



HAL
open science

Perfectionnements à la mesure de traceurs fluorescents [Texte imprimé] : applications à l'hydrogéologie

René Charrière

► To cite this version:

René Charrière. Perfectionnements à la mesure de traceurs fluorescents [Texte imprimé] : applications à l'hydrogéologie. Géologie appliquée. Université Scientifique et Médicale de Grenoble, 1974. Français. NNT : . tel-00783386

HAL Id: tel-00783386

<https://theses.hal.science/tel-00783386>

Submitted on 1 Feb 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Doctorat de 3^e cycle
N° d'ordre

DOUBLE

205142

1974

97

205142

1974

97

THESE

présentée

A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir

le titre de Docteur de 3^e Cycle

Spécialité : Géologie Appliquée

Mention : Hydrogéologie

par

René CHARRIERE



PERFECTIONNEMENTS A LA MESURE DE TRACEURS FLUORESCENTS APPLICATIONS A L'HYDROGÉOLOGIE

Soutenu le 18 juin 1974 devant la Commission d'examen

Président	M. R. BARBIER	Professeur
Examineurs :	Mlle J. ALARY	Professeur
	M. J. SARROT-REYNAUD	Professeur - Directeur de thèse
Invité	M. J. MOLINARI	Ingénieur au CENG - Rapporteur

Doctorat de 3^e cycle
N^o d'ordre

205142
1974
97

THESE

présentée

A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

pour obtenir

le titre de Docteur de 3^e Cycle

Spécialité : Géologie Appliquée

Mention : Hydrogéologie

par

René CHARRIERE

BIBLIOTHEQUE
GRENOBLE - SCIENCES
UNIVERSITAIRE



0520358521

PERFECTIONNEMENTS A LA MESURE
DE TRACEURS FLUORESCENTS
APPLICATIONS A L'HYDROGÉOLOGIE

T.74 / 918

Soutenue le 18 juin 1974 devant la Commission d'examen

Président	M. R. BARBIER	Professeur
Examineurs :	Mlle J. ALARY	Professeur
	M. J. SARROT-REYNAUD	Professeur - Directeur de thèse
Invité	M. J. MOLINARI	Ingénieur au CENG - Rapporteur

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été effectué au cours d'un stage de deux années au sein du Groupe d'Application des Traceurs à l'Hydrologie et à l'Industrie (GATHI) du Service d'Application des Radioéléments et des Rayonnements (SARR) du Centre d'Etudes Nucléaires de GRENOBLE, en qualité de stagiaire de longue durée, sous la direction de Monsieur J. MOLINARI.

Monsieur le Professeur J. SARROT-REYNAUD qui a bien voulu me recommander auprès des autorités du C.E.N.G., par sa constante disponibilité, n'a pas cessé de m'encourager et m'a amicalement prodigué, tout au long de ce travail, ses précieux conseils.

Je le prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent, particulièrement, à Monsieur J. MOLINARI - Ingénieur au Commissariat à l'Energie Atomique - qui m'a conseillé tout au long des deux années passées au S.A.R.R.

Pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour la pertinence de ses remarques, pour toute l'attention qu'il m'a consacrée, ne ménageant ni son temps ni son travail, il a permis à ce mémoire de voir le jour.

Je le prie d'accepter l'expression de ma reconnaissance.

Monsieur JUNOD, Ingénieur au C.E.N.G. spécialiste du traitement des données spectrales et Monsieur COROMPT spécialiste au S.A.R.R. du traitement des informations ont bien voulu m'initier à ces techniques, qu'ils en soient, ici, remerciés.

Mademoiselle le Professeur J. ALARY et Monsieur J. ROCHAS, de l'U.E.R. de Pharmacie de GRENOBLE, m'ont fait découvrir certains aspects de la fluorescence au cours de nombreuses discussions constructives et par leurs études sur les séparations physicochimiques de traceurs fluorescents, m'ont stimulé dans mon travail et m'ont permis de mieux connaître le comportement

physicochimique des traceurs fluorescents, je leur exprime ici mes remerciements.

Monsieur J.C. ANDRE, chargé de Recherches au C.N.R.S. à NANCY, a porté un vif intérêt à nos études et s'est attaché à répondre aux nombreuses questions que nous nous posions sur l'interprétation de certains aspects de la fluorescence.

Son étude bibliographique sur la fluorimétrie, ainsi que ses études sur l'extinction de fluorescence -études qu'il a eu l'amabilité d'entreprendre pour faciliter ma tâche- ont constitué des bases précieuses abondamment citées au cours de ce travail.

Je lui exprime ici toute ma reconnaissance.

Que Monsieur B. GAILLARD qui m'a initié aux mesures de fluorescence, et qui avec Messieurs CALMELS, VILLE et MARION m'ont fait participer aux expériences de terrain et à la mise en oeuvre des traceurs en hydrologie, trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur R. BARBIER qui me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Je suis reconnaissant à Messieurs CORNUET et GUIZERIX pour leur généreux et sympathique accueil dans leur laboratoire S.A.R.R. du C.E.N.G.

Je tiens à remercier, enfin, la Direction Départementale de l'Agriculture de l'Isère qui, par sa participation financière à certaines études, a rendu leur réalisation possible.

Que mes parents, qui m'ont toujours encouragé au cours de mes études universitaires, trouvent dans la réalisation de ce travail l'expression de mon humble remerciement.

SOMMAIRE

A.1. INTRODUCTION

- A.1.1. CADRE DE L'ETUDE
- A.1.2. RAPPELS SUR LES DIFFERENTS TRACEURS
FLUORESCENTS UTILISES EN HYDROGEOLOGIE
- A.1.3. OBJET DE L'ETUDE

A 2 RAPPELS THEORIQUES SUR LA PHOTOLUMINESCENCE DES SOLUTIONS

A.2.1. RAPPELS DE SPECTROSCOPIE ELECTRONIQUE

A.2.1.1. INTERACTION DE LA LUMIERE AVEC LE MILIEU

A.2.1.2. DIFFERENTS ETATS D'UN SYSTEME

- a) Moment cinétique d'un électron : spin
- b) Etat d'un système à 2 électrons (exemple de l'atome d'hélium)
- c) Cas d'une molécule
- d) Cas d'un ion

A.2.1.3. SPECTRE D'ABSORPTION

- a) Interactions avec les électrons
- b) Interactions avec l'ensemble des électrons et des noyaux

A.2.2. DIFFUSION DE LA LUMIERE

A.2.2.1. DIFFUSION ELASTIQUE

- a) Effet RAYLEIGH
- b) Effet TYNDALL
- c) Diffusion par les grosses molécules

A.2.2.2. DIFFUSION INELASTIQUE (effet RAMAN)

A.2.3. PHOTO LUMINESCENCE

A.2.3.1. LA FLUORESCENCE

A.2.3.2. LA PHOSPHORESCENCE

A.2.3.3. ENSEMBLE DES PROCESSUS DE PHOTOLUMINESCENCE

A.2.4. PHOTOCHEMIE CINETIQUE

A.2.4.1. DUREE DE VIE D'UN ETAT EXCITE

A.2.4.2. ETUDE DE L'ETAT STATIONNAIRE

- a) Peuplement de l'état excité
- b) Intensité de fluorescence
- c) rendement quantique de fluorescence

A.2.4.3. INHIBITION DE FLUORESCENCE : Droite de STERN-VOLMER

A.2.5. RELATION ENTRE STRUCTURE MOLECULAIRE ET FLUORESCENCE

A.2.5.1. CONDITIONS REQUISES POUR QU'UNE MOLECULE ABSORBE LA LUMIERE

- a) Présence de groupements chromophores
- b) Présence de groupements auxochromes

A.2.5.2. CARACTERES REQUIS POUR QU'UNE MOLECULE SOIT FLUORESCENTE

- a) Présence de nombreux électrons π
- b) structure plane de la molécule

A.2.5.3. ETUDE DE LA STRUCTURE D'UN COLORANT XANTHENIQUE EXEMPLE DE LA SULFORHODAMINE G

- a) Présence de nombreux groupements chromophores
- b) Présence de groupements auxochromes
- c) Rigidité de la molécule.

