

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Sciences pour l'environnement - Gay Lussac

Faculté des Sciences et Techniques

Groupement de Recherche Eau, Sol, Environnement

Thèse N° 63-2013

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Spécialité : Eau, Sol, Environnement

présentée et soutenue par

Maud LELOUP

Ingénieure Eau et Environnement ENSIL Limoges

le 12 Décembre 2013

**Evaluation de l'impact des blooms algaux et d'efflorescences bactériennes
sur les caractéristiques de la matière organique des eaux naturelles**

Thèse dirigée par : Pr. Geneviève FEUILLADE, Dr. Rudy NICOLAU

JURY :

Rapporteurs

M. Jean-François HUMBERT - Directeur de Recherche INRA - ENS Paris

M. Patrick MAZELLIER - Professeur - Université de Bordeaux I

Examineurs

M. James BOWEN - Associate Professor - UNCC Charlotte (USA)

Mme. Geneviève FEUILLADE - Professeure - Université de Limoges

M. Stéphane MOUNIER - Maître de Conférences, HDR - Université du Sud
Toulon-Var

M. Rudy NICOLAU - Maître de Conférences - Université de Limoges

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier Messieurs Jean-François Humbert, Directeur de recherche INRA au laboratoire Bioemco à l'ENS Paris et Patrick Mazellier, Professeur au LPTC de l'Université de Bordeaux, pour l'attention qu'ils ont porté à mon travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Qu'ils trouvent en ces quelques mots le témoignage de toute ma gratitude.

Je remercie également Messieurs James Bowen, Associate Professor à l'Université de Charlotte (Caroline du Nord, USA) et Stéphane Mounier, Maître de Conférences (HDR) au laboratoire PROTEE de l'Université de Toulon, pour leur participation à ce Jury et à qui je tiens à exprimer toute ma considération. Merci d'avoir fait un si long voyage jusqu'à Limoges pour juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent à ma directrice de thèse Madame Geneviève Feuillade, Professeure au GRESE de l'Université de Limoges, pour avoir encadré ce travail. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ces 4 années de recherche, d'abord au cours de mon master puis de ces 3 années de thèse. J'exprime également toute ma gratitude à mes co-encadrants : Monsieur Rudy Nicolau et Madame Virginie Pallier, Maîtres de conférences au GRESE, pour leur participation à cette aventure. A tous les trois, merci pour le temps que vous avez consacré à la correction de ce travail et pour tous vos conseils.

Je tiens également à remercier l'ensemble des partenaires du programme de recherche CYAME - programme financé par le FEDER, auquel ma thèse s'est intégrée - ainsi que la région Limousin. Merci à Olivier Rouchut et Clément Boireau (Ndata), Bruno Védrine et Marilyne Vergnoux (Métis Biotechnologies), Mathieu Marsaudon et Serge Chambon (Odessol), Yohann Brizard (SABV), James Bowen (UNCC Charlotte, USA), Kenneth Persson (Université de Lund) et enfin Jean-Claude Lévêque et Gérard Cambonie (merci pour nous avoir laissé libre accès à l'étang de Pigéard et pour l'aide logistique... les dames de nage doivent toujours être dans l'étang!).

Je remercie l'ensemble du personnel du laboratoire GRESE pour leur accueil et pour leur aide tout au long de cette thèse. Merci à son directeur, le Professeur Michel Baudu pour m'avoir accordé sa confiance. Un grand merci plus particulièrement à Karine, Sophie, Patrice, Emeline, Jean-François, Corinne, David et Mathieu pour leur aide technique et analytique, ainsi qu'à Lourdès pour son aide administrative.

J'exprime également ma plus profonde gratitude à mes stagiaires pour leur aide précieuse et leur contribution à ce travail : Delphine, Alexandra et Virgile. Merci à tous les trois pour votre patience. En effet, vous avez été les premières victimes de mes débuts dans l'enseignement...

Je remercie aussi très chaleureusement tous les autres membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer quotidiennement pendant toutes ces années : Christophe, Magali, Audrey, Philippe, Guy, Marie-Line, Patrick et tant d'autres... ainsi que tous les thésards, post-doctorants ou contractuels qui m'ont accompagnée dans cette aventure et auprès desquels j'ai beaucoup appris tant sur le plan scientifique qu'humain : Aurély, Thibault, Kais, Thouraya, Junfeng, Jean-Noël, Edem, Patrick, Naïma, Camille, Moussab, JB, et tous ceux que j'aurais oublié de nommer... J'ai également une pensée toute particulière pour Delphine, qui fut d'abord mon master recherche puis qui devint thésarde à son tour, avec laquelle j'ai passé tant de bons moments et qui a su m'écouter et me soutenir dans les heures les plus sombres. Nos discussions de laboratoire vont me manquer... merci pour ton amitié depuis toutes ces années (nos années ENSIL et repas de "famille" puis nos années recherche), merci "maman Delphine".

A titre plus personnel, j'adresse tous mes remerciements à Emilie pour son amitié inconditionnelle depuis notre rencontre à l'ENSIL, pour son soutien, pour ses encouragements, pour toutes ces heures passées ensemble à discuter de tout et surtout de n'importe quoi (graou?)... j'espère que cela va continuer encore longtemps ! Un grand merci également à sa famille pour leur accueil chaleureux et pour leur amitié... merci à vous tous, ma "famille d'accueil" en Limousin!

Merci également à mes amis pour leur soutien et notamment à Quentin, que j'ai pris sous mon aile à son arrivée en 1ère année à l'ENSIL et qui maintenant vole de ses propres ailes...

Je voudrais aussi exprimer toute ma gratitude à la joyeuse bande des thésards d'électronique de l'ENSIL (on va manger?) et plus particulièrement à Thomas et Nicolas, qui ont su me prêter leur oreille attentive à tous mes malheurs et m'apporter le soutien, les encouragements et le réconfort dont j'avais besoin... Nos discussions scientifiques et philosophiques du midi vont me manquer... merci pour votre bonne humeur et votre amitié.

Enfin, à ma famille, à mes parents et à mon frère, merci pour tout l'amour que vous me portez, pour votre soutien et vos encouragements permanents. A mon papa et à ma maman, merci pour toutes ces heures passées au téléphone à écouter mes larmes et mes sanglots, à supporter ma mauvaise humeur et mes colères ; merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir offert la possibilité de poursuivre mes études si loin... cette thèse est aussi la vôtre !

TABLE DES MATIERES

Introduction Générale	1
Partie 1. Synthèse bibliographique	5
I. L'eutrophisation	5
I.1. Généralités	5
I.2. Occurrence des phénomènes d'eutrophisation	6
I.3. Blooms algaux et de cyanobactéries	8
I.4. Souches d'algues et de cyanobactéries	8
I.5. Paramètres d'influence pour la formation des blooms	11
I.5.1. Luminosité	12
I.5.2. Nutriments	12
I.5.3. Température	13
I.5.4. Stabilité de la colonne d'eau	14
I.5.5. pH	15
I.5.6. Pression exercée par les organismes prédateurs	16
I.6. Avantages compétitifs	16
I.7. Cycle de vie du phytoplancton	20
I.7.1. Culture en laboratoire (réacteur fermé)	20
I.7.2. Cycle de vie en milieu naturel	20
I.8. Conséquences : effets indésirables des proliférations générées par l'eutrophisation	23
II. Matière Organique	25
II.1. Généralités	25
II.2. Caractérisation de la matière organique	25
II.2.1. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	28
II.2.2. Spectroscopie de fluorescence 3D	29
II.2.3. Ultrafiltration	32
II.2.4. Indice SUVA	33
II.2.5. Protocoles de fractionnement selon le caractère hydrophobe	33
II.3. Matière Organique Algale	35
II.3.1. Définition	35
II.3.2. Production et caractéristiques de la Matière Organique d'origine Algale (MOA)	36
II.3.3. Caractéristiques de la Matière Organique Cellulaire (MOC) et de la Matière Organique Extracellulaire (MOE)	39
II.4. Matière organique naturelle des eaux de surface	41
II.5. Processus d'humification	44
III. Impacts des blooms algaux et de cyanobactéries sur les procédés de traitement des eaux: cas de la coagulation-floculation	48
III.1. Pré-oxydation : chloration, ozonation et permanganate de potassium	49
III.2. Coagulation-floculation	50

III.2.1. Principe de la coagulation-floculation.....	50
III.2.2. Elimination des cyanotoxines	51
III.2.3. Elimination des cellules phytoplanctoniques.....	51
III.2.4. Elimination de la matière organique	53
III.2.5. Mécanismes d'élimination de la matière organique	58
IV. Conclusions et objectifs de l'étude.....	59
Partie 2. Matériels & Méthodes	61
I. Méthodologie	61
II. Cultures d'algues et de cyanobactéries en laboratoire.....	64
II.1. Souches cultivées	64
II.2. Préparation du milieu de culture	64
II.3. Conditions de culture.....	66
II.4. Suivi des populations phytoplanctoniques.....	66
III. Suivi des caractéristiques de la MO.....	67
III.1.1. Quantification de la MO : mesure du Carbone Organique Dissous (COD)	67
III.1.2. Détermination de l'indice SUVA	68
III.1.3. Fractionnement selon le caractère hydrophobe.....	68
IV. Analyse par fractionnement de taille (ultrafiltration)	70
V. Analyse par spectroscopie de fluorescence 3D	73
VI. Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	74
VII. Suivi <i>in-situ</i> sur le site de l'étang de Pigeard	77
VII.1. Présentation du site d'étude et stratégie d'échantillonnage	77
VII.2. Analyses effectuées	79
VIII. Traitement des eaux : essais de coagulation-floculation.....	84
VIII.1. Origine des échantillons testés.....	84
VIII.1.1. Essais sur eaux naturelles.....	84
VIII.1.2. Essais sur échantillons issus de cultures en laboratoire d'algues et de cyanobactéries	86
VIII.1.3. Essais sur fractions de MO extraites.....	86
VIII.2. Préparation de l'eau synthétique.....	87
VIII.3. Procédé de coagulation-floculation.....	88
VIII.3.1. Analyses effectuées	88
VIII.3.2. Choix du coagulant & conditions expérimentales choisies	89
Partie 3. Résultats & Discussion.....	93
I. Chapitre 1 : Caractérisation de Matière Organique Algale (MOA) produite au cours de la croissance d' <i>E. gracilis</i> et de <i>M. aeruginosa</i> en laboratoire	94
I.1. Introduction	94
I.2. Article 1 : Organic matter produced by algae and cyanobacteria : quantitative and qualitative characterization	96
I.3. Article 2 : Contribution of Algal Organic Matter on water resources composition: hydrophobic characteristics and size distribution.....	105
I.4. Article 3 : Fluorescence spectroscopy as a tool to identify eutrophication consequences on NOM characteristics	118
I.5. Article 4 : Characterization of algal organic matter by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) : comparison to natural organic matter	130

I.6. Principales conclusions du chapitre 1	144
II. Chapitre 2 : Impacts des apports en Matière Organique Algale (MOA) générés par les blooms algaux et cyanobactériens sur les caractéristiques de la Matière Organique Naturelle (MON) : étude <i>in-situ</i>	147
II.1. Introduction.....	147
II.2. Article 5 : Dynamics of an eutrophic pond: impacts of algal and cyanobacterial blooms on the characteristics of NOM	148
II.3. Principales conclusions du chapitre 2.....	164
III. Chapitre 3 : Impacts des phénomènes d'eutrophisation sur les performances de la coagulation-floculation	166
III.1. Introduction	166
III.2. Article 6 : Impact of eutrophication phenomenon on the performances of coagulation flocculation.....	168
III.3. Principales conclusions du chapitre 3	192
Conclusions & Perspectives.....	195
References Bibliographiques.....	199
Annexes	221

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Frise chronologique du travail effectué au cours des chapitres 1 (a), 2 (b) et 3 (c) et de l'organisation/valorisation scientifique (d).....	3
Figure 2 : Etat écologique des ressources en eau en France en 2009	7
Figure 3 : Schéma simplifié (non exhaustif) de la classification des organismes photosynthétiques.....	10
Figure 4 : Brassage des eaux et stratification thermique d'un lac profond tempéré	15
Figure 5 : Courbe théorique de croissance d'une culture d'algue ou de cyanobactérie en laboratoire	20
Figure 6: Cycle de vie de <i>Microcystis aeruginosa</i>	22
Figure 7: Cycle de vie des cyanobactéries de l'ordre des Nostocales et Stigonematales	23
Figure 8 : Matrice d'excitation-émission de l'eau ultra-pure : position des marqueurs de fluorescence d'après Chen <i>et al.</i> , (2003).....	30
Figure 9 : Fractions constitutives de la Matière Organique Algale (MOA)	35
Figure 10 : Courbe de croissance et concentration en COD pour <i>M. aeruginosa</i> (d'après Pivokonsky <i>et al.</i> , 2006)	36
Figure 11 : Proportions de COD _p (carbone organique dissous de la fraction protéique) et COD _{NP} (carbone organique dissous non protéique) du COD _T (carbone organique dissous total) de la MOE et de la MOI de <i>M. aeruginosa</i> (d'après Pivokonsky <i>et al.</i> , 2006).....	40
Figure 12: Mécanismes de formation des substances humiques d'après Stevenson, (1982) (source: Labanowski, 2004).....	46
Figure 13: Mécanismes possibles d'élimination de la MON par coagulation-floculation (d'après Jarvis <i>et al.</i> , (2004) et Matilainen <i>et al.</i> , (2010)).....	59
Figure 14: Synthèse des méthodes expérimentales suivies au cours de la thèse	63
Figure 15 : Principe de séparation des acides humiques et fractionnement de la matière organique selon son caractère hydrophobe	69
Figure 16: Protocole d'ultrafiltration utilisé en mode diafiltration.....	72
Figure 17: Vues à la caméra du MALDI-TOF des dépôts d'échantillons dans les différents tampons de solubilisation sans matrice (a à d) et avec matrice (e à f)	75
Figure 18 : Occupation des sols sur le bassin versant de la Valette.	78
Figure 19 : a) Localisation des points de prélèvement (Etang de Pigeard et la Valette) sur le site d'étude ; b) Vue aérienne du site de l'étang de Pigeard.	79
Figure 20: a) Localisation des points de prélèvement; b) Photo du site de la Glane; c) Photo du site de l'étang de Pigeard.....	84
Figure 21 : Occupation des sols sur le bassin versant de la Glane, en amont du point de prélèvement.....	85
Figure 22 : a) Turbidité résiduelle en fonction de la dose de traitement; b) COD résiduel en fonction de la dose de traitement; c) Pourcentage d'élimination du phytoplancton en fonction de la dose de traitement	90
Figure 23: evolution of AOM fractions distribution ($\pm 3\%$) from the lag phase to the advanced decline phase for <i>E. gracilis</i> (<i>E.g</i>) and <i>M. aeruginosa</i> (<i>M.a</i>).	110
Figure 24: Comparison of size fractionation of dissolved organic matter: evolution between the stationary and advanced decline phases: a) and b) are total samples from <i>E. gracilis</i> and	

<i>M. aeruginosa</i> ; c) e) and g) are respectively HPO, TPH and HPI fractions of AOM produced by <i>E. gracilis</i> and d), f) and h) are respectively HPO, TPH and HPI fractions from <i>M. aeruginosa</i>	113
Figure 25: Comparison of size fractionation of dissolved organic matter from various origins: a) HA and FA provided by Aldrich and the IHSS and b) from the eutrophic Pigeard pond. .	115
Figure 26: concentration of HPO, TPH and HPI fractions in the different size fractions during the stationary and advanced decline phases for <i>Euglena gracilis</i> (a) and <i>Microcystis aeruginosa</i> (b) and during winter for Pigeard pond (c).....	116
Figure 27: EEM of AOM fractions produced by <i>E. gracilis</i> during the stationary phase: (a) for total sample, (b) for HPO, (c) for TPH and (d) for HPI; and during the advanced decline phase: (e) for total sample, (f) for HPO, (g) for TPH and (h) for HPI. Spectra for AOM fractions produced by <i>M. aeruginosa</i> during the stationary phase are given in: (i) for total sample, (j) for HPO, (k) for TPH and (l) for HP; during the advanced decline phase: (m) for total sample, (n) for HPO, (o) for TPH and (p) for HPI.....	123
Figure 28: EEM of NOM fractions from Pigeard pond are given in: (a) for total sample, (b) for HPO, (c) for TPH and (d) for HPI. EEM of HA provided by Aldrich is given in (e); HA and FA of the Suwannee River are respectively (f) and (g) spectra.....	123
Figure 29: LDI spectra of HA (a) and FA (b) from the Suwannee River, HPO (c) and TPH (d) from <i>E. gracilis</i> and HPO (e) and TPH (f) from <i>M. aeruginosa</i>	135
Figure 30: MALDI spectra of HA (a) and FA (b) from the Suwannee River, HPO (c) and TPH (d) from <i>E. gracilis</i> and HPO (e) and TPH (f) from <i>M. aeruginosa</i> . Prominent repeating units of 28, 44, 58, 100, 114 and 169 Da are being shown in the spectra.	136
Figure 31: Relative abundance of each considered mass delta in HA and FA from the Suwannee River, HPO and TPH by <i>E. gracilis</i> and HPO and TPH by <i>M. aeruginosa</i> , calculated for LDI (a) and MALDI (b).....	140
Figure 32: Relative abundance of each considered structure-like in HA and FA from the Suwannee River, HPO and TPH by <i>E. gracilis</i> and HPO and TPH by <i>M. aeruginosa</i> , calculated for LDI (a) and MALDI (b).....	142
Figure 33: Cytograms showing the position of the clusters defined according the fluorescence of chlorophyll a (FL3) and phycocyanin (FL4) for cell counting of algae (R1) and cyanobacteria (R5). a) and b) are cytograms obtained respectively for Valette river and Pigeard pond during spring 2012.	152
Figure 34: Evolution of parameters over the one and a half year of the study: a) 7-day average of 24h cumulative radiance, b) rainfalls, c) water temperature and 7-day average air temperature at 2pm, d) Dissolved Organic Carbon, e) pH, f) Total Dissolved Nitrogen, g) chlorophyll a and h) phosphates.....	154
Figure 35: Evolution over the study period of chlorophyll a and total phytoplankton cell counting divided in algae and cyanobacteria parts for Valette river a) and Pigeard pond b). Evolution from January 2012 to August 2013 of turbidity and Total Suspended Solids divided in Organic part (VSS) and Mineral part (MSS) for Valette river c) and Pigeard pond d).	157
Figure 36: Evolution of prominent species over seasons: a) and b) are cytograms obtained respectively for Valette river and Pigeard pond during winter 2012 and c) and d) during summer 2013.....	157
Figure 37: Evolution from January 2012 to August 2013 of the HPO, TPH and HPI fractions concentrations and 7-day average of 24h cumulative rainfall for Valette river (a). Evolution of fractions concentrations and total phytoplankton cells density for Pigeard pond (b).	158
Figure 38: Comparison of the contribution of HPO, TPH and HPI fractions to the additional DOC load for the Valette river (high rainfall periods) and Pigeard pond (high phytoplanktonic activity periods) as well as characteristics of water extractable organic matter from soil (Chow <i>et al.</i> , 2006) and AOM (Henderson <i>et al.</i> , 2008; Leloup <i>et al.</i> , 2013).	159

Figure 39: Evolution of the percentage of the HPI fraction and SUVA of the HPI fraction for Valette river a). Evolution of the percentage of the HPI fraction and SUVA of the HPI fraction for Pigeard pond b). Evolution over the study period of percentage of HPO and SUVA of the HPO fraction for Valette river c). Evolution of the percentage of the HPI fraction and SUVA of the HPI fraction for Pigeard pond d).	162
Figure 40: Residual turbidity a) and cells/filaments removal b) vs. coagulant dose for each laboratory cultivated species: <i>E. gracilis</i> in blue, <i>M. aeruginosa</i> in black and <i>P. agardhii</i> in red.	175
Figure 41: Residual DOC concentration vs. coagulant dose for each laboratory cultivated species a). b) repartition of the HPO, TPH and HPI fractions for each species, before treatment c) removal of the HPO, TPH and HPI fractions for each species at optimum coagulant dose (36.7 mgFe/L).....	176
Figure 42: a) and b) show residual turbidity, c) and d) residual algae cells density, e) and f) residual cyanobacteria cells/filaments density, vs. coagulant dose.....	178
Figure 43: a) and b) show residual DOC concentration vs. coagulant dose. c) and d) are the repartition of the HPO, TPH and HPI fractions for each season, before treatment. e) and f) show, for each season, the removal of the HPO, TPH and HPI fractions, obtained for optimum coagulant dose.....	179
Figure 44: Removal of the studied fractions during coagulation-flocculation of synthetic waters (coagulant dose 36.7 mgFe/L and pH 6.5 ± 0.1).....	184
Figure 45: Comparison of removal percentage of HPO, TPH and HPI fractions of freshly produced AOM (Stationary phase) and degraded material (advanced decline phase) for <i>E. gracilis</i> a) and <i>M. aeruginosa</i> b).	187
Figure 46: Comparison of zeta potential of synthetic waters, raw samples and treated samples for the studied organic matter fractions (coagulant dose 36.7mgFe/L, pH 6.5 ± 0.1): HPO (a), TPH (b) and HPI (c). AOM fractions were also compared during the stationary (Stat.) and advanced decline (Adv. decline) phases.	188
Figure 47: Comparison of the removal of fractions in samples not fractionated (total samples, with mixed fractions) and in synthetic waters (XAD extraction, containing only one fraction) for Pigeard pond during winter a), <i>E. gracilis</i> b) and <i>M. aeruginosa</i> c).	190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques moyennes des lacs, cours d'eau et milieux marins de différents statuts trophiques (Smith <i>et al.</i> , 1999).....	5
Tableau II : Sources anthropiques d'apport en nutriments (Carpenter <i>et al.</i> , 1998).....	6
Tableau III : Caractéristiques de quelques genres et espèces fréquemment retrouvés en Limousin (d'après Antoine, 2009)	11
Tableau IV : Adaptations des algues et cyanobactéries aux différents paramètres d'influence	19
Tableau V : Effets indésirables induits par les proliférations d'algues et de cyanobactéries (AFSSA-AFSSSET, 2006).....	24
Tableau VI : Méthodes de caractérisation de la matière organique : techniques et objectifs, adapté d'après Labanowski, (2004).....	26
Tableau VII : Synthèse des valeurs de HIX reportées dans la littérature en fonction de l'origine de la MO.....	31
Tableau VIII : Synthèse des valeurs de FI reportées dans la littérature en fonction de l'origine de la MO	32
Tableau IX : Production de MOA au cours des phases de croissance et de déclin d'algues et cyanobactérie (d'après Spinette, 2008)	36
Tableau X : Répartition des fractions HPO, TPH et HPI au sein de la MOA issue de cultures d'algues en laboratoire, au cours des phases de croissance exponentielle et stationnaire.	37
Tableau XI : Répartition des fractions HPO, TPH et HPI au sein de la MOA issue de cultures de cyanobactéries en laboratoire, au cours des phases de croissance exponentielle et stationnaire.	38
Tableau XII : Principales caractéristiques de la matière organique d'origine algale (Henderson <i>et al.</i> , 2008 et 2010)	38
Tableau XIII : Comparaison des propriétés de la MOE et de MOS issues de cultures en laboratoire de <i>M. aeruginosa</i> au cours de la phase stationnaire (Qu <i>et al.</i> , 2012).....	40
Tableau XIV : Principales caractéristiques des fractions constitutives de la MON (Croué, 2004 ; Labanowski, 2004 ; Swietlik <i>et al.</i> , 2004; Świetlik et Sikorska, 2004 ; Pernet-Coudrier, 2008 ; Labanowski et Feuillade, 2009).....	43
Tableau XV : Synthèse des principales études concernant l'impact des proliférations d'algues et de cyanobactéries sur la coagulation-floculation	56
Tableau XVI : Caractéristiques des espèces d'algues et de cyanobactéries cultivées en laboratoire	64
Tableau XVII : Composition du milieu de culture utilisé	65
Tableau XVIII : Paramètres déterminés par cytométrie en flux	66
Tableau XIX : Récapitulatif des conditions expérimentales testées pour l'optimisation des spectres de masse.....	75
Tableau XX : Pics de masse et intensités relatives correspondantes pour trois spectres acquis successivement pour un même spot	76
Tableau XXI : Conditions expérimentales optimales pour chaque échantillon analysé en LDI	77

Tableau XXII: Conditions expérimentales optimales pour chaque échantillon analysé en MALDI (matrice DHB à 10mg.mL ⁻¹)	77
Tableau XXIII : Caractéristiques du bassin versant de l'étang de Pigeard	78
Tableau XXIV: Synthèse des paramètres analysés au cours du suivi réalisé sur le site de l'étang de Pigeard	80
Tableau XXV : Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des ions dosés par chromatographie ionique	82
Tableau XXVI: Comparaison des caractéristiques de l'eau reconstituée, adapté d'après Lenoble <i>et al.</i> , (2004) et Pallier <i>et al.</i> , (2010) et de celles des eaux naturelles issues de l'étang de Pigeard et de la Glane.	86
Tableau XXVII: Récapitulatif des fractions de matières organiques étudiées au cours de la coagulation-floculation	87
Tableau XXVIII : Synthèse des paramètres mesurés au cours des essais de coagulation-floculation	89
Tableau XXIX: Conditions expérimentales utilisées pour le choix du coagulant	90
Tableau XXX : Synthèse des conditions expérimentales appliquées lors des essais de coagulation-floculation sur les différents types d'échantillons	91
Table XXXI : SUVA index of dissolved organic matter from various natural origins	111
Table XXXII: evolution of SUVA index of dissolved organic matter fractions from Pigeard Pond, <i>E. gracilis</i> and <i>M. aeruginosa</i>	112
Table XXXIII: fluorescence peak/area position according to Coble, (1996) and Chen <i>et al.</i> , (2003).....	119
Table XXXIV: FI values calculated for each studied fraction.....	127
Table XXXV: HIX values calculated for each studied fraction.....	128
Table XXXVI: Optimized experimental conditions for each sample	134
Table XXXVII: Frequently reported peaks in the literature for aquatic HA and FA, soil FA, by LDI and MALDI: comparison with NOM and AOM fractions	137
Table XXXVIII: Characteristics of each studied fraction relative to the total DOC content	139
Table XXXIX: Overall evolution of SUVA index of Valette river and Pigeard pond according to the seasons.	160
Table XL: Bio-physico-chemical parameters of the studied natural waters.....	171
Table XLI: Analysis performed during coagulation-flocculation experiments.....	173
Table XLII: Synthesis of the properties of each studied fraction of Natural Organic Matter	185
Table XLIII: Synthesis of the properties of each studied fraction of Algal Organic Matter	186

LISTE DES ABREVIATIONS

ACN: Acétonitrile
AF : Acide Fulvique
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire et de Travail
AH : Acide Humique
Chl a : Chlorophylle a
COA : Carbone Organique Assimilable
COD : Carbone Organique Dissous
CODB : Carbone Organique Dissous Biodégradable
COT : Carbone Organique Total
DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DS : Disque de Secchi
DSC : Scanning calorimetry
EC : Electrophorèse Capillaire
FEDER : Fonds Européen de Développement Régional
FFF : couplage Flux Force
FI : Indice de Fluorescence
FTIR : Infrarouge à Transformée de Fourier
HIX : Index d'Humification
HPI : composés Hydrophiles
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
HPO : composé Hydrophobes
HPSEC : Chromatographie d'Exclusion Stérique Haute Performance
IHSS : International Humic Substances Society
LDI : Laser Desorption Ionization
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MES : Matières En Suspension
MMS : Matières Minérales en Suspension
MO : Matière Organique
MOA : Matière Organique Algale
MOC : Matière Organique Cellulaire
MOD : Matière Organique Dissoute
MOE : Matière Organique Extracellulaire
MOI : Matière Organique Intracellulaire
MON : Matière Organique Naturelle
MOS : Matière Organique de Surface
MVS : Matières Volatiles en Suspension
m/z : ratio masse sur charge
ONEMA : Office National de l'Eau et des Milieux aquatiques
PMA : Poids Moléculaire Apparent
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

SABV : Syndicat d'Aménagement du Bassin de la Vienne
SAXS : dispersion rayons X aux petits angles
SH : Substances Humiques
SUVA : Specific UV Absorbance
TFA : acide trifluoroacétique
TG : Thermo-gravimétrie
TDN : Azote total dissous
TOF : Time-Of-Flight
TP : Phosphore total
TPH : composés Transphiliques
UF : UltraFiltration

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A CETTE THESE :

Liste des publications

- **Leloup, M.**, Nicolau, R., Pallier, V., Yéprémian, C., Feuillade-Cathalifaud, G., 2013. Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *Journal of Environmental Sciences* 25 (6), 1089–1097. (*Article 1*)
- **Leloup, M.**, Nicolau, R., Pallier, V., Feuillade-Cathalifaud, G., 2013. Eutrophication impacts on characteristics of natural organic matter: A laboratory approach based on *Euglena gracilis* and *Microcystis aeruginosa* cultivation. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 171, 187–198.
- **Leloup, M.**, Pallier V., Nicolau, R., Feuillade-Cathalifaud, G. Contribution of Algal Organic Matter on water resources composition: hydrophobic characteristics and size distribution. *Rédigé pour soumission. (Article 2)*
- **Leloup, M.**, Feuillade-Cathalifaud, G., Nicolau, R., Pallier, V. Fluorescence spectroscopy as a tool to identify eutrophication consequences on NOM characteristics. *Rédigé pour soumission. (Article 3)*
- **Leloup, M.**, Lachassagne D., Pinault, E., Feuillade-Cathalifaud, G., Nicolau, R. Characterization of algal organic matter by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS): comparison to natural organic matter. *Rédigé pour soumission. (Article 4)*
- **Leloup, M.**, Feuillade-Cathalifaud, G., Pallier, V., Védrine, B., Nicolau, R. Dynamics of an eutrophic pond: impacts of algal and cyanobacterial blooms on the characteristics of NOM. *Rédigé pour soumission. (Article 5)*
- **Leloup, M.**, Pallier, V., Nicolau, R., Feuillade-Cathalifaud, G. Impact of eutrophication phenomenon on the performances of coagulation flocculation. Part A : Study of the impact of algae and cyanobacteria proliferations on the performances of coagulation-flocculation. *Rédigé pour soumission. (Article 6, partie A)*
- **Leloup, M.**, Pallier, V., Nicolau, R., Feuillade-Cathalifaud, G. Impact of eutrophication phenomenon on the performances of coagulation flocculation. Part B : Reactivity of Algal Organic Matter fractions during Coagulation/Flocculation: Comparison to Natural Organic Matter. *Rédigé pour soumission. (Article 6, partie B)*

Liste des communications dans des congrès nationaux

- **Leloup M.**, Lachassagne D., Nicolau R., Feuillade-Cathalifaud G., Pinault E., 2011. Matière organique générée par les blooms d'algues (*Euglena gracilis*) et de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa*). PLUMEE 2011, Deuxième colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique, Limoges (France), 30 Mai - 1er Juin 2011. (communication orale, résumé).
- **Leloup M.**, Nicolau R., Pallier V., Feuillade-Cathalifaud G., 2013. Matière Organique produite par des algues et cyanobactéries : caractérisation quantitative et qualitative. Séminaire prospectif Réseau Matières Organiques, Vers de nouveaux concepts autour des matières organiques. Biarritz (France), 27-30 Janvier 2013. (poster, résumé).
- **Leloup M.**, Nicolau R., Pallier V., Feuillade-Cathalifaud G., 2013. Séminaire CYAME. Scientific symposium : European program FEDER CYAME, Monitoring the quality of eutrophic environments: how to better manage their environmental impacts ? Limoges (France), 13-14 Juin 2013 (communication orale).

Liste des communications dans des congrès internationaux

- **Leloup, M.**, Nicolau, R., Pallier, V., Feuillade-Cathalifaud, G., 2013. Eutrophication impacts on characteristics of natural organic matter: A laboratory approach based on *Euglena gracilis* and *Microcystis aeruginosa* cultivation, New Forest (Royaume-Uni), 21-23 Mai 2013. (communication orale, texte intégral).
- **Leloup M.**, Nicolau R., Pallier V., Feuillade-Cathalifaud G., 2013. Impacts of algal blooms on the characteristics of NOM. NOM5 Down Under 2013 IWA Natural Organic Matter Specialist Conference, Perth (Australie), 1er - 04 Octobre 2013. (communication orale, résumé).
- Pallier V., **Leloup M.**, Akowanou V., Nicolau R., Feuillade-Cathalifaud G., 2013. Reactivity of algal organic matter during coagulation/flocculation: comparison to NOM. NOM5 Down Under 2013 IWA Natural Organic Matter Specialist Conference, Perth (Australie), 1er - 04 Octobre 2013. (communication orale, résumé).

INTRODUCTION

GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les phénomènes d'eutrophisation, dont l'origine est naturelle, sont grandement accélérés par les activités anthropiques, par l'intermédiaire des rejets en azote et phosphore principalement. Ces rejets sont liés aux activités industrielles et de transport qui génèrent des pollutions allant de l'agriculture, avec l'utilisation intensive d'engrais, aux activités domestiques, ou encore aux rejets de stations d'épuration des eaux ou liés à l'assainissement non collectif. Ces apports excessifs en nutriments sont véhiculés via les eaux de ruissellement et d'infiltration, puis finissent par s'accumuler dans les écosystèmes fermés que constituent les lacs notamment. Dans les milieux aquatiques, l'azote et le phosphore sont les deux principaux facteurs limitants du développement des organismes photosynthétiques. Lorsqu'ils sont introduits en excès et en présence de conditions de température et de luminosité propices, ils favorisent la prolifération massive des organismes photosynthétiques. Ces développements anarchiques d'algues et de cyanobactéries voient leur fréquence et leur ampleur augmentées au cours des dernières décennies et ce dans de nombreuses régions du globe. La région Limousin ne fait pas exception à la règle.

Les phénomènes de blooms ont de nombreuses conséquences néfastes sur les écosystèmes aquatiques avec une perte de biodiversité conséquente liée à une sélection des espèces les plus aptes à s'adapter à des conditions particulières. Ils constituent également une gêne importante pour les usages récréatifs des ressources touchées. Dans certaines conditions, les cyanobactéries sont également susceptibles de libérer des toxines - substances dangereuses pour la santé humaine - posant ainsi des problèmes de santé publique. Dans le cas où la ressource en eau est utilisée pour la production d'eau potable, le traitement et son efficacité sont alors affectés par la présence de ces composés toxiques.

L'autre aspect majeur lié aux blooms est la production massive de matière organique. En effet, le développement des organismes photosynthétiques provoque la libération dans le milieu d'exsudats organiques liés à l'activité métabolique. Lors de la sénescence de ces organismes, d'autres composés organiques vont également être relargués. L'ensemble de ces molécules est appelé Matière Organique Algale (MOA). La dynamique de cette matière organique ne suit, à priori, pas celle de la Matière Organique Naturelle (MON) initialement présente au sein des ressources en eau. Ces composés organiques d'origine algale vont alors faire partie intégrante du cycle de la MON et contribuer à la modification de ses caractéristiques, en participant à son enrichissement. Ces modifications qualitatives et quantitatives vont également affecter les procédés de traitement des eaux et nécessiter une réadaptation de ces derniers. En effet, l'efficacité des procédés de traitement et en particulier de l'étape de coagulation-floculation, est largement dépendante des propriétés de la matière organique à traiter. Ces changements sont encore méconnus et demandent à être plus amplement étudiés. Il apparaît ainsi nécessaire d'établir une "carte d'identité" de la MOA pour mieux connaître ses propriétés et son évolution afin d'anticiper les conséquences des apports

générés par les phénomènes d'eutrophisation sur les ressources. Il sera alors possible, à partir de ces connaissances, d'optimiser les procédés de traitement.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du programme de recherche CYAME, financé sur fonds FEDER. Ce programme vise principalement à évaluer les impacts des blooms algaux et cyanobactériens sur les caractéristiques de la matière organique des ressources en eau; à déterminer des indicateurs pertinents de risque de prolifération phytoplanctonique; et à déterminer les impacts des modifications induites par les phénomènes d'eutrophisation sur les performances des procédés de traitement des eaux.

Ce manuscrit se compose de trois parties :

La première partie fait la synthèse des connaissances bibliographiques sur l'eutrophisation ainsi que sur les techniques analytiques de caractérisation de matière organique. Un état des lieux des connaissances des propriétés de la MOA et de la MON est également réalisé, en lien avec les performances du procédé de coagulation-floculation.

La seconde partie présente la démarche expérimentale suivie au cours de cette thèse. Elle décrit également les techniques utilisées et les analyses effectuées.

La troisième partie se décompose en trois chapitres, en relation avec les trois axes de recherche menés en parallèle au cours de ce travail (Figure 1). Elle présente les résultats obtenus sous la forme de 6 articles publiés ou rédigés pour soumission.

Le chapitre 1 a pour objectif de mieux comprendre la dynamique de croissance d'espèces d'algues ou de cyanobactéries cultivées en laboratoire (cultures mono-spécifiques) et ainsi dévaluer l'enrichissement du milieu en MOA qui découle du développement et de la sénescence des espèces. La MOA générée est caractérisée par différentes techniques analytiques afin de lui attribuer une "carte d'identité", soulignant ses différences avec la MON. Des fractions de MOA sont ainsi extraites selon le caractère hydrophobe (fractionnement sur résines XAD) puis étudiées par spectroscopie de fluorescence 3D, spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS) et ultrafiltration. Ces propriétés sont alors comparées à celles de fractions de MON d'origine eutrophe ou non (Figure 1 a).

Le chapitre 2 étudie la dynamique de la MON dans deux écosystèmes ayant des fonctionnements différents : un système lentique hypereutrophe (plan d'eau situé en Limousin) et un système lotique non soumis aux blooms (rivière en amont du plan d'eau), au travers d'un suivi *in-situ* de 18 mois sur site expérimental instrumenté. L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la contribution et le devenir de la MOA générée par des phénomènes de blooms récurrents ainsi que de confirmer et confronter les données de la littérature avec celles obtenues au chapitre 1 (Figure 1 b).

Le chapitre 3 aborde l'étude de la réactivité de la MOA et de ses fractions dans les procédés de traitement des eaux (coagulation-floculation). Les impacts de l'eutrophisation sur les performances du procédé sont évaluées au travers de la comparaison de la réactivité de MO d'origines variées (Figure 1 c).

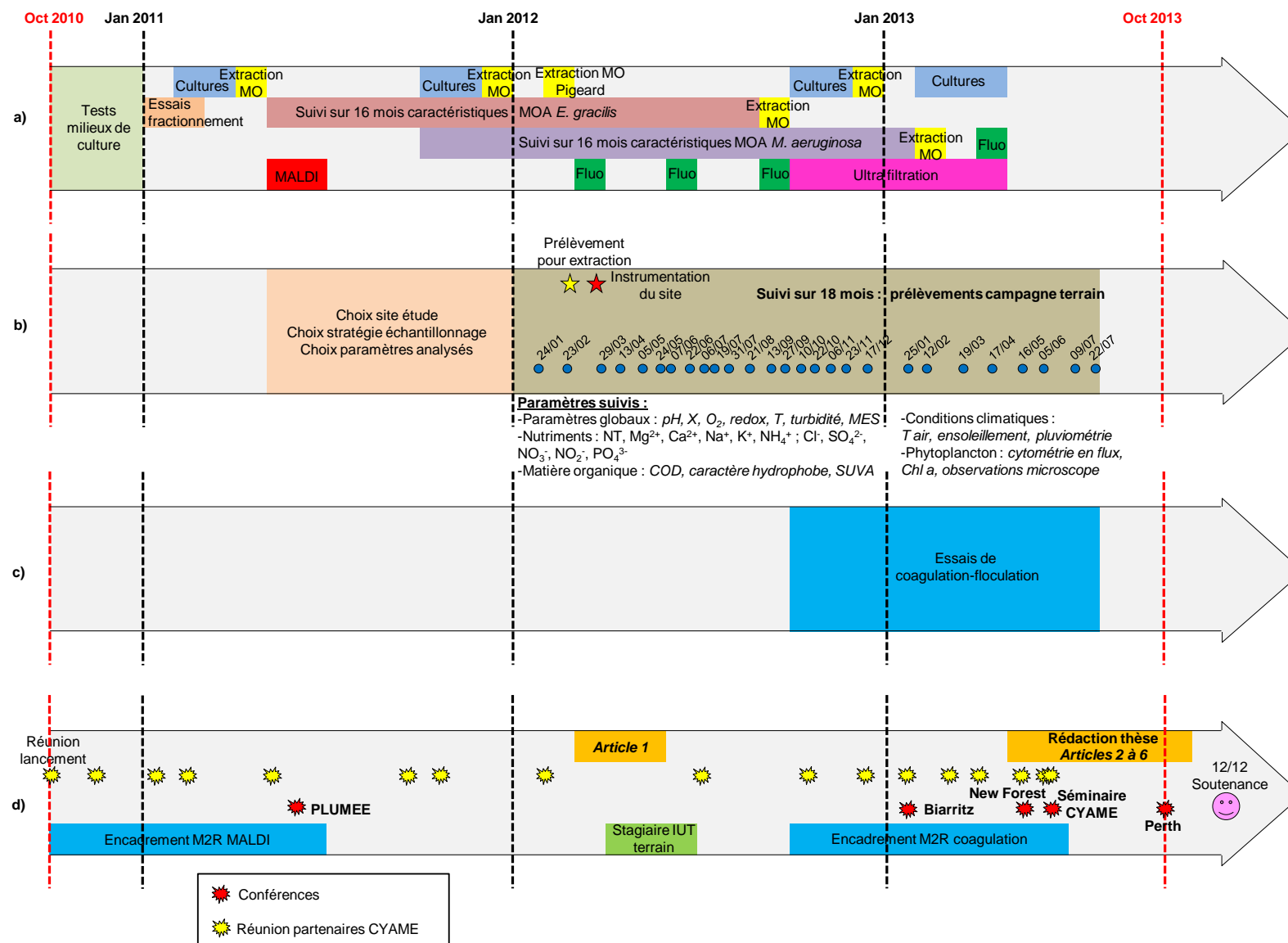


Figure 1: Frise chronologique du travail effectué au cours des chapitres 1 (a), 2 (b) et 3 (c) et de l'organisation/valorisation scientifique (d)

PARTIE 1. SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. L'eutrophisation

I.1. Généralités

A l'origine, l'eutrophisation était définie comme un phénomène naturel qui conduit progressivement, à l'échelle des temps géologiques, au comblement des lacs peu profonds et à la formation de marais puis de prairies et de forêts (Anderson *et al.*, 2002). Ce comblement est le résultat du processus de vieillissement des lacs qui se produit naturellement sous l'action d'un apport en nutriments et en sédiments généré par l'érosion et le ruissellement (Carpenter *et al.*, 1998). Ce phénomène peut également être grandement accéléré par les activités humaines, auquel cas le comblement intervient en quelques décennies au lieu de plusieurs centaines voire milliers d'années. Cependant, le terme « eutrophisation » a ensuite été extrapolé à l'enrichissement en nutriments des cours d'eaux, estuaires et milieux marins, même si les conséquences écologiques diffèrent (Smayda, 2008). L'eutrophisation correspond ainsi au processus d'évolution du statut trophique (Tableau I) des plans d'eau, cours d'eaux ou milieux aquatiques affectés, qui deviennent progressivement eutrophes par une augmentation excessive de leurs apports en nutriments (Smith *et al.*, 1999), dont l'azote et le phosphore principalement.

Tableau I : Caractéristiques moyennes des lacs, cours d'eau et milieux marins de différents statuts trophiques (Smith *et al.*, 1999)

Milieu	Statut trophique	Ntot (µgN/L)	Ptot (µgP/L)	Chl a en suspension (µg/L)	DS (m)
Lacs	Oligotrophe	< 350	< 10	< 3.5	>4
	Mésotrophe	350-650	10-30	3.5-9	2-4
	Eutrophe	650-1200	30-100	9-25	1-2
	Hypertrophe	> 1200	> 100	> 25	<1
Milieu marin	Oligotrophe	< 260	< 10	< 1	> 6
	Mésotrophe	260-350	10-30	1-3	3-6
	Eutrophe	350-400	30-40	3-5	1.5-3
	Hypertrophe	> 400	> 40	> 5	< 1.5
Milieu	Statut trophique	Ntot (µgN/L)	Ptot (µgP/L)	Chl a en suspension (µg/L)	Chl a benthique (µg/L)
Cours d'eau	Oligotrophe	< 700	< 25	< 10	< 20
	Mésotrophe	700-1500	25-75	10-30	20-70
	Eutrophe	>1500	> 75	> 30	>70

Chl a : chlorophylle a ; DS : Disque de Secchi

L'azote et le phosphore sont naturellement des facteurs limitants du développement des organismes photosynthétiques dans les milieux aquatiques. Lorsqu'ils sont apportés en quantités importantes dans le milieu par les activités anthropiques, leur abondance provoque la prolifération des producteurs primaires (algues, cyanobactéries) (Chorus et Bartram, 1999). La prolifération du phytoplancton provoque l'augmentation de la teneur en chlorophylle *a* (Chl *a*) en suspension dans l'eau car ce pigment est présent au sein des cellules de tous les organismes photosynthétiques et en particulier du phytoplancton. Il constitue ainsi un paramètre permettant la quantification de ce dernier. Ensuite, l'augmentation de la quantité de particules en suspension due à la recrudescence des cellules phytoplanctoniques provoque une augmentation de la turbidité et donc une réduction de la transparence de l'eau, d'où une diminution de la profondeur du Disque de Secchi (DS).

Les apports en azote et en phosphore dans les milieux aquatiques peuvent être d'origine naturelle ou anthropique. Les sources naturelles d'apports en ces éléments sont : l'érosion continentale, la décomposition bactérienne et les apports atmosphériques (Van Hullebusch, 2002). Les sources anthropiques d'apport en nutriments peuvent être diffuses ou ponctuelles (Tableau II). Ces apports sont véhiculés via les eaux souterraines, fluviales ou les dépôts atmosphériques. Les sources ponctuelles tendent souvent à être continues et peu variables dans le temps tandis que les sources diffuses sont plus intermittentes et irrégulières. Ainsi, il est plus facile de contrôler et de mettre en place des systèmes de traitement pour limiter les rejets d'azote et de phosphore dans le milieu aquatique au niveau des sources ponctuelles qu'au niveau des sources diffuses (Carpenter *et al.*, 1998 ; Smith *et al.*, 1999). Cependant, ce sont les sources diffuses qui contribuent le plus à la pollution des ressources en eaux.

Tableau II : Sources anthropiques d'apport en nutriments (Carpenter *et al.*, 1998)

Sources ponctuelles	Sources diffuses
<ul style="list-style-type: none"> - rejets de station d'épuration - effluents de sites de stockage de déchets - déjections animales - eaux de ruissellement issues de mines, installations pétrolières, sites industriels - déversement des bassins d'orage des villes (population > 100 000 habitants) - eaux de ruissellement issues de chantiers (surface > 2 ha) - débordement des réseaux pluviaux et égouts 	<ul style="list-style-type: none"> - eaux de ruissellement issues de l'agriculture (élevage intensif, irrigation, amendement,...) - rejets de fosses septiques défectueuses - eaux de ruissellement des sites miniers abandonnés - déposition atmosphérique - rejets d'exploitation forestière, de conversion de zones humides - rejets urbains (population < 100 000 habitants) - eaux de ruissellement issues de chantiers (surface < 2 ha)

I.2. Occurrence des phénomènes d'eutrophisation

Les phénomènes d'eutrophisation peuvent être identifiés soit par leurs causes (concentration en nutriments excessive, température de l'eau élevée) soit par leurs conséquences (perte de biodiversité, prolifération du phytoplancton). Ces paramètres étant

pris en compte lors de la détermination de l'état écologique des ressources en eau, il est ainsi possible d'estimer approximativement l'ampleur du phénomène en France (Figure 2). En 2009, 55% des masses d'eau de surface avaient un état écologique jugé moyen à mauvais et sont donc susceptibles d'être affectées par des phénomènes d'eutrophisation. Les zones potentiellement les plus touchées sont : la Bretagne, le Sud-Ouest, l'Ile-de-France ainsi que les zones frontalières de la Belgique et de l'Allemagne.

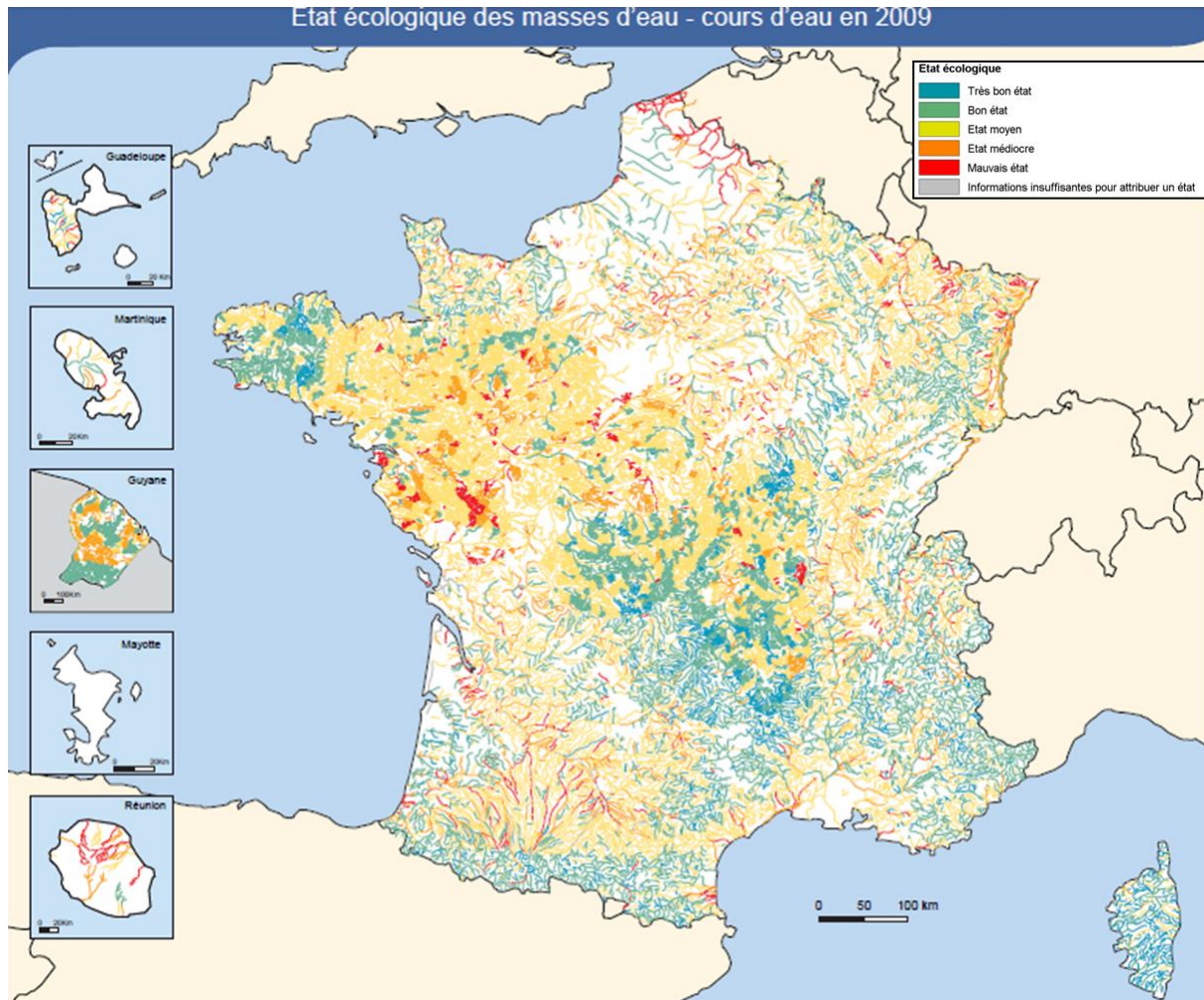


Figure 2 : Etat écologique des ressources en eau en France en 2009 (source: ONEMA, 2009)

En Europe, Asie et Amérique, environ 40% des lacs sont eutrophes et sujets aux proliférations algales (Chorus et Bartram 1999). En région Limousin, un rapport émis par le Ministère de la Santé et des Solidarités (French Ministry of Health, 2009) estime que 78% des baignades suivies au cours de la période estivale de 2003 à 2008 ont une situation préoccupante par rapport à une présence plus ou moins importante de cyanobactéries. En 2009, 43% des sites étudiés sont considérés comme eutrophisés. Les blooms de cyanobactéries et de micro-algues se produisent habituellement dans ces environnements eutrophes, c'est-à-dire contenant des concentrations élevées en nutriments, plus particulièrement en phosphore, et où le renouvellement de l'eau est faible.

