

Développement d'un capteur de fluorescence pour la caractérisation *in situ* et à haute fréquence de la matière organique dans les milieux aquatiques

Gilles Varrault¹, Angélique Goffin¹, Nadège Musabimana¹, Sabrina Guérin², Vincent Rocher²

¹ Université Paris-Est Créteil/LEESU

² SIAAP/DI

* varrault@u-pec.fr

Résumé

La matière organique (MO) joue un rôle essentiel dans les écosystèmes aquatiques de surface en raison du nombre de processus biogéochimiques dans lesquels elle intervient. Ce rôle va dépendre de sa quantité mais aussi de sa nature chimique.

Les travaux récents du programme PIREN-Seine ont montré la forte variabilité spatio-temporelle de la qualité et de la quantité de matière organique dans le bassin de la Seine. Des travaux de la littérature évoquent même des variations temporelles à l'échelle de la journée, même dans des situations hydrologiques stables.

C'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser une sonde de fluorescence pour caractériser in situ et à haute fréquence la MO dans les milieux aquatiques. Après avoir constaté que l'offre commerciale de sondes de fluorescence ne répondait pas à nos exigences en termes de nombre de fluorophores analysés, il a été décidé de développer une sonde au LEESU en collaboration avec le SIAAP. Il s'agit du projet FLUOCOPEE mené dans le cadre des programmes MOCOPEE et PIREN-Seine.

La première version industrielle de la sonde, permettant l'analyse de 32 fluorophores, a été testée dans le cadre de ces travaux. La justesse des mesures effectuées s'avère d'un très bon niveau. La sensibilité obtenue est largement suffisante pour son utilisation dans les milieux aquatiques, et même en filière de potabilisation. La sonde donne donc entière satisfaction et répond totalement à notre cahier des charges.

Les tests vont se poursuivre pendant tout l'automne 2021. Au début de l'année 2022, trois autres sondes vont nous être livrées et seront déployées en STEU et dans les milieux aquatiques.

Points clefs

- ✓ *La MO est impliquée dans un grand nombre de processus biogéochimiques en rivière. Les quantité et qualité de MO varient à une fréquence temporelle élevée.*
- ✓ *Une sonde de fluorescence permettant l'analyse in situ et à haute fréquence de 32 fluorophores a été développé dans le cadre du projet FLUOCOPEE.*
- ✓ *Trois à six sondes FLUOCOPEE vont être déployées en STEU et dans les milieux aquatiques en 2022.*

Abstract

Organic matter (OM) plays an essential role in surface aquatic ecosystems because of the number of biogeochemical processes in which it is involved. This role will depend on its quantity but also on its chemical nature.

Recent work of the PIREN-Seine program has shown the strong spatio-temporal variability of the quality and quantity of organic matter in the Seine basin. Some works in the literature even mention temporal variations on a daily scale even in stable hydrological situations.

For this reason, we decided to use a fluorescence probe to characterize in situ and at high frequency the OM in aquatic environments. After noticing that the commercial offer of fluorescence probes did not meet our requirements in terms of number of fluorophores analyzed, it was decided to develop a probe at LEESU in collaboration with SIAAP. This is the FLUOCOPEE project carried out in the framework of the MOCOPEE and PIREN-Seine programs.

In this work, we have tested the first industrial version of this probe. It allows the analysis of 32 fluorophores. The accuracy of the measurements made is of a very good level. The sensitivity obtained is largely sufficient for its use in aquatic environments and even in the potabilisation process. The probe is therefore fully satisfactory and meets our specifications.

The tests will continue throughout the fall of 2021. At the beginning of 2022, 3 other probes will be delivered to us and will be deployed in WWTPs and in aquatic environments.

Key points

- ✓ OM is involved in a large number of biogeochemical processes in rivers. The quantity and quality of OM vary at a high temporal frequency.
- ✓ A fluorescence probe allowing in situ and high frequency analysis of 32 fluorophores has been developed in the framework of the FLUOCOPEE project.
- ✓ Three to six FLUOCOPEE probes will be deployed in WWTPs and in aquatic environments in 2022.

Introduction

La matière organique (MO) dans les systèmes aquatiques est un mélange très complexe et dynamique de composés organiques provenant de sources naturelles et d'apports anthropiques (Bauer et al., 2011 ; Cawley et al., 2012 ; Artifon et al., 2019). L'origine de la MO influence sa composition et ses propriétés qui vont déterminer sa réactivité dans les écosystèmes aquatiques (Besemer et al., 2009 ; Lambert et al., 2017). La concentration et la composition de la MO dépendent du bassin versant environnant (nature, occupation des sols) et de la connectivité hydrologique entre le cours d'eau (lit mineur), sa plaine d'inondation et les eaux souterraines, qui contrôle le transfert de la MO terrestre et d'origine aquatique vers le cours d'eau (Besemer et al., 2009).

La MO joue un rôle essentiel dans les écosystèmes aquatiques de surface en raison du nombre de processus biogéochimiques dans lesquels elle intervient. Quelle que soit sa source, elle joue un rôle central sur la nature du métabolisme (hétérotrophe ou autotrophe) des cours d'eau. La MO influence également la spéciation, la solubilité, la toxicité et le transport des polluants organiques et inorganiques (Buffle, 1988 ; Campbell, 1995). Elle est aussi impliquée dans les réactions photochimiques aqueuses, le cycle et la disponibilité des nutriments (Bormann et Likens, 1967 ; Nebbioso et Piccolo, 2013).

Les mécanismes impliqués dans tous ces processus dépendent fortement non seulement de la quantité de MO, mais aussi de sa nature chimique, de ses propriétés physico-chimiques et de sa composition. Les activités humaines, notamment pour la Seine qui est sous forte pression urbaine, modifient la nature de la MO en raison des apports provenant notamment des rejets de stations d'épuration des eaux usées (Matar et al., 2012). Malgré leur rôle clé dans les processus environnementaux, la composition et la réactivité de la MO sont encore trop peu connues.

Les travaux réalisés durant la phase précédente du programme PIREN-Seine ont permis de caractériser pour la première fois la MO dissoute (MOD), colloïdale et particulaire (MOP) à l'échelle globale, mais aussi moléculaire dans le bassin de la Seine. Il en ressort une grande variabilité spatiale et temporelle des caractéristiques de la MOD et de la MOP dans les sites ateliers de l'axe Seine, de l'Orge et de la Bassée (Varrault et al., 2019). Cette variabilité traduit la grande hétérogénéité des constituants de la MO, de ses sources, naturelles et anthropiques, et des processus de transformation dans les eaux de surface.

