quatorzième jour. Il est toujours impossible de conclure quant à l'origine exacte de ces deux bandes et la nature des composés qu'elles représentent. On ne peut que regretter à nouveau l'absence d'un « blanc » d'expérience constitué du bouchon vaseux sans algues mis à incuber dans les mêmes conditions qui nous aurait aidé à déterminer l'origine de ces composés.

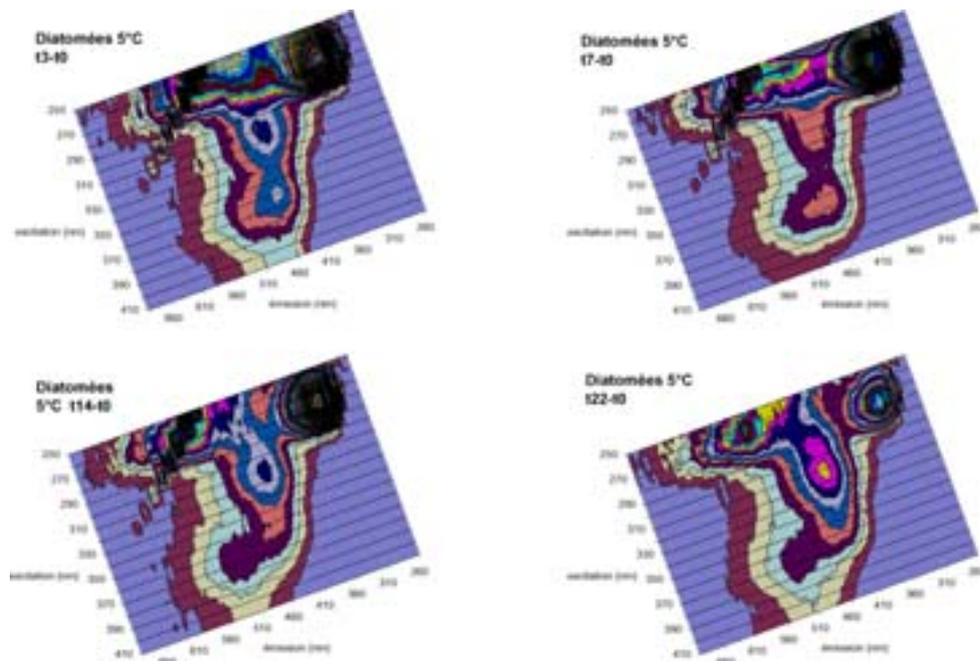


Figure 5-13. Projections dans le plan résultant de la soustraction des matrices de fluorescence aux temps $t = 3, 7, 14$ et 22 jours pour l'incubation des diatomées à 5°C.

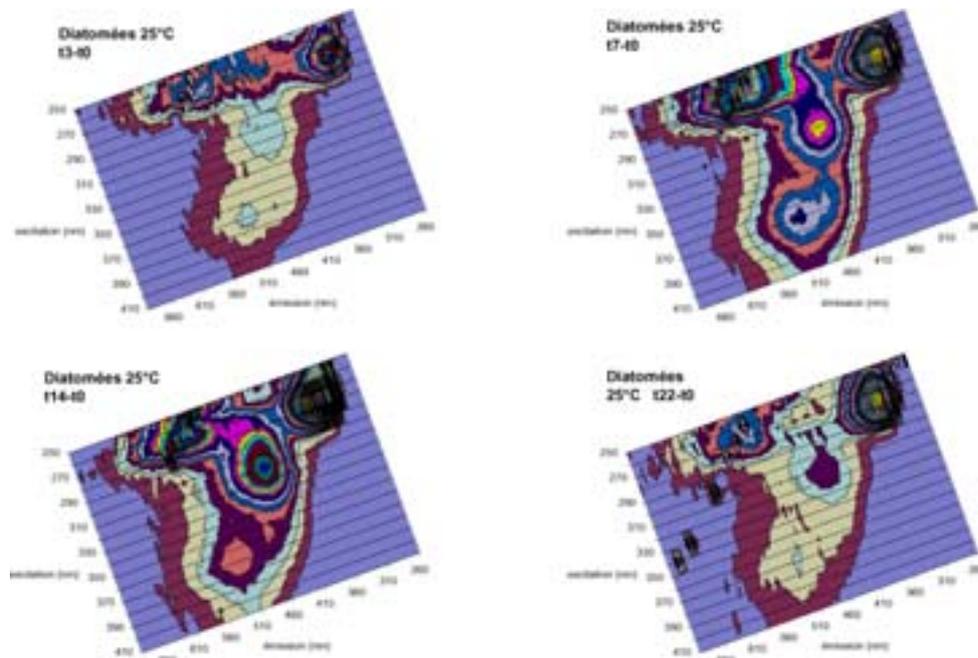


Figure 5-14. Projections dans le plan résultant de la soustraction des matrices de fluorescence aux temps $t = 3, 7, 14$ et 22 jours pour l'incubation des diatomées à 25°C.

1-3- Synthèse des résultats

Cette expérience a consisté à observer l'évolution au cours du temps des différentes bandes de fluorescence caractéristiques de la MOD lors de la dégradation de deux espèces phytoplanctoniques et en fonction de la température.

Les résultats observés ont montré une forte variabilité des propriétés de fluorescence du matériel dissous en fonction du temps. Les cinétiques d'apparition et de disparition des fluorophores semblent dépendre de la température. Nous avons émis ici l'hypothèse d'une réaction du phytoplancton relative au stress causé par une faible température à 5°C.

Les différents fluorophores formés sont quasiment identiques entre les deux espèces phytoplanctoniques considérées tandis que les produits d'exsudation issus des deux cultures originelles sont différents (fig. 5-2). Il en est de même pour l'indice d'humification HIX qui présente exactement la même évolution dans le cas des deux espèces. Ceci implique que les produits de dégradation formés par les communautés bactériennes du BV de la Gironde sont semblables quelle que soit l'espèce et se distinguent des produits d'exsudation qui sont probablement trop faiblement concentrés pour être clairement différenciés au milieu du mélange des composés fluorescents issus du bouchon vaseux et de la dégradation résultant de l'activité bactérienne.

Par ailleurs, les valeurs de l'indice HIX sont très faibles (< 4 à partir du troisième jour) par rapport à celles que nous avons observées dans les estuaires de la Seine et de la Gironde (figure 3-55 et 3-56, chapitre 3) et correspondent à des valeurs trouvées pour des échantillons de forte salinité ou même d'origine purement marine dans lesquels la MOD est très majoritairement d'origine phytoplanctonique ou bactérienne. Ceci montre bien que cet indice semble tout à fait valable pour donner une indication de la source de la MOD fluorescente.

Il est particulièrement regrettable que nous n'ayons pas pu disposer d'un échantillon témoin de bouchon vaseux dans les mêmes conditions de température sans ajout de culture phytoplanctonique. Ceci aurait permis de rendre réellement compte de l'évolution parallèle des composés dissous fluorescents présents dans le bouchon vaseux ainsi que de l'activité propre des communautés bactériennes du bouchon vaseux de la Gironde. En effet, même si nous avons observé des différences très nettes dans l'évolution des fluorophores présents dans ces échantillons, il est difficile d'attribuer de façon certaine ces différences à une réelle contribution algale plutôt qu'à une contribution bactérienne du bouchon vaseux qui peut être relativement importante (Tanoue et al., 1995). De même l'évolution du COP au sein du bouchon vaseux seul comparée à l'évolution du COP dans les deux incubations aurait

également permis de mettre en évidence les échanges entre les phases particulaire et dissoute dans le bouchon vaseux et les transferts de matériel phytoplanctonique particulaire vers le milieu dissous résultant de la dégradation des algues.

Il en est de même pour les deux bandes atypiques que nous avons mises en évidence aux couples de longueurs d'onde d'excitation/émission 260/530nm et 370/525nm et qui sont communes aux deux expériences. Il est alors difficile de leur attribuer sans équivoque une origine phytoplanctonique et il est alors possible d'imaginer qu'elles proviennent peut être de l'activité bactérienne au sein du BV plutôt que de la dégradation à proprement parler des deux espèces phytoplanctoniques.

De plus, le manque de données concernant les valeurs de COD ne permet pas de conclure plus précisément quant aux transferts effectifs entre le pool particulaire et la fraction dissoute ainsi que pour connaître la part de dégradation et de minéralisation du carbone organique au sein des incubateurs.

2- EFFET DES MATIERES EN SUSPENSION (MES)

2-1- Expérience

Nous allons décrire dans cette partie l'influence des matières en suspension (MES) du bouchon vaseux (BV) sur la production de matière organique dissoute fluorescente lors de la dégradation de matériel phytoplanctonique.

En effet, comme nous l'avons déjà dit précédemment, le bouchon vaseux (BV) est considéré comme une zone de dégradation intense où une grande partie du carbone organique drainé par le fleuve est minéralisé sous l'action d'une importante communauté bactérienne associée aux particules du BV. Après avoir étudié l'effet de la température et de l'espèce phytoplanctonique dégradée sur les transformations de la MOD dans le BV dans la partie précédente, nous allons désormais déterminer l'influence de la teneur en matières en suspension du BV sur les modifications de la MOD lors de la dégradation du phytoplancton.

Cette expérience a à nouveau été réalisée en collaboration avec H. Etcheber, G. Abril et E. Lemaire du DGO (Université Bordeaux 1) dans le cadre du programme Seine Aval 2. Elle a consisté à inoculer une culture d'algues dans des réacteurs contenant du bouchon vaseux de l'estuaire de la Seine à des teneurs en MES différentes (figure 5-15).

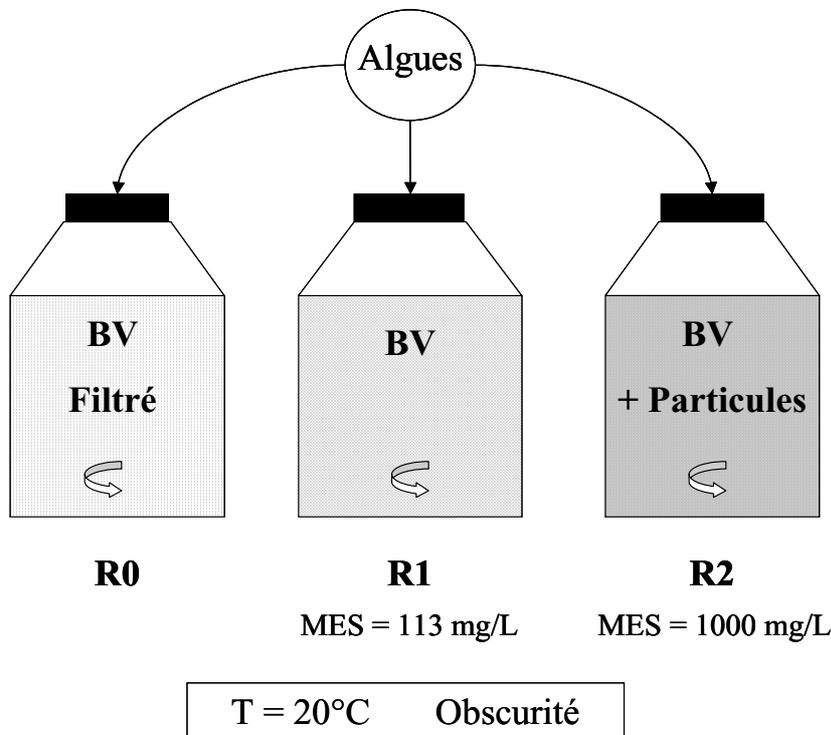


Figure 5-15. Schéma des systèmes d'incubation *in vitro* pour l'étude de l'effet des MES.

L'incubation a été réalisée selon le protocole suivant : un prélèvement de bouchon vaseux de l'estuaire de la Seine a été prélevé lors de la mission NUTS 2 de septembre 2002 avec une teneur en MES de 113 mg/L.

Une souche algale de chlorophycées (*Scenedesmus suspicatus*) a été utilisée dans le cadre de cette expérience. Les caractéristiques de cette culture de chlorophycées sont identiques à celles décrites dans le paragraphe précédent traitant de l'influence de la température. Cette culture a été introduite dans 3 réacteurs (R0, R1 et R2). La teneur en chlorophylle A après introduction de la culture d'algue dans les réacteurs était de 60µg/L. Cette concentration est représentative des apports fluviaux de phytoplancton dans le bouchon vaseux de la Seine pendant les périodes printanières et estivales propices aux développements de blooms phytoplanctoniques (Données brutes du programme Seine Aval 2 et Lemaire, 2002).

R0 était constitué de 4L de l'échantillon de bouchon vaseux de la Seine filtré sur des filtres Whatman GF/F. Le réacteur R1 contenait 4L de l'échantillon de bouchon vaseux de la Seine brut c'est à dire sans filtration. R2 était constitué de 4L de bouchon vaseux brut auxquels ont été ajoutées des particules de bouchon vaseux récupérées lors du même prélèvement par décantation d'un large volume d'eau. Ces particules ont été ajoutées de façon à ce que la teneur en MES dans le réacteur R2 soit de 1000mg/L. Une agitation continue a été maintenue dans les réacteurs qui ont été incubés pendant 28 jours à l'obscurité dans une enceinte thermostatée à 20°C.

R0 rend compte de la dégradation sans particules.

R1 représente la dégradation effective dans le bouchon vaseux (MES=113mg/L).

R2 représente la dégradation dans une forte concentration en particules (MES=1000 mg/L).

Un échantillonnage a été réalisé à divers temps tout au long de la durée de l'incubation (0, 1.7, 2.7, 5, 7, 10, 14, 21 et 28 jours). Chaque échantillon prélevé a été filtré par E. Lemaire sur filtre GF/F (Whatman) 0,7 µm pour effectuer les divers dosages particuliers (pigments, COP) et nous avons utilisé le filtrat afin d'étudier par fluorescence 3D l'évolution de la matière organique dissoute lors de ces incubations. Les teneurs en COD ont été déterminées par H. Etcheber et E. Lemaire.

Les spectres de fluorescence 3D du bouchon vaseux et de la culture d'algues filtrés (0,7µm) sont présentés sur la figure 5-16.

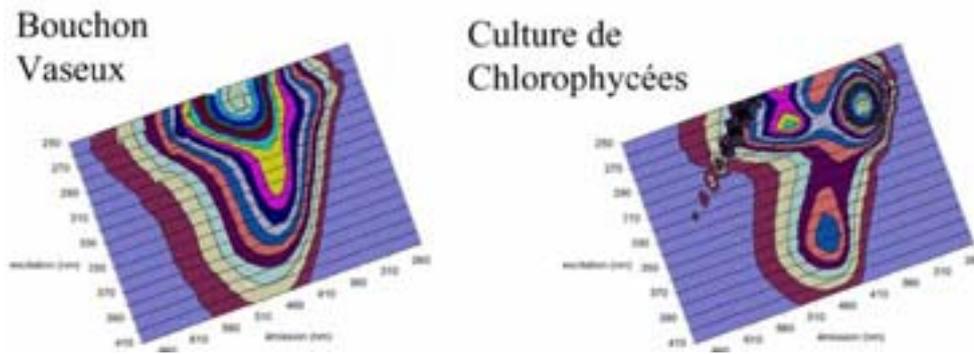


Figure 5-16. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D du bouchon vaseux et de la culture des chlorophycées filtrée.

2-2- Résultats

Les spectres de fluorescence 3D ont été enregistrés selon le protocole classique décrit au chapitre 3. Les figures 5-17, 5-18 et 5-19 présentent le type d'évolution des spectres de fluorescence 3D au cours de l'incubation pour les trois réacteurs considérés.

Réacteur R0 – Bouchon Vaseux filtré + algues

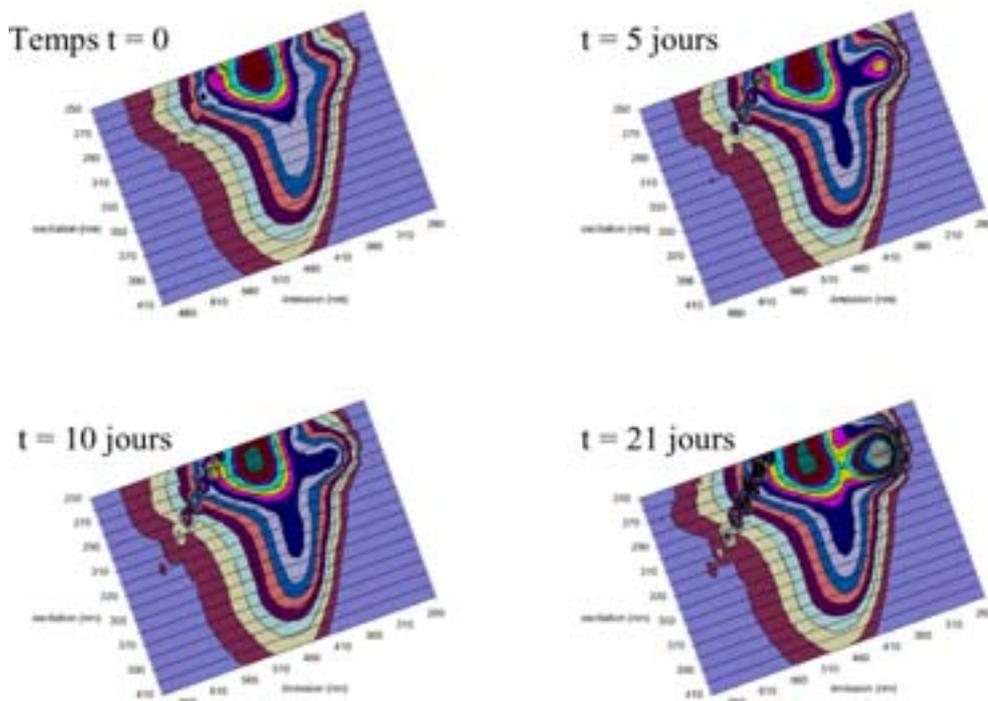


Figure 5-17. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des aliquotes prélevés aux temps $t = 0$, 5, 10 et 21 jours dans le réacteur R0 (BV filtré +algues).

Réacteur R1 – Bouchon Vaseux brut + algues

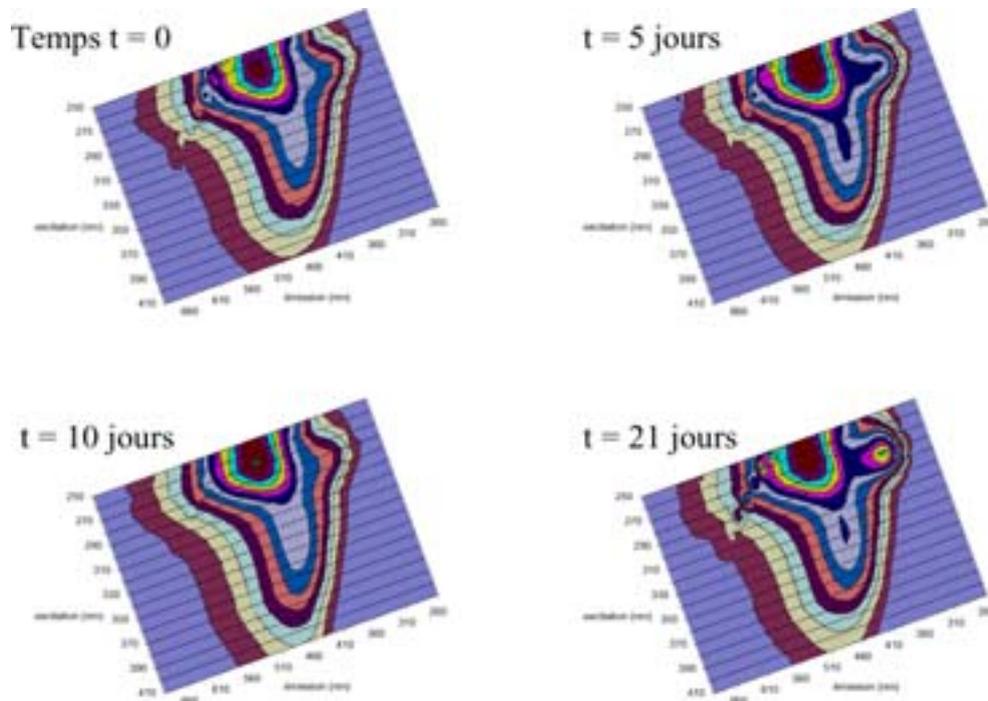


Figure 5-18. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des aliquotes prélevés aux temps t = 0, 5, 10 et 21 jours dans le réacteur R1 (BV brut + algues).

Réacteur R2 – Bouchon Vaseux + particules + algues

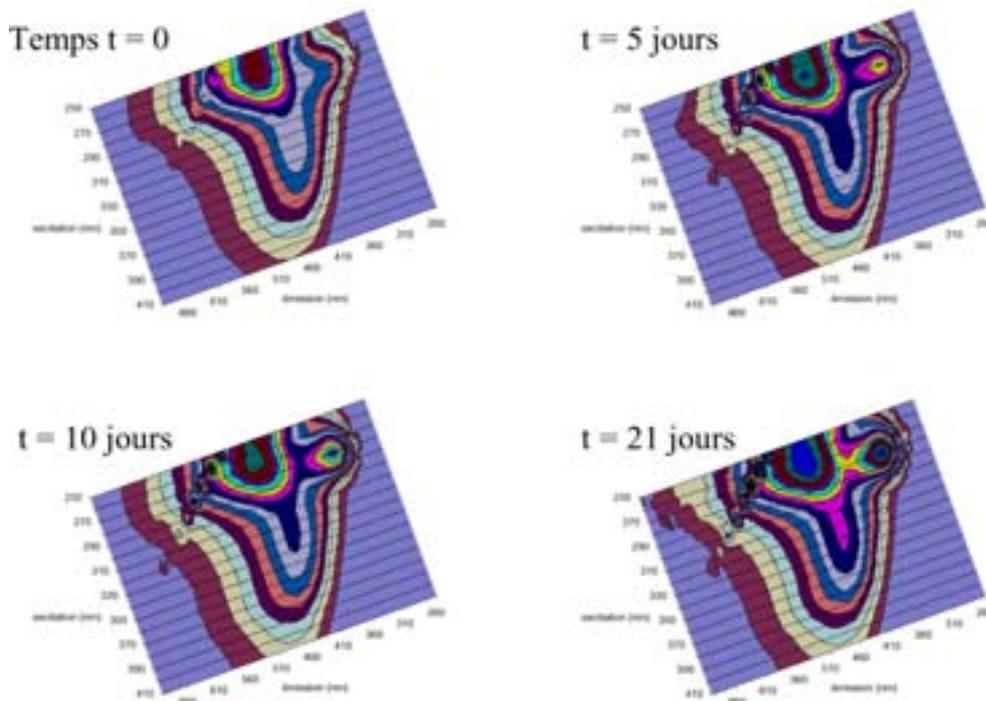


Figure 5-19. Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des aliquotes prélevés aux temps t = 0, 5, 10 et 21 jours dans le réacteur R2 (BV + particules + algues).

On remarque d'emblée moins de modification des spectres 3D au cours du temps que lors de l'expérience précédente concernant l'effet de la température. En effet, seules des modifications concernant la bande γ sont clairement observables et les spectres présentent pour le reste un aspect similaire à celui de l'échantillon de bouchon vaseux initial.

L'intensité de fluorescence de la bande α ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/460nm) ne variant quasiment pas en fonction du temps pour les trois expériences considérées, nous représentons ici uniquement les rapports d'intensité de fluorescence qui rendent également compte de l'évolution et des variations des intensités de fluorescence des différentes bandes étudiées.

La figure 5-20 présente les variations des rapports d'intensité de fluorescence et des teneurs en COD au cours du temps pour le réacteur R0, c'est à dire celui contenant le bouchon vaseux de la Seine filtré.

Réacteur R0 – Bouchon Vaseux filtré + algues

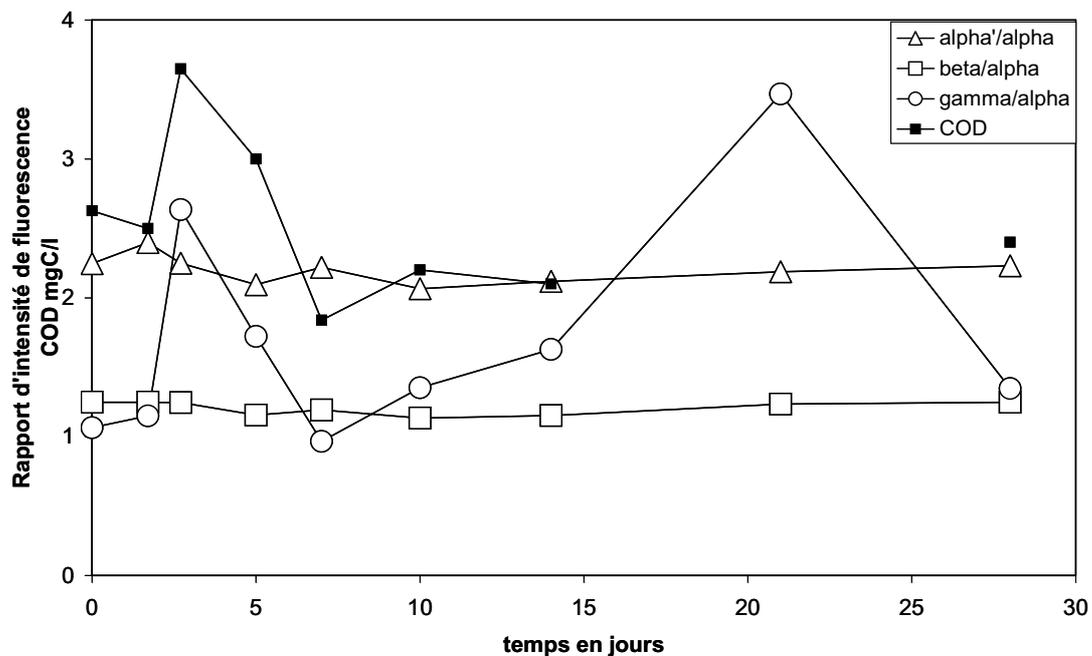


Figure 5-20. Variation des rapports d'intensités $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , I_{γ}/I_{α} et du COD en fonction du temps d'incubation dans le réacteur R0 (BV filtré + algues).

On peut remarquer que les bandes α' et β ne varient quasiment pas. Par contre la bande γ varie très fortement comme le laissait entrevoir les spectres 3D de la figure 5-17.

On peut ainsi noter deux périodes distinctes de production de composés de type γ . La première durant les 5 premiers jours puis ensuite au cours de la troisième semaine d'incubation. La première augmentation de l'intensité de γ est parfaitement corrélée avec l'augmentation de la teneur en COD tandis qu'il n'est pas possible de conclure pour la deuxième augmentation d'intensité de cette bande puisque la valeur de COD est manquante.

En ce qui concerne le réacteur R1 contenant le bouchon vaseux brut et les algues, les variations des rapports d'intensités de fluorescence et du COD sont consignées sur la figure 5-21. Il semble y avoir à nouveau deux périodes de production de la bande γ mais cette fois-ci la première est beaucoup moins nette et elle n'est pas associée à une augmentation particulière du COD. La deuxième augmentation de la bande γ est beaucoup plus évidente et se produit au cours de la deuxième semaine d'incubation c'est à dire plus rapidement que dans le cas du réacteur R0. Cette fois, l'apparition de la bande γ est accompagnée d'une augmentation de la teneur en COD qui indique donc que ce matériel protéique fluorescent provient à ce moment-là de la dégradation du matériel algal particulaire.

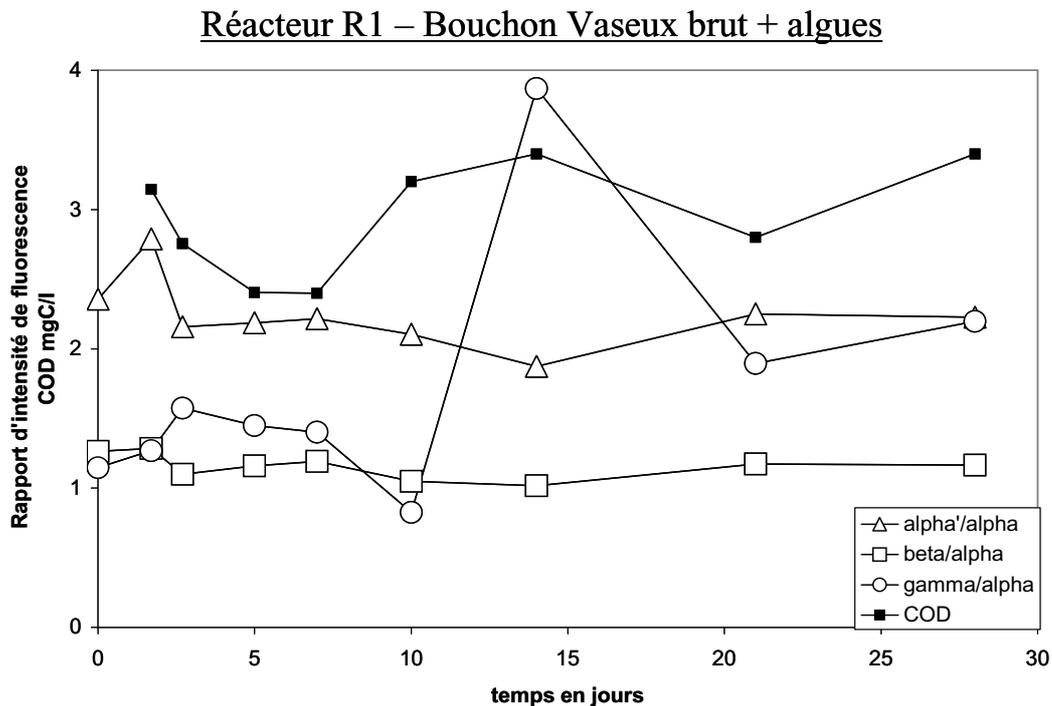


Figure 5-21. Variation des rapports d'intensités $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , I_{γ}/I_{α} et du COD en fonction du temps d'incubation dans le réacteur R1 (BV brut + algues).

Il semble donc que la première période d'apparition de la composante γ durant les cinq premiers jours dans les deux réacteurs ne soit pas directement liée à la dégradation à proprement parler des cellules phytoplanctoniques mais provienne d'un autre type de matériel consécutivement à l'ajout de la culture d'algues dans les réacteurs. Il pourrait s'agir de composés d'origine bactérienne ou provenant de l'activité du phytoplancton. Lors d'expériences de dégradation similaires, Lemaire et al. (2002) ont observé une augmentation des teneurs en pigments durant les premiers jours d'incubation. Ils ont attribué ce phénomène à une adaptation pigmentaire de l'algues aux récentes conditions d'obscurité. Il est alors possible que cette photoadaptation entraîne la libération de composés de type γ . Par contre, il n'est pas possible d'expliquer pourquoi cette apparition de composé γ en début d'incubation

est plus importante dans le cas du bouchon vaseux filtré et pourquoi elle est dans ce cas clairement liée à une augmentation de la teneur COD contrairement au bouchon vaseux non-filtré.