I.3. Blooms algaux et de cyanobactéries

Le terme « bloom » désigne une augmentation significative d'une population donnée, conduisant à l'apparition d'un pic de biomasse (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000 ; Masó et Garcés, 2006). L'amplitude du pic dépend de l'espèce considérée mais présente une variation temporelle et spatiale importante, dépendante des conditions environnementales. Les blooms algaux peuvent impliquer une grande diversité d'organismes et mettent en jeu des dynamiques complexes. De même, dans un rapport de l'AFSSA (AFSSA-AFSSET, 2006) les efflorescences ou blooms de cyanobactéries sont définies comme « des phases de prolifération massive se produisant lorsque les conditions environnementales leur sont favorables (Paragraphe I.5.). Ces proliférations se caractérisent notamment par :

- la production, sur une période de temps courte (quelques jours), d'une biomasse importante
- une forte diminution de la diversité spécifique dans le compartiment phytoplanctonique car une ou deux espèces deviennent alors très largement dominantes ».

Cependant, il est très difficile de définir un seuil de biomasse au delà duquel il est possible de considérer l'apparition d'une prolifération, car ce seuil devrait à la fois tenir compte du statut trophique de l'écosystème aquatique concerné, mais également de l'évolution temporelle de la biomasse ainsi que de l'espèce considérée. En effet, bien que le terme « prolifération de cyanobactéries » soit employé dans la réglementation, il n'en existe pas de définition internationale. Les proliférations de cyanobactéries sont des phénomènes dynamiques dont le développement ainsi que la disparition peuvent être très rapides. Ainsi, en l'état actuel des connaissances scientifiques, il n'est pas possible de caractériser les phénomènes de blooms avec précision, par des valeurs seuils de nombre de cellules ou de temps de doublement (AFSSA-AFSSET, 2006).

I.4. Souches d'algues et de cyanobactéries

Le terme « algue » désigne des organismes **eucaryotes**, autotrophes et photosynthétiques. Les algues sont retrouvées dans tous les écosystèmes aquatiques : eaux douces, milieu marin, glaces et neiges, mais également dans les milieux terrestres dès lors qu'ils sont humides. Environ 20 000 à 40 000 espèces d'algues ont été décrites dans le monde à ce jour, ce qui représente près de 18% du règne végétal (Garon-Lardiere, 2004 ; Guiry, 2012). Cependant, le nombre d'espèces d'algues est estimé de 65 000 à plus d'un million (Guiry, 2012). Les algues présentent des tailles (de l'ordre de quelques micromètres à plusieurs mètres) et des morphologies (unicellulaires, formation de filaments ou de colonies ou encore organisations pluricellulaires avec des architectures parfois complexes) très diverses. Elles regroupent de nombreux genres qui sont classifiés selon leur contenu en pigments photosynthétiques :

- *algues vertes*, contenant de la chlorophylle a et b, des carotènes et xanthophylles, vivent surtout en eau douces ou saumâtres.

- *algues rouges*, possèdent toutes une structure pluricellulaire et vivent en majorité en milieu marin. Elles contiennent de la chlorophylle-a, des caroténoïdes ainsi que des pigments accessoires phycocyanine, allo-phycocyanine et surtout phycoérythrine (responsable de la couleur rouge).
- *algues brunes*, contenant de la chlorophylle a et c ainsi qu'un pigment brun la fucoxanthine qui masque la présence des autres pigments, vivent en milieu marin, en eau douce ou sur sol humide.

Les cyanobactéries sont des micro-organismes **procaryotes**, autotrophes et photosynthétiques. Elles présentent une paroi cellulaire caractéristique des bactéries Gram-avec feuillet de peptidoglycane. Elles se caractérisent également par l'absence de noyau, de plaste et de mitochondrie. Le nombre d'espèces de cyanobactéries est estimé à près de 8000 (Guiry, 2012). A ce jour environ 150 genres et plus de 2000 espèces ont été identifiées (Hoek *et al.*, 1995), dont près de 40 sont connues pour synthétiser des toxines (Briand *et al.*, 2003). Les cyanobactéries ont tout d'abord été classifiées en tant que micro-algues du fait de leur nombreuses caractéristiques communes avec les algues et notamment leur capacité à synthétiser des pigments photosynthétiques (chlorophylle a et pigments accessoires tels que phycocyanine, allo-phycocyanine ou phycoérythrine) qui leur confèrent une large gamme de couleur (bleu, vert, rouge). La découverte de fossiles suggère que les cyanobactéries sont présentes sur Terre depuis au moins 3,5 milliard d'années. Ce sont des micro-organismes ubiquitaires, retrouvés des régions polaires jusqu'à l'équateur, capables de se développer dans des milieux très variés (terrestres ou aquatiques) et de s'adapter à des conditions environnementales défavorables (températures extrêmes, salinité, alcalinité,...). En effet, ils sont capables de coloniser aussi bien les eaux douces (lacs, rivières, étangs, estuaires) que le milieu marin (Anderson *et al.*, 2002). En milieu aquatique, on distingue les cyanobactéries planctoniques, c'est-à-dire en suspension dans la colonne d'eau, des cyanobactéries benthiques qui se développent fixées sur les sédiments. Les espèces planctoniques se développent dans l'ensemble de la colonne d'eau ou à un niveau bien précis. Dans ce cas, les proliférations sont le plus fréquemment observées à la surface où elles forment des agrégats flottants appelés « fleurs d'eau », « écumes » ou encore « mousses ». De façon moins fréquente, ces phénomènes peuvent survenir en profondeur (entre 10 et 15m) en fonction des disponibilités en nutriments et en énergie lumineuse (AFSSA-AFSSET, 2006).

Dans le cadre de ce travail, seuls les organismes unicellulaires photo-autotrophes seront étudiés, micro-algues et cyanobactéries, qui composent le phytoplancton (Figure 3). Chacun de ces deux groupes est subdivisé en différents ordres, qui regroupent les espèces en fonction de leurs caractéristiques. La reproduction du phytoplancton se fait très majoritairement par voie asexuée, elle repose sur une simple multiplication végétative ou sur la formation de spores.

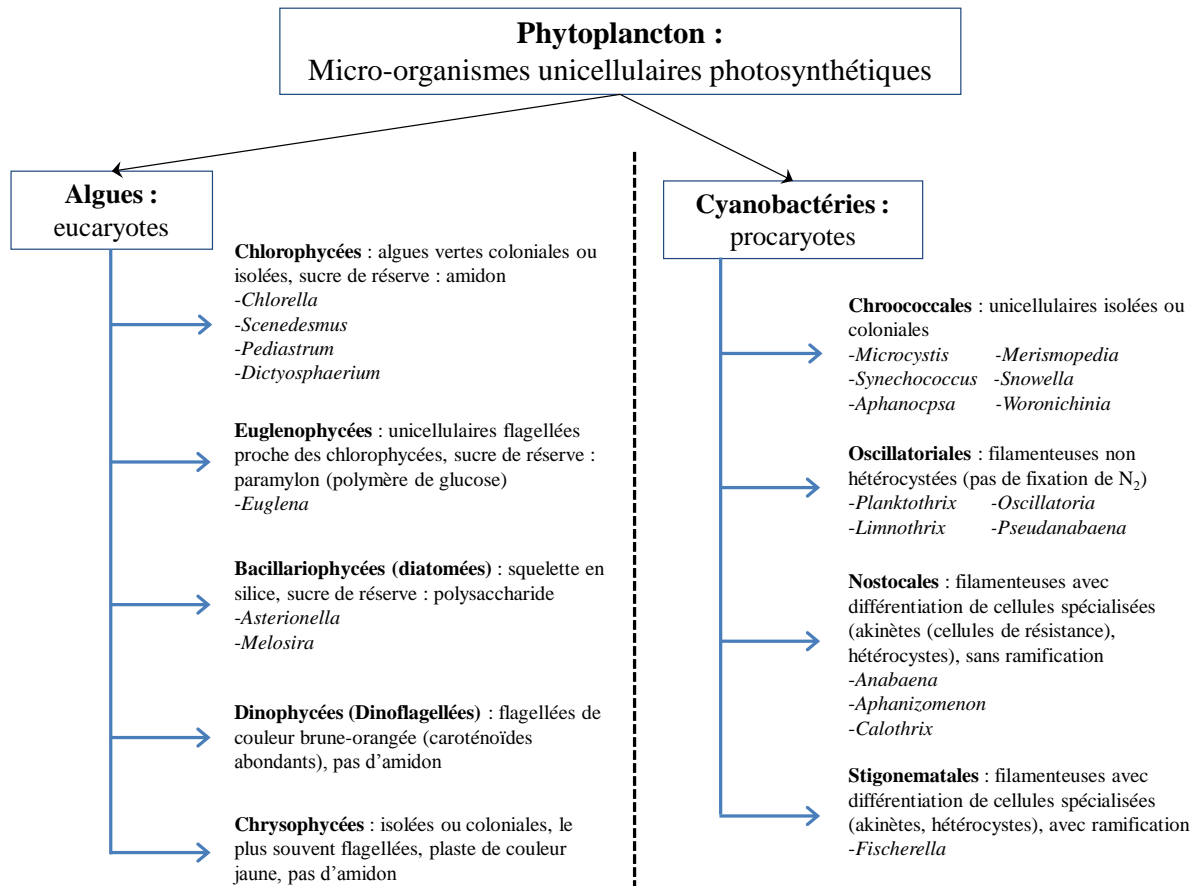


Figure 3 : Schéma simplifié (non exhaustif) de la classification des organismes photosynthétiques

Les familles d'algues les plus fréquemment retrouvées en eau douce sont les Chlorelles (telles que *Chlorella vulgaris*), les Euglènes (telles que *Euglena gracilis*), ainsi que les Diatomées (des genres *Asterionella*, *Aulacoseira*, *Stephanodiscus*, *Tabellaria* ou *Fragilaria* par exemple) (Bertru, 2006).

En milieu tempéré, comme c'est le cas en Limousin, les espèces de cyanobactéries les plus susceptibles de former des efflorescences sont celles de type *Planktothrix rubescens* ou *Planktothrix agardhii*, qui peuvent former des blooms à des températures faibles (<10°C), des Nostocales comme *Aphanizomenon flos-aquae* ou *Anabaena flos-aquae* ou encore des Chroococcales comme *Microcystis spp.* qui forment des blooms massifs en période estivale ou au début de l'automne (Catherine, 2009). Le Tableau III présente les caractéristiques de quelques genres de cyanobactéries fréquemment retrouvés en région Limousin.

La zone et la période de développement du phytoplancton sont conditionnées par l'espèce considérée et par un certain nombre de paramètres d'influence dont les principaux sont : la stabilité de la colonne d'eau, la température ainsi que la lumière et les nutriments disponibles.

Tableau III : Caractéristiques de quelques genres et espèces fréquemment retrouvés en Limousin (d'après Antoine, 2009)

Genre	Espèce	Organisation	Production toxines	Fixation N ₂ (hétérocystes)	Formation akinètes
<i>Anabaena</i>	<i>spiroïde</i>	Filamenteuse	+	+	+
<i>Aphanizomenon</i>	<i>flos-aquae</i>	Filamenteuse	+	+	+
	<i>ovalisporum</i>				
<i>Aphanocapsa</i>		Coloniale	-	-	-
<i>Limnothrix</i>		Filamenteuse	-	-	-
<i>Merismopedia</i>		Coloniale	-	-	-
<i>Microcystis</i>	<i>aeruginosa</i>	Coloniale	+	-	-
<i>Oscillatoria</i>		Filamenteuse	+	-	-
<i>Plankothrix</i>		Filamenteuse	+	-	-
<i>Pseudanabaena</i>		Filamenteuse	+	-	-
<i>Snowella</i>		Coloniale	-	-	-
<i>Woronichinia</i>	<i>naegeliana</i>	Coloniale	+	-	-

Toutes les espèces d'un même genre ne produisent pas forcément de toxines ; la production de toxines dépend de la présence ou non du gène associé.

I.5. Paramètres d'influence pour la formation des blooms

Les paramètres les plus influents pour le développement de blooms algaux et de cyanobactéries sont : la température de l'eau ; la lumière ; la quantité et la biodisponibilité des nutriments ; la dynamique des masses d'eau ; le pH et la pression exercée par les organismes prédateurs (Andersen *et al.*, 2006 ; Guven et Howard, 2006). De plus, l'influence d'un paramètre unique ne permet pas à lui seul d'expliquer l'apparition des blooms, car ceux-ci résultent de la combinaison de plusieurs des facteurs précédemment cités (Dokulil et Teubner, 2000). En effet, les blooms résultent d'un phénomène global dans la mesure où ces paramètres sont interdépendants.

L'OMS donne 5 facteurs de risque permettant de caractériser la vulnérabilité d'une ressource. Ces facteurs de risque sont d'ordre : historique, physique, hydraulique, chimique et biologique. Une ressource peut être considérée comme à risque si :

- des informations historiques ou des connaissances locales font état de précédents épisodes de proliférations ;
- la température de surface dépasse 18°C et /ou la ressource est stratifiée ;
- le temps de séjour dépasse 5 à 10 jours ;
- les concentrations annuelles moyennes en phosphore, voire en azote, permettent le développement des cyanobactéries présentes sur le site ;
- des informations issues de suivis biologiques font état du niveau de présence, des périodes d'apparition et de la persistance des cyanobactéries dans la ressource.

I.5.1. Luminosité

L'accès à la lumière (durée de l'exposition et intensité lumineuse) est un paramètre capital pour le contrôle de la dynamique des organismes photosynthétiques (Oberhaus *et al.*, 2007). Cependant, une trop forte intensité lumineuse peut dégrader l'appareil photosynthétique du phytoplancton par photo-inhibition. De nombreuses espèces de cyanobactéries sont sensibles voire inhibées lors de périodes prolongées de forte intensité lumineuse. Ainsi, des intensités supérieures à $320 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sont létales pour beaucoup d'espèces. La durée de l'ensoleillement a également une influence cruciale : par exemple, *Aphanizomenon flos-aquae* se développe peu en dessous de 10h de lumière et de 14h d'obscurité (Yamamoto et Nakahara, 2005).

I.5.2. Nutriments

Les blooms de cyanobactéries et d'algues se produisent principalement dans les milieux eutrophes, c'est-à-dire où les apports en azote et phosphore sont importants, car ces éléments sont les deux principaux facteurs limitants pour le développement du phytoplancton (Chorus et Bartram, 1999). Le phytoplancton utilise principalement le phosphore sous forme d'orthophosphates (PO_4^{3-}) et l'azote sous forme d'ammonium (NH_4^+) et de nitrates (NO_3^-) (Liu *et al.*, 2007). Le carbone n'est pas un élément limitant dans les milieux aquatiques à cause des échanges permanents avec le CO_2 atmosphérique. Cependant, le carbone en excès peut non seulement avoir un impact important sur le développement des espèces phytoplanctoniques mixotrophes, c'est-à-dire qui peuvent utiliser le carbone sous forme minérale ou organique, mais aussi sur les proliférations bactériennes.

Le ratio Redfield correspondant au ratio carbone:azote:phosphore est de 106:16:1 (en moles) dans la composition de la matière organique phytoplanctonique, qui est relativement constante. Lorsque le ratio azote total sur phosphore total (TN:TP) est inférieur à 16 (exprimé en moles) l'azote est le facteur limitant pour le développement du phytoplancton tandis que $\text{TN:TP} > 16$ indique que le phosphore est limitant. Dans la majorité des cas l'azote est le facteur limitant dans les écosystèmes marins et côtiers tandis que le phosphore est le facteur limitant pour les écosystèmes d'eau douce (Anderson *et al.*, 2002).

De nombreux auteurs se sont intéressés à l'impact du ratio TN:TP sur la domination des cyanobactéries ou des algues sur la communauté phytoplanctonique (Havens *et al.*, 2003 ; Xie *et al.*, 2003 ; Håkanson *et al.*, 2007 ; Kangro *et al.*, 2007 ; Lv et Wu, 2010). Les faibles ratios semblent fréquemment associés aux blooms de cyanobactéries avec une très large domination des espèces capables de fixer l'azote atmosphérique (Vrede *et al.*, 2009), tandis que les ratios élevés sont plus couramment liés aux blooms algaux (Smith, 1983). Cependant, l'influence du ratio TN:TP est controversée et certains auteurs s'accorderaient plutôt à dire que ce ratio ne joue pas de rôle majeur dans la domination des cyanobactéries et qu'un faible ratio TN:TP serait plutôt la conséquence d'un bloom de cyanobactérie que la cause de son apparition (Xie *et al.*, 2003). En effet, le facteur le plus important pour le contrôle des blooms de cyanobactéries serait plutôt la quantité de phosphore disponible (Xie *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2007).

La succession des espèces formant des blooms au cours de l'année a également une influence importante. Par exemple, Heisler *et al.*, (2008) rapportent que dans la Baie de Chesapeake (USA) les nitrates déversés en grande quantité au printemps sont rapidement assimilés par les diatomées pour former un premier bloom, puis avec la raréfaction des nutriments ce bloom va dépérir et au moment de l'été, l'azote est abondamment relargué par les processus de décomposition sous forme d'ammonium pour supporter le développement d'un nouveau bloom formé par des flagellés et dinoflagellés. Ceci montre également que les nutriments continuent à servir de support à la formation des blooms longtemps après leur apport initial dans le milieu, grâce à leur recyclage au sein des sédiments. Ainsi, il existe une sorte d'auto-entretien des blooms. Cependant, tous ces blooms génèrent aussi du carbone organique qui ne suit, à priori, pas les mêmes cycles de consommation/relargage que l'azote et le phosphore. Cet apport en carbone contribuerait plutôt à l'enrichissement de l'eau en matière organique carbonée.

En plus de la quantité totale de nutriments disponibles, la composition de l'apport en nutriments a également une grande influence sur la formation des blooms (Anderson *et al.*, 2002 ; Heisler *et al.*, 2008). En effet, la croissance du phytoplancton ne dépend pas seulement de la présence suffisante de nutriments essentiels tels que le carbone sous forme de CO₂, l'azote ou le phosphore (et la silice pour les diatomées). Elle dépend également de la présence de certains ions majeurs tels que Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, et SO₄²⁻ (à des concentrations de quelques milligrammes par litre dans les eaux de rivière) et de certains éléments métalliques sous forme de micronutriments comme le fer, le manganèse, le zinc, le cobalt, le cuivre et le molybdène (Lukac et Aegerter, 1993 ; Andersen *et al.*, 2006). Ces éléments métalliques sont retrouvés en moyenne dans les eaux de rivière à des concentrations d'environ 40µg/L pour le fer, 8µg/L pour le manganèse, 30µg/L pour le zinc, 0,2µg/L pour le cobalt, 2µg/L pour le cuivre et 0,5µg/L pour le molybdène (Martin et Meybeck, 1979).

Le fer est impliqué dans le transport des électrons pour la photosynthèse et participe également avec le molybdène au métabolisme de l'azote (Rueter et Petersen, 1987) ; le zinc est quant à lui fortement impliqué dans la croissance et la production de toxines (Lukac et Aegerter, 1993). Certains de ces éléments métalliques sont toxiques à forte concentration comme le cuivre qui a longtemps été utilisé dans les eaux pour le traitement des algues ou encore le zinc et le cobalt. Le fer, le manganèse ou le molybdène peuvent notamment se trouver sous formes d'hydroxydes ou d'oxydes insolubles qui les rendent indisponibles pour le phytoplancton et peuvent constituer des facteurs limitants pour la croissance de ces micro-organismes (Andersen, 2005). Ainsi, les facteurs influençant la spéciation des éléments métalliques et donc leur biodisponibilité comme le pH, l'alcalinité ou la concentration en ligands, jouent aussi un rôle important pour le développement des organismes photosynthétiques.

I.5.3. Température

Les taux de croissance les plus élevés sont généralement atteints à des températures voisines de 25°C chez la plupart des cyanobactéries et autour de 20°C pour les algues (voire même 15°C pour les diatomées) (Yamamoto et Nakahara, 2005 ; Reynolds, 2006 ; Billen et Garnier, 2009). Ceci explique pourquoi les blooms de cyanobactéries se forment en été - la

période la plus propice étant de mai à septembre, dans les zones tempérées tandis que la domination des algues vertes est principalement observable pendant l'hiver et le printemps (Yamamoto et Nakahara, 2005). Selon Kanoshina *et al.*, (2003), les blooms de cyanobactéries peuvent se former lorsque la température dépasse 16°C. Cependant, les optimums de température varient d'une espèce à l'autre, ainsi les espèces thermophiles de *Synecococcus* présentent un optimum de croissance entre 35 et 45°C et peuvent se développer jusqu'à 70°C tandis que certaines espèces de *Planktothrix* peuvent former des efflorescences à des températures voisines de 10°C (Yéprémian *et al.*, 2007). Les cyanobactéries peuvent également se développer sur une large plage de températures. Yamamoto et Nakahara, (2005) ont ainsi montré qu'*Aphanizomenon flos-aquae* peut se développer à partir de 11°C bien que son optimum de température se situe plutôt autour de 20 à 25°C. Certaines études ont également suggéré qu'une hausse des températures liée au réchauffement climatique pourrait jouer un rôle crucial dans l'expansion géographique et l'accumulation de biomasse générée par les blooms (Anderson *et al.*, 2002 ; Paerl et Huisman, 2009 ; Granéli *et al.*, 2011).

Le développement de blooms de cyanobactéries est favorisé par un temps chaud et calme tandis qu'un temps froid et agité favorise plutôt le développement des algues (Kanoshina *et al.*, 2003). Cette forte dépendance vis-à-vis de la température suggère qu'un été précoce est très important pour l'inoculum, à partir duquel le développement des populations s'opère. Ainsi, un printemps chaud et un été précoce induisent une migration rapide des cellules et un pourcentage de germination plus élevé des cellules de résistance (Karlsson-Elfgren *et al.*, 2004), ce qui peut expliquer les variations d'ampleur du phénomène et le moment d'apparition différent selon les années. Selon Kanoshina *et al.*, (2003), la température de l'eau semble être le paramètre influençant la formation des blooms tandis que la stratification de l'eau paraît être le paramètre influençant l'intensité du bloom à l'échelle de l'espèce.

I.5.4. Stabilité de la colonne d'eau

La dynamique des masses d'eau est un des paramètres ayant le plus d'influence sur la répartition spatiale des communautés phytoplanctoniques au sein des écosystèmes lacustres (Hedger *et al.*, 2004). Cette dynamique est influencée par les conditions climatiques et varie au cours de l'année avec une succession de brassages de la colonne d'eau en automne et au printemps, et de stratifications thermiques en hiver et en été (Figure 4). Cependant, seule la stratification thermique de l'été est favorable à la prolifération d'algues et de cyanobactéries. Les conditions d'ensoleillement influencent rapidement la température de la couche d'eau superficielle (épilimnion) contrairement aux masses d'eau situées plus en profondeur (hypolimnion), du fait d'une forte inertie thermique et de l'absence de brassage. Il se crée alors une différence de densité entre ces masses d'eau liée à cette différence de température. Ces couches d'eau superposées ne se mélangent plus, créant une stratification thermique mais également chimique. Cette dernière est liée d'une part aux nutriments, qui se trouvent généralement à proximité des sédiments tandis qu'ils sont rapidement consommés en surface par les producteurs primaires, et d'autre part à l'oxygène apporté par les échanges à l'interface eau/air et produit par le phytoplancton qui se développe en surface, tandis qu'il est consommé en profondeur par les bactéries hétérotrophes.

Les conditions climatiques et notamment le vent, les fortes pluies ou le rayonnement solaire sont susceptibles d'induire des mouvements de masses d'eau. Ces mouvements vont modifier les échanges de nutriments entre la colonne d'eau et les sédiments par brassage des eaux. En effet, la température de l'eau permet à elle seule d'expliquer près de 70% des variations saisonnières de relargage de phosphore par les sédiments (Jensen et Andersen, 1992). Les phénomènes de brassage ont donc un impact important pour le développement du phytoplancton, car les deux ressources essentielles (nutriments et lumière) se trouvent aux deux extrémités de la colonne d'eau. Ainsi, lorsque le brassage devient insuffisant, les micro-organismes capables de constituer des réserves de nutriments et de faire varier leur position au sein de la colonne d'eau pour l'accès à la lumière, comme les cyanobactéries, possèdent un sérieux avantage compétitif sur les autres espèces phytoplanctoniques.

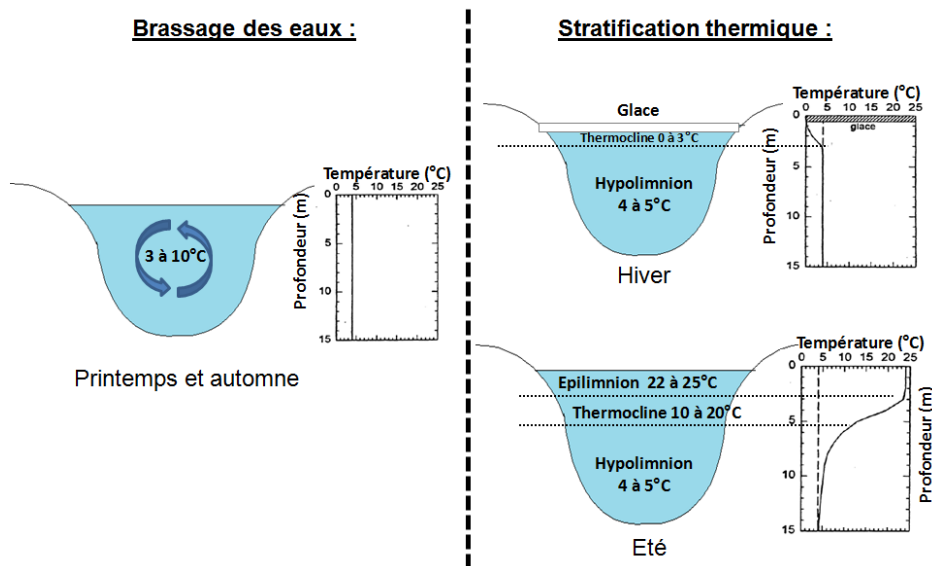


Figure 4 : Brassage des eaux et stratification thermique d'un lac profond tempéré

I.5.5. pH

Le pH des milieux aquatiques est fortement influencé par l'activité photosynthétique. Pour les systèmes lacustres, il peut varier entre 6 et 10 selon le statut trophique. Le pH a tendance à augmenter pendant les périodes de forte production primaire lorsque la concentration en CO_2 diminue sous l'effet de sa consommation par le phytoplancton et d'échanges relativement lents avec le CO_2 atmosphérique. De plus, lors de la photosynthèse, la consommation d'ions H^+ va également contribuer à l'augmentation du pH. Ainsi, la mesure du pH est un bon indicateur des phases d'activité biologique et de l'intensité de l'activité photosynthétique. De plus, la consommation et l'assimilation de l'azote sous forme de nitrates induit également une diminution du pH (Granum et Mykkestad, 2002). Le pH peut également influencer la composition de la communauté algale et bactérienne dans le milieu. Ainsi, lorsque le pH est compris entre 8 et 10, les cyanobactéries sont dominantes tandis que certains types d'algues sont inhibés à de telles conditions de pH. Yamamoto et Nakahara, (2005) ont montré que *Aphanizomenon flos-aquae* ne peut pas se développer à $\text{pH} < 7,1$ (optimum de croissance autour de pH 8).

I.5.6. Pression exercée par les organismes prédateurs

Les blooms ne sont pas exclusivement régulés par des paramètres physiques ou chimiques mais ils sont également contrôlés par des paramètres biologiques. En effet, la pression exercée par les organismes prédateurs sur le phytoplancton joue un grand rôle dans la régulation de ses populations (Smayda, 2008). Cependant, contrairement aux algues, les cyanobactéries sont peu soumises à la prédation du fait de leur organisation cellulaire et de leur capacité à produire des toxines. La formation de filaments (*Anabaena*, *Planktothrix* par exemple) ou de colonies englobées dans un mucilage commun (ex. *Microcystis*) les rend difficile à consommer notamment par les organismes filtreurs, du fait de la taille importante des structures obtenues. Enfin, bien que le rôle des cyanotoxines ne soit pas clairement déterminé, celles-ci peuvent avoir un impact sur la mortalité des organismes prédateurs.

I.6. Avantages compétitifs

Le phytoplancton présente un grand nombre de morphologies et de caractéristiques fonctionnelles qui constituent autant d'adaptations aux différents paramètres d'influence (Tableau IV).

Les micro-organismes photo-autotrophes doivent faire face à de nombreux changements qualitatifs et quantitatifs au niveau de la lumière disponible pour leur métabolisme. En effet, celle-ci varie en fonction de la latitude, de l'alternance jour/nuit, du cycle des saisons, de la présence d'arbres en bord de rivière qui limitent l'accès à la lumière ou encore des conditions climatiques. De plus, le milieu aquatique introduit de nouveaux paramètres qui vont influencer sur l'intensité ou les longueurs d'onde disponibles tels que : la transparence du milieu, l'effet d'ombrage et de dispersion induit par les matières en suspension ou encore l'inclinaison des radiations incidentes donnant lieu à une réflexion de la lumière incidente à la surface de l'eau (Pelmont, 1993). Ainsi, la distribution des algues au sein de la colonne d'eau varie selon la profondeur avec la raréfaction de certaines longueurs d'onde disponibles pour l'activité photosynthétique (Farineau et Morot-Gaudry, 2006) tandis que les cyanobactéries sont capables d'adapter leur appareil photosynthétique en fonction de l'éclairement (adaptation chromatique). Les cyanobactéries peuvent augmenter leur contenu en phycoérythrine ou en phycocyanine en fonction des conditions. Ceci constitue donc un avantage dans les milieux troubles comme c'est le cas pour les milieux eutrophes. Elles peuvent également ajuster leur position dans la colonne d'eau (vésicules de gaz) pour bénéficier des conditions de luminosité optimales et donc bénéficier de l'avantage d'une productivité photosynthétique accrue.

Différentes stratégies d'adaptation au manque de nutriments existent. Les espèces phytoplanctoniques sont photo-autotrophes, cependant, certaines d'entre elles (par ex. *Euglena gracilis*) possèdent un métabolisme particulier qui leur permet également d'utiliser les nutriments sous forme organique qui sont abondants dans les milieux eutrophes, ce sont des espèces mixotrophes (Liu *et al.*, 2007 ; Burkholder *et al.*, 2008; Heisler *et al.*, 2008). En outre, environ un tiers des espèces de cyanobactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique via la formation de cellules spécialisées, les hétérocystes (Oberholster *et al.*, 2004). Les cyanobactéries sont également capables d'ajuster leur position au sein de la

colonne d'eau grâce à la présence de vésicules de gaz, qui leur permettent de réguler leur densité par rapport celle de l'eau. Elles peuvent ainsi migrer en surface pour un meilleur accès à la lumière ou en profondeur où les nutriments sont généralement abondants près des sédiments. De plus, certaines espèces sont capables de constituer des réserves internes de nutriments qui seront consommées lorsque les conditions deviennent défavorables. Ces caractéristiques particulières de leur métabolisme permettent aux espèces qui les possèdent d'avoir un sérieux avantage compétitif lorsque les nutriments se raréfient.

Il existe trois formes d'organisation structurelle possibles : unicellulaire, coloniale ou filamenteuse. La formation de colonies pouvant être enrobées dans un mucilage commun (substance visqueuse composée de polysaccharides) ou de filaments permet de limiter la pression due aux organismes prédateurs du fait de la taille importante de la structure obtenue. La compétition due aux autres organismes photosynthétiques peut également être limitée par effet d'ombrage induit par la formation d'écume en surface (Hense et Beckmann, 2006). En effet, les espèces présentes en quantité très importante à la surface de l'eau lors des blooms réduisent fortement la pénétration de la lumière et limitent ainsi la disponibilité de l'énergie lumineuse pour les autres espèces.

Afin d'assurer leur survie lorsque les conditions deviennent difficiles, certaines espèces sont capables de former des cellules de résistance (spores ou akinètes).

Le métabolisme des algues et cyanobactéries conduit à la production de nombreux composés chimiques. Cette production peut :

- soit être dépendante de l'expression des gènes et les molécules produites sont essentielles au fonctionnement de l'organisme auquel cas elles sont appelées métabolites primaires,
- soit être dépendante du niveau de stress généré par les facteurs environnementaux auquel cas les molécules produites sont appelées métabolites secondaires.

Les cyanobactéries et micro-algues sont ainsi capables de produire des composés allélopathiques (métabolites secondaires) ayant des effets inhibiteurs sur les micro-organismes prédateurs mais également sur les compétiteurs (Granéli *et al.*, 2008). Ces composés semblent jouer un grand rôle dans la succession des espèces ainsi que dans la formation et la disparition des blooms (Vardi *et al.*, 2002). Les cyanobactéries sont aussi connues pour synthétiser d'autres métabolites, les cyanotoxines, dont la véritable fonction n'est pas encore bien déterminée (métabolites primaires ou secondaires) et qui agiraient comme une défense chimique contre les organismes prédateurs ou auraient un effet contre la compétition avec les algues (Briand *et al.*, 2003 ; Hense et Beckmann, 2006). Leflaive et Ten-Hage, (2007) considèrent que seules les cyanobactéries produisent des toxines en eau douce, dont les plus connues sont les microcystines. Cependant, il en existe trois catégories : les hépatotoxines, neurotoxines et dermatotoxines (Briand *et al.*, 2003). La capacité à excréter des sidérophores joue également un grand rôle dans la domination des cyanobactéries. En effet, ces composés, synthétisés en conditions de carence, sont capables de modifier la spéciation chimique d'un élément pour le remobiliser et augmenter ainsi sa biodisponibilité (le fer par exemple) ou encore pour réduire sa toxicité (le cuivre par exemple) (Rueter et Petersen, 1987).

Les cyanobactéries possèdent ainsi de nombreux avantages compétitifs par rapport aux autres organismes phytoplanctoniques, qui font d'elles de formidables compétitrices. Dans les années futures, le réchauffement climatique pourrait avoir pour conséquences de renforcer la domination des cyanobactéries et d'augmenter la fréquence, la persistance et l'intensité des blooms (Paerl et al., 2011). Il est ainsi crucial de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des blooms ainsi que les conséquences de ces proliférations sur la qualité des eaux.

Tableau IV: Adaptations des algues et cyanobactéries aux différents paramètres d'influence

Paramètres d'influence	Adaptation		Références
	Algues	Cyanobactéries	
Température	- Optimum de température généralement plus faibles ($\approx 20^{\circ}\text{C}$)	- Optimum de température généralement plus élevés ($\approx 25^{\circ}\text{C}$)	Yamamoto et Nakahara, (2005) ; Reynolds (2006)
Luminosité	- Distribution des espèces varie en profondeur selon l'équipement de la cellule en pigments assimilateurs et les longueurs d'onde disponibles	- Adaptation chromatique : changement de la sensibilité chromatique en fonction des longueurs d'onde disponibles (production de phycoérythrine ou phycocyanine), <i>avantage en eaux troubles</i> - Protection contre les UV : mécanismes de réparation de l'ADN - Migration verticale (régulation de la flottabilité grâce à des vésicules de gaz) : adaptation de la position dans la colonne d'eau : <i>meilleur accès à la lumière en surface</i>	Tandeau De Marsac, (1977) ; Stomp <i>et al.</i> , (2004) ; Farineau et Morot-Gaudry (2006) ; Sommaruga <i>et al.</i> , (2009) ; Kehoe, (2010)
Nutriments	- Mixotrophie possible - Réserves internes : carbone (amidon)	- Mixotrophie possible - Fixation de l'azote atmosphérique grâce à des cellules spécialisées (hétérocystes) : <i>l'azote n'est pas un facteur limitant</i> - Réserves internes : C (glycogène), N (cyanophycine), P - Migration verticale (régulation de la flottabilité grâce à des vésicules de gaz) : adaptation de la position dans la colonne d'eau : <i>meilleur accès aux nutriments près des sédiments</i> - Production de sidérophores : molécules permettant la modification de la spéciation chimique d'un élément pour augmenter sa biodisponibilité (ex. le fer) ou réduire sa toxicité (ex. le cuivre)	Reynolds <i>et al.</i> , (1987); Rueter et Petersen (1987); Ibelings <i>et al.</i> , (1991); Pelmont, (1993); Walsby <i>et al.</i> , (1997); Adams et Duggan, (1999) Oberholster <i>et al.</i> , (2004); Burkholder <i>et al.</i> , (2008) ; Kaplan-Levy <i>et al.</i> , (2010);
Stabilité de la colonne d'eau	Tolérance au brassage des eaux : taux de croissance élevés (à 20°C et saturation lumineuse, $0,8$ à $1,9 \text{ jour}^{-1}$)	Faible tolérance au brassage des eaux : nécessite une stabilité de la colonne d'eau car faibles taux de croissance (à 20°C et saturation lumineuse, $0,3$ à $1,4 \text{ jour}^{-1}$)	Chorus et Bartram (1999)
Prédation	- Composés allélopathiques - Organisation structurelle : coloniale ou filamenteuse	- Toxines/composés allélopathiques - Organisation structurelle : coloniale englobée dans un mucilage ou filamenteuse, <i>difficile à consommer par les prédateurs</i>	Paerl <i>et al.</i> , (2001); Ghadouani <i>et al.</i> , (2003)
pH		- Tolérance aux pH élevés (8-10)	Yamamoto et Nakahara (2005)
Conditions défavorables	- Cellules de résistance : spores (Dinophycées, diatomées, chrysophycées)	- Cellules de résistance : akinètes (Nostocales, Stigonematales)	Adams et Dugan (1999); Baker et Bellifemine, (2000); Andersen, (2005)
Compétition	- Composés allélopathiques - Ecume en surface : <i>effet d'ombrage</i>	- Composés allélopathiques - Toxines - Formation d' écume en surface : <i>effet d'ombrage</i>	Hense et Beckmann (2006); Leflaive et Ten-Hage, (2007); Granéli <i>et al.</i> , (2008)

I.7. Cycle de vie du phytoplancton

I.7.1. Culture en laboratoire (réacteur fermé)

Au laboratoire, la culture d'algues ou de cyanobactéries en batch est caractérisée par une phase de latence correspondant au temps nécessaire à l'adaptation de la souche à son environnement. Ensuite, cette phase est suivie d'une période de croissance rapide appelée phase exponentielle où la souche se multiplie activement et atteint une vitesse de division maximale et constante. Lorsque les nutriments viennent à manquer à cause de la surpopulation dans le milieu, un ralentissement de la croissance s'opère, c'est le début de la phase stationnaire. Enfin, lorsque les nutriments et les réserves intracellulaires des cellules sont épuisés, la population décline, c'est la sénescence (Figure 5).

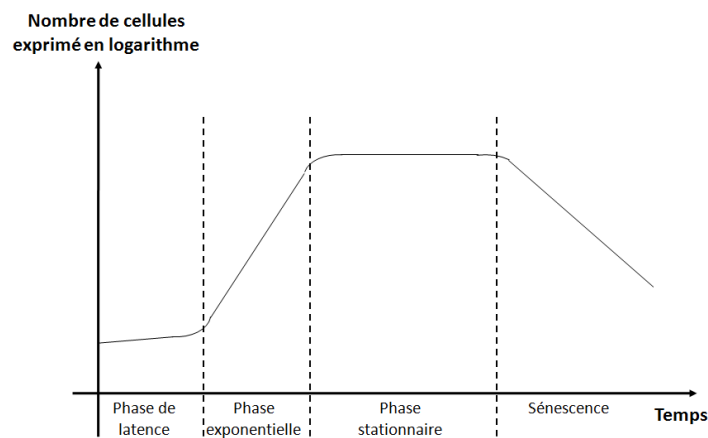


Figure 5 : Courbe théorique de croissance d'une culture d'algue ou de cyanobactérie en laboratoire

I.7.2. Cycle de vie en milieu naturel

Le cycle de vie des algues et cyanobactéries *in situ* est relativement complexe, dépend de l'espèce considérée et se caractérise par une alternance de phases de repos (notamment sous forme de spores ou de colonies benthiques, fixées aux sédiments) et d'activité (sous forme de cellules végétatives). La **germination** correspond au processus par lequel les cellules au repos (akinètes) deviennent actives (excystement). Le **recrutement** est la phase pendant laquelle les cellules quittent les sédiments et retournent en suspension au sein de la colonne d'eau (Rengefors *et al.*, 2004). Cependant, les périodes de blooms sont les plus couramment étudiées et donc les plus documentées même s'il est maintenant couramment admis que les phases de repos jouent un rôle important dans la formation des blooms (Head *et al.*, 1999 ; Hense et Beckmann, 2006).

- Processus de germination

Les spores « dormantes » au sein des sédiments constituent un inoculum pour la période de croissance suivante. En effet, il existe une relation entre l'importance des blooms d'été, la formation d'akinètes et la formation de blooms au cours de l'année suivante (Hense et Beckmann, 2006). Les facteurs influençant le processus de germination des spores

semblent être la présence de nutriments, de lumière et la température (Rengefors *et al.*, 2004 ; Karlsson-Elfgren *et al.*, 2004). Cependant, l'impact de ces facteurs ainsi que l'influence de la salinité ou de la dessiccation varient selon les espèces de même que les besoins en lumière en termes d'intensité ou de longueurs d'onde disponibles (Huber, 1985 ; Baker et Bellifemine, 2000).

- Processus de recrutement

Les sédiments peu profonds semblent être la plus grande réserve d'inoculum pour les blooms de phytoplancton. En effet, même si les zones plus profondes présentent potentiellement une réserve d'inoculum aussi importante que les zones littorales, le recrutement ne s'opère pas à partir de ces zones où les conditions environnementales ne sont pas favorables. Des études menées en laboratoire et à l'échelle du site ont montré que la présence de lumière, le brassage des sédiments et des températures élevées (conditions retrouvées en zones peu profondes) sont les facteurs les plus importants du déclenchement du processus de recrutement (Rengefors *et al.*, 2004 ; Karlsson-Elfgren *et al.*, 2004). Le brassage des sédiments (remise en suspension par procédés physiques ou par activité des organismes vivants) permet aux cellules enfouies trop profondément d'être à nouveau exposées à la lumière, à la surface des sédiments. De plus, le brassage permet le relargage dans l'eau de nutriments essentiels pour la croissance du phytoplancton, ce qui peut donc contribuer à stimuler le processus de recrutement (Rengefors *et al.*, 2004).

- **Cycle de vie des espèces phytoplanctoniques ne formant pas de spores (Figure 6) : exemple de *Microcystis aeruginosa* d'après Latour, (2002)**

Au printemps, une partie des colonies benthiques quitte les sédiments où elles ont passé l'hiver pour constituer un inoculum qui se retrouve ensuite dans la colonne d'eau, c'est la phase de recrutement. Les cellules remontent ensuite progressivement à la surface sous l'action combinée de la synthèse de vésicules de gaz et de la consommation de leurs réserves de nutriments qui provoquent une diminution de leur densité intracellulaire. Ces cellules forment les premières colonies planctoniques. Ensuite, avec l'apparition de conditions stables en été (stratification thermique et chimique) (Figure 4), les colonies planctoniques se développent et peuvent conduire à la formation d'efflorescences. En automne, la concentration des colonies planctoniques diminue sous l'action de la dégradation des conditions climatiques (baisse des températures et brassage des masses d'eau) au profit d'une augmentation du nombre de colonies benthiques, c'est la sédimentation. Ces colonies benthiques survivraient à l'hiver (conditions défavorables : faibles températures, absence de lumière) au sein des sédiments grâce à une modification de leur métabolisme. Ainsi le passage d'un métabolisme autotrophe photosynthétique à un métabolisme hétérotrophe ou à la fermentation de leurs réserves glucidiques internes constituerait le principal facteur de cette survie.

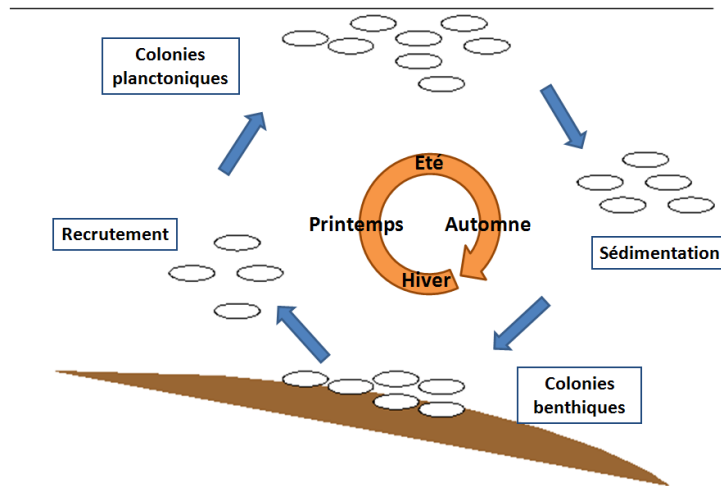


Figure 6: Cycle de vie de *Microcystis aeruginosa*

➤ **Cycle de vie des espèces phytoplactoniques formant des spores (Figure 7) : exemple des cyanobactéries de l'ordre des Nostocales (ex. *Anabaena*) et Stigonematales d'après Hense et Beckmann, (2006)**

Lorsque les conditions deviennent favorables au printemps, les akinètes se transforment en cellules végétatives (germination) et le processus de migration des cellules au sein de la colonne d'eau débute, il s'agit de la phase de recrutement. La formation de vésicules de gaz permet à celles-ci de remonter progressivement à la surface où l'énergie lumineuse devient accessible pour réaliser la photosynthèse. Les cellules végétatives se développent alors jusqu'à épuisement de l'azote disponible. La diminution de l'azote intracellulaire induit ensuite un processus de différenciation cellulaire sous la forme d'hétérocystes. Ces cellules spécialisées, situées à intervalles réguliers ou bien à l'extrémité de la colonie fixent l'azote pour le filament tout entier, permettant à celui-ci de continuer à se développer. A la fin de l'été, la baisse des températures et de l'intensité lumineuse ainsi que la limitation des nutriments (azote et phosphore) conduisent au ralentissement des divisions cellulaires puis à la différenciation de certaines cellules en akinètes. Leur densité élevée leur permet de regagner facilement les sédiments riches en nutriments où ils vont pouvoir reconstituer leurs réserves durant l'hiver et le printemps suivant. Enfin, une fois que les conditions seront redevenues favorables, le processus de recrutement recommencera et conduira au début d'un nouveau cycle.

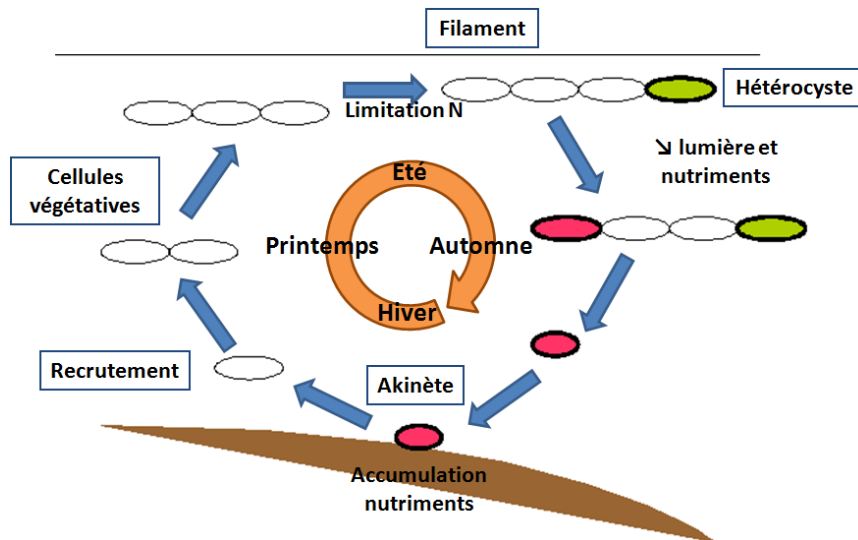


Figure 7: Cycle de vie des cyanobactéries de l'ordre des Nostocales et Stigonematales

I.8. Conséquences : effets indésirables des proliférations générées par l'eutrophisation

Les phénomènes d'eutrophisation ont de nombreuses conséquences négatives sur le milieu et les écosystèmes aquatiques. L'effet le plus visible est la prolifération d'algues ou de cyanobactéries appelée "bloom", qui provoque notamment des changements d'espèces dominantes au sein de la communauté phytoplanctonique et une dégradation des qualités organoleptiques de l'eau (couleur, odeur). Les cyanobactéries peuvent en effet produire des métabolites secondaires odorants ou potentiellement toxiques pour les autres organismes (Graham *et al.*, 2010). Ces proliférations ont également pour conséquence une augmentation de la turbidité due à l'augmentation de la quantité de particules en suspension, ce qui réduit la transparence de l'eau et donc la pénétration de la lumière. La lumière n'est alors plus disponible pour l'activité photosynthétique qu'au niveau de la surface et la profondeur de la zone anoxique augmente. A la mort des producteurs primaires, l'abondance de matière organique générée entraîne la prolifération des organismes décomposeurs (bactéries, champignons) qui vont minéraliser la matière organique et consommer, pour leur métabolisme, l'oxygène dissous dans l'eau au détriment des nombreux autres organismes vivant dans le milieu (zooplancton, poissons). Les proliférations de phytoplancton provoquent une augmentation du pH et une anoxie de la colonne d'eau qui conduit à la mort d'autres espèces vivant dans le milieu (poissons, algues, invertébrés...), d'où une perte conséquente de biodiversité aquatique et une modification profonde des réseaux trophiques (Zingone et Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

Les proliférations d'algues et de cyanobactéries ont ainsi de nombreux effets néfastes sur l'environnement et le milieu aquatique, sur les autres organismes vivants dans le milieu mais elles ont également des impacts sur les usages de l'eau (Tableau V). Les phénomènes de bloom peuvent conduire à deux types de problématiques, l'une associée à une forte production de biomasse, et l'autre associée à la production de toxines qui peut résulter d'une très faible concentration en organismes producteurs (Masó et Garcés, 2006).