A3 ETUDE DES DIFFERENTS FACTEURS INFLUANT SUR LA FLUORESCENCE

A.3.1. CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES PHENOMENES D'INTERACTION

A.3.1.1. DIFFERENTES FORMES STRUCTURALES D'UN COLORANT XANTHENIQUE

- a) Formes monomères (exemple de la fluoresceïne)
- b) Formes dimères

A.3.1.2. MECANISMES DE PASSAGE D'UNE FORME STRUCTURALE A UNE AUTRE

- a) Réactions protolytiques
- b) facteurs physiques intervenant sur la réaction protolytique
- c) facteurs chimiques et thermodynamiques intervenant sur la réaction protolytique.

A.3.2. INFLUENCE DES PHENOMENES CHIMIQUES

A.3.2.1. Rôle du potentiel hydrogène (pH)

- a) Domaines d'existence des différentes formes structurales d'un colorant (cas de la fluoresceïne) en fonction du pH.
- b) caractéristiques de fluorescence de chaque forme structurale.
- c) influence du pH sur la durée de vie de l'état émissif et le rendement de fluorescence
- d) influence du pH sur les mesures d'intensité de fluorescence.

A.3.2.2. INFLUENCE DES SELS

A.3.2.3. INFLUENCE DU SOLVANT

- a) Désactivation non radiative
- b) Déplacement des spectres
- c) exaltation de fluorescence

A.3.2.4. INHIBITEURS DE FLUORESCENCE

- a) Expression analytique de l'inhibition de fluorescence
- b) nature des inhibiteurs
- c) inhibition par les halogénures
- d) mesure d'un traceur fluorescent en présence d'ions iodure

A 3.3. INFLUENCE DES PHENOMENES PHOTOCHEMISTIQUES

A.3.3.1. DEGRADATIONS PHOTOCHEMISTIQUES

- a) Aspects théoriques
- b) Données expérimentales

A.3.3.2. PHOTOOXYDATION PAR L'OXYGENE MOLECULAIRE

- a) Aspects théoriques
- b) Données expérimentales

A.3.3.3. PHOTOOXYDATION PAR DES IONS METALLIQUES

A.3.3.4. PHOTOREDUCTION

A.3.4. INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSIQUES

A.3.4.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTANCE FLUORESCENTE

- a) Aspect théorique
- b) Travaux expérimentaux

A.3.4.2. INFLUENCE DE LA VISCOSITE DU SOLVANT

- a) Influence sur la fluorescence en absence d'inhibiteurs
- b) Influence sur l'extinction

A.3.4.3. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

- a) Considérations théoriques
- b) Influence de la viscosité
- c) Travaux expérimentaux

A.3.5. PANORAMA RECAPITULATIF DES PHENOMENES INFLUANT SUR LA FLUORESCENCE

A.3.5.1. LES TROIS GRANDES CLASSES DE MECANISMES INFLUANT SUR LA FLUORESCENCE DES SOLUTIONS

A.3.5.2. FACTEURS PROVOQUANT DES MODIFICATIONS STRUCTURALES DU PRODUIT FLUORESCENT

A.3.5.3. FACTEURS PROVOQUANT LE DEPLACEMENT ET L'ALTERATION DES SPECTRES

A.3.5.4. FACTEURS MODIFIANT LE RENDEMENT QUANTIQUE DE FLUORESCENCE

- a) Facteurs favorisant les processus de désactivation
- b) Facteurs entravant l'action des facteurs précédents.

A 4 OPTIMISATION DES MESURES DE FLUORESCENCE

A.4.1. RAPPELS SUR LES MESURES DE FLUORESCENCE

A.4.1.1. PRINCIPE DE LA MESURE

- a) Colorimétrie et fluorescence
- b) Absorptiométrie : loi de BEER - LAMBERT
- c) cas des faibles concentrations : relation entre intensité de fluorescence et concentration.

A.4.1.2. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN APPAREIL DE FLUORESCENCE

- a) Schéma optique
- b) géométrie de la cellule de mesure

A.4.1.3. SPECTROMETRIE OPTIQUE

- a) Spectre d'excitation et d'absorption
- b) Spectre d'émission ou de fluorescence
- c) Phénomènes parasites

A.4.1.4. DESCRIPTION SOMMAIRE ET FONCTIONNEMENT DU FLUORIMETRE UTILISE

- a) Les différents éléments
- b) Fonctionnement de l'appareil
- § § x x c) Influences extérieures
- d) Mise en oeuvre

A.4.1.5. DESCRIPTION SOMMAIRE ET FONCTIONNEMENT DU SPECTRO-FLUORIMETRE

- a) Les différents constituants
- b) principe de fonctionnement

A.4.2. PROBLEME DE LA FLUORESCENCE DU BLANC

A.4.2.1. LUMIERE DIFFUSEE RAYLEIGH - TYNDALL

- a) Influence de la longueur d'onde
- b) Influence de la matrice
- c) Influence de la turbidité
- d) Influence de la cuvette de mesure
- e) conclusions.

A.4.2.2. DIFFUSION RAMAN

- a) Raies RAMAN de l'eau
- b) Intensité et position du spectre RAMAN de l'eau en fonction de la longueur d'onde de la lumière excitatrice
- c) Conclusion.

A.4.3. PROBLEME DE LA SELECTION DES LONGUEURS D'ONDE

A.4.3.1. LES FILTRES COLORES

- a) Les filtres passe bande
- b) Les filtres passe haut
- c) Les filtres atténuateurs

A.4.3.2. LES FILTRES INTERFERENTIELS

A.4.3.3. CHOIX DES COMBINAISONS DE FILTRES

- a) Cas des filtres colorés
- b) cas des filtres interférentiels
- c) Comparaison des caractéristiques des différentes catégories de filtres
- d) Conclusion.

A.4.3.4. LES MONOCHROMATEURS A RESEAUX

- a) Généralités sur les réseaux
- b) Elimination des phénomènes de diffraction d'ordre supérieur à 1.
- c) Caractéristiques des réseaux équipant le spectrofluorimètre TURNER 430

A.4.4. COMPARAISON DES PERFORMANCES RESPECTIVES DES FLUORIMETRES ET SPECTROFLUORIMETRES.