Le réacteur R2 contient du bouchon vaseux auquel des particules de bouchon vaseux ont été ajoutées. La figure 5-22 présente les variations de la teneur en COD et des rapports d'intensités de fluorescence au cours du temps. On peut noter une très forte augmentation de la bande γ durant la première semaine comme dans le cas des deux autres réacteurs, pourtant cette forte augmentation n'est pas associée à une augmentation particulièrement intense du COD. Ensuite, il se produit au cours de la troisième semaine une nouvelle augmentation mais moindre de cette bande γ qui correspond cette fois-ci à une augmentation de la teneur en COD comme dans le cas du bouchon vaseux brut.

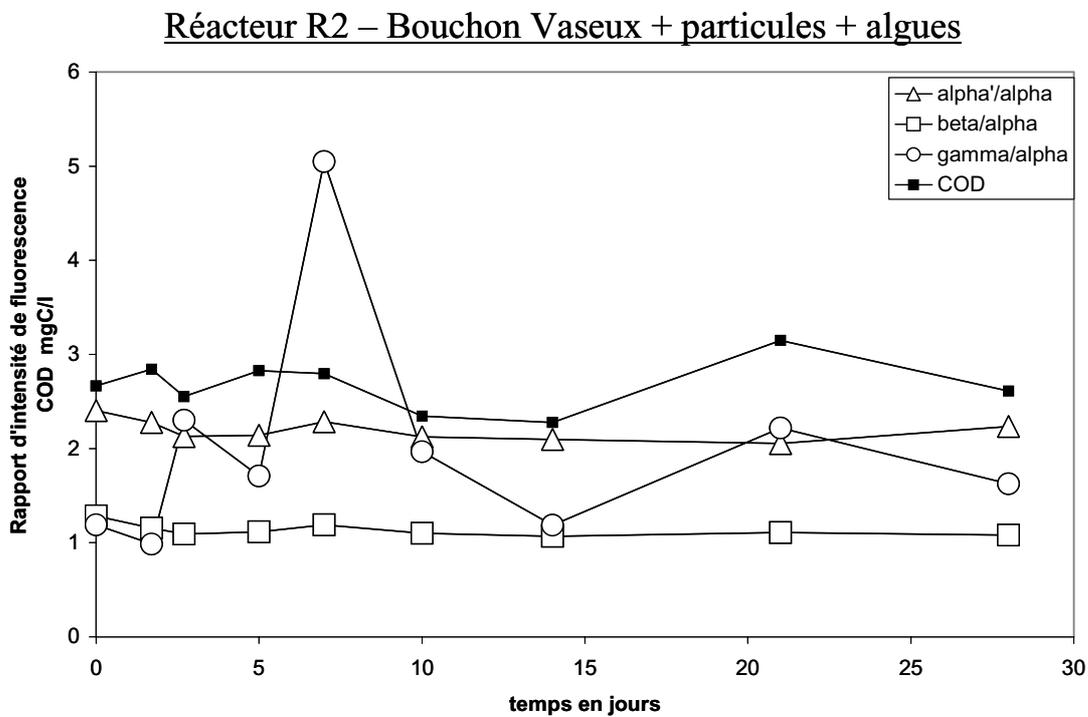


Figure 5-22. Variation des rapports d'intensités $I_{\alpha'}/I_{\alpha}$, I_{β}/I_{α} , I_{γ}/I_{α} et du COD en fonction du temps d'incubation dans le réacteur R2 (BV + particules + algues).

Il apparaît donc au travers de ces divers résultats que seule la bande γ attribuée aux substances de type protéique ou liées à l'activité bactérienne semble varier de façon significative au cours de ces trois incubations. Nous avons porté sur la figure 5-23 le rapport d'intensités I_{γ}/I_{α} dans chacun des réacteurs afin de mieux apprécier le rôle des matières en suspension.

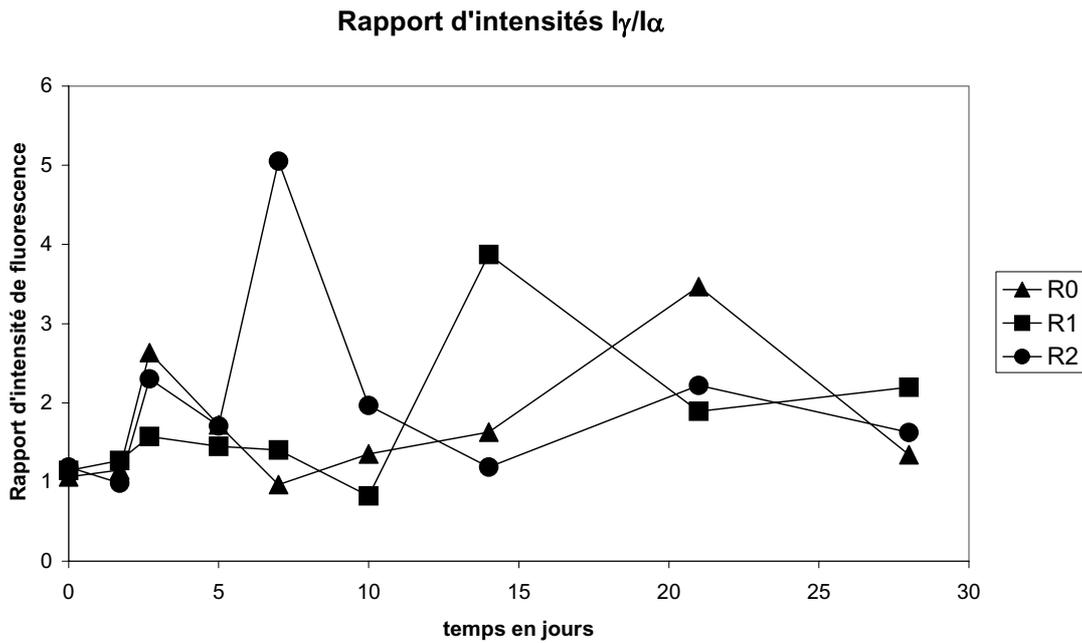


Figure 5-23. Rapport d'intensités de fluorescence I_{γ}/I_{α} en fonction de la durée d'incubation dans les trois réacteurs.

Il semble clair au travers de cette figure que la présence de particules accélère la production de composés de type protéique et favorise donc la dégradation du matériel organique phytoplanctonique. Il est cependant difficile de dire si la forte augmentation de la bande γ au septième jour est due à la dégradation du matériel phytoplanctonique, à une réaction des communautés bactériennes ou encore à une dégradation intense de composés provenant de la culture d'algues. En effet, il semble tout d'abord que dans chacun des réacteurs il se produise une libération de substances protéiques durant les premiers jours d'incubation. Il est par contre surprenant que cette production de composés de type γ ne s'accompagne pas systématiquement d'une augmentation de la teneur en COD.

Il nous semble donc probable que cette prolifération de composés protéiques durant les premiers jours de l'incubation provient de la dégradation de composés issus de la culture d'algues tandis que la dégradation à proprement parler des cellules phytoplanctoniques se produit réellement qu'en fin de deuxième (R1) et fin de troisième (R0 et R2) semaine d'incubation. En effet comme nous l'avons déjà spécifié lors de l'expérience précédente concernant l'effet de la température, la culture de chlorophycées montre au travers de son spectre de fluorescence 3D (Fig. 5-16) que de nombreux composés organiques dissous sont présents. Il est alors fort probable que ces composés issus de l'exsudation sont alors préférentiellement dégradés par les bactéries en début d'incubation.

De plus, il est également possible que le mélange des consortiums bactériens de chaque milieu (culture et BV) conduise à des modifications de l'activité bactérienne et la production de composés organiques dissous au sein des réacteurs.

Il est également surprenant de remarquer que les bandes α , α' et β n'ont quasiment pas varié au cours de cette expérience. Afin de mieux observer l'évolution réelle des fluorophores tout au long de l'incubation nous avons effectué la soustraction des matrices de fluorescence 3D entre divers temps t et le temps $t=0$ de l'incubation. Comme nous l'avons déjà précisé dans la première expérience concernant l'effet de la température, ceci devrait permettre de rendre compte plus clairement du matériel fluorescent réellement apparu et de ses modifications par rapport au début de l'incubation.

Les figures 5-24, 5-25 et 5-26 présentent les résultats de ces soustractions de matrices à divers temps pour les réacteurs R0, R1 et R2 respectivement.

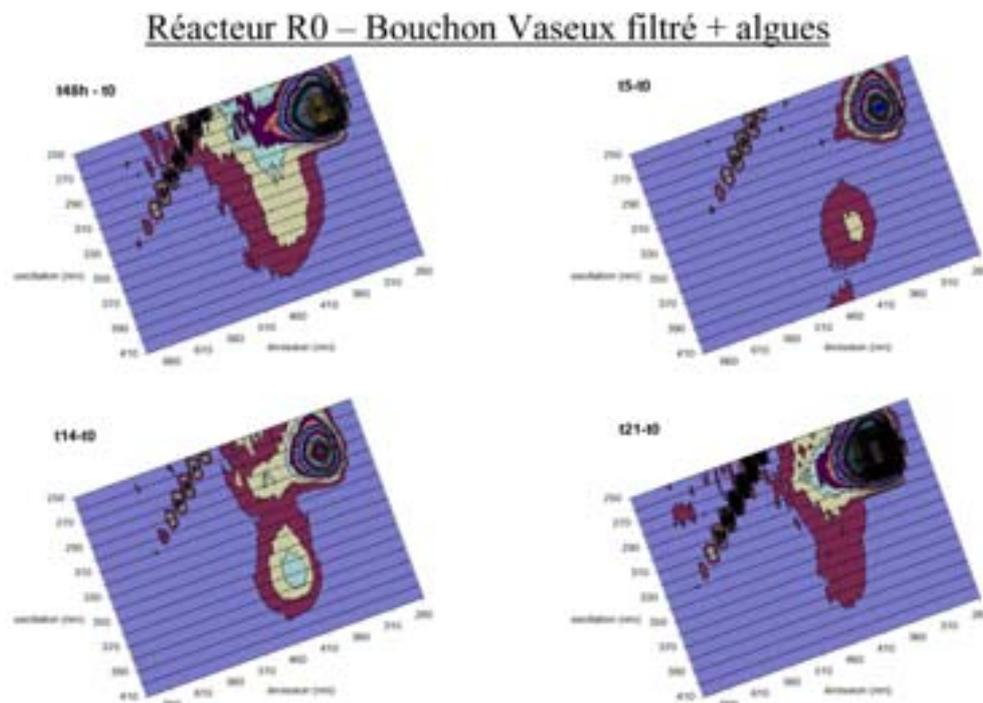


Figure 5-24. Projections dans le plan issues de la soustraction des matrices de fluorescence aux temps $t = 2, 5, 14$ et 21 jours dans le réacteur R0 (BV filtré + algues).

Réacteur R1 – Bouchon Vaseux brut + algues

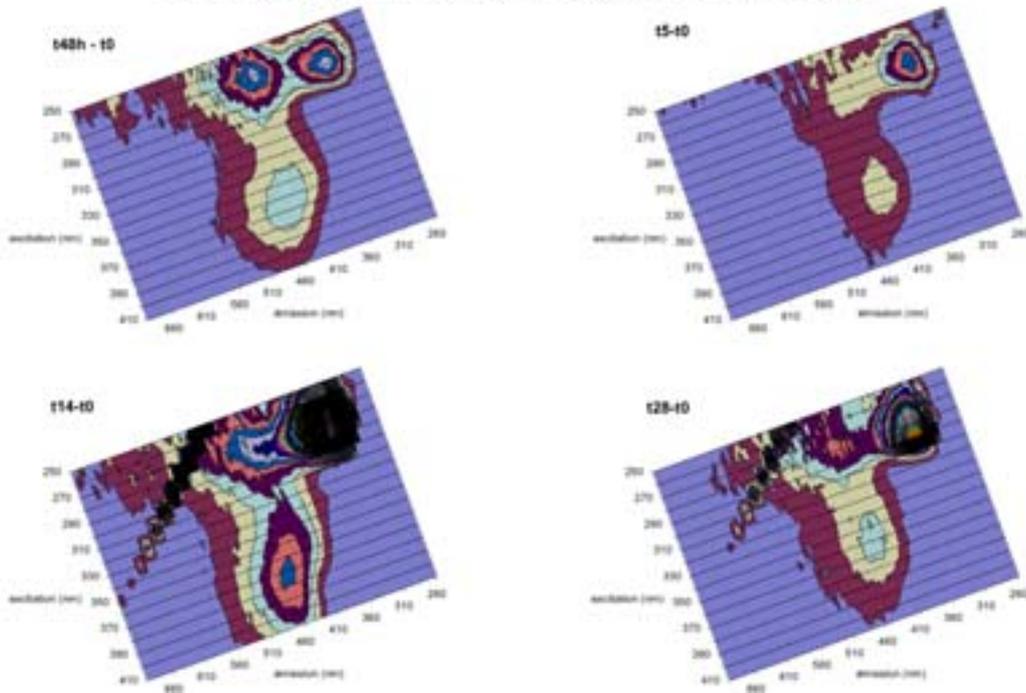


Figure 5-25. Projections dans le plan issues de la soustraction des matrices de fluorescence aux temps $t = 2, 5, 14$ et 21 jours dans le réacteur R1 (BV brut + algues).

Réacteur R2 – Bouchon Vaseux + particules + algues

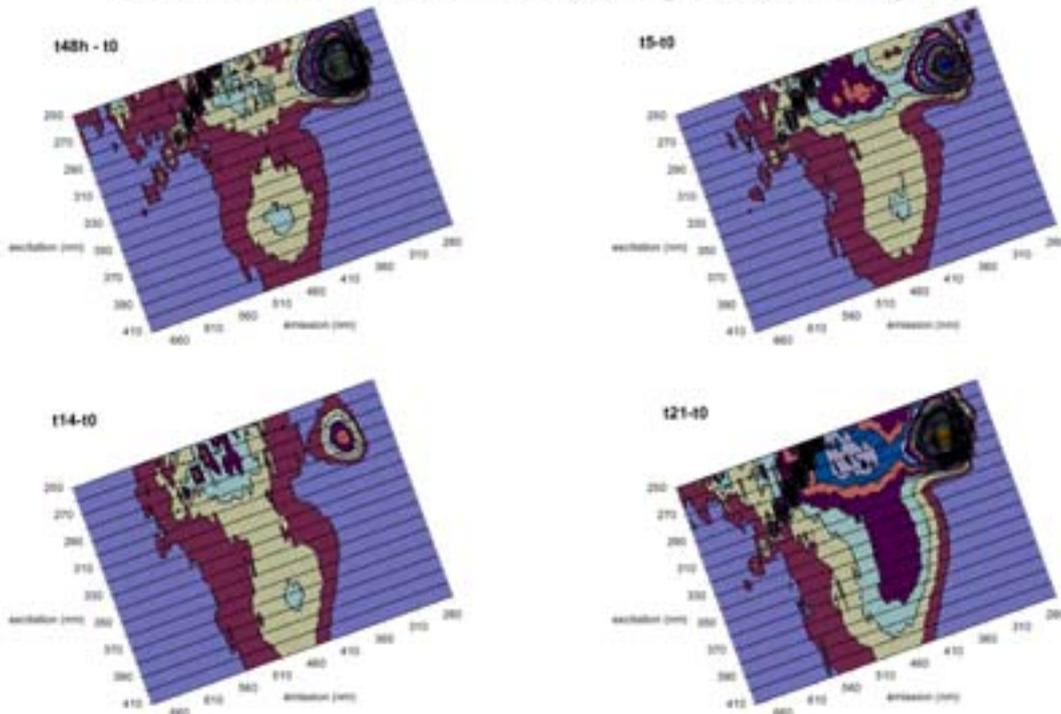


Figure 5-26. Projections dans le plan issues de la soustraction des matrices de fluorescence aux temps $t = 2, 5, 14$ et 21 jours dans le réacteur R2 (BV + particules + algues).

Sur la figure 5-24 la soustraction de la matrice à $t = 0$ du spectre à $t = 48$ heures montre clairement qu'il y a eu forte production de composés de type γ durant les deux premiers jours de l'incubation. De même, on peut également remarquer la présence d'un massif de type α relativement bien marqué. Au bout du cinquième jour et surtout du quatorzième jour on note la présence des bandes γ et α bien marquées et en plus au quatorzième jour la présence d'un autre type de fluorophores au couple de longueurs d'onde d'excitation/émission 290/430nm. Ces trois bandes de fluorescence rappellent bien le signal de fluorescence donné par la de culture de chorophycées (Fig. 5-16).

Il semble donc bien que lors des premiers jours de l'incubation, les composés de type γ formés proviennent bien de la dégradation de composés organiques issus de la culture d'algues ou de l'activité bactérienne. Ensuite, il semble que durant les deux semaines suivantes, les cellules phytoplanctoniques poursuivent leur cycle de vie donnant donc lieu à des produits d'exsudation fluorescents identiques à ceux observés dans la culture originelle (Fig. 5-16). En effet, bien que l'expérience soit conduite dans le noir, il est possible que l'exsudation se poursuive à l'abri de la lumière (Sieburth, 1969). Finalement, il semble que la dégradation des cellules phytoplanctoniques ne se produit qu'au cours de la troisième semaine avec la production d'une bande γ beaucoup plus intense comme le montre le spectre issu de la soustraction des matrices $t_{21}-t_0$ (Fig. 5-24).

En ce qui concerne le réacteur R1 contenant le bouchon vaseux non filtré (fig. 5-25), la signature de fluorescence des chlorophycées est déjà présente lors du deuxième jour comme le montre le spectre résultant de la soustraction $t_{48}-t_0$. La dégradation de l'algue semble alors plus rapide que dans le cas de R0 car les fluorophores caractéristiques des chlorophycées semblent petit à petit disparaître au profit d'une fluorescence humique plus classique au bout du 14^{ème} jour. En effet, la soustraction $t_{14}-t_0$ montre la présence d'une bande γ très intense traduisant une forte dégradation ainsi qu'une distorsion du spectre au niveau du massif de fluorescence α ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 370/460nm) qui est probablement due au recouvrement entre les fluorophores humiques de type α issus de la dégradation de l'algue et les fluorophores caractéristiques de l'algue qui émettent à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission légèrement supérieures. D'ailleurs, cette distorsion disparaît au 28^{ème} jour au profit d'une bande de fluorescence α plus classique.

Si l'on s'intéresse maintenant au réacteur R2 contenant en plus du bouchon vaseux des particules de crème de vase (Fig. 5-26), la signature des fluorophores de l'algue est présente également après 48 heures mais de façon moins nette et ce signal se déforme progressivement jusqu'au 21^{ème} jour où l'on voit apparaître le massif humique α . Parallèlement, la bande

protéique γ qui est très intense dès le deuxième jour, diminue d'intensité par la suite avant de connaître une forte augmentation au 21^{ème} jour traduisant ainsi une nouvelle étape de dégradation ou d'activité bactérienne. Concernant ce réacteur, il est difficile de juger réellement de l'effet de l'apport de particules car les particules ajoutés ont été au préalable extraites par sédimentation avant d'être introduites dans le réacteur R2. Il est impossible de dire si ce traitement n'a pas eu d'influence sur les propriétés originelles et les communautés bactériennes associées à ces particules. En effet, les spectres issus des soustractions semblent suggérer que la présence importante de composés γ au septième jour de l'incubation (Fig. 5-22) soit plutôt due au mélange des activités bactériennes alors que la dégradation de l'algue ne semble se produire que durant la troisième semaine comme dans le cas de R0. Ainsi, cet apport de particules en très forte concentration semblerait quelque peu inhiber la dégradation du phytoplancton par rapport au bouchon vaseux brut (R1).

Ceci est également visible sur la figure 5-27 qui montre l'évolution de l'indice d'humification HIX. On remarque que dans le cas de R1 et dans une moindre mesure de R0, une augmentation de l'indice se produit au bout du dixième jour tandis que pour R2 ce pic n'apparaît qu'au quatorzième jour. Ces pics sont suivis ensuite d'une ré-augmentation progressive de l'indice jusqu'à la fin de l'incubation traduisant l'humification progressive de la MOD.

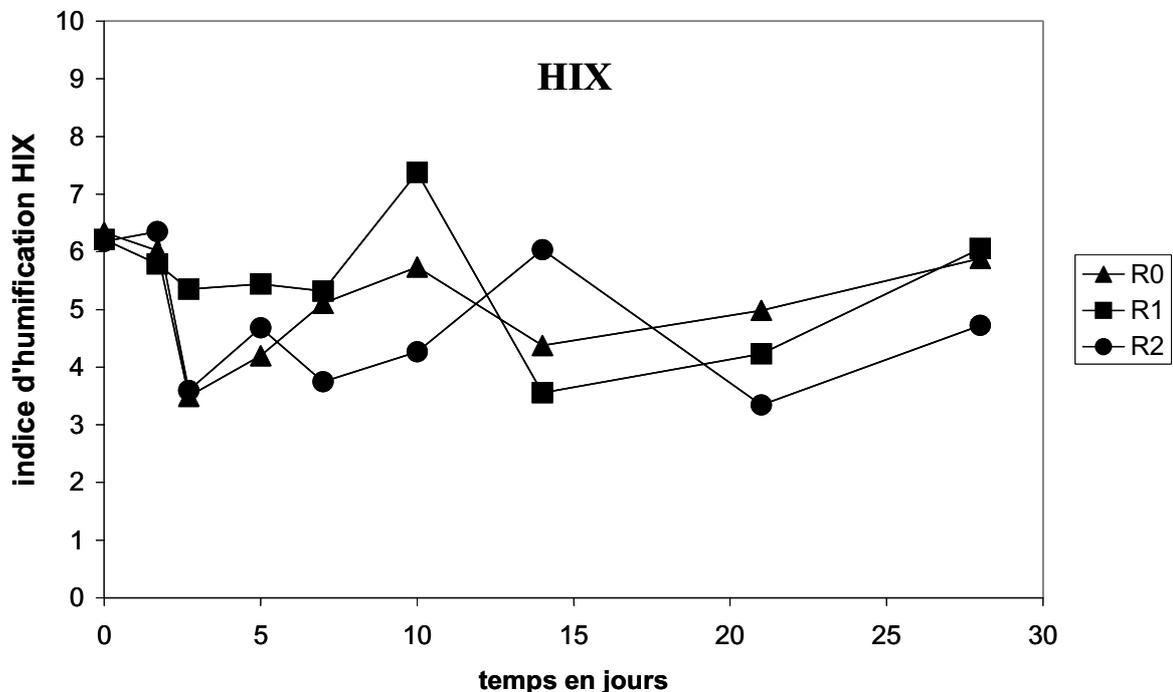


Figure 5-27. Variation de l'indice d'humification HIX en fonction du temps d'incubation dans les réacteurs R0 (BV filtré + algues), R1 (BV non filtré + algues) et R3 (BV non filtré + particules + algues).

Il est tout à fait intéressant de noter que la soustraction des spectres de fluorescence a permis d'apprécier l'évolution des différentes bandes de fluorescence au cours de l'incubation de façon plus précise que ne l'a permis le suivi des intensités. En effet, il semblerait que ces soustractions nous aient permis de mettre plus nettement en évidence la présence des résidus d'exsudation du phytoplancton. De plus, les différences entre les réacteurs R0 et R1 apparaissent de façon plus claire sur les figures 5-24 et 5-25 et semblent indiquer l'accélération de la dégradation des cellules phytoplanctoniques en présence des particules du bouchon vaseux qui traduit l'influence des bactéries liées aux particules.

Malheureusement, les données relatives à la teneur en carbone organique particulaire (COP) ne permettent pas de conclure quant aux transferts de la phase particulaire vers le milieu dissous qui pourraient indiquer la dégradation des cellules phytoplanctoniques. Les variations du COP sont consignées sur la figure 5-28 et il n'est en effet pas possible d'interpréter de façon précise ces résultats et notamment l'augmentation du COP durant les premières 24 heures. Le prélèvement d'aliquotes à chaque temps ne permet pas d'obtenir précisément le matériel particulaire de façon homogène par rapport à l'état du milieu dans chaque réacteur et entraîne donc des incertitudes trop importantes sur la détermination des teneurs en MES et donc en COP pour pouvoir interpréter clairement ces résultats.

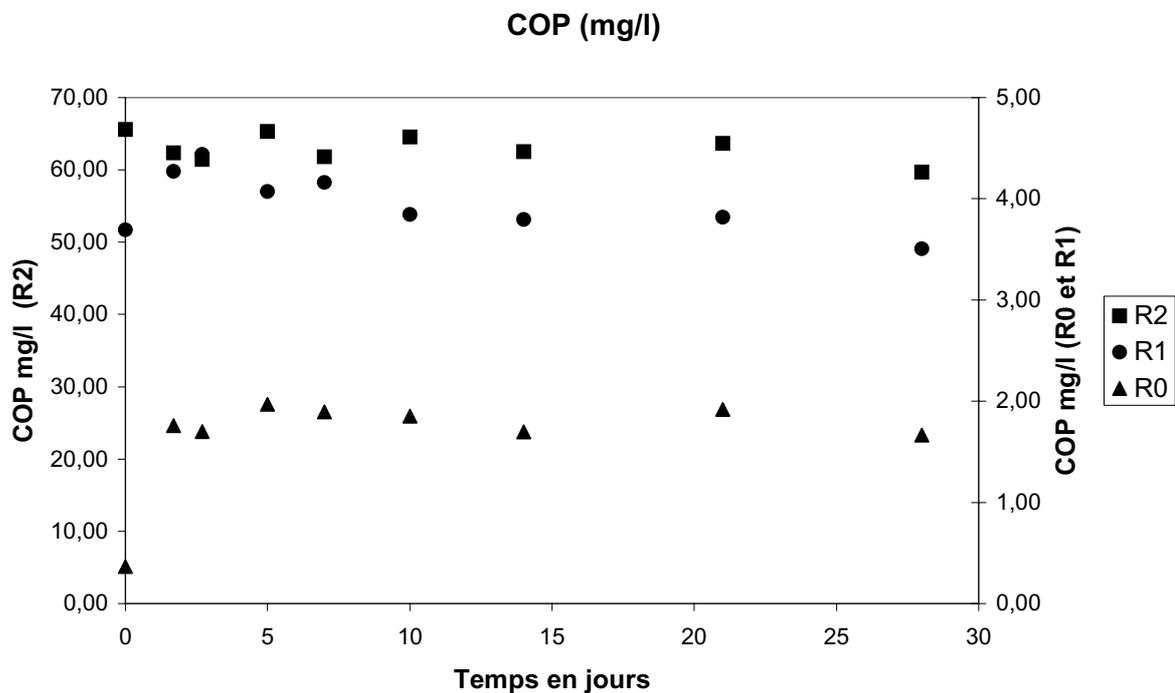


Figure 5-25. Variation de la teneur en carbone organique particulaire (COP) en fonction de la durée d'incubation dans les réacteurs R0 (BV filtré + algues), R1 (BV non filtré + algues) et R3 (BV non filtré + particules + algues).

Il aurait d'autre part été intéressant de disposer d'un échantillon témoin de chaque réacteur sans ajout de culture phytoplanctonique. Ceci aurait permis de rendre réellement compte de l'évolution parallèle des composés dissous fluorescents présents dans les réacteurs ainsi que de l'activité propre des communautés bactériennes

3- SYNTHÈSE DES RESULTATS

Les deux expériences décrites dans ce chapitre ont consisté à observer l'évolution au cours du temps des signaux de fluorescence du matériel organique dissous lors de la dégradation de cellules phytoplanctoniques. Les résultats obtenus ont montré une très grande variabilité de l'évolution de chacune des bandes de fluorescence en fonction des différents facteurs (température, turbidité). Ainsi divers cinétiques d'évolution des caractéristiques de fluorescence ont été mises en évidence en fonction de la température ainsi que l'effet accélérateur des particules sur la dégradation du phytoplancton sous l'impulsion des bactéries liées aux particules. Les résultats de Lemaire et al. (2002) ont également montré que l'augmentation de la quantité de MES accélère la dégradation des pigments phytoplanctoniques sous l'effet des communautés bactériennes associées aux particules.

Un point très important est à noter suite aux résultats de l'expérience sur l'effet des MES et par comparaison avec l'expérience relative à l'effet de la température.

Dans la première partie de ce chapitre nous avons étudié la dégradation de cellules phytoplanctoniques de type chlorophycées dans le bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde. Dans la deuxième partie nous avons étudié la dégradation de cette même souche algale dans le bouchon vaseux de l'estuaire de la Seine.

Or, les spectres de fluorescence obtenus tout au long des incubations lors de ces deux expériences présentent des caractéristiques bien distinctes. En effet, les spectres obtenus dans la deuxième partie suite à la soustraction des matrices de fluorescence montrent clairement la signature de fluorescence des chlorophycées au travers des fluorophores caractéristiques observés sur le spectre de la culture de chlorophycées (Fig. 5-16). Au contraire, dans la première partie de ce chapitre, cette signature caractéristique des algues vertes n'est pas apparue au cours de la dégradation sur les spectres issus des soustractions tandis que de profondes modifications de la structure des spectres étaient nettement visibles avec notamment l'observation de deux bandes atypiques également visibles dans l'incubation concernant les diatomées.

Alors que nous n'avions pas conclu dans un premier temps quant à l'origine phytoplanctonique ou bactérienne de ces deux bandes, il apparaît maintenant tout à fait clair que les particularités des spectres de fluorescence observées lors des incubations de chlorophycées et de diatomées dans la première partie de ce chapitre ont pour origine principale l'activité bactérienne du bouchon vaseux de la Gironde.

En effet, les incubations de diatomées et de chlorophycées aux différentes températures dans le bouchon vaseux de la Gironde ont eu des résultats relativement identiques sans que les caractéristiques de fluorescence propres et pourtant distinctes de chaque espèce n'apparaissent. Ces caractéristiques étaient donc sous jacentes mais pas assez intenses pour apparaître clairement au milieu de la fluorescence très intense produite par l'activité bactérienne. Le bouchon vaseux de la Gironde était en effet très turbide (444mg/l) en comparaison de celui de la Seine utilisé dans cette partie (environ 110mg/l). La plus faible activité bactérienne de ce dernier a semblé limiter la dégradation et permis d'observer plus nettement la véritable contribution de fluorescence de l'exsudation des chlorophycées.

Ainsi, ces expériences ont permis de mettre en évidence toute l'importance du rôle des communautés bactériennes dans la formation ou la dégradation de MOD fluorescente au sein des bouchons vaseux des estuaires considérés. En effet, la production des composés organiques fluorescents semble plus liée à la nature et à l'activité des bactéries qu'à l'espèce phytoplanctonique considérée. Ceci s'est traduit par l'observation de deux bandes de fluorescence atypiques caractéristiques de l'intense activité des communautés bactériennes du bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde.

Cependant de nombreuses questions restent en suspens notamment concernant une analyse plus précise des transferts du milieu particulaire vers la phase dissoute en raison du manque de précision de la détermination des teneurs en COD et COP.