Les propriétés optiques de la MOD ont permis de discriminer les différents sites, mais aussi l'impact des conditions hydrologiques. Le suivi à une fréquence hebdomadaire pendant un an (360 échantillons, 12 sites d'échantillonnage) associé à une caractérisation de la MOD en spectroscopie de fluorescence 3D a permis de mettre en évidence des caractéristiques communes de la MOD présente en Seine, Marne et Oise à l'amont de l'agglomération parisienne. Certaines différences de nature de MOD dans les trois cours d'eau ont également été soulignées. En outre, des différences importantes en termes de dynamique de la MOD ont été observées pour les trois cours d'eau (Goffin, 2017 ; Varrault et al., 2019). Les travaux récents du programme PIREN-Seine ont donc montré la forte variabilité spatio-temporelle des qualité et quantité de MO dans le bassin de seine. Des travaux de la littérature évoquent même une variabilité temporelle à une fréquence élevée, avec des variations à l'échelle de la journée même dans des situations hydrologiques stables.

Pour suivre ces évolutions de qualité et de quantité de la MO et mieux comprendre les processus biogéochimiques dans lesquels elle est impliquée, il est par conséquent nécessaire de pouvoir caractériser la MO à une fréquence élevée. En outre, une analyse *in situ* est un avantage important dans la mesure où les contaminations de l'échantillon par le flaconnage et son évolution, notamment en raison de la biodégradation de la fraction la plus labile, entre le prélèvement et l'analyse seraient éliminées.

C'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser une sonde de fluorescence. Après avoir constaté que l'offre commerciale de sondes de fluorescence ne répondait pas à nos exigences en termes de nombre de fluorophores analysés, il a été décidé de développer une sonde au LEESU en collaboration avec le SIAAP. Il s'agit du projet FLUOCOPEE mené dans le cadre des programmes MOCOPEE et PIREN-Seine. Les résultats des tests de la première version industrielle de la sonde, permettant l'analyse de 32 fluorophores, sont présentés dans ce rapport.

Un dépôt de brevet étant en cours, la description technique de la sonde n'est pas présentée dans le cadre de ce rapport.

1. Matériel et méthodes

1.1. Principe de la spectrofluorescence

1.1.1. Le phénomène de fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui survient lorsqu'un composé ayant auparavant été excité par absorption d'énergie issue d'une source lumineuse (type UV-Vis) présente la faculté de réémettre cette énergie sous forme de rayonnement. Celui-ci est émis de façon quasi instantanée, à une longueur d'onde λ (nm) plus grande que celle de la lumière d'origine. Les différents phénomènes énergétiques auxquels une molécule peut être sujette sont illustrés dans la Figure 1 qui présente le diagramme de Jablonski. Les processus d'absorption et de fluorescence, de relaxation vibrationnelle ou encore la conversion interne de l'énergie d'émission généralement inférieure à l'énergie d'absorption y sont présentés (Lakowicz et al., 2006).

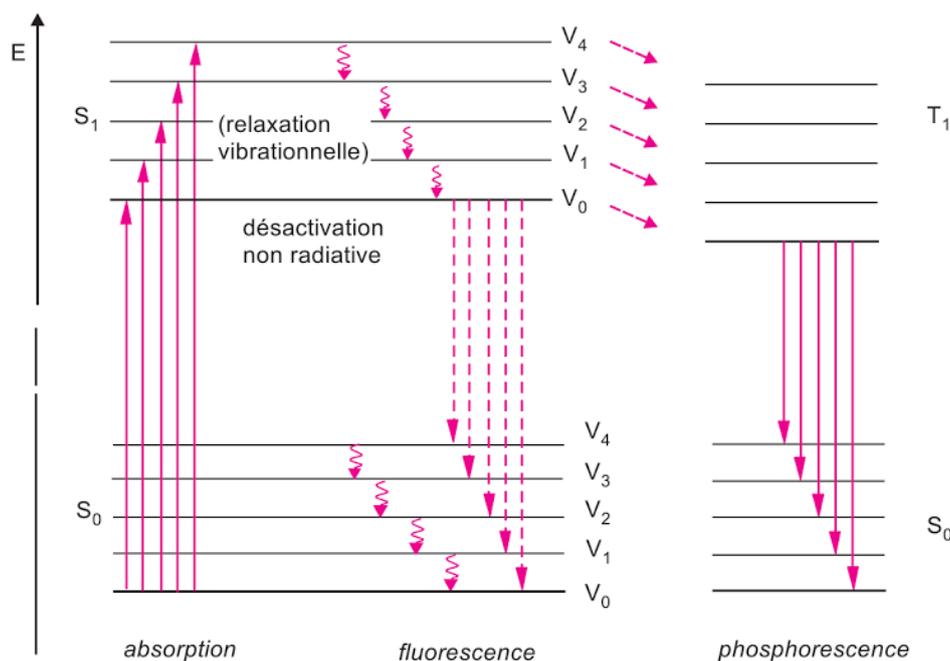


Figure 1. Diagramme de Jablonsky (d'après Rouessac et al., 2004).

Pour fluorescer, les molécules doivent comporter des fluorophores (aminoacides, structures aromatiques, porphyrines, acides organiques). On nommera ainsi fluorophore toute molécule susceptible d'absorber l'énergie sous forme de photon à une longueur d'onde spécifique (excitation) et de la relaxer sous forme d'émission lumineuse spontanée à une longueur d'onde plus importante (et donc d'énergie moindre) dans le domaine du visible ou de l'ultraviolet.

Après avoir été sujet à une excitation lumineuse, une molécule va absorber un photon, qui va entraîner une transition électronique de l'état fondamental S₀ vers un état énergétique supérieur S₁ que l'on nomme « état excité ». Ce phénomène de transition énergétique, appelé absorption moléculaire, survient lorsqu'une molécule est exposée à un photon d'énergie égale à la différence d'énergie entre l'état initial et l'état excité d'une molécule. La longueur d'onde du maximum d'absorption moléculaire est déterminée par le degré de conjugaisons des doubles liaisons π . L'augmentation du nombre de doubles liaisons présente dans une molécule induit un décalage spectral du maximum d'absorption vers des niveaux d'énergie plus faibles, localisés à des longueurs d'ondes élevées (partie rouge du spectre du visible).

Dans un second temps, la désexcitation de la molécule peut suivre différents processus. La mise en place rapide (10^{-12} s) de processus de conversions internes amènera les molécules à atteindre l'état V₀ du niveau S₁ sans émissions de photons. La structure moléculaire est un facteur déterminant du type de désexcitation subi par une molécule lors de son retour à l'état fondamental. Ainsi, une molécule possédant d'importants degrés de rotations et de vibrations suivra plus favorablement le chemin de la désactivation thermique sans émettre de fluorescence (Schulman, 1985).