A.4.4.1. LES SOURCES DE LUMIERE

- a) fluorimètre
- b) spectrofluorimètre

A.4.4.2. SENSIBILITES DE MESURE

- a) Concentrations minimales détectables sur le fluorimètre "TURNER"
- b) Comparaison entre les sensibilités maximales de mesure de fluorimètres équipés de filtres colorés et de filtres interférentiels

A.4.4.3. SELECTIVITE

A.4.5. COMPARAISON DE TROIS SPECTROFLUORIMETRES

A.4.5.1. CARACTERISTIQUES COMPAREES DES SPECTRES DE TRACEURS FLUORESCENTS OBTENUES PAR LES DIFFERENTS APPAREILS

A.4.5.2. POSITION RELATIVE DES PICS D'EXCITATION ET D'EMISSION PAR RAPPORT A LEUR POSITION THEORIQUE

A.4.5.3. CONCLUSION

A.4.6. CONCLUSION

A.5. DISCRIMINATION SIMULTANEE DE PLUSIEURS TRACEURS FLUORESCENTS

A.5.1. POSITION DU PROBLEME

A.5.2. METHODE DE DISCRIMINATION SPECTROFLUORIMETRIQUE DITE "DU PAS CONSTANT" ET ESSAIS D'AMELIORATION

A.5.2.1. PRINCIPES ET AVANTAGES DE LA METHODE

A.5.2.2. LIMITES DE DISCRIMINATION

- a) Discrimination Uranine - Rhodamine
- b) Discrimination Uranine - Sulforhodamine G
- c) Discrimination Sulforhodamine G - Rhodamine B ou WT

A.5.2.3. ESSAI D'OPTIMISATION DU "PAS" DE LA METHODE DU "PAS CONSTANT" (CAS D'UN MELANGE DE RHODAMINE WT ET DE SULFORHODAMINE G)

- a) Objectif
- b) Résumé des essais effectués
- c) Résultats

A.5.2.4. APPLICATION A LA METHODE DU "PAS CONSTANT" DES TECHNIQUES D'ANALYSE D'UN SPECTRE COMPLEXE PAR LA METHODE DES MOINDRES CARRÉS

- a) Principe de la méthode : analyse d'un spectre complexe par la méthode des moindres carrés
- b) Mise en oeuvre de la méthode
- c) Cas de la discrimination Sulforhodamine G - Rhodamine WT
- d) Essais de discrimination Rhodamine WT - Uranine pour le cas de concentrations très différentes des deux produits présents
- e) Conclusions

A.5.3. METHODE DE DISCRIMINATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET ANALYSE SPECTROFLUORIMETRIQUE

A.5.3.1. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

A.5.3.2. MISE EN OEUVRE DE LA METHODE

- a) Mise au point du solvant
- b) Support

A.5.3.3. RESULTATS OBTENUS

- a) Analyse qualitative
- b) Analyse quantitative
- c) Inconvénients de la chromatographie sur couche mince

A.5.4. METHODE DE DISCRIMINATION PAR SEPARATION CHIMIQUE ET ANALYSE SPECTROFLUORIMETRIQUE

A.5.4.1. ASPECT CHIMIQUE DU PROBLEME

A.5.4.2. PROCEDE DE SEPARATION

A.5.4.3. RESULTATS OBTENUS

- a) Séparation et analyse spectrofluorimétrique d'un mélange
Rhodamine WT - SULFORHODAMINE G
- b) Séparation et analyse spectrofluorimétrique d'un mélange
Rhodamine B - Sulforhodamine G

A.5.5. CONCLUSION SUR LES PROCEDES DE DISCRIMINATION DES TRACEURS FLUORESCENTS

B.1. METHODOLOGIE ET CHOIX DES TRACEURS FLUORESCENTS EN HYDROGEOLOGIE

B.1.1. RAPPELS SUR LA METHODE DES TRACEURS

B.1.1.1. DISTRIBUTION DES TEMPS DE SEJOUR

- a) Définition
- b) Mode d'obtention

B.1.1.2. EXPLOITATION DES DISTRIBUTIONS DES TEMPS DE SEJOUR (D.T.S.)

- a) Informations fournies par les D.T.S.
- b) Relations analytiques entre l'entrée et la sortie d'un système
- c) Modèles mathématiques d'écoulement

B.1.2. PRATIQUE DE LA MESURE

B.1.2.1. ETALONNAGE

B.1.2.2. MESURES

- a) "In situ"
- b) En Laboratoire

B.1.3. CHOIX D'UN TRACEUR FLUORESCENT EN HYDROGEOLOGIE

B.1.3.1. HYDROLOGIE DE SURFACE

B.1.3.2. MILIEU KARSTIQUE

B.1.3.3. HYDROLOGIE SOUTERRAINE

B.1.4. LES ESSAIS EFFECTUES SUR LE TERRAIN

B.2. HYDROLOGIE DE SURFACE

B.2.1. CADRE DE L'ETUDE

B.2.1.1. OBJECTIF DES ESSAIS

B.2.1.2. PRESENTATION GEOGRAPHIQUE ET GEOLOGIQUE

B.2.1.3. SITUATION DES SECTIONS DE MESURES

B.2.2. PRINCIPE ET MODE OPERATOIRE

B.2.2.1. JAUGEAGE PAR DILUTION

B.2.2.2. OBTENTION DES D.T.S.

a) Injection multipoints

b) Mesures en continu et prélèvements d'échantillons

B.2.3. ESSAIS EFFECTUES

B.2.4. COMMENTAIRES SUR LES RESULTATS OBTENUS

B.3. HYDROGEOLOGIE KARSTIQUE

B.3.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

B.3.2. SITUATION GEOGRAPHIQUE ET GEOLOGIQUE

B.3.2.1. COUPES GEOLOGIQUES ET CARTE DE LA REGION DE VILLARD DE LANS

B.3.2.2. SITUATION DES POINTS D'INJECTIONS

- a) Le vallon de LA FAUGE
- b) La doline des CLOTS

B.3.2.3. SITUATION DES POINTS DE PRELEVEMENTS

- a) Point N° 1 : FONT DU RENARD
- b) Point N° 2 : FONTAINE AYMARD
- c) Point N° 3 : FONT DE LA MAIE
- d) LES POUTEILS
- e) Point N° 4 : GOULE BLANCHE

B.3.3. CONDITIONS DE DEROULEMENT DES ESSAIS

B.3.3.1. Opérations d'injections

B.3.3.2. Opérations de prélèvements

B.3.3.3. Conditions hydrodynamiques

B.3.4. MESURES

B.3.4.1. Détermination de la distribution des temps de séjour (D.T.S.)