On ne peut également que regretter l'absence de réplicats ou bien de réacteurs témoins (sans inoculation de phytoplancton) qui aurait parallèlement pu rendre compte de l'évolution de la fluorescence intrinsèque des différents milieux étudiés mais compte tenu déjà de l'ampleur des moyens mis en œuvre pour réaliser ces expériences, ceci aurait impliqué des complications logistiques difficilement surmontables. Il faudra néanmoins impérativement à l'avenir réitérer ces modélisations du fonctionnement du bouchon vaseux avec des témoins pour pouvoir conclure définitivement quant aux produits de dégradation des algues et à la production de MOD due à l'activité bactérienne.

Ainsi, en dépit de toutes les incertitudes qui pèsent sur les conclusions finales de ces expériences d'incubations il convient tout de même de noter tout le potentiel que possède la spectrofluorimétrie pour l'observation des modifications des caractéristiques de la matière organique dissoute. En effet, son extrême sensibilité a permis de mettre en évidence de façon claire des modifications spectrales au cours du temps en termes de qualité et de quantité de composés fluorescents dissous lors de ces incubations.

Le suivi des intensités et des rapports d'intensités de fluorescence a permis d'apprécier l'évolution quantitative des différents fluorophores caractéristiques de la MOD au cours des deux expériences. Les spectres de fluorescence 3D ont permis de rendre compte de l'évolution plutôt qualitative de ces fluorophores en terme de présence ou non de maxima, de déformation des bandes.

Les spectres 3D des prélèvements aux différents temps de l'incubation ont permis de déceler des modifications de la structure des spectres qui impliquent la présence d'autres types de fluorophores mais en concentration trop faible pour ressortir clairement du signal de fluorescence de l'échantillon de bouchon vaseux initial. Ces modifications ont pu être exacerbées par les soustractions des matrices de fluorescence au temps $t = 0$ qui permettent de rendre compte plus clairement du matériel fluorescent réellement produit et de ses modifications par rapport au début de l'incubation. Il reste évident qu'il aurait été préférable de soustraire les spectres des témoins aux mêmes temps d'incubation. Ceci a néanmoins permis de mettre en évidence la présence de deux nouvelles bandes de fluorescence (excitation/émission 260/530 et 370/525nm) que estimons liées à l'activité bactérienne dans le bouchon vaseux de la Gironde et qui caractérisent des types de fluorophores qui n'ont jusque là jamais été observés et décrits dans la littérature à notre connaissance.

CHAPITRE 6

PROPRIETES DE COMPLEXATION DE LA MOD

Le contrôle de la qualité des eaux de surface est devenu une préoccupation majeure en raison des concentrations importantes de toxiques introduits dans l'environnement résultant du développement industriel, de l'urbanisation et de l'utilisation de produits phytosanitaires dans l'agriculture. Les mesures de concentrations des différents composés xénobiotiques dans les divers compartiments aquatiques permettent de connaître le niveau de contamination d'un milieu. Cependant ces mesures ne permettent pas de rendre compte des interactions, des transformations et des transferts de ces contaminants entre les différents compartiments.

En effet, la toxicité et le devenir de ces composés dans l'environnement sont principalement liés à leur spéciation c'est à dire la forme chimique dans laquelle ils évoluent, soit en tant que composés libres, soit en étant associés à d'autres composés ou matrices qui vont influencer leurs propriétés. La spéciation d'un composé dépend d'une part de ses propriétés physico-chimiques mais aussi des conditions environnementales du milieu et des autres composés avec lesquels il va pouvoir ou non interagir.

De nombreux types de contaminants participent à la pollution des systèmes aquatiques.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants ubiquistes de l'environnement marin d'une part à cause de leur stabilité importante et d'autre part à cause de la multiplicité de leurs sources (transports fluviaux, lessivage des sols, dépôts atmosphériques, rejets incontrôlés, marées noires...).

Les HAP sont principalement d'origine pyrolytique liée à l'activité industrielle, mais ils peuvent également résulter d'une contamination à partir de produits pétroliers ou encore présenter une origine diagénétique.

Les polychlorobiphényles (PCB) sont une autre classe de composés persistants dans l'environnement et proviennent de l'utilisation de mélanges industriels. Leur emploi est aujourd'hui très réglementé cependant leur grande stabilité chimique fait qu'ils sont omniprésents dans notre environnement.

Les produits phytosanitaires (pesticides) sont utilisés comme herbicides, insecticides ou fongicides. Ils se composent principalement de composés organohalogénés, de carbamates, de triazines et de phénylurées. Leur introduction dans les milieux aquatiques provient principalement du drainage ou du lessivage des sols.

A coté de ces polluants organiques, la concentration en contaminants inorganiques n'a fait qu'augmenter ces dernières années sous l'influence des activités anthropiques et la pollution métallique des zones côtières mérite donc une attention toute particulière. Dans les eaux naturelles, les métaux présentent une grande variété de formes chimiques, tant dans la phase dissoute (ions hydratés, complexes minéraux et/ou organiques, associés ou non à des

colloïdes...) que dans la phase particulaire. La spéciation de ces métaux dépend des conditions physico-chimiques du milieu mais aussi de l'affinité des différents métaux pour les ligands que décrit la série de Irving – Williams (Guo et al., 2000) :



La matière organique dissoute et notamment les substances humiques présentent une aptitude particulière pour la complexation des métaux lourds et contribuent donc d'une manière importante à leur cycle dans les milieux aquatiques (Mantoura, 1981 ; Christensen et al., 1996). Il est donc primordial pour comprendre la présence et le devenir des contaminants dans l'environnement d'étudier les mécanismes de dispersion, de transformation et de transport et d'étudier plus particulièrement le rôle joué par les macromolécules organiques naturelles (piège, véhiculant, réservoir ou source).

Dans les estuaires, les conditions environnementales sont particulièrement variables et elles vont influencer à la fois sur la spéciation des contaminants mais également sur les caractéristiques de la matière organique dissoute et ainsi modifier ses propriétés complexantes. L'étude des propriétés de la MOD dans des systèmes aussi complexes que les estuaires semble donc absolument nécessaire afin de mieux appréhender son impact sur les flux de contaminants et leur devenir lors de leur transit des eaux fluviales vers le milieu marin.

1- PROPRIETES COMPLEXANTES DE LA MOD VIS A VIS DES METAUX DANS L'ESTUAIRE DE LA GIRONDE

Dans le cadre de ces présents travaux nous avons voulu développer une étude sur les propriétés complexantes de la MOD vis à vis des contaminants métalliques dans l'estuaire de la Gironde en collaboration avec l'équipe du Pr. G. Blanc (UMR 5805 EPOC-DGO Université Bordeaux 1). Dans la continuité et la même optique que l'étude des propriétés de fluorescence de la MOD en fonction de sa taille le long de l'estuaire nous avons voulu observer les propriétés complexantes de la MOD en fonction de sa taille moléculaire et son évolution dans le système estuarien afin de mieux comprendre le comportement des métaux lourds lors du mélange des eaux douces et salées et le rôle de la fraction organique colloïdale.

Cette étude a été réalisée avec les neuf échantillons provenant de la mission GIMET 3 que nous avons présentés dans le chapitre 4. Il s'agit donc de trois échantillons pris dans la colonne d'eau (surface, milieu et fond) dans le bouchon vaseux de l'estuaire de la Gironde, en amont et en aval de celui-ci.

Lors de la mission GIMET 3, un litre de chaque échantillon a été prélevé spécifiquement pour cette étude des propriétés complexantes en plus du volume nécessaire aux études par ultrafiltration présentées au chapitre 4. Ces échantillons ont été également fractionnés par ultrafiltration tangentielle mais cette fois-ci avec un seul seuil de coupure de 1kD afin de séparer la fraction colloïdale de la fraction dite réellement dissoute. La séparation par ultrafiltration a donc été effectuée sur environ 1 litre de chaque échantillon en utilisant le système Millipore dont le protocole est décrit dans le chapitre 2. Pour chacune des fractions obtenues, 10 mL ont été utilisées pour la fluorescence et la mesure des teneurs en carbone organique dissous, 60 mL ont servi au dosage des métaux et enfin 20 mL pour les réténats et 100 mL pour les filtrats ont servi à effectuer une étude sur la complexation du cuivre par extinction de fluorescence.

Les spectres de fluorescence totale de chacune des fractions ont été enregistrés afin de voir si les propriétés de complexation de la MOD étaient liées à des caractéristiques spectroscopiques particulières. Le dosage des métaux a alors été effectué dans chacune des fractions obtenues (réténats et filtrats). Nous avons ainsi pu déduire le taux de métal lié aux colloïdes.

L'ultrafiltration est une méthode de séparation douce et bien que les espèces de taille supérieure à 1kDa soient retenues d'un côté de la membrane, il se crée un équilibre entre les deux côtés de la membrane concernant les espèces plus petites (<1kDa) qui peuvent traverser librement la membrane.

Ainsi, la concentration en métal mesurée dans le réténat est la somme de la concentration en métal lié aux colloïdes (>1kDa) et de celle mesurée dans le filtrat 1kDa comme ceci est montré sur la figure 6-1.

Afin d'effectuer un bilan massique, le dosage de divers métaux traces a été réalisé dans chacun des échantillons filtrés. Les concentrations des différents métaux étudiés ont été déterminées par l'équipe du Pr. Blanc par ICP-MS. Les descriptifs de la méthode utilisée sont décrits par Robert et al. (2004). La présence de sel dans les échantillons rend plus difficile les mesures par ICP-MS et nécessite un protocole préalable d'extraction de la matrice saline. Ainsi, le dosage des métaux des échantillons prélevés en aval du bouchon vaseux n'a malheureusement pas pu être effectué pour l'instant et seules les données relatives aux échantillons du bouchon vaseux et de l'amont sont présentées dans la figure 6-2. Les concentrations obtenues sont dans la gamme des valeurs données dans la littérature pour les concentrations en métaux dissous dans l'estuaire de la Gironde (Kraepiel et al., 1997 ; Michel et al., 2000 ; Robert et al., 2004).

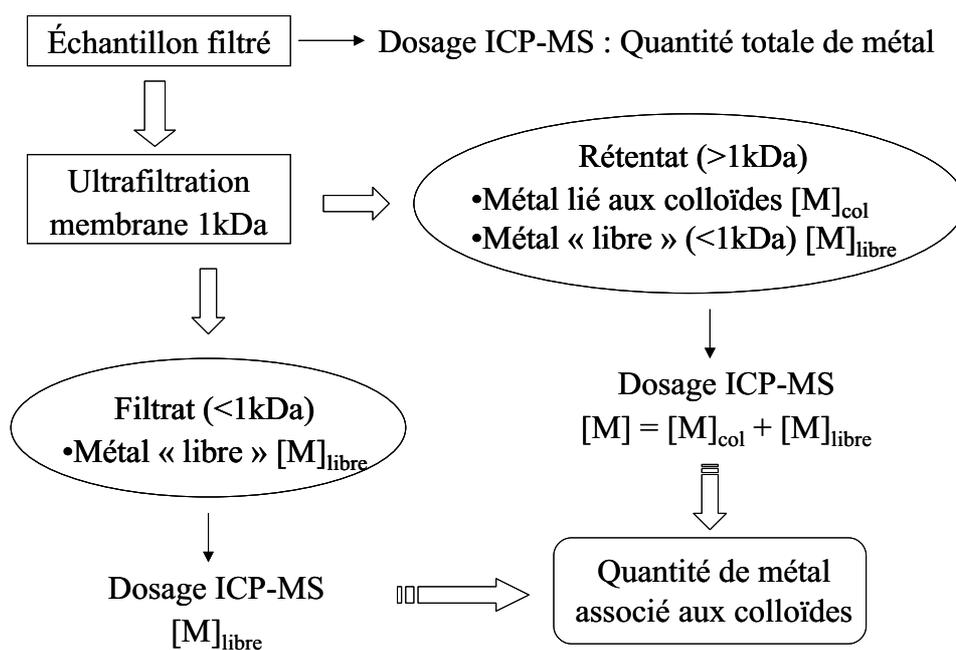


Figure 6-1. Principe du dosage des métaux dans les fractions colloïdale et dissoute.

Les résultats montrent différents comportements entre l'amont, qui représente le comportement fluvial, et le bouchon vaseux mais également dans la colonne d'eau. Tout d'abord, le vanadium et le molybdène semblent avoir des concentrations homogènes dans la colonne d'eau en amont et montrent une relativement forte augmentation au fond dans le bouchon vaseux qui pourrait être due à une remobilisation de ces deux éléments lors d'une remise en suspension de sédiment. Le cobalt et le cuivre ont un comportement identique qui présente une légère augmentation de la concentration de la surface vers le fond dans le BV. Les faibles valeurs obtenues pour l'échantillon d'amont au milieu de la colonne d'eau sont sous estimées. En effet, cet échantillon n'a malheureusement pas pu être dosé et la valeur indiquée est estimée par rapport au dosage ultérieur des fractions de filtrat et de rétentat.

Le chrome présente une légère diminution des concentrations entre l'amont et le BV. Le zinc présente par contre une très forte augmentation au milieu du BV tandis que ses concentrations en surface et au fond diminuent fortement par rapport à l'amont. Enfin, l'uranium n'est pas affecté et sa distribution est à la fois homogène dans la colonne d'eau et entre l'amont et le BV.

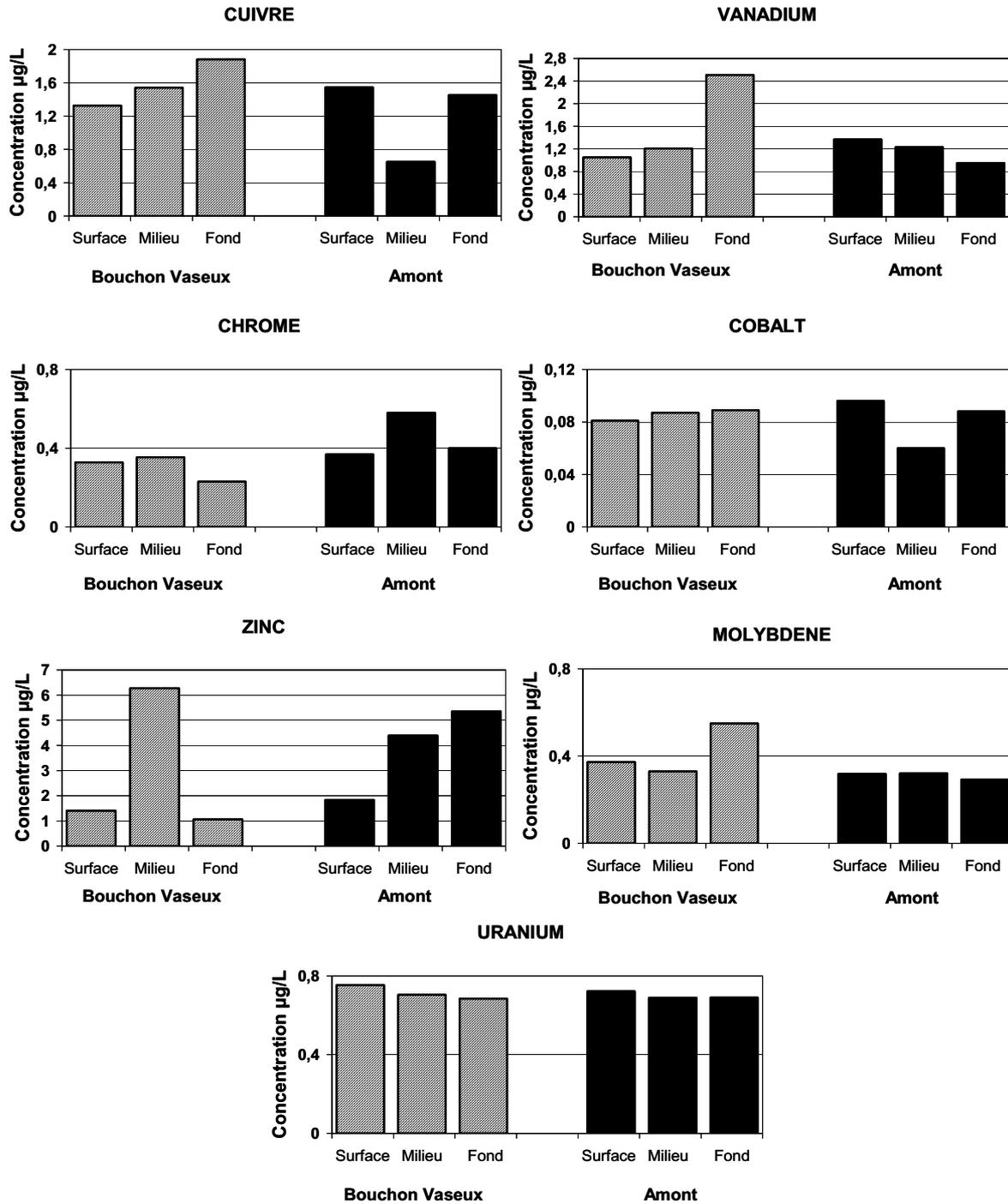


Figure 6-2 Dosage des métaux dans les échantillons filtrés.

Les teneurs en carbone organique dissous ont été également mesurées dans les fractions et rapportées à la teneur dans l'échantillon brut. La figure 6-3 présente l'évolution de la teneur en COD de la fraction organique colloïdale de l'amont vers l'aval.

La fraction colloïdale (>1kDa) représente entre 20 et 35 % du COD total. La tendance semble montrer une très légère diminution de l'amont vers l'aval indiquant une très faible dilution des eaux fluviales plus concentrées en carbone organique dans l'eau de mer. On remarque également une valeur plus élevée au cœur du bouchon vaseux. Cette augmentation ne peut pas être attribuée à de la remise en suspension puisque ce phénomène n'est pas observable au fond de la colonne d'eau. De plus il est peu probable que cette augmentation soit due à la désorption de macromolécules organiques liées aux particules puisque on ne note pas une augmentation de la teneur globale en COD au milieu de la colonne d'eau qui traduirait un apport de COD depuis la phase particulaire ou bien encore une production de COD. Ce phénomène semble donc être plutôt le résultat du pompage colloïdal, c'est à dire de la floculation de molécules organiques dissoutes de taille inférieure à 1kDa. Les échantillons du BV présentent une salinité comprise entre 2 et 2,6 et de nombreux auteurs ont mis en évidence la floculation de macromolécules de types acides humiques dès le début de l'estuaire et les faibles salinités.

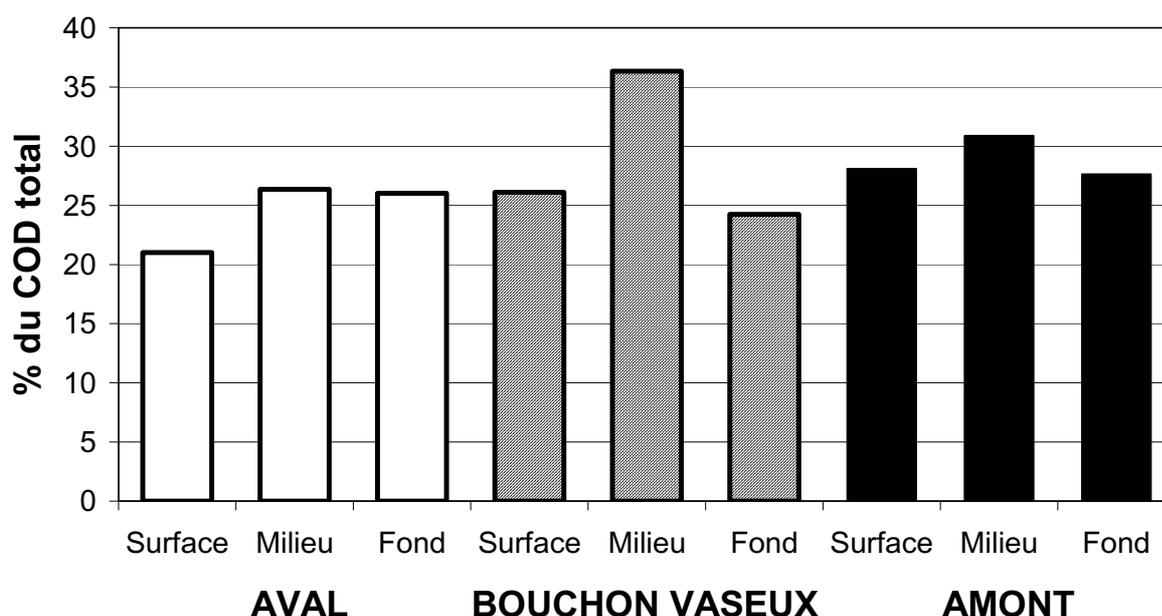


Figure 6-3. Importance relative du COD dans la fraction colloïdale.

La figure 6-4 montrent les variations des rapports d'intensité de fluorescence entre l'amont et l'aval du bouchon vaseux. Le rapport de l'intensité de la bande α' sur l'intensité de la bande α montre qu'il est plus important dans le filtrat que dans les réténats ce qui indique que les fluorophores de type α' seraient de taille généralement plus petite que les fluorophores

de type α . On remarque que ce rapport varie beaucoup moins au niveau des filtrats 1kD alors qu'après avoir été constant entre l'amont et le BV il augmente fortement vers l'aval dans toute la colonne d'eau, ce qui tend bien à montrer la plus forte proportion de fluorophores de type α' en aval du bouchon vaseux.

En ce qui concerne le rapport I_γ/I_α , il est de valeur relativement semblable entre les rétentrats et les filtrats (1,80 à 2,05) cependant il est beaucoup plus important que ce que l'on a pu voir au chapitre 5. Il présente une cassure sous la forme d'une diminution importante au niveau du BV, ce phénomène est marqué dans toute la colonne d'eau dans les filtrats tandis qu'il apparaît nettement plus marqué au fond pour les rétentrats. On peut également noter une légère augmentation de ce rapport en aval par rapport à l'amont, ce qui indique encore une fois une présence relative des fluorophores de type γ plus importante en aval.

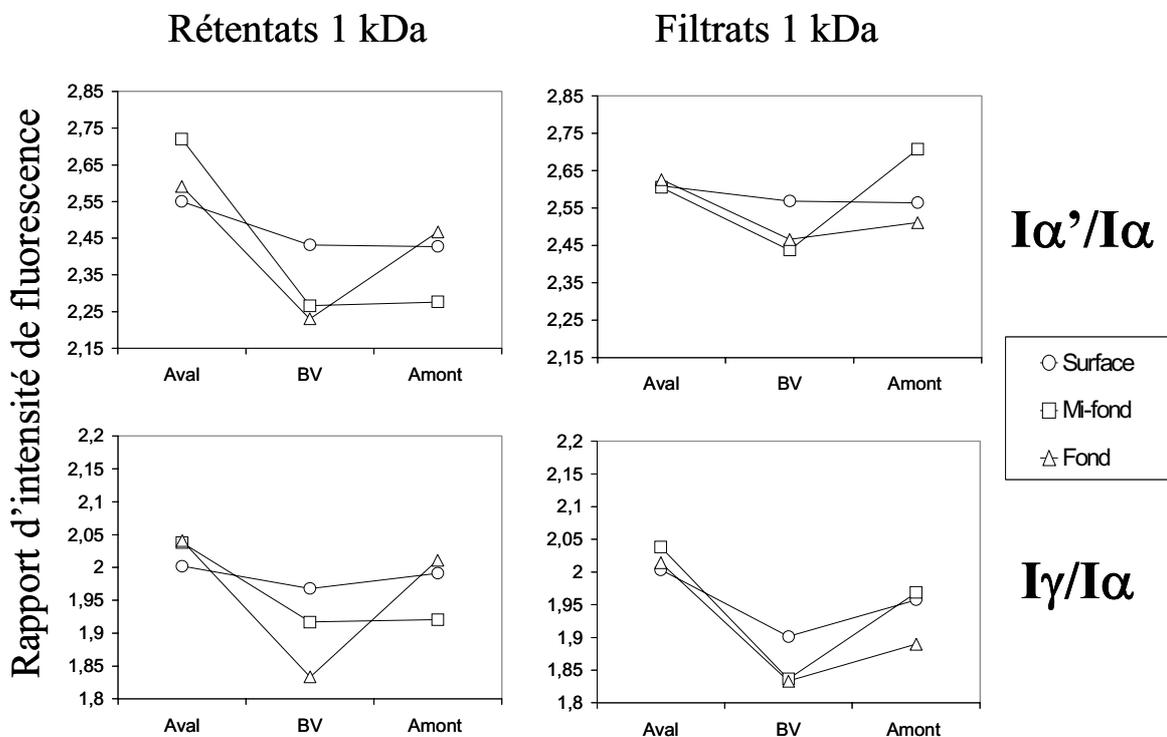


Figure 6-4 Rapports d'intensités de fluorescence des bandes α' et γ par rapport à la bande α pour les rétentrats 1kDa à droite et les filtrats 1kDa à gauche.

Grâce au dosage des métaux dans les différentes fractions d'ultrafiltration nous avons pu déterminer la quantité de métaux liés aux colloïdes dans chacune des fractions pour les échantillons du bouchon vaseux et de l'amont de celui-ci.

En effet comme le montre la figure 6-1, le dosage des métaux dans le rétentrat permet d'obtenir la concentration des métaux liés aux colloïdes en soustrayant à la valeur obtenue la teneur en métaux dans le filtrat. La connaissance des volumes de rétentrats et de filtrats permet

de déterminer le taux de métaux liés à la fraction colloïdale, c'est à dire liés aux molécules dont la taille est supérieure à 1kDa. Les résultats obtenus sont donnés sous la forme d'histogrammes dans la figure 6-5 et montrent l'évolution du pourcentage de métaux liés aux colloïdes dans la colonne d'eau entre l'amont du BV et le BV.

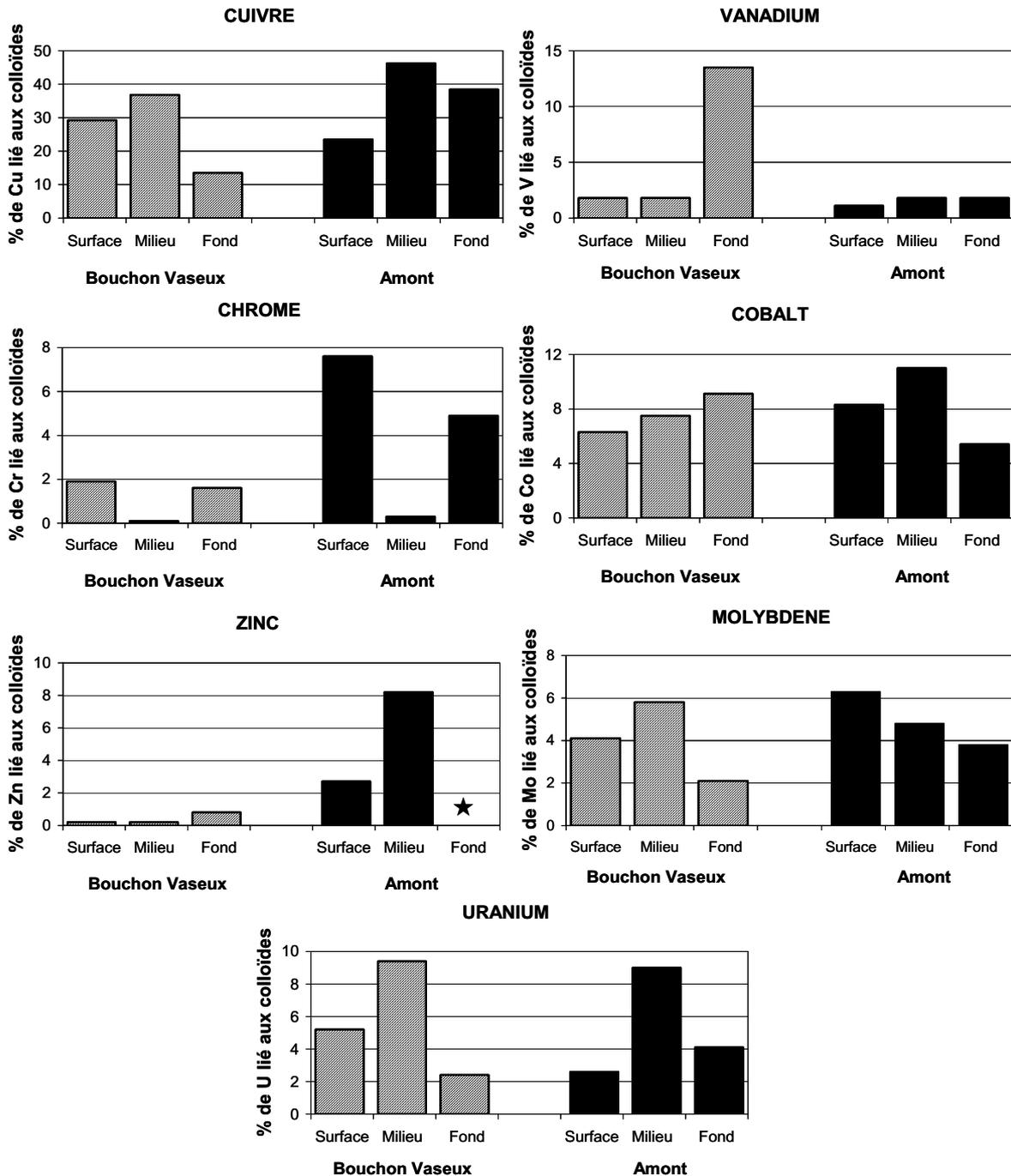


Figure 6-5 Taux d'association des métaux étudiés avec les espèces colloïdales. ★ = non déterminé.

La première observation est que, parmi les métaux étudiés ici, le cuivre est celui qui est le plus associé aux colloïdes (de 13 à 47 %) tandis que les autres métaux sont associés pour une part inférieure à 10 %. En ce qui concerne le cuivre, nos résultats sont globalement dans la gamme des valeurs (de 20 à 60 %) données dans la littérature pour la complexation du cuivre par les colloïdes dans les milieux estuariens (Wells et al., 2000 ; Hill et Aplin, 2001 ; Muller, 1996 ; Lores et Pennock, 1998). Pour les autres métaux, les valeurs que nous avons obtenues sont inférieures à celles généralement trouvées dans la littérature (Guo et al., 2000) avec par exemple de 10 à 50% pour le zinc (Hill et Aplin, 2001 ; Lores et Pennock, 1998 ; Guo et al., 2002), environ de 20 à 50 % pour le cobalt (Tang et al., 2002 ; Guo et al., 2002 ; Pham et Garnier, 1998).

En ce qui concerne le comportement des différents métaux, plusieurs caractéristiques peuvent être mises en évidence. Tout d'abord, le cobalt et l'uranium ne semblent pas être affectés par le passage de l'amont vers le bouchon en terme de quantité globale de métal associé aux colloïdes si l'on prend en compte toute la colonne d'eau.

Cependant on peut remarquer une inversion de distribution entre la surface et le fond. Le cuivre et le molybdène présentent une diminution de la fraction liée aux colloïdes. Le cuivre montre aussi une inversion de distribution surface-fond entre l'amont et le BV. Le molybdène semble lui s'associer préférentiellement avec les colloïdes au milieu du bouchon vaseux. Pour le chrome et le zinc, la tendance est une forte diminution de l'association aux colloïdes au niveau du bouchon vaseux. Le vanadium montre une valeur inexplicablement forte au niveau du fond dans le bouchon vaseux et qu'il faut mettre en parallèle avec une plus forte concentration totale en vanadium observée pour cet échantillon (figure 6-2).