Tableau V : Effets indésirables induits par les proliférations d'algues et de cyanobactéries (AFSSA-AFSSET, 2006)

<p style="text-align: center;">Sur l'environnement et le cadre de vie :</p> <ul style="list-style-type: none">• modification de l'aspect de la ressource par une coloration inhabituelle (bleue, rouge ou verte), des irisations en surface et/ou des masses d'écume se déplaçant au gré des vents ;• nuisance olfactive lors de la décomposition de la prolifération.
<p style="text-align: center;">Sur les organismes du milieu :</p> <ul style="list-style-type: none">• perturbation de la biodiversité de l'écosystème aquatique ;• perturbation des réseaux trophiques aquatiques car les cyanobactéries sont peu ou pas consommées par le zooplancton et leur prolifération s'effectue le plus souvent au détriment du développement des autres micro-organismes photosynthétiques (compétition pour les nutriments et la lumière) ;• mortalités de poissons, par intoxication ou diminution de la teneur en oxygène de l'eau,• mortalités d'oiseaux, par intoxication directe ou <i>via</i> leur alimentation (mollusques, poissons,...), (*)• intoxication d'animaux domestiques ou sauvages par abreuvement à proximité d'écumes toxiques (Briand <i>et al.</i> 2003) (*).
<p style="text-align: center;">Sur les usages anthropiques de l'eau :</p> <ul style="list-style-type: none">• coloration, odeur et texture de l'eau pouvant décourager voire interdire la baignade ;• troubles cutanés ou des muqueuses suite à des baignades dans des eaux affectées par des efflorescences ;• perturbation du fonctionnement des procédés de traitement des eaux : colmatage des filtres ou des membranes, consommation accrue en réactifs de traitement et génération de sous-produits de désinfection, dérèglement des réactions de floculation par suite des changements rapides de pH des eaux entrant dans la filière ;• dégradation, par la présence de métabolites odorants, de la qualité organoleptique des eaux d'alimentation mal traitées ;• induction de risques sanitaires par ingestion, inhalation ou exposition par dialyse si les toxines sont mal éliminées (*);

(*) *Cas particulier des cyanobactéries*

Afin de limiter les risques liés aux usages d'eaux sujettes aux proliférations de cyanobactéries, il existe des recommandations émanant de l'OMS mais aussi un certain nombre de textes réglementaires. Ainsi l'OMS a proposé des valeurs guides associées à différents niveaux de risques sanitaires, pour la gestion des eaux à usage récréatif mais également pour la production d'eau potable où elle a retenu la valeur guide de 1µg/L en microcystines-LR totales (WHO, 2003). En effet, une attention toute particulière est accordée aux microcystines car elles sont le plus souvent impliquées dans les empoisonnements humains ou animaux. Elles peuvent non seulement être à l'origine d'empoisonnements aigus mais il semblerait aussi qu'elles soient des promoteurs de cancer du foie par exposition chronique à faible dose dans les eaux de boisson (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992 ; Zhou *et al.*, 2002).

La réglementation européenne n'intègre pas de volet spécifique associé au risque de prolifération de cyanobactéries. La législation française a donc dû établir ses propres recommandations pour remédier à ce vide juridique, au travers de la publication de circulaires de la Direction Générale de la Santé (circulaires DGS/SD7A 2003/270(34), 2004/365(35), 2005/304(36)) pour la surveillance des eaux de baignade (Annexe 1) et de l'Arrêté du 11

Janvier 2007 pour les eaux destinées à la consommation humaine, qui étend les recommandations de l’OMS, à savoir la valeur limite de 1µg/L en microcystines totales (correspondant à la somme de toutes les microcystines détectées et quantifiées).

Une autre conséquence encore mal connue des phénomènes de blooms est l'accumulation de matière organique. En effet, parmi les molécules excrétées par les algues et cyanobactéries, les déchets issus de l'activité métabolique comme les protéines ou polysaccharides peuvent être retrouvés dans le milieu aquatique et contribuer à accroître la charge organique du milieu. Cette matière organique générée par l'activité métabolique du phytoplancton est appelée Matière Organique Algale (MOA).

II. Matière Organique

II.1. Généralités

La Matière Organique (MO) est une composante ubiquiste des milieux terrestres, aquatiques et anthropiques mais dont l'origine et la composition restent propres à chaque environnement. Ainsi, la répartition des différentes fractions de la MO varie significativement selon l'origine de l'échantillon (Imai *et al.*, 2001) et il est possible de définir des caractéristiques propres à chaque milieu. La matière organique est constituée d'une architecture basée sur un assemblage d'atomes de C, H, O, N, P et S. Lorsqu'elle est générée dans un milieu naturel, elle est principalement issue de l'activité métabolique des micro-organismes et regroupe un vaste ensemble de composés qu'il est impossible de définir par une méthode analytique unique. La matière organique est une matrice en constante évolution, particulièrement complexe et difficile à étudier du fait de sa très forte réactivité.

II.2. Caractérisation de la matière organique

La caractérisation avancée de la matière organique consiste à déterminer des informations sur la structure ou les fonctions chimiques constitutives des molécules analysées ainsi que sur les propriétés physiques (taille des molécules,...) ou chimiques (polarité, hydrophobicité) des éléments qui la composent (Labanowski, 2004). Il existe de nombreuses techniques pour caractériser la matière organique (Tableau VI), qu'il est souvent nécessaire de combiner afin d'obtenir des informations complémentaires. En effet, même si les outils analytiques utilisés pour caractériser la matière organique sont les mêmes que ceux utilisés pour déterminer la structure des composés organiques seuls, ils ne permettent cependant pas de définir avec précision la structure de la matière organique. Ils permettent uniquement d'accéder à des informations globales, qui en les combinant, permettent d'élaborer des modèles structuraux ou de définir l'origine de la matière organique. L'objectif principal de la caractérisation de la MO, dans une perspective de production d'eau potable à l'échelle industrielle, consiste à comprendre et à prédire la réactivité de celle-ci ou de ses fractions constitutives vis-à-vis d'un procédé de traitement spécifique (Croué, 2004). Dans le cadre de ce travail, la caractérisation de MO vise à déterminer des caractéristiques spécifiques à la matière organique générée par l'activité du phytoplancton afin d'appréhender les conséquences des apports liés aux phénomènes d'eutrophisation sur les caractéristiques de la MO naturelle.

Tableau VI : Méthodes de caractérisation de la matière organique : techniques et objectifs, adapté d'après Labanowski, (2004)

	Techniques	Objectifs	Références
Estimation quantitative de la MO globale	<i>Carbone Organique Total (COT) ou Dissous (COD)</i>	- <i>Evaluation quantitative de la matière organique</i>	Pivokonsky <i>et al.</i> , (2006) Henderson <i>et al.</i> , (2008 & 2010) ; Hong <i>et al.</i> , (2008)
Caractère biodégradable	Carbone Organique Dissous Biodégradable (CODB)	- Informations sur la quantité de COD minéralisée par les micro-organismes hétérotrophes	Servais <i>et al.</i> , (1987) Labanowski et Feuillade, (2009)
	Carbone Organique Assimilable (COA)	- Estimation de la proportion de carbone organique facilement assimilable par les micro-organismes	van der Kooij <i>et al.</i> , (1982); Labanowski et Feuillade, (2009)
Détermination d'éléments de structure/ groupements fonctionnels	Analyse de composition isotopique	- Informations sur l'origine de la matière organique (allochtone/autochtone)	Hiradate <i>et al.</i> , (2004)
	Electrophorèse capillaire (EC)	- Caractérisation des substances humiques	Parlanti <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Fluorescence 3D</i>	- <i>Informations sur la structure moléculaire de la matière organique dissoute et des SH</i> - <i>Informations sur la réactivité avec les métaux</i>	Parlanti <i>et al.</i> , (2002) Ziegmann <i>et al.</i> , (2010)
	Pyrolyse GC/MS	- Informations sur les origines et la formation de la MO - Identification au niveau structural	Navalon <i>et al.</i> , (2010)
	<i>Spectroscopie UV-Visible Absorbance UV (254nm)</i>	- <i>Identification quantitative des composés organiques (200-800nm)</i> - <i>Mise en évidence de composés organiques aromatiques</i>	Leenheer et Croué, (2003); Wang <i>et al.</i> , (2009)
	Analyse élémentaire (C, H, O, N, P, S)	- Informations sur les teneurs atomiques en divers éléments	Jouraihy <i>et al.</i> , (2008); Maurice <i>et al.</i> , (2002)
	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	- Etude de la Matière Organique (AH et AF) - Information qualitative sur les différents groupements carbonés - Distinction entre les carbones aromatiques et aliphatiques	Maurice <i>et al.</i> , (2002) Croué, (2004) Navalon <i>et al.</i> , (2010)
	Spectroscopie photo-électronique à rayons X	- Analyse de spéciation - Détermination de la nature des liaisons - Quantification de groupements fonctionnels	Monteil-Rivera <i>et al.</i> , (2000) ; Mercier <i>et al.</i> , (2002)
<i>Spectrométrie de masse</i>	- <i>Caractérisation de la structure chimique des molécules par fragmentation</i>	Mugo et Bottaro, (2004) Navalon <i>et al.</i> , (2010)	

	Techniques	Objectifs	Références
Détermination d'éléments de structure/ groupements fonctionnels	Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	- Etude des groupements fonctionnels de la matière organique	Maurice <i>et al.</i> , (2002) Croué, (2004)
	Thermo-Gravimétrie et Différentiel (TG), Scanning Calorimetry (DSC)	- Mise en évidence de pics spécifiques de la matière organique	Esteves et Duarte, (1999)
Fractionnement selon des propriétés chimiques	Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)	- Séparation des différentes classes de matière organique dissoute - Séparation des SH en fonction de leur polarité	Parlanti <i>et al.</i> , (2002) Navalon <i>et al.</i> , (2010)
	<i>Fractionnement selon le caractère hydrophobe</i>	- Quantification et identification des AH, AF et du carbone organique hydrophile	Henderson <i>et al.</i> , (2008) Labanowski et Feuillade (2009)
Détermination de propriétés physiques	Chromatographie d'Exclusion Stérique à Haute Performance (HPSEC)	- Détermination des masses moléculaires moyennes	Maurice <i>et al.</i> , (2002) Wang <i>et al.</i> , (2009)
	Chromatographie à perméation de gel	- Etude du poids moléculaire apparent	Seo <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Ultrafiltration (UF)</i>	- <i>Fractionnement selon le poids moléculaire apparent</i>	Lagier <i>et al.</i> , (2000) Labanowski et Feuillade, (2009)

Les techniques utilisées pour la caractérisation des matières organiques au cours de ce travail figurent en italique.

II.2.1. Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

➤ Principe de l'analyse et paramètres d'influence

La spectrométrie de masse est une technique qui permet de déterminer la masse moléculaire des composés présents dans l'échantillon (Shinozuka *et al.*, 2004) et de caractériser la structure chimique des molécules par fragmentation. Elle est couramment utilisée pour l'étude en milieu complexe de biomolécules telles que peptides, protéines, polysaccharides ou polymères de synthèse (Kaufmann, 1995 ; Kimura *et al.*, 2012). Lors de l'analyse, les molécules sont ionisées à l'aide d'une source, puis les ions produits sont triés en fonction de leur masse et de leur charge (obtention d'un spectre de masse qui peut permettre l'identification du composé initial).

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, MALDI) et un analyseur à temps de vol (Time of Flight, TOF). Les spectres de masses obtenus sont caractéristiques des molécules contenues dans l'échantillon et peuvent être utilisés comme signature pour identifier des MO de même origine ou de structures similaires (Haberhauer *et al.*, 1999). Le MALDI-TOF présente une bonne sensibilité et l'analyseur TOF permet l'étude d'une large gamme de rapports masse/charge (m/z jusqu'à 500 000). Cette technique est tolérante par rapport aux impuretés et à la présence de sels. Elle permet d'obtenir des espèces mono-chargées, ce qui rend l'interprétation des spectres de masse plus aisée. Le recours à une matrice permet également une désorption/ionisation "douce", c'est-à-dire que les molécules présentes dans l'échantillon à analyser sont peu fragmentées. Par contre les signaux obtenus sont dépendants de la complexité et surtout de la préparation de l'échantillon à analyser (Garden et Sweedler, 2000 ; Qiao *et al.*, 2009). En effet, la formation de cristaux hétérogènes analyte-matrice rend variable l'allure des spectres obtenus. En l'absence de matrice (Laser Desorption Ionization, LDI), le risque de fragmentation des molécules augmente, rendant difficile l'obtention de pics de haut poids moléculaires (généralement $m/z > 800$). Par contre cette technique permet l'analyse des molécules de petites tailles (100-600 m/z) contrairement au MALDI. En effet, l'utilisation d'une matrice génère des pics parasites compris dans la gamme 0-600 m/z qui rendent difficile l'interprétation des spectres dans cette zone mais protège les molécules de haut poids moléculaires de la fragmentation. Les modes MALDI et LDI apparaissent donc complémentaires pour l'analyse des molécules organiques dont les poids moléculaires sont compris dans une large gamme de masses.

➤ Application à l'étude des substances humiques

L'utilisation du MALDI-TOF pour la caractérisation des substances humiques est encore relativement peu fréquente car techniquement lourde à mettre en place. En effet, l'obtention d'un spectre de masse exploitable nécessite de multiples optimisations (Annexe 2) Cependant, un certain nombre d'auteurs se sont intéressés à cette technique notamment pour déterminer les masses moléculaires des composés présents dans le mélange avec une plus grande précision comparativement à d'autres techniques comme l'ultrafiltration ou la chromatographie d'exclusion stérique. Novotny *et al.*, (1995); Brown et Rice, (2000); Mugo et

Bottaro, (2004) et Peña-Méndez *et al.*, (2005) ont ainsi pu mettre en évidence l'abondance de composés de masses moléculaires relativement faibles (500-3000 Da), étayant le concept du modèle "supramoléculaire" des SH (Piccolo 2001 et 2002).

Gajdošová *et al.*, (2003) et Mugo et Bottaro (2004) ont analysé des substances humiques extraites de sol ou de la Suwannee River fournies par l'International Humic Substances Society (IHSS). Ces deux études ont montré que bien qu'ayant une origine différente, certains pics de masse sont communs aux deux types de MO, confirmant ainsi la présence de structures communes à tout type de MO. Ces structures peuvent résulter d'une "base" commune (protéines, polysaccharides par exemple) ou de processus évolutifs (humification) conduisant à une homogénéisation structurale. Ils ont également mis en évidence une structure quasi-polymérique avec la répétition de motifs (deltas de masses entre pics successifs) de masses bien déterminées.

II.2.2. Spectroscopie de fluorescence 3D

Dans les milieux aquatiques, de nombreux composés organiques dissous possèdent la propriété d'émettre un signal de fluorescence, c'est-à-dire que lorsqu'ils sont excités par absorption d'un rayonnement à une longueur d'onde λ_{ex} , ils retrouvent leur niveau d'énergie fondamental par émission d'un rayonnement à une longueur d'onde λ_{em} supérieure à la longueur d'onde d'excitation. La fluorescence dépend de la structure des molécules et elle est très souvent associée à la présence d'un système électronique π d'une molécule insaturée. Ainsi, dans les eaux naturelles, on estime qu'environ 70% de la Matière Organique Dissoute (principalement les composés humiques) peut émettre un signal de fluorescence (Laane et Koole, 1982). La Matière Organique Naturelle est composée de molécules très hétérogènes qui fluorescent dans des régions spectrales différentes. La spectroscopie de fluorescence 3D a largement été utilisée pour la caractérisation de MON et pour l'étude de phénomènes de transformation, de dégradation ou d'interactions entre métaux ou micropolluants et constituants organiques car elle permet d'observer l'ensemble d'une région spectrale. Elle possède notamment l'avantage de ne pas nécessiter de traitement préalable de l'échantillon et permet d'obtenir des informations globales sur les caractéristiques des molécules présentes ainsi que leur abondance relative au sein de l'échantillon. Cette technique simple et rapide ne nécessite qu'un petit volume d'échantillon à une faible concentration (<20mg/L) (Coble, 1996; Chen *et al.*, 2003).

Les spectres de fluorescence 3D, que l'on appelle matrices d'excitation-émission, constituent une représentation de l'intensité de fluorescence en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Un exemple de matrice d'excitation-émission est donné Figure 8, pour l'eau ultra-pure. La position des maxima d'intensité varie en fonction de l'origine des échantillons ainsi que de la nature et de la structure des fluorophores présents. Cependant, l'identification de ces fluorophores est difficile car certains paramètres tels que pH, force ionique ou température vont influencer sur l'émission de fluorescence (Patel-Sorrentino *et al.*, 2002 ; Baker, 2005). De plus, les effets de solvant (diffusions de Rayleigh et de Raman) ou d'extinction de fluorescence (effet de filtre interne lorsque les échantillons sont concentrés) peuvent entrer en compétition avec l'émission de fluorescence et ainsi perturber les spectres. Une limitation à cette technique est ainsi l'aspect quantitatif : il est particulièrement difficile

de quantifier les fluorophores présents du fait de ces nombreux paramètres. Au sein de la MON, il existe principalement deux types de composés fluorescents, les composés de types humiques et ceux de types protéiques, dont les bandes de fluorescence ont été décrites dans la littérature (Coble, 1996 ; Parlanti *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2003) et qui permettent de caractériser la matière organique dissoute (Figure 8).

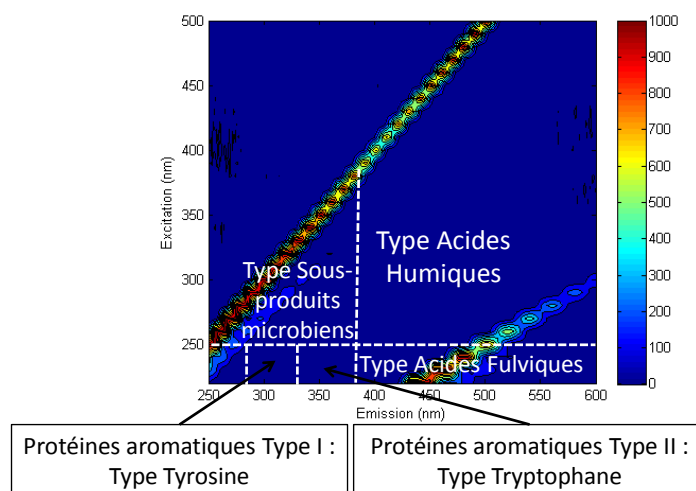


Figure 8 : Matrice d'excitation-émission de l'eau ultra-pure : position des marqueurs de fluorescence d'après Chen *et al.*, (2003)

Un autre intérêt de cette technique est la possibilité de caractériser l'état d'humification du système et de renseigner sur le caractère biodégradable. En effet, Zsolnay *et al.*, (1999) ont défini un Indice d'Humification (HIX), qui permet d'évaluer de degré de maturation de la matière organique dissoute. Cet indice a d'abord été utilisé pour caractériser les sols, il a ensuite été appliqué aux eaux du milieu naturel. L'indice HIX est déterminé pour une longueur d'onde d'excitation de 254 nm, par l'Équation 1.

Équation 1: Indice d'humification (HIX) (d'après Zsolnay *et al.*, 1999)

$$HIX = \frac{\int_{345nm}^{480nm} I_{\lambda em} d\lambda_{em}}{\int_{300nm}^{345nm} I_{\lambda em} d\lambda_{em}}$$

Des valeurs de HIX élevées traduisent une présence accrue de molécules émettant à de grandes longueurs d'onde, qui sont des molécules à forts poids moléculaires ayant un rapport C/H élevé et qui sont indicatrices d'un degré d'humification avancé. Le Tableau VII présente les valeurs d'indice HIX en fonction de l'origine de l'échantillon.

Tableau VII : Synthèse des valeurs de HIX reportées dans la littérature en fonction de l'origine de la MO

Origine de la MO		HIX	Référence
AH	Charbon	> 50	Birdwell et Engel, (2010)
	Eaux de surface	20 - 50	Birdwell et Engel, (2010)
	Tourbe, sols	10-30	Birdwell et Engel, (2010) Zaccone <i>et al.</i> , (2011)
AF (eaux de surface)		12-16	Zsolnay <i>et al.</i> , (1999)
Eau interstitielle sédiments		5 - 20	Birdwell et Engel, (2010)
Fumier		20	Kalbitz <i>et al.</i> , (2003)
Sol minéral		8	Zsolnay <i>et al.</i> , (1999)
Eau de rivière		6-12 (selon les saisons) 10-16	Vacher, (2004); Huguet <i>et al.</i> , (2009)
Végétaux (épicéa, hêtre, maïs)		0,7-4,7 fortement biodégradable 14-16,3 faiblement biodégradable	Kalbitz <i>et al.</i> , (2003)
Eau de source eau souterraine		< 5	Birdwell et Engel, (2010)
Activité microbienne		< 2	Birdwell et Engel, (2010)
Tryptone		0,05	Birdwell et Engel, (2010)

McKnight *et al.*, (2001) ont défini un autre indice, appelé Indice de Fluorescence (FI), qui correspond au ratio de l'intensité de fluorescence émise à 450nm sur celle émise à 500nm, pour une longueur d'onde d'excitation de 370nm (Équation 2). Cet indice renseigne sur le degré d'aromaticité de la matière organique dissoute et permet de déterminer l'origine de la matière organique. En effet, des valeurs supérieures à 1,9 traduisent une matière organique issue de l'activité bactérienne tandis que des valeurs inférieures à 1,4 montrent une origine allochtone (McKnight *et al.*, 2001). Le Tableau VIII présente les valeurs d'indice FI en fonction de l'origine de l'échantillon.

Équation 2: Indice de Fluorescence (FI) (d'après McKnight *et al.*, 2001)

$$FI = \frac{I_{\lambda_{em} = 450nm}}{I_{\lambda_{em} = 500nm}}$$

Ces techniques d'analyse structurale permettent d'obtenir des informations globales qui restent insuffisantes pour prédire l'évolution d'un système par exemple. Cependant, elles peuvent être couplées à des techniques de fractionnement afin d'obtenir des informations plus précises sur les caractéristiques des composés organiques présents au sein d'une même famille de molécules.

Tableau VIII : Synthèse des valeurs de FI reportées dans la littérature en fonction de l'origine de la MO

Origine de la MO		FI	Référence
AH	Charbon	1,0 - 1,2	Birdwell et Engel, (2010)
	Eaux de surface	1,0 - 1,3	Birdwell et Engel, (2010)
	Tourbe, sols	0,8 - 1,3	Birdwell et Engel, (2010)
AF	Rivière	1,3 - 1,5	McKnight <i>et al.</i> , (2001) Nguyen <i>et al.</i> , (2005)
	Lacs	1,6 - 1,9	McKnight <i>et al.</i> , (2001)
	Antarctique	1,7 - 2,0	McKnight <i>et al.</i> , (2001)
Eau interstitielle de sols		1,2 - 1,5	Wickland <i>et al.</i> , (2007)
Eau interstitielle de sédiments		1,5 - 1,8	Birdwell et Engel, (2010)
Amendement de sol		1,2 - 1,4	Hunt et Ohno, (2007)
Eaux de surface		1,23 - 1,28 1,16 - 1,43 1,15 - 1,22 1,46 - 1,83	Macalady et Walton-Day, (2009) Larsen <i>et al.</i> , (2010) Huguet <i>et al.</i> , (2009) Chen <i>et al.</i> , (2013)
Eau de source, eau souterraine		> 1,6	Birdwell et Engel, (2010)
Activité microbienne		> 2	Birdwell et Engel, (2010)
Matière Organique Algale		1,5 - 3	Nguyen <i>et al.</i> , (2005) Yang <i>et al.</i> , (2011)
Tryptone		> 2	Birdwell et Engel, (2010)

II.2.3. Ultrafiltration

De nombreuses techniques permettent de déterminer la répartition des tailles des molécules en mélange dans un échantillon comme le fractionnement par couplage flux-force (FFF), la chromatographie d'exclusion stérique (SEC), la dispersion des rayons X aux petits angles (SAXS), la dialyse ou l'ultrafiltration. L'ultrafiltration (UF) est très utilisée car elle présente l'avantage de ne pas nécessiter de réactifs et elle n'est pas destructive, ce qui permet d'éviter les modifications de structure de la MO. Cette technique a déjà été appliquée avec succès à des échantillons d'origines variées: eaux naturelles (Labanowski et Feuillade, 2009), lixiviats de décharge d'ordures ménagères (Lagier *et al.*, 2000 ; Berthe *et al.*, 2008) ou eaux usées (Imai *et al.*, 2002). L'UF consiste à appliquer une pression suffisante sur un liquide en contact avec une membrane semi-perméable pour que les molécules organiques, dont la taille est inférieure à celle des pores de la membrane, passent au travers de celle-ci. En UF, la notion de taille se rapporte au poids moléculaire apparent (PMA) et non à la taille proprement dite (Logan et Jiang, 1990). Chaque membrane est caractérisée par un seuil de coupure (exprimé en Daltons, Da) qui est défini comme le pouvoir d'arrêt de la membrane au dessus de laquelle 90% des molécules sont retenues. Un certain nombre de paramètres peuvent avoir une influence sur le passage des molécules au travers de la membrane tels que le pH, la force ionique, la pression appliquée, la température, la viscosité ou encore la concentration du

soluté. En effet, l'accumulation des molécules retenues à la surface de la membrane, appelée phénomène de polarisation de concentration, fait varier la sélectivité de la membrane, ce qui se traduit par une sous-estimation de la quantité de carbone contenue dans le perméat (Lagier *et al.*, 2000).

Le fractionnement par la taille est obtenu par passages successifs de l'échantillon sur des membranes de seuils de coupure différents. L'UF peut être utilisée soit en mode concentration, soit en mode diafiltration. Le mode concentration permet une analyse relativement rapide comparé au mode diafiltration, par passage de l'échantillon sur les différentes membranes et quantification des molécules dans le rétentat ou le perméat. La diafiltration consiste à maintenir un volume constant dans la cellule en remplaçant le volume ultrafiltré par une solution sans soluté mais à pH et force ionique identique à l'échantillon analysé, l'échantillon étant passé plusieurs fois sur la même membrane. Ceci permet d'éviter les phénomènes de polarisation de concentration. De plus, Logan et Jiang, (1990) ont montré que ce phénomène devient négligeable pour des concentrations inférieures à 100 mgC/L.

II.2.4. Indice SUVA

La détermination de l'indice SUVA (Specific UV Absorbance), qui est défini comme le rapport de l'absorbance UV à 254nm sur le COD, est un outil pertinent pour déterminer le caractère aromatique et hydrophobe des molécules organiques (Leenheer et Croué, 2003 ; Weishaar *et al.*, 2003). Plus le SUVA est élevé et plus les molécules sont aromatiques. Les molécules de SUVA élevé et donc à fort caractère aromatique et hydrophobe sont également de poids moléculaire plus élevé (Croué, 2004). Ainsi, l'utilisation d'un protocole de fractionnement sur résine combinée à la mesure de l'indice SUVA permet une bonne estimation du caractère aromatique et hydrophobe des fractions organiques et donc du déroulement des processus d'humification dans le milieu.

II.2.5. Protocoles de fractionnement selon le caractère hydrophobe

Le recours généralisé aux protocoles de fractionnement selon le caractère hydrophobe, basé sur l'utilisation de résines XAD, est associé à une certaine standardisation dans la mesure où l'adsorption des substances humiques sur résines XAD est reconnue par l'IHSS (International Humic Substance Society) comme méthode standard pour leur isolement et leur fractionnement. Ces protocoles ont posé les bases de la terminologie sur la matière organique (Labanowski, 2004). En effet, vu la complexité et l'hétérogénéité des composés organiques il n'est pas possible de définir de « structure type ». Il n'est alors plus question de chercher à identifier avec précision la structure des molécules organiques, mais de définir différentes fractions de composés organiques selon leurs propriétés chimiques (solubilité en milieu acide ou alcalin) et leur capacité à être retenues sur résines (caractère hydrophobe). Cependant, en l'absence de norme et de recommandations officielles, il existe une certaine liberté dans le choix des protocoles à utiliser dans la mesure où la littérature comporte un nombre important de protocoles de fractionnement sur résines XAD différents. Ainsi, les définitions données aux différentes fractions de matière organique peuvent varier d'un auteur à l'autre, en fonction des conditions expérimentales appliquées.

Les protocoles de fractionnement sur résines XAD sont très utilisés et ont déjà été appliqués avec succès sur des milieux très diverses : eaux du milieu naturel (Aiken *et al.*, 1992 ; Martin-Mousset *et al.*, 1997 ; Imai *et al.*, 2001 ; Labanowski 2004), lixiviats (Lagier, 2000 ; Labanowski, 2004 ; Berthe *et al.*, 2008 ; Parodi, 2010), eaux usées et boues de station d'épuration (Imai *et al.*, 2002 ; Pernet-Coudrier *et al.*, 2010), solutions de sols (Labanowski, 2004 ; Amery *et al.*, 2009).

Les Substances Humiques (SH) étant définies en fonction de leur mode d'extraction et non selon leur structure, le protocole de Thurman et Malcolm, (1981) modifié par Malcolm et MacCarthy, (1992) et Croué *et al.*, (1993), qui se déroule en trois étapes, permet à la fois de séparer, d'extraire et de concentrer des fractions de matière organique. Les Acides Humiques (AH), les composés hydrophobes (HPO), transphiliques (TPH) et hydrophiles (HPI) peuvent ainsi être séparés.

Chaque fraction est caractéristique de différents processus environnementaux et reflète l'origine de la matière organique. Wang *et al.*, (2009) ont montré que les composés hydrophobes, de haut poids moléculaires dérivent principalement d'une origine allochtone tandis que les composés hydrophiles, de faibles poids moléculaires, ont plutôt une origine autochtone. La répartition des différentes fractions permet également d'avoir des indications quant au degré d'humification du système. En effet, les processus d'humification tendant à complexifier et augmenter l'aromaticité et le poids moléculaire apparent des composés, l'humification dans le milieu naturel tend à transformer les HPI vers les TPH puis vers les HPO et AH, ceux-ci étant le stade ultime de maturation de la MOD.

Pour cette étude, différentes techniques analytiques permettant de quantifier et/ou caractériser la matière organique ont été choisies : indice SUVA, fractionnement selon le caractère hydrophobe, fractionnement de taille (ultrafiltration), spectroscopie de fluorescence 3D et spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

L'originalité de ce travail réside à la fois dans la caractérisation d'une matière organique relativement peu étudiée jusqu'alors, la matière organique algale (MOA), et dans le couplage des techniques analytiques : fractionnement selon le caractère hydrophobe - SUVA ou ultrafiltration ou fluorescence 3D ou spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Ce couplage a pour objectif d'effectuer une caractérisation plus poussée des composés organiques suite au premier "tri" assuré par le fractionnement sur résines XAD afin d'obtenir une signature de la MOA et tracer sa contribution dans le milieu naturel.

II.3. Matière Organique Algale

II.3.1. Définition

La Matière Organique Algale (MOA) est produite par le phytoplancton (algues, cyanobactéries, etc...) et regroupe la Matière Organique Cellulaire (MOC) et la Matière Organique Extracellulaire (MOE). La MOC est elle-même constituée de Matière Organique Intracellulaire (MOI) et de Matière Organique de Surface (MOS) (Figure 9). Cependant, en pratique, la MOC est souvent associée à la MOI car d'un point de vue expérimental, la séparation de la MOI et de la MOS est compliquée et la lyse cellulaire par sonication, souvent utilisée, entraîne le mélange de leurs contributions.

La Figure 10 montre la relation entre production de MOA et phase de croissance. Elle fait clairement apparaître une phase de latence courte suivie d'une phase de croissance exponentielle où la concentration en matière organique dissoute exprimée en termes de COD augmente rapidement. La Matière Organique Extracellulaire (MOE) est principalement composée de polysaccharides et de quelques protéines. Au cours de la phase exponentielle de croissance, la mortalité cellulaire est relativement faible, aussi la MOE est essentiellement produite par le métabolisme des micro-organismes et excrétée dans le milieu, par diffusion ou via des transporteurs à travers la membrane tandis que la contribution des composés libérés lors de la lyse cellulaire est relativement faible (Bernhardt *et al.*, 1989 ; Pivokonsky *et al.*, 2006). Ensuite, la phase stationnaire est caractérisée par une lente évolution de la concentration en COD. Au cours de l'avancement de la phase stationnaire, le début du déclin de la population conduit à une augmentation du taux de mortalité qui provoque ainsi une augmentation de la contribution des composés intracellulaires libérés dans le milieu environnant par lyse cellulaire. Enfin la phase de déclin est caractérisée par une accumulation rapide de COD due à l'autolyse des cellules et à la libération de la MOI. La cinétique de production de MOA est ainsi très dépendante de la phase de croissance et largement influencée par le déclin des populations.

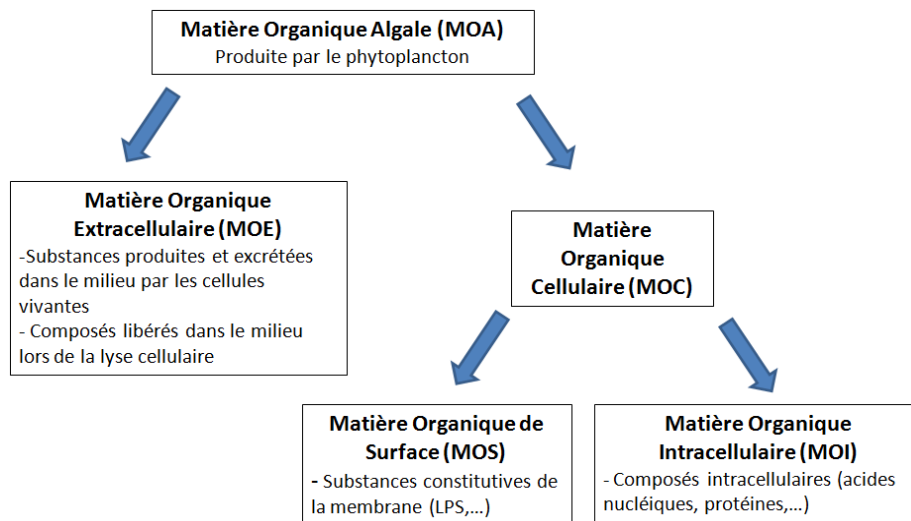


Figure 9 : Fractions constitutives de la Matière Organique Algale (MOA)

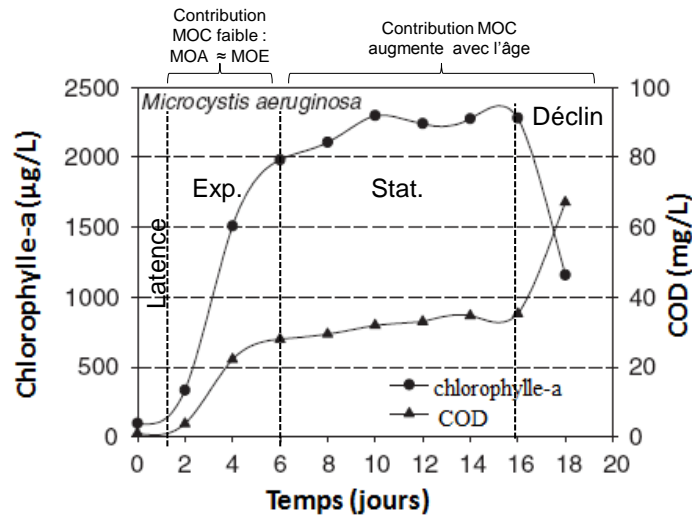


Figure 10 : Courbe de croissance et concentration en COD pour *M. aeruginosa* (d'après Pivokonsky *et al.*, 2006)

II.3.2. Production et caractéristiques de la Matière Organique d'origine Algale (MOA)

La quantité de Matière Organique Algale (MOA) dissoute générée par les algues et cyanobactéries au cours de leur croissance en laboratoire varie selon les espèces et les phases de croissance (Tableau IX). Cependant, d'un point de vue purement quantitatif, la majeure partie de la MOA est libérée au cours de la phase stationnaire et surtout au cours du déclin des populations.

Tableau IX : Production de MOA au cours des phases de croissance et de déclin d'algues et cyanobactérie (d'après Spinette, 2008)

Micro-organisme	<i>Scenedesmus quadricauda</i>			<i>Asterionella formosa</i>		<i>Microcystis aeruginosa</i>		
	Chlorophycée			Diatomée		Cyanobactérie		
Milieu de culture	Milieu Woods Hole			Milieu Chu-10		Milieu Chu-10 modifié		
Phases de croissance (jours de culture)	Exp.	Stat.	Déclin	Exp.	Déclin	Exp.	Stat.	Déclin
	0-11 ^{ème}	11-35 ^{ème}	Après 35 ^{ème}	0-14 ^{ème}	Après 19 ^{ème}	0 - 23 ^{ème}	31 - 51 ^{ème}	Après 51 ^{ème}
MOA (mgC/L)	2-5	5-14	14-22	5	6,5	4-14	33-100	130

Exp. = phase exponentielle ; Stat. = phase stationnaire

La MOA est majoritairement constituée de polysaccharides, de protéines (30-50% de la matière sèche algale selon González López *et al.*, (2010), de lipides, d'acides aminés et d'autres acides organiques tels que les acides gras (Cardozo *et al.*, 2007). Ses caractéristiques dépendent à la fois de l'espèce considérée, de la phase de croissance, et des conditions environnementales (composition du milieu de culture, intensité lumineuse, température)

(Tableau IX, Tableau X, Tableau XI). Par exemple, Zhang *et al.*, (2012) ont montré qu'une limitation de la quantité d'azote disponible est favorable à la production de lipides. Ceux-ci représentent respectivement environ 14.1, 25.6 et 34.6% de la masse sèche de cultures d'algues (*Chlorella zofingiensis*) en phase exponentielle, stationnaire et de déclin. De même, Huang *et al.*, (2012) ont montré que la proportion de composés hydrophiles augmente au sein la MOA lorsque le ratio N/P diminue. Cependant, malgré la très grande diversité des conditions de culture et indépendamment de l'espèce étudiée (Tableau X et Tableau XI), il ressort de la littérature que la MOA est majoritairement hydrophile (>50%) avec un faible SUVA (12 à 17 L/cm/gC). De plus, selon Her *et al.*, (2004) et Henderson *et al.*, (2008 et 2010), le caractère hydrophile de la MOA tendrait à s'accroître au cours de la phase exponentielle, car ces auteurs ont observé une diminution du SUVA. Cependant l'évolution du caractère hydrophobe n'a pas été clairement établie, et en particulier pour les phases de croissances suivantes.

Quelle que soit l'espèce considérée, la MOA est plus riche en carbohydrates (Tableau XII), majoritairement contenus dans les fractions TPH et surtout HPI, qu'en protéines. Selon Henderson *et al.*, (2008) 58-95% des carbohydrates sont contenus dans les fractions HPI et TPH et Qu *et al.*, (2012) ont même estimé cette proportion à 75-80% pour la seule fraction HPI. Les protéines sont, quant à elles, très majoritairement retrouvées dans la fraction HPO (60-65% selon Qu *et al.*, (2012)).

Il a également été constaté que la MOA présente un potentiel zêta négatif pour des gammes de pH entre 2 et 10 et que la densité de charge négative augmente avec le pH et varie selon les espèces et la phase de croissance considérée (Henderson *et al.*, 2008). Dans la littérature, le potentiel zêta des cellules durant la phase exponentielle est généralement compris entre -30 et -10 mV, pour des pH proches de la neutralité (Martinez *et al.*, 2008 ; Henderson *et al.*, 2008 ; Hadjoudja *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2012). De plus, le potentiel zêta tend à diminuer avec l'âge des cultures (Zhang *et al.*, 2012).

Tableau X: Répartition des fractions HPO, TPH et HPI au sein de la MOA issue de cultures d'algues en laboratoire, au cours des phases de croissance exponentielle et stationnaire.

Phase de croissance	Reference	Fractions (%)			Espèce étudiée	Milieu de culture	Luminosité Cycle jour/nuit	T (°C)
		HPO	TPH	HPI				
Exp.	Henderson <i>et al.</i> , (2008)	22	18	60	<i>Chlorella vulgaris</i>	Jaworski	Non précisée 14h/10h	20°C
Stat.	Nguyen <i>et al.</i> , (2005)	25		75	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Milieu inorganique Hoehn <i>et al.</i> , (1980)	95 µmol.m ⁻² .s ⁻¹	26°C
	Henderson <i>et al.</i> , (2008)	11	18	71	<i>Chlorella vulgaris</i>	Jaworski	Non précisée 14h/10h	20°C

Exp. = phase exponentielle ; Stat. = phase stationnaire

Partie 1. Synthèse bibliographique

Tableau XI: Répartition des fractions HPO, TPH et HPI au sein de la MOA issue de cultures de cyanobactéries en laboratoire, au cours des phases de croissance exponentielle et stationnaire.

Phase de croissance	Reference	Fractions (%)			Espèce étudiée	Milieu de culture	Luminosité Cycle jour/nuit	T (°C)
		HPO	TPH	HPI				
Exp.	Li <i>et al.</i> , (2012)	31	6	63	<i>M. aeruginosa</i>	BG11	Non précisée	25°C
	Henderson <i>et al.</i> , (2008)	24	17	59	<i>M. aeruginosa</i>	Jaworski	Non précisée 14h/10h	20°C
Stat.	Zhang <i>et al.</i> , (2011)	19	18	63	<i>M. aeruginosa</i>	BG11	Non précisée 12h/12h	23-24°C
	Her <i>et al.</i> , (2004)	26	17	57	Cyanobactéries issues de Klamath Lake, USA			
	Henderson <i>et al.</i> , (2008)	30	13	57	<i>M. aeruginosa</i>	Jaworski	Non précisée 14h/10h	20°C
	Qu <i>et al.</i> , (2012)	42	6	52	<i>M. aeruginosa</i>	BG11	5000 lux 14h/10h	25°C

Exp. = phase exponentielle ; *Stat.* = phase stationnaire

Tableau XII : Principales caractéristiques de la matière organique d'origine algale (Henderson *et al.*, 2008 et 2010)

Micro-organisme	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Microcystis aeruginosa</i>		<i>Asterionella formosa</i>		<i>Melosira spp.</i>
	Chlorophycée		Cyanobactérie		Diatomée		Diatomée
Phase de croissance	Exp.	Stat.	Exp.	Stat.	Exp.	Stat.	Stationnaire
MOA (10 ⁻¹² gC/cellule)	ND	2,9	ND	0,95	ND	19	650
HPO (%)	22	11	24	30	15	20	32
HPI (%)	60	71	59	57	73	70	64
SUVA (L/cm/gC)	12.9	5.4	16.5	4.8	17	5.4	5.8
MOA>30kDa (%)	ND	62	ND	55	ND	9	30
MOA<1kDa (%)	ND	30	ND	38	ND	81	53
Densité de charge (meq/g)	0.9	3.2	0.2	0.1	Négligeable	1.0	Négligeable
Ratio Carbohydate/COD (mg-glucose/mg-C)	0.9	1.1	1.0	0.7	ND	1.0	0.8
% de carbohydrates dans les fractions HPO et TPH	65	95	64	77	58	90	83
Ratio Proteine/COD (mg BSA/mg-C)	0.53	0.40	0.40	0.64	ND	0.19	0.16
Ratio Protéine/carbohydate (mg/mg)	0.58	0.4	0.30	0.6	ND	0.2	0.2

Exp. = phase exponentielle ; *Stat.* = phase stationnaire

L'étude de la répartition des poids moléculaires apparents des constituants de la MOA montre un caractère bimodal (Tableau XII) : selon les espèces, 9-62% des molécules de la MOA ont un PMA supérieur à 30 kDa et 30 à 81% d'entre elles ont un PMA inférieur à 1 kDa (Henderson *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2011). La contribution des molécules de petites tailles est ainsi très importante au sein de la MOA, en accord avec son caractère hydrophile marqué et sa faible aromaticité.

Une autre spécificité de la MOA est la distribution et la composition des acides gras et des alcanols. Elle constitue un marqueur de la prédominance de matière organique d'origine autochtone (algues, zooplancton, bactéries). En effet, les acides alcanoïques en C₁₈ mono ou polyinsaturés sont des marqueurs d'activité biologique issus des contributions d'algues, de bactéries et de cyanobactéries (Bechtel et Schubert, 2009).

II.3.3. Caractéristiques de la Matière Organique Cellulaire (MOC) et de la Matière Organique Extracellulaire (MOE)

Pivokonsky *et al.*, (2006) ont étudié la relation entre phase de croissance, quantité et caractère protéique de la MOA produite par différents micro-organismes photosynthétiques dont *Microcystis aeruginosa* (Figure 11). Ces auteurs ont montré que la composition de la MOI diffère de celle de la MOE. En effet, la MOE est principalement composée de polysaccharides et de molécules à caractère non protéique, cependant il a été observé une augmentation de la part de la fraction protéique au sein de la MOE au cours du temps, aussi bien pour les cyanobactéries que pour les algues vertes. Cette augmentation est due à l'apport, de plus en plus importante, de MOI due à la lyse cellulaire avec l'âge des cultures. En effet, un fractionnement selon le poids moléculaire apparent des protéines constitutives de la MOE et de la MOI, au cours de la croissance, a confirmé l'augmentation de la quantité de protéines au sein de la MOE due à la libération de constituants cellulaires, avec l'âge de la culture (Pivokonsky *et al.*, 2006). La diversité de ces protéines ne varie pas au cours des phases exponentielle et stationnaire (deux pics caractéristiques autour de 20 kDa et plus de 900 kDa pour les cyanobactéries contre un seul autour de 20 kDa pour les algues vertes), mais commence seulement à changer avec la destruction des cellules (apparition d'une plage de pics entre 20 et 400 kDa similaire à celle de la MOI), lorsque les composés intracellulaires sont libérés dans le milieu. Par contre, cette augmentation de la fraction protéique est plus marquée dans le cas des cyanobactéries que dans celui des algues vertes, probablement à cause de l'accumulation intracellulaire des protéines comme source d'énergie pour les cyanobactéries (Hoek *et al.*, 1995), expliquant la plus forte proportion de protéines retrouvées au sein leur MOI. Le déclin des populations semble donc également avoir un impact sur les propriétés de la MOA.

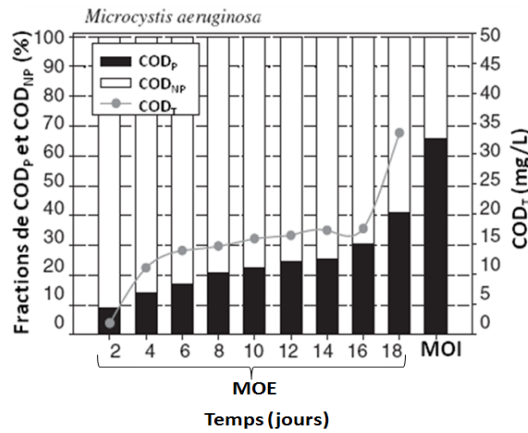


Figure 11 : Proportions de COD_p (carbone organique dissous de la fraction protéique) et COD_{NP} (carbone organique dissous non protéique) du COD_T (carbone organique dissous total) de la MOE et de la MOI de *M. aeruginosa* (d'après Pivokonsky *et al.*, 2006)

Fang *et al.*, (2010), Li *et al.*, (2012) et Qu *et al.*, (2012) ont également montré que les propriétés de la MOE sont différentes de celles de la MOC, bien que toutes deux soient riches en azote comparativement à la MON. En effet, selon Qu *et al.*, (2012) la MOE est plus riche en composés hydrophiles que la MO constitutive de la paroi cellulaire (MOS) (Tableau XIII) Ces auteurs ont également montré que la proportion de molécules de hauts poids moléculaires apparents (> 100kDa) est plus importante au sein de la MOS que de la MOE. De plus, les protéines constitutives de la MOS sont très majoritairement de PMA élevés, contrairement à la MOE. A l'inverse, une part importante des polysaccharides cellulaires et extracellulaires présente un faible PMA (< 1 kDa). Enfin, le potentiel zêta des constituants cellulaires est plus élevé que celui de la MOE, ce qui explique les résultats obtenus par Zhang *et al.*, (2012) dans la mesure où la libération de composés cellulaires par autolyse au cours de la phase de déclin tendrait à augmenter le potentiel zêta.

Tableau XIII: Comparaison des propriétés de la MOE et de MOS issues de cultures en laboratoire de *M. aeruginosa* au cours de la phase stationnaire (Qu *et al.*, 2012)

	Fractionnement selon le caractère hydrophobe			Fractionnement de taille		Répartition protéines	Répartition polysaccharides		Potentiel Zêta
	HPO	TPH	HPI	> 100 kDa	< 1 kDa	> 100kDa	> 100 kDa	< 1 kDa	(mV)
MOS	59%	5%	36%	75%	15%	70%	28%	34%	-14.6
MOE	42%	6%	52%	42%	26%	28%	30%	42%	-26.2

Fang *et al.*, (2010) ont notamment montré que comparativement à la MOE, la MOI est plus riche en azote et en acides aminés libres. De plus, la part de composés hydrophobes et de hauts poids moléculaires est plus importante au sein de la fraction riche en azote de la MOI que de la MOE.

Les caractéristiques de la MOA ont été largement étudiées au cours des phases de croissance exponentielle et stationnaire. Au cours de la phase exponentielle et du début de la phase stationnaire, la mortalité cellulaire est faible et la MOA peut être assimilée à la MOE. Cependant, les propriétés des composés libérés par le métabolisme cellulaire sont différentes de celles des constituants cellulaires, or, la contribution de ces derniers tend à augmenter avec l'âge des cultures. Comment évoluent les caractéristiques de la MOA au cours du déclin des populations ?

De plus, l'évolution des caractéristiques de la MOA au cours de différentes phases de croissance implique très probablement une modification des impacts sur les procédés de traitement des eaux et notamment la coagulation-floculation, dont les performances sont largement dépendantes des propriétés de la MO à traiter. Ainsi, comment les performances de ce procédé sont affectées au cours des différentes phases de croissance ?

II.4. Matière organique naturelle des eaux de surface

La quantité de matière organique dans les eaux de surface peut varier selon les conditions hydrologiques du milieu et la végétation du bassin versant mais elle dépend également des saisons et du climat, qui font varier l'intensité de l'activité biologique notamment au niveau de la production primaire. La production de matière organique par les végétaux et le phytoplancton ainsi que les processus de décomposition de la matière organique sont les principaux facteurs influençant la concentration en COD dans l'eau. Thurman, (1985) estimait la concentration moyenne en COD des eaux de rivière autour de 5mgC/L, celle des lacs oligotrophes autour de 2mgC/L et celles des lacs eutrophes autour de 10mgC/L. Cependant, il a été constaté une augmentation de la teneur en COD des eaux de surface en particulier en Amérique du Nord et en Europe au cours des vingt dernières années. Ainsi, les valeurs les plus fréquemment rencontrées sont comprises entre 1 et 20mgC/L (Skjelkvaale, 2003 ; Evans *et al.*, 2005). Cette augmentation serait probablement due à l'action combinée de la réduction des dépôts acides et de l'augmentation des températures (Evans *et al.*, 2005).

Le Tableau XIV présente les principales caractéristiques des fractions constitutives de la MON (Croué, 2004 ; Labanowski, 2004, Swietlik *et al.*, 2004 ; Świetlik et Sikorska, 2004 ; Pernet-Coudrier, 2008 ; Labanowski et Feuillade, 2009). Dans les eaux naturelles, la fraction HPO est majoritaire et résulte principalement d'une contribution allochtone véhiculée par les eaux de ruissellement. En moyenne, les poids moléculaires apparents ainsi que les indices SUVA des HPO sont supérieurs à ceux des TPH, qui sont eux-mêmes plus élevés que ceux des HPI. Les valeurs d'indice SUVA généralement rencontrées dans les eaux naturelles varient entre 15 et 50 L.cm⁻¹.gC⁻¹ (Edzwald, 1993 ; Gray *et al.*, 2007 ; Teixeira et Rosa, 2007; Labanowski et Feuillade, 2009). Edzwald (1993) estime que dans les eaux dont le SUVA est supérieur à 40 L.cm⁻¹.gC⁻¹ les molécules hydrophobes, à fort caractère aromatique et de hauts poids moléculaires sont majoritaires tandis que dans les eaux dont le SUVA est inférieur à 30 L.cm⁻¹.gC⁻¹, les substances non humiques sont très présentes et la MO est relativement hydrophile, moins aromatique et de faible poids moléculaire.