B.3.4.2. Etablissement d'un bilan de restitution

B.3.5. RESULTATS

B.3.6. CONCLUSIONS

B.5. ETUDE DU TRANSIT VERTICAL EN MILIEU NON SATURE

B.5.1. CADRE DE L'ETUDE

B.5.1.1. OBJECTIF

B.5.2.2. SITUATION ET AMENAGEMENT DU SITE

B.5.2.3. CHOIX DES TRACEURS UTILISES

B.5.2. DEROULEMENT DES ESSAIS

B.5.2.1. TRANSFERT VERTICAL EN TERRAIN IMPREGNE A TRAVERS LA COUCHE D'ARGILE

B.5.2.2. TRANSFERT VERTICAL EN TERRAIN IMPREGNE SOUS LA COUCHE D'ARGILE

B.5.3. RESULTATS OBTENUS ET CONCLUSION DE L'ESSAI

B.5.4. CONCLUSIONS

B.4. HYDROLOGIE EN MILIEU SATURE

B.4.1. CADRE DE L'ETUDE

B.4.1.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

B.4.1.2. DESCRIPTION DU SITE

a) Présentation géographique et géologique

b) Situation des points d'injection

c) Situation des points d'observation

B.4.2. CONDITIONS DE DEROULEMENT DES ESSAIS

B.4.2.1. OPERATIONS D'INJECTIONS

B.4.2.2. OPERATIONS DE PRELEVEMENTS

B.4.2.3. CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES

B.4.3. RESULTATS DES ESSAIS

B.4.4. CONCLUSIONS

LISTE DES FIGURES

PREMIERE PARTIE

- FIGURE A1 Différents état énergétiques d'un système à deux électrons (d'après ANDRE et BOUCHY A5)
- FIGURE A2 Niveaux d'énergie relatifs d'un système élémentaire à deux électrons (d'après ANDRE et BOUCHY A5)
- FIGURE A3 Niveaux d'énergie de rotation et de vibration d'un système élémentaire à deux électrons (d'après ANDRE et BOUCHY A5)
- FIGURE A4 Variation des niveaux d'énergie avec la distance interatomique et spectres d'absorption et de fluorescence (d'après ANDRE et BOUCHY A5)
- FIGURE A5 Effet RAYLEIGH : diffusion de la lumière par des particules sphériques (d'après PARKER A7)
- FIGURE A6 Effet TYNDALL : diffusion de la lumière par des particules non sphériques (d'après PARKER A7)
- FIGURE A7 Excitation, fluorescence, phosphorescence et transitions non radiatives (d'après PARKER A7)
- FIGURE A8 Influence de la structure de la molécule sur la fluorescence (d'après PARKER A7)
- FIGURE A9 Formes structurales de la fluoresceine (d'après ZANKER et PETER cité par ANDRE A14)
- FIGURE A10 Bandes d'absorption de la forme monomère (M) et de la forme dimère (D_1 et D_2) de la fluoresceine en solution alcaline aqueuse (d'après LAVOREL, ² cité par ANDRE A14)
- FIGURE A11 Diagramme énergétique d'une réaction protolytique (d'après FORSTER cité par ANDRE A14)
- FIGURE A12 Détermination graphique des valeurs du PK de l'équilibre de dissociation pour les différentes formes de la fluoresceine (d'après LINQVIST cité par ANDRE A14)
- FIGURE A13 Spectres d'absorption et d'émission de la fluoresceine à différents pH (d'après ROZWADOWSKI, cité par ANDRE A14)
- FIGURE A14 Durée de vie τ de l'état émissif en fonction du pH (d'après ROZWADOWSKI cité par ANDRE A14)
- FIGURE A15 Rendement de fluorescence en fonction du pH (d'après ROZWADOWSKI cité par ANDRE A14)
- FIGURE A16 Variation du signal de fluorescence en fonction du pH pour la Rhodamine la Sulforhodamine B (Pontacyl Pink B) et la fluoresceine (d'après FEUERSTEIN et SELLECK A4)

- FIGURE A17 Variation du signal de fluorescence en fonction du pH pour la Rhodamine WT (d'après SIVERTS A18 et MOSER A19)
- FIGURE A18 Variation du signal de fluorescence en fonction du pH pour la Sulforhodamine G (d'après LACHENAL et DESCELEE A16)
- FIGURE A19 Extinction de la fluorescence de la Rhodamine B et de l'Uranine par les ions chlorures, bromures, et iodures (d'après LUCATU cité par GRABZAK A20)
- FIGURE A20 Diagramme d'une transition intersystème favorisée par une augmentation de température (d'après GUILBAULT A11)
- FIGURE A21 Schéma optique d'un appareil de fluorescence (d'après A23)
- FIGURE A22 Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentrations pour 3 géométries de cellule données (d'après GUILBAULT A11)
- FIGURE A23 Schéma optique du fluorimètre "Turner 111" (d'après SCHOULER A17)
- FIGURE A24 Schéma de fonctionnement du fluorimètre "Turner 111" (d'après SCHOULER A17)
- FIGURE A25 Schéma simplifié du spectrofluorimètre "Turner 430" (d'après A23)
- FIGURE A26 Variation de l'intensité de la lumière diffusée par de l'eau bidistillée en fonction de la longueur d'onde d'excitation
- FIGURE A27 Intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde pour quatre matrices d'eaux naturelles
- FIGURE A28 Intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde pour 2 saumures de concentration différente
- FIGURE A29 Intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde pour des solutions de sulfate d'alumine de concentrations différentes
- FIGURE A30 Effet RAYLEIGH et Effet TYNDALL en fonction de la concentration en sulfate d'alumine
- FIGURE A31 Intensité de la lumière diffusée pour des suspensions de bentonite de "concentrations" comprises entre 10^{-1} g/l et $9 \cdot 10^{-1}$ g/l
- FIGURE A32 Proportionnalité de l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la "concentration" en bentonite pour une longueur d'onde donnée
- FIGURE A33 Influence de la nature des cuvettes de mesure sur l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde
- FIGURE A34 Exemple de spectre RAMAN de l'eau pour une longueur d'onde d'excitation de 370 nm
- FIGURE A35 Evolution en fonction de la longueur d'onde d'excitation de la différence $\Delta \lambda$ entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde du pic RAMAN

- FIGURE A36 Variation de l'intensité du pic RAMAN de l'eau en fonction de la longueur d'onde d'excitation
- FIGURE A37 Spectres d'excitation des principaux traceurs fluorescents
- FIGURE A38 Spectres de transmission des filtres primaires pour les rhodamines
- FIGURE A39 Spectres de transmission des filtres primaires pour l'uranine
- FIGURE A40 Spectres d'émission des principaux traceurs fluorescents
- FIGURE A41 Spectres de transmission des filtres secondaires pour les Rhodamines
- FIGURE A42 Spectres de transmission des filtres secondaires pour l'Uranine
- FIGURE A43a et A43b Exemples de spectres normés en amplitude pour l'étude comparée de trois spectrofluorimètres
- FIGURE A44 Détection spectrofluorimétrique d'Uranine et de Rhodamine B, à concentrations différentes (respectivement $2 \cdot 10^{-11}$ et 10^{-8}) dans la même solution. Enregistrement au PERKIN-ELMER 203, excitation à 25 nm en dessous de la longueur d'onde d'analyse (d'après BEHRENS A25)
- X FIGURE A45 Spectres à "pas constant" effectués pour différentes longueurs de pas $\Delta\lambda$, d'un mélange de sulforhodamine G et de rhodamine Wt à des concentrations respectives de $1,4 \cdot 10^{-8}$ et $8,6 \cdot 10^{-8}$ kg/l) (les valeurs indiquées en abscisses sont respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission)
- FIGURE A46 Etude des "spectres combinés" de la rhodamine Wt et de la sulforhodamine G obtenus par la méthode du pas constant pour des pas ($\Delta\lambda$) variant entre 20 et 30 nanomètres. On notera que le réglage en amplification des signaux était différent pour l'une et l'autre série de mesures. Il importe par conséquent de préciser ici que les sensibilités de détection de la sulforhodamine G et de la rhodamine Wt sont dans un rapport variant de 7 à 45 pour des concentrations variant de 10^{-7} à 10^{-9} (cf figure A48)
- FIGURE A48 Série de spectres étalon d'uranine à des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-9} (courbes normées en surface)
- FIGURE A49 Exemple de spectres (relevés à la table de lecture) de deux étalons de rhodamine Wt et de sulforhodamine G à même concentration (10^{-7} kg/l) et d'un mélange binaire de deux traceurs, la concentration en RhWt étant cette fois 5 fois supérieure à celle de la sulforhodamine G
- FIGURE A50 Tableau récapitulatif des essais de discrimination de rhodamine Wt et de sulforhodamine G dans 22 mélanges binaires
- FIGURE A51 Exemple de spectres (relevés à la table de lecture) de deux étalons d'uranine et de rhodamine Wt ainsi que de trois mélanges binaires de ces deux traceurs (courbes normées en surface).