A contrario, certaines molécules peuvent y redescendre (10^{-11} à 10^{-8} s) en suivant la loi de Stokes via l'émission de photons moins énergétiques, causant le phénomène de fluorescence. La relaxation par émission de lumière se produit toujours à partir de l'état électronique excité S_1 , le plus bas d'une molécule (principe de Kasha). Pendant l'émission de fluorescence qui accompagne le retour à l'état initial, la molécule peut conserver une partie de l'énergie reçue sous forme d'énergie vibrationnelle. Cet excès d'énergie de vibration est dissipé par collisions ou autres processus non radiatifs baptisés mécanismes de relaxation vibrationnelle.

1.1.2. Propriétés de la matière organique fluorescente

La matière organique comporte une fraction optiquement active capable d'absorber la lumière dans le spectre du visible (400-700 nm) et de l'ultra-violet (200-400 nm) que l'on regroupe sous le terme de « matière organique chromophorique ». L'absorption par cette fraction du carbone organique dissous est maximale dans l'ultraviolet et diminue jusqu'à une absorption proche de zéro dans la partie rouge du spectre. Un sous-ensemble de la matière organique chromophorique est défini comme « matière organique dissoute fluorescente », du fait de sa capacité à émettre de la fluorescence (Stedmon et Cory, 2014).

La spectrométrie de fluorescence permet de différencier les fractions de la MOD via la présence de fluorophores qui dépendent en grande partie des propriétés physico-chimiques intrinsèques de la MOD et de son environnement chimique (Hudson et al., 2008). Cette technique permet d'apporter des informations sur la composition de la MOD ou sur les transformations qu'elle subit (Weber, 1988 ; Vodacek et al., 1997).

Différentes méthodes de mesures de fluorescence existent, avec notamment :

- *Fluorescence d'émission simple* : l'intensité de fluorescence peut être acquise pour un couple de longueurs d'onde d'excitation-émission. Cette méthode peut aussi être appliquée pour obtenir un spectre de l'intensité de fluorescence mesurée sur une plage de longueurs d'onde d'émission pour une longueur d'onde d'excitation fixée. Cette approche est aussi valable pour l'acquisition d'un spectre d'absorption ou d'excitation pour une longueur d'onde d'émission fixée.
- *Fluorescence en trois dimensions* : scan simultané des longueurs d'ondes d'excitation et d'émissions, résultant en une matrice d'excitation-émission de fluorescence en trois dimensions (3D-EEM).

Les variations de composition chimique et de structures moléculaires de la MOD peuvent être visualisées via la mesure de paramètres tels que l'intensité maximale de fluorescence (Coble, 1996), les ratios de fluorescence (McKnight et al., 2001) ou encore la localisation des bandes d'Excitation (Exc) et d'Emission (Em), permettant ainsi d'obtenir des informations sur la quantité, les sources et le caractère de la MOD (Stedmon et al., 2008 ; Goldman et al., 2012). Les différents fluorophores d'intérêts de la MOD sont présentés ci-après.

1.1.3. Fluorophores d'intérêts de la MOD

Les spectres de fluorescence contiennent les contributions simultanées de différents fluorophores, complexifiant leur identification (Vacher, 2004). Chaque molécule organique fluorescente (fluorophore) présente des spécificités propres se traduisant par :

- Un couple de longueurs d'ondes d'Exc/Em ;
- Une intensité de fluorescence maximale ;
- Un rendement quantique de fluorescence ;
- Une durée de vie de fluorescence propre.

Ces maximums d'intensités de fluorescence observés ont été attribués à différents groupes de composés chimiques « types » constitutifs de la MOD. Cette identification a été réalisée par comparaison des propriétés de la fluorescence mesurée pour des composés standards présentant des propriétés optiques similaires (Henderson et al., 2009). On différencie alors les composés fluorescents de « types » humiques, fulviques et protéiques (subdivisé en deux groupes, tryptophane et tyrosine).

La première nomenclature de classification des fluorophores est celle de Coble (1996) : les bandes A et C pour les composés de type humique, la bande B pour les composés protéiniques type tyrosine, la bande T pour les composés protéiniques de type tryptophane et enfin la bande M caractéristique des composés marins

de type humique. Une nomenclature correspondante a également été introduite par Parlanti et al. (2000). La figure 2 présente un exemple de l'emplacement de ces différents fluorophores sur un spectre de fluorescence 3D (matrice d'excitation-émission). Le tableau 1 présente l'association des domaines de fluorescence pour chacun des composés de la MOD.

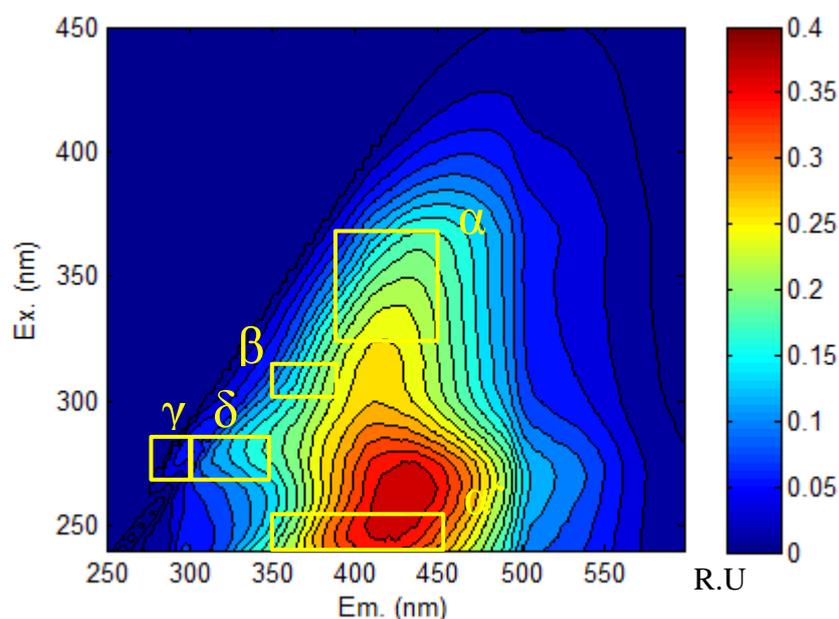


Figure 2. Localisation des fluorophores de la MOD sur un spectre de fluorescence 3D d'eau de Seine (Choisy).

Tableau 1. Localisation spectrale des fluorophores de la MOD dans les milieux récepteurs.