Des différences dans les caractéristiques de la MON ont été mises en évidence en fonction du type de ressource et de l'origine de la MO. En effet, Imai *et al.*, (2001) ont observé que la part des composés hydrophiles est plus importante et le SUVA plus faible dans les lacs comparé aux eaux de rivière, car la contribution autochtone y est plus marquée. Cheng et Chi, (2003) ont montré une relation directe entre le phénomène d'eutrophisation et la concentration en MOD : les variations de concentration en COD suivent celles de la chlorophylle a. Par ailleurs, une augmentation de la part des molécules de petites tailles a également pu être mise en évidence, en lien avec les caractéristiques de la MOA. Par contre, même si les valeurs d'indices SUVA diminuent avec le développement des algues, il n'a pas été trouvé de relation directe entre SUVA et chlorophylle a. Cependant, la relation entre COD et chlorophylle a demeure controversée. En effet, Minor *et al.*, (2006) n'ont, quant à eux, pas mis en évidence de corrélation entre ces deux paramètres. Si le développement des algues et cyanobactéries a un impact qualitatif et quantitatif sur la MOD, le déclin des populations semble également avoir une influence, avec la libération d'une grande quantité de MO liée à la lyse cellulaire (Ye *et al.*, 2011). Ces auteurs ont montré que la fin des blooms provoque un enrichissement des composés de hauts poids moléculaires, avec une augmentation de la part des carbohydrates ainsi que des composés azotés, caractéristiques de la MOA. Il semble donc que le développement du phytoplancton et son déclin influent sur les caractéristiques de la matière organique mais ces relations n'ont pas été clairement définies.

Dans les eaux du milieu naturel, la matière organique est soumise à un ensemble de transformations biotiques (processus biologiques) et abiotiques (photochimie) qui conduisent progressivement à sa stabilisation. Selon Guillemette *et al.*, (2013), la MOA est consommée préférentiellement par les bactéries hétérotrophes, comparativement à la MO d'origine allochtone. Loïselle *et al.*, (2009) ont, quant-à eux, montré l'importance de la photochimie sur l'évolution des propriétés de la MON et surtout sur les composés d'origine allochtone "jeunes". Deux mécanismes interviennent dans ces transformations (Loïselle *et al.*, 2012) :

- l'absorption d'un rayonnement à une longueur d'onde inférieure à 300nm (photochimie directe),
- la production d'espèces réactives radicalaires ou de MO dans un état excité (photochimie indirecte), qui vont à leur tour réagir avec la MON.

Xu et Jiang, (2013) ont montré que les SH sont de bien meilleurs promoteurs de réactions induites par photochimie indirecte que la MOA. Ainsi, l'irradiation aux UV dégrade la MON de façon plus importante et plus rapidement que la MOA et l'influence des processus biologiques et abiotiques et largement dépendante des propriétés des composés organiques.

Les caractéristiques de la MOA sont différentes de celles de la MON. Les blooms algaux et de cyanobactéries sont des phénomènes récurrents qui génèrent une grande quantité de composés organiques. Cependant, l'ampleur et la nature des modifications engendrées par ces apports sur les caractéristiques de la MON sont encore méconnues. Les conséquences de ces apports sont-elles visibles à court, à moyen ou à long terme ? Sont-elles irréversibles ?

Tableau XIV: Principales caractéristiques des fractions constitutives de la MON (Croué, 2004 ; Labanowski, 2004 ; Swietlik *et al.*, 2004; Świetlik et Sikorska, 2004 ; Pernet-Coudrier, 2008 ; Labanowski et Feuillade, 2009).

		Fraction	Répartition dans le milieu naturel	Composition	Aromaticité Hydrophobicité	Distribution des PMA	SUVA (L/cm/gC)	C/N/O	Caractéristiques	Origine
Substances Humiques (SH)	Acides humiques	AH	8-10%	Macromolécules	+++	> 30 kDa: 40% 30-3 kDa: 35% 0.5-3 kDa: 10% < 0.5 kDa: 15%	23-40	Riche en phénols, composés aromatiques	- Molécules possédant de nombreux cycles aromatiques, à fort caractère hydrophobe - Difficilement biodégradable	allochtone
	Acides fulviques AF	HPO	50-60%	Macromolécules aromatiques dérivées de la cellulose et lignine	++	> 30 kDa: 18% 30-3 kDa: 20% 0.5-3 kDa: 40% < 0.5 kDa: 32%	18-34	Riche en carbone aromatique Ratio C/O, C/N, C/H élevés Pauvre en azote et en fonctions C-O COOH, O-C-O	- Fraction la plus réactive à une oxydation chimique - Fort degré d'insaturation - Carbohydre le plus abondant : glucose - Réfractaire à la biodégradation	allochtone
Substances non Humiques		Acides fulviques AF	TPH	15-25%	Protéines, polysaccharides, Acides aminés	+	> 30 kDa: 6% 30-3 kDa: 20% 0.5-3 kDa: 37% < 0.5 kDa: 37%	13-21	Fraction intermédiaire	- Fraction plus importante en milieu aquatique que dans les autres milieux (lixiviats, sols) - Carbohydre le plus abondant : galactose
	HPI		20-30%	Protéines, polysaccharides, AGV, Acides aminés	-	> 30 kDa: 5% 30-3 kDa: 10% 0.5-3 kDa: 30% < 0.5 kDa: 55%	7-13	Riche en azote et en fonctions C-O COOH O-C-O	- Facilement biodégradable - Indicateur de l'activité biologique des micro-organismes (algues, bactéries,...) - Concentrée en sels - Molécules à faible degré d'insaturation	autochtone

II.5. Processus d'humification

Dans le milieu naturel, la matière organique difficilement biodégradable issue des mécanismes de dégradation biologique et d'oxydation chimique de débris végétaux et animaux subit une lente transformation, conduisant à la formation de molécules réfractaires à la biodégradation, appelées Substances Humiques (SH) (Thurman, 1985). Ces modifications s'effectuent par l'intermédiaire de réactions biotiques (action de micro-organismes) et abiotiques (photo-oxydation par exemple). L'ensemble des processus aboutissant à la formation des SH est appelé "humification" de la matière organique. Les SH sont composées d'humines, d'Acides Humiques (AH) et d'Acides Fulviques (AF), qui sont expérimentalement définies par les conditions de pH (Thurman, 1985) :

- les humines sont insolubles à tous pH
- les acides humiques (AH) sont insolubles à pH acide ($\text{pH} < 2$)
- les acides fulviques (AF) sont solubles à tous pH et représentent entre 80 et 90% des SH

Les SH sont des macromolécules hydrophobes et aromatiques de structures complexes et hétérogènes avec des poids moléculaires variables, qui sont souvent responsables de la coloration brune des eaux. Elles ont des propriétés de polyélectrolyte anionique dues à la présence de groupements fonctionnels acide carboxylique et phénolique. Dans les eaux naturelles, elles représentent entre 50 et 75% du COD et constituent donc la fraction majoritaire des composés organiques (Thurman, 1985). L'architecture de ces molécules est si complexe qu'il n'est pas possible, en l'état actuel des connaissances scientifiques, d'identifier précisément leur structure ou leur composition, qui sont d'ailleurs variables d'un environnement à un autre. Les processus d'humification combinent une succession d'étapes de décomposition et de réassemblage des fragments produits, qui tendent à générer des composés de plus en plus complexes, aromatiques et de poids moléculaires apparents de plus en plus élevés (Zech *et al.*, 1989 et 1992 ; Merritt et Erich, 2003). Pour expliquer la formation des SH, il existe deux types de modèles : les modèles polymériques et ceux par agrégation.

- Modèles polymériques

Les processus d'humification sont étudiés depuis des décennies et la plupart des théories élaborées pour décrire la formation des SH à partir de débris végétaux ou animaux se sont appuyées sur des observations issues de l'étude des sols. Stevenson, (1982) rapporte quatre principales théories de formation des SH (Figure 12). Les débris organiques seraient, dans un premier temps, dégradés par les micro-organismes en fragments et unités structurelles simples (sucres, acides aminés) ou en molécules dérivées de leur précurseurs (lignine modifiée, polyphénols). Ces produits de dégradation seraient, dans un second temps, réassemblés en SH par des réactions de polymérisation lentes.

- Voie 1 : théorie de la lignine modifiée

Les SH proviendraient de fragments de lignine dégradés et modifiés par des micro-organismes entraînant la perte de groupes méthoxyl (OCH_3) et la génération de o-hydroxyphénols ainsi que l'oxydation des chaînes latérales aliphatiques. La lignine modifiée s'associerait entre autres avec des composés azotés de type protéique. L'ordre de formation des SH par dégradation de la lignine serait : lignine \rightarrow Humines \rightarrow AH \rightarrow AF (Stevenson, 1994).

- Voies 2 & 3 : théorie des polyphénols

Selon cette théorie, les SH proviendraient de combinaisons de biopolymères issus de la biodégradation des végétaux et d'autres constituants organiques. Dans la voie 2, les polyphénols sont synthétisés par des micro-organismes à partir de sources de carbone non-ligneuse telles que la cellulose ou l'hémicellulose. Ces polyphénols bactériens conduiraient à la formation de SH sous l'action d'enzymes polyphénoloxydase qui les transformeraient en quinones, puis par association de celles-ci avec d'autres constituants de la matière organique comme les acides aminés. Dans la voie 3, les polyphénols sont formés par décomposition de la lignine en ses unités structurales primaires (unités phényl propène) qui vont être déméthylées et oxydées en polyphénols. Ces polyphénols vont, comme ceux d'origine bactérienne, conduire à la formation de SH. L'ordre de formation des SH par la voie des polyphénols est : polyphénols \rightarrow AF \rightarrow AH \rightarrow Humines (Stevenson, 1994).

- Voie 4 : condensation des sucres et acides aminés (réaction de type Maillard)

Les sucres et les acides aminés issus du métabolisme bactérien et de la biodégradation des matières organiques se polymériseraient par condensation abiotique. Au cours de cette réaction, appelée réaction de Maillard, une fonction amine est ajoutée au groupement aldéhyde d'un sucre pour former une glycosamine N substituée (Cheshire *et al.*, 1992). Cette glycosamine pourrait soit se décomposer en aldéhydes et cétones (acetol et diacetyl), soit se réorganiser selon le réarrangement d'Amadori pour former une cétosamine N substituée. Selon les conditions du milieu, un furfural (forte déshydratation) ou une réductone (déshydratation modérée) seraient formés à partir de cette cétosamine. Cependant, la formation des SH par la réaction de Maillard est assez controversée (Sutton et Sposito, 2005 ; Von Lützow *et al.*, 2006) en particulier pour les milieux aquatiques car elle nécessite des pH et des températures élevés sinon elle est extrêmement lente. Dans les sols elle peut être catalysée par des oxydes de fer ou de manganèse tels que la birnessite, qui est généralement abondante (Jokic *et al.*, 2001 ; Qi *et al.*, 2012).

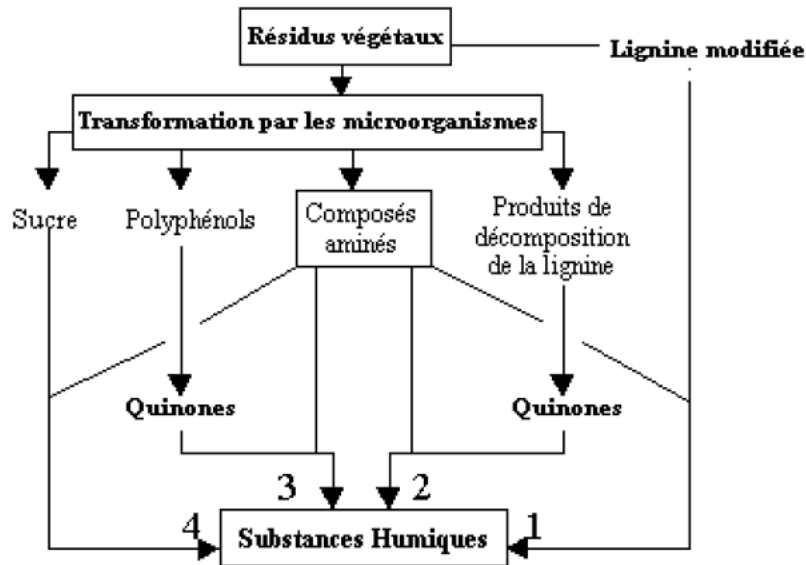


Figure 12: Mécanismes de formation des substances humiques d'après Stevenson, (1982) (source: Labanowski, 2004)

D'autres théories ont été élaborées à partir des quatre précédentes :

- *Théorie de la préservation sélective : substances humiques végétales*

Selon cette théorie, les SH seraient formées à partir de la modification et de la préservation des tissus végétaux (Hatcher et Spiker, 1988 ; Kögel-Knabner *et al.*, 1992) et notamment la lignine, la cutine et la subérine. La lignine est moins facilement dégradée par les micro-organismes que les autres constituants des tissus végétaux tels que les polysaccharides ou les lipides. Elle a donc tendance à s'accumuler dans les premières phases de dégradation. Les champignons sont capables de dégrader complètement la lignine par des mécanismes de dégradation aérobie. Or les SH sont également retrouvées dans les sédiments lacustres ou les sols faiblement drainés même en l'absence de champignons et d'oxygène. Fengel et Wegener, (1989) et Showalter, (1993) concluent qu'une partie des tissus végétaux est constituée de noyaux de type humique, dans lesquels des composés aromatiques (lignine), et aliphatiques (cutine), des hydrates de carbone (hémicellulose) et des protéines s'agencent pour former une structure chimique stable. La lignine et ses dérivés sont considérés comme les principaux précurseurs des substances humiques (Johansson *et al.*, 1994), mais les polymères aliphatiques interviennent également (Almendros *et al.*, 2000). Tegelaar *et al.*, (1989) indiquent que des polyesters naturels (cutines et subérines) qui sont peu décomposés et d'autres molécules aliphatiques non hydrolysables et insolubles servent également de précurseurs aux acides humiques.

- *Théorie de la réaction combinée polyphénols-Maillard*

Selon cette théorie, il est peu probable que dans des environnements naturels la voie des polyphénols et la réaction de Maillard aient lieu séparément. En effet, sucres, protéines et polyphénols coexistent aussi bien dans les sols que dans les eaux. Jokic *et al.*, (2004) ont

montré que le processus d'humification par réaction combinée polyphénols-Maillard était considérablement accéléré en présence de birnessite et qu'elle conduit plus efficacement à la formation de SH que la seule réaction de Maillard.

- Modèle par agrégation

- *Théorie des supramolécules*

Toutes les théories précédentes reposent sur l'idée que les SH sont formées de polymères de structures chimiques différentes de leurs précurseurs, liés par liaison covalente (Wershaw, 2004). Cependant, par opposition à ces modèles "polymériques", d'autres modèles se sont progressivement développés, les modèles par "agrégation". Selon ce type de modèles, les SH seraient constituées d'agrégats supramoléculaires de fragments de faibles poids moléculaires apparents (1000 à 1500 Da) issus de la dégradation de végétaux, liés par des liaisons non covalentes telles que les interactions π - π , les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogène ou encore les forces de Van der Waals (Wershaw, 1994 ; Piccolo, 2001 et 2002 ; Sutton et Sposito, 2005). Les agrégats ainsi formés s'assemblent en large conformations de haut poids moléculaires par des liaisons faibles qui peuvent aisément être dissociées par ajout d'acide organique.

Il n'existe pas de preuve évidente pour privilégier l'un ou l'autre des modèles et aucune théorie n'apparaît plus probable que les autres. La formation des substances humiques résulte très probablement de la combinaison de plusieurs mécanismes en même temps - la contribution relative de chacun étant certainement dépendante du type d'environnement et des conditions bio-physico-chimiques qui y règnent. De plus, des composés répondant aux propriétés des AH et AF peuvent être produits à différents stades du turn-over de la matière organique, en phase de dégradation ou d'humification. Cependant, il est très difficile de discerner les SH produites par les processus d'humification de celles générées par les phénomènes de dégradation. En outre, la présence de substances de type humique a déjà été rapportée au sein même des tissus végétaux. L'étude des processus d'humification est ainsi très complexe et en constante évolution.

Les mécanismes d'humification sont très étudiés dans les sols, cependant, les caractéristiques et la composition de la matière organique diffèrent selon les milieux. Dans les milieux terrestres, la contribution des végétaux est prédominante tandis que celle de la biomasse microbienne représenterait moins de 5% du carbone organique total (Kassim et al., 1981). Dans les milieux aquatiques, la contribution des micro-organismes est bien plus marquée et en particulier dans les milieux eutrophes. Les processus d'humification sont ainsi potentiellement différents selon les environnements et peuvent aboutir à des SH de propriétés différentes car issues de précurseurs de caractéristiques différentes. Il apparaît ainsi nécessaire de mieux comprendre les modifications subies par la matière organique produite par le phytoplancton au cours de sa transformation pour appréhender, sur le long terme, les impacts de l'eutrophisation sur les caractéristiques de la matière organique naturelle et également sur les procédés de traitement des eaux.

III. Impacts des blooms algaux et de cyanobactéries sur les procédés de traitement des eaux: cas de la coagulation-floculation

La clarification des eaux a pour objectifs d'éliminer les particules en suspension (sables, limons, argiles, débris végétaux, bactéries, phytoplancton, etc...), les particules colloïdales ainsi qu'une partie des matières dissoutes dont le fer, le manganèse et les matières organiques dissoutes, qui sont à l'origine de la couleur et de la turbidité. La clarification comprend l'association des étapes de coagulation, floculation, décantation ou flottation et filtration. La coagulation-floculation permet, par ajout de sels de fer ou d'aluminium, de déstabiliser les particules colloïdales contenues dans l'eau et donc favoriser leur agglomération. La formation de floes favorise ensuite la décantation des particules ou améliore leur rétention par filtration. La mesure de la turbidité assure le contrôle du bon fonctionnement de la clarification et la législation impose ainsi une valeur maximale de turbidité de 0.5 NTU en sortie de filtration (qui permet une élimination efficace des protozoaires tels que *Cryptosporidium* ou *Giardia*), de 1 NTU pour l'eau traitée et de 2 NTU pour l'eau distribuée. La coagulation-floculation est donc une étape importante dans la clarification, qui peut être précédée d'une étape de pré-oxydation, permettant d'améliorer ses performances.

Pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, il faut considérer la problématique « cyanobactéries » comme triple : l'élimination des cellules de cyanobactéries, l'élimination des cyanotoxines et l'élimination de la Matière Organique Algale (MOA). Concernant l'élimination des cyanobactéries, les méthodes de traitement ne conduisant pas à une lyse cellulaire sont à privilégier dans la mesure où Negri *et al.*, (1997), Chorus et Bartram, (1999) et Hawkins *et al.*, (2001) estiment qu'au moins 80 à 90% des cyanotoxines totales sont en fait retenues à l'intérieur des cellules pendant la phase exponentielle de croissance. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire puis lors de la sénescence, le taux de mortalité est plus important et la proportion de cyanotoxines extracellulaires augmente (Sivonen, 1990 ; Lehtimäki *et al.*, 1997 ; Rapala *et al.*, 1997). En effet, Saker et Griffiths, (2000) et Hawkins *et al.*, (2001) estiment le taux de cyanotoxines extracellulaire à plus de 50% en phase stationnaire. Au cours des procédés de traitement, s'il y a lyse cellulaire, les cyanotoxines sont libérées dans le milieu et il faut alors reconsidérer la problématique « cyanotoxines », tandis que les méthodes piégeant la biomasse sans lyse cellulaire permettent de limiter les risques de relargage de cyanotoxines et donc de considérer la problématique « cyanobactérie » de façon plus globale. Les proliférations d'algues sont seulement à l'origine de deux problématiques (élimination des cellules et de la MOA) car elles ne produisent pas de toxines.

En outre, la matière organique générée en abondance lors des phénomènes de blooms algaux ou de cyanobactéries a de nombreux impacts sur les étapes chimiques des procédés de traitement des eaux devant être considérés afin d'assurer la qualité de l'eau distribuée.

III.1. Pré-oxydation : chloration, ozonation et permanganate de potassium

Très souvent, une étape de pré-oxydation est effectuée avant le processus de clarification. Elle permet d'oxyder les ions métalliques (principalement fer et manganèse) ainsi que partiellement certaines matières organiques dissoutes pour favoriser leur élimination. Elle permet aussi d'améliorer la coagulation-floculation par déstabilisation des colloïdes, d'éliminer les molécules responsables des goûts et des odeurs ainsi que les algues et cyanobactéries par lyse cellulaire (ASTEE, 2006). Différents réactifs sont utilisés pour cette étape : chlore, dioxyde de chlore, ozone ou permanganate de potassium. L'effet de l'oxydant sur l'élimination des algues ou cyanobactéries dépend à la fois du type d'oxydant, du dosage appliqué et de l'espèce à éliminer, probablement à cause de propriétés de surface différentes (Chen *et al.*, 2009).

L'utilisation du chlore en tête de filière de traitement pour les eaux de surface n'est plus autorisée en France depuis 2007 (Circulaire DGS NDGS/EA4 n° 2007-259 du 26 juin 2007), car il forme avec certains composés organiques (acides humiques et fulviques) des Trihalométhanes (THM) cancérigènes, faisant l'objet d'une norme (THM totaux <100µg/L selon l'arrêté du 11 janvier 2007). Par ailleurs, Nguyen *et al.*, (2005), ont montré que la MOA formait, par réaction avec le chlore, des chloroformes (acide dichloroacétique et trichloroacétique).

De nombreux auteurs se sont intéressés au traitement des cyanotoxines par l'ozone (Donati *et al.*, 1994 ; Shawwa et Smith, 2001 ; Maatouk *et al.*, 2002). Selon Rositano *et al.*, (1998), l'ozone serait plus efficace que le chlore et le permanganate de potassium pour la destruction des cyanotoxines, cependant l'efficacité de l'ozone est dépendante des conditions de pH (efficacité réduite en milieu alcalin). Au cours du traitement, l'ozone réagit très rapidement avec les composés organiques, et à faibles doses, il n'a que peu d'effet sur les cyanotoxines. Ce n'est qu'une fois que la demande en O₃ due au COD a été satisfaite que l'effet est plus important. Ainsi, en dessous de 0,6 mg/L, l'ozone réagit principalement avec la matière organique. Entre 0,6 et 1,3mg/L, l'ozone n'a pour effet que de lyser les cellules et donc libérer les cyanotoxines intracellulaires sans les éliminer. Ce n'est seulement que pour des doses d'environ 2 mg/L que l'ozone réagit avec les cyanotoxines et a un effet significatif sur leur élimination (Chorus & Bartram, 1999). Ainsi, l'efficacité de l'ozonation pour la destruction des cyanotoxines est réduite par une concentration élevée en COD et une forte densité de cyanobactéries (Hoeger *et al.*, 2002).

La pré-ozonation peut conduire à une perte d'intégrité membranaire, entraînant un relargage des composés cytoplasmiques, des cyanotoxines intracellulaires et de composés volatiles responsables de goûts et d'odeurs (Huang *et al.*, 2008 ; Miao et Tao, 2009). Les métabolites et toxines libérés par les cyanobactéries ou les algues augmentent la demande chimique en oxydant et conduisent également à la formation de sous-produits d'oxydation (Westrick *et al.*, 2010). Huang *et al.*, (2008) ont également montré que la pré-ozonation de cultures de cyanobactéries et d'algues conduit à la formation de près d'une vingtaine de sous-produits, principalement des aldéhydes et phtalates. En outre, l'ozone est plus efficace que le chlore pour détruire les cellules. En effet, Daly *et al.*, (2007) ont montré qu'une exposition au chlore entre 7 et 29 mg.min.L⁻¹ provoquait une lyse cellulaire tandis qu'une très faible

exposition à l'ozone ($2 \text{ mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$) est suffisante pour induire des dommages et une perte d'intégrité cellulaires (Coral *et al.*, 2013).

Par ailleurs, Widrig *et al.*, (1996) ont montré que la pré-ozonation permet une légère amélioration des performances de la coagulation pour l'élimination de la MOA (de 1-15% selon l'espèce considérée, la dose de traitement, le pH et la concentration en bicarbonates). De même, Teixeira et Rosa, (2007) ont obtenu de meilleures performances pour l'élimination du phytoplancton grâce à la pré-ozonation.

Il a été montré que le permanganate de potassium pouvait être utilisé en tête de filière sans provoquer de lyse cellulaire ni de relargage de cyanotoxines et autres métabolites (Ho *et al.*, 2009) pour favoriser l'agglomération des algues (Chen et Yeh, 2005). Toutefois, Cheng *et al.*, (2009) ont montré que l'ozone et le chlore étaient plus efficaces pour l'élimination des cyanotoxines et l'inactivation des cyanobactéries par rapport aux autres oxydants dont le permanganate de potassium, qui n'a qu'un effet marginal sur l'inactivation des cyanobactéries mais possède l'avantage de ne pas provoquer de lyse cellulaire.

III.2. Coagulation-floculation

III.2.1. Principe de la coagulation-floculation

Les particules colloïdales possèdent une charge de surface majoritairement négative (caractérisée par un potentiel zêta) entraînant une répulsion électrostatique entre particules et conduisant à l'obtention d'un système colloïdal stable, responsable de la turbidité des eaux du milieu naturel (Holt *et al.*, 2002 ; Duan et Gregory, 2003). Les ions présents en solution ainsi que les molécules d'eau, qui sont polaires, assurent l'électro-neutralité du système. Dans une solution, les particules sont soumises à deux types de forces qui conditionnent la stabilité: les forces de répulsion électrostatiques, liées à la charge de surface des particules, et les forces d'attraction de type Van der Waals, liées à la surface spécifique et à la masse des particules ainsi qu'à la nature du milieu environnant. La résultante de ces forces favorise ou non la rencontre des particules. Les particules sont entourées d'une double couche :

- une couche liée ou couche de Stern à proximité immédiate de la particule, au cœur de laquelle seuls les ions spécifiquement adsorbés peuvent pénétrer,
- une couche diffuse ou couche de Gouy-Chapman, déformable et mobile, influencée par la force ionique de la solution.

Dans les eaux du milieu naturel, les forces de répulsion sont supérieures aux forces d'attraction, créant un système colloïdal stable. L'ajout d'un coagulant (souvent des sels de fer ou d'aluminium) permet de déstabiliser la suspension colloïdale en réduisant les forces de répulsion. En effet, les ions Fe^{3+} ou Al^{3+} peuvent à la fois pénétrer la couche de Stern en s'adsorbant spécifiquement, ce qui augmente le potentiel Zêta des particules, et augmenter la force ionique du milieu, participant à la réduction de la double couche. Ceci permet ensuite aux particules de s'agréger et de créer des floccs, c'est le phénomène de coagulation. La floculation favorise ensuite, par agitation lente, les rencontres entre particules déstabilisées

qui vont conduire au grossissement des floccs - les particules colloïdales étant entraînées par précipitation en solution, d'hydroxydes de fer ou d'aluminium, si les conditions de pH le permettent.

L'efficacité du procédé de coagulation-floculation pour l'élimination des particules et de la MON dépend ainsi de plusieurs paramètres dont : le type de coagulant utilisé et le taux de traitement appliqué, les conditions d'agitation, le pH, la température, les propriétés des particules et de la MON à éliminer (taille, charge de surface, structures, présence de groupements fonctionnels ionisés), et force ionique (présence d'ions spécifiquement adsorbés qui peuvent pénétrer la couche de Stern et d'ions déterminants du potentiels qui favorisent la compression de la double couche) (Duan et Gregory, 2003 ; Sharp et al., 2006 a et b ; Qin *et al.*, 2006).

III.2.2. Elimination des cyanotoxines

La coagulation-floculation n'a aucun effet sur l'élimination des cyanotoxines extracellulaires (Teixeira et Rosa, 2007).

Les méthodes de traitement conventionnelles des eaux par coagulation sont également très sensibles à la présence de MOA. Ce problème est en fait double. Il s'agit d'une part de l'influence de cette MO sur la coagulation des autres composés (particules colloïdales organiques ou inorganiques) et d'autre part de l'efficacité du procédé de traitement sur son élimination à proprement parler, en particulier lorsqu'elle est présente en grande quantité (Pivokonsky *et al.*, 2006). Le Tableau XV présente une synthèse des principales études menées sur l'impact des proliférations d'algues et de cyanobactéries sur la coagulation-floculation.

III.2.3. Elimination des cellules phytoplanctoniques

Le Tableau XV met en évidence une bonne efficacité du procédé pour l'élimination des cellules, aux doses optimales de traitement. Des abattements de 69% à plus de 99% sont obtenus, selon les auteurs. De plus, Chorus et Bartram, (1999), indiquent que l'efficacité de la coagulation sur les algues et cyanobactéries est dépendante des doses de réactifs appliquées et du pH. Par exemple, si la dose de coagulant est insuffisante, les cyanobactéries seront les dernières cellules phytoplanctoniques à être éliminées, d'où une efficacité réduite. La coagulation des algues et cyanobactéries est variable à cause de leurs caractéristiques physico-chimiques différentes d'une espèce à l'autre, telles que la morphologie (formation de filaments ou colonies), la présence de vésicules de gaz qui permet la libération des floccs ou encore leur charge de surface (Henderson *et al.*, 2008). Chorus et Bartram, (1999) ont rapporté des résultats différents en termes d'élimination de cyanobactéries suivant l'espèce à traiter et plus particulièrement leur morphologie : plus de 90% pour *Microcystis spp.* (genre formant des colonies en milieu naturel ou des cellules isolées en laboratoire) contre seulement 30% pour *Planktothrix agardhii* (formant des filaments). Cependant ces résultats sont controversés car d'autres auteurs ne trouvent pas de différence significative entre l'élimination d'espèces ayant des morphologies différentes : 93 à 99% pour *Microcystis aruginosa* contre 92 à 98% pour *Planktothrix rubescens* (Teixeira *et al.*, 2010). Selon Chow

et al., (1998 et 1999), les doses d'aluminium (11 mg/L Al_2O_3) ou de chlorure ferrique (30 mg/L FeCl_3) ainsi que l'agitation mécanique (200 rpm en coagulation et 20 rpm en floculation) couramment appliquées en traitement de l'eau ne provoquent pas la lyse des cellules de *Microcystis aeruginosa* ou *Anabaena circinalis* et n'augmentent donc pas la quantité de microcystines dissoute dans l'eau - résultats confirmés par les études menées par Drikas *et al.*, (2001) et Teixeira et Rosa, (2006 et 2007).

La coagulation-floculation peut être suivie d'une étape de décantation ou de flottation. Chorus et Bartram, (1999) indiquent que l'étape de coagulation-floculation suivie d'une étape de flottation est plus efficace pour l'élimination des algues et cyanobactéries qu'une étape de décantation. L'agrégation de cyanobactéries au sein des floes peut provoquer leur remontée en surface, due à la présence de vésicules de gaz chez ces organismes qui leur permettent de réguler leur flottabilité. L'efficacité de la décantation est également liée à celle de la coagulation-floculation car elle dépend de la densité des floes formés. Teixeira et Rosa, (2006 et 2007) ont montré que la filière de coagulation-floculation-flottation nécessite une dose plus faible en coagulant (8 mg/L Al_2O_3) pour un meilleur taux d'abattement afin d'éliminer des cellules de *Microcystis aeruginosa* (plus de 97% exprimé en chlorophylle a), comparé à la filière coagulation-floculation-décantation (12mg/L Al_2O_3 pour seulement 91% d'abattement). De plus, l'efficacité de la filière coagulation-floculation-flottation est optimale avec un gradient de vitesse plus faible pour la coagulation (380s^{-1} contre 743s^{-1}) et une floculation plus courte mais avec une agitation plus forte (8 min à 70s^{-1} contre 15 min à 24s^{-1}) par rapport à une filière classique de coagulation-floculation-décantation. L'objectif est de former des floes plus petits donc moins lourds mais avec une forte cohésion (Teixeira et Rosa, 2006).

Teixeira et Rosa, (2007) ont également montré que la présence d'autres composés organiques diminue l'efficacité des deux filières en augmentant la demande en coagulant. En effet, le coagulant réagit en premier avec les acides organiques libres constitutifs de la MON et, si la dose de coagulant est suffisamment élevée, il peut neutraliser les charges de surface des cellules. Cependant, la filière coagulation-floculation-décantation est davantage affectée par ce phénomène. En effet, l'efficacité de la décantation est dépendante de la densité des floes formés or les matières organiques algales sont généralement de petite taille, peu denses, avec une charge de surface négative ainsi qu'une tendance à flotter et décantent donc difficilement lorsqu'elles ne sont pas suffisamment agrégées (Teixeira et Rosa, 2006).

Un autre problème lié à la filière coagulation-floculation-décantation est la gestion des boues. En effet, Chorus et Bartram, (1999) rapportent qu'après 2 jours de conservation des boues, la moitié des cellules collectées est lysée et jusqu'à 100% des toxines sont relarguées dans l'eau. Ce n'est qu'après 5 jours que la concentration en toxines commence à diminuer sous l'action de la dégradation due aux micro-organismes - dégradation qui nécessite près de 13 jours pour être complète. Il est donc impératif de prendre en compte ce phénomène et de prévoir une élimination des boues régulière en particulier dans le cas de décanteurs à lit de boues.

III.2.4. Elimination de la matière organique

MON

Dans les eaux naturelles, des pourcentages d'élimination de la MON de 30% à 70% sont généralement obtenus par coagulation-floculation (Edzwald, 1993 ; Volk *et al.*, 2000 ; Sharp *et al.*, 2006b). Les données de la littérature précisent que le pH optimal pour l'élimination de la MON à l'aide de sels de fer se situe autour de 5,5 - 6,5 tandis qu'il est plus élevé avec les sels d'aluminium, autour de 6,0 - 7,5. Sharp *et al.*, (2006b) reportent une meilleure élimination de la MON avec le fer qu'avec l'aluminium, et à des doses plus faibles.

Les composés hydrophobes sont généralement ceux qui présentent la plus forte densité de charges négatives, dues à la présence importante de groupements fonctionnels carboxylique ou phénolique ionisés (Cho *et al.*, 2000 ; Zularisam *et al.*, 2009). Ils ont ainsi une demande en coagulant plus forte que les composés hydrophiles et sont également éliminés plus efficacement par neutralisation de charge que ces derniers. En effet, Teixeira *et al.*, (2010) ont montré que le traitement de composés hydrophobes nécessite environ trois fois plus de réactifs que celui de composés hydrophiles. Par contre, les molécules hydrophobes, à fort caractère aromatique et de haut poids moléculaires sont mieux éliminées par coagulation-floculation que les molécules hydrophiles, à faible aromaticité et de faibles poids moléculaires (Edzwald, 1993 ; Fearing *et al.*, 2004 ; Chow *et al.*, 2009). Les pourcentages d'élimination des fractions hydrophobes varient ainsi entre 70% et plus de 90% tandis que des pourcentages plus faibles, de l'ordre de 14% à 17% sont obtenus pour les fractions hydrophiles (Croué *et al.*, 1993 ; Fearing *et al.*, 2004 ; Sharp *et al.*, 2006a).

MOA

Les eaux caractérisées par une fraction hydrophile importante et un faible SUVA (<30L/cm/gC), qui sont les caractéristiques de la MOA générée par des phénomènes de blooms sont généralement reconnues pour avoir une faible demande en coagulant à cause de leur faible densité de charge surfacique tandis que l'efficacité de la coagulation sur l'élimination du COD reste relativement limitée (Edzwald, 1993). En effet, Edzwald, (1993) prévoit un abattement inférieur à 50% pour ce type de MO, ce qui est confirmé par les études de Widrig *et al.*, (1996) et Pivokonsky *et al.*, (2006), qui ont obtenu des abattements de l'ordre de 20 à 50%, selon les espèces (Tableau XV). De plus, selon ces auteurs, l'abattement obtenu est meilleur en utilisant le fer comme coagulant plutôt que l'aluminium. En effet, il semblerait que la MOA ait plus d'affinité pour l'aluminium que pour le fer et donc ait plus de facilité à former des complexes avec l'aluminium qu'avec le fer (Pivokonsky *et al.*, 2006). Or la formation de tels complexes provoque une augmentation de la demande en coagulant mais également une diminution de l'efficacité de la coagulation. De plus, ces complexes peuvent être solubles ou sous forme colloïdale et risquent donc de passer au travers des filtres au cours des processus de traitement. Cependant, les performances obtenues par Henderson *et al.*, (2010) - de 46 à 71% - sont meilleures que celles obtenues par les auteurs précédemment cités et sont similaires à celles obtenues pour la MON. Une étude plus approfondie des performances du procédé sur l'élimination de la MOA paraît donc nécessaire.

Certains auteurs se sont intéressés aux impacts de la MOE sur la coagulation floculation (Bernhardt *et al.*, 1989 ; Pivokonsky *et al.*, 2006 ; Takaara *et al.*, 2007) tandis que l'isolement de la MOI et surtout de la MOS, techniquement plus compliqué que celui de la MOE, ne permet pas une étude approfondie des effets de ces substances (Takaara *et al.*, 2007 et 2010). A faible concentration, la MOE peut améliorer l'efficacité de la coagulation dans la mesure où elle se comporte comme un adjuvant de floculation en formant des ponts inter-particules ou en s'adsorbant à la surface des particules (Bernhardt *et al.*, 1989). Au contraire, à forte concentration, elle peut inhiber les processus de coagulation des particules en augmentant leur charge de surface négative et donc en augmentant les répulsions entre particules. L'effet inhibiteur de la MOE est dépendant des propriétés chimiques de ses constituants, qui sont influencés par les organismes présents et par leur phase de croissance (Pivokonsky *et al.*, 2006). Tandis que les substances non protéiques (polysaccharides, acides nucléiques) de la MOE réduisent l'efficacité de la coagulation, certaines protéines constitutives de cette MOE peuvent inhiber la coagulation en formant des complexes avec les cations métalliques multivalents ou avec les ions hydratés par l'intermédiaire de liaisons de coordination (Takaara *et al.*, 2004).

A forte concentration, les protéines constitutives de la MOI et de la MOS agiraient comme substances inhibitrices en formant des complexes avec les réactifs de coagulation, d'où une augmentation de la demande en réactifs et une diminution des performances du procédé (Takaara *et al.*, 2007 et 2010). En outre, l'effet inhibiteur des substances de la MOI semble plus important que celui des substances de la MOE, probablement parce que la MOI contient plus de protéines que la MOE. En effet, les polysaccharides sont difficilement éliminés tandis que les protéines sont inhibitrices de la coagulation. De plus, il a déjà été observé une inhibition de la coagulation même lorsque les cellules ne sont pas lysées (Ma *et al.*, 2007). Ce constat a été justifié par Takaara *et al.*, (2010) qui montrent que les substances hydrophiles chargées négativement ayant un poids moléculaire supérieur à 10kDa jouent un rôle inhibiteur significatif. Les composés tels que les lipopolysaccharides (LPS), constitutifs de la paroi cellulaire et donc de la MOS, entrent dans cette catégorie de molécules et pourraient expliquer l'inhibition observée sans lyse cellulaire.

L'identification et la caractérisation des molécules responsables de l'inhibition de la coagulation permettraient de mieux appréhender leurs impacts en optimisant les filières de traitement par ajout d'une étape spécifique visant à les inhiber ou les éliminer. En effet, la réponse apportée par les exploitants aux problèmes d'inhibition de la coagulation consiste souvent à augmenter les taux de traitement, ce qui induit de nouvelles perturbations au sein de la filière de traitement avec notamment une augmentation de la production de boues ainsi que de la quantité de réactif résiduel dans l'eau traitée (Sano *et al.*, 2011).

L'élimination de la MOA par coagulation-floculation nécessite d'être optimisée afin d'obtenir le meilleur abattement possible. En effet, la présence de MOA perturbe le bon fonctionnement des différentes étapes de traitement dans les chaînes de potabilisation des eaux. La MOA accélère le colmatage des membranes (Lee et al., 2006 ; Huang et al., 2012 ; Qu et al., 2012), entre en compétition avec les micropolluants organiques lors de l'adsorption sur charbon actif provoquant une diminution des performances d'élimination de ces derniers (Hnatukova et al., 2011) et entraîne la formation de sous-produits de désinfection (Yang et al., 2011 ; Li et al., 2012). Il apparaît donc nécessaire d'étudier la réactivité de la MOA au cours du procédé de coagulation-floculation, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et ainsi optimiser son élimination.

Tableau XV : Synthèse des principales études concernant l'impact des proliférations d'algues et de cyanobactéries sur la coagulation-floculation

Référence	Caractéristiques eau testée	Conditions traitement testées				Conditions optimales		% élimination	
		Agitation	Coagulant	Doses testées	pH	Dose	pH	Phytoplancton	MO
Widrig <i>et al.</i> , (1996)	COD = 6 mgC/L Milieu Bold Basal (dilué Eau ultra-pure) + HCO ₃ ⁻ (0.5-3mM) + MOA (phase exponentielle) extraite de monocultures de - <i>Scenedesmus quadricauda</i> (S. q.) - <i>Dictyoshaerium pulchellum</i> (D. p.) - <i>M. aeruginosa</i> (M. a.)	3 min 300 rpm 27 min 30 rpm 1h décantation	Al ₂ (SO ₄) ₃ , 14H ₂ O FeCl ₃ , 6H ₂ O	0,25-100 mgAl/L 0,51-206 mgFe/L	5 et 8	206 mgFe/L	5	-	20-50% Selon l'espèce S.q. 22-29% D.p. 44-49% M. a. 17-20%
Teixeira et Rosa (2006)	Eau du robinet COD = 2.1mgC/L + cellules issues de cultures <i>M. aeruginosa</i> fin de phase exponentielle	2 min G = 743 s ⁻¹ 15 min G = 24 s ⁻¹ Décantation 20min	Al ₂ (SO ₄) ₃ , 18H ₂ O WAC	1,1-10,7 mgAl/L	5,5-7 7,5-8	2,7 mgAl/L (WAC)		69-89% 93-98%	
		2 min G = 743 s ⁻¹ 15 min G = 24 s ⁻¹ Flottation 8min Ou 2 min G = 380 s ⁻¹ 8 min G = 70 s ⁻¹ Flottation 8min	Al ₂ (SO ₄) ₃ , 18H ₂ O WAC (polyhydroxi-chlorosulphate d'aluminium)	0,53-3,7 mgAl/L	7-7.5 7,5-7,7	1,6 mgAl/L		77-99%	
Teixeira et Rosa (2007)	Eau brute (Algarve, Portugal) ou eau ozonée + cellules issues de cultures <i>M. aeruginosa</i> pH = 7.4 COD = 4.5mgC/L Turbidité 12 NTU	2 min G = 743 s ⁻¹ 15 min G = 24 s ⁻¹ Décantation 20min Ou 2 min G = 380 s ⁻¹ 8 min G = 70 s ⁻¹ Flotation 8min	WAC	1,1-6,4 mgAl/L		6,4 mgAl/L		88-90%	58-65%
			WAC	1,1-6,4 mgAl/L		2.7mgAl/L		92-95%	24-47%
Takaara <i>et al.</i> , (2007)	pH = 7 kaolinite 20 mg/L + MOE (filtration) Ou MOC (sonication cellules) produite par <i>M. aeruginosa</i> (phase stat.)	80 rpm 20min 60 rpm 15 min Decantation 20min	PACl (polychlorure d'aluminium)	10 mgAl/L	7	-	-		MOE : 81,5-91,5% MOC : 0-79,8%

Partie 1. Synthèse bibliographique

Référence	Caractéristiques eau testée	Conditions traitement testées				Conditions optimales		% élimination	
		Agitation	Coagulant	Doses testées	pH	Dose	pH	Phytoplancton	MO
Henderson <i>et al.</i> , (2010)	Dilution monocultures phase stationnaire avec EUP + 0.5mM NaHCO ₃ + 1.8mM NaCl, COD = 0.6-1.5mgC/L - <i>Chlorella vulgaris</i> (C.v.) - <i>M. aeruginosa</i> (M.a.) - <i>Asterionella Formosa</i> (A.f.) - <i>Melosira sp</i> (M. sp.)	2 min 200rpm 15 min 30rpm Flottation 10min	Sulfate aluminium		5 et 7	0,7-1,36 mgAl/L	7	C.v. 94,8% M.a. 97,3% A.f. 98,8% M.sp. 99,7%	71% 55% 46% -
Teixeira <i>et al.</i> , (2010)	Eau synthétique pH 6.5-7 + MON artificielle 2-5.7mgC/L : Acide salicylique (hydrophile) ou AH commercial (hydrophobe) + 1mM KCl + 3mM CaCl ₂ + culture fin phase exponentielle (50µgChla/L) <i>M. aeruginosa</i> Ou <i>Planktothrix rubescens</i>	2 min G = 380 s ⁻¹ 8 min G = 70 s ⁻¹ Flottation 8min	WAC	0,8-2,1 mgAl/L pour AH 0,27-0,8 mgAl/L pour Acide Salicylique	6,5-7.2			92-98% pour <i>P. rubescens</i> 93-99% pour <i>M. aeruginosa</i>	60-85% pour AH 10-15% pour Acide Salicylique
Zhang <i>et al.</i> , (2012)	Cultures de <i>Chlorella zofingiensis</i> (milieu BG11) à différentes phases de croissance - phase exponentielle - phase stationnaire - phase de déclin	2min G = 100 s ⁻¹ 10min G = 30 s ⁻¹ Flottation 10min	Al ₂ (SO ₄) ₃ , 18H ₂ O	10-100 mgAl/L	6,2	En présence de MOA: 70,8 à 37,6 mgAl/gMS d'algue En absence de MOA : 61,6 à 10,6 mgAl/gMS d'algue, selon la phase de croissance		91% d'élimination des cellules en présence de MOA, 92-95% en absence de MOA, indépendamment de la phase de croissance	

La grande majorité des études portant sur les impacts des blooms algaux ou de cyanobactéries sur la coagulation-floculation a été menée en utilisant des réactifs à base d'aluminium (bien que le fer semble plus performant), sur des cultures en laboratoire ou des eaux issues du milieu naturel. Cependant, ces travaux sont focalisés sur l'élimination des cellules et le comportement de la MOA est peu étudié au cours de ces essais. De plus, seules des données concernant une élimination globale de la MOA ou de la MON sont reportées dans la littérature.

III.2.5. Mécanismes d'élimination de la matière organique

Dans le cadre de cette étude, le coagulant choisi est le chlorure ferrique. Lorsqu'ils sont mis en solution, les sels de fer sont dissociés sous forme d'ions trivalents Fe^{3+} . Ceux-ci sont ensuite hydrolysés et forment différents complexes solubles de charge positive, tels que $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}_2(\text{OH})_4^{2+}$ ou $\text{Fe}_3(\text{OH})_4^{5+}$, dont la forme prédominante dépend des conditions de pH (Lefebvre et Legube, 1990 ; Duan et Gregory, 2003). Ces complexes sont susceptibles de s'adsorber à la surface des colloïdes, dont la charge est négative. De plus, si le pH est proche de la neutralité, un précipité amorphe d'hydroxyde de fer $\text{Fe}(\text{OH})_3$ peut également se former. Les deux principaux paramètres régulant la coagulation-floculation sont donc le pH de la solution et la dose de fer utilisée. La matière organique dissoute peut être éliminée par combinaison de quatre mécanismes (Figure 13) :

- la neutralisation de charge
les cations métalliques neutralisent les charges de surface en pénétrant la couche liée, permettant l'agrégation des composés et formant une structure insoluble de charge neutre.
- le piégeage
la matière organique est piégée au sein de précipités amorphes d'hydroxyde de fer au cours de leur formation.
- l'adsorption
la matière organique est adsorbée à la surface de précipités d'hydroxyde de fer.
- la complexation
les produits de l'hydrolyse métallique peuvent former des complexes avec la matière organique. Si la limite de solubilité du complexe formé n'est pas atteinte, celui-ci reste en solution, conduisant à une mauvaise clarification car ces complexes ne sont pas retenus par filtration. Lorsque la dose de coagulant est suffisamment élevée et que la limite de solubilité du complexe est atteinte, une grande quantité de précipité d'hydroxyde métallique se forme immédiatement et la matière organique est incorporée dans la masse, c'est le phénomène de "Sweep coagulation" ou coagulation par entrainement. Ce phénomène se produit à des doses de coagulant plus élevées que celles requises pour la simple neutralisation de charge et l'abattement obtenu peut être meilleur que celui atteint par simple mécanisme de neutralisation/précipitation.

Dans la pratique, il est difficile de distinguer les différents mécanismes et celui qui prédomine dépend des propriétés de la matière organique. Cependant, la mesure du potentiel

zêta permet d'avoir des indications quant aux possibles mécanismes et le maximum d'élimination de la MON est généralement atteint pour des valeurs comprises entre -10mV et 5mV (Sharp et al., 2006a) ou plus élevées lors de la coagulation par entrainement.

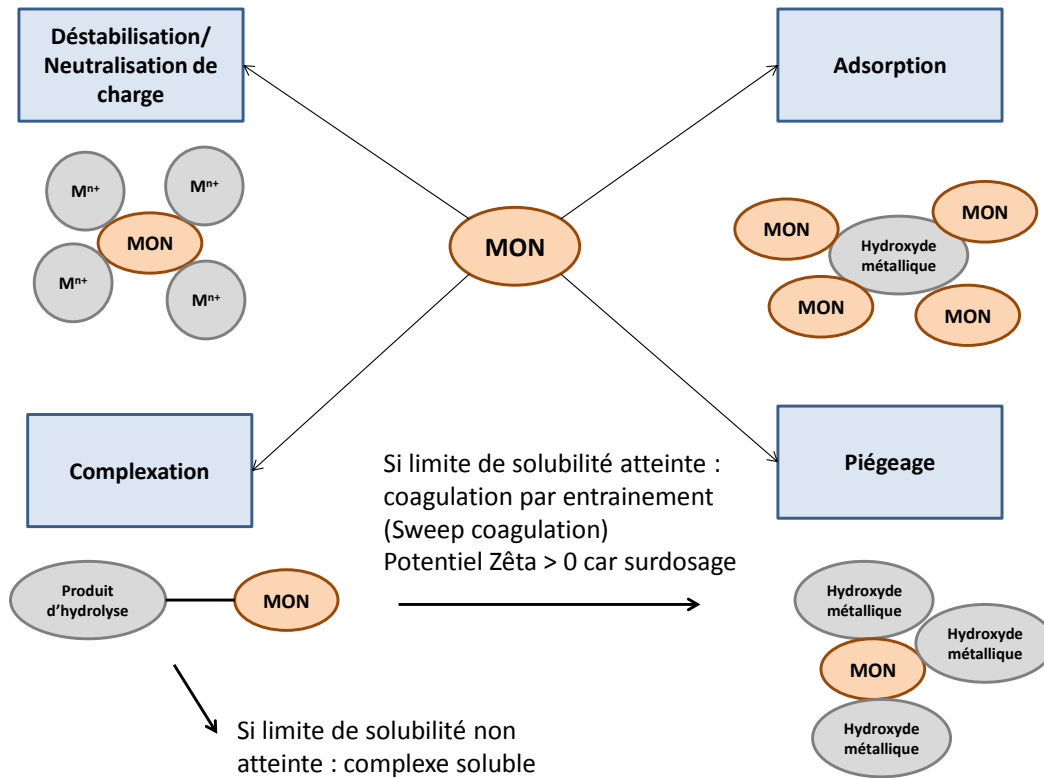


Figure 13: Mécanismes possibles d'élimination de la MON par coagulation-floculation (d'après Jarvis *et al.*, (2004) et Matilainen *et al.*, (2010))

IV. Conclusions et objectifs de l'étude

Cette synthèse bibliographique a permis de mettre l'accent sur l'enjeu que représentent les phénomènes d'eutrophisation associés aux blooms de cyanobactéries et d'algues et de soulever un certain nombre d'interrogations ou de données manquantes dans la littérature. Elle a également permis de montrer le caractère complexe de la dynamique de ces phénomènes ainsi que la nécessité d'étudier les caractéristiques des composés organiques produits par les blooms, qui sont encore mal connues, afin de déterminer leurs impacts sur le milieu aquatique et de mieux appréhender leurs conséquences sur les filières de production d'eau potable.