FIGURE A52

Etude de la séparation par chromatographie sur couche mince de Rhodamine Wt et de Sulforhodamine G en solution

- 1A (cercles noirs - trait continu) Etalonnage d'une solution de RhWt ayant subi la chromatographie
- 1B (cercles blancs - trait interrompu) Résultat de mesure de RhWt extraite par chromatographie du mélange binaire isoconcentration
- 2A (triangles noirs - trait continu) Etalonnage d'une solution de sulforhodamine G ayant subi la chromatographie
- 2B (triangles blancs - trait interrompu) Résultat de mesure de sulforhodamine G extraite par chromatographie du mélange binaire isoconcentration

FIGURE A53

Etude de la séparation par voie chimique et extraction liquide-liquide d'un mélange de rhodamine Wt et de sulforhodamine G

- 1A (cercles noirs - trait continu) Etalonnage d'une solution chloroformique de rhodamine Wt ayant subi le traitement
- 1B (cercles blancs - trait interrompu) Résultat de mesure de Rh.Wt en solution chloroformique extraite du mélange binaire isoconcentration
- 2A (triangles noirs - trait continu) Etalonnage d'une solution aqueuse de sulforhodamine G ayant subi le traitement
- 2B (triangles blancs - trait discontinu) Résultat de mesure de sulforhodamine G dans le résidu aqueux du mélange binaire isoconcentration
- 3 (carrés blancs - trait discontinu long) Résultat de mesure de Rhodamine Wt dans le résidu aqueux de la solution chloroformique 1B

FIGURE A54

Etude de la séparation par voie chimique et extraction liquide-liquide d'un mélange de Rhodamine B et de Sulforhodamine G

L'identification des graphes est identique à celle de la figure A53 à la substitution près de la Rhodamine B à la Rhodamine Wt.

- FIGURE B19 Courbe de restitution de la Rhodamine Wt et courbe de débit à GOULE BLANCHE
- FIGURE B20a Exemple pour la Rhodamine Wt de l'intégration des produits élémentaires $q \cdot c \cdot dt$ effectuée à la machine
- FIGURE B20b Planche synoptique des essais
- FIGURE B22 Carte géologique de la région de FRECHENCOURT
- FIGURE B23 Situation des points d'injection et de prélèvements du site de FRECHENCOURT
- FIGURE B24 Coupe géologique du site de FRECHENCOURT
- X FIGURE B25 Courbes de restitution en Rhodamine Wt et en Uranine lors de la coloration de FRECHENCOURT
- FIGURE B21 Bassin versant de l'HALLUE
- FIGURE B26 Log de forage et croquis de l'expérience du site de VAULX EN VELIN
- FIGURE B27 Courbes de restitution en Rhodamine Wt et Uranine sur le site de VAULX EN VELIN

DEUXIEME PARTIE

- FIGURE B1 Schéma d'obtention de la distribution des temps de séjour (D.T.S.) d'un système (d'après MOLINARI [B1])
- FIGURE B2 Marquage homogène, par "injections multipoints" d'une tranche élémentaire d'écoulement dans un cours d'eau. La quantité de traceur injectée dans chaque élément de section doit être proportionnelle au débit local.
Les vitesses moyennes locales sont généralement obtenues directement par intégration du champ des vitesses, en déplaçant à vitesse constante le moulinet sur la verticale de mesure (d'après MOLINARI [B1])
- FIGURE B3 Bassin versant de la DIEGE (carte de situation)
- FIGURE B4 Schéma géologique du bassin versant de la DIEGE
- FIGURE B5 Réduction de la carte topographique au 1/25000° montrant l'implantation des points de mesures
- FIGURE B6 Profil en long du cours supérieur de la DIEGE avec le repérage hectométrique des stations de mesure
- FIGURE B7 D.T.S. en cascade obtenues pour le point d'injection I et aux
et B8 deux sections de mesures (9) et (12)
- FIGURE B9 Evolution des réponses impulsionnelles correspondant aux trois sections de mesure : "Pont de Sornac" (I) "Pont de St GERMAIN LAVOLPS" (12) et "Pont de CONFOLENS" en fonction de la distance
- FIGURE B10 D.T.S. pour des débits différents sur le bief expérimental :
"Pont de CONFOLENS" - "Pont du LOUBEIX"
- FIGURE B11 D.T.S. pour des débits différents sur le bief expérimental
"Pont de CONFOLENS" - "PONT DU LOUBEIX" représentées en temps réduit
- FIGURE B12 Variation des réponses impulsionnelles en fonction du débit sur la DIEGE
- FIGURE B13 Carte géologique au 1/50000° de la région de Villard de Lans et situation des points d'injection
- FIGURE B14 Coupe géologique LA FAUGE - GOULE BLANCHE
- FIGURE B15 Schéma des scialets d'injection de LA FAUGE
- FIGURE B16 Coupe géologique LES CLOTS - FONTAINE DU RENARD
- FIGURE B18 Courbe de restitution de l'Uranine et courbe de débit à GOULE BLANCHE

1^{ERE} P A R T I E

PERFECTIONNEMENT A LA MESURE DE TRACEURS FLUORESCENTS

A.1. INTRODUCTION

A.1.1. CADRE DE L'ETUDE

L'emploi de traceurs en hydrologie est demeuré jusqu'à ces dernières années l'apanage du spéléologue. Cette technique était réservée à des essais de corrélation dans des circulations karstiques ; elle résidait dans l'injection dans la perte d'une rivière souterraine, d'une substance fortement colorée, et la surveillance de la, ou les résurgences présumées, dans le but de prouver une éventuelle communication facilitant la reconnaissance du réseau karstique étudié.

Les quantités de colorant employées étaient toujours considérables car la détection se faisait le plus souvent visuellement. Le traceur utilisé était la "fluoresceine", dont les remarquables performances avaient rapidement imposé l'emploi.

Depuis, de nouveaux traceurs sont apparus, à la faveur notamment des mesures de débit par dilution, mesures dont l'essor est relativement récent. A cette importante application en hydrométrie se sont ajoutées de nouvelles applications dans des domaines extrêmement divers. Ainsi en hydrogéologie, l'emploi des traceurs s'est révélé fructueux pour résoudre des problèmes aussi variés que la détermination de la perméabilité d'un aquifère, le mode de transit de l'eau dans le sol, la délimitation de périmètres de protection pour des captages ou des pompages. En Génie Civil, les traceurs peuvent également jouer un rôle important, pour mettre en évidence par exemple des zones de fuites dans des retenues, des barrages ou des canaux.

Les exigences de l'hydrogéologie ont conduit le praticien à rechercher des substances traçantes ayant de bonnes performances, détectables avec une grande sensibilité et une bonne précision.

Il faut, ici, faire remarquer que le problème du marquage achoppe sur un paradoxe : l'identification d'une substance ne peut être obtenue que par le biais d'un "marqueur", indicateur ou encore traceur, de nature nécessairement différente de la substance à étudier : substance et indicateur pouvant avoir des comportements physico-chimiques ou même hydrodynamiques différents.

En hydrologie, toutes les techniques de marquage postulent que le traceur reflète fidèlement, au cours de son transit, le comportement de la phase liquide, l'eau, qu'il représente. En fait, cette hypothèse est difficile à admettre en raison des multiples interactions mutuelles susceptibles de se produire entre le traceur, la phase marquée et le milieu [A1].

Le traceur idéal est bien évidemment celui qui serait capable de marquer les molécules elles-mêmes de la phase en mouvement. Cette possibilité est offerte par les traceurs isotopiques, et, dans le cas de l'eau, par les variétés isotopiques de la molécule d'eau, marquées par des isotopes de l'oxygène ou de l'hydrogène.

On montre en fait que seul le tritium est susceptible d'être utilisé comme traceur artificiel [A1]. Des raisons non seulement financières mais surtout scientifiques font que, jusqu'à présent, on a préféré proscrire l'emploi de ce traceur dont on étudie par ailleurs les fluctuations naturelles dans le cycle hydrogéologique, dans le cadre d'études d'environnement.

L'emploi des variétés isotopiques de l'eau, qualifiées par MOLINARI [A1] de *traceurs intrinsèques*, étant ainsi exclu, la recherche de nouveaux traceurs ne peut déboucher que sur des compromis entre différentes contraintes où interviennent à la fois, les qualités du traceur, son coût, sa sensibilité de détection, sa toxicité, etc. ...

Les traceurs dont l'emploi a été le plus développé sont :

- les traceurs salins, mesurés par voie chimique, activable ou radioactive
- les traceurs fluorescents.