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les rapports d'intensité de fluorescence des rétentats et les taux de métaux liés aux colloïdes. Les propriétés de fluorescence des colloïdes ne permettent donc pas directement d'observer des comportements particuliers de la matière organique dissoute colloïdale vis à vis des métaux. Il faut voir que le signal de fluorescence des rétentats correspond à la combinaison des spectres relatifs aux espèces colloïdales et aux espèces dissoutes qui sont en équilibre entre le rétentat et le filtrat et que ces espèces présentent potentiellement les mêmes types de fluorophores comme cela a été montré dans le chapitre 5. De plus, la complexation des métaux peut aussi résulter d'une association avec des colloïdes inorganiques non fluorescents. D'autre part, il ne faut pas perdre de vue que le seuil de coupure utilisé est de 1kDa pour séparer les espèces colloïdales des espèces dites réellement dissoutes et il y a malgré tout au sein de cette fraction de petite taille (<1kDa) des macromolécules organiques qui sont également capables de complexer des

métaux et d'influencer leur comportement dans l'environnement. C'est ce que nous allons montrer dans la partie suivante.

2- DETERMINATION DES PARAMETRES DE COMPLEXATION DE LA MOD VIS A VIS DU CUIVRE PAR EXTINCTION DE FLUORESCENCE

Comme cela été précisé au chapitre 3, la spectroscopie de fluorescence peut s'avérer très utile pour déterminer des caractéristiques de complexation au travers de l'extinction de fluorescence. Cette technique est relativement simple à mettre en œuvre mais d'un autre côté elle est basée sur certaines approximations qui peuvent induire des erreurs d'interprétation. En effet, elle permet de rendre compte du comportement des sites fluorescents qu'ils soient complexants ou non, mais ne permet pas de rendre compte des sites complexants non fluorescents contrairement aux méthodes basées sur l'utilisation d'électrodes sélectives.

A ce titre, l'extinction de fluorescence basé sur le modèle de Ryan et Weber (1982) a été fortement controversé (Cabaniss et Shuman, 1990) mais les conclusions de Ryan et Ventry (1990) montrent que cette technique conduit finalement aux mêmes incertitudes dans la détermination des constantes d'association que les méthodes électrochimiques. Ainsi, outre le fait qu'elle conduise à des déterminations satisfaisantes des constantes de complexation, l'extinction de fluorescence présente l'énorme avantage de ne nécessiter aucun traitement préalable des échantillons et donc de pouvoir être effectué dans les conditions naturelles.

Nous avons décidé de mettre en œuvre cette technique sur les mêmes fractions d'ultrafiltration et d'utiliser comme métal cible le cuivre. Nous avons choisi le cuivre pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le cuivre est référencé comme un très bon « quencher » de la fluorescence des substances humiques et de nombreuses études lui ont été consacrées (Ryan et Weber, 1982 ; Berger, 1984, Lee et al., 1992 ; Fang Lin et al., 1995 ; Lombardi et Jardim, 1997). D'autre part, comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, de tous les métaux étudiés, le cuivre est celui qui est le plus associé aux colloïdes (en moyenne pour 20 à 30%) et il apparaît donc comme tout à fait évident de l'utiliser pour étudier les propriétés de complexation de la matière organique dissoute.

Cette étude a donc été réalisée sur les mêmes fractions d'ultrafiltration que précédemment. Nous nous sommes uniquement focalisés sur les échantillons de mi-profondeur qui présentent les plus forts taux d'association avec les colloïdes pour les échantillons d'amont et du BV.

Après l'ultrafiltration, la partie des fractions conservée pour cette étude a été évaporée sous flux d'azote afin de concentrer le matériel organique. En effet, un des problème majeur

de cette technique lorsqu'elle est appliquée à des échantillons naturels est la trop faible concentration en matériel organique (De Souza Sierra, 1992, Rivail Da Silva, 1996 ; Berger et al., 1984).

Nous avons ensuite réalisé l'extinction de fluorescence de ces fractions en effectuant des ajouts successifs d'une solution de cuivre et en observant l'évolution du signal de fluorescence de ces fractions.

Nous avons réalisé pour chaque échantillon dix ajouts successifs de cuivre. Les solutions ont été agitées pendant les 30 minutes suivant l'ajout avant d'enregistrer la fluorescence.

La solution de cuivre utilisée est une solution certifiée standard TECHLAB pour torche à plasma de concentration 0,999 $\mu\text{g/L}$.

Dans le cadre de cette étude nous avons utilisé le modèle de Ryan et Weber décrit au chapitre 3 pour le traitement des données obtenues. Ce modèle est un modèle dit monoligand puisqu'il suppose dans ses hypothèses que tout le matériel organique agit comme un seul type de ligand. Ainsi dans la majorité des cas les différentes études portent sur l'extinction de fluorescence mesurée à une longueur d'onde d'excitation particulière et les auteurs observent alors, soit la décroissance de l'aire du spectre d'émission obtenu soit la décroissance du maximum d'émission. Ils en déduisent ainsi les paramètres de complexation concernant un seul type de fluorophore, donc un seul type de ligand qu'ils considèrent alors comme caractéristique de leur échantillon de matière organique.

Nous avons décidé d'adopter une approche relativement différente qui consiste à utiliser ce modèle monoligand et à l'adapter en considérant plusieurs ligands distincts caractérisés par les différents fluorophores. Pour cela nous avons suivi l'extinction de fluorescence en réalisant pour chacun des ajouts des spectres d'émission à différentes longueurs d'ondes d'excitation. Ainsi nous avons enregistré les spectres d'émission pour des excitations à 280 nm (fluorophores α' et γ), 313 nm (fluorophore β), 340 et 370 nm (fluorophore α). Pour chacun des spectres nous avons donc mesuré l'extinction de fluorescence en suivant la décroissance du maximum d'intensité de la bande correspondante au fluorophore concerné.

Les résultats obtenus en fonction de la concentration en cuivre ajouté ont alors fait l'objet d'une paramétrisation par une méthode de régression non-linéaire comme cela est décrit au chapitre 2 afin de déterminer les paramètres de complexation relatifs à chacun des fluorophores.

La figure 6-6 montrent les spectres d'émission de fluorescence du filtrat 1kDa Aval du bouchon vaseux pour les différents ajouts de cuivre et pour la longueur d'onde d'excitation

280 nm. On remarque bien la décroissance de l'intensité de fluorescence avec l'augmentation de la concentration en cuivre et pour les deux bandes de fluorescence observées sur ces spectres (α' et γ). Ce résultat montre que la fraction colloïdale supérieure à 1 kDa n'est pas uniquement responsable de la complexation des métaux et que les molécules de taille inférieure à 1 kDa peuvent participer activement à la complexation des xénobiotiques. La décroissance de l'intensité n'est pas la même pour la bande α' et γ ce qui traduit une différence de comportement de ces deux fluorophores vis à vis de la complexation.

La décroissance de la bande α a été observée en excitant à 370nm. Le suivi à 340nm ayant sensiblement abouti pour cette bande aux mêmes résultats, il ne sera pas présenté ici tout comme le suivi à 313 nm puisque la bande β n'a pas été observée. La décroissance de la bande γ n'a pu être clairement suivie que dans les échantillons de filtrat 1kDa. Cette bande était soit totalement absente soit trop faiblement distincte du massif α' pour permettre de suivre son évolution dans les rétentats.

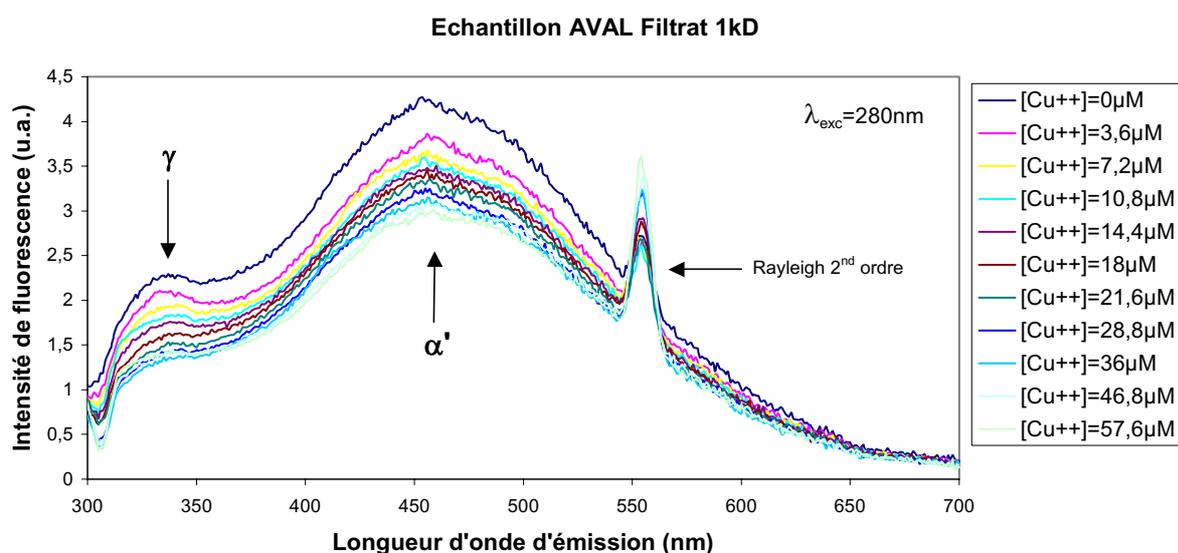


Figure 6-6. Spectres d'émission de fluorescence du filtrat 1kDa de l'échantillon Aval du bouchon vaseux pour une excitation à 280 nm et pour différents ajouts de cuivre.

Les intensités des maxima de fluorescence de chacune des bandes en fonction de la concentration en cuivre ont servi à déterminer les paramètres de complexation I_{ML} , l'intensité de fluorescence résiduelle des espèces qui ne complexent pas les métaux, K qui est la constante de complexation du ligand considéré et C_L qui est la capacité complexante (ou concentration du ligand considéré).

I_{ML} , K , et C_L ont été déterminés par une méthode de régression non linéaire appliquée sur les données expérimentales d'intensités de fluorescence.

Le profil des courbes de titrage $I = f([Cu])$ des trois échantillons (amont, aval et bouchon vaseux) pour chacun des fluorophores (α' , α et γ) sont présentés sur la figure 6-7 pour les rétentats et la figure 6-8 pour les filtrats. Ces figures présentent à la fois les valeurs expérimentales et les courbes paramétrées issues des calculs de régression non linéaire. Les paramètres de complexation ainsi déterminés sont donnés dans le tableau 6-1 pour chacun des fluorophores.

Les valeurs des paramètres de complexation varient en fonction du fluorophore considéré et en fonction de l'échantillon pour un même fluorophore. En ce qui concerne les valeurs de l'intensité résiduelle I_{ML} , celles-ci s'échelonnent de 36,1 à 78,1 et les valeurs de la constante d'association K varient d'environ 5.10^4 à $1.10^6 M^{-1}$. Pour comparaison, les valeurs données dans la littérature concernant des échantillons naturels de l'estuaire de la Gironde font état de valeurs allant de 50,0 à 55,0 et $0,5.10^4$ à $2,9.10^4$ (Berger et al., 1984) ou encore 47,9 à 67,5 et $4,9.10^4$ à $2,09.10^5$ (Rivail Da Silva, 1996) concernant I_{ML} et K respectivement. Il faut cependant noter que ces valeurs ont été obtenues dans le cas d'échantillons bruts et en ne considérant qu'un seul type de ligand organique.

En ce qui concerne les valeurs des capacités complexantes C_L , en dehors des résultats obtenus pour la bande γ qui semblent tout à fait vraisemblables et corrects si l'on considère les valeurs obtenues et les erreurs associées, les résultats pour les bandes α et α' présentent des erreurs considérables qui ne permettent pas de discuter ce paramètre.

Ces erreurs ont pour origine une difficulté de la méthode que de nombreux auteurs ont signalé comme provenant du fait de la trop faible concentration des sites complexants correspondants (De Souza Sierra, 1992 ; Rivail Da Silva, 1996 ; Berger, 1984). En effet, en fonction de la valeur du produit $K \times C_L$ la paramétrisation peut conduire à des valeurs très faibles voir négatives pour C_L (Berger, 1984) si $K \times C_L \ll 1$ (Rivail Da Silva, 1996). Le profil des courbes de titration devient dans ce cas indépendant de C_L qui peut varier d'une grande magnitude sans influencer les valeurs de I_{ML} et K , ce qui explique les très grands pourcentages d'erreur obtenus. Dans de pareils cas où la paramétrisation conduit à des valeurs aberrantes de C_L , Rivail da Silva (1996) a proposé une alternative portant sur la détermination de ce paramètre à partir de la pente à l'origine de la courbe de titration.

En effet, la dérivation de l'expression de l'intensité de fluorescence en fonction des divers paramètres (page 48, chapitre 2), pour une concentration en métal C_M tendant vers zéro conduit à $P_{CM \rightarrow 0} = (I_{ML} - 100) \times K / (K C_L + 1)$ où $P_{CM \rightarrow 0}$ est la pente à l'origine.

On en déduit que $C_L = [(I_{ML} - 100) \times K - P_{CM \rightarrow 0}] / (P_{CM \rightarrow 0} \times K)$.

Ainsi, si la paramétrisation conduit à une valeur de C_L trouvée anormale, la détermination de la pente à l'origine permet d'approcher la valeur réelle de façon plus vraisemblable.

Fluorophore	Fraction		I_{ML}	Erreur %	K (M^{-1})	Erreur %	C_L (site/litre)	Erreur %
γ	Filtrat 1kDa	Aval	61,63	1,09	$1,1 \cdot 10^6$	34,82	$2,10 \cdot 10^{-5}$	3,42
		BV	41,35	3,99	$4,3 \cdot 10^5$	33,17	$1,22 \cdot 10^{-5}$	11,89
		Amont	36,09	2,23	$2,0 \cdot 10^5$	11,92	$1,97 \cdot 10^{-5}$	4,3
α'	Filtrat 1kDa	Aval	64,61	3,08	$7,6 \cdot 10^4$	28,76	$4,11 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^8$
		BV	56,96	4,13	$5,4 \cdot 10^4$	14,45	$1,16 \cdot 10^{-12}$	$1 \cdot 10^8$
		Amont	46,92	2,92	$5,8 \cdot 10^4$	7,73	$1,32 \cdot 10^{-13}$	$8 \cdot 10^7$
	Rétentat 1kDa	Aval	64,02	2,14	$9,2 \cdot 10^4$	21,12	$5,37 \cdot 10^{-12}$	$5 \cdot 10^7$
		BV	42,63	2,74	$7,6 \cdot 10^4$	7,24	$1,41 \cdot 10^{-12}$	$5 \cdot 10^7$
		Amont	43,73	3,84	$5,1 \cdot 10^4$	9,44	$1,50 \cdot 10^{-12}$	$8 \cdot 10^7$
α	Filtrat 1kDa	Aval	78,12	1,34	$2,0 \cdot 10^5$	40,46	$4,28 \cdot 10^{-12}$	$8 \cdot 10^7$
		BV	65,91	8,93	$6,3 \cdot 10^4$	86,97	$1,01 \cdot 10^{-11}$	$2 \cdot 10^8$
		Amont	58,14	1,85	$7,8 \cdot 10^4$	8,52	$3,61 \cdot 10^{-13}$	$1 \cdot 10^8$
	Rétentat 1kDa	Aval	74,52	0,79	$1,3 \cdot 10^5$	10,37	$1,98 \cdot 10^{-12}$	4.107
		BV	51,77	2,52	$1,1 \cdot 10^5$	16,75	$1,37 \cdot 10^{-12}$	3.107
		Amont	52,66	3,61	$5,8 \cdot 10^4$	18,45	$3,88 \cdot 10^{-12}$	9.107

Tableau 6-1. Paramètres de complexation issus des régressions non linéaires appliquées sur les données expérimentales des courbes de titration $I = f([Cu])$.

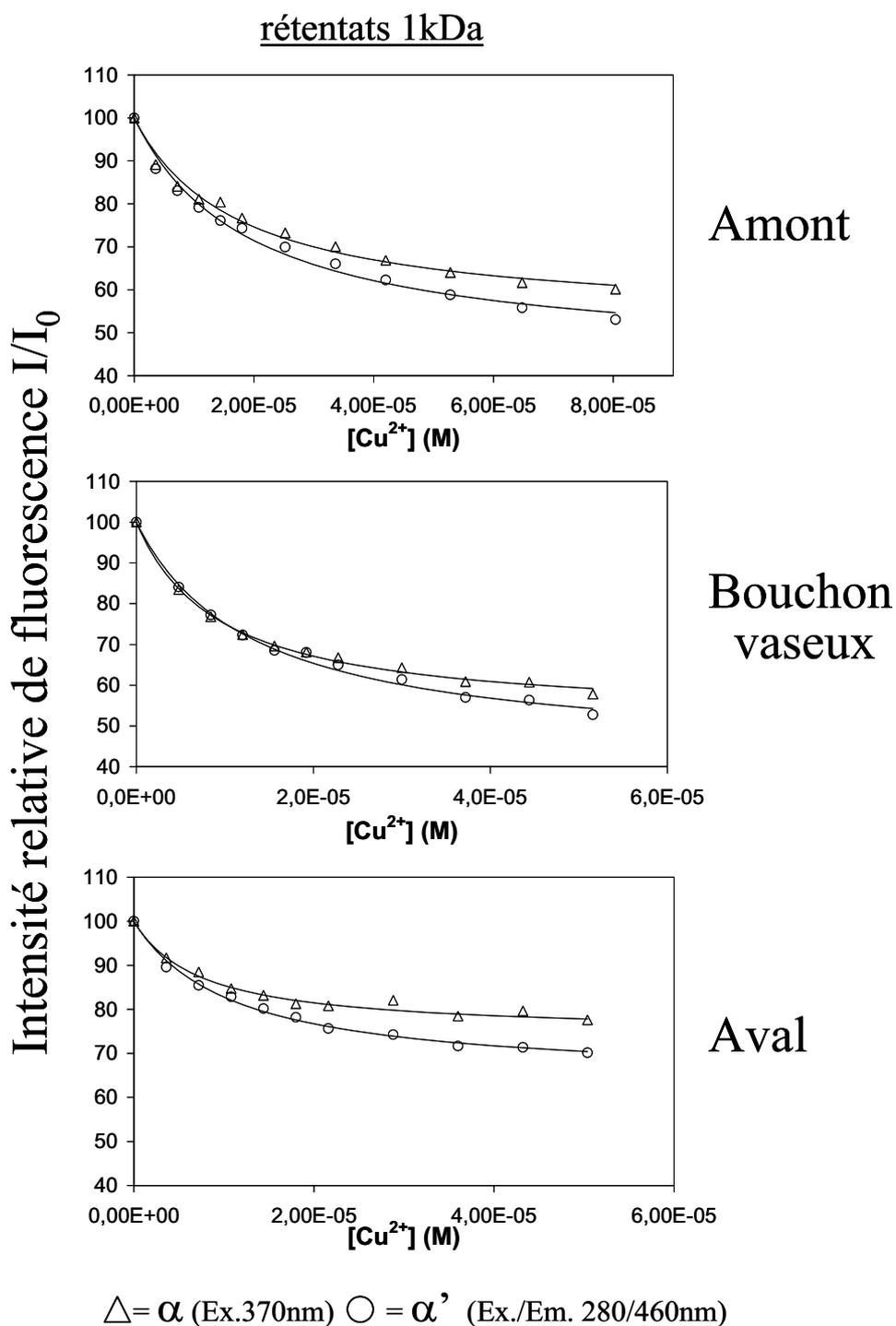


Figure 6-7. Courbes de titration $I = f([Cu^{2+}])$ pour les rétentats 1kDa. Données expérimentales et courbes associées calculées par régression non-linéaire (—).

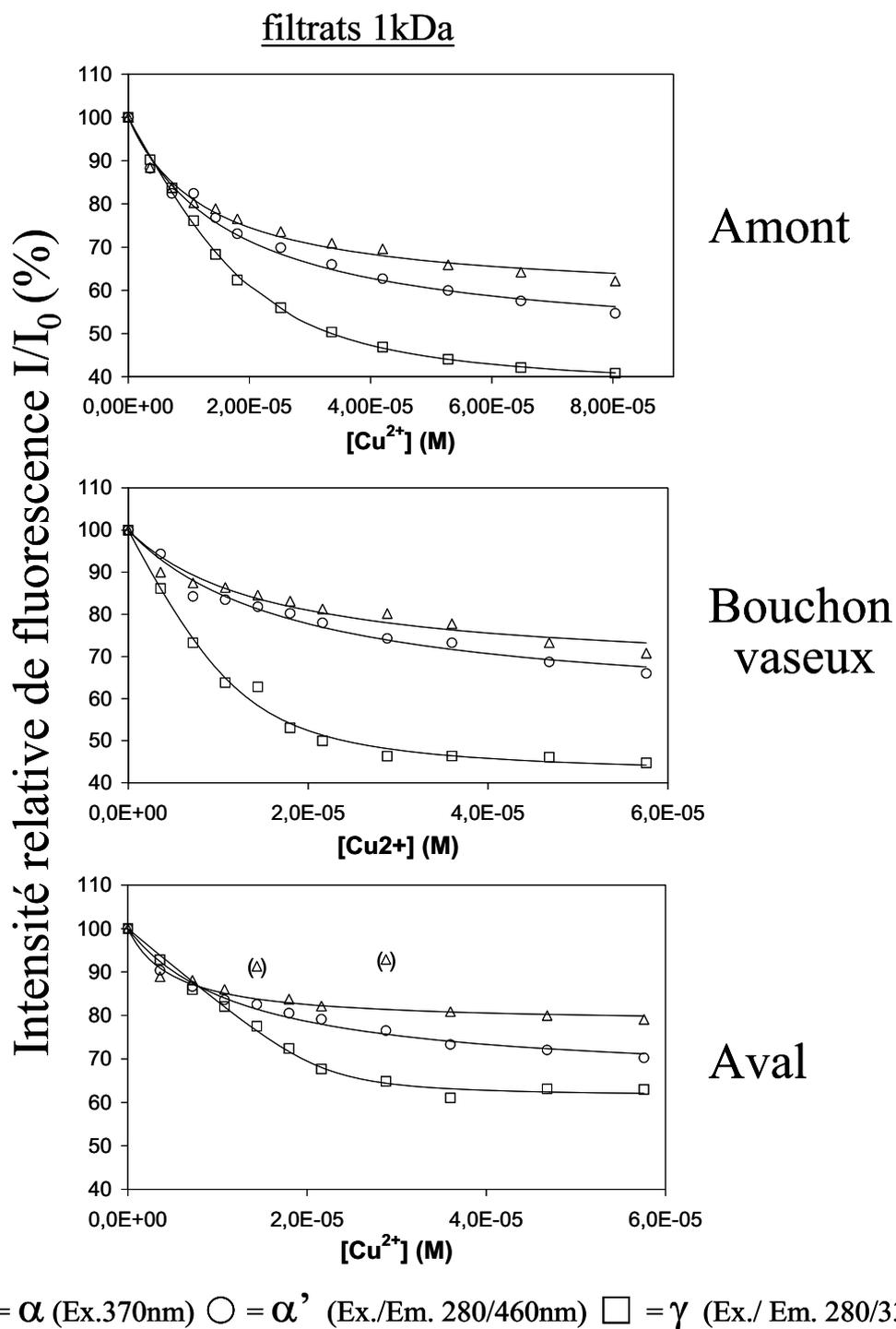


Figure 6-8. Courbes de titration $I = f([Cu^{2+}])$ pour les filtrats 1kDa. Données expérimentales et courbes associées calculées par régression non-linéaire (—). (Δ) Points expérimentaux non pris en compte dans la régression.

Nous avons donc déterminé à nouveau les capacités complexantes de tous les fluorophores par cette méthode et les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 6-2 qui les compare aux valeurs trouvées par paramétrisation. Les résultats trouvés par cette méthode semblent plus corrects et concordent bien avec ceux trouvés par paramétrisation pour le fluorophore γ .

Fluorophore	Fraction		C_L param. (site/litre)	C_L pente (site/litre)
γ	Filtrat 1kDa	Aval	$2,10.10^{-5}$	$2,13.10^{-5}$
		BV	$1,22.10^{-5}$	$1,23.10^{-5}$
		Amont	$1,97.10^{-5}$	$1,90.10^{-5}$
α'	Filtrat 1kDa	Aval	$4,11.10^{-12}$	$1,05.10^{-6}$
		BV	$1,16.10^{-12}$	$1,80.10^{-6}$
		Amont	$1,32.10^{-13}$	$2,02.10^{-6}$
	Rétentat 1kDa	Aval	$5,37.10^{-12}$	$9,8.10^{-7}$
		BV	$1,41.10^{-12}$	$3,6.10^{-7}$
		Amont	$1,50.10^{-12}$	$1,13.10^{-6}$
α	Filtrat 1kDa	Aval	$4,28.10^{-12}$	$1,51.10^{-6}$
		BV	$1,01.10^{-11}$	$1,26.10^{-6}$
		Amon	$3,61.10^{-13}$	$5,00.10^{-7}$
	Rétentat 1kDa	Aval	$1,98.10^{-12}$	$8,90.10^{-7}$
		BV	$1,37.10^{-12}$	$1,52.10^{-6}$
		Amont	$3,88.10^{-12}$	$4,40.10^{-7}$

Tableau 6-2. Comparaison des résultats de capacités complexantes C_L obtenues par paramétrisation et par détermination de la pente à l'origine des courbes de titration.

Les valeurs de C_L issues de la détermination de la pente à l'origine ont été retenues pour tracer les graphiques de la figure 6-9 qui présente les variations des paramètres de complexation pour chaque fluorophore entre l'amont et l'aval du bouchon vaseux.

Au niveau des filtrats 1kDa, il apparaît que les intensités résiduelles I_{ML} augmentent d'amont en aval pour les trois fluorophores α , α' et plus particulièrement pour γ , ce qui peut avoir plusieurs significations. D'une part le matériel fluorescent qui participait initialement à la complexation a pu subir des transformations au niveau du bouchon vaseux ou lors du mélange des eaux douces et salées.

En effet, des changements de conformation des macromolécules ou des phénomènes de floculations induits par l'augmentation de salinité peuvent masquer ou bloquer l'accès des métaux vers les sites complexants. D'autre part, il est possible que du matériel fluorescent ne participant pas à la complexation du cuivre soit présent en plus grande quantité à l'aval du bouchon vaseux.

Cette deuxième possibilité semble plus probable comme tendent à le montrer les valeurs des constantes de complexation K , qui parallèlement augmentent vers l'aval traduisant une augmentation du pouvoir complexant des petites molécules (<1kDa) caractérisées par le fluorophore γ . Ce comportement est moins marqué pour les fluorophores α et α' , leurs constantes de complexation associées étant beaucoup plus faibles.

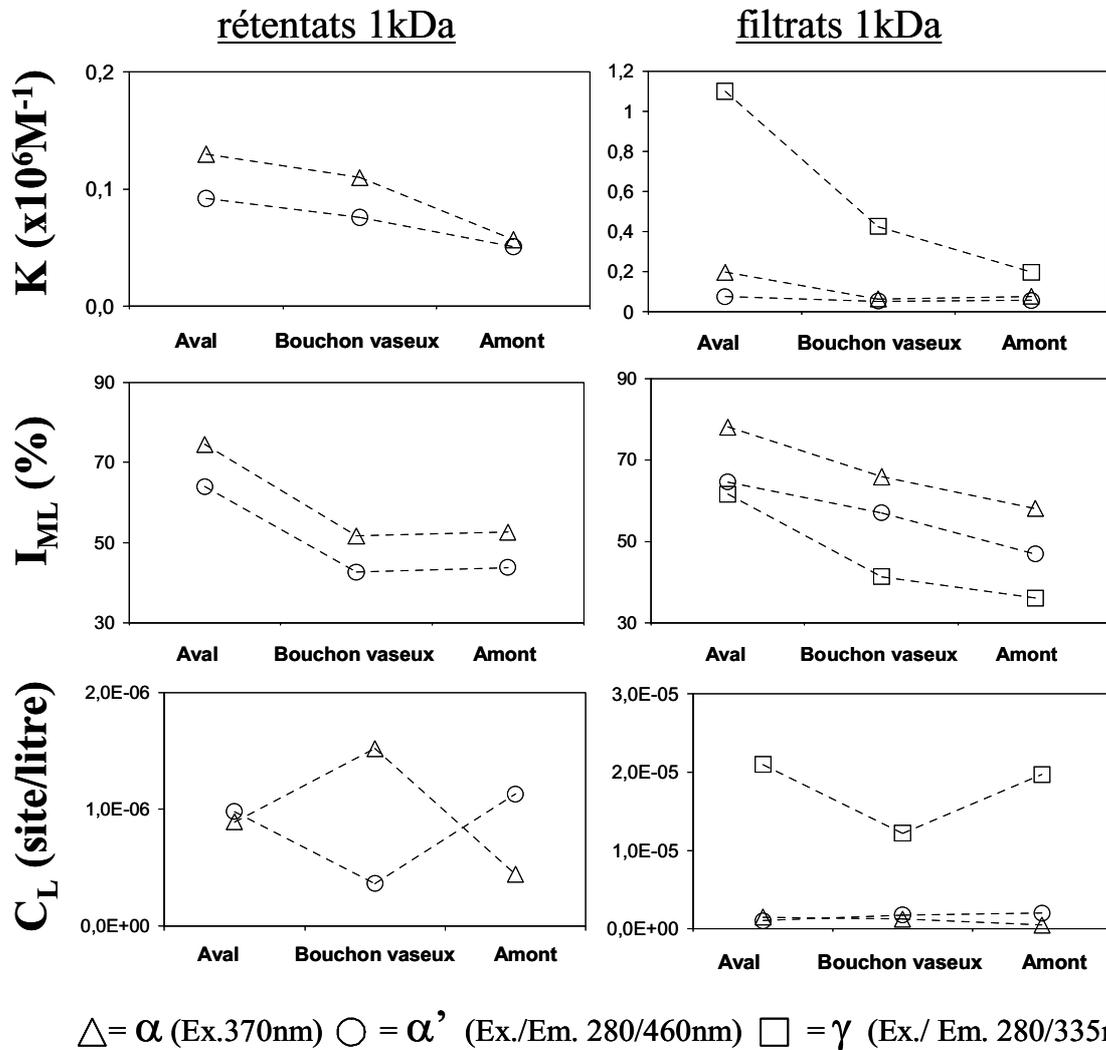


Figure 6-9. Variations des paramètres de complexation I_{ML} , K et C_L le long de l'estuaire pour chaque fluorophore. Les valeurs de C_L présentées sont celles calculées à partir des pentes à l'origine des courbes de titration et données dans le tableau 6-2.