Cette étude a ainsi pour objectifs de caractériser les apports en matière organique générés par les blooms pour comprendre et évaluer les effets de cet apport sur les caractéristiques de la MON et ensuite déterminer les impacts de ces modifications sur l'étape de coagulation-floculation. Ce travail vise également à identifier des paramètres physico-chimiques indicateurs des risques de prolifération algale ou cyanobactérienne pour améliorer la compréhension des mécanismes d'apparition et de développement du phénomène.

PARTIE 2. MATERIELS & METHODES

PARTIE 2. MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Méthodologie

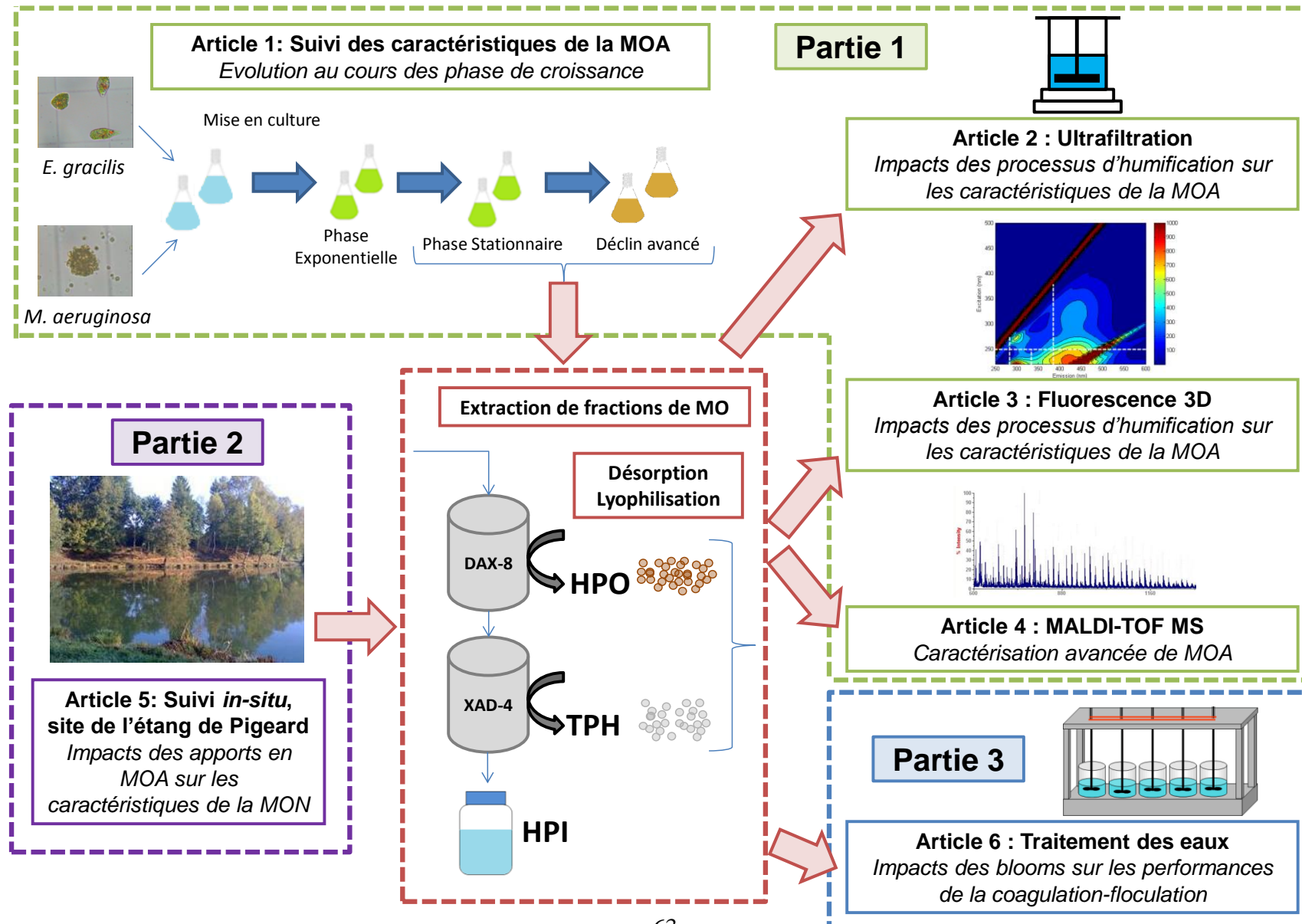
Le travail effectué au cours de cette thèse s'articule en trois parties (Figure 14). La première partie a permis de mettre en place, dans un premier temps, un protocole de culture en laboratoire adapté au développement rapide et massif d'algues et de cyanobactéries et permettant la quantification et la caractérisation de la Matière Organique Algale (MOA) générée au cours de leur croissance. Dans un deuxième temps, l'évolution des caractéristiques de cette MOA a été déterminée tout au long du cycle de vie des espèces étudiées - une algue, *Euglena gracilis*, et une cyanobactérie, *Microcystis aeruginosa* - par fractionnement selon le caractère hydrophobe et détermination de l'indice SUVA. Dans un troisième temps, des fractions de MOA ont été extraites au début de la phase de croissance stationnaire et de déclin avancé (après 16 mois de culture), lyophilisées et caractérisées à l'aide de techniques analytiques plus poussées telles que le fractionnement selon le Poids Moléculaire Apparent (PMA) par ultrafiltration et la spectroscopie de fluorescence 3D. Cette étude a ainsi permis de déterminer des caractéristiques propres à la MOA et d'évaluer les impacts des processus d'humification sur ses propriétés, par comparaison avec la MON. Des éléments structuraux et des caractéristiques communes avec la MON ont été mises en évidence via l'analyse, par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS), des fractions de MOA extraites au début de la phase stationnaire.

La deuxième partie vise à déterminer les impacts des blooms algaux ou de cyanobactéries sur les caractéristiques de la MON d'un étang eutrophe. Pour cela, une comparaison entre la qualité de l'eau de l'étang eutrophe de Pigeard et celle de la rivière alimentant cet étang (la Valette) a été effectuée par analyse de données issues d'un suivi d'une période de 18 mois. Ces données incluent des paramètres physico-chimiques (paramètres globaux tels que : température, pH, conductivité, O₂ dissous ou potentiel d'oxydo-réduction; données météorologiques dont température de l'air, pluviométrie ou ensoleillement ; composition ionique des formes de l'azote et du phosphore), biologiques (détermination qualitative et quantitative des populations d'algues et de cyanobactéries par cytométrie en flux, mesure de la chlorophylle a et observations au microscope) et les caractéristiques de la MON (SUVA, fractionnement selon le caractère hydrophobe).

La troisième partie a pour objectif d'évaluer les impacts des phénomènes de blooms sur le procédé de coagulation floculation et notamment les conséquences des apports en MOA sur l'élimination de la MON. Ce travail s'est effectué en trois étapes. La première étape visait à évaluer les performances du procédé sur l'élimination des populations d'algues (*E. gracilis*) et de cyanobactéries (*M. aeruginosa* et *Planktothrix agardhii*) ainsi que de la MOA générée au cours de leur croissance, par traitement de cultures en laboratoire. La deuxième étape a consisté à comparer la réactivité globale, à différentes saisons, d'échantillons issus d'une

ressource eutrophe (l'étang de Pigéard) et d'une ressource non impactée (la rivière Glane). Enfin, la dernière étape a spécifiquement évalué la réactivité de fractions de MO extraites d'origines diverses par coagulation-floculation d'eaux synthétiques.

Figure 14: Synthèse des méthodes expérimentales suivies au cours de la thèse

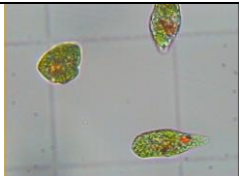
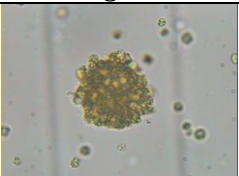



II. Cultures d'algues et de cyanobactéries en laboratoire

II.1. Souches cultivées

Les souches d'algues (*Euglena gracilis*) et de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa* et *Planktothrix agardhii*) étudiées au cours de cette thèse sont non axéniques et ne produisent pas de toxines. Elles ont été fournies par le Muséum National d'Histoires Naturelles à Paris, unité Ecosystèmes et Interactions Toxiques (département "Régulation, Développement et Diversité Moléculaire"). Le Tableau XVI présente les caractéristiques propres à chaque espèce.

Tableau XVI : Caractéristiques des espèces d'algues et de cyanobactéries cultivées en laboratoire

Espèce	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Planktothrix agardhii</i>
			
Famille	Algue	Cyanobactérie	Cyanobactérie
Taille/forme	Cylindrique (déformable) 30-55 µm de long 8-10 µm de large	Sphérique 3-8 µm de diamètre	Filaments pouvant atteindre plusieurs centaines de µm de long
Organisation structurelle	Unicellulaire	Unicellulaire, formation de colonies	Filamenteuse
Mobilité	Flagelle	Vésicules de gaz	Vésicules de gaz
Métabolisme	Mixotrophe, Consommation d'azote sous forme NH ₄ ⁺ uniquement, Nécessite vitamines B1 et B12	Photo-autotrophe Non fixatrice de N ₂ Ne forme pas de cellules de résistance	Photo-autotrophe Non fixatrice de N ₂ Ne forme pas de cellules de résistance
Conditions optimales	pH	2,5-7	6-9
	Luminosité	élevée	élevée
	Température	23-30°C	23-35°C

II.2. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est un Chu 10 modifié. Sa composition (Tableau XVII) est adaptée de celle utilisée par Hadjoudja *et al.*, (2009) et permet une croissance reproductible et rapide des algues et cyanobactéries. Cependant, quelques modifications ont été apportées afin de tenir compte des contraintes spécifiques liées à ce travail et du métabolisme des espèces étudiées. En effet, afin de pouvoir quantifier avec le plus de précision possible la MOA produite par le phytoplancton, le milieu initial doit avoir la plus faible concentration possible

en carbone organique, pour ne pas perturber les mesures. Des molécules organiques telles que le MOPS (acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique) ne peuvent pas être utilisées pour tamponner le pH. Un tampon phosphate a ainsi été utilisé pour fixer le pH initial du milieu à $7,4 \pm 0,1$. De plus, les nitrates ont été remplacés par des ions ammonium dans le cas d'*E. gracilis*. Cependant leur consommation au cours de la croissance des algues entraîne une forte baisse du pH, qui peut atteindre des valeurs proches de 2 en fin de croissance, ce qui n'est pas représentatif des valeurs rencontrées dans le milieu naturel. Une régulation du pH à $6,5 \pm 0,1$ a ainsi été effectuée au cours de la phase de croissance exponentielle d'*E. gracilis*, à l'aide de NaOH à 0,1M. Dans le cas des cyanobactéries, la consommation des nitrates et la photosynthèse entraînent une augmentation du pH qui reste compris entre 7,4 et 9, caractéristique des milieux naturels eutrophes. Le pH n'a donc pas été régulé dans le cas de cultures de *M. aeruginosa* et *P. agardhii*. Des vitamines B1 et B12 ont également été ajoutées pour permettre le développement d'*E. gracilis*.

Tableau XVII : Composition du milieu de culture utilisé

Produit	Concentration (mol.L ⁻¹)	Apport en COD	Fournisseur (pureté ≥ 99%)
Macronutriments			
K ₂ HPO ₄	$5,00 \times 10^{-4}$		VWR Prolabo
KH ₂ PO ₄	$5,00 \times 10^{-4}$		VWR Prolabo
NH ₄ Cl (<i>E. gracilis</i>) ou NaNO ₃ (cyanobactéries)	$1,73 \times 10^{-3}$ $1,73 \times 10^{-3}$		Fluka
MgSO ₄ , 7H ₂ O	$1,03 \times 10^{-4}$		Fluka
CaCl ₂ , 2H ₂ O	$2,16 \times 10^{-4}$		Chem-Lab
Na ₂ CO ₃	$1,89 \times 10^{-4}$		VWR Prolabo
Micronutriments			
H ₃ BO ₃	$4,63 \times 10^{-5}$		Acros Organics
MnCl ₂ , 4H ₂ O	$9,10 \times 10^{-6}$		Sigma
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	$1,60 \times 10^{-6}$		Sigma
CoSO ₄ , 7H ₂ O	$2,00 \times 10^{-7}$		Acros Organics
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	$8,00 \times 10^{-7}$		VWR Prolabo
CuSO ₄ , 5H ₂ O	$3,00 \times 10^{-7}$		VWR Prolabo
EDTANa ₂	$1,17 \times 10^{-5}$		1,4 mgC.L ⁻¹
Fe(NO ₃) ₃ , 9H ₂ O	$1,16 \times 10^{-5}$		Sigma-Aldrich
Vitamine B1	$3,00 \times 10^{-6}$	0,4 mgC.L ⁻¹	Sigma-Aldrich
Vitamine B12	$7,40 \times 10^{-10}$	6×10^{-4} mgC.L ⁻¹	Biochemika
Total		1,8 mgC.L ⁻¹	

Les cultures sont réalisées dans des Erlenmeyers de 1L, remplis avec 500mL de milieu de culture. Avant inoculation, les milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave (21min à 120°C sous 1 bar de pression). Ils sont ensuiteensemencés, en conditions stériles, par repiquage à partir d'une culture "mère" en phase de croissance exponentielle (dilution au centième), pour éviter toute contamination et obtenir ainsi des cultures mono-spécifiques.

II.3. Conditions de culture

Après inoculation, les cultures d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa* sont placées dans une enceinte thermostatée (Versatile environmental test chamber, SANYO) assurant une alternance de cycles jour/nuit de 15h/9h, sous une intensité lumineuse de $30 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (soit environ 2000 lux) et une température constante de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Ces conditions permettent une croissance soutenue des algues et cyanobactéries (Hadjoudja *et al.*, 2009) et sont maintenues quelle que soit la durée de l'expérience (durée maximale 16 mois, correspondant à la phase de déclin avancé). Compte tenu de leurs faibles besoins en intensité lumineuse (une intensité de $30 \mu\text{mol.photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ serait létale) et température, les cultures de *P. agardhii* sont laissées à température et luminosité ambiante. Au cours de leur croissance, les cultures sont agitées à la main quotidiennement.

II.4. Suivi des populations phytoplanctoniques

Afin de déterminer les phases de croissance, un suivi quotidien de l'absorbance à 685nm est réalisé pour les cultures d'*E. gracilis* et à 750nm pour *M. aeruginosa*, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu Pharmaspec 1700 à double faisceau (précision $\pm 0,005$). Des observations au microscope des cultures sont également effectuées périodiquement afin de contrôler l'absence de contamination.

En parallèle, un dénombrement des cellules est effectué par cytométrie en flux (FACSCalibur Becton-Dickinson), en collaboration avec la société Mêtis Biotechnologies (Limoges, France). Le cytomètre est équipé d'un laser à l'argon émettant à une longueur d'onde de 488nm et d'une diode émettant dans le rouge à une longueur d'onde de 635nm. Les paramètres pouvant être déterminés par le cytomètre sont donnés dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Paramètres déterminés par cytométrie en flux

Paramètre	λ_{ex}	λ_{em}	Fluorescence enregistrée
Taille/forme	488 nm	488 nm	FSC (diffusion de la lumière dans l'axe)
Granulosité, taille, index de réfraction	488 nm	488 nm	SSC (réfraction de la lumière à 90°)
ARN, ADN (marquage au Sybergreen)	455 nm	530 nm	FL1
Phycocérythrine	488 nm	564-606nm	FL2
Chlorophylle a	488 nm	> 650 nm	FL3
Phycocyanine	635 nm	660 nm	FL4

Le dénombrement des cellules d'algues et de cyanobactéries est basé sur les propriétés d'auto-fluorescence des pigments photosynthétiques contenus dans ces dernières. De plus, le contenu en pigments des cellules varie selon les espèces, permettant de distinguer les populations les unes des autres. Les algues sont généralement plus riches en chlorophylle que

les cyanobactéries, qui sont, quant à elles plus riches en pigments accessoires tels que la phycoyanine et la phycoérythrine. Une combinaison des paramètres FL2-FL3 ou FL2-FL4 permet ainsi de distinguer facilement les populations d'algues (y compris les diatomées) des cyanobactéries. Le nombre de cellules est déterminé par l'appareil à partir de fenêtres définies par l'utilisateur. L'analyse est effectuée sur les échantillons non filtrés (30µL sont injectés par l'appareil), dans les heures suivant le prélèvement. Pour chaque échantillon, des dilutions décimales en cascade à l'aide d'un tampon phosphate salin (PBS) sont réalisées pour vérifier la linéarité de l'appareil. La calibration est vérifiée avant chaque utilisation à l'aide de billes fluorescentes de 6µm (Kit CaliBRITE contenant différents types de billes fluoresçant à différentes longueurs d'onde : FITC, PE et PerCP).

III. Suivi des caractéristiques de la MO

Un suivi des caractéristiques de la MOA au cours des différentes phases de croissance a été effectué. Ce travail a fait l'objet de l'*Article 1* et de la première partie de l'*Article 2*. Ce suivi a été réalisé sur des cultures d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa*. Pour chacune des espèces, 20 Erlenmeyers ont été inoculés en même temps, en conditions stériles. Deux d'entre eux ont été sacrifiés périodiquement afin de déterminer la densité cellulaire et la durée des phases de croissance (mesure d'absorbance et cytométrie en flux, voir Partie 2, II.4.). Cependant, les souches étudiées étant non axéniques, les bactéries initialement présentes dans l'inoculum sont susceptibles de se développer. De plus, sur le long terme, les conditions stériles ne sont plus assurées et il y a donc potentiellement présence d'une flore microbienne génératrice de MO. Les caractéristiques de la MOA ainsi que la quantité produite ont également été analysées, par mesure du COD, fractionnement selon le caractère hydrophobe et détermination de l'indice SUVA. Les analyses sont ainsi effectuées en duplicats sur des échantillons provenant de cultures séparées. La fréquence des analyses est fixée à une par semaine pour les premières phases de croissance (phases de latence et exponentielle ainsi que le début de la phase stationnaire) où le système évolue rapidement, puis elle est diminuée, car le système évolue moins vite. Ce suivi est effectué sur une période de 16 mois afin de pouvoir également déterminer l'impact des processus d'humification sur les caractéristiques de la MOA, après la mort des cellules. Les mêmes protocoles expérimentaux sont appliqués sur la MO issue du milieu naturel.

III.1.1. Quantification de la MO : mesure du Carbone Organique Dissous (COD)

La matière organique est quantifiée par mesure du COD après filtration de l'échantillon à 0.45µm, à l'aide d'un COT-mètre Shimadzu TOC-L (précision ± 2%, limite de détection 50 µgC.L⁻¹). La mesure est effectuée après acidification avec HCl 1M et bullage à l'air synthétique de qualité 5.0 pendant 3min, afin de faire dégazer le carbone inorganique. L'échantillon est alors injecté dans un four à 720°C et le CO₂ produit par la combustion de la MO est ensuite quantifié par mesure IR. La mesure est effectuée en duplicats.

III.1.2. Détermination de l'indice SUVA

L'indice SUVA est calculé grâce à l'Équation 3. L'absorbance UV à 254 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu Pharmaspec 1700 (précision $\pm 0,005$), muni de cuves en quartz de trajet optique 1 cm. La mesure du COD est détaillée dans la Partie 2, III.1.1.

Équation 3: Calcul de l'indice SUVA

$$SUVA = 1000 \times \frac{AbsUV254nm}{COD}$$

Avec SUVA : indice SUVA (exprimé en $L.cm^{-1}.gC^{-1}$)

Abs UV 254nm : l'absorbance UV mesurée à 254nm (cm^{-1})

COD : Carbone Organique Dissous de l'échantillon ($mgC.L^{-1}$)

III.1.3. Fractionnement selon le caractère hydrophobe

Le fractionnement sur résines permet de séparer les molécules organiques en familles de composés selon leur caractère hydrophobe. Dans un premier temps, les cellules et débris cellulaires sont séparés du milieu de culture par centrifugation à 6000g pendant 20min à 4°C, le surnageant étant ensuite filtré sur filtres en nitrate de cellulose de seuil de coupure 0,45 μ m. Cette première étape n'est pas réalisée dans le cas d'échantillons d'eau naturelle car ceux-ci sont moins chargés en particules en suspension et se filtrent donc bien plus aisément. Le protocole de fractionnement utilisé (illustré par la Figure 15) est adapté de celui proposé par Aiken *et al.*, (1992) et Malcolm et MacCarthy, (1992). Il permet de séparer les molécules organiques en quatre fractions : les AH, les composés hydrophobes (HPO), les composés transphiliques (TPH) et les composés hydrophiles (HPI). Les AH sont séparés par précipitation après acidification à pH 2 avec HCl à 37% et filtration à 0,45 μ m. 306 mL d'échantillon acidifié et filtré sont ensuite passés à un débit de 50mL.h⁻¹ à l'aide d'une pompe péristaltique sur deux colonnes montées en série, en acier inoxydable, contenant respectivement 5mL de résine DAX-8 et 5mL de résine XAD-4. Les valeurs du facteur de capacité k' les plus fréquemment appliquées pour les eaux du milieu naturel sont 50 et 100. Labanowski et Feuillade, (2011) ont préconisé l'emploi d'un faible k' pour les échantillons riches en composés hydrophiles, ainsi, pour cette étude, le k' utilisé est fixé à 50. Le volume d'échantillon est relié au volume de résine par l'Équation 4. Du fait de leur présence limitée (<3%) les AH n'ont pas été pris en compte dans ce travail. Les HPO sont retenus sur DAX-8, les TPH sur XAD-4 et les HPI ne sont pas retenus sur résines. La résine DAX-8 est de nature acrylique et présente une légère polarité tandis que la résine XAD-4 est de type styrène-divinylbenzène et non polaire. Toutes deux se présentent sous la forme de billes de polymère macroporeux non chargé et nécessitent un conditionnement au méthanol suivi d'un rinçage à l'eau distillée à pH 2 jusqu'à ce que le COD de l'eau de rinçage soit inférieur à 0.2mgC.L⁻¹.

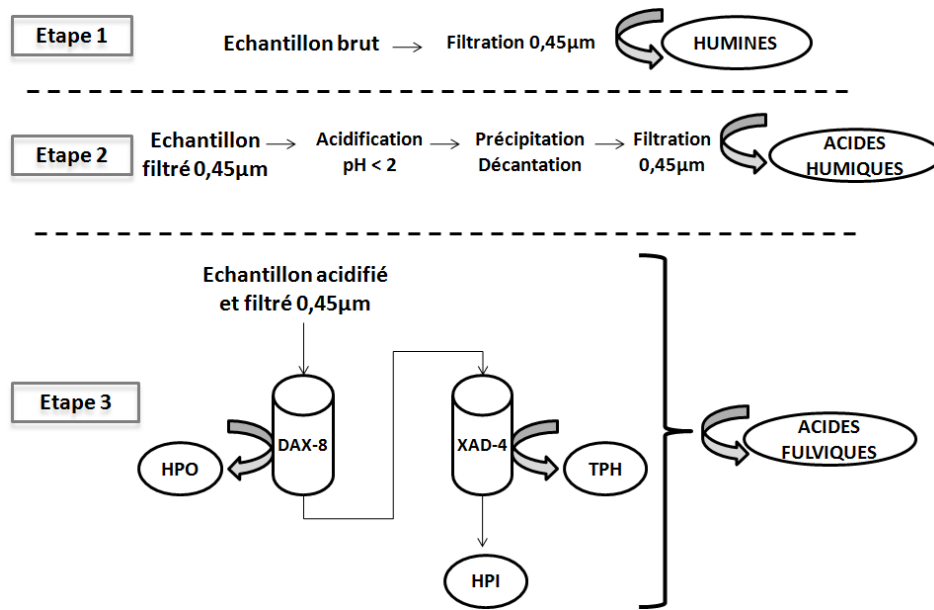


Figure 15 : Principe de séparation des acides humiques et fractionnement de la matière organique selon son caractère hydrophobe

Équation 4: Détermination du volume d'échantillon à faire passer sur la résine

$$V_{éch} = 2 \times V_0 \times (1 + k')$$

Avec $V_{éch}$: le volume d'échantillon (mL)

V_0 : le volume mort de la colonne de résine (60% du volume du lit) (mL)

k' : le facteur de capacité

La proportion de chacune des fractions est déterminée par mesure du COD en entrée et en sortie de chaque colonne et calculée par différence, à l'aide des formules suivantes (Équation 5, Équation 6, Équation 7) :

Équation 5: Calcul du pourcentage de HPO

$$\% HPO = 100 \times \frac{COD_i - COD_{DAX-8}}{COD_i}$$

Équation 6: Calcul du pourcentage de TPH

$$\% TPH = 100 \times \frac{COD_{DAX-8} - COD_{XAD-4}}{COD_i}$$

Équation 7: Calcul du pourcentage de HPI

$$\% HPI = 100 \times \frac{COD_{XAD-4}}{COD_i}$$

Avec COD_i : COD initial avant passage sur résine

COD_{DAX-8} : COD après DAX-8

COD_{XAD-4} : COD après XAD-4

Un fractionnement du milieu de culture a également été réalisé. L'EDTA (1,4 mgC/L) initialement présent au sein du milieu est alors retrouvé dans la fraction HPI, tandis que les vitamines B1 (0,4 mgC/L) et B12 (négligeable, <0.1 mgC/L) sont retrouvées dans la fraction TPH. Le devenir de ces composés n'étant pas connu au cours de la croissance du phytoplancton, ces valeurs n'ont pas été soustraites pour les calculs et ne sont donc pas négligeables lors des premières phases de croissance (latence et exponentielle) par rapport à la production de MOA (< 10 mgC/L).

Des fractions de MO sont également extraites à partir des cultures d'algues et de cyanobactéries en laboratoire ainsi que d'échantillons d'eau du milieu naturel. L'extraction repose sur le même principe que celui du fractionnement selon le caractère hydrophobe. Lors de l'extraction de MO, le volume de résine à introduire dans la colonne est conditionné par le volume d'échantillon récupéré, selon la formule (Équation 8) :

Équation 8: Détermination du volume de résine pour l'extraction de MO

$$V_{résine} = \frac{V_{échantillon}}{2 \times 0.6 \times (1 + k')}$$

Avec $V_{résine}$: le volume de résine (mL)

$V_{échantillon}$ le volume d'échantillon (mL)

k' : le facteur de capacité

Avant désorption des fractions HPO et TPH, les résines sont rincées à l'acide formique à pH 2 afin d'éliminer les ions. Un test au nitrate d'argent permet de contrôler l'efficacité du rinçage. Les fractions HPO et TPH sont ensuite désorbées à l'aide d'un mélange acétonitrile-eau (75%-25% V/V) injecté à 25mL.h⁻¹. Une évaporation sous vide réduit grâce à un évaporateur rotatif (Rotavap modèle Heidolph WB 2000) permet ensuite de concentrer les fractions obtenues et d'éliminer les résidus d'acétonitrile et d'acide formique. Les échantillons sont répartis dans des ballons en verre et mis à congeler à -20°C à l'aide d'une cryo-chambre rotative (Heto CBN 18-50) puis sont lyophilisés (lyophilisateur Heto Drywinner modèle 6-85-1). Les fractions extraites sont récupérées sous forme de poudre et conservées pour une utilisation ultérieure.

La fraction HPI n'étant pas retenue sur résine, elle est très chargée en sels et nécessite une purification délicate à mettre en œuvre. Il existe des protocoles de purification de cette fraction mais leur rendement reste faible (<30% dans la majorité des cas, selon Pernet-Coudrier, 2008). De plus, l'utilisation de nombreux réactifs est susceptible de modifier la structure des composés organiques. Aussi, ces protocoles n'ont pas été mis en place au cours de cette thèse et les fractions HPI testées sont utilisées directement en solution, en présence des ions.

IV. Analyse par fractionnement de taille (ultrafiltration)

La distribution des Poids Moléculaires Apparents (PMA) des molécules constitutives de MOA et de MON est déterminée par fractionnement de taille selon un protocole d'ultrafiltration utilisé en mode diafiltration (Lagier *et al.*, 2000 ; Labanowski et Feuillade, 2009). Les résultats de cette étude sont présentés dans l'**Article 2**. Les molécules sont séparées

selon leur PMA en 5 fractions : 0,45 μm -0,2 μm ; 0,2 μm -30 kDa; 30 kDa-3 kDa; 3 kDa-0,5 kDa et <0,5 kDa, par filtrations successives sur des membranes Amicon YM de seuils de coupure 30kDa, 3kDa et 0,5kDa. Ces membranes sont constituées de cellulose régénérée, ont des propriétés hydrophiles et une faible capacité d'adsorption. Les expérimentations sont effectuées d'une part sur les échantillons non fractionnés (appelés "Total") et d'autre part sur les différentes fractions HPO, TPH et HPI extraites de ces échantillons (Partie 2, III.1.3.). Les échantillons analysés sont issus de cultures d' *E. gracilis* et de *M. aeruginosa* en début de phase stationnaire et en phase de déclin avancé après 16 mois de culture. Une comparaison avec le milieu naturel est réalisée par analyse d'échantillons non fractionnés et de fractions issus de l'étang de Pigeard (Hiver, milieu eutrophe), ainsi que de fractions AH (réf. 2S101H) et AF (réf. 2S101F) fournies par l'IHSS et provenant d'un milieu non eutrophe (Suwannee River).

Le pH des échantillons est ajusté à $6,5 \pm 0,1$ (à l'aide de NaOH à 4M et 0,1M ainsi que HCl à 0,1M) avant analyse afin de préserver l'intégrité des membranes. La concentration des échantillons est comprise entre 1,5 et 10 mgC.L^{-1} , selon leur origine, ce qui limite les phénomènes de polarisation de concentration. Les échantillons préalablement filtrés à 0,45 μm , sont ensuite filtrés à 0,2 μm sur filtres en nitrate de cellulose. La part de cette première fraction de taille comprise entre 0,45 μm et 0,2 μm est déterminée par mesure du COD avant et après filtration. Le protocole d'ultrafiltration utilisé est illustré par la Figure 16. 200mL d'échantillon filtré à 0,2 μm sont introduits dans une cellule d'ultrafiltration frontale Amicon à agitation magnétique, équipée d'une première membrane de seuil de coupure 30kDa. Avant utilisation, les membranes sont rincées abondamment à l'eau ultra-pure afin d'éliminer la glycérine servant à protéger leur surface de la déshydratation. Les membranes sont régénérées, selon les recommandations du fabricant, dès que l'apparition d'une coloration est constatée sur la surface. Le mode diafiltration consiste à garder le volume d'échantillon constant dans la cellule en ajoutant une solution de nitrate de sodium à la même force ionique et au même pH que l'échantillon analysé. La force ionique est calculée grâce à l'équation de Marion-Babcock (Équation 9, qui est valable tant que la force ionique reste inférieure à 0,3 mol.L^{-1}), après avoir mesuré la conductivité électrique des solutions (conductimètre WTW LF 538 de précision $\pm 0,5\%$).

Équation 9: Equation de Marion-Babcock

$$\log I = 1.159 + 1.009 \log \chi$$

Avec I : force ionique en mmol.L^{-1}

χ : conductivité en mS.cm^{-1}

La solution de NaNO_3 de même force ionique I est préparée grâce à l'Équation 10 qui permet de déterminer la masse à peser.

Équation 10 : Calcul de la force ionique en fonction de la concentration ionique de la solution

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i Z_i^2$$

Avec I : force ionique en mol.L⁻¹

C_i : la concentration de l'ion i en mol.L⁻¹

Z_i : la charge de l'ion i

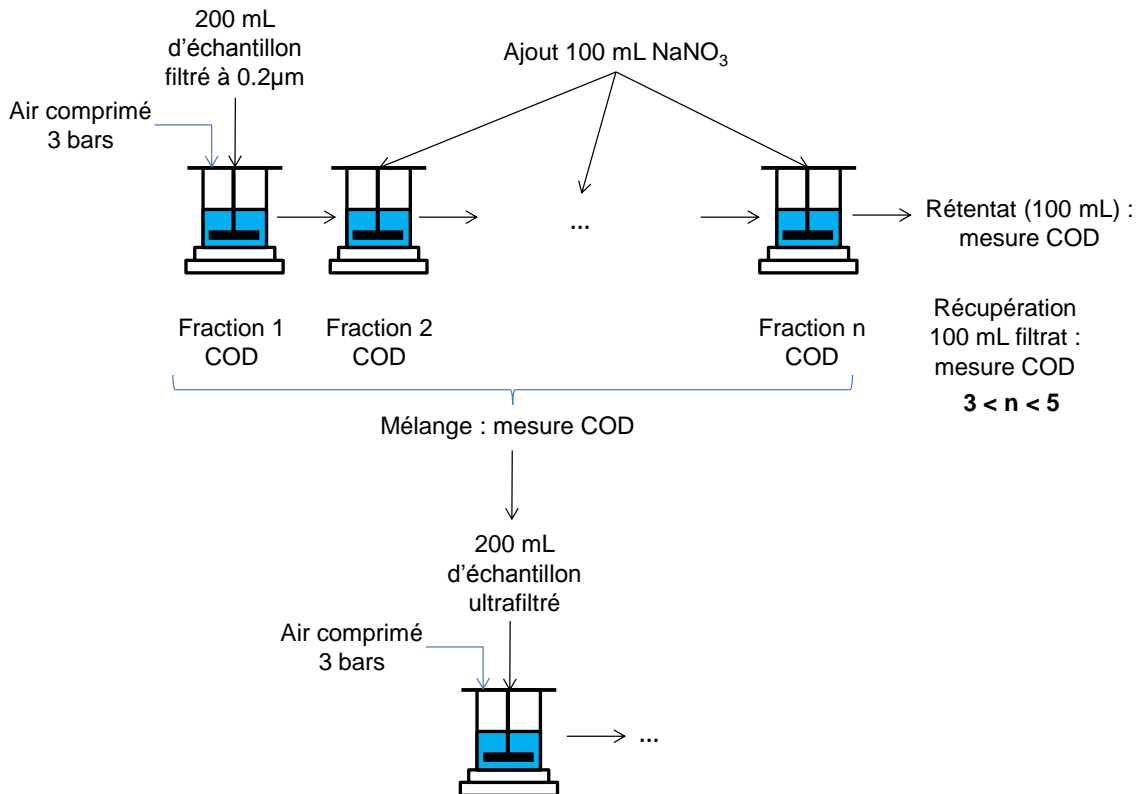


Figure 16: Protocole d'ultrafiltration utilisé en mode diafiltration

Une pression de 3 bars est appliquée avec de l'air comprimé afin de permettre le passage de la solution au travers de la membrane. Dès que 100 mL de filtrat sont récupérés (Fraction 1), 100 mL de solution de NaNO₃ sont introduits dans la cellule, l'échantillon est de nouveau filtré sur la même membrane et une deuxième fraction est alors récupérée. Ce schéma est ainsi répété entre 3 et 5 fois selon la concentration initiale de l'échantillon. La concentration en COD est déterminée dans chaque filtrat ainsi que dans le rétentat. Elle décroît de façon exponentielle dans le filtrat à chaque itération. Il est alors possible de modéliser cette fonction exponentielle décroissante et d'extrapoler les résultats à un nombre infini d'itérations. La quantité totale de carbone pouvant traverser la membrane peut alors être déterminée en intégrant cette fonction. Les fractions récupérées (dont la teneur en COD n'est pas négligeable) sont ensuite mélangées et le COD du mélange est mesuré. 200 mL de ce mélange sont introduits dans la cellule d'ultrafiltration équipée d'une membrane de seuil de coupure inférieur. Ce protocole est répété pour les autres seuils de coupure et la répartition des PMA peut ainsi être évaluée. Dès que le COD est inférieur à 0,2 mgC.L⁻¹, le fractionnement est arrêté. Les fractionnements sont réalisés en duplicats.

V. Analyse par spectroscopie de fluorescence 3D

Les résultats d'analyse des fractions de MO extraites par spectroscopie de fluorescence 3D sont présentés dans l'**Article 3**. Les échantillons analysés sont les mêmes que ceux utilisés pour le fractionnement de taille par ultrafiltration. Deux types d'échantillons sont donc testés : les échantillons non fractionnés ("Total") et chacune des fractions extraites sur résines XAD (HPO, TPH et HPI, voir Partie 2, III.1.3.). Une comparaison est ainsi effectuée entre composés organiques d'origines différentes : MOA (cultures en laboratoire d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa*, voir Partie 2, II.) et MON (Etang de Pigéard, Hiver). De plus, les propriétés de MOA issues de cultures d'âges différents sont comparées à partir d'échantillons provenant de cultures d'*E. gracilis* et *M. aeruginosa* en début de phase stationnaire et au cours de la phase de déclin avancé (après 16 mois de culture), afin d'évaluer les impacts des processus d'humification sur les caractéristiques de la MOA. Les impacts de l'eutrophisation sur les caractéristiques de la MON sont également évalués par analyse de fractions provenant d'une part de l'étang eutrophe de Pigéard et d'autre part fournies par l'IHSS (AH et AF de Suwannee River).

Les analyses sont réalisées à température ambiante (environ 21°C) sur les échantillons préalablement filtrés à 0,45µm sur filtres en nitrate de cellulose, dont le pH a été ajusté à 6,5 ± 0,1 et dont la concentration est comprise entre 1 et 5 mgC.L⁻¹, afin d'éviter les effets de filtre interne ainsi que la saturation du détecteur. De plus, la force ionique des échantillons (dont la conductivité est comprise entre 3 et 3700 µs.cm⁻¹, selon le type de fraction) n'a pas été tamponnée dans la mesure où Mobed *et al.*, (1996) ont montré qu'une force ionique comprise dans la gamme 0-1M KCl (10,2 S.m⁻¹ à 20°C) n'avait pas d'effet significatif sur les spectres. L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre 3D Shimadzu RF-5301 PC équipé du logiciel d'acquisition Panorama Fluorescence 2.1, et muni d'une cuve en quartz de trajet optique 1 cm. La stabilité de l'appareil est vérifiée avant chaque série d'analyse en utilisant la fluorescence due à la diffusion de Raman de l'eau ultra-pure. La variation de l'intensité de fluorescence mesurée à λ_{ex} = 350 nm et λ_{em} = 395 nm est inférieure à 2%. Les matrices d'excitation-émission sont tracées en effectuant une série de scans dont la longueur d'onde d'excitation varie de 220 à 500 nm par pas de 5nm et la longueur d'onde d'émission est comprise entre 250 et 600 nm, par pas de 1 nm. Deux indices de fluorescence, l'indice d'humification (HIX) et l'indice de fluorescence (FI) (Zsolnay *et al.*, 1999 ; McKnight *et al.*, 2001) sont également calculés avec les données collectées, selon l'Équation 1 et l'Équation 2 respectivement.

Equation 1 : Indice d'humification (HIX) (d'après Zsolnay *et al.*, 1999)

$$HIX = \frac{\int_{345nm}^{480nm} I_{\lambda_{em}} d\lambda_{em}}{\int_{300nm}^{435nm} I_{\lambda_{em}} d\lambda_{em}}$$

Equation 2 : Indice de Fluorescence (FI) (d'après McKnight *et al.*, 2001)

$$FI = \frac{I_{\lambda_{em} = 450nm}}{I_{\lambda_{em} = 500nm}}$$

VI. Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Une caractérisation avancée des structures et de la composition des fractions HPO et TPH extraites de cultures d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa* en début de phase stationnaire (Partie 2, III.1.3.) est effectuée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS). Les structures observées sont comparées avec celles de fractions de MON : AH (réf. 2S101H) et AF (réf. 2S101F) issus de la Suwannee River. L'application de cette technique analytique à des échantillons complexes tels que ceux de MON ou de MOA nécessite une optimisation préalable (Partie 1, II.2.1.). Dans cette optique, ce travail s'est largement appuyé sur l'étude menée par Mugo et Bottaro, (2004).

Les analyses sont effectuées grâce à un spectromètre de masse 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems/MDS SCIEX), en collaboration avec l'unité de pharmacologie (plateforme de spectrométrie de masse) de la faculté de médecine et de pharmacie de l'Université de Limoges. L'appareil est équipé d'un laser de type ND:YAG ($\lambda_{em} = 355nm$, pulsation 3 à 7 ns) dont la puissance est réglable de 2000 à 5000 (unité arbitraire). Le système est paramétré de la façon suivante :

- mode d'ionisation : positif
- mode de détection : réflecteur
- gamme de masses analysées : 100 à 2000 m/z
- acquisition : 900 coups de laser, 30 sous-spectres et acquisition du spectre moyen

Pour chaque échantillon, les analyses sont réalisées en mode LDI (sans matrice) et en mode MALDI (avec matrice). L'ensemble des conditions testées au cours de l'étude est donné dans le Tableau XIX.

- Préparation des échantillons en LDI

Pour dissoudre les échantillons d'AF et d'AH issus de *Suwannee river*, différents tampons de solubilisation ont été testés : un mélange ACN (Acétonitrile)-eau (1:1), un mélange ACN-0,1% TFA (Acide trifluoroacétique) (7:3), une solution de NaOH à 0,036 mol.L⁻¹ et une solution de KOH à 0,036 mol.L⁻¹. L'optimisation a également porté sur la concentration en échantillon : une solution à 1 mg/mL est préparée, puis les solutions à 0,1 ; 0,01 et 0,001 mg.mL⁻¹ sont réalisées par dilutions successives. Pour les fractions HPO et TPH issues d'*E. gracilis* de *M. aeruginosa*, les tampons ACN-eau (1:1) et ACN-0,1%TFA (7:3) sont testés, aux concentrations suivantes : 2,5 ; 1 ; 0,1 ; 0,01 et 0,001 mg.mL⁻¹. En effet, un premier essai mené sur les AH avec NaOH et KOH comme tampons de solubilisation n'a pas permis une bonne ionisation probablement due à la mauvaise cristallisation de l'échantillon

(Figure 17). Les solutions de NaOH et KOH n'ont donc pas été retenues pour les essais sur les autres fractions. L'optimisation a également porté sur la puissance du laser.

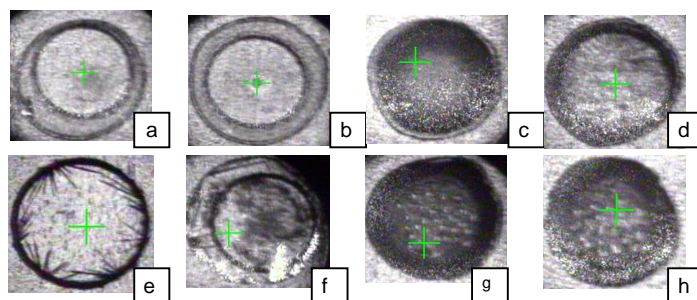


Figure 17: Vues à la caméra du MALDI-TOF des dépôts d'échantillons dans les différents tampons de solubilisation sans matrice (a à d) et avec matrice (e à h)

a : AF/ACN-eau (1:1), b : AF/ACN-TFA (7:3), c : AH/NaOH, d : AH/KOH

e : AF/ACN-eau(1:1)/DHB, f : AF/ACN-TFA(7:3)/DHB, g : AH/NaOH/DHB, h : AH/KOH/DHB

- Préparation des échantillons en MALDI

Mugo et Bottaro (2004) ont testé différentes matrices pour étudier la MO de Suwannee River. L'ionisation était la plus efficace avec la matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque); elle a donc été choisie pour cette étude. La concentration en matrice utilisée est fixée à 10 mg.mL⁻¹. Le DHB, qui provient d'un kit de matrice (DHB matrix kit, LaserBio Labs), est repris dans un mélange ACN/TFA (3:7). Pour chaque concentration en échantillon, une solution de mélange échantillon/matrice (1:1) est réalisée, et ainsi, différents ratios analyte/matrice sont testés.

Tableau XIX: Récapitulatif des conditions expérimentales testées pour l'optimisation des spectres de masse

Origine	Echantillons	Tampon de solubilisation	Concentration	Matrice DHB	Ratio analyte/matrice	Puissance du laser
Suwannee River	AH	0,036 mol.L ⁻¹ NaOH 0,036 mol.L ⁻¹ KOH ACN/eau (1:1)	1; 0,1; 0,01 et 0,001 mg.mL ⁻¹	10 mg.mL ⁻¹	1:10; 1:100; 1:1000 et 1:10 000	3000; 4000 et 5000 (unité arbitraire)
	AF	ACN/eau (1:1) ACN/0.1% TFA (7:3)				
<i>E. gracilis</i>	HPO	ACN/eau (1:1) ACN/0.1% TFA (7:3)	2,5; 1; 0,1; 0,01 et 0,001 mg.mL ⁻¹		1:4; 1:10; 1:100; 1:1000 et 1:10 000	
	TPH					
<i>M. aeruginosa</i>	HPO	ACN/eau (1:1) ACN/0.1% TFA (7:3)	2,5; 1; 0,1; 0,01 et 0,001 mg.mL ⁻¹	1:4; 1:10; 1:100; 1:1000 et 1:10 000		
	TPH					

Une fois les échantillons préparés, les mélanges sont déposés (1µL) sur la plaque d'analyse (de type 384 Opti-TOF 123×81mm), qui est mise à sécher quelques minutes afin de

permettre la cristallisation du mélange (méthode de dépôt par goutte séchée, préconisée par Mugo & Bottaro, (2004) pour l'étude des SH car elle permet une meilleure ionisation que les méthodes par évaporation rapide ou lente ou par couche superposée). La plaque est ensuite chargée dans une chambre où le vide est réalisé par la suite (5.10^{-7} torr). Avant analyse, la calibration de l'appareil est vérifiée avec du DHB, dont la position des pics est connue (904,486 ; 1296,685 ; 1570,677 ; 2093,087 ; 2465,199 et 3657,929 m/z).

La répétabilité de la méthode est vérifiée par acquisition de trois spectres sur un même spot d'échantillon, avec des conditions expérimentales identiques, sur une gamme de masses de 700 à 1100 m/z. Les pics majoritaires et leurs intensités ont été regroupés dans le Tableau XX.

Tableau XX: Pics de masse et intensités relatives correspondantes pour trois spectres acquis successivement pour un même spot (échantillon testé : TPH *M. aeruginosa* à 2,5mg/mL, tampon solubilisation ACN/0.1%TFA 7:1, sans matrice)

Pics de masse m/z			Ecart-type %	Intensité relative			Ecart-type %
spectre 1	spectre 2	spectre 3		spectre 1	spectre 2	spectre 3	
760,664	760,666	760,660	4,1E-04	8,03	7,38	6,37	11,5
793,313	793,315	793,309	4,4E-04	7,46	7,07	5,42	16,3
851,344	851,342	851,341	1,7E-04	8,71	8,75	6,67	14,8
893,394	893,394	893,391	2,0E-04	6,74	6,69	5,15	14,6
909,374	909,373	909,373	1,0E-04	9,87	9,77	8,4	8,8
951,429	951,428	951,423	3,5E-04	7,9	6,6	6,23	12,7
967,408	967,402	967,404	3,4E-04	10,73	9,96	8,68	10,6
1009,465	1009,459	1009,458	3,7E-04	7,13	6,21	5,57	12,4
1025,442	1025,440	1025,438	2,1E-04	9,34	8,97	8,34	5,7
1083,479	1083,470	1083,474	4,3E-04	8,35	7,7	7,1	8,1

En termes de position de pic, l'écart-type calculé pour chaque série est très faible (inférieur à 5.10^{-4} %). Donc les pics de masse pour un m/z donné sont toujours présents et ne sont pas décalés, ce qui montre que la technique est répétable. Cependant en termes d'intensité, il est observé une variabilité très importante. Ceci s'explique par le fait qu'en spottant plusieurs fois au même endroit avec le laser, la quantité d'échantillon s'épuise rapidement, d'où une diminution de l'intensité. En revanche, en s'intéressant aux intensités relatives, c'est-à-dire aux intensités rapportées à celle du pic majoritaire, il peut être noté une bonne répétabilité d'un spectre à l'autre (écart-type inférieur à 16% d'après le Tableau XX). Ceci indique que la relation entre les pics, et donc la caractérisation structurale, reste fiable d'une série à une autre.

L'interprétation des spectres de masses obtenus pour chacune des fractions de matière organique fait l'objet de l'**Article 4**. Cette interprétation est réalisée uniquement sur les spectres optimisés, c'est-à-dire présentant un maximum de pics aux meilleures intensités et résolutions possibles et permettant donc d'établir la meilleure caractérisation structurale. Le Tableau XXI présente les conditions expérimentales optimales pour chaque échantillon analysé en LDI et le Tableau XXII, celles des échantillons analysés en MALDI.

Tableau XXI: Conditions expérimentales optimales pour chaque échantillon analysé en LDI

Echantillon	Tampon de solubilisation	Concentration	Puissance laser
AH Suwannee River	ACN-water (1:1)	0,1 mg.mL ⁻¹	4000 (unité arbitraire)
AF Suwannee River	ACN-0,1% TFA (7:3)	0,001 mg.mL ⁻¹	
HPO <i>E. gracilis</i>	ACN-eau (1:1)	0,01 mg.mL ⁻¹	
TPH <i>E. gracilis</i>		0,1 mg.mL ⁻¹	
HPO <i>M. aeruginosa</i>		2,5 mg.mL ⁻¹	
TPH <i>M. aeruginosa</i>			

Tableau XXII: Conditions expérimentales optimales pour chaque échantillon analysé en MALDI (matrice DHB à 10mg.mL⁻¹)

Echantillon	Tampon de solubilisation	Concentration	Ratio analyte/matrice	Puissance laser
AH Suwannee River	ACN-water (1:1)	1 mg.mL ⁻¹	1:10	5000 (unité arbitraire)
AF Suwannee River	ACN-0,1% TFA (7:3)	1 mg.mL ⁻¹	1:10	
HPO <i>E. gracilis</i>	ACN-eau (1:1)	0,001 mg.mL ⁻¹	1:10 000	
TPH <i>E. gracilis</i>				
HPO <i>M. aeruginosa</i>		2,5 mg.mL ⁻¹	1:4	
TPH <i>M. aeruginosa</i>				

VII. Suivi *in-situ* sur le site de l'étang de Pigeard

L'objectif de cette partie est de déterminer l'impact des proliférations d'algues et de cyanobactéries sur les caractéristiques de la MON, directement à l'échelle du site. Pour cela, un suivi comparatif de l'évolution de paramètres bio-physico-chimiques est réalisé sur deux ressources en eaux dont le fonctionnement est différent. Le choix du site d'étude s'est porté sur l'étang de Pigeard, qui a été identifié grâce à une étude préalable (Antoine *et al.*, 2009) menée par le Syndicat d'Aménagement du Bassin de la Vienne (SABV) comme vecteur récurrent de cyanobactéries sur le bassin versant de la Valette, puis sur celui de la Glane.