Ces traceurs fluorescents se distinguent particulièrement par leur faible coût, leur sensibilité de détection considérable et surtout leur facilité de mesure, notamment "in situ".

L'intérêt des traceurs fluorescents, ainsi que les problèmes que leur emploi pose ont été récemment exposés par MOLINARI (in [A14]) :

"Depuis de nombreuses années, le Service des Applications des Radioéléments et des Rayonnements (anciennement : Section d'Applications des Radioéléments) a développé au sein de son groupe d'hydrologie les techniques de marquage et d'identification, et a progressivement étendu sa compétence des radio-traceurs à tous les autres traceurs, notamment les traceurs fluorescents".

"L'intérêt particulier que le SARR porte à ces traceurs est d'autant plus vif qu'à la fluorescéine, si familière aux hydrogéologues, et à la Rhodamine B, d'un usage maintenant répandu, viennent s'adjoindre d'autres colorants de performances analogues ou même supérieures.

Outre la promotion de tous ces colorants, le laboratoire s'est donné pour objectif d'améliorer leurs techniques de mesure. Les innovations qui ont résulté de ces travaux ont, d'ores et déjà, profondément renouvelé l'utilisation des traceurs en hydrologie. En effet, l'emploi de colorants plus adéquats, mieux compatibles avec le milieu, décelés par fluorimétrie avec une sensibilité infiniment supérieure à celle qu'offrait la simple colorimétrie, ont autorisé l'étude des modalités de transit de l'eau sur des distances et pour des flux considérables, en hydrologie de surface, en hydrogéologie karstique et même en hydrogéologie souterraine".

"Ces progrès ont suscité de nouveaux besoins, ainsi l'importance et l'ampleur des études que ces techniques permettaient d'aborder, incitaient à entreprendre, sur chaque site et au cours d'une même campagne d'études, plusieurs opérations de marquage différentes.

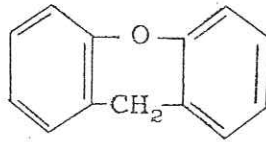
Pour ce faire, il fallait disposer de traceurs compatibles entre eux et suffisamment distincts pour être mesurés conjointement avec la précision requise. Dans certains cas particuliers, des contraintes technologiques réduisaient à mettre en oeuvre ces mêmes traceurs dans des milieux perturbateurs ou agressifs.

Ainsi, certains des essais du SARR avaient conduits à associer, aux traceurs fluorescents, de l'iodure de sodium, traceur anionique auquel ce Service a très fréquemment recours ; d'autres essais ont contraints le SARR à associer aux mêmes traceurs fluorescents, des saumures à haute concentration.

Dans toutes ces circonstances, l'interprétation quantitative des résultats expérimentaux a été jusqu'alors obéré par une certaine méconnaissance des phénomènes physicochimiques d'extinction de fluorescence invoquée de façon fragmentaire et éparse dans la documentation technique".

A.1.2. RAPPELS SUR LES DIFFERENTS TRACEURS FLUORESCENTS UTILISES EN HYDROGEOLOGIE [A2]

Les seuls traceurs fluorescents couramment utilisés en hydrologie appartiennent tous à la famille des colorants dits Xanthéniques dérivant du Xanthène de formule



Les caractéristiques physico-chimiques des plus importants de ces colorants, notamment l'Uranine (fluoresceine hydraulique), la Rhodamine B, la Rhodamine Wt, la sulforhodamine B et la Sulforhodamine G, sont précisées dans le Tableau de la page 5.

Ces traceurs, dont la gamme sera vraisemblablement complétée dans les années à venir par d'autres traceurs de performances analogues, présentent la propriété remarquable de pouvoir être décelés *en continu*, et à des *concentrations extrêmement faibles*, de l'ordre de 10^{-11} , performances inégalées dans le domaine des traceurs conventionnels [A2]. Les propriétés comparées de ces traceurs seront examinées dans le chapitre B.1. .

A.1.3. OBJET DE L'ETUDE

La présente étude a pour objet le perfectionnement des techniques de mesure des traceurs fluorescents dans leurs applications à des problèmes hydrogéologiques. Elle a été effectuée au SARR du CENG, peu de temps après la mise en service dans ce laboratoire d'un spectrofluorimètre, appareil permettant une analyse quantitative plus fine et plus sélective de ces différents traceurs fluorescents.

L'intérêt d'un tel appareil par rapport aux fluorimètres classiques est de permettre une identification du traceur caractérisé par son spectre de fluorescence. Il est ainsi possible, aux très faibles concentrations et dans le cas de "bruits de fond" élevés, d'avoir la certitude que le signal

CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRINCIPAUX TRACEURS FLUORESCENTS

REFERENCE COLOUR INDEX	CI 45 350 Acid Yellow 73	CI 45 170 Basic Violet 10	CI 45 100 Acid Red 52	CI 45 220 Acid Red 50	
NON COMMERCIAL	URANINE Fluoresceine sodique Fluoresceine hydraulique	RHODAMINE B	SULPHORHODAMINE B Pentacyl-Brilliant-Pink B (Réf. 2) Rose sulfacide brillant 3B (Réf. 3)	SULPHORHODAMINE G	RHODAMINE WT
DESIGNATION CHIMIQUE	Sodium-résorcinol-phthaléine	NNNN Tetraéthylrhodamine-chlorhydrate	Disodium 3,6 - Tetraéthylrhodamine-9-phényl-Xanthylum-2,7-Sulfonate		9- (2,4 dicarboxyphényl) - 6 (diéthylamine) - 30- xanthine 1 ylidène diéthyl asenium chlorid.
FORMULE DEVELOPPEE	<p><u>FLUORESCÉINE</u></p> <p><u>URANINE</u></p>				
FORMULE	$C_{20} H_{10} O_5 Na_2$	$C_{28} H_{31} O_3 N_2 Cl$	$C_{27} H_{30} O_7 N_2 S_2 Na_2$	$C_{29} H_{33} O_7 N_2 S_2 Na_2$	$C_{29} H_{29} O_5 N_2 Na_2 C^+$
POIDS MOLECULAIRE	376,15	479,02	604,67	631	566,5
POIDS IONIQUE	anion	cation	anion	anion	anion
FORME COMMERCIALE	Poudre Solution aqueuse	Poudre Solution acétique	Poudre	poudre	solution sodique
LONGUEUR D'ONDE D'ABSORPTION MAXIMALE LABORATOIRE (nm)	491 (Jaune vert)	554 (rouge)	562 (rouge violet)	530	554
LONGUEUR D'ONDE DE FLUORESCENCE MAXIMALE	514 (vert)	576 (orange)	572 (orange)	560	572

fluorescent est bien le fait du traceur employé et non pas une fluorescence parasite due à la matrice.

Si la mesure de traceurs fluorescents a fait d'énormes progrès, il n'en demeure pas moins vrai que des problèmes complexes sont encore mal élucidés. Beaucoup de phénomènes intervenant dans les mécanismes mêmes de la fluorescence interfèrent sur la mesure. Il nous a semblé nécessaire, dans une première partie, d'étudier après des rappels théoriques, les principaux facteurs intervenant sur la fluorescence des solutions de matières colorantes pour en dégager des conditions optimales de mesure. Nous avons aussi, dans cette même première partie, abordé l'important problème de la discrimination et de la mesure simultanée de plusieurs traceurs fluorescents.

Les techniques faisant intervenir des traceurs fluorescents, bien qu'ayant considérablement évolué, restent encore cependant d'une utilisation limitée. Ceci est souvent dû à une certaine méconnaissance des services qu'elles peuvent rendre, tout particulièrement dans les domaines de l'hydrogéologie et du Génie Civil.