La quantité de sites complexants C_L est beaucoup plus importante pour les molécules présentant le fluorophore γ qui rappelle le est attribuée à des composés de type protéiques ou dérivés d'acides aminées. Ce résultat est tout à fait intéressant puisqu'il confère à ce type de molécules des capacités potentielles de complexation plus importantes que celles des substances humiques (caractérisées par les bandes α et α') qui jusqu'à présent étaient

considérées comme majoritairement responsables de la complexation des métaux dans le compartiment organique dissous (Kogut et Voelker, 2001).

Ce résultat rejoint les conclusions d'une récente étude de Croué et al. (2003) qui ont montré une influence majeure des composés ayant des groupements aminés sur la complexation des métaux dans des eaux de rivière. Les travaux de Jackson et Morgan (1978) ont montré à l'époque que l'histidine, qui est un acide aminé, est susceptible de complexer le cuivre de façon substantielle. D'autre part ce type d'acide aminé est connu comme résultant de la dégradation du phytoplancton (Daumas, 1976).

Il semble alors normal que dans les eaux naturelles, les composés dérivés de ces acides aminés produits par la dégradation du matériel biologique présentent également la possibilité de complexer des métaux comme le cuivre. Il faut cependant noter que ce résultat concerne les plus petites molécules (<1kDa) et que le suivi de la bande γ dans les rétentats n'a pas été possible même si ce type de matériel est présent dans les fractions de plus haut poids moléculaire comme cela a été montré au chapitre 4.

D'ailleurs, Gordon et al. (1996) ont isolé des ligands de taille inférieure à 1kDa présentant une grande affinité pour complexer le cuivre. Ils ont reliés ces ligands à une activité biologique et en ont déduit que le phytoplancton peut être une source importante de composés présentant une grande affinité pour la complexation du cuivre.

En ce qui concerne les rétentats, donc les molécules de taille plus importante, l'intensité limite résiduelle diminue entre l'amont et le bouchon vaseux avant d'augmenter très fortement en aval de façon similaire pour les fluorophores α et α' . Ceci peut provenir soit d'une diminution de matériel fluorescent non complexant, soit d'une augmentation du pouvoir complexant de ces deux fluorophores au sein des plus grosses molécules au niveau du bouchon vaseux comme semble le montrer l'augmentation des constantes de complexations K . Au niveau des capacités complexantes, celles-ci sont légèrement plus faibles que celles des filtrats et laissent apparaître un comportement opposé entre l'amont et le BV avant de devenir identique vers l'aval pour les deux fluorophores.

Ainsi à la vue de ces résultats il est possible d'émettre une hypothèse concernant la diminution de l'importance relative de la fraction colloïdale dans la complexation des métaux, et notamment du cuivre au niveau du bouchon vaseux qui a été observé dans le paragraphe précédent (Figure 6-5). En effet, il est possible qu'au niveau du bouchon vaseux, l'augmentation des capacités et des constantes de complexation des molécules plus petites (<1kDa) entraînent un transfert des métaux complexés de la fraction colloïdale vers la fraction dissoute qui contient des espèces susceptibles de complexer les métaux comme nous venons de le montrer.

3- CONCLUSION

Nous avons souhaité dans cette étude appréhender de manière plus précise les propriétés de complexation de la matière organique dissoute vis à vis des métaux et notamment les modifications de ces propriétés lors du transit estuarien. Pour cela nous avons dans un premier temps fractionné la MOD afin de séparer la fraction colloïdale de la fraction réellement dissoute et déterminé les quantités de divers métaux associés aux colloïdes. Il est apparu que des modifications de l'influence de la fraction colloïdale se produisent au niveau du bouchon vaseux et aussi que, de tous les métaux étudiés, le cuivre est celui qui présente le plus d'affinité vis à vis de la complexation.

Nous avons donc décidé d'approfondir ces résultats en effectuant une étude plus précise des propriétés complexantes par une méthode spectroscopique basée sur l'extinction de fluorescence du matériel organique sous l'effet de la complexation avec des métaux et notamment le cuivre qui est donc apparu comme le plus approprié pour mener cette étude. Nous avons ainsi pu mettre en évidence plusieurs résultats tout à fait intéressants.

Tout d'abord il est apparu qu'au sein de la fraction décrite dans la littérature comme réellement dissoute (<1kDa), une part importante de molécules organiques participent activement à la complexation des métaux traces.

D'autre part, des modifications importantes des propriétés de complexations de la MOD ont été observées lors du transit estuarien et du passage du cuivre au sein du système bouchon vaseux. Ces modifications se sont avérées variables en fonction du fluorophore, donc, du type de composé considéré. Cela montre tout l'intérêt de notre approche « multiligand ». Bien qu'elle soit basée sur une méthode nécessitant d'importantes approximations, cette méthode nous a permis d'appréhender de façon plus précise ces processus de complexation. Cela montre également l'utilité des approches dites multiligands qui semblent plus appropriées pour élucider ce type de propriétés sur des échantillons naturels présentant une telle complexité et une telle hétérogénéité.

Enfin, cette étude a permis de montrer que les molécules caractérisées par le fluorophore γ participent fortement à la complexation des métaux traces. Ce matériel est constitué de dérivées protéiques ou de fragments d'acides aminés. Il provient de matériel organique biologique fraîchement dégradé et représente une partie importante de la fraction labile du carbone organique dissous dans les eaux naturelles. Les propriétés de complexation importantes de ce type de composés ont été très récemment mises en évidence dans des eaux de rivières (Croué et al., 2003) et nos travaux les confirment très nettement au niveau des estuaires qui sont des zones de forte production de ce type de matériel au travers des activités

autotrophes et hétérotrophes. De plus, nos résultats tendent à indiquer que ces propriétés complexantes semblent s'accroître au delà du bouchon vaseux lors du mélange des eaux douces et marines.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux consignés dans ce mémoire ont concerné l'étude par spectroscopie de fluorescence de la matière organique dissoute (MOD) dans les estuaires de la Seine et de la Gironde. Dans le cadre de ces études, trois objectifs étaient plus précisément poursuivis. Tout d'abord, utiliser la fluorimétrie afin de caractériser le plus finement possible la MOD fluorescente et son évolution sur les deux zones d'étude, Seine et Gironde, en fonction des paramètres environnementaux. Ensuite, appréhender les échanges entre les phases organiques particulaire et dissoute au travers des apports de matériel organique vers la fraction fluorescente dissoute suite à la dégradation du phytoplancton. Enfin, aborder l'étude des interactions entre la MOD et les contaminants lors du mélange estuarien.

Les résultats obtenus ont conduit aux conclusions suivantes :

En ce qui concerne la caractérisation de la MOD fluorescente, les mêmes fluorophores ont été observés pour la Seine et la Gironde. Au delà de cette similitude de profondes différences ont été mises en évidence au sein de ces deux estuaires, lors du mélange des eaux douces et marines.

Tout d'abord, la Seine présente des variations saisonnières très nettes des teneurs en COD, de la nature et de la composition de la MOD tandis que la Gironde montre globalement peu de variations au cours de l'année.

La fluorescence de la MOD des deux estuaires est dominée par les signaux relatifs aux substances humiques, cependant l'utilisation des rapports d'intensités et des indices de fluorescence HIX et f380/450 a permis de distinguer encore plus précisément la MOD fluorescente des deux estuaires.

La MOD de l'estuaire de la Gironde présente un caractère humique plus marqué et une plus faible activité biologique jusqu'à des salinités de l'ordre de 25 qui semblent associées à la très forte turbidité observée jusqu'à cette salinité quelque soit la saison.

L'évolution saisonnière de la MOD de la Seine montre la présence d'un matériel plus humifié en hiver et d'une composante liée à l'activité biologique plus importante durant la période estivale sur l'ensemble de la zone soumise à l'influence de la salinité. De plus, l'étude de la partie amont de l'estuaire de la Seine a montré une production autochtone de composés organiques relativement importante.

L'ensemble de ces observations nous a permis de regrouper sur le tableau 3-3 (p. 125) les gammes de valeurs que nous avons obtenues pour trois indices de fluorescence et les caractéristiques de la MOD associées à ces valeurs pour des échantillons d'eaux estuariennes.

Les modifications des propriétés de fluorescence observées et les teneurs en COD mesurées permettent de conclure à la non conservativité du carbone organique lors du transit estuarien. La seule mesure de la teneur en COD est insuffisante pour caractériser la fraction organique et son évolution au sein des systèmes aquatiques. En effet, le caractère conservatif fréquemment observé dans les estuaires n'est qu'apparent et cache en fait de profondes modifications du matériel organique comme celles que nous avons pu observer.

L'utilisation combinée de la fluorescence et du fractionnement par ultrafiltration pour séparer le matériel organique en différents groupes de tailles moléculaires distinctes a permis de confirmer ces observations. Des modifications de la distribution du carbone organique et des différents fluorophores en fonction de la taille lors du mélange estuarien ont été observées et reliées à des phénomènes de floculation, sédimentation et remise en suspension du matériel organique au cours des cycles de marée.

Une différence importante entre les deux estuaires semble être la taille des macromolécules organiques dissoutes puisque une part plus importante du COD dans l'estuaire de la Seine est composée de molécules de grande taille par rapport à la Gironde.

De plus, malgré un caractère fractal très marqué confirmant bien de récents travaux indiquant une nature supramoléculaire d'une majorité des composants de la MOD (Piccolo, 2001), certains fluorophores caractéristiques ont pu être isolés au sein de fractions d'ultrafiltration distinctes.

Parallèlement, les expériences d'incubation de matériel phytoplanctonique ont permis de montrer l'effet accélérateur du bouchon vaseux et en particulier des bactéries liées aux particules sur la dégradation et les apports vers la phase dissoute fluorescente. En effet, l'activité bactérienne s'est avérée être un paramètre fondamental dans le fonctionnement du bouchon vaseux et notamment au niveau de la production de matériel organique dissous.

Deux nouvelles bandes de fluorescence qui n'avaient jusqu'à présent jamais été répertoriées à notre connaissance ont pu être observées lors de ces expériences. Nous avons associé ces bandes aux communautés bactériennes et à leur activité au sein du bouchon vaseux de la Gironde mais le manque de données relatives à la dégradation propre à l'échantillon de bouchon vaseux nous empêche de conclure définitivement quant à leur origine.

Dans le dernier chapitre de ce mémoire nous avons abordé l'étude des relations entre la matière organique dissoute et les polluants.

Cette étude a permis de montrer que le rôle de la fraction colloïdale sur la spéciation des métaux traces dans l'estuaire de la Gironde dépend en premier lieu de l'espèce métallique considérée. Ensuite, les résultats ont montré que le degré de complexation des métaux par les espèces colloïdales évoluent lors du mélange estuarien et en particulier dans le bouchon vaseux en raison des modifications des conditions environnementales.

Dans un deuxième temps, le cuivre étant apparu comme le métal le plus sensible à la présence de colloïdes, l'étude plus précise de la complexation des ions cuivriques (Cu^{2+}) par extinction de fluorescence a permis d'aboutir à des conclusions particulièrement intéressantes.

Tout d'abord, la fraction constituée de molécules de taille inférieure à 1kDa contient des composés organiques participant activement à la complexation des ions métalliques. Ainsi, la limite purement arbitraire de 1kDa fixée dans la littérature pour séparer le matériel colloïdal de la fraction généralement considérée comme réellement dissoute ne tient pas compte d'une part importante de composés de taille inférieure à cette limite et qui présentent pourtant des propriétés colloïdales et notamment de complexation non-négligeables.

Ensuite, il s'est avéré que l'approche « multiligand » utilisée a permis de différencier la complexation respective des différents fluorophore. Ainsi, il est clairement apparu que les composés d'origine protéiques ou dérivés d'acides aminés présentent une très grande affinité pour la complexation du cuivre rejoignant ainsi les résultats de récents travaux (Croué et al., 2003).

Les résultats présentés ici sont cependant limités à l'étude des contaminants métalliques dans l'estuaire de la Gironde. En effet, l'étude de la spéciation des métaux dans l'estuaire de la Seine par une méthode de titration potentiométrique n'a pas pu être conduite à son terme.

D'autre part, nous avons également engagé des études concernant les interactions entre la MOD et des contaminants de type organique (HAP et PCB) dans les deux estuaires mais ces expériences se sont heurtés jusqu'à présent à de trop sérieuses difficultés analytiques pour pouvoir aboutir.

Ainsi, de nombreuses perspectives sont à envisager à l'issue de ce travail :

En effet, ce travail a montré toute l'utilité de la fluorimétrie pour l'étude de la MOD dans les eaux naturelles et des travaux récents font état du développement actuel de méthode de déconvolution des matrices de fluorescence qui permettront dans un futur proche de dissocier au sein de ces matrices complexes l'influence de chacun des fluorophores (Stedmon et al., 2003).

D'un autre côté, le chapitre 4 a montré tout l'intérêt du couplage entre la spectroscopie de fluorescence et une méthode de fractionnement comme l'ultrafiltration. Cependant, comme cela a déjà été précisé au cours de ce travail, la fluorimétrie reste une méthode globale qui ne permet pas une caractérisation moléculaire précise des composés. Par contre, et il s'agissait d'un choix délibéré au départ, elle permet de suivre aisément les processus d'évolution de la MOD dans les systèmes aquatiques et il apparaît tout à fait envisageable de la coupler avec d'autres types de fractionnement (Parlanti et al., 2000) et surtout d'autres techniques analytiques plus généralement destinées à la caractérisation moléculaire (RMN, Py-GC/MS, MALDI-TOF).

Ces multiples couplages entre techniques de fractionnement et de caractérisation semblent à présent indispensables afin de progresser dans la connaissance de sa composition et de ses propriétés dans les différents compartiments environnementaux.

Le suivi des incubations *in vitro* de matériel phytoplanctonique a également montré un potentiel intéressant pour la détermination des mécanismes de production et de dégradation du matériel organique dissous dans le bouchon vaseux. Il est en effet possible d'imaginer des expériences similaires incluant d'autres paramètres comme la salinité et l'oxygène qui sont particulièrement influents dans les zones estuariennes.

Enfin, il apparaît fondamental à la suite de ces travaux de persévérer dans l'étude des interactions entre les contaminants organiques ou métalliques et les macromolécules organiques naturelles, car il devient absolument nécessaire de tenir compte de l'influence de la fraction organique dissoute pour mieux comprendre les cycles biogéochimiques des contaminants dans l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abril G., Etcheber H., Le Hir P., Bassoulet P., Boutier B., Frankignoulle M. (1999) Oxic/anoxic oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde, France). *Limnology and Oceanography*, **44**, 1304-1305.
- 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.
- Ahel M., Barlow R.G., Mantoura R.F.C. (1996) Effect of salinity gradients on the distribution of phytoplankton pigments in a stratified estuary. *Marine Ecology Progress Series*. **143**, 289-295.
- Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (1985) Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization. J. Wiley and Son. (Eds.) 692p.
- Aiken G.R., McKnight D.M., Thorn K.A., Thurman E.M. (1992) Isolation of hydrophilic organic acids from water using non-ionic macroporous resins. *Organic Geochemistry*, **18**, 567-573.
- Alberts J.J., Takács M., Egeberg P.K. (2002) Total luminescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography (HPSEC). *Organic Geochemistry*, **33**, 817-828.
- Allen G.P. (1972) Etude des processus sédimentaires dans l'estuaire de la Gironde. Mémoire IGBA, Bordeaux, 314 pp.
- Allen G.P., Sauzay G., Castaing P., Jouanneau J.M. (1977) Transport and deposition of suspended sediment in the Gironde Estuary, France. "Estuarine processes", M. Wiley (Ed.) Academic press, New York, 63-81.
- Allen G.P., Salomon J.C., Bassoulet P., Du Penhoat Y., De Granpré C. (1980) Effects of tides on mixing and suspended sediment transport in macrotidal estuaries. *Sedimentary Geology*, **26**, 69-90.
- Aluwihare L.I., Repeta D.J., Chen R.F. (1997) A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface seawater. *Nature*, **387**, 166-169.
- Amon R.W.M., Benner R. (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **41**, 41-51.
- Arnosti C., Keith S.C., Blough N.V. (2000) Application of fluorescence spectroscopic techniques and probes to the detection of biopolymer degradation in natural environments. *Marine Chemistry*, **71**, 321-330.
- Arvola L., Tulonen T. (1998) Effects of allochthonous dissolved organic matter and inorganic nutrients on the growth of bacteria and algae from a highly humic lake. *Environment International*, **24** (4/5), 509-520.
- Battin T.J. (1998) Dissolved organic matter and its optical properties in a blackwater tributary of the upper Onorico river, Venezuela. *Organic Geochemistry*, **28**, 561-567.

- Beck K.C., Reuter J.H., Perdue E.M. (1974) Organic and inorganic geochemistry of some coastal plain rivers of south-eastern United States. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **38**, 341-364.
- Belin C., Quéllec C., Lamotte M., Ewald M., Simon P. (1993) Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water. Application to fractions obtained by tangential ultrafiltration and XAD resin isolation. *Environmental Technology*, **14**, 1131-1144.
- Benedetti M., Ranville J.F., Ponthieu M., Pinheiro J.P. (2002) Field-flow fractionation and binding properties of particulate and colloidal organic matter from the Rio Amazon and Rio Negro. *Organic Geochemistry*, **33**, 269-279.
- Benner R. (1991) Ultra-filtration for the concentration of bacteria, viruses and dissolved organic matter. "Marine Particles: Analysis and characterisation". D.C Hurd, D.W. Spencer (Eds.) Geophysical Monograph, American Geophysical Union, **63**, 181-186pp.
- Benner R., Hedges J.I. (1993) A test of the accuracy of fresh water DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation and UV-promoted persulfate oxidation. *Marine Chemistry*, **41**, 161-165.
- Benner R., Biddanda B., Black B., McCarthy M. (1997) Abundance, size distribution and stable carbon and nitrogen isotopic compositions of marine organic matter isolated by tangential-flow ultrafiltration. *Marine Chemistry*, **57**, 243-263.
- 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.
- Berger P. (1984) Etude de la matière organique complexe fluorescente dissoute dans les estuaires de la zone tempérée. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 163pp.
- Berger P., Ewald M., Liu D., Weber J.H. (1984) Application of the fluorescence quenching titration method to the complexation of copper (II) in the Gironde Estuary (France). *Marine Chemistry*, **14** (3), 289-295.
- Berzelius J.J. (1806) Undersohning af adolfsberg brunnsvatten, undersohning af Polakallratten Berzelius och Hisinger's :Afhandlingar i Physik, Kemi, och Mineralogi, **1**, 124-145.
- Blough N.V., Del Vecchio R. (2002) Chromophoric DOM in the coastal environment. In: Biogeochemistry of marine dissolved organic matter, D.A. Hansell, C.A. Carlson (Eds.), Academic Press, Elsevier, 509p.
- Bollag J.M., Myers C.J., Minard R.D. (1992) Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment*, **123/124**, 205-217.
- Brophy J.E., Carlson D.J. (1989) Production of biologically refractory dissolved organic carbon by natural seawater microbial populations. *Deep Sea Research*, **56** (4), 497-507.

- Buffle J., Deladoey J.P. and Haerdi W. (1978) The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. *Analytica Chimica Acta*, **101**, 339-357.
- Buffle J. (1988) Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach. E. Norwood (Ed.), Chichester, 692p.
- Buffle J., Leppard G.G. (1995) Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1- Structure and behaviour of colloidal material. 2- Key role of physical structures on analytical results. *Environmental Science and Technology*, **29**, 2169-2184.
- Buffle J., Wilkinson K.J., Stoll S., Filella M., Zhang J. (1998) A generalized description of aquatic colloidal interactions : the three-colloidal component approach. *Environmental Science and Technology*, **32**, 2887-2889.
- Burba P., Aster B., Nifant'eva T., Shkinev V., Spivakov B.Ya. (1998) Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part1. Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration. *Talanta*, **45**, 977-988.
- Burton J.D., Liss P.S. (1976) Estuarine Chemistry. Academic Press, London, 193p.
- Cabaniss S.E., Shuman M.S. (1990) Exchange of comments on fluorescence quenching measurements of copper – fulvic acid binding. *Analytical Chemistry*, **62**, 1526-1528.
- Cai Y. (1999) Size distribution measurements of dissolved organic carbon in natural waters using ultra-filtration technique. *Water Research*, **33** (13), 3056-3060.
- Canfield D.E. (1994) Factors influencing organic carbon preservation in marine sediments. *Chemical Geology*, **114**, 315-329.
- Carter C.W., Suffet I.H. (1982) Binding of DDT to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, **16**, 735-740.
- Cauwet G., Gadel F., De Souza Sierra M.M., Donard O.F.X., Ewald M. (1990) Contribution of the Rhone River to organic carbon inputs to the Northwestern Mediterranean Sea. *Continental Shelf Research*, **10**, 1025-1037.
- Cauwet G., Mackenzie F.T. (1993) Carbon inputs and distribution in estuaries of turbid rivers: the Yang Tze and Yellow rivers, (China). *Marine Chemistry*, **43**, 235-246.
- Chen R.F. (1999) In situ fluorescence measurements in coastal waters. *Organic Geochemistry*, **30**, 397-409.
- Christensen J.B., Jensen D.L., Christensen T.H. (1996) Effect of dissolved organic carbon on the mobility of cadmium, nickel and zinc in leachate polluted groundwater. *Water Research*, **30** (12), 3037-3049.
- Cifuentes L.A., Eldridge P.M. (1998) A mass- and isotope-balance model of DOC mixing in estuaries. *Limnology and Oceanography*, **43**, 1872-1882.
- Coble P.G., Green S., Blough N.V., Gargosian R.B. (1990) Characterization of the dissolved organic matter in the Black Sea by fluorescence spectroscopy. *Nature*, **348**, 432-435.

- Coble P.G., (1996) Characterisation of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission spectroscopy. *Marine Chemistry* **51**, 325-346.
- 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*, **45**, 2195-2223.
- Coleman W.E., Munch J.N., Kaylo W.H., Streicher R.P., Ringhand H.P., Meier J.R. (1984) Gas chromatographic/mass spectroscopy analysis of mutagenic extracts of aqueous chlorinated humic acid. A comparison of the byproducts to drinking water contaminants. *Environmental Science and Technology*, **18**, 674-681.
- Cox L., Celis R., Hermosín M.C., Cornejo J., Zsolnay A., Zeller K. (2000) Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, **34**, 4600-4605.
- Croué J.P., Martin B., Simon P., Legube B. (1993) Les matières hydrophobes et hydrophiles des eaux de retenue : extraction, caractérisation et quantification. *Water Supply*, **11**, 51-62.
- Croué J.P. (2001) What information can we obtain on the bulk NOM characteristics using isolation protocols? Organic Matter in the environment: role and behaviour. Proceeding of the 4th Workshop of the French chapter of the International Humic Substances Society, Limoges, France, November 2001, pp 7-8.
- Croué J.P., Benedetti M.F., Violleau D., Leenheer J.A. (2003) Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte river: evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environmental Science and Technology*, **37**, 328-336.
- Croué J.P. (2004) Isolation of humic and non-humic NOM fractions: structural characterization. *Environmental Monitoring and assessment*, **92**, 193-207.
- Crump B.C., Barros J.A., Simenstad C.A. (1998) Dominance of particle-attached bacteria in the Columbia River estuary, USA. *Aquatic Microbial Ecology*, **14**, 7-18.
- Dai M., Martin J.M., Cauwet G. (1995) The significant role of colloids in the transport and transformation of organic carbon and associated trace metals (Cd, Cu and Ni) in the Rhône delta (France). *Marine Chemistry*, **51**, 159-175.
- Daumas R.A. (1976) Variations of particulate proteins and dissolved amino acids in coastal seawater. *Marine Chemistry*, **4**, 225-242.
- De Grandpré M.D., Vodacek A., Nelson R.K., Bruce E.J., Blough N.V. (1996) Seasonal seawater optical properties of the US middle Atlantic bight. *Journal of Geophysical Research*, **101**, 22727-22736.
- De Hann H., De Boer T. (1987) Application of light absorbance and fluorescence as measures of concentration and molecular size of dissolved organic carbon in humic lake Tjeukemeer. *Water Research*, **21** (6), 731-734.

- De Souza Sierra M.M. (1992) Caractérisation et réactivité de la matière organique fluorescente dissoute dans des milieux côtiers et marins. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 200p.
- De Souza Sierra M.M., Donard O.F.X., Lamotte M., Belin C., Ewald M. (1994) Fluorescence spectroscopy of coastal and marine waters. *Marine Chemistry*, **47**, 127-144.
- 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.
- 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*, **41**, 659-675.
- Determann S., Lobbes J.M., Reuter R., Rullkötter J. (1998) Ultraviolet fluorescence excitation and emission spectroscopy of marine algae and bacteria. *Marine Chemistry*, **62**, 137-156.
- Dienert F. (1910) De la recherche des substances fluorescentes dans le contrôle de la stérilisation des eaux. C. hebdomadaire. Séances Acad. Sci. Paris, 150, 487-488.
- Donard O.F.X., Lamotte M., Belin C., Ewald M. (1989) High sensitivity fluorescence spectroscopy of Mediterranean waters using a conventional or a pulsed laser source. *Marine Chemistry*, **27**, 117-136.
- Dressler M. (1979) Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers. *Journal of Chromatography*, **165**, 167-206.
- Duursma E.K. (1965) The dissolved organic constituents of seawater. "Chemical Oceanography" J.P. Riley, G. Skirrow (Eds.) Academic Press, London, **1**, 433-475.
- Duursma E.K. (1974) The fluorescence of dissolved organic matter in the sea. In : Optical aspects of oceanography. Jerlov N.G., Steemann-Nielsen E. (Eds.) Academic Press, **11**, 237-256.
- Ephraïm J.H., Marinsky J.A. (1990) Ultrafiltration as a technique for studying metal-humate interaction: studies with iron and copper. *Analytica Chimica Acta*, **232**, 171-180.
- Etcheber H. (1983) Biogéochimie de la matière organique en milieu estuarien : comportement, bilan, propriétés. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 352p.
- Etcheber H., Relexans J.C., Beliard M., Weber O., Buscail R., Heussner S. (1999) Distribution and quality of sedimentary organic matter on the Aquitanian Margin (Bay of Biscay). *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **46** (10), 2249-2288.
- Ewald M., Belin C., Berger P., Weber J.H. (1983) Corrected fluorescence spectra of fulvic acids isolated from soil and water. *Environmental Science and Technology*, **17**, 501-504.
- Ewald M., Berger P., Visser S.A. (1988) UV-visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as functions of their molecular weights. *Geoderma*, **43**, 11-20.

- Fang F., Kanan S., Patterson H.H., Cronan C.S. (1998) A spectrofluorimetric study of the binding of carbofuran, carbaryl, and aldicarb with dissolved organic matter. *Analytica Chimica Acta*, **373**, 139-151.
- Fang Lin C., Yuan Lee D., Tsai Chen W., Lo K.S. (1995) Fractionation of fulvic acids. Characteristics and complexation with copper. *Environmental Pollution*, **87**, 181-187.
- Fisher T.R., Hagy J.D., Rochelle-Newall E.J. (1998) Dissolved and particulate organic carbon in Chesapeake Bay. *Estuaries*, **21**, 61-93.
- Frankignoulle M., Abril G., Borges A., Bourge I., Canon C., Delille B., Libert E., Théate J.M. (1998) Carbone dioxide emission from European estuaries. *Science*, **282**, 434-436.
- Frimmel F.H. (1992) In: "Progress in hydrogeochemistry". G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schultz, E. Usdowski (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp24-28.
- Frimmel F.H., Huber S.A., Gremm T. (1993) The role of organic matter in natural aquatic systems: analytical constraints. *Chemistry and Ecology*, **8**, 153-169.
- Gargosian R.B., Lee C. (1981) Processes controlling the distribution of biogenic organic compounds in seawater. "Marine Organic Chemistry". E.K. Duursma, R. Dawson (Eds.) Elsevier Oceanography Series.
- Garnier J., Billen G., Hanset P., Testard P., Coste M. (1993) Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. Actes du Colloque : La Seine et son bassin, de la recherche à la gestion, pp289-310.
- Garnier J.M., Martin J.M., Mouchel J.M., Sioud K. (1996) Partitioning of trace metals between the dissolved and particulate phases and particulate surface reactivity in the Lena River estuary and the Laptev Sea (Russia). *Marine Chemistry*, **53**, 269-283.
- Gauthier T.D., Shane E.C., Guerin W.F., Seitz W.R., Grant C.L. (1986) Fluorescence quenching method for determining the equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environmental Science and Technology*, **20**, 1162-1166.
- Ghosh K., Schnitzer M. (1980) Macromolecular structure of humic substances. *Soil Science*, **129**, 266-276.
- Gjessing E.T., Lee G.F. (1967) Fractionation of organic matter in natural waters on Sephadex columns. *Environmental Science and Technology*, **1**, 631-638.
- Gjessing E.T., Berglund L. (1981) Adsorption of PAH to aquatic humus. *Archives of Hydrobiology*, **92**, 24-30.
- Gohin F., Lampert L., Guillaud J.F., Herbland A., Nézan E. (2003) Satellite and in situ observations of a late winter phytoplankton bloom in the northern Bay of Biscay. *Continental Shelf Research*, **23**, 1117-1141.

- Gordon A.S., Dyer B.J., Kango R.A., Donat J.R. (1996) Copper ligands isolated from estuarine water by immobilized metal affinity chromatography: temporal variability and partial characterization. *Marine Chemistry*, **53**, 163-172.
- Guo L., Santschi P.H. (1997) Isotopic and elemental characterization of colloidal organic matter from the Chesapeake Bay and Galveston Bay. *Marine Chemistry*, **59**, 1-15.
- Guo L., Santschi P.H., Warnken K.W. (2000) Trace metal composition of colloidal organic material in marine environments. *Marine Chemistry*, **70**, 257-275.
- Guo L., Santschi P.H., Ray S.M. (2002) Metal partitioning between colloidal and dissolved phases and its relation with bioavailability to american oysters. *Marine Environmental Research*, **54**, 49-64.
- Hamsch B., Werner P., Mäcke H., Frimmel F.H. (1993) Degradation of algal exsudates by mixed bacterial biocenoses. *Water Science and Technology*, **27** (7-8), 421-429.
- Harvey G.R., Boran D.A. (1981) Geochemistry of humic substances in seawater. In *Humic Substances in soil, sediment and water*, G.R. Aiken, D.M McKnight, R.L. Wershaw, P. MacCarthy (Eds.), Wiley, New York, pp 233-248.
- Harvey G.R., Boran D.A., Chesal L.A., Tokar J.M. (1983) The structure of marine fulvic and humic acids. *Marine Chemistry*, **12**, 119-132.
- Harvey H.R., Mannino A. (2001) The chemical composition and cycling of particulate and macromolecular dissolved organic matter in temperate estuaries as revealed by molecular organic tracers. *Organic Geochemistry*, **32** (4), 527-542.
- Hayase K., Tsubota H. (1984) Reversed-phase liquid chromatography of molecular weight-fractionated sedimentary fulvic acid. *Journal of Chromatography*, **295**, 530-532.
- Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., Swift R.S. (1989) Humic Substances II. In search of structure. J. Wiley and Sons (Eds.), 764p.
- Hedges J.I., Hatcher P., Ertel J., Meyers-Schulte K.A. (1992) Comparison of dissolved humic substances from sea water with Amazon counterparts by ¹³C-NMR spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **56**, 1753-1757.
- Hedges J.I., Keil R.G., Benner R. (1997) What happen to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic Geochemistry*, **27**, 195-212.
- Hedges J.I., Keil R.G. (1999) Organic Geochemical perspectives on estuarine processes : sorption reactions and consequences. *Marine Chemistry*, **65**, 55-65.
- Hedges J.I., Eglinton G., Hatcher P.G., Kirchman D.L., Arnosti C., Derenne S., Evershed R.P., Kögel-Knaber I., De Leeuw J.W., Littke R., Michaelis W., Rullkötter J. (2000) The molecularly-uncharacterized component of nonliving organic matter in natural environments. *Organic Geochemistry*, **31**, 945-958.
- Heip C.H.R., Goosen N.K., Herman P.M.J., Kromkamp J., Middleburg J.J., Soetaert K. (1995) Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. *Oceanography and Marine Biology, Annual Review*, **33**, 1-149.