Fluorophores (Coble, 1996)	Fluorophores (Parlanti et al., 2000)	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Type de composés
A	α'	230 - 260	380 - 480	Substances type humiques + matériel plus récent
C	α	330 - 370	420 - 480	Substances type humiques
M	β	310 - 320	380 - 420	Matériel récent + composante biologique
B	γ	270 - 280	300 - 320	Tyrosine
T	δ	270 - 280	320 - 380	Tryptophane

1.2. Méthodes d'interprétation des spectres de fluorescence

Les dernières avancées technologiques permettent désormais le scan simultané des longueurs d'ondes d'excitation et d'émissions, résultant en une matrice d'excitation-émission de fluorescence en trois dimensions (3D-EEM) (Baker *et al.*, 2003). Cette méthode est la plus couramment utilisée à ce jour et présente différentes méthodologies d'interprétation présentées ci-après.

- « peak-picking »

Le « peak-picking » est une méthode couramment utilisée pour l'interprétation de données de fluorescence. Cette catégorisation regroupe un ensemble de techniques d'identification de fluorophores. La première méthode de « peak-picking » se base sur un simple relevé de l'emplacement des maxima de fluorescence observés sans préconception de leur localisation. Leur emplacement est par la suite réattribué à la fluorescence de composés fluorescents dans des zones de fluorescences similaires, issues de la littérature (Tableau). Néanmoins, cette méthode chronophage n'est pas recommandée pour plus de 20 échantillons et n'est pas à l'abri d'erreurs d'interprétations humaines. La seconde méthode de « peak-picking » consiste en l'extraction des intensités maximales de fluorescence mesurées soit dans une zone (ex : Figure) ou à un couple d'Exc/Em de fluorescence prédéfini d'après la littérature (Tableau 1).

Néanmoins, bien que ce type d'approche soit simple d'application, celle-ci peut induire des erreurs d'interprétation si aucune étude préalable de compatibilité des pics de fluorescence appliqués n'est réalisée. En effet, la majorité de ces pics prédéfinis ont été identifiés pour des matrices du milieu récepteur qui peuvent présenter, par exemple, des caractéristiques différentes des fluorophores observés dans la matrice analysée (ex : eaux de STEU). Ce type d'approche doit ainsi être appliqué avec précaution pour toute autre matrice que celle du milieu récepteur, afin d'éviter de passer outre la présence de fluorophores présents en dehors de zones prédéfinies ou présentant des caractéristiques trop éloignées de celles des fluorophores du milieu récepteur.

- *Les approches basées sur des algorithmes de décomposition*

L'ensemble des approches précédentes présentent l'inconvénient de reposer sur l'application de fluorophores préalablement identifiés dans les milieux naturels/récepteurs. Dans l'optique de ne pas omettre de pics de fluorescence et de mieux étudier la fluorescence d'échantillons de diverses origines, de nouvelles approches de traitements ont été proposées. En se basant sur des techniques statistiques adaptées, des algorithmes de décompositions des spectres de fluorescence en trois dimensions ont été développés. Les plus courants sont le *PARAllel FACtor analysis* (PARAFAC) (Stedmon et Bro, 2008), le *self organizing map* (SOM) (Bieroza *et al.*, 2009), ou encore le *partial least squares regression* (Bieroza *et al.*, 2012). PARAFAC est, à ce jour, l'algorithme de traitement le plus couramment utilisé pour définir le nombre de fluorophores, leurs intensités de fluorescence ainsi que les allures spectrales des spectres d'Exc/Em des composantes (ou groupements de fluorophores) indépendantes identifiées dans l'échantillon.

- *Le nombre de fluorophores*

Les travaux précédents menés dans le cadre de la thèse d'Angélique Goffin et dans le cadre de la phase 7 du PIREN-Seine ont montré que la MO du bassin de la Seine pouvait être caractérisée par 6 fluorophores dans le cas des eaux souterraines de la plaine de la Bassée (Parlanti *et al.*, 2019) et 10 fluorophores pour les eaux du surface (Goffin, 2017). Dans la littérature scientifique, le plus souvent, selon le type d'échantillon, la MO est caractérisée par la présence de 5 à 10 fluorophores. En outre, ces fluorophores ne sont pas nécessairement les mêmes d'une étude à l'autre, ce qui veut dire qu'il est nécessaire de pouvoir détecter un grand nombre de fluorophores, dans l'idéal quelques dizaines, pour permettre de caractériser au mieux la MO des milieux aquatiques.

1.3. Le développement d'une sonde de fluorescence : FLUOCOPEE

1.3.1. L'offre commerciale

Dans un premier temps, l'offre commerciale de sonde de fluorescence a été étudiée en 2017/2018 puis actualisée en 2020. Il ressort de cette étude que les sondes disponibles dans le commerce sont principalement dédiées à l'analyse des différentes classes d'algues dans les milieux aquatiques. Les couples de longueurs d'onde d'Exc/Em analysables ne sont pas adaptés à la caractérisation de la MO dans les milieux aquatiques, rendant par conséquent inutilisable ce type de sonde pour notre problématique.

Il existe bien des sondes dédiées à la caractérisation de la MO dans les milieux aquatiques, mais elles ne permettent l'analyse que d'un ou deux fluorophores, généralement un fluorophore protéinique (tryptophane) et un fluorophore en lien avec les substances dites humiques. Il apparaît donc que les sondes disponibles dans le commerce ne sont pas adaptées à une caractérisation fine de la MO par spectrofluorescence, notamment en raison du trop faible nombre de fluorophores analysés. C'est pour cette raison qu'il a été décidé de développer notre propre sonde de fluorescence (projet FLUOCOPEE) en collaboration avec la Direction de l'Innovation (DI) du SIAAP dans le cadre des programmes de recherche MOCOPEE et PIREN-Seine.

1.3.2. Le développement de Fluocopée

L'objectif à atteindre pour la sonde FLUOCOPEE était donc, en plus des objectifs classiques de qualité analytique (exactitude des mesures, robustesse, sensibilité, etc.), la capacité à analyser plusieurs dizaines de fluorophores. Il a donc fallu dans un premier temps entamer une réflexion sur les choix technologiques à opérer. Il a notamment fallu choisir :

- Le type de sources de photons que nous allons employer pour exciter les molécules organiques de l'échantillon ;
- Le dispositif de sélection des photons réémis par la fluorescence des molécules organiques avant leur transfert vers le détecteur ;
- Le type de détecteur utilisé.