VII.1. Présentation du site d'étude et stratégie d'échantillonnage

Le site de l'étang de Pigeard est situé à 5km de Nieul, soit à environ 20 km au Nord-Ouest de Limoges (87). L'étang est alimenté par la Valette, un affluent de la Glane. En amont de l'étang, l'occupation des sols est dominée par l'agriculture (surfaces agricoles discontinues et prairies, Figure 18). Les caractéristiques du bassin versant de l'étang de Pigeard sont présentées dans le Tableau XXIII.

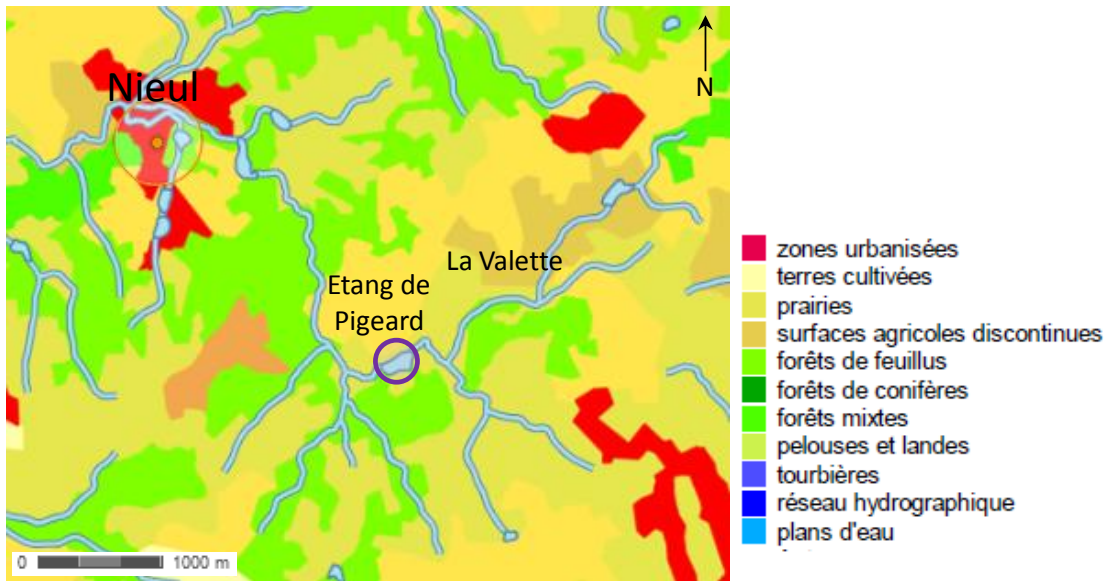


Figure 18 : Occupation des sols sur le bassin versant de la Valette (données Corine Land Cover 2006, accessible sur <http://www.geoportail.gouv.fr>).

Tableau XXIII : Caractéristiques du bassin versant de l'étang de Pigeard

Surface	697 ha
Plus long chemin de l'eau (Lce)	4,470 km
Pente	0,021 m/m
Module	13,1 L/s
Coefficient de ruissellement	0,15
Q100	7,25 m ³ /s

L'étang de Pigeard est un étang artificiel privé et peu profond (la profondeur maximale est d'environ 2 m 30, pour une surface d'environ 3,2 ha), dont les coordonnées GPS sont : latitude 45°54'N et longitude 1°11'E. Des activités de pêche (loisirs) sont pratiquées sur l'étang qui est chaulé une fois par an. Trois points de prélèvement ont été définis sur le site de l'étang de Pigeard (Figure 19). Le premier est situé sur la Valette, une rivière non soumise à des proliférations algales, juste avant qu'elle ne se jette dans l'étang. A ce point de prélèvement, la rivière fait environ 30 cm de profondeur pour 40 cm de large. Les deux autres points de prélèvement sont situés dans l'étang, au niveau où la profondeur de la colonne d'eau est maximale. Pour une même colonne d'eau, les échantillons sont prélevés en surface, à environ 30 cm de profondeur et au fond, à environ 20-50 cm au dessus des sédiments.

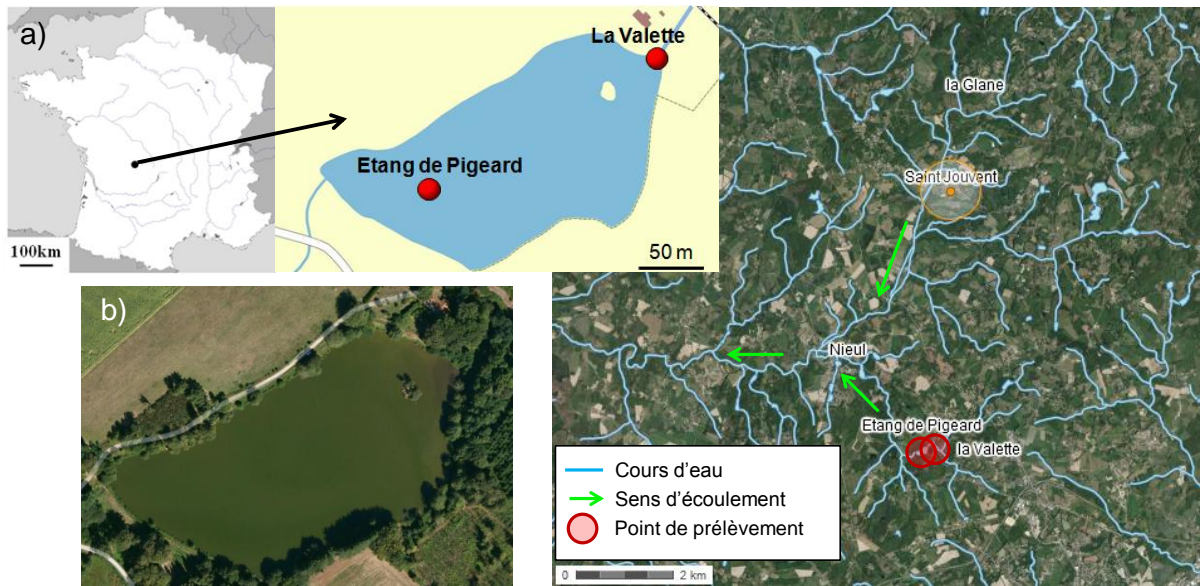


Figure 19 : a) Localisation des points de prélèvement (Etang de Pigeard et la Valette) sur le site d'étude ; b) Vue aérienne du site de l'étang de Pigeard.

Chaque point de prélèvement est équipé d'une sonde multi-paramètres MS5 (OTT) permettant d'enregistrer, à une fréquence d'une mesure par heure, les paramètres globaux de qualité de l'eau (température, pH, conductivité, O₂ dissous et potentiel d'oxydo-réduction, Tableau XXIV). Cependant, l'étang n'est pas assez profond pour observer une stratification thermique et la zone d'anoxie est limitée à une hauteur d'environ 30 cm au dessus des sédiments, si bien que les résultats des analyses sont très proches pour les deux points de prélèvement situés sur l'étang. L'*Article 5* présente les résultats de l'étude qui prend en compte les points de prélèvement situés sur la Valette et en surface de l'étang.

Le suivi a été mis en place sur une période de 18 mois, de Janvier 2012 à Juillet 2013. Les prélèvements sont effectués à une fréquence d'un par mois en l'absence de développement phytoplanctonique marqué (de décembre à mars) et d'un tous les quinze jours en période de développement d'algues ou de cyanobactéries (d'avril à novembre). Les prélèvements sont réalisés en matinée, entre 9h et 11h. Les échantillons sont collectés dans des bidons de 6L en polyéthylène préalablement nettoyés à l'acide et soigneusement rincés à l'eau ultra-pure. Une fois prélevés, les échantillons d'eau sont ramenés dans l'heure au laboratoire pour analyse et sont ensuite conservés à 4°C et à l'obscurité.

VII.2. Analyses effectuées

Afin de pouvoir comprendre la dynamique de fonctionnement de l'étang et de mettre en relation les caractéristiques de la matière organique avec le développement des algues ou cyanobactéries, un certain nombre de paramètres bio-physico-chimiques ont été suivis (Tableau XXIV). La bibliographie a permis d'établir les paramètres favorables à la prolifération du phytoplancton tels que les conditions climatiques ou la quantité de nutriments disponibles. De plus, les blooms peuvent également être suivis au travers de leurs conséquences sur la qualité de l'eau, notamment au niveau des variations de pH, d'oxygène dissous ou encore *via* la production de matière organique. Le Tableau XXIV présente une synthèse des paramètres mesurés au cours de ce suivi.

Tableau XXIV: Synthèse des paramètres analysés au cours du suivi réalisé sur le site de l'étang de Pigeard

	Paramètres	Matériel/méthode utilisé(e)	Précision	Réplicats	Préparation échantillon
Conditions météorologiques	Température de l'air	Données Météo France (Station de Limoges Bellegarde située à environ 3 km du site d'étude) www.meteofrance.com			
	Ensoleillement (<i>durée, intensité</i>)				
	Pluviométrie				
	Vent (<i>force, direction</i>)				
Paramètres globaux	Température de l'eau	Sonde multi-paramètres MS5 (OTT)	± 0,10°C	1	<i>In-situ</i> , brut
	pH		± 0,2		<i>In-situ</i> , brut
	Conductivité		± 0,001 mS.cm ⁻¹		<i>In-situ</i> , brut
	O ₂ dissous		± 0,2 mg.L ⁻¹		<i>In-situ</i> , brut
	Potentiel redox		± 20 mV		<i>In-situ</i> , brut
	Turbidité	Turbidimètre Turb 550 IR	± 2%	3	Brut
	Matières en suspension (MES/MVS)	Norme NF EN 872 T90-105	-	3	1,2 µm, fibres de verre
Quantification éléments nutritifs	Azote total dissous (TDN)	Module TNM-L COT-mètre Shimadzu TOC-L	± 3%	2	0,45 µm, nitrate de cellulose
	Ions majeurs Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ et NH ₄ ⁺ Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ et PO ₄ ³⁻	Chromatographie ionique Dionex DX-120	± 5%	1	0,2 µm, nylon
Suivi des populations phytoplanktoniques	Dénombrement cellules d'algues et de cyanobactéries	Cytomètre en flux FACSCalibur (Becton-Dickinson) Partie 2, II.4.	± 4%	1	Brut
	Chlorophylle a	Norme NF T 90-117	-	3	0,8 µm, acétate de cellulose
	Identification des populations majoritaires	Fixation au lugol (1% v/v), Microscope Olympus CX31 (x100)	-	1	Brut
Quantification et caractérisation de MO	COD	COT-mètre Shimadzu TOC-L, Partie 2, III.1.1.	± 2%	2	0,45 µm, nitrate de cellulose
	Fractionnement selon le caractère hydrophobe	Résines DAX-8/XAD-4, COT-mètre Shimadzu TOC-L (Partie 2, III.1.3.	± 3%	2	
	Absorbance UV 254 nm	Spectrophotomètre Shimadzu Pharmaspec 1700, cuves en quartz trajet optique 1cm	± 0,005	2	
	Indice SUVA	Weishaar <i>et al.</i> , (2003) (Partie 2, III.1.2.)	-	2	

- Paramètres météorologiques

Les données météorologiques (température de l'air, ensoleillement, précipitations, vent), mesurées au niveau de la station de Limoges Bellegarde (3km du site d'étude), sont fournies par Météo France (www.meteofrance.com).

- Paramètres globaux

Les paramètres globaux - température ($\pm 0,10^\circ\text{C}$), pH ($\pm 0,2$), conductivité ($\pm 0,001 \text{ mS.cm}^{-1}$), potentiel d'oxydo-réduction ($\pm 20 \text{ mV}$) et oxygène dissous ($\pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) - permettent d'estimer la qualité d'ensemble de l'eau. Ils sont mesurés *in-situ* grâce à une sonde multi-paramètres MS5 (OTT), assurant un enregistrement des données à une fréquence d'une mesure par heure.

La mesure de la turbidité permet d'estimer la transparence de l'eau : plus la turbidité de l'eau est élevée et moins la lumière est disponible pour les organismes photosynthétiques. L'analyse est effectuée en triplicats dès le retour au laboratoire, sur les échantillons non filtrés, à l'aide d'un turbidimètre Turb IR 550 (précision $\pm 2\%$).

La mesure des Matières En Suspension (MES) est effectuée dès le retour au laboratoire, selon la Norme NF EN 872 T90-105. Cette mesure permet d'estimer l'influence relative des apports sous forme particulaire en provenance du bassin versant par rapport à la production autochtone. L'analyse est réalisée en triplicats. Les échantillons sont filtrés sur membranes en fibres de verre de seuil de coupure $1,2\mu\text{m}$, préalablement rincés à l'eau ultra-pure, séchés à 105°C et pesés. Le filtre est mis à l'étuve à 105°C jusqu'à stabilisation de la masse. La pesée après séchage permet de déterminer la teneur en MES (Équation 11).

Le filtre est ensuite mis au four à 550°C pendant 2h pour calcination, puis il est mis à refroidir et sa pesée permet de déterminer la teneur en Matières Minérales en Suspension (MMS) (Équation 12). La teneur en Matières Volatiles en Suspension (MVS), assimilables à la matière organique, est alors estimée par différence avec les MES (Équation 13).

Équation 11 : Calcul des MES

$$MES = \frac{M_{105} - M_{\text{filtre}}}{V_{\text{filtré}}}$$

Équation 12: Calcul des MMS

$$MMS = \frac{M_{550} - M_{\text{filtre}}}{V_{\text{filtré}}}$$

Équation 13 : Calcul des MVS

$$MVS = MES - MMS = \frac{M_{105} - M_{550}}{V_{\text{filtré}}}$$

Avec MES la concentration en MES (mg.L^{-1})

MVS la concentration en MVS (mg.L^{-1})

MMS la concentration en MMS (mg.L^{-1})

M_{105} la masse du filtre après filtration et passage à l'étuve à 105°C (mg)

M_{550} la masse du filtre après calcination à 550°C (mg)

M_{filtre} la masse initiale du filtre sec (mg)

$V_{\text{filtré}}$ le volume d'échantillon filtré (L)

- Quantification des éléments nutritifs

L'azote et le phosphore sont les deux éléments majeurs pouvant limiter la croissance du phytoplancton. Ils sont immédiatement biodisponibles sous la forme ionique.

L'azote total dissous (TDN) est quantifié sur les échantillons filtrés à 0,45µm à l'aide du module TNM-L (précision $\pm 3\%$, limite de détection 20 µgN.L⁻¹) équipant le COT-mètre Shimadzu TOC-L. La combustion des échantillons dans un four à 720°C, catalysée en présence de platine conduit à la formation d'oxyde d'azote. L'oxydation par ozonation du NO précédemment formé permet de produire du NO₂, quantifié par chimiluminescence. Les analyses sont effectuées en duplicats. L'azote total dissous comprend les formes ioniques de l'azote (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺, dosées par chromatographie ionique) ainsi que l'azote organique, qui peut ainsi être déterminé par différence.

Les cations (Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺, K⁺ et NH₄⁺) et anions (Cl⁻, SO₄²⁻, NO₃⁻, NO₂⁻ et PO₄³⁻) majeurs sont quantifiés par chromatographie ionique Dionex DX-120, après filtration sur membranes en nylon de seuil de coupure 0,2µm. Les colonnes Ion Pac® AG9-HC (pré-colonne) et Ion Pac® AS9-HC sont utilisées pour l'analyse des anions et les colonnes Ion Pac® CG12 (pré-colonne) et Ion Pac® CS12 pour l'analyse des cations. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont données dans le Tableau XXV.

Tableau XXV : Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) des ions dosés par chromatographie ionique

(mg/L)	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	PO ₄ ³⁻	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺
LD	0,15	0,02	0,14	0,02	0,15	0,08	0,08	0,03	0,05	0,10
LQ	0,50	0,08	0,45	0,08	0,50	0,25	0,25	0,10	0,15	0,33

- Suivi des populations phytoplanctoniques

Les analyses sur le phytoplancton sont réalisées le plus rapidement possible après le retour au laboratoire, dans les 12-24h suivant le prélèvement. L'évolution des populations d'algues et de cyanobactéries est suivie, d'un point de vue quantitatif, grâce à un dénombrement des cellules par cytométrie en flux (Partie 2, II.4.) ainsi que par détermination de la concentration en chlorophylle a.

La chlorophylle a (Chl a) est quantifiée selon la norme NF T 90-117. L'échantillon est filtré sur filtre en acétate de cellulose de seuil de coupure 0,8µm. Le filtre est ensuite dissout dans de l'acétone à 90% (v/v) afin d'extraire les pigments contenus dans les cellules. Ces extraits sont alors centrifugés à 3500g pendant 10min afin de séparer les particules en suspension. Un blanc est réalisé par dissolution d'un filtre en acétate de cellulose dans de

l'acétone à 90%. L'absorbance du surnageant est alors mesurée aux longueurs d'onde 750 nm et 665 nm. Le surnageant est ensuite acidifié avec HCl 5M (10 µL d'acide pour 10 mL d'échantillon). L'absorbance de l'extrait acidifié est également mesurée aux longueurs d'onde 750 nm et 665 nm. La concentration en chlorophylle a est calculée à partir de l'équation de Lorenzen (Équation 14). Les analyses sont réalisées en triplicats.

Équation 14: Equation de Lorenzen

$$Chla = 27 \times \frac{[(A_0 665 - A_0 750) - (A_a 665 - A_a 750)] \times v}{L \times V_{éch}}$$

Avec *Chla* la concentration en chlorophylle a (µg.L⁻¹)

A₀665 l'absorbance de l'extrait non acidifié à 665nm (cm⁻¹)

A₀750 l'absorbance de l'extrait non acidifié à 750nm (cm⁻¹)

A_a665 l'absorbance de l'extrait acidifié à 665nm (cm⁻¹)

A_a750 l'absorbance de l'extrait acidifié à 750nm (cm⁻¹)

v le volume de solvant utilisé (mL)

V_{éch} le volume d'échantillon filtré (mL)

L le trajet optique de la cuve (ici 1cm)

D'un point de vue qualitatif, une observation au microscope permet de déterminer le genre des populations majoritaires. Les échantillons sont préalablement fixés au Lugol (1% v/v) et sont ensuite observés au microscope (Microscope Olympus CX31, grossissement x100).

- Quantification et caractérisation de matière organique

La matière organique est quantifiée par mesure du COD après filtration de l'échantillon à 0,45µm sur filtre en nitrate de cellulose (Partie 2, III.1.1.). La mesure est réalisée en duplicats.

L'absorbance UV à 254 nm des échantillons filtrés à 0,45µm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible Shimadzu Pharmaspec 1700 (précision ± 0,005) à double faisceau, avec des cuves en quartz de trajet optique 1cm. La mesure est réalisée en duplicats.

La matière organique est caractérisée par fractionnement selon le caractère hydrophobe, après filtration de l'échantillon à 0,45µm (Partie 2, III.1.3.). Le fractionnement est réalisé en duplicats.

La mesure de l'absorbance UV à 254 nm permet de déterminer, par couplage avec le COD, l'indice SUVA (Partie 2, III.1.2.) des échantillons non fractionnés (Indice global) ainsi que des fractions de matière organique (HPO, TPH et HPI).

VIII. Traitement des eaux : essais de coagulation-floculation

La compréhension du mécanisme d'élimination de la MOA générée par les phénomènes d'eutrophisation au cours du procédé de coagulation-floculation est abordée par une approche tridimensionnelle, de façon à apprécier la réactivité globale d'échantillons d'eaux naturelles, la réactivité de souches mono-spécifiques et la réactivité de fractions de matière organique extraites. Les résultats des essais de coagulation-floculation sont présentés dans l'**Article 6**. Cette étude se déroule en trois étapes :

1/ Comparaison de l'élimination globale de différentes souches mono-spécifiques d'algues et de cyanobactéries cultivées en milieu synthétique en laboratoire et de la matière organique générée au cours de leur croissance,

2/ Comparaison de la réactivité globale d'échantillons prélevés sur un milieu eutrophe (Etang de Pigeard) et non eutrophe (Rivière Glane) à différentes saisons,

3/ Comparaison de la réactivité d'une eau synthétique (reconstituée selon les caractéristiques d'une eau du Limousin) contenant des fractions de matières organiques extraites d'origines diverses, et à différents degrés d'humification.

VIII.1. Origine des échantillons testés

VIII.1.1. Essais sur eaux naturelles

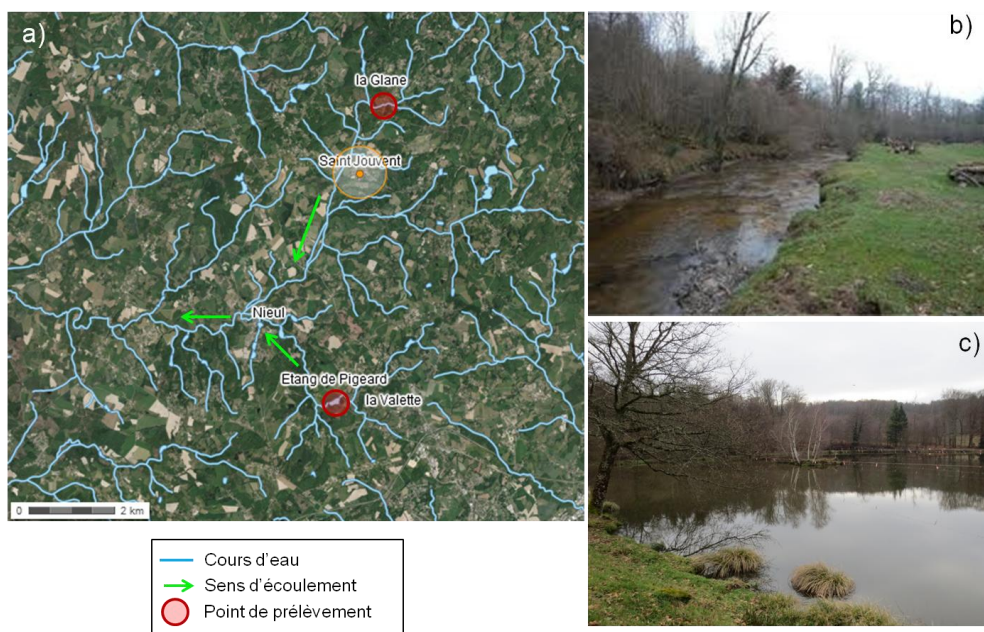


Figure 20: a) Localisation des points de prélèvement; b) Photo du site de la Glane; c) Photo du site de l'étang de Pigeard

Les échantillons d'eaux naturelles testés ont été prélevés sur le site de l'étang de Pigeard et de la rivière Glane, le 12/02/2013 pour la période hivernale, le 05/06/2013 pour la période printanière et le 09/07/2013 pour la période estivale.

Les échantillons de la Glane ont été prélevés près de St Jouvent (87) (coordonnées GPS : latitude 45°97'N et longitude 1°21'E) (Figure 20). Des études effectuées par le Syndicat d'Aménagement du Bassin de la Vienne (SABV), ont montré, que dans cette zone, la Glane n'est pas soumise au phénomène d'eutrophisation. Il sera donc admis le caractère non eutrophe de l'eau prélevée. La Figure 21 montre sur le bassin versant de la Glane, qu'en amont du point de prélèvement, les sols sont majoritairement occupés par des forêts et prairies.

Les essais ont été menés sur la Glane plutôt que sur la Valette dans la mesure où les 18 mois de suivi ont montré que bien que la Valette n'est pas soumise à des développements algaux, ses caractéristiques (concentration en nutriments et chlorophylle a) sont assimilables à celles d'une ressource eutrophe. En effet, de nombreux plans d'eau affectés par des phénomènes d'eutrophisation, situés en amont du point de prélèvement sur la Valette, impactent la qualité de l'eau. La Glane a donc été préférée à la Valette pour cette étude, car elle présente toutes les caractéristiques d'une ressource oligotrophe.

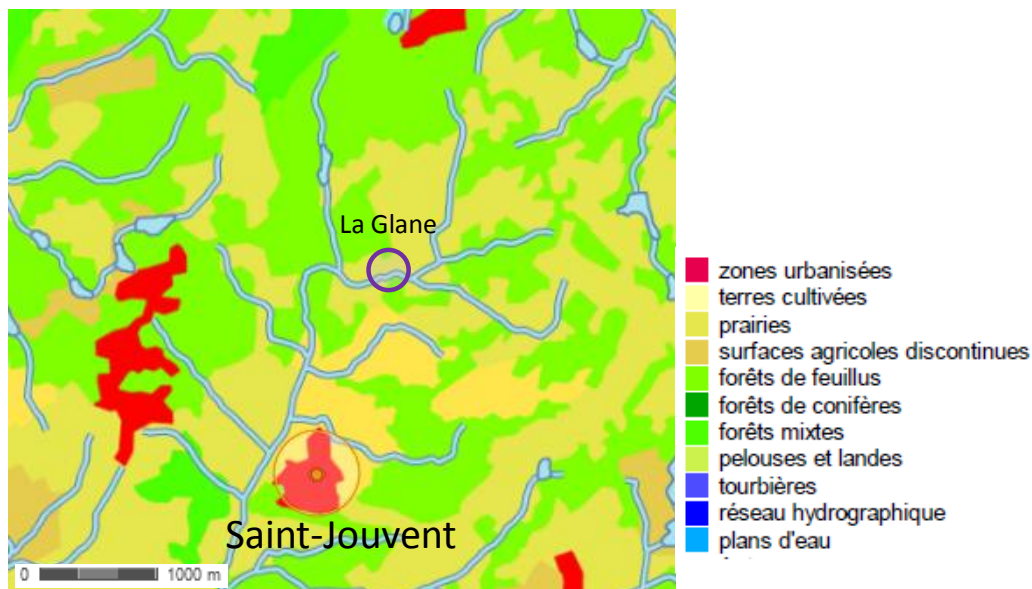


Figure 21 : Occupation des sols sur le bassin versant de la Glane, en amont du point de prélèvement (données Corine Land Cover 2006, accessible sur <http://www.geoportail.gouv.fr>).

Les caractéristiques des eaux sont présentées dans le Tableau XXVI. Les essais de coagulation-floculation réalisés sur ces échantillons naturels permettent de comparer la réactivité globale, à différentes saisons, d'eaux à caractère eutrophe ou non eutrophe. L'impact des proliférations d'algues et de cyanobactéries sur les performances du procédé en termes d'élimination du phytoplancton et de la matière organique associée est alors évalué.

Tableau XXVI: Comparaison des caractéristiques de l'eau reconstituée, adapté d'après Lenoble *et al.*, (2004) et Pallier *et al.*, (2010) et de celles des eaux naturelles issues de l'étang de Pigeard et de la Glane.

Paramètre	Eau reconstituée	Etang de Pigeard	Glane
pH (± 0.1)	6,0	7,5 à 9,6	7,3 à 7,7
Turbidité (± 1 NTU)	18	6,8 à 17,5	6,5 à 57,7
COD (± 0.5 mgC.L ⁻¹)	2,2 (HPO/AH/AF)	3,7 à 5,8	4,5 à 7,2
	1,0 (TPH)		
	2,2 (HPI)		
Algues ($\pm 4\%$) (cellules/mL)	-	7 500 à 72 300	1 500 à 4 900
Cyanobactéries ($\pm 4\%$) (cellules.mL ⁻¹)	-	7 300 à 569 200	<100 à 600
Concentration moyenne des ions majeurs¹ ($\pm 5\%$) (mg.L⁻¹)			
Ca ²⁺	3,6	6,3	3,6
Mg ²⁺	1,5	1,6	1,3
Na ⁺	7,0	8,6	7,2
K ⁺	0,9	2,1	1,3
NH ₄ ⁺	-	<LD ²	<LD ²
Cl ⁻	8,6	13,4	10,8
SO ₄ ²⁻	4,0	8,5	6,1
NO ₃ ⁻	10,9	Min. 0,9 - Max. 11,2	8,5
NO ₂ ⁻	-	<LD ²	<LD ²
PO ₄ ³⁻	-	Min. <LQ ³ - Max. 1,3	<LQ ³

¹Concentrations déterminées par chromatographie ionique Dionex DX-120 après filtration sur filtres en nylon à 0,2 μ m.

²Limite de détection

³Limite de quantification

VIII.1.2. Essais sur échantillons issus de cultures en laboratoire d'algues et de cyanobactéries

Des essais sont effectués sur des cultures d'algues (*Euglena gracilis*) et de cyanobactéries (*Microcystis aeruginosa* et *Planktothrix agardhii*) réalisées en laboratoire, sur un milieu synthétique (Partie 2, II.), au début de la phase stationnaire. Au cours de cette phase, la population atteint sa densité maximum et la MOA résulte principalement de l'activité métabolique des cellules vivantes. Les tests sont ainsi réalisés directement sur les cultures après 21 jours pour *E. gracilis*, 28 jours pour *M. aeruginosa* et 90 jours pour *P. agardhii*.

VIII.1.3. Essais sur fractions de MO extraites

L'influence de trois paramètres : origine, espèce et degré d'humification, paramètres ayant un impact sur les caractéristiques de la MO et donc sur le procédé de traitement, est

étudiée lors d'essais de coagulation-floculation sur une eau synthétique contenant différentes fractions de MON ou MOA. Ces essais permettent de comparer la réactivité de fractions de MO extraites de cultures d'algues (*E. gracilis*) et de cyanobactéries (*M. aeruginosa*), à différents stades de maturité : MOA fraîchement produite en phase stationnaire ou MOA en cours d'humification pendant la phase de déclin avancé ; afin d'étudier à la fois l'influence de l'espèce produisant la MOA et des processus d'humification qui peuvent affecter cette MO. Ces fractions sont ainsi extraites à partir de cultures en phase stationnaire de croissance (21 jours pour *E. gracilis* ou 28 jours pour *M. aeruginosa*) et en phase de déclin avancé après 16 mois de culture. Les modalités de culture sont données dans la Partie 2, II. L'influence de l'origine de la MO (allochtone ou autochtone) est également déterminée par comparaison avec des fractions extraites du milieu naturel (Etang de Pigeard, hiver). Ces fractions sont extraites grâce à un protocole de fractionnement de la matière organique selon son caractère hydrophobe (Partie 2, III.1.3.). Des matières organiques commerciales, AH et AF (assimilables à la fraction HPO) issus de la Suwannee River et fournis par l'International Humic Substances Society (IHSS), permettent une comparaison avec un milieu non eutrophe (contribution allochtone plus marquée). Enfin, des AH fournis par Aldrich et issus de tourbe (origine allochtone) permettent de compléter l'étude de l'influence de l'origine de la matière organique sur les performances du procédé de traitement. L'ensemble des fractions étudiées au cours de ce travail est présenté dans le Tableau XXVII.

Tableau XXVII: Récapitulatif des fractions de matières organiques étudiées au cours de la coagulation-floculation

Matières Organiques Algales				Matières Organiques Naturelles		
<i>E. gracilis</i>		<i>M. aeruginosa</i>		Etang de Pigeard, Hiver	Suwannee River, IHSS	Tourbe (Allemagne) Aldrich
Phase stationnaire 21 jours	Phase de déclin avancé 16 mois	Phase stationnaire 28 jours	Phase de déclin avancé 16 mois			
HPO					AH	AH
TPH					AF	
HPI						

VIII.2. Préparation de l'eau synthétique

L'étude de la réactivité des différentes fractions HPO, TPH et HPI extraites de MOA ou MON ainsi que les fractions commerciales AH et AF fournies par Aldrich et l'IHSS nécessite l'utilisation d'une eau reconstituée pour la préparation des échantillons. Cette eau reconstituée (Lenoble *et al.*, 2004) présente des concentrations en ions majeurs voisines des conditions du milieu naturel mais une faible turbidité ($0,6 \pm 0,1$ NTU) non représentative des valeurs rencontrées dans les eaux naturelles. Cette faible turbidité ne facilite pas l'étape de coagulation. En effet, la formation de quantités adéquates de précipités d'hydroxyde métallique nécessite un ajout de matière argileuse (Zahiruddin et Leon, 2008), qui est réalisé par addition de kaolinite dans le but d'augmenter artificiellement la charge colloïdale de cette eau reconstituée (Pallier *et al.*, 2010). La concentration en kaolinite est choisie de manière à créer une turbidité finale de l'eau reconstituée en accord avec les ordres de grandeur des turbidités rencontrées dans le milieu naturel (10 – 30 NTU). La concentration optimale en

kaolinite est choisie égale à 23 mg.L^{-1} afin de créer une turbidité de $18 \pm 1 \text{ NTU}$. Pallier, (2008) a étudié l'adsorption de la MO sur ces argiles et a estimé qu'elle est négligeable en comparaison à ce qui est retenu par coagulation-floculation. Les caractéristiques de l'eau reconstituée sont décrites dans le Tableau XXVI.

Pour étudier la réactivité de chacune des fractions séparément, les concentrations testées sont définies telles qu'elles soient proches de celles rencontrées dans le milieu naturel. Ainsi, les valeurs choisies correspondent, pour chaque fraction, à la concentration moyenne retrouvée dans l'étang de Pigeard au cours de l'année 2012 : $2,2 \text{ mgC.L}^{-1}$ pour la fraction HPO (la même concentration est appliquée aux AH et AF), $1,0 \text{ mgC.L}^{-1}$ pour TPH et $2,2 \text{ mgC.L}^{-1}$ pour HPI. L'étude de la réactivité des fractions HPI nécessite des conditions spécifiques. En effet, cette fraction n'étant pas retenue sur les résines, elle reste en solution avec tous les sels et n'a donc pas été purifiée. Cette solution étant riche en sels, les fractions HPI ne sont pas reprises dans l'eau reconstituée mais conservées dans un milieu similaire. Pour comparer le comportement des fractions HPI, les échantillons sont placés dans des conditions similaires de concentration ($2,2 \text{ mgC.L}^{-1}$), de pH (6,5 par ajout de NaOH 4M et 1M), de force ionique (conductivité environ $1600 \mu\text{S.cm}^{-1}$) et de turbidité (ajout de kaolinite nécessaire pour obtenir une turbidité de 18 NTU).

VIII.3. Procédé de coagulation-floculation

Les essais sont réalisés sous forme de manipulations "Jar-tests" à l'aide d'un banc expérimental FC6S flocculator équipé de pales en acier inoxydable dont la vitesse de rotation est réglable et assurant l'agitation des échantillons. Cet appareil permet de travailler simultanément avec 6 béchers de 1L de forme haute.

VIII.3.1. Analyses effectuées

L'ensemble des paramètres analysés au cours des différents essais de coagulation-floculation et permettant d'évaluer les performances du procédé est synthétisé dans le Tableau XXVIII.

Le suivi du potentiel zêta est réalisé afin d'essayer de comprendre les mécanismes intervenant au cours du procédé de coagulation-floculation. Les mesures de pH et de turbidité permettent de suivre et de contrôler le bon fonctionnement du procédé de coagulation-floculation. La mesure du COD permet de quantifier la matière organique et d'évaluer son abattement. La mesure de l'absorbance à 254 nm, couplée au COD permet de calculer l'indice SUVA (Partie 2, III.1.2.). Un dénombrement des populations d'algues et de cyanobactéries est effectué par cytométrie en flux sur les échantillons prélevés sur l'étang de Pigeard et sur la Glane ainsi que sur les cultures d'algues. Ce dénombrement, effectué sur l'échantillon brut et sur l'échantillon après traitement, permet d'évaluer les performances du procédé sur l'élimination des populations d'algues et de cyanobactéries. Sur ces mêmes échantillons, la matière organique réfractaire au traitement est caractérisée par fractionnement selon le caractère hydrophobe, aux doses optimales de traitement.

Tableau XXVIII : Synthèse des paramètres mesurés au cours des essais de coagulation-floculation

Paramètre	Unité	Matériel/Références	Précision	Nombre de répliqués	Echantillons testés	
pH	-	pH-mètre Cyberscan pH 11, Eutech Instruments, électrode en verre combinée Ag/AgCl	± 0,1	1	Tous	Non filtrés
Turbidité	NTU	Turbidimètre Turb 550 IR	± 2%	3	Tous	Non filtrés
COD	mgC.L ⁻¹	COT-mètre Shimadzu TOC-L Partie 2, III.1.1.	± 2%	2	Tous	Filtrés à 0,45µm filtres en nitrate cellulose
Absorbance 254 nm	cm ⁻¹	Spectrophotomètre Shimadzu Pharmaspec 1700, cuves en quartz trajet optique 1cm	± 0,005	2	Tous	Filtrés à 0,45µm filtres en nitrate cellulose
Potentiel Zêta	mV	Zeta-mètre IV Z4000, CAD Instrumentation	-	3	Eaux synthétiques	Suspension colloïdale
Dénombrement algues & cyanobactéries	cellules/mL	Cytomètre en flux FACSCalibur, Becton Dickinson (Partie 2, II.4.)	± 4%	1	Eaux naturelles & cultures d'algues et de cyanobactéries	Non filtrés
Fractionnement selon le caractère hydrophobe	% COD	Résines DAX-8/XAD-4, COT-mètre Shimadzu TOC-L (Malcolm et MacCarthy, 1992) (Partie 2, III.1.3.)	± 3%	2	Avant coagulation et dose optimale pour eaux naturelles & cultures d'algues et de cyanobactéries	Filtrés à 0,45µm filtres en nitrate cellulose

VIII.3.2. Choix du coagulant & conditions expérimentales choisies

Le fer et l'aluminium sont les coagulants les plus testés dans les études sur l'élimination de la MOA par coagulation-floculation (Tableau XV). Dans un premier temps, des essais de coagulation-floculation ont été réalisés sur l'eau de l'étang de Pigéard, prélevée le 03/12/2012, afin d'évaluer les performances de deux coagulants : le chlorure ferrique (FeCl₃) et le sulfate d'aluminium (Al₂(SO₄)₃). Les conditions expérimentales appliquées sont présentées dans le Tableau XXIX.

Tableau XXIX: Conditions expérimentales utilisées pour le choix du coagulant

Coagulation : 3 min à $G = 380 \text{ s}^{-1}$ (150 rpm)						
Floculation : 15 min à $G = 35 \text{ s}^{-1}$ (30 rpm)						
Décantation : 30 min sans agitation						
Concentration en $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}^{3+}$ (mg.L^{-1})	9,2	18,3	27,5	36,7	45,8	55,0
Concentration en coagulant FeCl_3 (mg.L^{-1})	26,6	53,3	79,9	106,6	133,2	159,8
Concentration en coagulant $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (mg.L^{-1})	58,3	116,0	174,4	232,7	290,4	348,7
pH de coagulation	6,3 - 6,8					

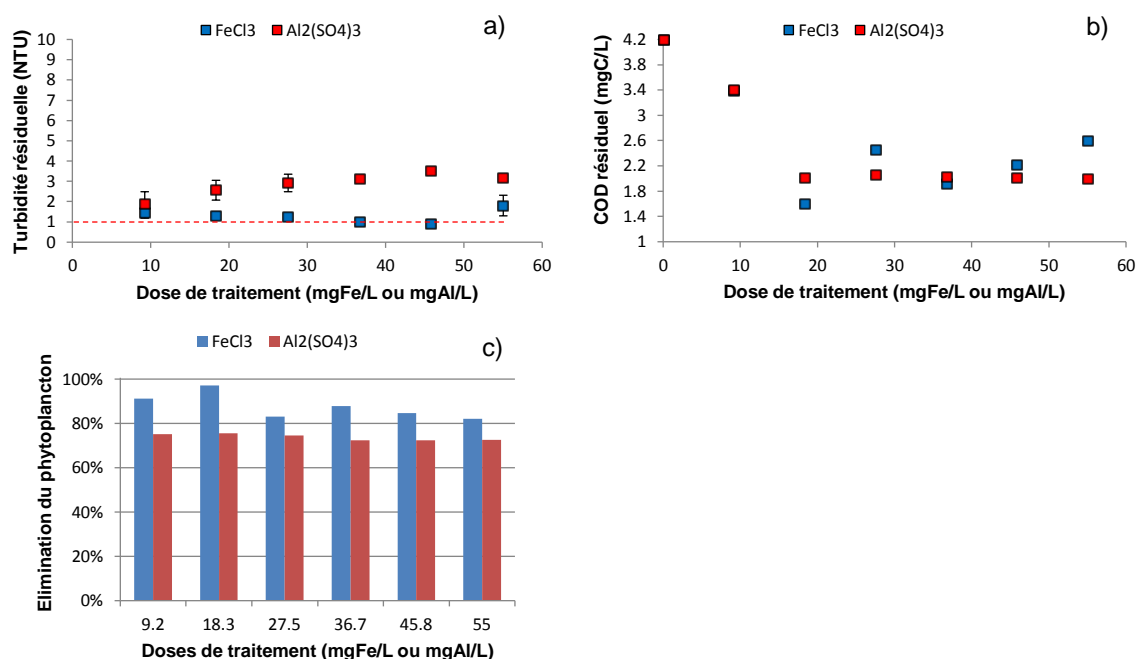


Figure 22 : a) Turbidité résiduelle en fonction de la dose de traitement; b) COD résiduel en fonction de la dose de traitement; c) Pourcentage d'élimination du phytoplancton en fonction de la dose de traitement

Il est observé un meilleur abattement de la turbidité par le fer (Figure 22 a), et les valeurs de turbidités résiduelles sont plus proches de la norme de potabilisation de 1 NTU imposée en sortie de filtre à sable. Pour les doses de coagulants appliquées, les concentrations résiduelles en COD sont très peu variables quel que soit le coagulant utilisé (Figure 22 b). Concernant l'élimination des populations d'algues et de cyanobactéries (Figure 22 c), le chlorure ferrique est le réactif le plus efficace avec un abattement maximum de 97% contre 75% pour le sulfate d'aluminium.

Le fer (sous forme de chlorure ferrique) est donc choisi comme coagulant pour tous les essais de coagulation-floculation. La gamme de concentration en FeCl_3 présentée dans le Tableau XXIX est testée lors de la coagulation des échantillons du milieu naturel et des cultures en laboratoire d'algues et de cyanobactéries. La dose optimale de traitement définie à $106,6 \text{ mg FeCl}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (ou $36,7 \text{ mgFe} \cdot \text{L}^{-1}$) est utilisée pour les essais sur les fractions de MOA et

MON extraites. En effet, pour l'intégralité des fractions testées et compte tenu des faibles quantités de fractions de matière organique extraites, les essais sont réalisés en duplicats à la dose optimale précédemment définie. Le Tableau XXX présente une synthèse des conditions expérimentales utilisées lors des différents essais sur échantillons du milieu naturel, cultures en laboratoire ou eau reconstituée.

Tableau XXX : Synthèse des conditions expérimentales appliquées lors des essais de coagulation-floculation sur les différents types d'échantillons

Conditions	Eaux naturelles (Pigeard, Glane)	Cultures en laboratoire (<i>E. gracilis</i> , <i>M. aeruginosa</i> et <i>P. agardhii</i>)	Eau reconstituée + fractions de MO
Agitation	Coagulation : 3 min à $G = 380 \text{ s}^{-1}$ (150 rpm)		
	Floculation : 15 min à $G = 35 \text{ s}^{-1}$ (30 rpm)		
	Décantation : 30 min sans agitation		
pH	$6,5 \pm 0,3$		
Coagulant	FeCl_3		
Dose de traitement	Gamme 9,2 - 55,0 mgFe.L^{-1}	Gamme 9,2 - 55,0 mgFe.L^{-1}	36,7 mgFe.L^{-1}

PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION

PARTIE 3. RESULTATS & DISCUSSION

Cette partie présente les principaux résultats obtenus au cours du travail de thèse. Elle se compose de trois chapitres, correspondant aux trois axes de recherche menés en parallèle au cours de cette étude :

- Chapitre 1 : Caractérisation de Matière Organique Algale (MOA) produite au cours de la croissance d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa* en laboratoire

Ce premier chapitre a pour objectif d'étudier les propriétés de la MOA ainsi que de mettre en évidence des caractéristiques qui lui sont propres et qui vont permettre, par la suite, de suivre la contribution de ce type de MO dans l'environnement. Cette première étape est réalisée à l'échelle du laboratoire. Ce chapitre se présente sous la forme de quatre articles publiés ou soumis dans des revues scientifiques.

- Chapitre 2 : Impacts des apports en MOA générés par les blooms algaux et de cyanobactéries sur les caractéristiques de la MON : étude *in-situ*

Au cours de ce chapitre, les impacts des apports en MOA générés par les blooms sur les caractéristiques de la MON sont étudiés, dans le milieu naturel, de manière quantitative et qualitative. Pour cela, un suivi comparatif sur une période d'un an et demi de paramètres bio-physico-chimiques est réalisé *in-situ* sur deux ressources en eaux du Limousin, l'une eutrophe, l'étang de Pigeard, et l'autre non sujette aux développements phytoplanctoniques, la rivière la Valette. Ce chapitre se présente également sous la forme d'un article rédigé pour soumission.

- Chapitre 3 : Impacts des phénomènes d'eutrophisation sur les performances de la coagulation-floculation

Ce troisième chapitre vise à étudier la réactivité de la MOA au cours du procédé de coagulation-floculation, par comparaison avec la réactivité de la MON. Cette étude vise notamment à déterminer les impacts des modifications des caractéristiques de la MON générées par les apports en MOA, sur les performances du procédé. Pour cela, une approche à trois échelles est utilisée : essais sur cultures d'algues et de cyanobactéries en laboratoire, essais sur eaux naturelles eutrophes ou non, issues de prélèvements à différentes saisons et essais sur eaux synthétiques enrichies avec des fractions de MO extraites. Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme de deux articles rédigés pour soumission.

I. Chapitre 1 : Caractérisation de Matière Organique Algale (MOA) produite au cours de la croissance d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa* en laboratoire

I.1. Introduction

Le travail effectué au sein de ce chapitre a consisté à étudier spécifiquement les propriétés de la MOA générée par le développement d'une seule espèce d'algue ou de cyanobactérie dans un milieu synthétique. Le choix des espèces étudiées s'est porté sur *Euglena gracilis*, une algue verte flagellée, et *Microcystis aeruginosa*, une cyanobactérie unicellulaire, toutes deux fréquemment observées dans les milieux eutrophes. Néanmoins chacune de ces espèces possède des propriétés spécifiques qui peuvent être à l'origine de comportements différents et de la production de MOA de propriétés différentes. En effet, *E. gracilis* est mixotrophe, c'est-à-dire qu'en l'absence de nutriments ou de lumière nécessaires à la photosynthèse, elle peut consommer la MO (hétérotrophie). Suivant les conditions du milieu *M. aeruginosa* peut sécréter un mucilage plus ou moins soluble contenant notamment des exo-polysaccharides en quantité importante.

La synthèse bibliographique a permis de mettre l'accent sur le manque de données relatives à l'évolution des caractéristiques de la MOA au delà de la phase de croissance stationnaire. Cependant, il est nécessaire de connaître le devenir de la MOA, au delà même de la sénescence des cellules, afin de comprendre les impacts de ces apports sur la MON. En effet, la MOA issue de l'intégralité du cycle de vie du phytoplancton est présente dans la ressource en eau, de plus, elle subit ensuite des modifications liées aux processus d'humification. La MOA tend ainsi à s'accumuler lors des phénomènes d'eutrophisation récurrents. Cette étude s'est donc appliquée à suivre, dans un premier temps, les caractéristiques de la MOA produite par les deux espèces considérées, à partir de leur mise en culture (phase de latence), puis au cours de leur développement (phases exponentielle et stationnaire) et jusqu'à leur déclin. Ce suivi a été réalisé par fractionnement selon le caractère hydrophobe des molécules organiques et par détermination de l'indice SUVA. Ce travail a nécessité l'utilisation d'un milieu de culture adapté à la croissance de chacune des espèces et permettant une analyse précise de la MOA et donc ne contenant initialement qu'une faible quantité de carbone organique dissous. La durée des phases de croissance, dans les conditions expérimentales données, a été suivie par cytométrie en flux. Ce travail fait l'objet de l'**Article 1** intitulé : "**Organic matter produced by algae and cyanobacteria : quantitative and qualitative characterization**", publié dans Journal of Environmental Sciences.

En outre, l'absence de données relatives aux conséquences des processus d'humification sur la MOA a ensuite orienté le travail de recherche sur la caractérisation de cette MO. En effet, les propriétés de la MOA ont été spécifiquement étudiées après extraction de fractions de MO sur résines XAD en début de phase stationnaire (MOA fraîchement produite par l'activité de cellules vivantes) et lors de la phase de déclin avancé, après 16 mois de culture (MOA de degré d'humification avancé). L'analyse des fractions de MOA d'âges différents par fractionnement de taille et spectroscopie de fluorescence permet de déterminer,

par comparaison avec la MON, l'influence des processus d'humification sur les caractéristiques de la MOA. Les données permettent ensuite de faire des hypothèses quant aux impacts des apports en MOA, à long terme, sur les caractéristiques de la MON. Les résultats obtenus font l'objet de l'*Article 2* intitulé "**Contribution of Algal Organic Matter on water resources composition: hydrophobic characteristics and size distribution**" et de l'*Article 3* intitulé "**Fluorescence spectroscopy as a tool to identify eutrophication consequences on NOM characteristics**".

L'*Article 4* a pour objectif de réaliser une caractérisation poussée des fractions HPO et TPH extraites en phase stationnaire de cultures d'*E. gracilis* et de *M. aeruginosa*, à l'aide d'une technique innovante : la spectrométrie de masse par ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF-MS). Cette technique d'ionisation douce permet à la fois d'estimer le poids moléculaire des composés organiques analysés et de déterminer la structure globale ainsi que la composition des monomères présents au sein de la MO. Une comparaison avec les caractéristiques de fractions de MON (AH Réf. 2S101H et AF Réf. 2S101F, de la Suwannee River) est également effectuée. Une approche semi-quantitative (abondance relative) permet notamment de faire le lien entre la composition biochimique et les éléments structuraux identifiés à l'aide des spectres et ceux présents au sein des fractions de taille obtenues par ultrafiltration. Les résultats obtenus sont présentés dans l'*Article 4*, intitulé "**Characterization of algal organic matter by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) : comparison to natural organic matter**". L'identification de certains éléments structuraux et leur abondance relative permettra, par la suite, d'établir des corrélations entre les caractéristiques des fractions de MO étudiées et leur réactivité au cours du procédé de coagulation-floculation.

I.6. Principales conclusions du chapitre 1

Malgré quelques différences de comportement (durée des phases de croissance, densité cellulaire ou quantité de MO produite différentes) et de caractéristiques (MOA plus hydrophile pour *E. gracilis* que pour *M. aeruginosa*) attribuables aux spécificités de chacune des espèces, des caractéristiques propres à la MOA ont pu être mises en évidence, indépendamment de l'espèce considérée. La MOA reste majoritairement hydrophile quelle que soit la phase de croissance et ce, même après la sénescence des cellules et plus d'un an d'évolution. Comparativement à la MON, la MOA présente un faible SUVA et en particulier pour la fraction HPI. Cependant, une évolution des propriétés de la MOA a été observée au cours des différentes phases de croissance. La part de la fraction hydrophile, bien que restant majoritaire, tend à diminuer avec le déclin des populations sous l'effet de la lyse cellulaire et de la libération, dans le milieu, de composés intracellulaires à caractère hydrophobe plus marqué, qui augmentent la part des fractions HPO et TPH.