- Hill D.M., Aplin A.C. (2001) Role of colloids and fine particles in the transport of metals in rivers draining carbonate and silicate terrains. *Limnology and Oceanography*, **46**, 331-344.
- Hoge F.E., Wright C.W., Swift R.N., Yungel J.K., Berry R.E., Mitchell R. (1998) Fluorescence signatures of an iron enriched phytoplankton community in the eastern equatorial Pacific Ocean. *Deep-sea Research Part II*, **45**, 1083-1092.
- Hollibaugh J.T., Azam F. (1983) Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnology and Oceanography*, **28**, 1104-1116.
- 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 and Technology*, **28** (6), 1194-1197.
- Ishiwatari R. (1992) Macromolecular material (humic substances) in the water column and sediments. *Marine Chemistry*, **39**, 151-166.
- Ittekkot V. (1982) Variation of dissolved organic matter during a plankton bloom: qualitative aspects based on sugar and amino acid analyses. *Marine Chemistry*, **11**, 143-158.
- Ittekkot V., Spitzky A., Lammerz U. (1982) Dissolved organic matter in the Elbe, Weser and Ems rivers and German bight. "Transport of carbon and minerals in major world rivers". Degens (Ed.). **52**, 749-756.
- Jackson G.A., Morgan J.J. (1978) Trace-metal chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media : theoretical analyses and comparison with reported observations. *Limnology and Oceanography*, **23**, 262-282.
- Jaffé R., Boyer J.N., Lu X., Maie N., Yang C., Scully N.M., Mock S. (2004) Source characterization of dissolved organic matter in a subtropical mangrove-dominated estuary by fluorescence analysis. *Marine Chemistry*, **84**, 195-210.
- Janoš P. (2003) Separation methods in the chemistry of humic substances. *Journal of Chromatography A*, **983**, 1-18.
- Jones K.D., Tiller C.L. (1999) Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid : a comparison of dissolved and clay bound humic. *Environmental Science and Technology*, **33**, 580-587.
- Kalbitz K., Geyer S., Geyer W. (2000) A comparative characterization of dissolved organic matter by means of original aqueous samples and isolated humic substances. *Chemosphere*, **40**, 1305-1312.
- Kalbitz K., Schmerwitz J., Schwesig D., Matzner E. (2003a) Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma*, **113**, 273-291.
- Kalbitz K., Schwesig D., Schmerwitz J., Kaiser K., Haumaier L., Glaser B., Ellerbrock R., Leinweber P. (2003b) Changes in properties of soil-derived dissolved organic matter induced by biodegradation. *Soil Biology & Biochemistry*, **35**, 1129-1142.

- Kalle K. (1966) The problem of the Gelbstoff in the sea. *Oceanography and Marine Biology*, **4**, 41-104.
- Kieber D.J., McDaniel J., Mopper K. (1989) Photochemical source of biological substrates in sea water : implications for carbon cycling. *Nature*, **341**, 637-639.
- Kilduff J., Walter J. and Weber Jr. (1992) Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration. *Environmental Science and Technology*, **26** (3), 569-577.
- Kogut M.B., Voelker B.M. (2001) Strong copper-binding behaviour of terrestrial humic substances in seawater. *Environmental Science and Technology*, **35**, 1149-1156.
- Kraepiel A.M.L., Chiffoleau J.F., Martin J.M., Morel F.M.M. (1997) Geochemistry of trace metals in the Gironde Estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **61** (7), 1421-1436.
- Küchler I.V., Miekeley, N., Forsberg B.R. (1994) Ultrafiltration of humic compounds through low molecular mass cut-off level membranes, *The Science of The Total Environment*, **154**, 23-28.
- Laane R.W.P.M. (1980) Conservative behaviour of dissolved organic carbon in the Ems-Dollart estuary and the Western Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, **14** (2), 192-199.
- Laane R.W.P.M., Koole L. (1982) The relation between fluorescence and dissolved organic carbon in the Ems-Dollart estuary and the Western Wadden sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, **15**, 217-227.
- Labry C., Herbland A., Delmas D., Laborde P., Lazure P., Froidefond J.M., Jegou A.M., Sautour B. (2001) Initiation of winter phytoplankton blooms within the Gironde Plume waters in the Bay of Biscay. *Marine Ecology Progress Series*, **212**, 117-130.
- Lara R.J., Thomas D.N. (1995) Formation of recalcitrant organic matter : humification of algal derived dissolved organic carbon and its hydrophobic fractions. *Marine Chemistry*, **51**, 193-199.
- Lee D.Y., Lin C.F., Huong L.M., Lo K.S. (1992) Spectrofluorimetric investigation of Cu and Pb complexation by dissolved organic matter. *Chinese Inst. Of Environ. Engr.*, **2**, 51-56.
- Leenheer J.A. (1981) Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environmental Science and Technology*, **15**, 578-587.
- Lemaire E. (2002) Source et devenir de la matière organique en milieu estuarien : utilisation des biomarqueurs pigmentaires. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 182p.
- Lemaire E., Abril G., De Wit R., Etcheber H. (2002) Effet de la turbidité sur la dégradation des pigments phytoplanctoniques dans l'estuaire de la Gironde. *C. R. Geoscience*, **334**, 251-258.
- Lores E.M., Pennock J.R. (1998) The effect of salinity on binding of Cd, Cr, Cu and Zn to dissolved organic matter. *Chemosphere*, **37** (5), 861-874.

- Lombardi A.T., Jardim W.F. (1997) Synchronous-scan fluorescence and the complexation of copper (II) ions by humic substances. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **8** (4), 339-342.
- Malcolm R.L., MacCarthy P. (1992) Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environment International*, **18** (6), 597-607.
- Maneux E. (1998) Erosion mécanique des sols et transports fluviaux de matières en suspension : application des systèmes d'information géographique dans les bassins de l'Adour, de la Dordogne et de la Garonne. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 252p.
- 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.
- Mannino A., Harvey H.R. (2000) Terrigenous dissolved organic matter along an estuarine gradient and its flux to the coastal ocean. *Organic Geochemistry*, **31**, 1611-1625.
- Mantoura R.F.C., Dickson A., Riley J.P. (1978) The complexation of metals with humic material in natural waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **6**, 387-408.
- Mantoura R.F.C. (1981) Organo-metallic interactions in natural waters. "Marine Organic Chemistry". E.K. Duursma, R. Dawson (Eds.). Elsevier Oceanography Series. 179-212pp.
- 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.
- Marschner B., Kalbitz K. (2003) Controls of bioavailability and biodegradability of dissolved organic matter in soils. *Geoderma*, **113**, 211-235.
- Martin J.M., Dai M.H. Cauwet G. (1995) Significance of colloids in the biogeochemical cycling of organic carbon and trace metals in the Venice Lagoon (Italy). *Limnology and Oceanography*, **40**, 119-131.
- Martin-Mousset B., Croué J.P., Lefebvre E., Legube B. (1997) Distribution and characterization of dissolved organic matter of surface waters. *Water Research*, **31** (3), 541-553.
- Mayer L.M., Schick L.L., Lodee III T.C. (1999) Dissolved protein fluorescence in two Maine estuaries. *Marine Chemistry*, **64**, 171-179.
- McCarthy M.D., Hedges J.I., Benner R. (1993) The chemical composition of dissolved organic matter in seawater. *Chemical Geology*, **107**, 503-507.
- McCarthy M.D., Hedges J.I., Benner R. (1996) Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. *Marine Chemistry*, **55**, 281-297.
- McKnight D.M., Boyer E.W., Westerhoff P.K., Doran P.T., Kulbe T., Anderson D.T. (2001) Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for the identification of precursor organic material and aromaticity. *Limnology and Oceanography*, **46**, 38-48.

- Michel P., Boutier B., Chiffolleau J.F. (2000) Net fluxes of dissolved arsenic, cadmium, copper, zinc, nitrogen and phosphorus from the Gironde Estuary (France): seasonal variations and trends. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **51**, 451-462.
- Miller A.E.J. (1999) Seasonal investigation of dissolved organic carbon dynamics in the Tamar estuary, UK. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **27**, 595-624.
- Mittenzwey Kl. H., Reuter R. (1995) Correlations between COD, DOC, UV₂₅₄ and fluorescence of inland waters measured in the laboratory. *EARSeL Advances in Remote Sensing*, **3** (3), 57-65.
- 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 and Technology*, **30**, 3061-3065.
- 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.
- Moran M.A., Hodson R.E. (1990) Bacterial production on humic and nonhumic components of dissolved organic carbon. *Limnology and Oceanography*, **35** (8), 1744-1756.
- Moran M.A., Sheldon W.M., Sheldon J.E. (1999) Biodegradation of riverine dissolved organic matter in five estuaries of the Southeastern United States. *Estuaries*, **22**, 55-64.
- Mounier S., Braucher R., Benaïm J.Y. (1999) Differentiation of organic matter's properties of the Rio Negro Bassin by crossflow ultrafiltration and UV-spectrofluorescence. *Water Research*, **33** (10), 2363-2373.
- Muller F.L.L. (1996) Interactions of copper, lead and cadmium with the dissolved, colloidal and particulate components of estuarine and coastal waters. *Marine Chemistry*, **52**, 245-268.
- Officer C.B. (1983) Physics of estuarine circulation. "Ecosystems of the world : Estuaries and enclosed seas", B.H. Ketchum (Ed.) Elsevier, 15-41.
- Ohno T. (2002) Fluorescence inner-filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, **36**, 742-746.
- Parker C.A., (1968) Photoluminescence of solutions. Elsevier, Amsterdam, 544p.
- Parlanti, E., Belin C., Texier H., Ewald M., Lamotte M. (1997) Interpretation of the fluorescence signature of the marine and continental waters in the Gironde and Seine estuaries. In: The role of humic substances in the ecosystems and in environmental protection. J. Drozd, S.S. Gonet, N. Senesi, J. Weber (Eds.), Polish Society of Humic Substances, Wroclaw, Poland, pp 603-609.
- Parlanti E., Wörz K., Geoffroy L., Lamotte M., (2000a) Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Organic Geochemistry*, **31** (12), 1765-1781.
- Parlanti E., Budzinski H., Lagarde F., Wörz K., Vacher L., Frank H. (2000b) Different approaches to study organic contaminants - humic substances interactions: fiction or

- reality? *Proceedings of the 10th International Meeting of the International Humic Substances Society*, Toulouse France, Juillet 2000, vol. 1, 385-388.
- Parlanti E., Morin B., Vacher L. (2002) Combined 3D-spectrofluorimetry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Organic Geochemistry*, **33**, 221-236.
- Patel-Sorrentino N., Mounier S., Benaim J.Y. (2002) Excitation –emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers. *Water Research*, **36**, 2571-2581.
- Perillo G.M.E. (1995) Definitions and geomorphologic classifications of estuaries. “Geomorphology and sedimentology of estuaries” G.M.E. Perillo (Ed.), Elsevier Developments in sedimentology **53**, 17-41.
- Pham M.K., Garnier J.M. (1998) Distribution of trace elements associated with dissolved compounds (<0.45 μm -1 nm) in freshwater using coupled (frontal cascade) ultrafiltration and chromatographic separations. *Environmental Science and Technology*, **32** (4), 440-449.
- Piccolo A. (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, **166**, 810-832.
- Pompe S., Heise K.H., Nitsche H. (1996) Capillary electrophoresis for a “finger-print” characterization of fulvic and humic acids. *Journal of Chromatography A*, **723**, 215-218.
- Pritchard D.W. (1967) What is an estuary? Physical point of view. “*Estuaries*” G.H. Lauff (Ed). Washington DC, 158-179.
- Rashid M.A. (1985) *Geochemistry of marine humic compounds*. Springer Verlag, NY, 300p.
- Raymond P.A., Bauer J.E. (2000) Bacterial consumption of DOC during transport through a temperate estuary. *Aquatic Microbial Ecology*, **22**, 1-12.
- Rivail Da Silva M. (1996) Etudes potentiométriques et fluorimétriques des équilibres acido-basiques et de la complexation avec les métaux de l’obsidien et des substances humiques. Contamination par les métaux des sédiments de l’île de Florianopolis (Brésil). Thèse de l’Université Bordeaux 1, 250p.
- Robert S., Blanc G., Schäfer J., Lavaux G., Abril G. (2004) Metal mobilization in the Gironde Estuary (France) : the role of the soft mud layer in the maximum turbidity zone. *Marine Chemistry*, **87**, 1-13.
- Rochelle-Newall E.J., Fisher T.R., Fan C., Glibert P.M. (1999) Dynamics of chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in experimental mesocosms. *International Journal of Remote Sensing*, **20**, 627-641.
- Rochelle-Newall E.J., Fisher T.R. (2002a) Production of chromophoric dissolved organic matter fluorescence in marine and estuarine environments : an investigation into the role of phytoplankton. *Marine Chemistry*, **77**, 7-21.

- Rochelle-Newall E.J., Fisher T.R. (2002b) Chromophoric dissolved organic matter and dissolved organic carbon in Chesapeake Bay. *Marine Chemistry*, **77**, 23-41.
- Ryan D.K., Weber J.H. (1982) Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Analytical Chemistry*, **54**, 986-990.
- Ryan D.K., Ventry L.S. (1990) Exchange of comments on fluorescence quenching measurements of copper – fulvic acid binding. *Analytical Chemistry*, **62**, 1523-1526.
- Santschi P.H., Guo L., Baskaran M., Trumbore S., Southon J., Bianchi T.S., Honeyman B., Cifuentes L. (1995) Isotopic evidence for contemporary origin of high-molecular weight organic matter in oceanic environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 625-631.
- Santschi P.H., Guo L., Means J.C., Ravichandran M. (1999) Natural organic matter binding of trace metals and trace organic contaminants in estuaries. In : “Biogeochemistry of Gulf of Mexico estuaries”. T.S. Bainchi, J.R. Pennock, R.R. Twilley (Eds.), Wiley, New York, pp347-380.
- Scheunert I., Mansour M., Andreux F. (1992) Binding of organic pollutants to soil organic matter. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **46**, 189-199.
- Schmitt-Kopplin P., Freitag D., Kettrup A. (1999) Capillary electrophoresis studies on Norwegian surface water natural organic matter. *Environment International*, **25**, 259-274.
- Schnitzer M., Khan S.U. (1972) Humic Substances in the environment. Dekker (Ed.), New York, 327p.
- Schulten H.R., Schnitzer M. (1995) Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*, **82**, 487-498.
- Schulten H.R., Leinweber P., Schnitzer M. (1998) Analytical pyrolysis and computer modelling of humic and soil particles. In “Environmental particles: structure and surface reactions of soil particles” P.N. Huang, N. Senesi, J. Buffle (Eds), Wiley, Chichester, England , pp 281-324.
- Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunetti G. (1989) Spectroscopic and compositional comparative characterization of IHSS reference and standard fulvic and humic acids of various origins. *Science of the Total Environment*, **81/82**, 143-156.
- Senesi N. (1990) Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*, **232**, 77-106.
- Senesi N., Miano T.M., Provenzano M.R., Brunetti G. (1991) Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, **152**, 259-271.
- Senesi N. (1992) Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances, *The Science of The Total Environment*, **123/124**, 63-76.

- Seritti A., Morelli E., Nannicini L., Del Vecchio R. (1994) Production of hydrophobic fluorescent organic matter by the marine diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Chemosphere*, **28** (1), 117-129.
- Shapiro M.S. (1957) Chemical and biological studies on the yellow organic acids of lake water. *Limnology and Oceanography*, **2**, 161-174.
- Shaw P.J., Jones R.I., DeHaan H. (1994) Separation of molecular size classes of aquatic humic substances using ultrafiltration and dialysis. *Environmental Technology*, **15**, 765-774.
- Sieburth J.McN. (1969) Studies on algal substances in the sea III : the production of extracellular organic matter by littoral marine algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **3**, 290-309.
- Sieburth J.McN., Jensen A. (1969) Studies on algal substances in the sea II : the formation of Gelbstoff (humic substances) by exsudates of *phaeophyta*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **3**, 275-289.
- Skoog A., Wedborg M., Fogelqvist E. (1996) Photobleaching of fluorescence and the organic carbone in a coastal environment. *Marine Chemistry*, **55**, 33-345.
- Sottolichio A. (1999) Modélisation de la dynamique des structures turbides (bouchon vaseux et crème de vase) dans l'estuaire de la Gironde. Thèse de l'Université Bordeaux 1, 183p.
- Staub C., Buffle J., Haerdi W. (1984) Measurements of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration: influence of various factors on the retention of metals and ligands by neutral and negatively charged membranes. *Analytical Chemistry*, **56**, 2843-2849.
- Stedmon C.A., Markager S., Bro R. (2003) Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, **82**, 239-254.
- Stevens M.S., Perdue E.M. (1990) Isolation of dissolved organic matter from the Suwannee river using reverse osmosis. *Water Research*, **24**, 911-911.
- Stevenson F.J. (1982) *Humus Chemistry*. Wiley (Ed.), New York, 443p.
- Stumm W., Morgan J.J. (1996) *Aquatic Chemistry. Chemical equilibria and rates in natural waters*. Wiley, New York.
- Suffet I.H., MacCarthy P. (Eds.) (1989) *Aquatic Humic Substances*. American Chemical Society.
- Tang D., Warnken K.W., Santschi P.H. (2002) Distribution and partitioning of trace metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) in Galveston Bay waters. *Marine Chemistry*, **78**, 29-45.
- Tanoue E. (1995) Detection of dissolved protein molécules in oceanic water. *Marine Chemistry*. **51**, 239-252.

- Tanoue E., Nishiyama S., Kamo M., Tsugita A. (1995) Bacterial membranes: possible source of a major dissolved protein in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **59**, 2643-2648.
- Texier H., Lafite R., Dupont J.P., Firmin V., Gadel F., Serve L., Charriere B. (1993) Organic matter transport across a macrotidal estuary gradient: the Seine Estuary, France. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, **27** (2-4), 405-413.
- Thouvenin B., Le Hir P., Romaña L.A. (1994) Dissolved oxygen model in the Loire Estuary. Changes in fluxes in estuaries: Implication from science to management, K.R. Dyer, R.J. Orth (Eds.) Academic Press, New York, 169-178pp.
- Thurman E.M., Malcolm R.L., Aiken G.R. (1978) Prediction of capacity factors for aqueous organic solutes adsorbed on a porous acrylic resin. *Analytical Chemistry*, **50**, 775-779.
- Thurman E.M., Malcolm R.L. (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environment Science and Technology*, **15**, 463-466.
- Thurman E.M. (1985) Organic Geochemistry of Natural Waters. M. Nijhoff, W. Junk (Eds.) Dordrecht, NL. 497p.
- Tipping E. (2002) Cation Binding by Humic Substances. Cambridge University Press. 444p.
- Tranvik L.J. (1993) Microbial transformation of labile dissolved organic matter into humic-like matter in seawater. *FEMS Microbiology Ecology*, **12**, 177-183.
- Van Heemst J.D.H., Megens L., Hatcher P.G., De Leeuw J.W. (2000) Nature, Origin and average age of estuarine ultrafiltered dissolved organic matter as determined by molecular and carbon isotope characterization. *Organic Geochemistry*, **31**, 847-857.
- Vo-Dihn T., (1978) Multicomponent analysis by synchronous luminescence spectrometry. *Analytical chemistry*, **50**, 396-401.
- Yamashita Y., Tanoue E. (2003) Chemical characterization of protein-like fluorophores in DOM in relation to aromatic amino acids. *Marine Chemistry*, **82**, 255-271.
- Wells M.L., Smith G.J., Bruland K.W. (2000) The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay, RI. *Marine Chemistry*, **71**, 143-163.
- Wetzel R.G., Hatcher P.G., Bianchi T.S. (1995) Natural photolysis by ultraviolet irradiance of recalcitrant dissolved organic matter to simple substrates for rapid bacterial metabolism. *Limnology and Oceanography*, **40**, 1369-1380.
- Wollast R. (1988) The Scheldt Estuary. "Pollution of the North Sea, an assessment" W. Salomon, B.L. Bayne, E.K. Duursma and U. Förstner (Eds.). Springer-Verlag, 183-193.
- Zafiriou O.C., Jousset-Dubien J., Zepp R.G., Zika R.G. (1984) Photochemistry of natural waters. *Environmental Science and Technology*, **18**, 358-371.
- Zhou J.L., Banks C.J. (1990) Fractionation of humic acid components by ion exchange chromatography. *Environmental Science and Technology*, **24**, 1147-1157.

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** (1), 45-50.

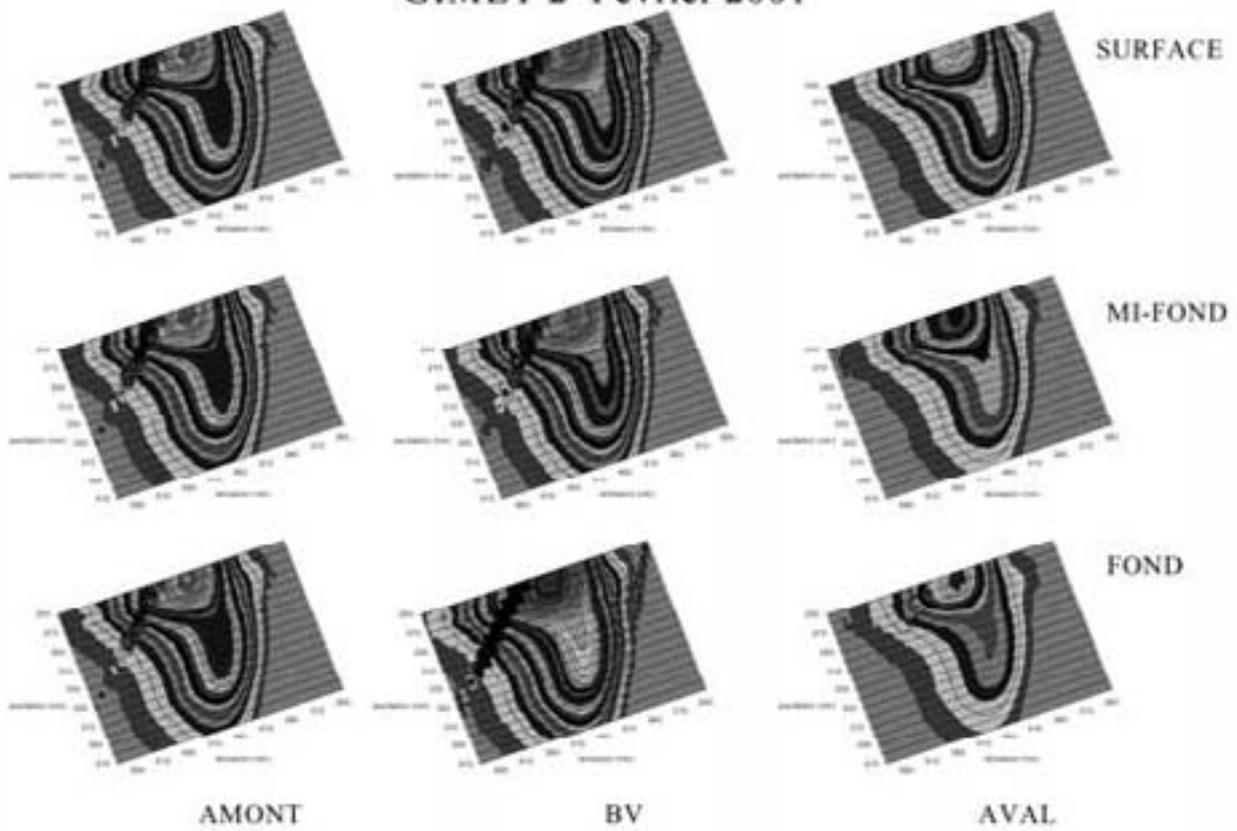
Zsolnay A. (2003) Dissolved organic matter: artefacts, definitions and functions. *Geoderma*, **113**, 187-209.

ANNEXES

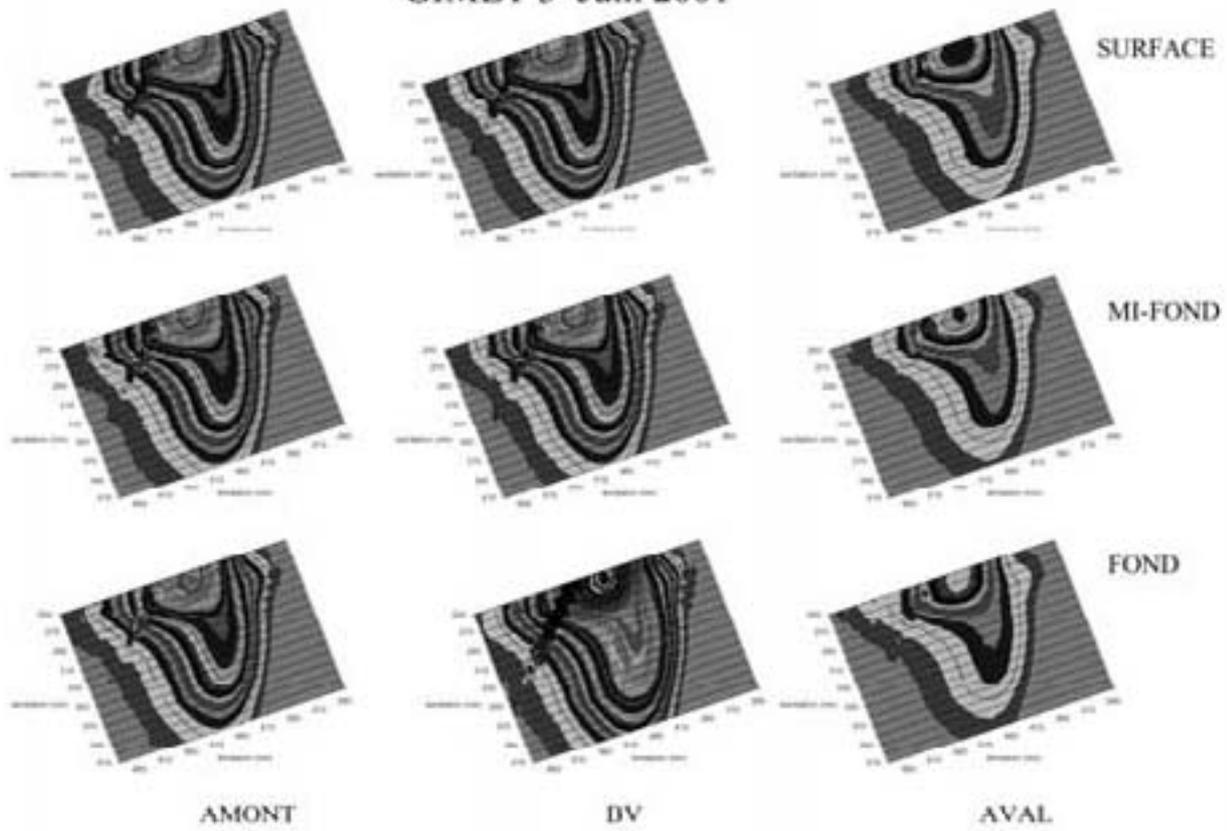
ANNEXE 1

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des échantillons prélevés dans l'estuaire de la Gironde lors des missions GIMET 2, 3 et 4 en février, juin et septembre 2001 respectivement.