Ces choix ont influencé d'une part la capacité de la sonde à analyser un grand nombre de fluorophores et d'autre part, sa sensibilité. Ils ont été opérés durant l'année 2018, après de nombreux tests de composants disponibles sur le marché. Différents types de sources et de détecteurs ont notamment été testés au laboratoire soit par nous-mêmes, soit avec l'aide de commerciaux. A la fin de l'année 2018, un montage réalisé au laboratoire avec des composants que nous avons choisis a montré son efficacité pour répondre à nos objectifs, notamment en termes de sensibilité et du nombre de fluorophores analysés. La preuve de concept ayant été apporté, un bureau d'étude en optoélectronique a été sélectionné pour fabriquer un prototype industriel sur la base du montage réalisé au laboratoire. De nombreux tests de versions intermédiaires et échanges ont été nécessaires pour aboutir à une première version industrielle satisfaisante à la mi-2021. Quelques modifications mineures ont été apportées et une seconde version nous sera livrée au tout début de l'année 2022. La chronologie du développement de la sonde FLUOCOPEE est résumée dans la figure 3.

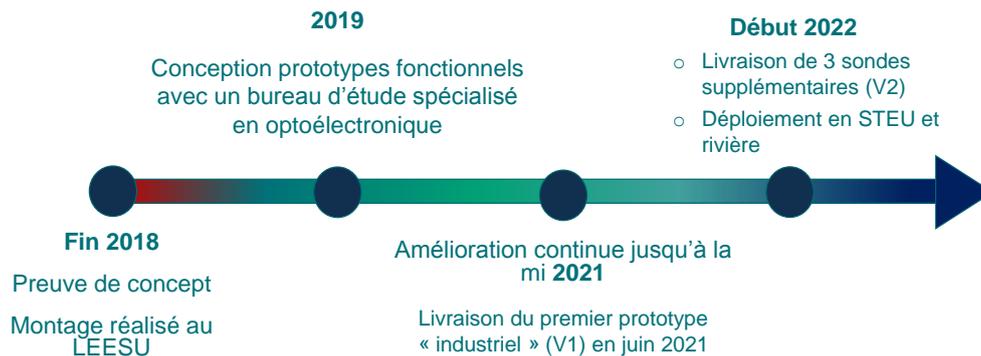


Figure 3. Chronologie du développement de la sonde FLUOCOPEE.

Un dépôt de brevet étant en cours, la description technique de la sonde n'est pas présentée dans le cadre de ce rapport.

Le principal avantage de cette sonde réside en sa capacité à analyser 32 fluorophores. Une synthèse des premiers tests réalisés avec la version 1 de la sonde depuis juillet 2021 est présentée dans ce qui suit.

2. Résultats et discussion

2.1. Premiers résultats de qualification de la sonde FLUOCOPEE

2.1.1. Calibration de la sonde

La sonde a pour l'instant été calibrée pour les trois types de fluorophores suivants :

- Type tyrosine (Ex 275 nm/Em 300 nm).
- Type tryptophane (Ex 275 nm/Em 365 nm).
- Type acides humiques (Ex 365 nm /Em 435 nm).

Les manipulations ont été effectuées en triplicat. La calibration de tous les autres fluorophores sera effectuée en 2022. Les résultats obtenus pour la tyrosine et le tryptophane sont présentés dans la figure 4.

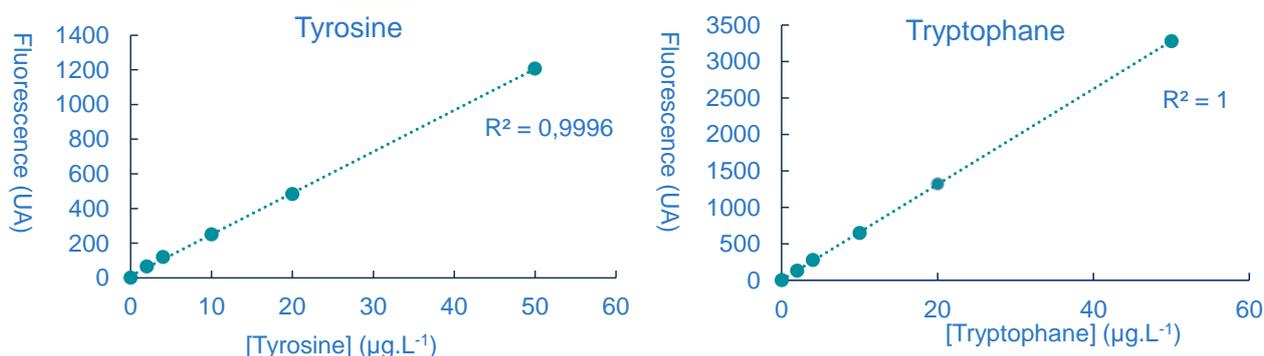


Figure 4. Droites de calibration de la sonde pour la tyrosine et le tryptophane.

Les résultats obtenus sont tout à fait satisfaisants et montrent une très bonne linéarité du signal mesuré par la sonde en présence de tyrosine, tryptophane et acides humiques (droite de calibration non présentée).

2.1.2. Limites de quantification

Les calibrations ont été réalisées en triplicat et les blancs ont été mesurés 10 fois de suite, permettant de calculer pour les blancs un écart-type sur les valeurs d'intensité de fluorescence robuste. Les pentes moyennes des droites de calibration obtenues pour chaque fluorophore ainsi que l'écart-type sur les valeurs mesurées pour le blanc nous ont permis de calculer des limites de quantification pour chacun de ces 3 fluorophores.

Les limites de quantification (LQ) obtenues sont les suivantes :

- 0,5 µg.L⁻¹ pour le tryptophane ;
- 2 µg.L⁻¹ pour la tyrosine ;
- 0,1 mgC.L⁻¹ pour les acides humiques.

Sur la base des mesures de fluorescence effectuées dans le cadre de la thèse d'Angélique Goffin (2017) sur près de 400 échantillons prélevés dans le bassin de la Seine à une fréquence hebdomadaire pendant un an, ces LQ sont, selon le fluorophore, 7 à 25 fois inférieures aux valeurs minimales mesurées en Seine. La sensibilité obtenue est donc largement compatible avec un suivi de la MO dans le bassin de la Seine. Cette sonde pourrait même être utilisée en filière de potabilisation des eaux.

2.1.3. Exactitude des mesures

Pour caractériser la justesse des mesures effectuées avec la sonde, 40 mesures ont été réalisées en laboratoire avec la sonde FLUOCOPEE et un spectrofluorimètre de paillasse (JASCO FP 8300) servant de référence. Ces mesures ont été effectuées dans des solutions mélanges d'eau de Seine (à Choisy-le-Roi) et d'eaux usées prélevées le 13 septembre 2021 en entrée et en sortie de la STEU Seine Centre. Ces solutions mélanges contiennent des proportions variables d'eau de Seine et d'eaux usées. A titre d'illustration, les résultats obtenus avec des mélanges binaires contenant des proportions variables d'eaux usées traitées (sortie

de STEU Seine Centre) et d'eau de Seine pour les fluorophores types tyrosine (Tyr), tryptophane (Try) et substances humiques (SH) sont présentés dans la figure 5.