Aussi s'est-on proposé, dans la seconde partie de notre étude, d'illustrer par de nombreux exemples de mise en oeuvre, les possibilités des traceurs fluorescents en hydrologie et surtout dans le domaine de l'hydrogéologie.

A.2. RAPPELS THEORIQUES SUR LA PHOTOLUMINESCENCE DES SOLUTIONS

Certaines substances, soumises à l'action d'un rayonnement lumineux, émettent des radiations lumineuses dont la longueur d'onde, caractéristique de la substance, est différente de la longueur d'onde de la lumière excitatrice. Ce phénomène est appelé photoluminescence .

Parallèlement à cet effet vont intervenir d'autres phénomènes accompagnateurs et nous serons ainsi amenés à étudier successivement, outre la luminescence qui comprend la fluorescence et la phosphorescence,

- la diffusion
- des processus non radiatifs entrant en compétition avec la photoluminescence .

Enfin, dans un dernier paragraphe nous essaierons de montrer l'incidence de la structure moléculaire sur la fluorescence.

A.2.1. RAPPELS DE SPECTROSCOPIE ELECTRONIQUE

A.2.1.1. INTERACTION DE LA LUMIERE AVEC LE MILIEU

Pour rendre compte de toute interaction, la lumière doit être interprétée à la fois comme un phénomène ondulatoire et corpusculaire. La lumière est caractérisée par une longueur d'onde λ et une fréquence ν reliées par l'équation :

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

où c est la vitesse de la lumière dans le vide, soit $3 \cdot 10^{10}$ cm/s .

Quand un faisceau lumineux irradie un milieu, deux types d'événements peuvent se produire :

- traversée sans absorption
- absorption partielle ou totale,

Dans ce dernier cas, l'énergie lumineuse est transférée au milieu par un processus d'absorption.

Cette absorption d'énergie doit avoir lieu par unités entières appelées quanta de telle sorte que la relation :

$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{soit vérifiée}$$

où h est la constante de PLANCK : avec $h = 6,62 \cdot 10^{-27}$ erg.sec.

A.2.1.2. DIFFERENTS ETATS D'UN SYSTEME

a) Moment cinétique d'un électron : spin [A5]

Les principes de la spectroscopie et de la mécanique quantique établissent que, dans un système, les niveaux d'énergie diffèrent par leurs états électroniques et, on a vu en A.2.1.1., que le passage d'un niveau d'énergie à un autre pouvait se faire par émission ou par absorption d'un photon associé à une onde dont la fréquence satisfait la relation de BOHR :

$$E_2 - E_1 = h\nu$$

Or, l'électron, qui est le principal vecteur de ce transfert d'énergie, est animé d'un mouvement de rotation sur lui-même. Le moment cinétique de son mouvement de rotation est appelé *spin*.

La projection de ce vecteur sur un axe est quantifiée et ne peut prendre que deux valeurs = $+\hbar/2$ et $-\hbar/2$, traduisant deux états de spin distincts. Ils seront caractérisés par un nombre quantique de spin σ de valeur $+1/2$ et $-1/2$ respectivement.

"Lorsque le système comporte plusieurs électrons, comme c'est le cas pour les atomes autres que l'hydrogène et pour les molécules, l'interaction entre les électrons fait que les seules grandeurs ayant un sens physique sont des grandeurs relatives au système dans son ensemble : *énergie totale* ou *spin total*. Le problème devient très complexe et une approximation usuelle consiste à supposer que chaque électron peut être décrit indépendamment des autres, c'est-à-dire, affecté d'une énergie propre et d'un spin propre. Un état multiélectronique est alors obtenu par superposition des états monoélectroniques correspondants qui doivent en outre satisfaire au principe de PAULI : un même état simple ne peut être occupé au plus que par deux électrons de spins nécessairement opposés (antiparallèles). La somme des énergies individuelles représente l'énergie totale, de même que le spin total est la somme des spins de chaque électron" ([A6] cité par ANDRE et BOUCHY [A5]).

** $\hbar = \frac{h}{2\pi}$, h étant la constante de PLANCK

b) Etat d'un système à 2 électrons (exemple de l'atome d'hélium)

Le cas le plus simple d'un système à deux électrons est celui de l'atome d'hélium. L'état fondamental (le plus stable) correspond à la configuration $(1s)^2$ où les deux électrons sont dans l'état $1s$ d'énergie e_0 , leurs spins étant opposés. L'énergie électronique totale est $E_0 = 2e_0$, avec pour le spin $M_s : 1/2 - 1/2 = 0$, seule valeur possible en raison du principe d'exclusion de PAULI : l'état est dit *singulet*, il est représenté schématiquement dans la partie gauche du diagramme ci-dessous (a)

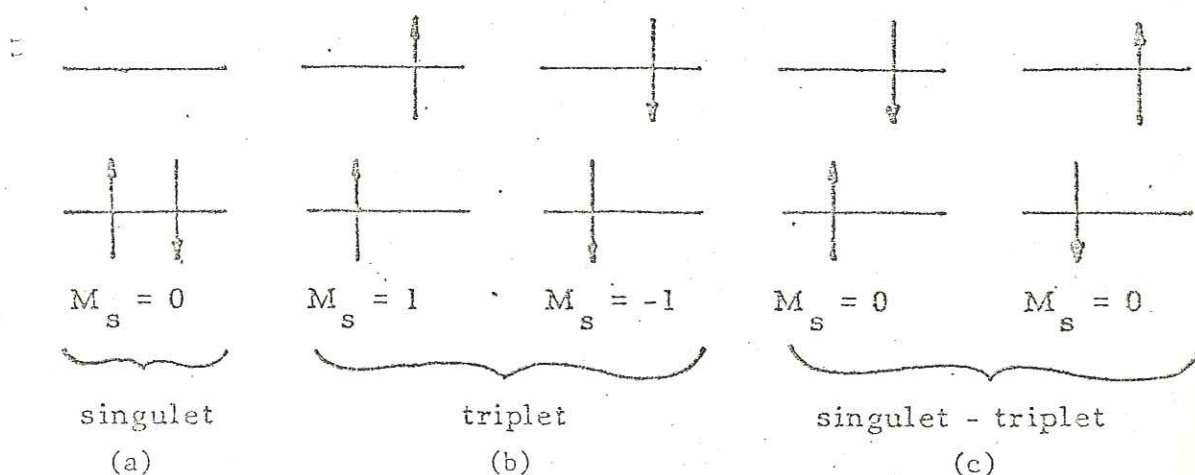


Figure A1: Différents états énergétiques d'un système à deux électrons. (d'après ANDRE et BOUCHY A5)

Un premier état excité de l'atome est obtenu en considérant le niveau suivant d'énergie e_1 , et en lui affectant l'un des électrons, l'autre restant au niveau précédent. L'énergie électronique est maintenant : $E_1 = e_1 + e_0$. Quant au spin, quatre cas peuvent se présenter comme le montre la partie droite (b) et (c) du diagramme ci-dessus, correspondant respectivement à trois valeurs de M_s :

$$M_s = 1, -1, 0$$

l'état est dit *triplet*.

Dans cette représentation, seules les configurations où M_s est différent de zéro peuvent être attribuées sans ambiguïté au triplet. En effet, la configuration où les spins occupent des positions antiparallèles (c) peut aussi être attribuée à un état *singulet* dit *excité*, l'approximation mono-électronique affecte ces deux états de la même énergie E_1 .

Une étude plus rigoureuse du problème, tenant compte notamment de l'interaction entre les électrons, révélerait que l'énergie du triplet est plus faible que celle du singulet correspondant, mais demeure évidemment supérieure à l'énergie de l'état fondamental.