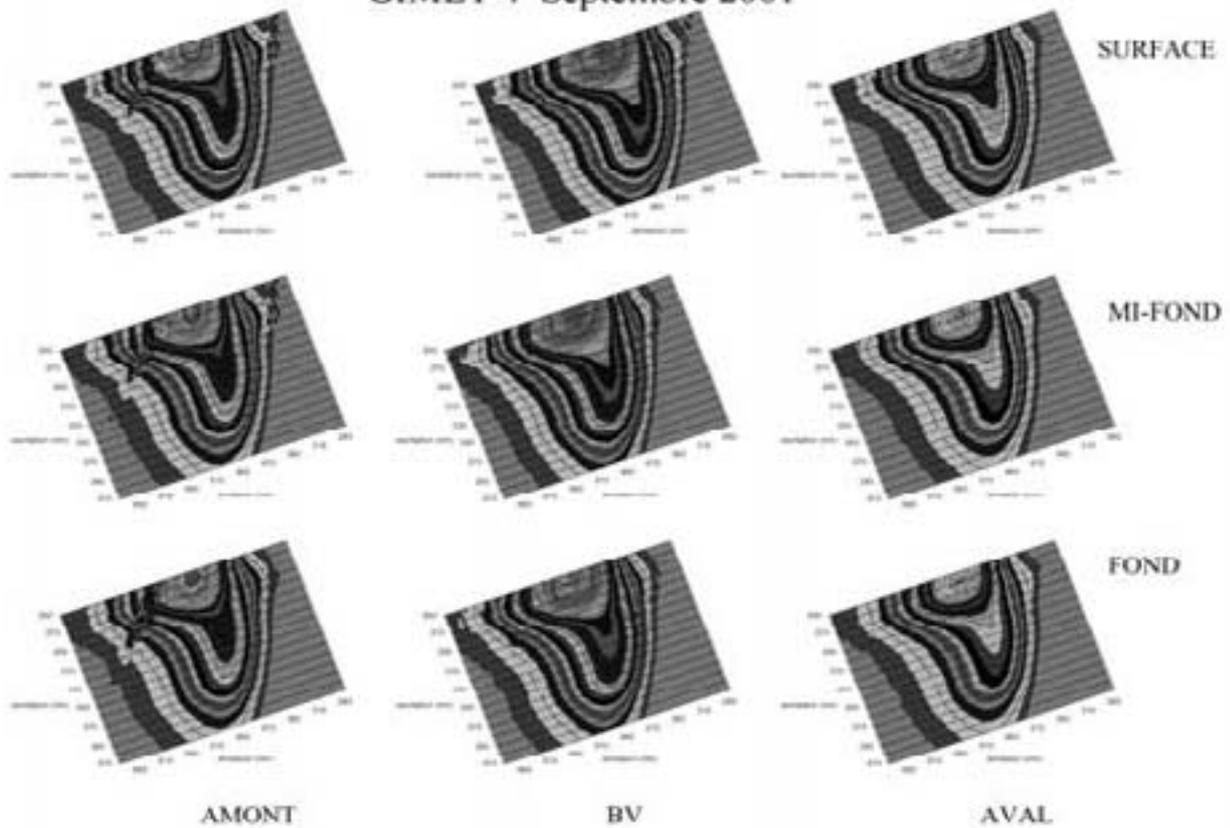
GIMET 2 Février 2001



GIMET 3 Juin 2001



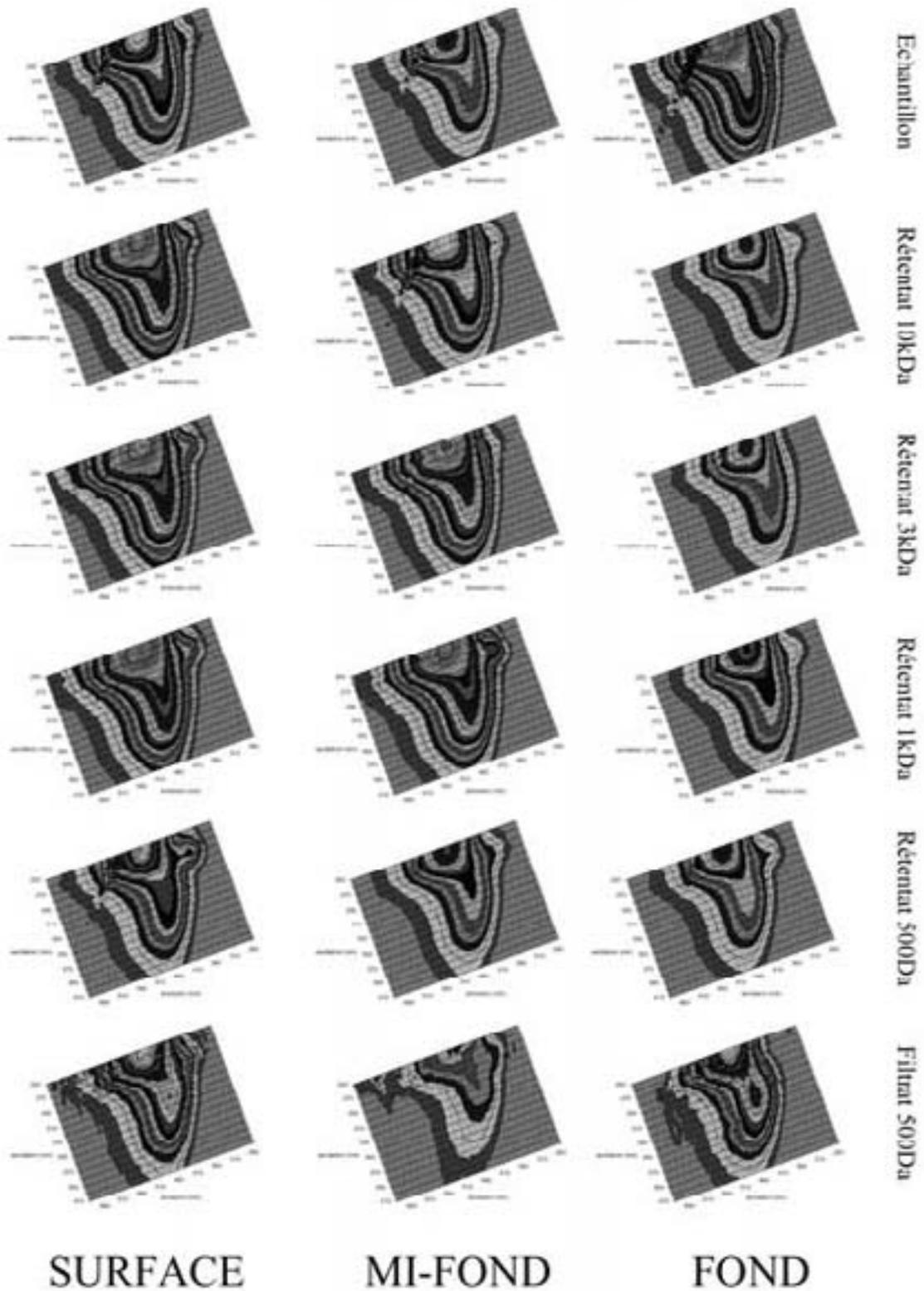
GIMET 4 Septembre 2001



ANNEXE 3

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon Bouchon Vaseux (GIMET 3)

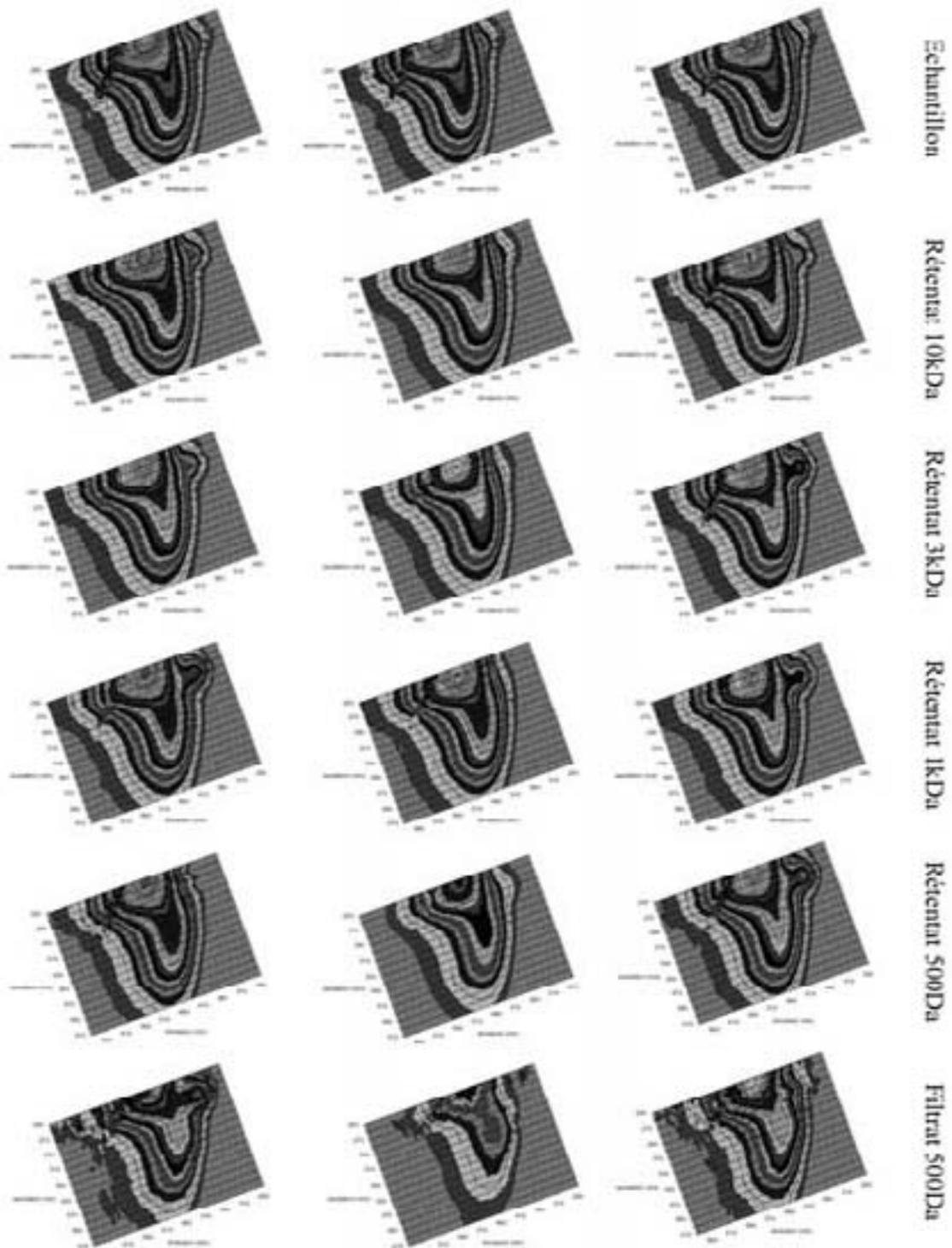
Bouchon Vaseux



ANNEXE 4

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon AMONT (GIMET 3).

AMONT



SURFACE

MI-FOND

FOND

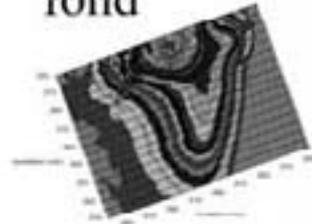
ANNEXE 5

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon AVAL MARIN prélevé dans la Seine durant la mission NUTS1.

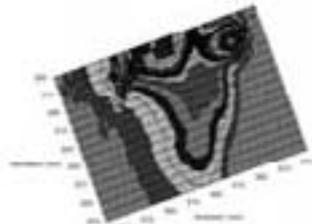
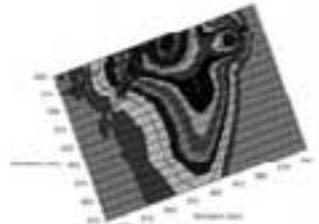
AVAL MARIN

surface

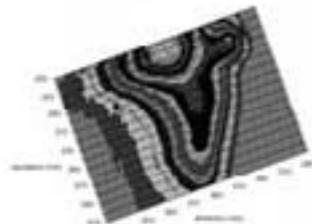
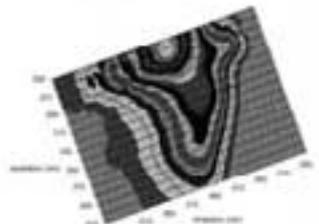
fond



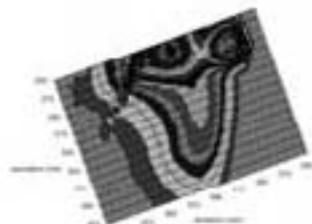
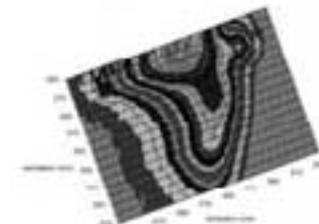
Echantillon



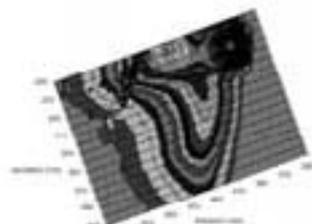
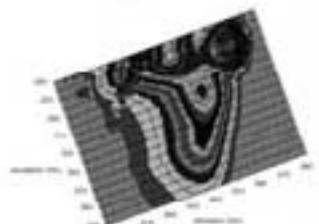
Rétentat 10kDa



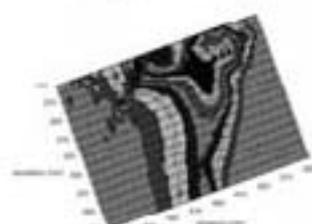
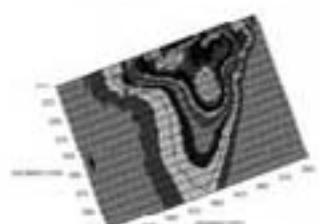
Rétentat 3kDa



Rétentat 1kDa



Rétentat 500Da



Filtrat 500Da

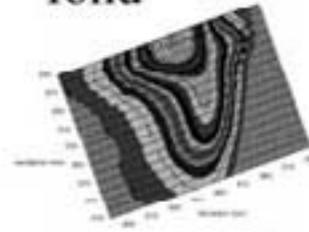
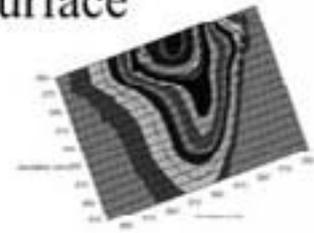
ANNEXE 6

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon AVAL prélevé dans la Seine durant la mission NUTSI.

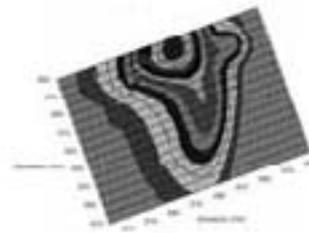
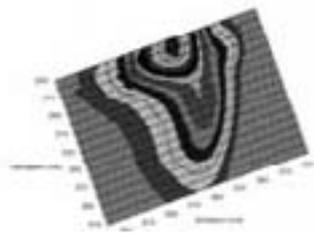
AVAL

surface

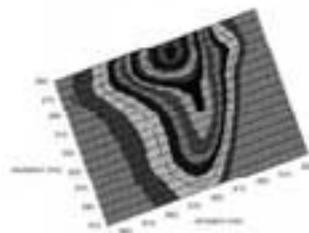
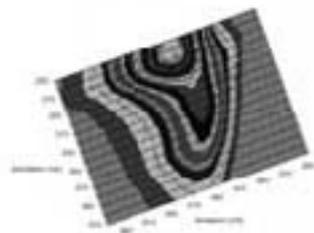
fond



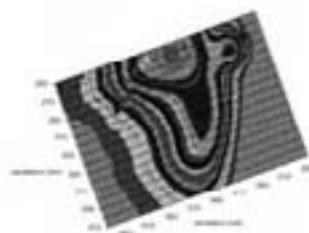
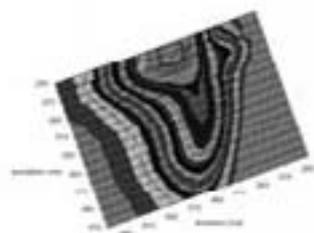
Echantillon



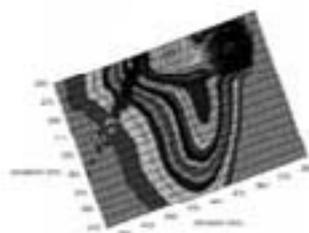
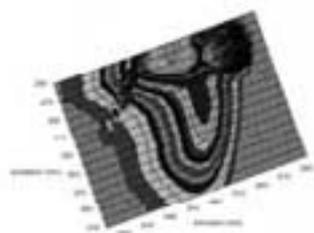
Rétentat 10kDa



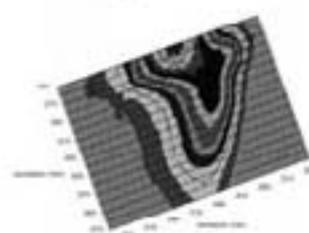
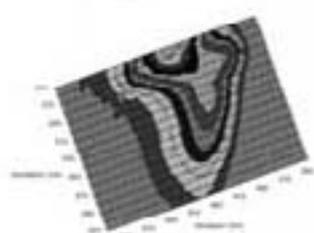
Rétentat 3kDa



Rétentat 1kDa



Rétentat 500Da



Filtrat 500Da

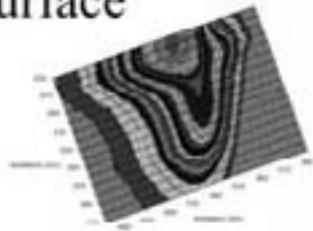
ANNEXE 7

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon AVAL BV prélevé dans la Seine durant la mission NUTS1.

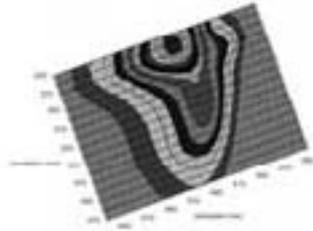
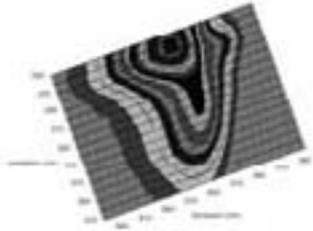
AVAL BV

surface

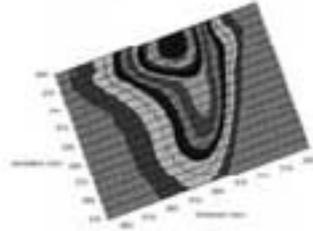
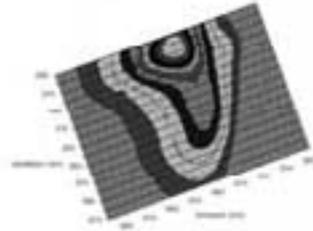
fond



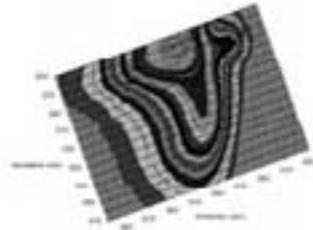
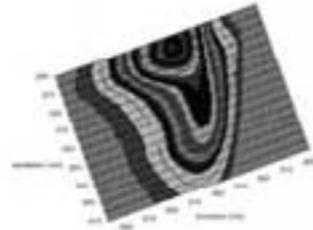
Echantillon



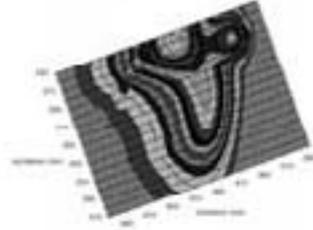
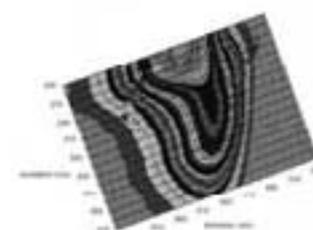
Rétentat 10kDa



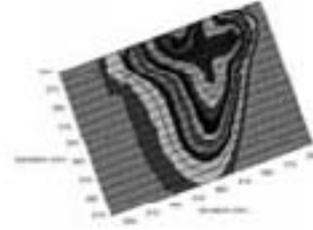
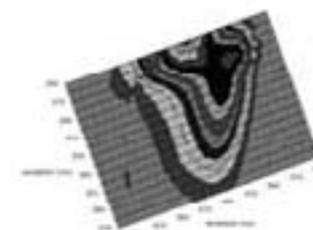
Rétentat 3kDa



Rétentat 1kDa



Rétentat 500Da



Filtrat 500Da

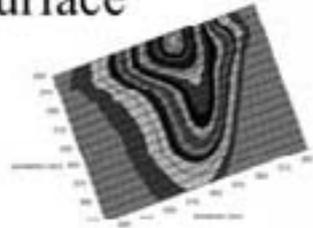
ANNEXE 8

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon AMONT BV prélevé dans la Seine durant la mission NUTS1.

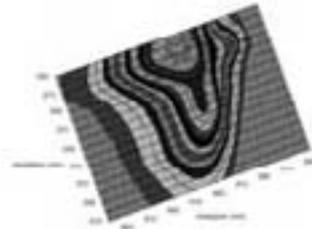
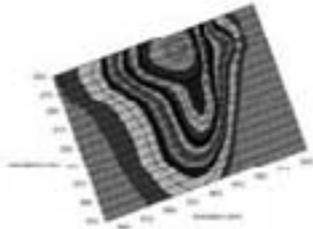
AMONT BV

surface

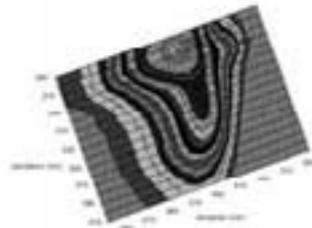
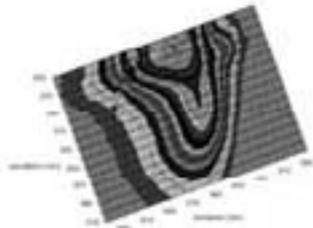
fond



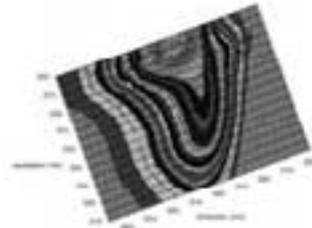
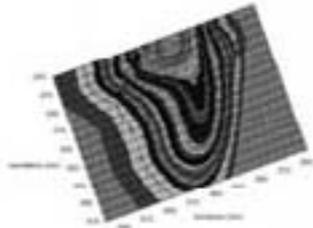
Echantillon



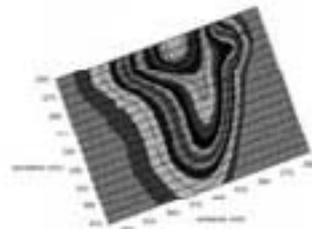
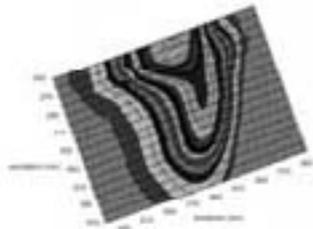
Rétentat 10kDa



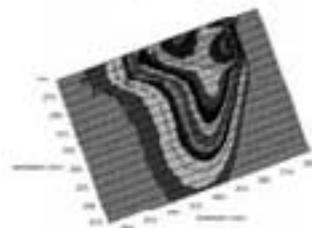
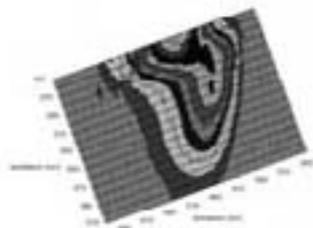
Rétentat 3kDa



Rétentat 1kDa



Rétentat 500Da



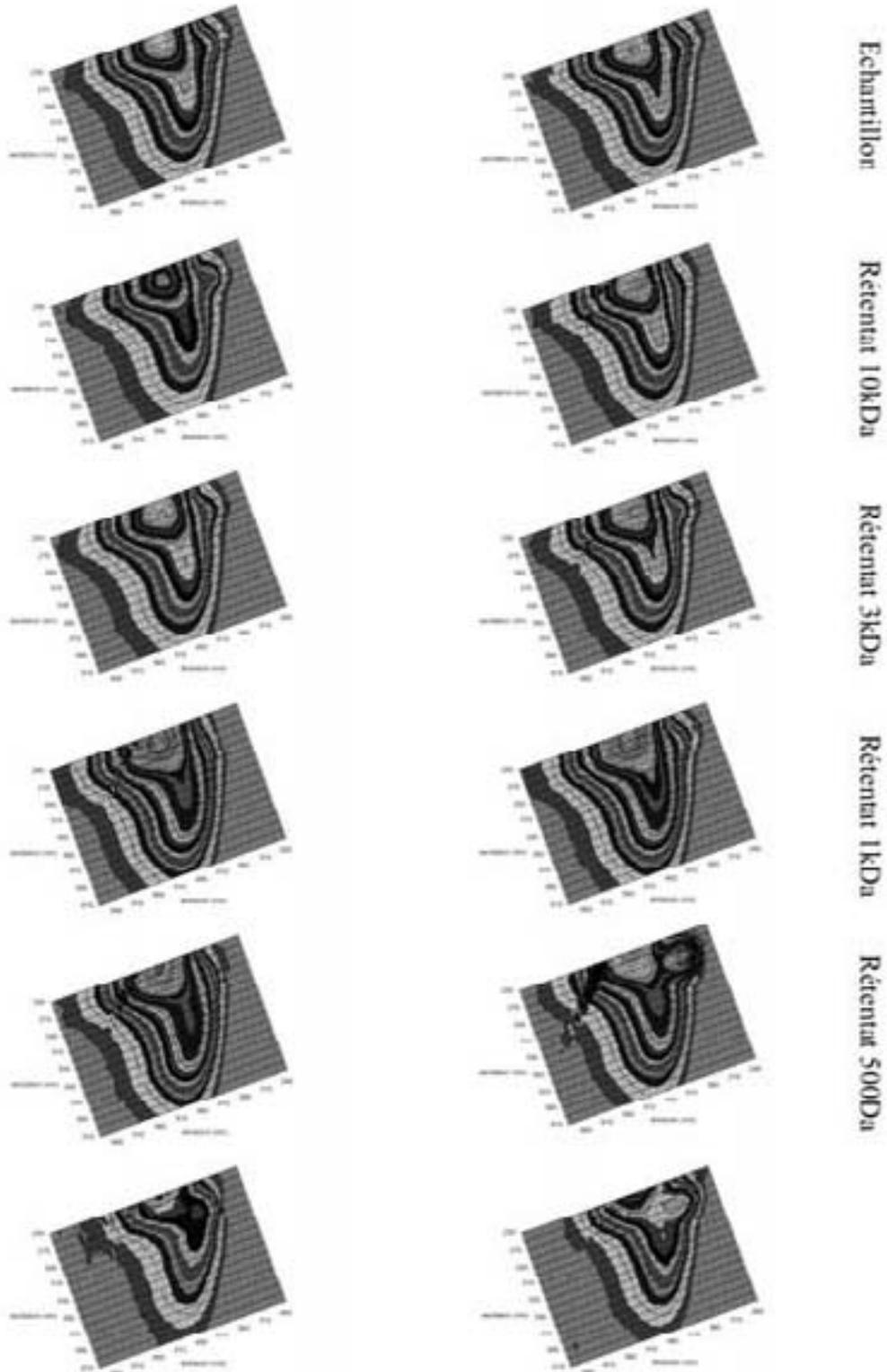
Filtrat 500Da

ANNEXE 9

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration des échantillons BV et AMONT prélevés en surface dans la Seine durant la mission NUTS1.

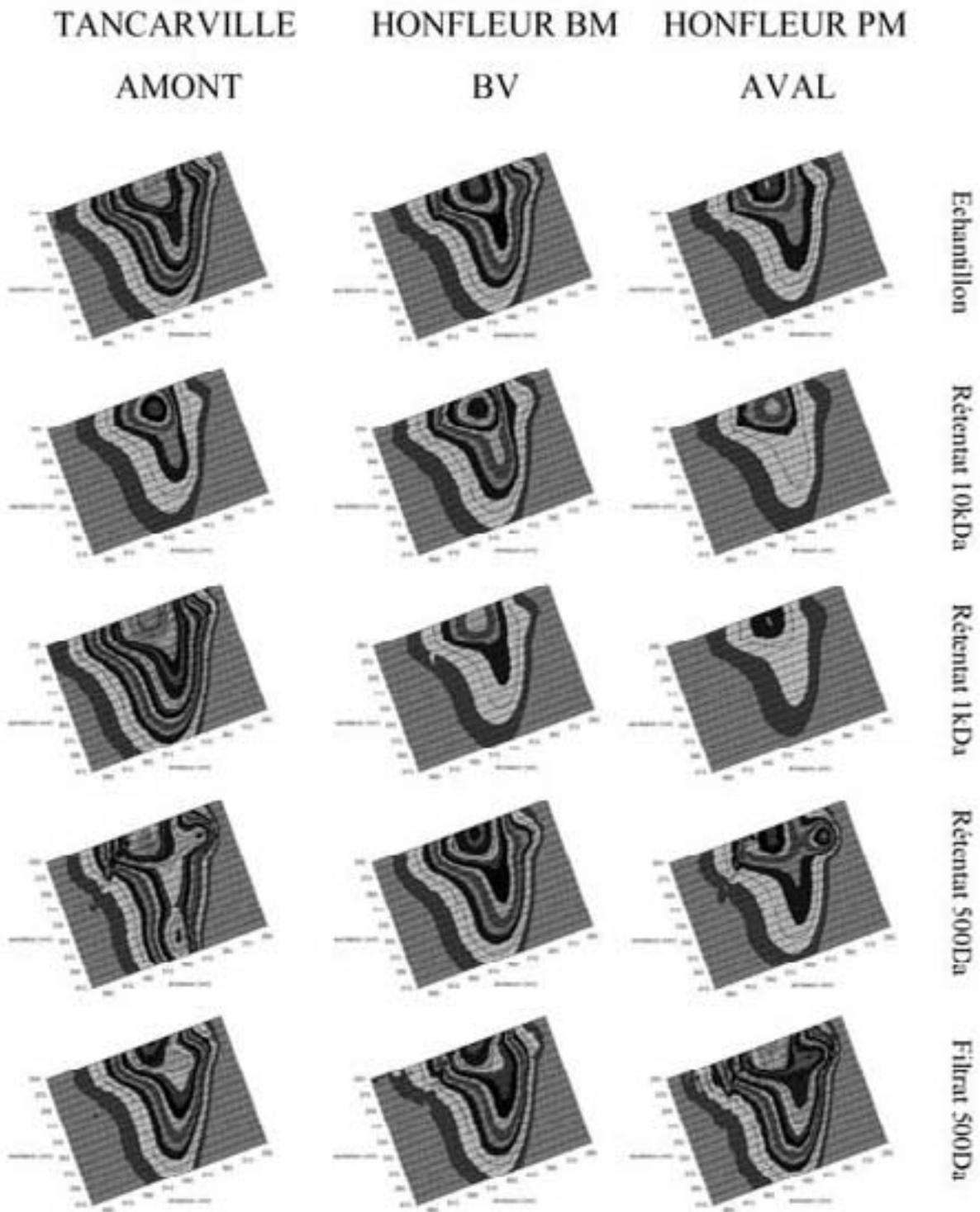
BV surface

AMONT surface



ANNEXE 10

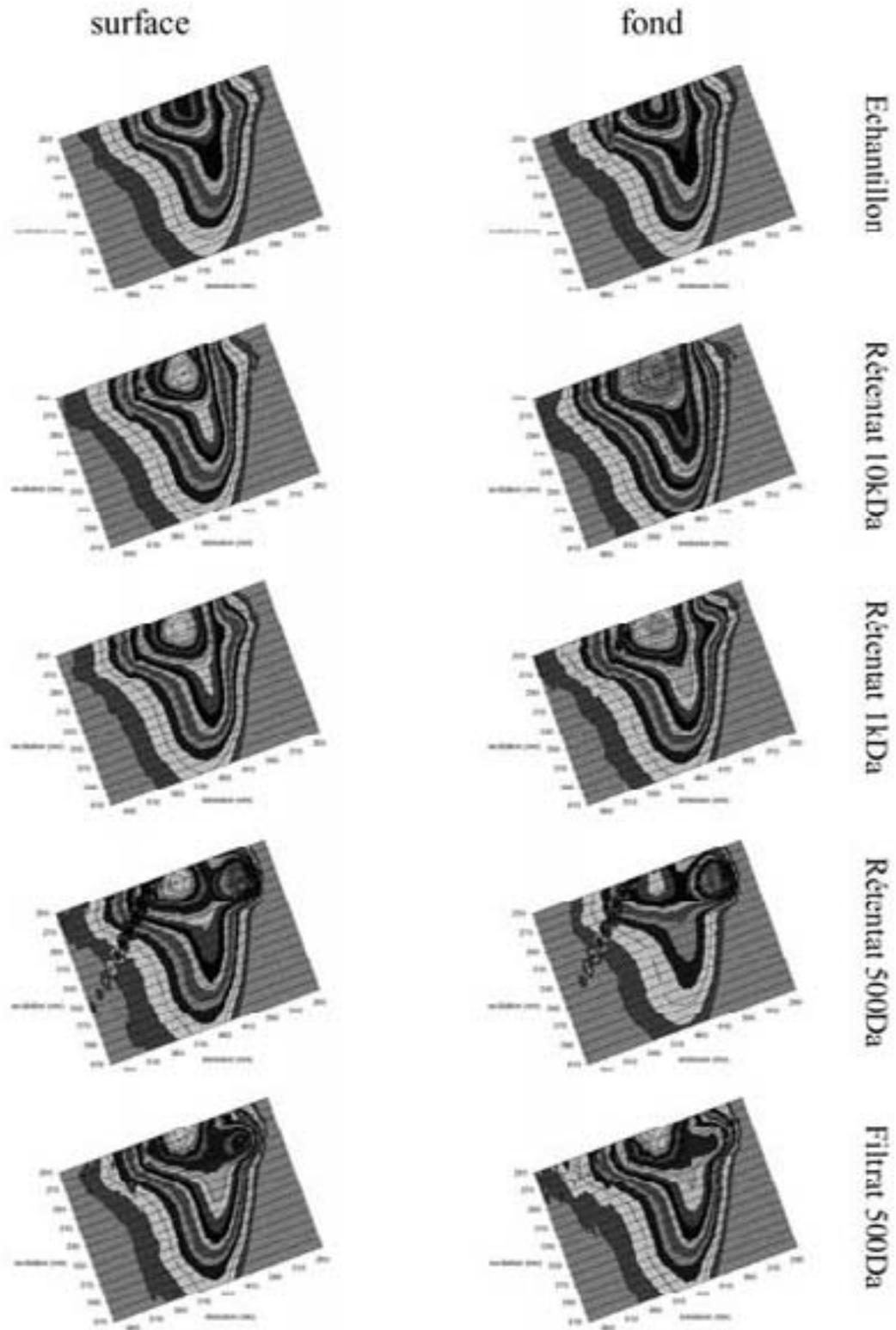
Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration des échantillons prélevés dans la Seine durant la mission de juillet 2002.