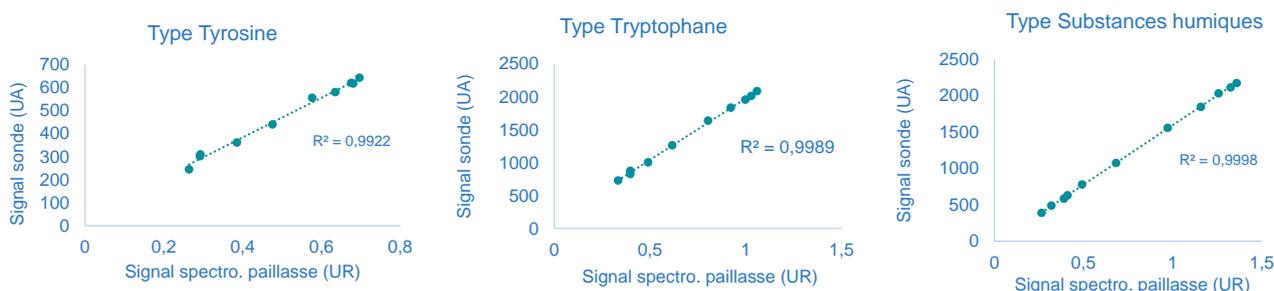


Figure 5. Comparaison des mesures de fluorescence effectuées par la sonde FLUOCOPEE et le spectrofluorimètre de paillasse (Jasco FP8300) dans des solutions mélanges contenant des proportions variables d'eaux usées traitées (sortie de STEU Seine Centre) et d'eau de Seine pour les fluorophores types tyrosine, tryptophane et substances humiques.

Pour les 80 mesures réalisées, en moyenne et selon le fluorophore, il y a entre 1 et 5% d'écart entre les valeurs mesurées par la sonde et celles mesurées par le spectrofluorimètre de paillasse et moins de 10% dans la quasi-totalité des cas. Il apparaît donc que dans des solutions de composition proche des eaux du bassin de la Seine, la justesse des mesures réalisées avec la sonde est très bonne.

Par ailleurs, les répétitions effectuées sur différents types d'échantillons (eau de Seine, eaux usées, étalons tyrosine, tryptophane ou substances humiques) ont permis de caractériser la fidélité (répétabilité) des mesures effectuées avec la sonde. Les écarts-types relatifs calculés sont systématiquement inférieurs à 3%.

L'exactitude (combinaison de la justesse et de la fidélité) des mesures réalisées avec la sonde FLUOCOPEE s'avère donc être d'un très bon niveau.

2.1.4. Robustesse de la sonde

Depuis juin 2021, plus de 2500 séquences de mesure ont été réalisées sans aucun dysfonctionnement (dont 1 500 dans des eaux usées). Cela correspond à 3,5 mois de mesures à une fréquence horaire. Bien entendu, les mois qui viennent et les futurs déploiements de la sonde nous permettront d'affiner notre estimation de la robustesse de la sonde.

2.2. Les premiers suivis à haute fréquence réalisés avec FLUOCOPEE

Les premiers suivis à haute fréquence réalisés avec la sonde FLUOCOPEE ont commencé au tout début octobre 2021 et vont se poursuivre durant l'automne 2021. La figure 6 présente ci-dessous les résultats obtenus dans le cadre du programme MOCOPEE lors d'un suivi de deux semaines des eaux usées décantées de la STEU Seine Centre. Les mesures sont effectuées toutes les 15 minutes la première semaine et toutes les 30 minutes la deuxième. En tout, près de 800 séquences de mesures ont été réalisées. Sur les 800 séquences de mesure, moins d'une dizaine (soit moins de 1%) ont été retirées en raison d'une très forte baisse du signal émis par les sources (mise en évidence grâce au système de contrôle de la dérive des sources) et donnant donc lieu à des mesures erronées de fluorescence. Les données présentées dans la figure 6 sont des données brutes non traitées et la fluorescence est exprimée en unité arbitraire. Il est par conséquent possible de visualiser les variations temporelles d'intensité de fluorescence de chaque composé, mais il n'est pas possible de comparer quantitativement l'intensité de fluorescence des différents fluorophores entre eux car les signaux doivent encore être corrigés. Cette correction ne modifiera en rien les variations temporelles des intensités de fluorescence de chaque fluorophore.

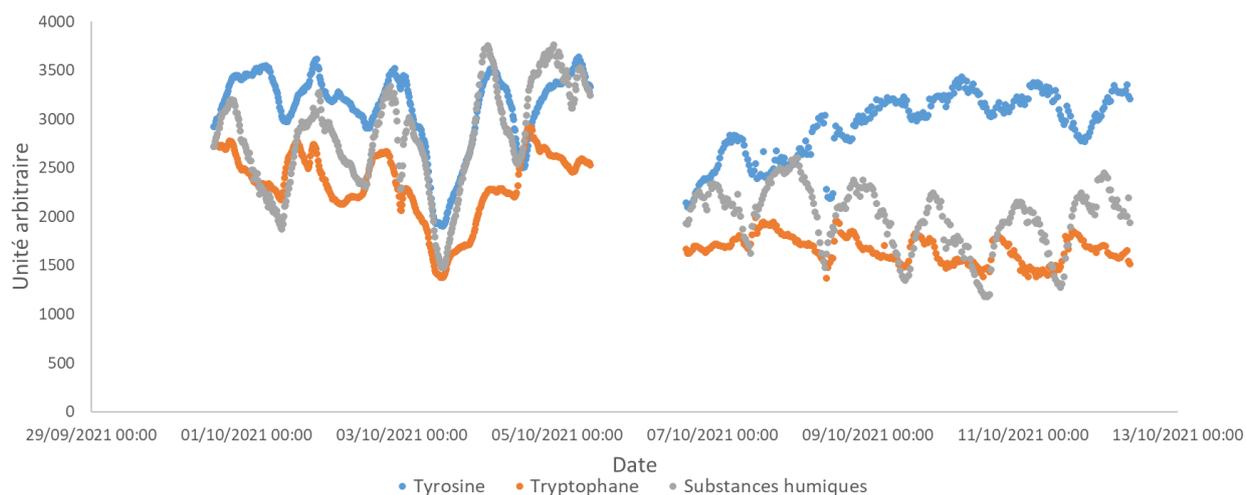


Figure 6. Suivi à haute fréquence de la fluorescence (unité arbitraire) des fluorophores types tyrosine, tryptophane et substances humiques dans les eaux décantées de la STEU Seine Centre réalisé avec la sonde FLUOCOPEE entre le 1^{er} et le 13 octobre 2021. Données brutes avant correction.