Cette tendance se poursuit ensuite, bien après la sénescence de la population dans son ensemble, sous l'action des processus d'humification. Ces derniers tendent à complexifier et à augmenter l'aromaticité ainsi que le poids moléculaire des composés présents au sein de chacune des fractions de la MOA, indépendamment de son origine, et en accord avec les théories de l'humification établies pour les milieux naturels (sols ou milieux aquatiques). Cependant, l'évolution des propriétés des molécules semble contrôlée par l'action de différents processus, selon le type de fraction considérée, et certainement, selon la composition intrinsèque de chaque fraction. Ainsi, pour chacune des fractions, la part des composés inférieurs à 0,5 kDa diminue, par contre les fractions HPO et TPH voient le pourcentage de composés dont le PMA est compris entre 0,5 et 3 kDa augmenter. Dans le cas des fractions HPI, la proportion de la fraction de taille 3 - 30 kDa augmente. L'évolution de l'indice SUVA semble suggérer une première phase de dégradation des fractions TPH et HPI (les plus labiles), suivie d'une phase de réassemblage et de complexification. Les fractions HPO, quant à elles, voient leur SUVA augmenter dès leur libération dans le milieu. Les mécanismes mis en jeu sont donc différents selon les fractions.

A l'aide des données de la littérature, les différentes voies d'humification potentiellement applicables à la MOA ont été estimées. Les processus de stabilisation des composés hydrophiles font très certainement intervenir des réactions de polymérisation de polysaccharides tandis que ceux des fractions HPO et TPH sont probablement dus à des réactions de condensation de protéines. Une combinaison de différents mécanismes semble la plus probable : la théorie des polyphénols produits par voie bactérienne à partir des fractions TPH et HPI pourrait constituer une première étape, ensuite l'association de terpènes avec des polysaccharides ou des protéines peut également intervenir, pour chacune des fractions, tout comme les réactions de condensation et de polymérisation des acides gras et lipides poly-insaturés. Par contre, les théories de la lignine et des tannins ne s'appliquent pas à la MOA car elle n'en contient pas. La théorie de condensation des sucres et acides aminés (réaction de Maillard) semble constituer une voie secondaire car elle est défavorisée dans les conditions expérimentales appliquées mais parfaitement compatible avec la composition de la MOA.

La comparaison de l'évolution de la répartition des fractions de taille au sein de la MOA, quelle que soit son origine ou la fraction considérée, avec celle de la MON issue de l'étang eutrophe de Pigeard et de la Suwannee River (non eutrophe), semble suggérer que la recrudescence des phénomènes d'eutrophisation tendrait à augmenter la contribution des molécules de petite taille (<0,5 kDa), en particulier au sein de la fraction HPO.

L'étude des propriétés de fluorescence des fractions de MOA et de MON a également permis de mettre en évidence des caractéristiques propres à la MOA. En effet, bien que les pics correspondant aux fluorophores de types protéiques et sous-produits microbiens soient prédominants au sein de la MOA, une fluorescence dans la zone des fluorophores de types AH et AF est observable, et ce quelle que soit la phase de croissance. De plus, dans le cas d'une MOA fraîchement produite, un pic spécifique a pu être identifié, aux longueurs d'onde d'excitation 250-300nm et aux longueurs d'onde d'émission 420-500nm. Ce pic tend à disparaître avec l'âge de la culture. L'avancement des processus d'humification a également pu être estimé par spectroscopie de fluorescence, et notamment par l'intermédiaire de deux ratios d'intensité de fluorescence : l'indice de fluorescence (FI) et l'indice d'humification (HIX). La comparaison, pour chaque fraction des matrices d'excitation-émission a permis de montrer un déplacement des pics vers des longueurs d'onde d'excitation plus élevées, caractéristique de l'augmentation des poids moléculaires des composés, en accord avec les théories de l'humification et les résultats obtenus par fractionnement de taille (ultrafiltration). Le ratio FI, permettant d'estimer l'origine de la MO, est plus faible dans le cas d'une MOA produite par les algues que par les cyanobactéries. Ce ratio est également plus faible pour les fractions HPO que TPH, qui est lui-même inférieur à celui des HPI, indépendamment de l'origine de la MO. Ce résultat est en accord avec l'idée d'une provenance plutôt allochtone des fractions HPO, bien que les HPO d'origine algale soient exclusivement produits par une activité biologique autochtone. Dans le cas d'échantillons non fractionnés de MOA, ce ratio a diminué entre les phases stationnaire et de déclin avancé (16 mois de culture), consécutivement à l'avancement des processus d'humification. De plus, des valeurs élevées de FI ont été obtenues pour les échantillons de l'étang de Pigeard, ce qui révèle un impact permanent des phénomènes d'eutrophisation sur les caractéristiques de la MON, avec une contribution importante de MO autochtone, et ce même en période hivernale. Cependant, ce ratio FI ne permet pas de traduire l'avancement de l'humification sur chacune des fractions de MO, contrairement à l'indice HIX. Pour chacune des fractions de MOA, le ratio HIX a augmenté entre les phases stationnaire et de déclin avancé, indiquant un avancement de l'état d'humification. Cependant, les valeurs obtenues pour la MOA restent faibles en comparaison de celles obtenues pour les fractions de MON issues de la Suwannee river, ce qui indique donc que les caractéristiques de la MOA, même après plus d'un an de maturation, sont celles d'une MO très peu humifiée. Ce phénomène explique les faibles indices HIX obtenus pour les fractions de MON issues de l'étang eutrophe de Pigeard. En effet, les apports annuels en MOA fraîchement produite ainsi que le faible avancement des processus d'humification de la MOA après plus d'un an de maturation semblent ralentir voire inhiber l'humification des fractions de MON, dont les caractéristiques sont alors proches de celles de la MOA, même en l'absence de développement phytoplanktonique. Ces résultats indiquent donc que les conséquences de l'eutrophisation sur les caractéristiques de la MON sont permanentes même si l'indice HIX est très dépendant du contenu protéique de l'échantillon.

Une étude approfondie par spectrométrie de masse (LDI/MALDI-TOF-MS) des caractéristiques et de la structure de fractions de MOA extraites en phase stationnaire et de MON provenant de milieux naturels a permis de mettre en évidence des similitudes entre fractions, indépendamment de leur origine : structures polymériques avec différents motifs répétitifs et présence de pics communs à des m/z définis. Ces structures suggèrent un assemblage "d'éléments de base" de petites tailles (< 600Da), dans la mesure où l'abondance relative des motifs de petites tailles est très voisine pour chaque échantillon analysé en LDI. Cependant, l'assemblage résultant de ces "motifs de base" diffère selon l'origine et la nature de la fraction considérée, donnant à chacune d'elles une empreinte unique. La structure de la MO présente une forte dépendance à l'origine. En effet, les fractions HPO et TPH d'une même origine ont plus d'éléments structuraux en commun que deux fractions HPO ou deux fractions TPH d'origines différentes. Ainsi, les masses des motifs répétitifs prédominants identifiés sont: 44, 114 et 169 Da pour les fractions HPO et TPH d'*E. gracilis* ; 58 et 100 Da pour *M. aeruginosa* ; 44 et 28 Da pour les AH et AF de Suwannee River. L'abondance relative de ces éléments structuraux permet néanmoins de distinguer HPO et TPH d'une même origine, en particulier pour les masses élevées (> 600 Da). Des hypothèses quant à la composition biochimique des éléments structuraux identifiés ont été faites et leur abondance relative au sein de chaque fraction a pu être déterminée pour les faibles masses (<600 Da, en LDI) et aux masses comprises entre 600 et 2000 Da (MALDI). Ainsi, cette composition diffère selon les échantillons aux masses plus élevées. Comparativement à la MON où les structures de type protéique sont les plus abondantes, les structures de type polysaccharide semblent plus présentes au sein des fractions de MOA. Les fractions HPO semblent plus riches en structures de type protéique que les TPH, où les structures de type stérols semblent plus abondantes. Parmi les structures de type polysaccharidiques, les hexoses sont prédominants quelle que soit l'origine de l'échantillon, cependant, les heptoses semblent caractéristiques d'une origine autochtone. Enfin, la contribution des pentoses semble plus élevée pour la MOA d'origine algale que celle d'origine cyanobactérienne.

II. Chapitre 2 : Impacts des apports en Matière Organique Algale (MOA) générés par les blooms algaux et cyanobactériens sur les caractéristiques de la Matière Organique Naturelle (MON) : étude *in-situ*

II.1. Introduction

A l'échelle du site, les proliférations d'algues et de cyanobactéries sont généralement suivies au travers de dénombrements de populations, et le cas échéant, de la quantification de cyanotoxines, dans la mesure où celles-ci posent de sérieux problèmes de santé publique à très court terme. De nombreuses études se sont focalisées à établir des corrélations entre les principaux paramètres influant le phénomène d'eutrophisation : conditions climatiques et apports en nutriments - principalement azote et surtout phosphore, via le ratio TN/TP - et occurrence des phénomènes de blooms ainsi que prédominance de certaines espèces.

Les proliférations phytoplanctoniques sont à l'origine d'une production importante de matière organique (MOA) dont les propriétés sont différentes de celles de la MON. En effet, les *Articles 1 à 4* ont mis en évidence des caractéristiques propres à cette MO, dont notamment un caractère majoritairement hydrophile (plus de 50% de HPI quelle que soit la phase de croissance), qui de plus est persistant (faible degré d'humification après plus d'un an de maturation), et une faible aromaticité (faible SUVA, en particulier pour les fractions HPO et HPI). Cependant, les conséquences de ces apports récurrents sur les caractéristiques de la MON sont très peu étudiées dans la littérature et sont donc encore méconnues. Pourtant, au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont mis en lumière des dysfonctionnements des procédés de traitement des eaux visant à éliminer la MO, consécutifs à des phénomènes d'eutrophisation et en lien avec de telles modifications. Il apparaît donc nécessaire d'évaluer qualitativement et quantitativement les modifications des caractéristiques de la MON induites par les apports en MOA dus aux blooms algaux et cyanobactériens, afin d'anticiper de tels dysfonctionnements. Pour cela, un suivi de paramètres bio-physico-chimiques a été réalisé sur une période de 18 mois sur le site de l'étang eutrophe de Pigeard (Limousin, France) ainsi qu'en amont de l'étang, sur la rivière qui l'alimente - la Valette. Ce suivi comparatif a ainsi pour objectif d'étudier la dynamique de la MO dans un étang eutrophe, en lien avec la dynamique des populations phytoplanctoniques et la qualité globale de l'eau. Les paramètres suivis incluent donc des paramètres globaux (pH, conductivité, O₂ dissous, potentiel d'oxydo-réduction), les principaux paramètres influents de l'eutrophisation (conditions climatiques, température de l'eau, nutriments), des paramètres biologiques permettant de quantifier (Chl a, cytométrie en flux) et de déterminer les populations majoritaires (observations microscopiques) ainsi que la quantité de MO (COD) et ses caractéristiques (fractionnement selon le caractère hydrophobe, SUVA) dont principalement celles identifiées comme spécifiques de la MOA. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'*Article 5* intitulé "**Dynamics of an eutrophic pond: impacts of algal and cyanobacterial blooms on the characteristics of NOM**", rédigé pour soumission.

II.3. Principales conclusions du chapitre 2

Le suivi des paramètres globaux et influents de l'eutrophisation a permis de conclure quant au caractère hypereutrophe de l'étang de Pigeard, dans lequel les nutriments ne constituent pas le facteur limitant du développement du phytoplancton, qui est contrôlé par les conditions climatiques (durée et intensité de l'ensoleillement). La cytométrie en flux a constitué un outil pertinent du suivi des populations. L'étang est sujet aux proliférations algales et cyanobactériennes, qui se succèdent au cours de l'année, tandis que dans la rivière, la population phytoplanctonique reste limitée et dominée par les algues. En effet, les algues se développent pendant la fin de l'hiver et le printemps, consommant l'azote, qui, en se raréfiant, contribue ensuite au développement et à la domination de populations de cyanobactéries fixatrices d'azote. Des blooms d'*Anabaena* ont ainsi été observés dans l'étang durant la période Avril-Août 2012 et durant le mois de Juillet 2013; ce second bloom étant d'une ampleur très supérieure au premier.

L'étude qualitative et quantitative de la MO dans les deux ressources en eau a permis de mettre en lumière des dynamiques différentes et de confirmer les hypothèses élaborées à partir de l'étude des caractéristiques de la MOA sur cultures en laboratoire.

Dans la rivière, la dynamique de la MO est influencée par la pluviométrie : en période de pluie, la quantité de MO augmente et ces apports sont directement liés à la contribution du bassin versant car la fraction majoritaire est la fraction HPO, typique d'une contribution allochtone des sols. Par contre, la pluviométrie n'a pas d'influence sur la fraction TPH et ne permet pas d'expliquer les variations de proportion ou d'aromaticité de la fraction HPI, de même que les variations de l'indice SUVA de la fraction HPO.

Dans l'étang, la dynamique de la MO est directement liée à l'activité biologique des populations d'algues et de cyanobactéries. Effectivement, l'augmentation de la densité cellulaire du phytoplancton induit une augmentation de la concentration en MO, avec un effet de retard, qui avait déjà été observé au cours de la culture en laboratoire de *M. aeruginosa* et *E. gracilis*. Cependant, il n'existe pas de relation de proportionnalité directe entre la quantité de MO produite et la densité cellulaire atteinte, qui dépend de nombreux paramètres : espèce considérée, phase de croissance et conditions environnementales. Consécutivement à ces apports identifiés comme ayant les caractéristiques de la MOA, la proportion de la fraction HPI augmente de 10 à 20% (celle des HPO diminue de près de 10%). Dans le même temps, le SUVA de la fraction HPI diminue, atteignant des valeurs semblables à celles de la MOA et montrant la forte influence des proliférations phytoplanctoniques sur cette fraction. A la fin du mois d'Août, le déclin rapide des populations (sénescence) provoque la libération dans le milieu de composés intracellulaires à caractère hydrophobe plus marqué, contribuant à une augmentation de la part de la fraction HPO. Cependant, la dynamique de ces composés étant jusque là liée aux apports du bassin versant en composés très aromatiques, la sénescence des populations issues du bloom provoque alors la brusque diminution du SUVA de la fraction HPO car les composés HPO d'origine algale présentent une faible aromaticité comparativement à ceux d'origine terrestre (*Articles 1 et 2*). Après la fin du bloom, la faible activité phytoplanctonique ainsi que les processus d'humification permettent à l'étang de retrouver progressivement une dynamique et des caractéristiques de la MO proches de celles

de la rivière. La formation des blooms ainsi que leur sénescence ont donc des conséquences sur les caractéristiques de la MON et les fractions HPO et HPI sont les plus impactées, même si aucune conséquence directe sur la proportion ou le SUVA des TPH n'a pu être mise en avant.

En outre, la comparaison des indices SUVA globaux des deux ressources en eau a permis d'estimer que certains impacts des blooms semblent permanents car l'aromaticité des molécules organiques dans l'étang demeure moindre par rapport à celles de la rivière. Ainsi, même si l'étang semble "récupérer" des conséquences des développements phytoplanktoniques et de leur sénescence au cours de l'hiver, car les proportions de chacune des fractions sont équivalentes à cette période dans les deux ressources, il semble exister une sorte "d'effet mémoire" des impacts récurrents.

III. Chapitre 3 : Impacts des phénomènes d'eutrophisation sur les performances de la coagulation-floculation

III.1. Introduction

Les phénomènes d'eutrophisation sont à l'origine de modifications quantitatives et qualitatives de la dynamique de la MO au sein des ressources en eau touchées, dues à la production d'une grande quantité de MOA de caractéristiques différentes de celles de la MON. L'*Article 5* a montré que le développement des algues et cyanobactéries ainsi que leur déclin ont des conséquences sur la proportion et l'indice SUVA des fractions HPO et HPI. Ces conséquences connaissent une saisonnalité très marquée.

La coagulation-floculation est la principale étape pour l'élimination de la MO au cours de la potabilisation des eaux. Cependant, la littérature a montré que les étapes suivantes peuvent être très affectées par la présence de MOA : colmatage accéléré des membranes, génération de sous-produits de désinfection cancérigènes, compétition avec les micropolluants lors de l'adsorption sur charbon actif diminuant l'efficacité du procédé, capacité à alimenter la formation de biofilms ou à participer à la reviviscence bactérienne dans les systèmes de distribution par exemple. Il est ainsi impératif d'optimiser l'élimination de la MOA par coagulation-floculation afin d'éviter les dysfonctionnements des étapes de traitement ultérieures. Il apparaît donc nécessaire d'identifier les conséquences des modifications saisonnières des caractéristiques de la MON induites par les phénomènes d'eutrophisation sur le procédé de coagulation-floculation, ainsi que les mécanismes à l'origine de ces diminutions d'efficacité du traitement.

Pour répondre à cette problématique, une étude du procédé de coagulation-floculation a été menée à différentes échelles pour estimer d'une part la capacité du procédé à éliminer les cellules d'algues et de cyanobactéries, correspondant à des colloïdes en suspension; et d'autre part à traiter la MON impactée par les proliférations. Pour cela, des essais "jar-tests" ont été effectués en laboratoire sur des échantillons issus de cultures d'*E. gracilis*, *M. aeruginosa* et *P. agardhii* en début de phase stationnaire. Des essais ont également été réalisés sur des échantillons prélevés dans le milieu naturel, à différentes saisons, sur une ressource eutrophe (l'étang de Pigéard) et une autre non soumise aux développements de phytoplancton (la rivière Glane). Les performances du procédé en termes d'élimination du phytoplancton ont été estimées par cytométrie en flux et les performances sur l'élimination de la MO ont été évaluées par fractionnement selon le caractère hydrophobe. Les résultats sont présentés dans l'*Article 6*, intitulé "**Impact of eutrophication phenomenon on the performances of coagulation flocculation**", *partie A* : "**Study of the impact of algae and cyanobacteria proliferations on the performances of coagulation-flocculation**".

Des essais ont également été menés sur une eau synthétique ayant les caractéristiques d'une eau de la région Limousin et contenant une fraction de MO extraite. Ces essais permettent de comparer la réactivité de fractions de MO d'origines variées et donc de propriétés différentes (déterminées dans les *Articles 1 à 4*), traitées séparément. Les impacts de l'origine de la MO (allochtone/autochtone), de l'espèce ayant produit la MO (algue ou

cyanobactérie) ainsi que des processus d'humification (MO fraîchement produite ou de degré d'humification plus élevé) ont ainsi été déterminés. De plus, le comportement des fractions traitées séparément ou en mélange a également été comparé et les mécanismes entrant en jeu lors du traitement des fractions ont été étudiés par mesure du potentiel zêta. Les résultats de ces essais font l'objet de l'*Article 6, partie B* : "**Reactivity of Algal Organic Matter fractions during Coagulation/Flocculation: Comparison to Natural Organic Matter**".

III.3. Principales conclusions du chapitre 3

Cette étude a montré que les algues étaient éliminées plus efficacement que les cyanobactéries, et ce même pour les doses de traitement les plus faibles. Les pourcentages d'élimination obtenus (72-96% selon les espèces cultivées en laboratoire et 94-99% pour les eaux naturelles) sont de façon globale élevés et en accord avec les données de la littérature. Cependant, des différences de comportement ont pu être mises en évidence au cours du traitement, selon les morphologies des espèces étudiées. En effet, l'abattement d'*E. gracilis* est élevé (>90%) quelle que soit la dose de traitement et donc l'augmentation de la dose de coagulant n'a que peu d'effet sur l'amélioration des performances. Par contre, les abattements de *M. aeruginosa* et *P. agardhii* sont largement dépendants des taux de traitement. En effet, pour des doses inférieures à 37mgFe/L *M. aeruginosa* est peu éliminée (<30%). Par contre, pour des doses supérieures, l'élimination augmente considérablement (96% à la dose optimale) probablement à cause de l'inhibition de la flottabilité due à la présence de vésicules de gaz au sein des cellules, par l'adsorption d'une plus grande quantité de fer augmentant ainsi la densité du floc. Dans le cas de *P. agardhii*, son élimination reste inférieure (72%) à celle obtenue pour les autres espèces aux doses optimales, dans la mesure où la forme filamenteuse peut être défavorable à la coagulation et à la décantation de cette espèce. Dans les eaux du milieu naturel, les pourcentages d'élimination varient peu au cours de l'année. Cependant, du fait d'une charge très élevée de cellules à éliminer en période de bloom (été), la densité cellulaire résiduelle reste élevée pour l'eau de l'étang de Pigeard, ce qui pourrait conduire à des dysfonctionnements des étapes de traitement suivantes (colmatage des filtres à sable ou des membranes par exemple). De plus, sur l'étang de Pigeard, le mélange d'espèces ayant des propriétés différentes et donc des réactivités différentes à des doses différentes amoindrit les performances globales du procédé.

La MOA est difficilement éliminée par coagulation quelle que soit l'espèce considérée (20-50% pour les doses optimales), à cause de la part importante des composés hydrophiles, très peu éliminés (1-15%). Cependant, l'abattement obtenu pour les fractions HPO et TPH varie selon les espèces. Il est faible pour *E. gracilis* et *P. agardhii* (<30%) avec une meilleure élimination des TPH. L'abattement obtenu pour la fraction HPO de *M. aeruginosa* est bien supérieur (70%), expliquant la meilleure élimination de la MOA pour cette espèce (50%) car la proportion de HPO y est en plus bien plus élevée que pour les deux autres espèces. L'élimination des fractions semble donc largement dépendante des propriétés et de la composition intrinsèques de chacune des fractions.

L'élimination de la MON au sein des échantillons issus du milieu naturel est largement impactée par les phénomènes d'eutrophisation, et ce quelle que soit la saison considérée. En effet, aux doses optimales de traitement, l'abattement obtenu reste inférieur sur l'étang de Pigeard (60%) comparativement à la Glane (66-80%). De plus, en hiver, bien que la concentration de la MO et la répartition des fractions HPO, TPH et HPI soient équivalentes pour les deux ressources, le comportement de chaque fraction est différent. Ainsi, dans le cas d'échantillons provenant de l'étang de Pigeard, les fractions HPO et HPI sont moins bien éliminées que celles issues de la Glane, en accord avec les conclusions de l'**Article 5** selon lesquelles ces deux fractions sont les plus impactées. Ces résultats confirment également l'hypothèse d'une MON affectée durablement et de la présence d'un "effet mémoire". Par

contre, l'abattement obtenu pour la fraction TPH est supérieur. Ces tendances restent observables pour les autres saisons tandis que la part de la fraction HPI augmente au printemps et en été sous l'effet des proliférations d'algues et de cyanobactéries se produisant dans l'étang. Il est ainsi possible d'estimer approximativement la composition de la MO résiduelle à partir de la connaissance de la proportion des composés hydrophiles qui restent peu éliminés par le traitement.

L'étude menée sur l'eau synthétique enrichie en fractions de MO extraites a permis de conclure quant à une meilleure efficacité du procédé sur les composés hydrophobes d'origine allochtone (>60%) comparativement à ceux d'origine autochtone (<30%). Dans le cas d'une origine autochtone, les composés TPH sont d'ailleurs mieux éliminés (35-70%) que les HPO, confirmant les résultats obtenus lors du traitement des échantillons de l'étang de Pigeard. Ce phénomène peut être expliqué par l'inhibition de la coagulation due à la présence des protéines, majoritairement contenues dans les fractions HPO. Les composés HPI ne sont quant à eux pas du tout éliminés par coagulation, lorsqu'ils sont traités séparément des autres fractions. Les performances du procédé sur chacune des fractions ont pu être mises en relation avec leurs caractéristiques. Plus l'aromaticité, le pourcentage de composés de hauts poids moléculaires (>3kDa) et l'indice d'humification (HIX) sont élevés et plus l'abattement obtenu est important. Cependant, l'étude de ces propriétés est insuffisante pour prédire la réactivité de la fraction TPH de l'étang de Pigeard. De plus, pour une dose de traitement fixée, les processus d'humification ont pour conséquence une diminution des performances de la coagulation sur l'élimination des fractions HPO et TPH comparativement à une MO fraîchement produite. Ce phénomène peut s'expliquer soit à cause d'une demande en coagulant plus élevée due aux modifications des propriétés liées à l'humification, soit à cause d'une plus forte inhibition due à l'augmentation du caractère protéique de ces fractions avec la lyse cellulaire.

Il a également été constaté un comportement différent des fractions traitées séparément par rapport à celles traitées en mélange, probablement dû à des effets de synergie ou de compétition provoquant une inhibition du procédé. Dans le cas des fractions HPI, celles-ci sont systématiquement mieux éliminées en présence des autres fractions grâce aux effets de synergie. Par contre, l'effet sur les fractions HPO et TPH dépend de leur origine et probablement de leur composition intrinsèque.

L'étude des potentiels zêta a révélé la prédominance de différents mécanismes d'élimination selon les fractions. Ainsi, la simple neutralisation de charge semble prédominante dans le cas des fractions HPO et TPH issues de *M. aeruginosa* et HPO de l'étang de Pigeard, tandis que les mécanismes par adsorption semblent prépondérants pour les AH et AF. Une combinaison de mécanismes (neutralisation de charges et adsorption/complexation) semble plus probable pour les fractions HPO et TPH d'*E. gracilis* ainsi que les TPH de l'étang. La combinaison de mécanismes semble donc plus efficace que la simple neutralisation de charge. Enfin, les fractions d'origine commune présentent des mécanismes d'élimination proches, en lien avec les similitudes structurales mises en avant lors de l'analyse par spectrométrie de masses (**Article 4**), tandis que les différences d'efficacité entre fractions HPO/TPH d'une même origine semblent liées à l'abondance relative de ces structures.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis d'établir une carte d'identité de la Matière Organique Algale (MOA) après avoir déterminé l'évolution de ses propriétés tout au long du cycle de vie d'espèces d'algues et de cyanobactéries cultivées en laboratoire (cultures monospécifiques) et au cours de son humification. Des fractions de MOA ont été caractérisées après fractionnement selon le caractère hydrophobe par différentes techniques analytiques (spectroscopie UV et de fluorescence, ultrafiltration et spectrométrie de masse (MALDI-TOF)). Ainsi, comparativement à la MON, la MOA reste majoritairement hydrophile et peu aromatique quelle que soit la phase de croissance considérée et malgré l'augmentation progressive de la contribution des composés hydrophobes au cours du déclin des populations, puis sous l'action des processus d'humification. De plus, elle présente un caractère protéique très marqué et de faibles poids moléculaires. Cependant, afin d'évaluer avec précision le devenir de ces composés au cours de leur humification, les contributions respectives des processus abiotiques (photo-dégradation, impact des changements de température,..) et des processus de dégradation biologique nécessitent d'être déterminées séparément. De plus, les cultures étant non axéniques, la présence de bactéries peut influencer sur le développement du phytoplancton et induire une réponse spécifique. L'effet de ces associations de communautés demande à être plus amplement étudiée, car dans le milieu naturel, la compétition ou la symbiose entre populations est un paramètre important. Ainsi, pour apporter des éléments de réponse quant à l'influence des communautés bactériennes sur les propriétés de la MOA, il apparaît donc nécessaire de caractériser également la MOA générée par des cultures pures d'algues et de cyanobactéries.

L'étude menée sur site a confirmé les conclusions établies à partir de l'étude en laboratoire des propriétés de la MOA en démontrant l'augmentation périodique importante de la part des composés hydrophiles. Elle a conclu que le développement des blooms ainsi que leur déclin ont des conséquences qualitatives et quantitatives sur la MON, perturbant ainsi sa dynamique. Les fractions les plus impactées sont les fractions HPO et surtout HPI, qui possèdent également un "effet mémoire" résultant des impacts des blooms successifs. En effet, bien qu'il existe une capacité du système à "s'auto-réguler" une fois le phénomène terminé, et qui donc permet à la ressource de retrouver des proportions entre fractions HPO, TPH et HPI semblables à celle de la rivière alimentant l'étang, des différences perdurent au niveau de la composition intrinsèque de chacune d'elles. Ce phénomène a été clairement établi par l'étude de la réactivité de ces fractions au cours du procédé de coagulation-floculation, qui est largement dépendante des caractéristiques des molécules organiques. En outre, le temps de résidence plus ou moins important de la matière organique au sein d'un plan d'eau pose également la question de l'influence de la cinétique. Même si les blooms sont des phénomènes récurrents et que de la MOA fraîche est apportée tous les ans, il est nécessaire de se demander si, à plus long terme (échelle de quelques dizaines d'années), les différences observées entre les propriétés de la MOA et de la MON ne vont pas se réduire,

c'est-à-dire si la MOA ne va pas finir par devenir assimilable à la MON. On peut également imaginer que le réchauffement climatique devrait avoir pour conséquences une reprise du phénomène de bloom plus tôt dans la saison ainsi qu'un allongement de la période favorable aux proliférations phytoplanctoniques, réduisant ainsi d'autant la période au cours de laquelle la ressource est susceptible de récupérer des conséquences du bloom. La capacité du système à "s'auto-réguler" pourrait alors s'en trouver réduite et suite à l'accumulation de MOA, dont le degré d'humification reste faible d'une année sur l'autre à cause de blooms récurrents, on pourrait assister à une accélération du phénomène et à une exacerbation de ses conséquences. Cependant, les effets potentiels du réchauffement climatiques sont controversés et les conséquences restent difficiles à prévoir. De plus, les nutriments sont connus pour être recyclés au sein des sédiments et ainsi participer à l'auto-entretien des phénomènes de blooms. Cependant, l'utilisation des nutriments sous forme organique (mixotrophie) par des espèces impliquées dans la formation de blooms est maintenant couramment admise et donc l'accumulation de MOA pourrait également constituer un facteur de risque supplémentaire au développement et à la persistance de ces phénomènes. Il apparaît ainsi nécessaire d'estimer dans quelle mesure la MOA pourrait participer à ce processus ainsi que d'étudier les mécanismes à l'origine de "l'auto-régulation" des ressources en eau. Des études menées sur d'autres ressources en eau et à plus long terme devraient permettre d'affiner ces conclusions.

En outre, l'ensemble des données issues du programme de suivi réalisé sur les 18 mois de l'étude servira, par la suite, à valider des corrélations entre paramètres par l'utilisation de l'analyse statistique. Ces données seront également réinvesties dans l'élaboration d'un modèle prédictif d'apparition du phénomène qui permettra d'anticiper ses conséquences et qui pourra, par la suite, et s'il est alimenté par des données issues d'autres campagnes de suivi sur des plans d'eau présentant des caractéristiques différentes, être utilisé par les exploitants d'usine de production d'eau potable afin de réadapter les filières de traitement.

Cette étude a également montré que le procédé de coagulation-floculation est largement affecté par les modifications des caractéristiques de la MON induites par les phénomènes d'eutrophisation. Ainsi, les performances du procédé pour l'élimination de la MON issue d'une ressource eutrophe sont réduites et les fractions HPO et HPI sont moins bien éliminées comparativement à une MON d'origine essentiellement allochtone. Par contre, l'abattement obtenu sur les fractions TPH des eaux impactées par le développement du phytoplancton est meilleur. Ce phénomène nécessite d'être plus amplement étudié notamment par l'intermédiaire d'une caractérisation plus poussée de la composition intrinsèque de ces fractions. L'élimination de la MOA est difficile à cause de ses propriétés hydrophiles, sa faible aromaticité, son faible poids moléculaire et son fort caractère protéique pouvant entraîner une inhibition du procédé. Cependant, la détermination de ces propriétés ne suffit pas toujours à prédire la réactivité des molécules, comme par exemple celle des composés transphiliques. En effet, des phénomènes de synergie ou de compétition entre fractions ont également été mis en évidence et l'identification des composés responsables de ces effets devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, et ainsi, faciliter l'optimisation du procédé.

Ce travail de thèse, situé au cœur du programme pilote de recherche CYAME, a ainsi apporté de nombreuses réponses quant aux impacts des blooms algaux et de cyanobactéries

sur les caractéristiques de la MON. Cependant, il a également soulevé de nouvelles interrogations, qui constituent autant de défis scientifiques à la hauteur des enjeux environnementaux.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, D.G., Duggan, P.S., 1999. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytol.* 144, 3–33.
- AFSSA-AFSSET, 2006. Risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans l'eau - Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leur toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives.
- Agha, R., Cirés, S., Wörmer, L., Domínguez, J.A., Quesada, A., 2012. Multi-scale strategies for the monitoring of freshwater cyanobacteria: Reducing the sources of uncertainty. *Water Res.* 46, 3043–3053.
- Ahn, C.-Y., Chung, A.-S., Oh, H.-M., 2002. Rainfall, phycocyanin, and N:P ratios related to cyanobacterial blooms in a Korean large reservoir. *Hydrobiologia* 474, 117–124.
- Ahn, C.-Y., Park, M.-H., Joung, S.-H., Kim, H.-S., Jang, K.-Y., Oh, H.-M., 2003. Growth Inhibition of Cyanobacteria by Ultrasonic Radiation: Laboratory and Enclosure Studies. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3031–3037.
- Aiken, G.R., McKnight, D.M., Thorn, K.A., Thurman, E.M., 1992. Isolation of hydrophilic organic acids from water using nonionic macroporous resins. *Org. Geochem.* 18, 567–573.
- Almendros, G., Dorado, J., González-Vila, F., Blanco, M., Lankes, U., 2000. ¹³C NMR assessment of decomposition patterns during composting of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32, 793–804.
- Amery, F., Vanmoorleghem, C., Smolders, E., 2009. Adapted DAX-8 fractionation method for dissolved organic matter (DOM) from soils: Development, calibration with test components and application to contrasting soil solutions. *Eur. J. Soil Sci.* 60, 956–965.
- Amirtharajah, A., 1988. Some Theoretical and Conceptual Views of Filtration. *J. Am. Water Works Assoc.* 80, 36–46.
- Andersen, J.H., Schlüter, L., Ærtebjerg, G., 2006. Coastal eutrophication: Recent developments in definitions and implications for monitoring strategies. *J. Plankton Res.* 28, 621–628.
- Andersen, R.A., 2005. *Algal culturing techniques*. Academic Press.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726.
- Antoine, M., 2009. Analyse et gestion du risque cyanobactéries/cyanotoxines dans les eaux de baignade et les eaux destinées à la consommation humaine du département de la Haute-Vienne. <http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Ehesp/Memoires/igs/2009/antoine.pdf>
- Antoine, M., Marsaudon, M., Brizard, Y., 2009. Contribution au suivi et à l'analyse de cyanobactéries sur le bassin versant de la Glane. <http://oaidoc.eau-loire-bretagne.fr/exl-php/oaidoc/PL163.pdf>
- ASTEE, 2006. Réglementation et traitement des eaux destinées à la consommation humaine: travaux de la Commission Distribution de l'Eau de l'ASTEE. ASTEE, Paris, France.
- AWWA, 2010. *Algae: Source to Treatment*. American Water Works Association.
- Baker, A., 2005. Thermal fluorescence quenching properties of dissolved organic matter. *Water Res.* 39, 4405–4412.

- Baker, A., Tipping, E., Thacker, S.A., Gondar, D., 2008. Relating dissolved organic matter fluorescence and functional properties. *Chemosphere* 73, 1765–1772.
- Baker, P.D., Bellifemine, D., 2000. Environmental influences on akinete germination of *Anabaena circinalis* and implications for management of cyanobacterial blooms. *Hydrobiologia* 427, 65–73.
- Bechtel, A., Schubert, C.J., 2009. Biogeochemistry of particulate organic matter from lakes of different trophic levels in Switzerland. *Org. Geochem.* 40, 441–454.
- Bernhardt, H., Hoyer, O., Lusse, B., Schell, H., 1989. Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 17, 235–277.
- Bernhardt, H., Shell, H., Hoyer, O., Lusse, B., 1991. Influence of algogenic organic substances on flocculation and filtration. *Water Inst. South Afr.* 1, 41–57.
- Berthe, C., Redon, E., Feuillade, G., 2008. Fractionation of the organic matter contained in leachate resulting from two modes of landfilling: An indicator of waste degradation. *J. Hazard. Mater.* 154, 262–271.
- Bertru, G., 2006. Les micro-algues d'eau douce s'adaptent tous azimuts. Comment ça marche ?
- Billen, G., Garnier, J., 2009. Eutrophisation des cours d'eau du bassin de la Seine. Agence de l'eau Seine Normandie.
- Birdwell, J.E., Engel, A.S., 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV–Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Org. Geochem.* 41, 270–280.
- Bonilla, S., Aubriot, L., Soares, M.C.S., González-Piana, M., Fabre, A., Huszar, V.L.M., Lüring, M., Antoniadou, D., Padisák, J., Kruk, C., 2012. What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 594–607.
- Bowen, J., 1998. Using Eutrophication Modeling to Predict the Effectiveness of River Restoration Efforts, in: *Engineering Approaches to Ecosystem Restoration*. American Society of Civil Engineers, pp. 687–692.
- Bowen, J., Hieronymus, J., 2003. A CE-QUAL-W2 Model of Neuse Estuary for Total Maximum Daily Load Development. *J. Water Resour. Plan. Manag.* 129, 283–294.
- Briand, J.-F., Jacquet, S., Bernard, C., Humbert, J.-F., 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet. Res.* 34, 361–377.
- Briand, J.F., Robillot, C., Quiblier-Llobéras, C., Humbert, J.F., Couté, A., Bernard, C., 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. *Water Res.* 36, 3183–3192.
- Brown, T.L., Rice, J.A., 2000. The effect of laser wavelength and power density on the laser desorption mass spectrum of fulvic acid. *Org. Geochem.* 31, 627–634.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Skelton, H.M., 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8, 77–93.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcão, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 146, 60–78.
- Carey, C.C., Ibelings, B.W., Hoffmann, E.P., Hamilton, D.P., Brookes, J.D., 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Res.* 46, 1394–1407.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecol. Appl.* 8, 559–568.

- Carr, N.G., Whitton, B.A., 1982. *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press.
- Catherine, A., 2009. Déterminisme des efflorescences et de la toxicité des cyanobactéries en milieu périurbain (Ile-de-France) (Thèse de doctorat). Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Cellamare, M., Rolland, A., Jacquet, S., 2009. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* 22, 87–100.
- Chandel, A.K., Singh, O.V., Rao, L.V., 2010. Biotechnological Applications of Hemicellulosic Derived Sugars: State-of-the-Art, in: Singh, O.V., Harvey, S.P. (Eds.), *Sustainable Biotechnology*. Springer Netherlands, pp. 63–81.
- Chen, H., Meng, W., Zheng, B., Wang, C., An, L., 2013. Optical signatures of dissolved organic matter in the watershed of a globally large river (Yangtze River, China). *Limnol. - Ecol. Manag. Inland Waters* 43, 482–491.
- Chen, J.-J., Yeh, H.-H., 2005. The mechanisms of potassium permanganate on algae removal. *Water Res.* 39, 4420–4428.
- Chen, J.-J., Yeh, H.-H., Tseng, I.-C., 2009. Effect of ozone and permanganate on algae coagulation removal - Pilot and bench scale tests. *Chemosphere* 74, 840–846.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., Booksh, K., 2003. Fluorescence Excitation–Emission Matrix Regional Integration to Quantify Spectra for Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5701–5710.
- Cheng, W.P., Chi, F.-H., 2003. Influence of eutrophication on the coagulation efficiency in reservoir water. *Chemosphere* 53, 773–778.
- Cheng, X., Shi, H., Adams, C.D., Timmons, T., Ma, Y., 2009. Effects of oxidative and physical treatments on inactivation of *Cylindrospermopsis raciborskii* and removal of cylindrospermopsin. *Water Sci. Technol.* 60, 689–697.
- Cheshire, M.V., Russell, J.D., Fraser, A.R., Bracewell, J.M., Robertsons, G.W., Benzing-Purdie, L.M., Ratcliffe, C.I., Ripmeester, J.A., Goodman, B.A., 1992. Nature of soil carbohydrate and its association with soil humic substances. *J. Soil Sci.* 43, 359–373.
- Chilom, G., Chilom, O., Rice, J.A., 2008. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1528–1532.
- Chin, Y.-P., Aiken, G., O'Loughlin, E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1853–1858.
- Cho, J., Amy, G., Pellegrino, J., 2000. Membrane filtration of natural organic matter: Factors and mechanisms affecting rejection and flux decline with charged ultrafiltration (UF) membrane. *J. Membr. Sci.* 164, 89–110.
- Chorus, I., Bartram, J., 1999. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management*. Taylor & Francis.
- Chow, A.T., Guo, F., Gao, S., Breuer, R.S., 2006. Size and XAD fractionations of trihalomethane precursors from soils. *Chemosphere* 62, 1636–1646.
- Chow, C.W.K., House, J., Velzeboer, R.M.A., Drikas, M., Burch, M.D., Steffensen, D.A., 1998. The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Res.* 32, 808–814.
- Chow, C.W.K., van Leeuwen, J.A., Fabris, R., Drikas, M., 2009. Optimised coagulation using aluminium sulfate for the removal of dissolved organic carbon. *Desalination* 245, 120–134.
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Mar. Chem.* 51, 325–346.

- Coral, L.A., Zamyadi, A., Barbeau, B., Bassetti, F.J., Lapolli, F.R., Prévost, M., 2013. Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. *Water Res.* 47, 2983–2994.
- Crapper, D.R., Krishnan, S.S., Dalton, A.J., 1973. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease and experimental neurofibrillary degeneration. *Science* 180, 511–513.
- Croué, J.-P., 2004. Isolation of humic and non-humic NOM fractions: Structural characterizations. *Environ. Monit. Assess.* 92, 193–207.
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 37, 328–336.
- Croué, J.P., Lefebvre, E., Martin, B., Legube, B., 1993. Removal of Dissolved Hydrophobic and Hydrophilic Organic Substances during Coagulation/Flocculation of Surface Waters. *Water Sci. Technol.* 27, 143–152.
- Croué, J.-P., Martin, B., Deguin, A., Legube, B., 1993. Isolation and characterization of dissolved hydrophobic and hydrophilic organic substances of a water reservoir. Presented at the Proceedings of Workshop on NOM in Drinking Water, Chamonix France, pp. 43–51.
- Daly, R.I., Ho, L., Brookes, J.D., 2007. Effect of Chlorination on *Microcystis aeruginosa* Cell Integrity and Subsequent Microcystin Release and Degradation. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4447–4453.
- Davis, T.W., Berry, D.L., Boyer, G.L., Gobler, C.J., 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8, 715–725.
- De Leder Kremer, R.M., Gallo-Rodriguez, C., 2004. Naturally occurring monosaccharides : properties and synthesis., in: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, pp. 9–67.
- Deblois, C.P., Juneau, P., 2010. Relationship between photosynthetic processes and microcystin in *Microcystis aeruginosa* grown under different photon irradiances. *Harmful Algae* 9, 18–24.
- Dennett, K.E., Amirtharajah, A., Moran, T.F., Gould, J.P., 1996. Coagulation: its effect on organic matter. *J. Am. Water Works Assoc.* 88, 129–142.
- Dokulil, M.T., Teubner, K., 2000. Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438, 1–12.
- Donati, C., Drikas, M., Hayes, R., Newcombe, G., 1994. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. *Water Res.* 28, 1735–1742.
- Drikas, M., Chow, C.W.K., House, J., Burch, M.D., 2001. Using coagulation, and settling to remove toxic cyanobacteria. *J. Am. Water Works Assoc.* 93, 100–111.
- Duan, J., Gregory, J., 2003. Coagulation by hydrolysing metal salts. *Adv. Colloid Interface Sci.* 100–102, 475–502.
- Dubinsky, Z., Stambler, N., 2009. Photoacclimation processes in phytoplankton: mechanisms, consequences, and applications, in: *Aquatic Microbial Ecology*. Presented at the International Workshop of the Group for Aquatic Primary Productivity (GAP), Inter-Research, pp. 163–176.
- Edzwald, J.K., 1993. Coagulation in drinking water treatment: Particles, organics and coagulants. *Water Sci. Technol.* 27, 21–35.
- Elliott, J.A., 2010. The seasonal sensitivity of Cyanobacteria and other phytoplankton to changes in flushing rate and water temperature. *Glob. Change Biol.* 16, 864–876.

- Elliott, J.A., Thackeray, S.J., Huntingford, C., Jones, R.G., 2005. Combining a regional climate model with a phytoplankton community model to predict future changes in phytoplankton in lakes. *Freshw. Biol.* 50, 1404–1411.
- Esteves, V.I., Duarte, A.C., 1999. Thermogravimetric properties of aquatic humic substances. *Mar. Chem.* 63, 225–233.
- Evans, C.D., Monteith, D.T., Cooper, D.M., 2005. Long-term increases in surface water dissolved organic carbon: Observations, possible causes and environmental impacts. *Environ. Pollut.* 137, 55–71.
- Exall, K.N., Vanloon, G.W., 2000. Using coagulants to remove organic matter. *J. Am. Water Works Assoc.* 92, 93–102.
- Fang, J., Yang, X., Ma, J., Shang, C., Zhao, Q., 2010. Characterization of algal organic matter and formation of DBPs from chlor(am)ination. *Water Res.* 44, 5897–5906.
- Farineau, J., Morot-Gaudry, J.-F., 2006. La photosynthèse: Processus physiques, moléculaires et physiologiques. Editions Quae.
- Fearing, D.A., Goslan, E.H., Banks, J., Wilson, D., Hillis, P., Campbell, A.T., Parsons, S.A., 2004. Staged coagulation for treatment of refractory organics. *J. Environ. Eng.* 130, 975–982.
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. , in: Wood: Chemistry, Ultra Structure, Reactions. De Gruyter W. (Ed), New York, p. 613.
- Flaten, T.P., 2001. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. *Brain Res. Bull.* 55, 187–196.
- French Ministry of Health, 2009. Bilan de la Région Limousin pour la Saison Baignades 2009. 01 Juillet 2009 - 31 Août 2009.
- Fuchs, B., Süß, R., Schiller, J., 2010. An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Prog. Lipid Res.* 49, 450–475.
- Gajdošová, D., Novotná, K., Prošek, P., Havel, J., 2003. Separation and characterization of humic acids from Antarctica by capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: Inclusion complexes of humic acids with cyclodextrins. *J. Chromatogr. A* 1014, 117–127.
- Gao, Y., Cornwell, J.C., Stoecker, D.K., Owens, M.S., 2012. Effects of cyanobacterial-driven pH increases on sediment nutrient fluxes and coupled nitrification-denitrification in a shallow fresh water estuary. *Biogeosciences* 9, 2697–2710.
- Garden, R.W., Sweedler, J.V., 2000. Heterogeneity within MALDI Samples As Revealed by Mass Spectrometric Imaging. *Anal. Chem.* 72, 30–36.
- Garon-Lardiere, S., 2004. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales) (Thèse de doctorat). Université de Bretagne Occidentale.
- Genz, A., Baumgarten, B., Goernitz, M., Jekel, M., 2008. NOM removal by adsorption onto granular ferric hydroxide: Equilibrium, kinetics, filter and regeneration studies. *Water Res.* 42, 238–248.
- Ghadouani, A., Pinel-Alloul, B., Prepas, E.E., 2003. Effects of experimentally induced cyanobacterial blooms on crustacean zooplankton communities. *Freshw. Biol.* 48, 363–381.
- Gobler, C.J., Davis, T.W., Coyne, K.J., Boyer, G.L., 2007. Interactive influences of nutrient loading, zooplankton grazing, and microcystin synthetase gene expression on cyanobacterial bloom dynamics in a eutrophic New York lake. *Harmful Algae* 6, 119–133.
- Golden, J.W., Robinson, S.J., Haselkorn, R., 1985. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* 314, 419–423.

- González López, C.V., García, M. del C.C., Fernández, F.G.A., Bustos, C.S., Chisti, Y., Sevilla, J.M.F., 2010. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 101, 7587–7591.
- Graham, J.L., Loftin, K.A., Meyer, M.T., Ziegler, A.C., 2010. Cyanotoxin mixtures and taste-and-odor compounds in cyanobacterial blooms from the midwestern united states. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7361–7368.
- Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaratunga, P.R.T., Scenati, R., 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae* 10, 165–172.
- Granéli, E., Weberg, M., Salomon, P.S., 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: The role of eutrophication. *Harmful Algae* 8, 94–102.
- Granum, E., Mykkestad, S.M., 2002. A photobioreactor with pH control: demonstration by growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *J. Plankton Res.* 24, 557–563.
- Gray, S.R., Ritchie, C.B., Tran, T., Bolto, B.A., 2007. Effect of NOM characteristics and membrane type on microfiltration performance. *Water Res.* 41, 3833–3841.
- Guillemette, F., McCallister, S.L., Del Giorgio, P.A., 2013. Differentiating the degradation dynamics of algal and terrestrial carbon within complex natural dissolved organic carbon in temperate lakes. *J. Geophys. Res. G Biogeosciences* 118, 963–973.
- Guiry, M.D., 2012. How Many Species of Algae Are There? *J. Phycol.* 48, 1057–1063.
- Guven, B., Howard, A., 2006. Modelling the growth and movement of cyanobacteria in river systems. *Sci. Total Environ.* 368, 898–908.
- Haberhauber, G., Bednar, W., Gerzabek, M.H., Rosenberg, E., 2000. Application of MALDI-TOF-MS to the characterization of fulvic acids., in: *Humic Substances - Versatile Components of Plants, Soil and Water*. Ghabbour, E.A., Davies, G., pp. 143–152.
- Haberhauer, G., Bednar, W., Gerzabek, M.H., Rosenberg, E., 1999. MALDI-TOF-MS analysis of humic substances - a new approach to obtain additional structural information? 121–128.
- Hadjoudja, S., Deluchat, V., Baudu, M., 2010. Cell surface characterisation of *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*. *J. Colloid Interface Sci.* 342, 293–299.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Deluchat, V., Lenain, J.-F., Le Jeune, A.-H., Baudu, M., 2009. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquat. Toxicol.* 94, 255–264.
- Håkanson, L., Bryhn, A.C., Hytteborn, J.K., 2007. On the issue of limiting nutrient and predictions of cyanobacteria in aquatic systems. *Sci. Total Environ.* 379, 89–108.
- Halstvedt, C.B., Rohrlack, T., Andersen, T., Skulberg, O., Edvardsen, B., 2007. Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. *J. Plankton Res.* 29, 471–482.
- Hammes, F., Meylan, S., Salhi, E., Köster, O., Egli, T., von Gunten, U., 2007. Formation of assimilable organic carbon (AOC) and specific natural organic matter (NOM) fractions during ozonation of phytoplankton. *Water Res.* 41, 1447–1454.
- Harvey, D.J., 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates and glycoconjugates. *Int. J. Mass Spectrom.* 226, 1–35.
- Hassouna, M., Théraulaz, F., Massiani, C., 2012. Production and elimination of water extractable organic matter in a calcareous soil as assessed by UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopy of its fractions isolated on XAD-8/4 resins. *Geoderma* 189–190, 404–414.
- Hatcher, P.G., Spiker, E.C., 1988. Selective degradation of plant biomolecules., in: *Humic Substances and Their Role in the Environment*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 59–74.