ANNEXE 11

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon T1 (étale PM) prélevé dans la Seine lors de la mission NUTS2.

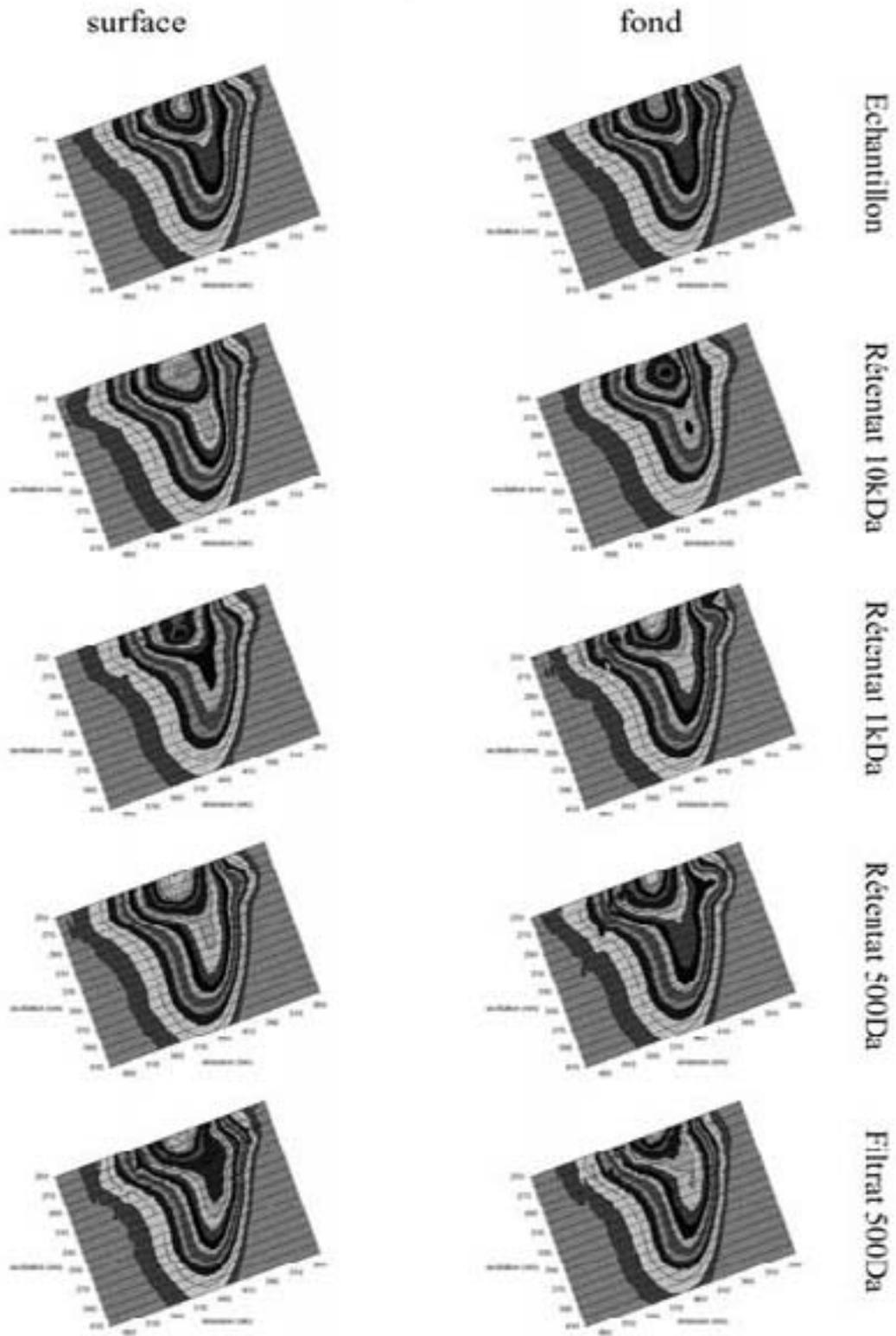
T1 étale PM



ANNEXE 12

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon T3 (jusant 2) prélevé dans la Seine lors de la mission NUTS2.

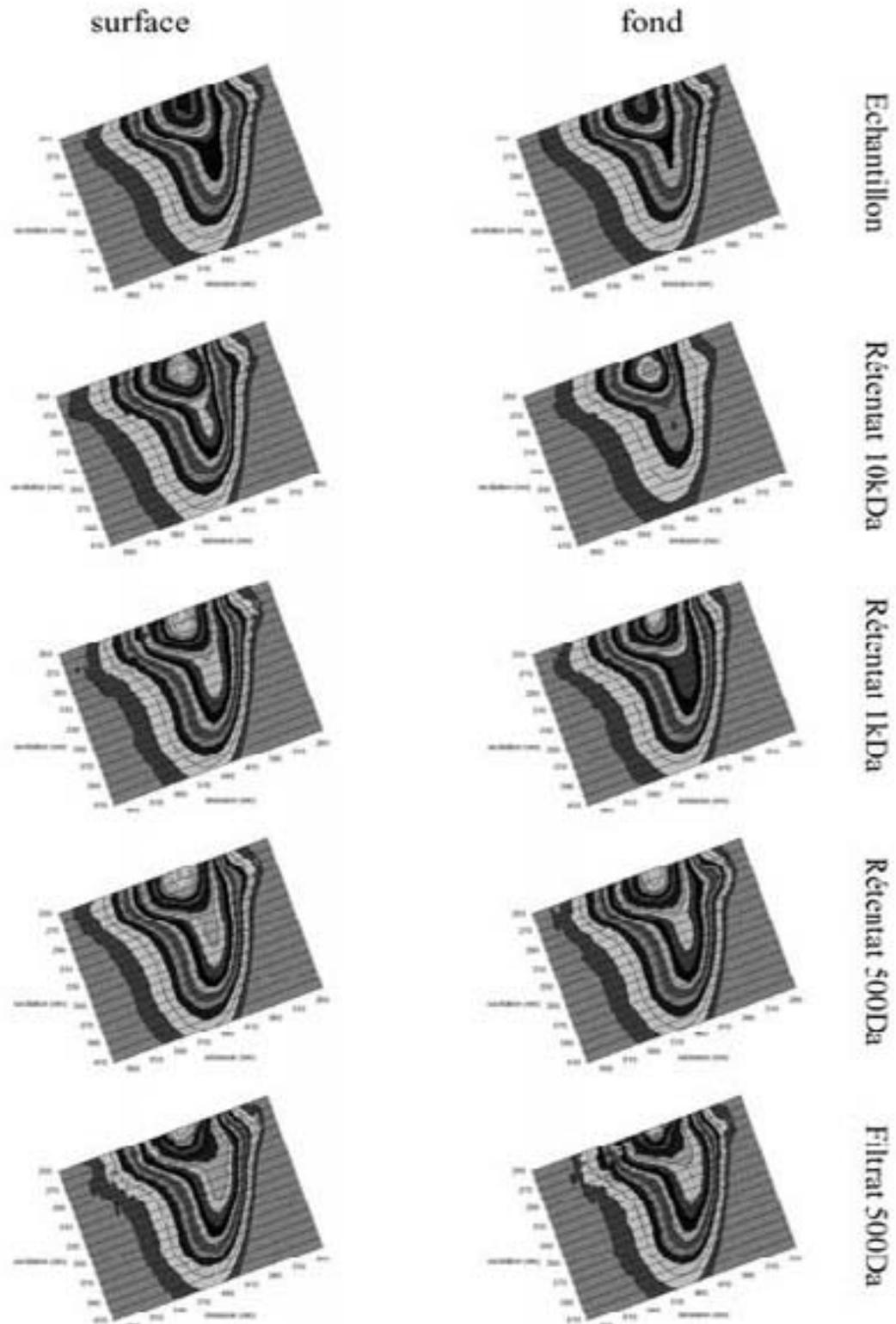
T3 jusant 2



ANNEXE 13

Projections dans le plan des spectres de fluorescence 3D des fractions d'ultrafiltration de l'échantillon T5 (flot) prélevé dans la Seine lors de la mission NUTS2.

T5 flot



ANNEXE 15

Paramètres relatifs aux échantillons prélevés lors des missions dans l'estuaire de la **SEINE**

Mission **NUTS 02** (août 2001) POINT FIXE

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP %
18/09/02	T1S	Bouée 18	17,4	2	18,5	2,95
18/09/02	T2S	Bouée 18	12,8	2,25	134	2,30
18/09/02	T3S	Bouée 18	7	2,4	445	3,30
18/09/02	T4S	Bouée 18	3,3	2,15	75,6	2,95
18/09/02	T5S	Bouée 18	10,1	2,1	77,6	2,90
18/09/02	T6S	Bouée 18	17,4	1,8	69,4	2,90
18/09/02	T1M	Bouée 18	21,5	1,8	-	-
18/09/02	T2M	Bouée 18	16,4	2,3	-	-
18/09/02	T3M	Bouée 18	7,2	2,45	-	-
18/09/02	T4M	Bouée 18	3,8	2,6	-	-
18/09/02	T5M	Bouée 18	12,3	2,15	-	-
18/09/02	T6M	Bouée 18	19,6	1,7	-	-
18/09/02	T1F	Bouée 18	23,8	1,85	14,1	3,45
18/09/02	T2F	Bouée 18	18,7	2,1	275	2,85
18/09/02	T3F	Bouée 18	7,4	2,7	475	2,85
18/09/02	T4F	Bouée 18	4,5	2,65	600	3,40
18/09/02	T5F	Bouée 18	12,6	2,1	1800	2,85
18/09/02	T6F	Bouée 18	20,2	2	200	2,80

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : F ; à mi-profondeur : M et en surface : S

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC 5805 Université Bordeaux 1)

Mission **NUTS 02** (septembre 2002) TRANSECT

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP %
16/09/02	tr15s	g.sal.	32	1,85	6,1	5,70
16/09/02	tr1s	g.sal.	30,2	1,25	10,0	2,85
16/09/02	tr2s	g.sal.	27,5	1,90	10,8	3,20
16/09/02	tr3s	g.sal.	22,2	1,60	18,5	2,45
16/09/02	tr14s	g.sal.	18,3	1,50	14,1	3,50
16/09/02	tr4s	g.sal.	16,1	2,70	15,3	3,55
16/09/02	tr5s	g.sal.	13,4	1,90	16,4	3,30
16/09/02	tr7s	g.sal.	11,1	2,50	19,0	3,15
16/09/02	tr13s	g.sal.	8,4	2,00	16,1	3,30
16/09/02	tr9s	g.sal.	5	3,05	20,8	3,35
16/09/02	tr10s	g.sal.	4	2,05	27,7	2,70
16/09/02	tr11s	g.sal.	2,1	2,20	28,7	3,30
16/09/02	tr12s	g.sal.	0,6	2,35	27,9	4,05
16/09/02	tr16s	Caudebec	0	3,2	7,0	7,75

échantillonnage en surface : s /g.sal. : Prélèvements effectués dans le gradient de salinité

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC 5805 Université Bordeaux 1)

Mission **NUTS 01** (août 2001) TRANSECT BASSE MER

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
08/08/01	B1s	PK385	32	1,60	8,1	2,85
08/08/01	B1f	PK385	32,1	2,05	-	-
08/08/01	B2s	PK374	24	2,15	37,4	5,15
08/08/01	B2f	PK374	26,6	-	-	-
08/08/01	B3s	PK374	18,8	2,00	125	3,85
08/08/01	B3f	PK374	18,6	2,35	-	-
08/08/01	B4s	PK370	15	2,15	179	3,85
08/08/01	B4f	PK370	21,3	2,85	-	-
08/08/01	B5s	PK370	14	2,20	382,5	3,15
08/08/01	B7s	PK354	9,5	2,50	-	-
08/08/01	B7f	PK354	15,2	9,45	190	4,05
08/08/01	B8s	PK355	5,1	2,55	-	-
08/08/01	B8f	PK355	5,1	6,65	128	3,65
08/08/01	B9s	PK355	4,3	2,35	860	3,75
08/08/01	B10s	PK355	3,1	2,30	895	3,60
08/08/01	B11s	PK355	1,9	2,70	319	4,00
08/08/01	B12s	PK345	1,1	4,15	130,35	5,05
08/08/01	B13s	PK330	0,1	2,75	75,1	4,55
08/08/01	B13f	PK330	0,1	8,75	-	-
08/08/01	B16s	PK310	0	2,8	42,8	4,85

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f ; en surface : s

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC 5805 Université Bordeaux 1)

Mission **NUTS 01** (août 2001) TRANSECT PLEINE MER

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
06/08/01	P1s	PK364	31,4	1,40	6,6	10,90
06/08/01	P1f	PK364	32,1	3,35	-	-
06/08/01	P2s	PK359	26,3	-	47,7	4,00
06/08/01	P2f	PK359	27,1	4,4	-	-
06/08/01	P3s	PK350	20,7	2,9	39,2	4,80
06/08/01	P3f	PK350	15,8	-	-	-
06/08/01	P4s	PK350	15,0	1,90	48,1	6,15
06/08/01	P4f	PK350	15,6	4,60	-	-
06/08/01	P6s	PK350	12,9	2,00	37,6	3,65
06/08/01	P7s	PK347	8,5	2,45	35,6	5,80
06/08/01	P7f	PK347	11,5	3,90	-	-
06/08/01	P8s	PK346	4,2	3,70	34,4	7,75
06/08/01	P8f	PK346	7,9	-	-	-
06/08/01	P9s	PK345	3,7	3,20	37,5	4,80
06/08/01	P10s	PK344	2,5	2,65	36,1	5,00
06/08/01	P11s	PK343	1,2	3,05	36,7	5,05
06/08/01	P12s	PK341	0,5	2,50	53,3	4,40
06/08/01	P13s	PK330	0,1	2,95	46,7	4,55
06/08/01	P13f	PK330	0,1	-	-	-
06/08/01	P16s	PK310	0,0	2,75	19,5	6,50

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f ; en surface : s

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC-DGO 5805 Université Bordeaux 1)

Mission **NUTS 01** (août 2001) POINT FIXE (TANCARVILLE)

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
10/08/01	T1S	Tancarville	0,9	7,55	112,0	4,20
10/08/01	T1F	Tancarville	0,9	2,55	1315,0	3,45
10/08/01	T2S	Tancarville	0,1	2,85	64,0	4,40
10/08/01	T2F	Tancarville	0,1	3,75	430,0	3,65
10/08/01	T3S	Tancarville	0,1	6,10	510,0	3,15
10/08/01	T3F	Tancarville	0,1	12,10	46,2	4,90
10/08/01	T4S	Tancarville	0,1	10,35	74,0	4,45
10/08/01	T4F	Tancarville	0,4	17,40	335,0	4,15
10/08/01	T5S	Tancarville	4,4	12,10	81,3	4,55
10/08/01	T5F	Tancarville	6,3	9,90	149,0	4,45
10/08/01	T6S	Tancarville	4,4	7,30	37,3	4,60
10/08/01	T6F	Tancarville	9,6	4,60	53,4	4,65
10/08/01	T7S	Tancarville	1,7	12,70	65,1	4,15
10/08/01	T7F	Tancarville	4,0	6,55	285,0	3,90

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f ; en surface : s

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC-DGO 5805 Université Bordeaux 1)

Mission **VASTEDEBA 4** (avril-mai 2001)

date	échantillon	Position		salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
29/04/01	VD4-1S	49°29,320N	0°08,280 W	30,7	7,05	0,2	19,00
29/04/01	VD4-2S	49°28,269N	0°03,808 W	27,4	4,30	1,5	23,50
29/04/01	VD4-3S	49°28,320N	0°03,740 W	22,2	2,05	2,0	20,00
29/04/01	VD4-5S	49°28,108N	0°01,791 W	19,1	8,65	7,0	6,35
29/04/01	VD4-6S	49°27,713N	0°00,330 W	18,1	2,15	12,8	4,80
29/04/01	VD4-7S	49°25,967N	0°08,830 E	15,7	7,85	116,1	3,80
29/04/01	VD4-8S	49°26,988N	0°07,391 E	13,3	3,40	74,9	3,80
29/04/01	VD4-9S	49°26,995N	0°07,998 E	8,6	11,25	109,0	3,65
29/04/01	VD4-10S	49°26,064N	0°06,112 E	5,5	8,55	148,4	3,50
29/04/01	VD4-12S	19°25,951N	0°09,370 E	1,1	8,35	64,0	4,05
29/04/01	VD4-14S	49°25,790N	0°15,360 E	0,3	7,25	38,3	4,10
30/04/01	VD4-15S	49°25,750N	1°01,650 E	0	6,85	17,5	5,75
30/04/01	VD4-16S	49°25,010N	1°01,091 E	0	3,60	17,9	6,30
30/04/01	VD4-17S	49°23,710N	1°00,688 E	0	3,90	27,3	5,70
30/04/01	VD4-18S	49°22,313N	1°00,162 E	0	6,60	22,7	5,80
30/04/01	VD4-19S	49°21,157N	0°58,460 E	0	3,8	26,3	5,35
30/05/01	VD4-20S	49°21,933N	0°55,135 E	0	3,9	25,0	5,25
01/05/01	VD4-21Ss	49°25,864N	0°16,514E	3,5	5,65	12,1	5,65
01/05/01	VD4-21Smf	49°25,864N	0°16,514E	10	3,55	18,5	5,40
01/05/01	VD4-21Sf	49°25,864N	0°16,514E	16,4	5,75	16,3	7,20
01/05/01	VD4-33Ss	49°26,829N	0°01,233 E	20,2	2,35	47,2	3,30
01/05/01	VD4-33Smf	49°26,829N	0°01,233 E	-	1,95	56,5	3,05
01/05/01	VD4-33Sf	49°26,829N	0°01,233 E	29,6	2,30	43,4	4,05
01/05/01	VD4-34Fs	49°26,614N	0°00,522 E	21,8	6,45	8,2	4,80
01/05/01	VD4-34Fmf	49°26,614N	0°00,522 E	-	1,85	7,2	6,05
01/05/01	VD4-34Ff	49°26,614N	0°00,522 E	30,4	1,95	13,0	4,65

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f ; à mi-profondeur : mf et en surface : s
Données MES, COD, COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC 5805 Université Bordeaux 1)

Mission de **Janvier 2001**

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES	COP%
17/01/01	Station 1s	Bouée19-20	12,0	4,90	44,0	3,35
17/01/01	Station 2s	Bouée18-17	20,9	2,80	44,4	3,35
17/01/01	Station 3s	Bouée14	19,8	2,40	22,5	3,45
17/01/01	Station 4s	Bouée10	25,2	2,75	21,8	3,55
17/01/01	Station 5s	Bouée22	8,9	4,60	29,7	4,95
17/01/01	Station 6s	Bouée24	3,4	4,70	33,3	3,85
17/01/01	Station 6f	Bouée24	19,1	-	53,7	3,45
17/01/01	Station 7s	Bouée30	0,7	-	28,6	3,95
17/01/01	Station 8s	Caudebec	0	5,20	28,0	5,35
17/01/01	Station 9s	Port Jérôme	0	5,75	44,1	4,70

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f mf et en surface : s
Données MES, COD, COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC 5805 Université Bordeaux 1)

Paramètres relatifs aux échantillons prélevés lors de la mission GIROX 1 dans l'estuaire de la **GIRONDE**

Mission **GIROX 1** (février 2002)

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
16/02/02	GX1f	PK0	0,2	2,8	2025	1,60
16/02/02	GX2s	PK5	0,4	2,2	589	1,20
16/02/02	GX4s	PK15	0,8	2,2	608	1,35
16/02/02	GX4f	PK15	0,7	1,85	414	1,30
16/02/02	GX7s	PK30	2,9	1,9	443	1,95
16/02/02	GX10s	PK45	3,1	2,1	263	1,45
16/02/02	GX12s	PK55	4,2	2,45	882	1,45
16/02/02	GX13s	PK65	5,2	1,9	202	1,60
16/02/02	GX14s	PK70	7,0	1,9	1314	1,55
16/02/02	GX15s	PK75	9,0	1,55	540	1,55
17/02/02	GX16s	PK80	13,5	1,5	108,2	1,50
17/02/02	GX17s	g.sal.	16,4	1,35	63,6	2,10
17/02/02	GX18s	g.sal.	24,0	1,5	42,3	2,70
17/02/02	GX18f	g.sal.	27,1	1,55	188,1	1,10
17/02/02	GX19s	g.sal.	28,0	1,2	55,1	2,15
17/02/02	GX19f	g.sal.	29,0	1,00	78,1	2,15
17/02/02	GX20s	g.sal.	30,3	1,05	72,2	0,96
17/02/02	GX20f	g.sal.	31,8	0,95	85,8	2,25
17/02/02	GX21s	g.sal.	33,8	1	24,0	2,40
17/02/02	GX21f	g.sal.	34,5	0,95	4,0	5,05
17/02/02	GX22s	g.sal.	31,7	1,4	34,9	1,90
17/02/02	GX22f	g.sal.	32,4	0,95	53,4	2,30
17/02/02	GX23s	g.sal.	25,4	1,1	50,7	2,70
17/02/02	GX23f	g.sal.	28,0	1,20	156,0	2,16
17/02/02	GX24s	g.sal.	20,5	1,3	37,0	2,25
17/02/02	GX24f	g.sal.	25,3	1,15	74,1	1,75

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f ; en surface : s

g.sal. : Prélèvements effectués dans le gradient de salinité.

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC-DGO 5805 Université Bordeaux 1)

Paramètres relatifs aux échantillons prélevés lors de la mission GIROX 2 dans l'estuaire de la **GIRONDE**

Mission **GIROX 2** (septembre 2002)

date	échantillon	Position	Salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
09/09/02	St1s	g.sal.	33,0	1,05	27,4	2,65
09/09/02	St3s	g.sal.	31,5	1	55	2,25
09/09/02	St5s	g.sal.	28,9	1,15	110	2,45
09/09/02	St7s	g.sal.	25,9	1,2	137	2,20
09/09/02	St9s	PK80	24,0	1,25	405	1,55
09/09/02	St12s	g.sal.	21,0	1,5	440	1,55
09/09/02	St13s	g.sal.	17,6	1,5	235	1,75
09/09/02	St15s	g.sal.	15,0	1,85	460	1,55
09/09/02	St16s	g.sal.	12,7	1,6	440	1,50
09/09/02	St17s	PK67	9,9	1,55	610	1,45
09/09/02	St18s	g.sal.	7,4	1,45	440	1,45
09/09/02	St19s	g.sal.	5,4	1,5	590	1,50
10/09/02	St20s	g.sal.	4,5	1,5	980	1,50
10/09/02	St21s	g.sal.	4,1	1,45	1300	1,45
10/09/02	St22s	g.sal.	2,6	1,4	1600	1,45
10/09/02	St23s	PK45	2,1	1,55	1050	1,50
10/09/02	St24s	PK30	1,3	1,45	1350	1,50
10/09/02	St25s	PK15	0,8	1,8	1750	1,45
10/09/02	St26s	PK7	0,6	1,5	1700	1,35
10/09/02	St27s	PK0	0,5	1,4	2250	1,50
09/09/02	St9f	PK80	25,3	1,20	-	-
09/09/02	St17f	PK67	9,7	1,50	-	-
10/09/02	St20f	g.sal.	4,3	1,50	-	-
10/09/02	St21f	g.sal.	3,1	1,65	-	-
10/09/02	St22f	g.sal.	2,8	1,40	-	-
10/09/02	St23f	PK45	2,0	1,55	-	-
10/09/02	St24f	PK30	1,2	1,45	-	-

échantillonnage au fond de la colonne d'eau : f ; en surface : s

g.sal. : Prélèvements effectués dans le gradient de salinité.

Données MES et COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC-DGO 5805 Université Bordeaux 1)

Paramètres relatifs aux échantillons prélevés lors des missions GIMET 3 et 4 dans l'estuaire de la **GIRONDE**

Mission **GIMET 3** (juin 2001)

date	échantillon	Position	salinité	COD (mg/L)	MES	COP%
21/06/01	Amont surface	PK30	0,1	2,00	122	1,85
21/06/01	Amont milieu	PK30	0,1	2,05	419	1,90
21/06/01	Amont fond	PK30	0,1	2,35	862	1,90
21/06/01	BV surface	PK48	3,5	2,65	159	1,85
21/06/01	BV milieu	PK48	3,2	3,60	600	1,80
21/06/01	BV fond	PK48	3,4	6,50	6035	1,65
20/06/01	Aval surface	PK80	18,2	2,10	98	0,97
20/06/01	Aval milieu	PK80	24,6	2,05	247	1,25
20/06/01	Aval fond	PK80	26,3	1,80	322	0,88

Mission **GIMET 4** (septembre 2001)

date	échantillon	position	salinité	COD (mg/L)	MES (mg/L)	COP%
09/09/01	Amont surface	PK35	0,2	1,80	495	1,65
09/09/01	Amont milieu	PK35	0,2	1,75	1120	1,75
09/09/01	Amont fond	PK35	0,2	2,10	4280	1,85
09/09/01	BV surface	PK45	2,8	1,75	1400	1,75
09/09/01	BV milieu	PK45	2,6	1,85	1560	1,75
09/09/01	BV fond	PK45	2,6	1,95	5880	1,70
09/09/01	Aval surface	PK80	24,0	1,65	101	2,40
09/09/01	Aval milieu	PK80	24,0	1,65	330	1,80
09/09/01	Aval fond	PK80	26,0	1,60	705	1,80

Données MES, COD, COP : H. ETCHEBER (UMR EPOC 5805 Université Bordeaux 1)

Résumé

La matière organique dissoute (MOD) est constituée d'un mélange complexe de macromolécules qui interviennent dans de nombreuses réactions physiques, chimiques et biologiques dans les systèmes aquatiques et sont susceptibles d'influencer le transport et la biodisponibilité des polluants.

La compréhension des mécanismes de dispersion des polluants nécessite donc une meilleure connaissance de la nature et de l'évolution de la MOD, en particulier au niveau des estuaires qui constituent des zones tampons entre les continents et les océans.

L'objectif de ce travail est de mieux appréhender les caractéristiques de la MOD dans les systèmes estuariens au travers de l'étude comparée des estuaires de la Seine et de la Gironde par spectroscopie de fluorescence.

L'analyse fluorimétrique des échantillons estuariens permet de distinguer les substances humiques du matériel provenant de la dégradation récente des organismes vivants (algues, phytoplancton...). L'application de cette technique aux deux estuaires met en évidence des différences de caractéristiques de la MOD en fonction des paramètres environnementaux (salinité, bouchon vaseux).

La MOD de la Seine présente des variations saisonnières marquées par de très fortes concentrations en carbone organique dissous (COD) et en composés humiques en hiver et par des zones de production de matériel fluorescent autochtone en amont et en aval du bouchon vaseux en été. La MOD de la Gironde présente un caractère humique dominant lié à une très forte turbidité tout au long de l'année jusqu'à la salinité 25 au delà de laquelle se trouve une zone de production biologique intense. Le fractionnement de la MOD par ultrafiltration tangentielle permet de mieux distinguer les fluorophores et montre des modifications de la distribution en taille des macromolécules dans le bouchon vaseux des deux estuaires.

Le phytoplancton est une source importante de COD dans les eaux naturelles. L'étude par fluorimétrie des apports de matériel organique vers la phase dissoute par la dégradation de cellules phytoplanctoniques montre le rôle important du bouchon vaseux et des communautés bactériennes sur la production de MOD fluorescente.

Le dosage des métaux traces dans les fractions colloïdales et dissoute permet d'appréhender l'évolution le long de l'estuaire de la Gironde du rôle des macromolécules organiques sur la complexation des métaux. L'étude par extinction de fluorescence de la complexation du cuivre par la MOD montre plus particulièrement l'importance de composés de petite taille d'origine protéique ou bactérienne sur cette complexation.

Mots clés: Matière Organique Dissoute • Estuaire • Substances Humiques • Fluorescence • Ultrafiltration Tangentielle • Propriétés Complexantes • Métaux

Abstract

Dissolved organic matter (DOM) consists of a mixture of macromolecular compounds with wide ranging chemical properties and diverse origins. It participates in many physical, chemical and biological reactions in aquatic systems and has been reported to affect the transport and fate of pollutants in the environment. The processes affecting DOM through estuaries are of major importance for a better understanding of its influence on regulating the estuarine behaviour of contaminants.

The aim of this work was to apply fluorescence spectroscopy for the study of the Gironde and Seine estuaries in order to investigate the evolution of DOM properties during estuarine mixing. Fluorescence spectroscopy enables to distinguish humic substances from recent biological organic compounds in estuarine water samples.

Fluorescent DOM exhibited specific trends in the Gironde and Seine estuaries depending on environmental parameters (salinity, maximum turbidity zone MTZ). Seasonal variations of DOM were observed in the Seine estuary where higher contents of humic substances and dissolved organic carbon (DOC) were found during the winter season while fluorescent biological organic material was produced upstream and downstream of the MTZ during the summer. Humic substances represented the major fraction of DOM in the very turbid Gironde estuary although biological production was very important for salinities higher than 25 all year long. The main fluorophores of DOM were better observed in ultrafiltered fractions and size distribution of organic material varied in the MTZ for both the Seine and Gironde estuaries.

The monitoring of phytoplanktonic cells degradation showed the significant role of the MTZ and microbial communities on the production of fluorescent DOM.

Trace metal distribution between colloidal and dissolved phases was determined in the Gironde estuary to evaluate the influence of organic macromolecules on metal ions complexation during estuarine mixing. Fluorescence quenching was used to study copper ions binding to DOM. The results showed the importance of small sized proteinaceous or bacterial derived organic material on copper complexation.

Keywords : Dissolved Organic Matter • Estuary • Humic Substances • Fluorescence • Ultrafiltration • Complexing parameters • Metals