Il ne s'agit pas d'interpréter ici ces mesures (programme MOCOPEE), mais nous pouvons simplement observer une forte variabilité temporelle, à l'échelle de la journée, des intensités de fluorescence mesurées dans les eaux usées décantées de la STEU Seine Centre. Ces variations sont dues en partie à la variation de quantité de MO présente dans les eaux usées aux différentes heures de la journée, cependant le calcul des rapports des intensités de fluorescence des différents fluorophores (Tyr/SH, Try/SH et Tyr/Try) sur la figure 7 nous permet de montrer que la nature de la MO présente dans les eaux usées décantées varie également dans le temps. En effet, ces rapports permettent d'évaluer la proportion des différents fluorophores les uns par rapport aux autres. Nous pouvons observer ici que cette proportion varie fortement dans la journée, montrant par là même une forte variation de la qualité de la MO présente.

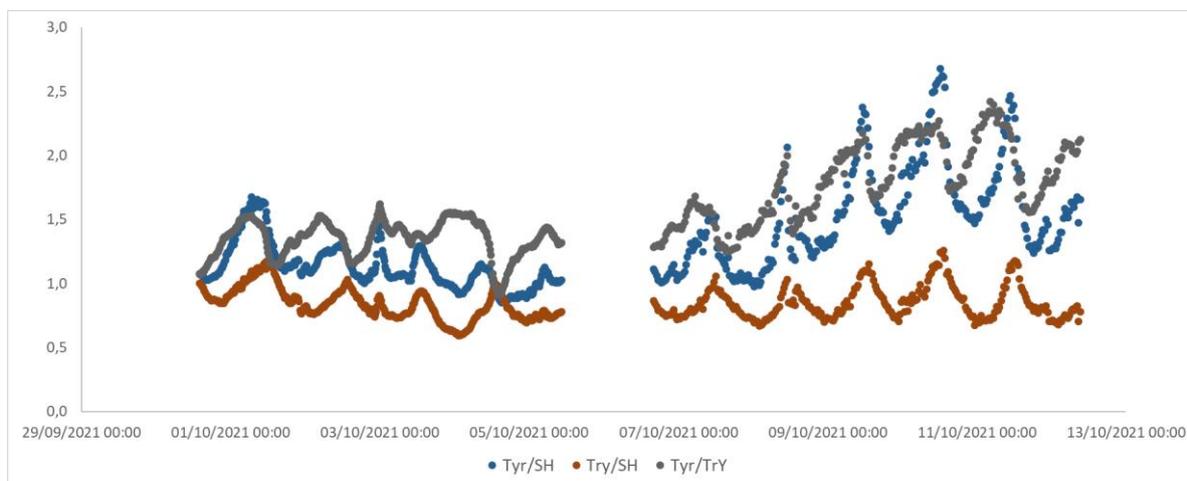


Figure 7. Valeurs des rapports d'intensité de fluorescence (Tyr/SH, Try/SH et Tyr/TrY) qui découlent du suivi à haute fréquence de la fluorescence des fluorophores types tyrosine, tryptophane et substances humiques dans les eaux décantées de la STEU Seine Centre réalisé avec la sonde FLUOCOPEE entre le 1^{er} et le 13 octobre 2021.

Conclusion

La MO est impliquée dans un grand nombre de processus biogéochimiques en lien notamment avec le cycle des nutriments, la désoxygénation des milieux et le devenir des polluants. Le rôle joué par la MO dans ces processus va dépendre de sa quantité mais aussi de sa qualité. Des travaux récents du programme PIREN-Seine ont montré la forte variabilité spatio-temporelle des qualité et quantité de matière organique dans le bassin de la Seine. Des travaux de la littérature évoquent même une variabilité temporelle à une fréquence élevée avec des variations à l'échelle de la journée même dans des situations hydrologiques stables.

Pour suivre ces évolutions de qualité et de quantité de la MO, il est par conséquent nécessaire de pouvoir caractériser la MO à une fréquence élevée. En outre, une analyse *in situ* serait un avantage important dans la mesure où les contaminations de l'échantillon par le flaconnage et son évolution, notamment en raison de la biodégradation de la fraction la plus labile, entre le prélèvement et l'analyse seraient éliminées.

C'est pour cette raison que nous avons décidé l'utilisation d'une sonde de fluorescence. En effet, des travaux récents ont montré l'efficacité de la spectrofluorescence 3D pour caractériser les qualité et quantité de MO dans les milieux aquatiques et aussi en STEU. Il apparaît que le signal de fluorescence provenant de la MO des milieux aquatiques comprend généralement de 5 à 10 fluorophores différents et qui ne sont pas nécessairement les mêmes d'un bassin versant à l'autre. Après avoir constaté que l'offre commerciale de sondes de fluorescence ne répondait pas à nos exigences en termes du nombre de fluorophores analysés, il a été décidé de développer une sonde au LEESU en collaboration avec le SIAAP. Il s'agit du projet FLUOCOPEE mené dans le cadre des programmes MOCOPEE et PIREN-Seine.

Ce développement s'est déroulé entre 2018 et 2021. Une version industrielle a été développée par un bureau d'études en optoélectronique sur la base d'un montage réalisé en laboratoire faisant office de preuve de concept. Pour réaliser ce montage, nous avons notamment dû sélectionner les meilleurs types de source, de détecteurs et de dispositif de tri des longueurs d'onde. L'avantage principal de cette sonde est qu'elle permet l'analyse de 32 fluorophores dans les échantillons contre 2 voire 3 pour les sondes disponibles dans le commerce. Un brevet est en cours de dépôt, la sonde n'est donc pas décrite techniquement dans ce rapport.

C'est cette première version industrielle de la sonde que nous avons testée dans le cadre de ces travaux. Elle a été testée avec des solutions étalons mais aussi des échantillons réels prélevés en entrée de STEU, sortie de STEU et en Seine. Il s'avère que la justesse des mesures effectuées est d'un très bon niveau. La sensibilité obtenue est largement suffisante pour son utilisation dans les milieux aquatiques, et même en filière de potabilisation. La sonde donne donc entière satisfaction et répond totalement à notre cahier des charges.

Les tests de la sonde FLUOCOPEE vont se poursuivre pendant tout l'automne 2021. Au début de l'année 2022, trois autres sondes vont nous être livrées et seront déployés en STEU et en rivière dans le bassin de la Seine. Les déploiements dans le milieu aquatique seront opérés dans le cadre de la thèse de Nadège Musabimana (2020/2023). L'autre volet de sa thèse consiste en une meilleure caractérisation par spectrofluorescence de la biodégradabilité de la MO contenue dans les milieux aquatiques et dans les rejets urbains. L'aboutissement de ces travaux ouvrira la voie à la mesure *in situ* et à haute fréquence de la quantité de MO biodégradable en rivière et dans les rejets urbains.