- Havens, K.E., 2008. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 619, 733–747.
- Havens, K.E., James, R.T., East, T.L., Smith, V.H., 2003. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in a subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environ. Pollut.* 122, 379–390.
- Hawkins, P.R., Putt, E., Falconer, I., Humpage, A., 2001. Phenotypical variation in a toxic strain of the phytoplankter, *Cylindrospermopsis raciborskii* (nostocales, cyanophyceae) during batch culture. *Environ. Toxicol.* 16, 460–467.
- Head, R.M., Jones, R.I., Bailey-Watts, A.E., 1999. An assessment of the influence of recruitment from the sediment on the development of planktonic populations of cyanobacteria in a temperate mesotrophic lake. *Freshw. Biol.* 41, 759–769.
- Hedger, R., Olsen, N., George, D., Malthus, T., Atkinson, P., 2004. Modelling spatial distributions of *Ceratium hirundinella* and *Microcystis* spp. in a small productive British lake. *Hydrobiologia* 528, 217–227.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8, 3–13.
- Henderson, R.K., Baker, A., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2008. Characterisation of algogenic organic matter extracted from cyanobacteria, green algae and diatoms. *Water Res.* 42, 3435–3445.
- Henderson, R.K., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2010. The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Res.* 44, 3617–3624.
- Hense, I., Beckmann, A., 2006. Towards a model of cyanobacteria life cycle-effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. *Ecol. Model.* 195, 205–218.
- Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y., 2003. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Res.* 37, 4295–4303.
- Her, N., Amy, G., Park, H.-R., Song, M., 2004. Characterizing algogenic organic matter (AOM) and evaluating associated NF membrane fouling. *Water Res.* 38, 1427–1438.
- Higuchi, T., 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23–63.
- Hiradate, S., Nakadai, T., Shindo, H., Yoneyama, T., 2004. Carbon source of humic substances in some Japanese volcanic ash soils determined by carbon stable isotopic ratio, $\delta^{13}\text{C}$. *Geoderma* 119, 133–141.
- Hnatukova, P., Kopecka, I., Pivokonsky, M., 2011. Adsorption of cellular peptides of *Microcystis aeruginosa* and two herbicides onto activated carbon: Effect of surface charge and interactions. *Water Res.* 45, 3359–3368.
- Ho, L., Tanis-Plant, P., Kayal, N., Slyman, N., Newcombe, G., 2009. Optimising water treatment practices for the removal of *Anabaena circinalis* and its associated metabolites, geosmin and saxitoxins. *J. Water Health* 7, 544–556.
- Hoeger, S.J., Dietrich, D.R., Hitzfeld, B.C., 2002. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. *Environ. Health Perspect.* 110, 1127–1132.
- Hoehn, R.C., Barnes, D.B., Thompson, B.C., Randall, C.W., Grizzard, T.J., Shaffer, P.T.B., 1980. Algae as Sources of Trihalomethanes Precursors. *J. Am. Water Works Assoc.* 72, 344–350.

- Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M., 1995. *Algae*. Cambridge University Press.
- Holt, P.K., Barton, G.W., Wark, M., Mitchell, C.A., 2002. A quantitative comparison between chemical dosing and electrocoagulation. *Colloids Surfaces Physicochem. Eng. Asp.* 211, 233–248.
- Hong, H.C., Wong, M.H., Mazumder, A., Liang, Y., 2008. Trophic state, natural organic matter content, and disinfection by-product formation potential of six drinking water reservoirs in the Pearl River Delta, China. *J. Hydrol.* 359, 164–173.
- Howarth, R., Chan, F., Conley, D.J., Garnier, J., Doney, S.C., Marino, R., Billen, G., 2011. Coupled biogeochemical cycles: eutrophication and hypoxia in temperate estuaries and coastal marine ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 9, 18–26.
- Huang, C., Shiu, H., 1996. Interactions between alum and organics in coagulation. *Colloids Surfaces Physicochem. Eng. Asp.* 113, 155–163.
- Huang, W., Chu, H., Dong, B., 2012. Characteristics of algogenic organic matter generated under different nutrient conditions and subsequent impact on microfiltration membrane fouling. *Desalination* 293, 104–111.
- Huang, W.-J., Cheng, Y.-L., Cheng, B.-L., 2008. Ozonation by-products and determination of extracellular release in freshwater algae and cyanobacteria. *Environ. Eng. Sci.* 25, 139–151.
- Huang, Y., Eglinton, G., Van Der Hage, E.R.E., Boon, J.J., Bol, R., Ineson, P., 1998. Dissolved organic matter and its parent organic matter in grass upland soil horizons studied by analytical pyrolysis techniques. *Eur. J. Soil Sci.* 49, 1–15.
- Huber, A.L., 1985. Factors affecting the germination of akinetes of *Nodularia spumigena* (Cyanobacteriaceae). *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 73–78.
- Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D., 2007. Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters—a review. *River Res. Appl.* 23, 631–649.
- Huguet, A., Vacher, L., Relexans, S., Saubusse, S., Froidefond, J.M., Parlanti, E., 2009. Properties of fluorescent dissolved organic matter in the Gironde Estuary. *Org. Geochem.* 40, 706–719.
- Hunt, J.F., Ohno, T., 2007. Characterization of fresh and decomposed dissolved organic matter using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy and multiway analysis. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2121–2128.
- Ibelings, B.W., Mur, L.R., Walsby, A.E., 1991. Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of *Microcystis* in two shallow lakes. *J. Plankton Res.* 13, 419–436.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Hwan Kim, Y., 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers, and other organic matter sources. *Water Res.* 35, 4019–4028.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K., 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. *Water Res.* 36, 859–870.
- Jarvis, P., Jefferson, B., Parsons, S.A., 2004. Characterising natural organic matter flocs. *Water Sci. Technol. Water Supply* 4, 79–87.
- Jelinek, R., Kulusheva, S., 2004. Carbohydrate biosensors. *Chem. Rev.* 104, 5987–6015.
- Jensen, H.S., Andersen, F.O., 1992. Importance of temperature, nitrate, and pH for phosphate release from aerobic sediments of four shallow, eutrophic lakes. *Limnol. Ocean.* 37, 577–589.
- Johansson, C., Valarie, I., Klavins, M., Allard, B., Borèn, H., Grimvall, A., 1994. The use of a chemical degradation techniques to study lignin-derived phenolic structures in humic matter., in: *Humic Substances in the Global Environment and Implication on Human Health*. Elsevier, Amsterdam, pp. 167–172.

- Jokic, A., Frenkel, A.I., Vairavamurthy, M.A., Huang, P.M., 2001. Birnessite catalysis of the maillard reaction: Its significance in natural humification. *Geophys. Res. Lett.* 28, 3899–3902.
- Jokic, A., Wang, M., Liu, C., Frenkel, A., Huang, P., 2004. Integration of the polyphenol and Maillard reactions into a unified abiotic pathway for humification in nature: the role of δ -MnO₂. *Org. Geochem.* 35, 747–762.
- Jouraihy, A., Amir, S., Winterton, P., El Gharous, M., Revel, J.-C., Hafidi, M., 2008. Structural study of the fulvic fraction during composting of activated sludge-plant matter: Elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Bioresour. Technol.* 99, 1066–1072.
- Juttner, F., 1995. Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae. *Water Sci. Technol.* 31, 69–78.
- Kalbitz, K., Schmerwitz, J., Schwesig, D., Matzner, E., 2003. Biodegradation of soil-derived dissolved organic matter as related to its properties. *Geoderma* 113, 273–291.
- Kangro, K., Olli, K., Tamminen, T., Lignell, R., 2007. Species-specific responses of a cyanobacteria-dominated phytoplankton community to artificial nutrient limitation in the Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 336, 15–27.
- Kanoshina, I., Lips, U., Leppänen, J.-M., 2003. The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Harmful Algae* 2, 29–41.
- Kaplan-Levy, R.N., Hadas, O., Summers, M.L., Rücker, J., Sukenik, A., 2010. Akinetes: Dormant cells of cyanobacteria.
- Karlsson-Elfgren, I., Rengefors, K., Gustafsson, S., 2004. Factors regulating recruitment from the sediment to the water column in the bloom-forming cyanobacterium *Gloeotrichia echinulata*. *Freshw. Biol.* 49, 265–273.
- Kassim, G., Martin, J.P., Haider, K., 1981. Incorporation of a Wide Variety of Organic Substrate Carbons into Soil Biomass as Estimated by the Fumigation Procedure¹. *Soil Sci Soc Am J* 45, 1106–1112.
- Kaufmann, R., 1995. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. *J. Biotechnol.* 41, 155–175.
- Kehoe, D.M., 2010. Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9029–9030.
- Kelly, J., Mackey, M., Helleur, R.J., 1991. Quantitative analysis of saccharides in wood pulps by quartz-tube pulse pyrolysis—polar phase gas chromatography. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 19, 105–117.
- Kim, H.-S., Hwang, S.-J., Shin, J.-K., An, K.-G., Yoon, C.G., 2007. Effects of limiting nutrients and N:P ratios on the phytoplankton growth in a shallow hypertrophic reservoir. *Hydrobiologia* 581, 255–267.
- Kimura, K., Tanaka, I., Nishimura, S.-I., Miyoshi, R., Miyoshi, T., Watanabe, Y., 2012. Further examination of polysaccharides causing membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs): Application of lectin affinity chromatography and MALDI-TOF/MS. *Water Res.* 46, 5725–5734.
- Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., 1992. Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles: implications for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules. *Sci. Total Environ.* 117–118, 175–185.
- 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. *Neth. J. Sea Res.* 15, 217–227.

- Labanowski, J., 2004. Matière organique naturelle et anthropique : vers une meilleure compréhension de sa réactivité et de sa caractérisation (Thèse de doctorat). Université de Limoges.
- Labanowski, J., Feuillade, G., 2009. Combination of biodegradable organic matter quantification and XAD-fractionation as effective working parameter for the study of biodegradability in environmental and anthropic samples. *Chemosphere* 74, 605–611.
- Labanowski, J., Feuillade, G., 2011. Dissolved organic matter: Precautions for the study of hydrophilic substances using XAD resins. *Water Res.* 45, 315–327.
- Lagier, T., 2000. Etude des macromolécules de lixiviat : caractérisation et comportement vis-à-vis des métaux (Thèse de doctorat). Université de Poitiers.
- Lagier, T., Feuillade, G., Matejka, G., 2000. Interactions between copper and organic macromolecules: Determination of conditional complexation constants. *Agronomie* 20, 537–546.
- Larsen, L.G., Aiken, G.R., Harvey, J.W., Noe, G.B., Crimaldi, J.P., 2010. Using fluorescence spectroscopy to trace seasonal DOM dynamics, disturbance effects, and hydrologic transport in the Florida Everglades. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 115.
- Latour, D., 2002. Potentiel toxique et structure génétique de populations de *Microcystis* en lien avec les différentes phases de son cycle de vie (Thèse de doctorat). Saint-Etienne.
- Le Ai Nguyen, V., Tanabe, Y., Matsuura, H., Kaya, K., Watanabe, M.M., 2012. Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of water-bloom-forming tropical morphospecies of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycol. Res.* 60, 208–222.
- Lebert, M., Porst, M., Richter, P., Hader, D.-P., 1999. Physical Characterization of Gravitaxis in *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.* 155, 338–343.
- Lee, N., Amy, G., Croué, J.-P., 2006. Low-pressure membrane (MF/UF) fouling associated with allochthonous versus autochthonous natural organic matter. *Water Res.* 40, 2357–2368.
- Leenheer, J.A., Croué, J.-P., 2003. Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37.
- Leenheer, J.A., Rostad, C.E., Gates, P.M., Furlong, E.T., Ferrer, I., 2001. Molecular Resolution and Fragmentation of Fulvic Acid by Electrospray Ionization/Multistage Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 73, 1461–1471.
- Lefebvre, E., Legube, B., 1990. Coagulation par Fe(III) de substances humiques extraites d'eaux de surface: effet du pH et de la concentration en substances humiques. *Water Res.* 24, 591–606.
- Leflaive, J., Ten-Hage, L., 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: A comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw. Biol.* 52, 199–214.
- Lehtimäki, J., Moisander, P., Sivonen, K., Kononen, K., 1997. Growth, nitrogen fixation, and Nodularin production by two Baltic Sea cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1647–1656.
- Leloup, M., Nicolau, R., Pallier, V., Yéprémian, C., Feuillade-Cathalifaud, G., 2013. Organic matter produced by algae and cyanobacteria: Quantitative and qualitative characterization. *J. Environ. Sci.* 25, 1089–1097.
- Lenoble, V., Chabrouillet, C., al Shukry, R., Serpaud, B., Deluchat, V., Bollinger, J.-C., 2004. Dynamic arsenic removal on a MnO₂-loaded resin. *J. Colloid Interface Sci.* 280, 62–67.
- Li, L., Gao, N., Deng, Y., Yao, J., Zhang, K., 2012. Characterization of intracellular & extracellular algae organic matters (AOM) of *Microcystis aeruginosa* and formation of

- AOM-associated disinfection byproducts and odor & taste compounds. *Water Res.* 46, 1233–1240.
- Liu, W., Au, D.W.T., Anderson, D.M., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., 2007. Effects of nutrients, salinity, pH and light:dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 346, 76–86.
- Liu, X., Lu, X., Chen, Y., 2011. The effects of temperature and nutrient ratios on *Microcystis* blooms in Lake Taihu, China: An 11-year investigation. *Harmful Algae* 10, 337–343.
- Logan, B., Jiang, Q., 1990. Molecular Size Distributions of Dissolved Organic Matter. *J. Environ. Eng.* 116, 1046–1062.
- Loiselle, S., Vione, D., Minero, C., Maurino, V., Tognazzi, A., Dattilo, A.M., Rossi, C., Bracchini, L., 2012. Chemical and optical phototransformation of dissolved organic matter. *Water Res.* 46, 3197–3207.
- Loiselle, S.A., Bracchini, L., Cózar, A., Dattilo, A.M., Tognazzi, A., Rossi, C., 2009. Variability in photobleaching yields and their related impacts on optical conditions in subtropical lakes. *J. Photochem. Photobiol. B* 95, 129–137.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Ocean.* 12, 343–346.
- Lui, Y.S., Qiu, J.W., Zhang, Y.L., Wong, M.H., Liang, Y., 2011. Algal-derived organic matter as precursors of disinfection by-products and mutagens upon chlorination. *Water Res.* 45, 1454–1462.
- Lukac, M., Aegerter, R., 1993. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31, 293–305.
- Lv, J., Wu, H., 2010. The effects of TN: TP ratios on the phytoplankton and colonial cyanobacteria in Eutrophic Shallow Lakes, in: 2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2010.
- Ma, H., Allen, H.E., Yin, Y., 2001. Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent. *Water Res.* 35, 985–996.
- Ma, J., Lei, G., Fang, J., 2007. Effect of algae species population structure on their removal by coagulation and filtration processes – a case study. *J. Water Supply Res. Technol.* 56, 41.
- Maatouk, I., Bouaïcha, N., Fontan, D., Levi, Y., 2002. Seasonal variation of microcystin concentrations in the Saint-Caprais reservoir (France) and their removal in a small full-scale treatment plant. *Water Res.* 36, 2891–2897.
- Macalady, D.L., Walton-Day, K., 2009. New light on a dark subject: On the use of fluorescence data to deduce redox states of natural organic matter (NOM). *Aquat. Sci.* 71, 135–143.
- Malcolm, R.L., MacCarthy, P., 1992. Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environ. Int.* 18, 597–607.
- Martin, J.-M., Meybeck, M., 1979. Elemental mass-balance of material carried by major world rivers. *Mar. Chem.* 7, 173–206.
- Martinez, R.E., Pokrovsky, O.S., Schott, J., Oelkers, E.H., 2008. Surface charge and zeta-potential of metabolically active and dead cyanobacteria. *J. Colloid Interface Sci.* 323, 317–325.
- Martin-Mousset, B., Croue, J.P., Lefebvre, E., Legube, B., 1997. Distribution et caractérisation de la matière organique dissoute d'eaux naturelles de surface. Distribution and characterization of dissolved organic matter of surface waters. *Water Res.* 31, 541–553.
- Maschek, J.A., Baker, B.J., 2008. The Chemistry of Algal Secondary Metabolism, in: Amsler, D.C.D. (Ed.), *Algal Chemical Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–24.

- Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 620–630.
- Matilainen, A., Vepsäläinen, M., Sillanpää, M., 2010. Natural organic matter removal by coagulation during drinking water treatment: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 159, 189–197.
- Maurice, P.A., Pullin, M.J., Cabaniss, S.E., Zhou, Q., Namjesnik-Dejanovic, K., Aiken, G.R., 2002. A comparison of surface water natural organic matter in raw filtered water samples, XAD, and reverse osmosis isolates. *Water Res.* 36, 2357–2371.
- Mayer, L.M., Schick, L.L., Loder III, T.C., 1999. Dissolved protein fluorescence in two Maine estuaries. *Mar. Chem.* 64, 171–179.
- McKnight, D.M., Boyer, E.W., Westerhoff, P.K., Doran, P.T., Kulbe, T., Andersen, D.T., 2001. Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Ocean.* 46, 38–48.
- Mercier, F., Moulin, V., Guittet, M.J., Barré, N., Gautier-Soyer, M., Trocellier, P., Toulhoat, P., 2002. Applications of new surface analysis techniques (NMA and XPS) to humic substances. *Org. Geochem.* 33, 247–255.
- Merritt, K.A., Erich, M.S., 2003. Influence of Organic Matter Decomposition on Soluble Carbon and Its Copper-Binding Capacity. *J. Environ. Qual.* 32, 2122.
- Miao, H., Tao, W., 2009. The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal. *Sep. Purif. Technol.* 66, 187–193.
- Minor, E., Eglinton, T., Olson, R., Boon, J., 1998. The compositional heterogeneity of particulate organic matter from the surface ocean: an investigation using flow cytometry and DT-MS. *Org. Geochem.* 29, 1561–1582.
- Minor, E.C., Simjouw, J.-P., Mulholland, M.R., 2006. Seasonal variations in dissolved organic carbon concentrations and characteristics in a shallow coastal bay. *Mar. Chem.* 101, 166–179.
- Minor, E.C., Steinbring, C.J., Longnecker, K., Kujawinski, E.B., 2012. Characterization of dissolved organic matter in Lake Superior and its watershed using ultrahigh resolution mass spectrometry. *Org. Geochem.* 43, 1–11.
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3061–3065.
- Montaudo, G., Samperi, F., Montaudo, M.S., 2006. Characterization of synthetic polymers by MALDI-MS. *Prog. Polym. Sci.* 31, 277–357.
- Monteil-Rivera, F., Brouwer, E.B., Masset, S., Deslandes, Y., Dumonceau, J., 2000. Combination of X-ray photoelectron and solid-state ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy in the structural characterisation of humic acids. *Anal. Chim. Acta* 424, 243–255.
- Mostofa, K.M.G., Yoshioka, T., Mottaleb, A., 2013. *Photobiogeochemistry of Organic Matter: Principles and Practices in Water Environments*. Springer.
- Mugo, S.M., Bottaro, C.S., 2004. Characterization of humic substances by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 2375–2382.
- Navalon, S., Alvaro, M., Alcaina, I., Garcia, H., 2010. Multi-method characterization of DOM from the Turia river (Spain). *Appl. Geochem.* 25, 1632–1643.
- Negri, A.P., Jones, G.J., Blackburn, S.I., Oshima, Y., Onodera, H., 1997. Effect of culture and bloom development and of sample storage on paralytic shellfish poisons in the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *J. Phycol.* 33, 26–35.

- Nguyen, M.-L., Westerhoff, P., Baker, L., Hu, Q., Esparza-Soto, M., Sommerfeld, M., 2005. Characteristics and Reactivity of Algae-Produced Dissolved Organic Carbon. *J. Environ. Eng.* 131, 1574–1582.
- Nishiwaki-Matsushima, R., Ohta, T., Nishiwaki, S., Suganuma, M., Kohyama, K., Ishikawa, T., Carmichael, W.W., Fujiki, H., 1992. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118, 420–424.
- Nixdorf, B., Mischke, U., Rucker, J., 2003. Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes – an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales. *Hydrobiologia* 502, 111–121.
- Novotny, F.J., Rice, J.A., Weil, D.A., 1995. Characterization of Fulvic Acid by Laser-Desorption Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2464–2466.
- Oberhaus, L., Briand, J.F., Leboulanger, C., Jacquet, S., Humbert, J.F., 2007. Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P. rubescens*. *J. Phycol.* 43, 1191–1199.
- Oberholster, P.J., Botha, A.-M., Grobbelaar, J.U., 2004. Microcystis aeruginosa: Source of toxic microcystins in drinking water. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 159–168.
- Oliver, R.L., Ganf, G.G., 2000. Freshwater blooms, in: *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Whitton, BA, Potts, pp. 149–194.
- ONEMA, 2009. Etat écologique des ressources en eau en France. http://www.eaufrance.fr/IMG/pdf/ME_RW_etat_ecologique_EF.pdf
- Paerl, H.W., Fulton 3rd., R.S., Moisaner, P.H., Dyble, J., 2001. Harmful freshwater algal blooms, with an emphasis on cyanobacteria. *TheScientificWorldJournal Electron. Resour.* 1, 76–113.
- Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Sci. Total Environ.* 409, 1739–1745.
- Paerl, H.W., Huisman, J., 2009. Climate change: A catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environ. Microbiol. Reports* 1, 27–37.
- Paerl, H.W., Paul, V.J., 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res.* 46, 1349–1363.
- Pallier, V., 2008. Elimination de l'arsenic par coagulation floculation et électrocoagulation d'eaux faiblement minéralisées (Thèse de doctorat). Université de Limoges.
- Pallier, V., Feuillade-Cathalifaud, G., Serpaud, B., Bollinger, J.-C., 2010. Effect of organic matter on arsenic removal during coagulation/flocculation treatment. *J. Colloid Interface Sci.* 342, 26–32.
- Parikh, A., Madamwar, D., 2006. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 97, 1822–1827.
- Parlanti, E., Morin, B., Vacher, L., 2002. Combined 3D-spectrofluorometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the characterization of dissolved organic matter in natural waters. *Org. Geochem.* 33, 221–236.
- Parlanti, E., Wörz, K., Geoffroy, L., Lamotte, M., 2000. Dissolved organic matter fluorescence spectroscopy as a tool to estimate biological activity in a coastal zone submitted to anthropogenic inputs. *Org. Geochem.* 31, 1765–1781.
- Parodi, A., 2010. Impact de nouveaux modes de gestion sur l'accélération de la dégradation de déchets ménagers: approche multiparamétrique et multi-échelle (Thèse de doctorat). Université de Limoges.
- 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 Res.* 36, 2571–2581.

- Pelmont, J., 1993. Bactéries et environnement: Adaptations physiologiques. Presses Universitaires de Grenoble.
- Peña-Méndez, E.M., Gajdosová, D., Novotná, K., Prosek, P., Havel, J., 2005. Mass spectrometry of humic substances of different origin including those from Antarctica A comparative study. *Talanta* 67, 880–890.
- Perminova, I.V., Frimmel, F.H., Kudryavtsev, A.V., Kulikova, N.A., Abbt-Braun, G., Hesse, S., Petrosyan, V.S., 2003. Molecular Weight Characteristics of Humic Substances from Different Environments As Determined by Size Exclusion Chromatography and Their Statistical Evaluation. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2477–2485.
- Pernet-Coudrier, B., 2008. Influence de la matière organique dissoute sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux : cas de la Seine, un milieu sous forte pression urbaine. Paris Est.
- Pernet-Coudrier, B., Varrault, G., Saad, M., Croue, J.P., Dignac, M.-F., Mouchel, J.-M., 2010. Characterisation of dissolved organic matter in Parisian urban aquatic systems: predominance of hydrophilic and proteinaceous structures.
- Peuravuori, J., Pihlaja, K., 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Anal. Chim. Acta* 337, 133–149.
- Piccolo, A., 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 166, 810–832.
- Piccolo, A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science.
- Pires, L.M.D., Bontes, B.M., Donk, E.V., Ibelings, B.W., 2005. Grazing on colonial and filamentous, toxic and non-toxic cyanobacteria by the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *J. Plankton Res.* 27, 331–339.
- Pivokonsky, M., Kloucek, O., Pivokonska, L., 2006. Evaluation of the production, composition and aluminum and iron complexation of algogenic organic matter. *Water Res.* 40, 3045–3052.
- Pivokonsky, M., Safarikova, J., Bubakova, P., Pivokonska, L., 2012. Coagulation of peptides and proteins produced by *Microcystis aeruginosa*: Interaction mechanisms and the effect of Fe–peptide/protein complexes formation. *Water Res.* 46, 5583–5590.
- Plancque, G., Amekraz, B., Moulin, V., Toulhoat, P., Moulin, C., 2001. Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 827–835.
- Pouličková, A., Hašler, P., Kitner, M., 2004. Annual Cycle of *Planktothrix agardhii*(Gom.) Anagn. & Kom. *Nature Population. Int. Rev. Hydrobiol.* 89, 278–288.
- Qi, G., Yue, D., Fukushima, M., Fukuchi, S., Nishimoto, R., Nie, Y., 2012. Enhanced humification by carbonated basic oxygen furnace steel slag – II. Process characterization and the role of inorganic components in the formation of humic-like substances. *Bioresour. Technol.* 114, 637–643.
- Qiao, H., Piyadasa, G., Spicer, V., Ens, W., 2009. Analyte distributions in MALDI samples using MALDI imaging mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 281, 41–51.
- Qin, J.-J., Oo, M.H., Kekre, K.A., Knops, F., Miller, P., 2006. Impact of coagulation pH on enhanced removal of natural organic matter in treatment of reservoir water. *Sep. Purif. Technol.* 49, 295–298.
- Qu, F., Liang, H., He, J., Ma, J., Wang, Z., Yu, H., Li, G., 2012. Characterization of dissolved extracellular organic matter (dEOM) and bound extracellular organic matter (bEOM) of *Microcystis aeruginosa* and their impacts on UF membrane fouling. *Water Res.* 46, 2881–2890.
- Ramseier, M.K., Peter, A., Traber, J., von Gunten, U., 2011. Formation of assimilable organic carbon during oxidation of natural waters with ozone, chlorine dioxide, chlorine, permanganate, and ferrate. *Water Res.* 45, 2002–2010.

- Rapala, J., Sivonen, K., Lyra, C., Niemelä, S.I., 1997. Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2206–2212.
- Ratnaweera, H., Gjessing, E., Oug, E., 1999. Influence of physical-chemical characteristics of natural organic matter (NOM) on coagulation properties: An analysis of eight Norwegian water sources. *Water Sci. Technol.* 40, 89–95.
- Reis, A., Coimbra, M.A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A.J., Rosário, M., Domingues, M., 2002. Structural characterisation of underivatised olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2124–2132.
- Remmler, M., Georgi, A., Kopinke, F.D., 1995. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry as a method for the determination of the molecular mass distributions of humic acids. *Eur. Mass Spectrom.* 1, 403–407.
- Rengefors, K., Gustafsson, S., Ståhl-Delbanco, A., 2004. Factors regulating the recruitment of cyanobacterial and eukaryotic phytoplankton from littoral and profundal sediments. *Aquat. Microb. Ecol.* 36, 213–226.
- Reynolds, C.S., 1984. *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press.
- Reynolds, C.S., Oliver, R.L., Walsby, A.E., 1987. Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 21, 379–390.
- Rositano, J., Nicholson, B.C., Pieronne, P., 1998. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. *Ozone Sci. Eng.* 20, 223–238.
- Rueter, J.G., Petersen, R.R., 1987. Micronutrient effects on cyanobacterial growth and physiology. *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 21, 435–445.
- Saker, M.L., Griffiths, D.J., 2000. The effect of temperature on growth and cylindrospermopsin content of seven isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from water bodies in northern Australia. *Phycologia* 39, 349–354.
- Sano, D., Ishifuji, S., Sato, Y., Imae, Y., Takaara, T., Masago, Y., Omura, T., 2011. Identification and characterization of coagulation inhibitor proteins derived from cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Chemosphere* 82, 1096–1102.
- Schulten, H.-R., 1995. The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 351, 62–73.
- Schulten, H.-R., 1999. Analytical pyrolysis and computational chemistry of aquatic humic substances and dissolved organic matter. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 49, 385–415.
- Semenov, V.M., Tulina, A.S., Semenova, N.A., Ivannikova, L.A., 2013. Humification and nonhumification pathways of the organic matter stabilization in soil: A review. *Eurasian Soil Sci.* 46, 355–368.
- Seo, D.-J., Kim, Y.-J., Ham, S.-Y., Lee, D.-H., 2007. Characterization of dissolved organic matter in leachate discharged from final disposal sites which contained municipal solid waste incineration residues. *J. Hazard. Mater.* 148, 679–692.
- Servais, P., Billen, G., Hascoet, M.-C., 1987. Determination of the biodegradable fraction of dissolved organic matter in waters. *Water Res.* 21, 445–450.
- Sharp, E.L., Jarvis, P., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2006a. Impact of fractional character on the coagulation of NOM. *Colloids Surfaces Physicochem. Eng. Asp.* 286, 104–111.

- Sharp, E.L., Parsons, S.A., Jefferson, B., 2006b. Seasonal variations in natural organic matter and its impact on coagulation in water treatment. *Sci. Total Environ.* 363, 183–194.
- Shawwa, A.R., Smith, D.W., 2001. Kinetics of Microcystin-LR - Oxidation by Ozone. *Ozone Sci. Eng. J. Int. Ozone Assoc.* 23.
- Shinozuka, T., Shibata, M., Yamaguchi, T., 2004. Molecular Weight Characterization of Humic Substances by MALDI-TOF-MS. *J Mass Spectrom Soc Jpn* 52, 29–32.
- Showalter, A.M., 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5, 9–23.
- Sivonen, K., 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2658–2666.
- Skjelkvaale, B.L., 2003. The 15-year report: Assessment and monitoring of surface waters in Europe and North America; acidification and recovery, dynamic modeling and heavy metals. (No. ICP-Waters report 73/2003). Norwegian Institute for Water Research.
- Smayda, T.J., 2008. Complexity in the eutrophication-harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae* 8, 140–151.
- Smith, V.H., 1983. Low nitrogen to phosphorus ratios favor dominance by blue green algae in lake phytoplankton. *Science* 221, 669–671.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 100, 179–196.
- Sommaruga, R., Chen, Y., Liu, Z., 2009. Multiple Strategies of Bloom-Forming Microcystis to Minimize Damage by Solar Ultraviolet Radiation in Surface Waters. *Microb. Ecol.* 57, 667–674.
- Spinette, R.F., 2008. Fouling of hydrophobic microfiltration membrane by algae and algal organic matter: mechanisms and prevention. (Thesis).
- Sposito, G., 1989. *The Chemistry of Solids*. Oxford University Press, New York.
- Srzic, D., Kazacic, S., Martinovic, S., Pasa-Tolic, L., Kezele, N., Vikić-Topić, D., Pecur, S., Vrančić, A., Klansinc, L., 2000. FTMS of Natural Polymers*. *Croatica Chemica Acta* 73, 69–80.
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons (Eds), New York.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*, 2nd ed. John Wiley & Sons (Eds), New York.
- Stomp, M., Huisman, J., De Jongh, F., Veraart, A.J., Gerla, D., Rijkeboer, M., Ibelings, B.W., Wollenzien, U.I.A., Stal, L.J., 2004. Adaptive divergence in pigment composition promotes phytoplankton biodiversity. *Nature* 432, 104–107.
- Sutton, R., Sposito, G., 2005. Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9009–9015.
- Świetlik, J., Dabrowska, A., Raczyk-Stanisławiak, U., Nawrocki, J., 2004. Reactivity of natural organic matter fractions with chlorine dioxide and ozone. *Water Res.* 38, 547–558.
- Świetlik, J., Sikorska, E., 2004. Application of fluorescence spectroscopy in the studies of natural organic matter fractions reactivity with chlorine dioxide and ozone. *Water Res.* 38, 3791–3799.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T., 2004. Affinity isolation of algal organic matters able to form complex with aluminium coagulant. *Water Sci. Technol. Water Supply* 4, 95–102.
- Takaara, T., Sano, D., Konno, H., Omura, T., 2007. Cellular proteins of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminum chloride. *Water Res.* 41, 1653–1658.

- Takaara, T., Sano, D., Masago, Y., Omura, T., 2010. Surface-retained organic matter of *Microcystis aeruginosa* inhibiting coagulation with polyaluminum chloride in drinking water treatment. *Water Res.* 44, 3781–3786.
- Tandeau De Marsac, N., 1977. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 130, 82–91.
- Te, S.H., Gin, K.Y.-H., 2011. The dynamics of cyanobacteria and microcystin production in a tropical reservoir of Singapore. *Harmful Algae* 10, 319–329.
- Tegelaar, E.W., De Leeuw, J.W., Saiz-Jimenez, C., 1989. Possible origin of aliphatic moieties in humic substances, in: *Science of the Total Environment*. Presented at the International humic substances society. International meeting. 4, Elsevier, pp. 1–17.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J., 2006. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*: Part I: The key operating conditions. *Sep. Purif. Technol.* 52, 84–94.
- Teixeira, M.R., Rosa, M.J., 2007. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa*: Part II. The effect of water background organics. *Sep. Purif. Technol.* 53, 126–134.
- Teixeira, M.R., Sousa, V., Rosa, M.J., 2010. Investigating dissolved air flotation performance with cyanobacterial cells and filaments. *Water Res.* 44, 3337–3344.
- Thurman, E.M., 1985. *Organic geochemistry of natural waters*. Springer Science & Business.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., 1981. Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 15, 463–566.
- Tian, C., Pei, H., Hu, W., Xie, J., 2012. Variation of cyanobacteria with different environmental conditions in Nansi Lake, China. *J. Environ. Sci.* 24, 1394–1402.
- Vacher, L., 2004. Étude par fluorescence des propriétés de la matière organique dissoute dans les systèmes estuariens : cas des estuaires de la Gironde et de la Seine. Bordeaux I.
- Van der Kooij, D., Visser, A., Hijnen, W.A.M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 74, 540–545.
- Van Hullebusch, E., 2002. Contribution à l'étude du devenir, de la mobilité et de l'impact de métaux utilisés pour le traitement de plans d'eau eutrophes : cas de l'aluminium et du cuivre. Limoges.
- Vardi, A., Schatz, D., Beeri, K., Motro, U., Sukenik, A., Levine, A., Kaplan, A., 2002. Dinoflagellate-Cyanobacterium Communication May Determine the Composition of Phytoplankton Assemblage in a Mesotrophic Lake. *Curr. Biol.* 12, 1767–1772.
- Volk, C., Bell, K., Ibrahim, E., Verges, D., Amy, G., LeChevallier, M., 2000. Impact of enhanced and optimized coagulation on removal of organic matter and its biodegradable fraction in drinking water. *Water Res.* 34, 3247–3257.
- Von Lützw, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions - a review. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 426–445.
- Von Wandruszka, R., 1998. The micellar model of humic acid: Evidence from pyrene fluorescence measurements. *Soil Sci.* 163, 921–930.
- Vrede, T., Ballantyne, A., Mille-Lindblom, C., Algesten, G., Gudas, C., Lindahl, S., Brunberg, A.K., 2009. Effects of N: P loading ratios on phytoplankton community composition, primary production and N fixation in a eutrophic lake. *Freshw. Biol.* 54, 331–344.
- Walsby, A.E., Hayes, P.K., Boje, R., Stal, L.J., 1997. The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytol.* 136, 407–417.

- Wang, L., Wu, F., Zhang, R., Li, W., Liao, H., 2009. Characterization of dissolved organic matter fractions from Lake Hongfeng, Southwestern China Plateau. *J. Environ. Sci.* 21, 581–588.
- Weishaar, J.L., Aiken, G.R., Bergamaschi, B.A., Fram, M.S., Fujii, R., Mopper, K., 2003. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4702–4708.
- Wershaw, R.L., 1994. Membrane-micelle model for humus in soils and sediments and its relation to humification (No. WSP - 2410). United States Geological Survey.
- Wershaw, R.L., 2004. Evaluation of conceptual models of natural organic matter (humus) from a consideration of the chemical and biochemical processes of humification [electronic resource] / by Robert L. Wershaw, Scientific investigations report ; 2004-5121. U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey ; U.S. Geological Survey, Information Services [distributor], Reston, Va. : Denver, CO.
- Westrick, J.A., Szlag, D.C., Southwell, B.J., Sinclair, J., 2010. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1705–1714.
- Wetzel, S.J., Guttman, C.M., Girard, J.E., 2004. The influence of matrix and laser energy on the molecular mass distribution of synthetic polymers obtained by MALDI-TOF-MS. *Int. J. Mass Spectrom.* 238, 215–225.
- Whitton, B.A., Potts, M., 2000. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Springer.
- WHO, 2003. Guidelines for safe recreational waters Volume 1 - Coastal and fresh waters. [WWW Document].
- Wickland, K.P., Neff, J.C., Aiken, G.R., 2007. Dissolved organic carbon in Alaskan boreal forest: Sources, chemical characteristics, and biodegradability. *Ecosystems* 10, 1323–1340.
- Widrig, D.L., Gray, K.A., McAuliffe, K.S., 1996. Removal of algal-derived organic material by preozonation and coagulation: Monitoring changes in organic quality by pyrolysis-GC-MS. *Water Res.* 30, 2621–2632.
- Wiedner, C., Rücker, J., Fastner, J., Chorus, I., Nixdorf, B., 2008. Seasonal dynamics of cylindrospermopsin and cyanobacteria in two German lakes. *Toxicon* 52, 677–686.
- Xie, L., Xie, P., Li, S., Tang, H., Liu, H., 2003. The low TN:TP ratio, a cause or a result of *Microcystis* blooms? *Water Res.* 37, 2073–2080.
- Xu, H., Jiang, H., 2013. UV-induced photochemical heterogeneity of dissolved and attached organic matter associated with cyanobacterial blooms in a eutrophic freshwater lake. *Water Res.* 47, 6506–6515.
- Yamamoto, Y., Nakahara, H., 2005. The formation and degradation of cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* blooms: the importance of pH, water temperature, and day length. *Limnology* 6, 1–6.
- Yamashita, Y., Tanoue, E., 2004. Chemical characteristics of amino acid-containing dissolved organic matter in seawater. *Org. Geochem.* 35, 679–692.
- Yang, X., Guo, W., Shen, Q., 2011. Formation of disinfection byproducts from chlor(am)ination of algal organic matter. *J. Hazard. Mater.* 197, 378–388.
- Ye, L., Shi, X., Wu, X., Zhang, M., Yu, Y., Li, D., Kong, F., 2011. Dynamics of dissolved organic carbon after a cyanobacterial bloom in hypereutrophic Lake Taihu (China). *Limnol. - Ecol. Manag. Inland Waters* 41, 382–388.
- Yéprémian, C., Gugger, M.F., Briand, E., Catherine, A., Berger, C., Quiblier, C., Bernard, C., 2007. Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Res.* 41, 4446–4456.

- Zaccone, C., Sanei, H., Outridge, P.M., Miano, T.M., 2011. Studying the humification degree and evolution of peat down a Holocene bog profile (Inuvik, NW Canada): A petrological and chemical perspective. *Org. Geochem.* 42, 399–408.
- Zahiruddin, K., Leon, T.T., 2008. Optimizing coagulation process for a low turbidity, low temperature water. *Electron. J. Environ. Agricultural Food Chem.* 7, 2599–2610.
- Zamyadi, A., Ho, L., Newcombe, G., Bustamante, H., Prévost, M., 2013. Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. *Water Res.* 47, 2689–2700.
- Zech, W., Haumaier, L., Kögel-Knabner, I., 1989. Changes in aromaticity and carbon distribution of soil organic matter due to pedogenesis. *Sci. Total Environ.* 81-82, 179–186.
- Zech, W., Ziegler, F., Kögel-Knabner, I., Haumaier, L., 1992. Humic substances distribution and transformation in forest soils. *Sci. Total Environ.* 117-118, 155–174.
- Zhang, X., Amendola, P., Hewson, J.C., Sommerfeld, M., Hu, Q., 2012. Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresour. Technol.* 116, 477–484.
- Zhang, Y., Tian, J., Nan, J., Gao, S., Liang, H., Wang, M., Li, G., 2011. Effect of PAC addition on immersed ultrafiltration for the treatment of algal-rich water. *J. Hazard. Mater.* 186, 1415–1424.
- Zhou, L., Yu, H., Chen, K., 2002. Relationship between microcystin in drinking water and colorectal cancer. *Biomed. Environ. Sci.* 15, 166–171.
- Ziegmann, M., Abert, M., Müller, M., Frimmel, F.H., 2010. Use of fluorescence fingerprints for the estimation of bloom formation and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 44, 195–204.
- Zingone, A., Oksfeldt Enevoldsen, H., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean Coast. Manag.* 43, 725–748.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F., 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere* 38, 45–50.
- Zularisam, A.W., Ismail, A.F., Salim, M.R., Sakinah, M., Matsuura, T., 2009. Application of coagulation–ultrafiltration hybrid process for drinking water treatment: Optimization of operating conditions using experimental design. *Sep. Purif. Technol.* 65, 193–210.

Textes réglementaires

Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique.

Circulaire DGS/SD7a n° 2003-270 du 4 juin 2003 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques.

Circulaire n° DGS/SD7A/2004/364 du 28 juillet 2004 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs.

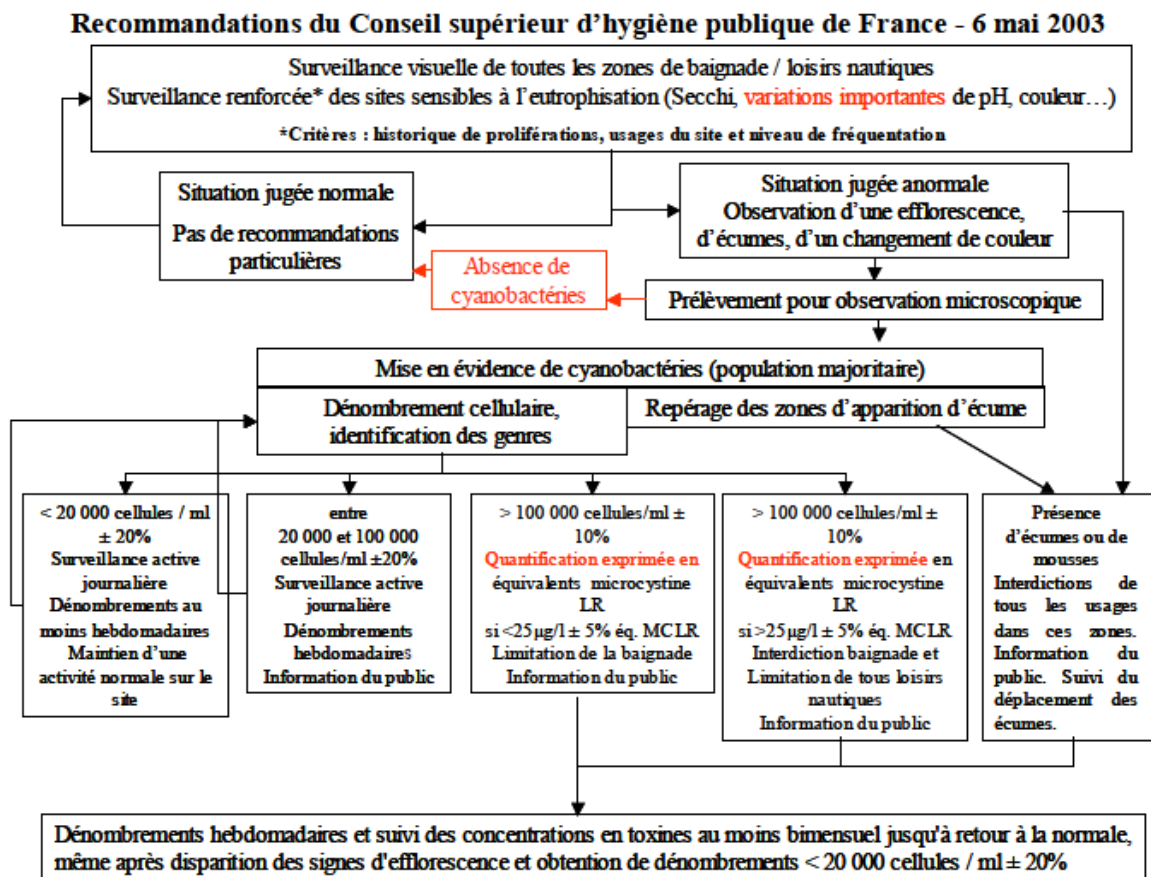
Circulaire n°DGS/SD7A/2005/304 du 5 juillet 2005 relative aux modalités d'évaluation et de gestion des risques sanitaires face à des situations de prolifération de micro-algues (cyanobactéries) dans des eaux de zones de baignades et de loisirs nautiques.

Circulaire NDGS/EA4 n° 2007-259 du 26 juin 2007 concernant l'application de l'arrêté du 20 juin 2007 relatif à la constitution du dossier de la demande d'autorisation d'utilisation d'eau destinée à la consommation humaine mentionnée aux articles R. 1321-6 à R. 1321-12 et R. 1321-42 du code de la santé publique.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Arbre décisionnel relatif à la gestion des proliférations de cyanobactéries dans les plans d'eau à vocation récréative.



Annexe 2 : paramètres à optimiser pour l'analyse par MALDI-TOF-MS

Dans le cadre d'une analyse par MALDI-TOF, les paramètres à optimiser pour chaque échantillon sont:

- la longueur d'onde et l'intensité du laser

Pour obtenir une bonne désorption de l'analyte, la longueur d'onde d'irradiation du laser doit se situer dans la zone où les molécules à analyser absorbent. Les Substances Humiques absorbant dans l'UV, les lasers à azote (337nm) et Nd-YAG (355nm) sont fréquemment utilisés. De plus, l'intensité du laser doit être optimale : si elle est trop élevée elle peut conduire à une fragmentation des molécules, si elle est trop faible l'ionisation sera mauvaise.

- le choix de la matrice et le ratio analyte/matrice

La matrice protège l'analyte de l'énergie élevée transmise par le laser lors de l'ionisation. Le choix de cette matrice dépend du type de molécule à analyser et du laser utilisé. Les matrices les plus utilisées sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinammique (CHCA), l'acide 2-(4-hydroxyphénylazo)-benzoïque (HABA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide sinapinique. Selon Fuchs *et al.*, (2010), la matrice présente en excès par rapport à l'analyte doit:

- donner un excellent ratio signal sur bruit pour les pics d'intérêt afin que la sensibilité soit élevée,
- avoir une absorption maximale à la longueur d'onde d'émission du laser,
- donner un signal faible pour éviter les interférences avec l'analyte,
- protéger l'analyte du laser par co-cristallisation
- éviter la formation d'aggrégats ("cluster") avec l'analyte afin d'obtenir des ions moléculaires

- le tampon de solubilisation

Différents tampons sont utilisés pour solubiliser l'analyte (sous forme solide) lors de la préparation de l'échantillon. Ceux-ci vont influencer sur la cristallisation de l'échantillon et donc sur la qualité du signal obtenu. Les mélanges suivants sont couramment utilisés : acétonitrile/eau (1:1), acétonitrile/0,1% Acide Trifluoroacétique TFA (7:3), NaOH (0,036mol/L), KOH (0,036 mol/L).

- *la méthode de dépôt* : il existe différents modes de dépôts qui vont avoir une influence directe sur la vitesse d'évaporation du solvant et donc sur la cristallisation de l'échantillon dont dépend la qualité du signal (Qiao *et al.*, 2009).

- *méthode de la goutte séchée* : analyte et matrice sont mélangés ensemble puis une goutte de ce mélange est déposée sur la plaque d'échantillons et séchée à l'air libre. Les

cristaux formés sont assez hétérogènes et se forment en périphérie du spot dans le cas de l'utilisation du DHB.

- *méthode d'évaporation rapide* : la matrice est reprise dans l'acétone puis une goutte du mélange est déposée sur la plaque jusqu'à évaporation du solvant. Ensuite, l'analyte est déposé sur la couche de matrice. Les cristaux obtenus sont plus homogènes et plus petits.

- *méthode de la couche superposée* : le principe est identique à la méthode précédente sauf qu'un mélange matrice/analyte est déposé sur la couche de matrice cristallisée.

- *méthode d'évaporation lente (quelques heures)* : cette méthode est utilisée pour l'analyse des échantillons fortement contaminés par les sels. La cristallisation lente produit un cristal de matrice dans lequel l'analyte est incorporé sans les sels.

Résumé :

Les phénomènes d'eutrophisation induisent de nombreux impacts négatifs sur les écosystèmes aquatiques mais également sur les usages des ressources en eaux. Ils conduisent à la prolifération du phytoplancton, qui, par son activité métabolique et sa sénescence, génère une grande quantité de Matière Organique Algale (MOA) dont la composition et la réactivité diffèrent de celles de la Matière Organique issue du milieu Naturel (MON).

L'évolution des caractéristiques de la MOA a été étudiée sur des cultures mono-spécifiques d'algues et de cyanobactéries, de sa production au cours de la formation du bloom à son humification. Des fractions de MOA extraites selon leur caractère hydrophobe ont été caractérisées par spectroscopie UV et de fluorescence, ultrafiltration et spectrométrie de masse (MALDI-TOF). Des propriétés spécifiques à la MOA ont ainsi été mises en évidence et reliées aux observations sur le terrain.

Une étude *in-situ* sur un plan d'eau hypereutrophe de la région Limousin a été menée sur une période de 18 mois. Les apports récurrents en MOA perturbent la dynamique de la MON de la ressource et modifient ses caractéristiques en augmentant la part de composés hydrophiles, en accord avec les observations en laboratoire.

Ces changements qualitatifs et quantitatifs ont également des conséquences sur les procédés de traitement des eaux et notamment sur la coagulation-floculation. Les performances du procédé appliqué à une eau riche en MOA sont ainsi réduites par rapport à une eau non eutrophe; les fractions hydrophobes et hydrophiles sont les plus impactées. Les mécanismes mis en jeu dans l'élimination de matières organiques d'origines variées ainsi que le rôle de chaque fraction ont pu être identifiés.

Mots clés : eaux naturelles, eutrophisation, coagulation-floculation, matière organique, fractionnement hydrophobe, poids moléculaire apparent, fluorescence.

Evaluation of the impacts of algal and cyanobacterial blooms on the characteristics of organic matter from natural waters**Abstract :**

Eutrophication phenomena adversely impact ecosystems and disturb the uses of the affected water resources. They lead to phytoplanktonic proliferations resulting in a large quantity of Algal Organic Matter (AOM) due to metabolic activity and senescence of populations. The composition and reactivity of AOM differ from those of Natural Organic Matter (NOM).

The AOM evolution was studied from its production by blooms formation to the humification stage, on laboratory cultures of mono-specific species of algae and cyanobacteria. Fractions of AOM extracted according to hydrophobicity were characterized by UV and fluorescence spectroscopy, ultrafiltration and mass spectrometry (MALDI-TOF). Some specific properties of AOM were thus determined. These properties were in agreement with the *in-situ* observations.

An *in-situ* monitoring program was conducted on an hypereutrophic pond in the Limousin area over a 18 months period. Recurrent inputs of AOM disturb the NOM dynamics and modify its characteristics by increasing the hydrophilic part, in agreement with the laboratory observations.

These qualitative and quantitative changes also affect drinking water treatment processes and especially coagulation-flocculation. Efficiency of the process applied to an eutrophic water was thus reduced compared to a non eutrophic water; both hydrophobic and hydrophilic fractions were the most impacted. Mechanisms involved in the elimination of organic matters from various origins and the role of each fraction were also identified.

Keywords : natural waters, eutrophication, coagulation-flocculation, organic matter, fractionation according hydrophobicity, apparent molecular weight, fluorescence.