Bibliographie

- Artifon V., Zanardi-Lamardo E., Fillmann G. (2019) Aquatic organic matter: Classification and interaction with organic microcontaminants. *Science of the Total Environment* 649 1620–1635
- Baker, A., Inverarity, R., Charlton, M., Richmond, S.(2003) Detecting river pollution using fluorescence spectrophotometry: case studies from the Ouseburn, NE England. *Environmental Pollution* 124, 57–70.
- Bauer JE and Bianchi TS (2011) Dissolved Organic Carbon Cycling and Transformation. In: Wolanski E and McLusky DS (eds.) *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, Vol 5, pp. 7–67. Waltham: Academic Press.
- Besemer K., Luef B., Preiner S., Eichberger B., Agis M., Peduzzi P. (2009) Sources and composition of organic matter for bacterial growth in a large European river floodplain system (Danube, Austria). *Org Geochem.* 40(3): 321–331.
- Bieroza, M., Baker, A., Bridgeman, J. (2009) Relating freshwater organic matter fluorescence to organic carbon removal efficiency in drinking water treatment. *Science of The Total Environment* 407, 1765–1774. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.013
- Bieroza, M., Baker, A., Bridgeman, J.(2012) Exploratory analysis of excitation–emission matrix fluorescence spectra with self-organizing maps—A tutorial. *Education for Chemical Engineers* 7, e22–e31. doi: 10.1016/j.ece.2011.10.002
- Bormann F. H. and Likens G. E. (1967) *Nutrient Cycling*, *Science*, 155 (3761), pp. 424–429. <https://doi.org/10.1126/science.155.3761.424>
- Buffle J. (1988) Complexation reactions in aquatic system: an analytical approach. Ellis Horwood, New York, p 692
- Campbell PGC. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner DR (eds) *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Wiley, Chichester, Grande-Bretagne, pp 45–102
- Cawley K. M., Butler K. D., Aiken G. R., Larsen L. G., Huntington T. G., and M. McKnight D. (2012) Identifying fluorescent pulp mill effluent in the Gulf of Maine and its watershed. *Mar. Pollut. Bull.*, 64(8), pp. 1678–1687.
- Coble, P.G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51 (4), 325–346. doi: 10.1016/0304-4203(95)00062-3
- Goffin, A. (2017) Potentiel d'utilisation de la spectrométrie de fluorescence 3D pour la caractérisation en ligne de la matière organique dissoute: de la station d'épuration au milieu récepteur. Thèse de l'Université Paris Est (268 p).
- Goldman, J.H., Rounds, S.A., Needoba, J.A.(2012) Applications of Fluorescence Spectroscopy for Predicting Percent Wastewater in an Urban Stream. *Environmental Science & Technology* 46, 4374–4381. doi: 10.1021/es2041114
- Henderson, R.K., Baker, A., Murphy, K.R., Hambly, A., Stuetz, R.M., Khan, S.J.(2009) Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems: A review. *Water Research* 43, 863–881. doi: 10.1016/j.watres.2008.11.027
- Hudson, N., Baker, A., Ward, D., Reynolds, D.M., Brunson, C., Carliell-Marquet, C., Browning, S. (2008) Can fluorescence spectrometry be used as a surrogate for the Biochemical Oxygen Demand (BOD) test in water quality assessment? An example from South West England. *Science of The Total Environment* 391, 149–158. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.10.054
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York.
- Lambert T., Bouillon S., Darchambeau F., Morana C., Roland F.A.E., Descy J-P., Borges A.V. (2017) Effects of human land use on the terrestrial and aquatic sources of fluvial organic matter in a temperate river basin (The Meuse River, Belgium). *Biogeochemistry* 136, <https://doi.org/10.1007/s10533-017-0387-9>
- Matar Z. (2012) Influence de la matière organique dissoute d'origine urbaine sur la spéciation et la biodisponibilité des métaux dans les milieux récepteurs anthropisés, Thèse Université Paris-Est, 258p

- 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. *Limnology and Oceanography* 46, 38–48.
- Nebbio A. and Piccolo A. (2013) Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): a critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (1), pp. 109–124. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6363-2>
- 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. *Organic Geochemistry* 31 (12), 1765-1781. doi: 10.1016/S0146-6380(00)00124-8
- Parlanti E., Sourzac M ; Baratelli F., Varrault G., Flipo N. (2019). Rapport de synthèse phase VII (2015-2019) programme Piren-Seine – Vol 5, chapitre 3. Propriétés optiques de la matière organique dissoute (MOD) traçage de ses sources et dynamique dans la plaine de la Bassée 20p
- Rouessac, F., Rouessac, A., Cruché, D. (2004) Analyse chimique - 6e éd.: Méthodes et techniques instrumentales modernes
- Schulman, S.G. (1985) Luminescence spectroscopy: An overview. In S.G. Schulman (Ed.), *Molecular Luminescence Spectroscopy – Methods and Applications; Part 1* (pp. 1–28). New York: John Wiley & Sons.
- Stedmon, C.A., Bro, R. (2008) Characterizing dissolved organic matter fluorescence with parallel factor analysis: a tutorial. *Limnology and Oceanography: Methods* 6, 572–579.
- Stedmon, C.A., Cory, R.M. (2014) Biological origins and fate of fluorescent dissolved organic matter. in P Coble, J Lead, A Baker, D Reynolds & RGM Spencer (eds), *Aquatic organic matter fluorescence*. Cambridge University Press, pp. 278-300. Cambridge Environmental Chemistry Series
- Varrault G., Parlanti E., Goffin A., Huguet A., Guillon S., Wang S. (2019) Rapport de synthèse phase VII (2015-2019) programme Piren-Seine – Vol 5, Sources et dynamique de la matière organique dans le bassin de la Seine 142p.
- 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 1.
- Vodacek, A., Blough, N.V., DeGrandpre, M.D., Peltzer, E.T., Nelson, R.K. (1997) Seasonal variation of CDOM and DOC in the Middle Atlantic Bight: terrestrial inputs and photooxidation. *Limnol. Oceanogr.* 42, 674–686.
- Weber, J.H. (1988) Binding and Transport of Metals by Humic Materials. Frimmel F.H., Christman R.F. Eds, *Humic Substances and their Role in the Environment*, Dahlem Workshop Reports, John Wiley & Sons, New York, 165-178.