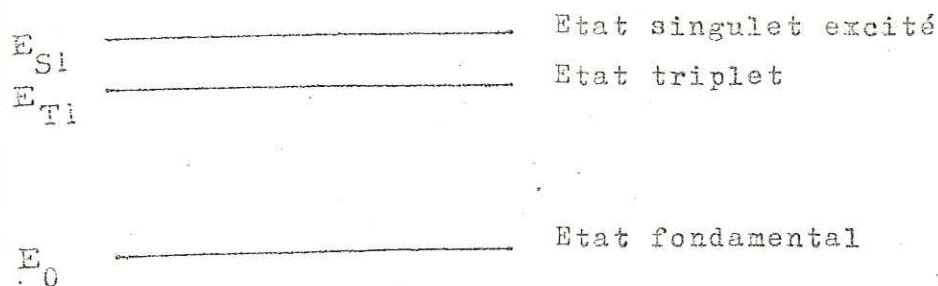


Figure A2: Niveaux d'énergie relatifs d'un système élémentaire à deux électrons. (d'après ANDRE et BOUCHY A5)

D'une façon plus générale, si à chaque électron non apparié, on affecte une valeur $S = 1/2$, la valeur $2S + 1$ définit la *multiplicité spectrale* de l'état du système ; ainsi pour :

- $S = 0$, l'état est dit *singulet*
- $S = 1/2$, il est dit *doublet* (cas des états de l'atome d'hydrogène)
- $S = 1$ il est dit *triplet*
- etc...

Notons que la stabilité d'un état augmente avec sa multiplicité, ce qui se comprend intuitivement : l'existence de spins identiques (ou encore parallèles) fait que les deux électrons sont maintenus à une distance moyenne supérieure à celle qui les sépare lorsque leurs spins sont différents (antiparallèles), et leur énergie d'interaction est de ce fait plus faible.

c) Cas d'une molécule

Le cas des molécules entre dans ce cadre général des systèmes à plusieurs électrons.

"Ainsi, les systèmes moléculaires à deux électrons présentent un état fondamental singulet et deux premiers états excités, l'un singulet, l'autre triplet. Ils sont très importants, car, dans nombre de molécules complexes, des parties du spectre peuvent s'interpréter en considérant deux électrons particuliers, indépendamment du reste de la molécule".

Dans ces systèmes, on a l'habitude de désigner en photochimie l'état fondamental par la lettre G ou S, l'état excité singulet par S_1 et le triplet par T_1 .

Le raisonnement fait pour déterminer la multiplicité des états d'un système à deux électrons peut être répété pour toutes les molécules comportant un nombre pair d'électrons. En effet, un niveau occupé par deux électrons

de spins opposés participe à l'énergie totale, mais a une contribution nulle au spin. L'état fondamental est donc toujours singulet et les états mono-excités (dans lesquels un seul électron occupe un niveau supérieur à celui qu'il occupe dans l'état fondamental) se décomposent en un singulet et un triplet. Ceci cesse d'être vrai dans les cas particuliers où le dernier niveau occupé par deux électrons à l'état fondamental est dégénéré. L'état fondamental est alors généralement triplet (cas de O_2 ou de certains biradicaux) ". ([A5] cité par ANDRE et BOUCHY [A5]).

d) Cas d'un ion

Dans ce cas particulier on a un nombre impair d'électrons et l'on est, alors, dans le cas de la configuration de l'atome d'hydrogène ; l'état est alors dit doublet.

Ce cas n'intervient jamais dans les phénomènes de photoluminescence.

A.2.1.3. SPECTRE D'ABSORPTION [A5] [A6]

a) Interactions avec les électrons

"On peut décrire d'une façon élémentaire le processus d'absorption : une "collision" d'un photon avec les électrons d'un atome ou d'une molécule entraîne la promotion d'un électron dans une orbitale inoccupée, telle que l'énergie qui la sépare de l'état fondamental représente justement l'énergie du photon.

$$E_{\text{accueil}} - E_{\text{départ}} = h\nu$$

Dans les molécules, les niveaux d'énergie électronique, vibrationnelle et rotationnelle sont quantifiés (cf figure A3) ".

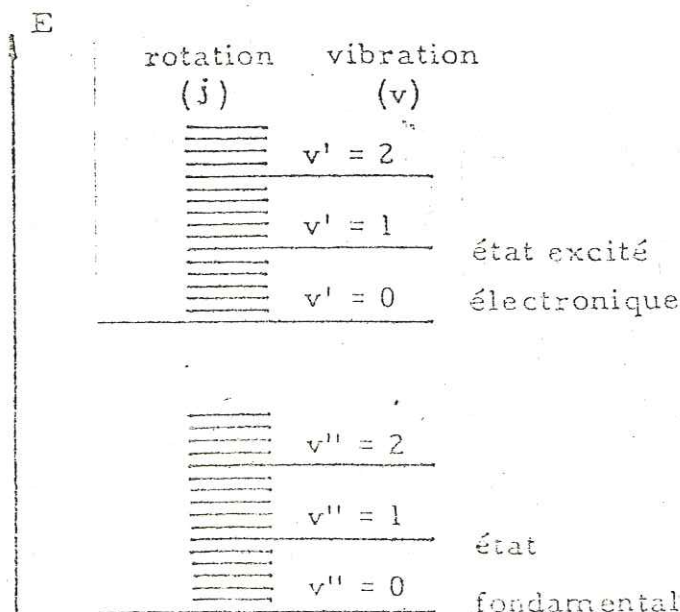


Figure A3: Niveaux d'énergie de rotation et de vibration d'un système élémentaire à deux électrons. (d'après ANDRE et BOUCHY A5)

"L'ensemble de ces transitions constitue les spectres U.V. et visible de la molécule (*).

Ces spectres sont complexes même pour les molécules diatomiques car il n'y a en général aucune règle de sélection concernant les nombres quantiques de vibration v et de rotation j lors d'une transition électronique. Il n'y a donc aucune interdiction et une bande U.V. ou visible peut présenter une structure fine de vibration et de rotation".

b) Interactions avec l'ensemble des électrons et des noyaux

"En fait, il faut considérer l'énergie totale de la molécule, qui prend en compte les interactions de l'ensemble des électrons et des noyaux. Dans le cas d'une molécule diatomique dans l'état fondamental, cette énergie E varie avec la distance interatomique R comme le représente la figure A4. .

Elle passe par un minimum pour la distance d'équilibre R_0 . Sur la même figure est représentée l'énergie E_1 du premier état excité correspondant à une transition permise avec l'état fondamental. La distance R_1 à l'équilibre n'a aucune raison d'être égale à R_0 , et, cet état étant moins "liant" que l'état fondamental, R_1 est généralement supérieure à R_0 . Par ailleurs, la masse de l'électron étant très inférieure à celle du noyau, l'énergie électronique peut varier beaucoup plus rapidement que la distance internucléaire.

(*) Les énergies électroniques correspondant aux mouvements des électrons de valence de la molécule sont de l'ordre de :

38 kcal/mole	à	250 kcal/mole
1,7 eV	à	11 eV
7500 Å	à	1100 Å
750 nm	à	110 nm

en rappelant que :

$$\begin{aligned}
 1 \text{ eV} &= 8068 \text{ cm}^{-1} = 23,06 \text{ kcal/mole} = 1,602 \cdot 10^{-12} \text{ erg/mole} \\
 h &= 6,623 \cdot 10^{-27} \text{ erg.s} \\
 c &= 2,9977 \cdot 10^{10} \text{ cm/s} \\
 1 \text{ Å} &= 10^{-10} \text{ m} = 10^{-1} \text{ m}\mu \text{ (millimicron)} = 10^{-1} \text{ nm (nanomètre)}
 \end{aligned}$$

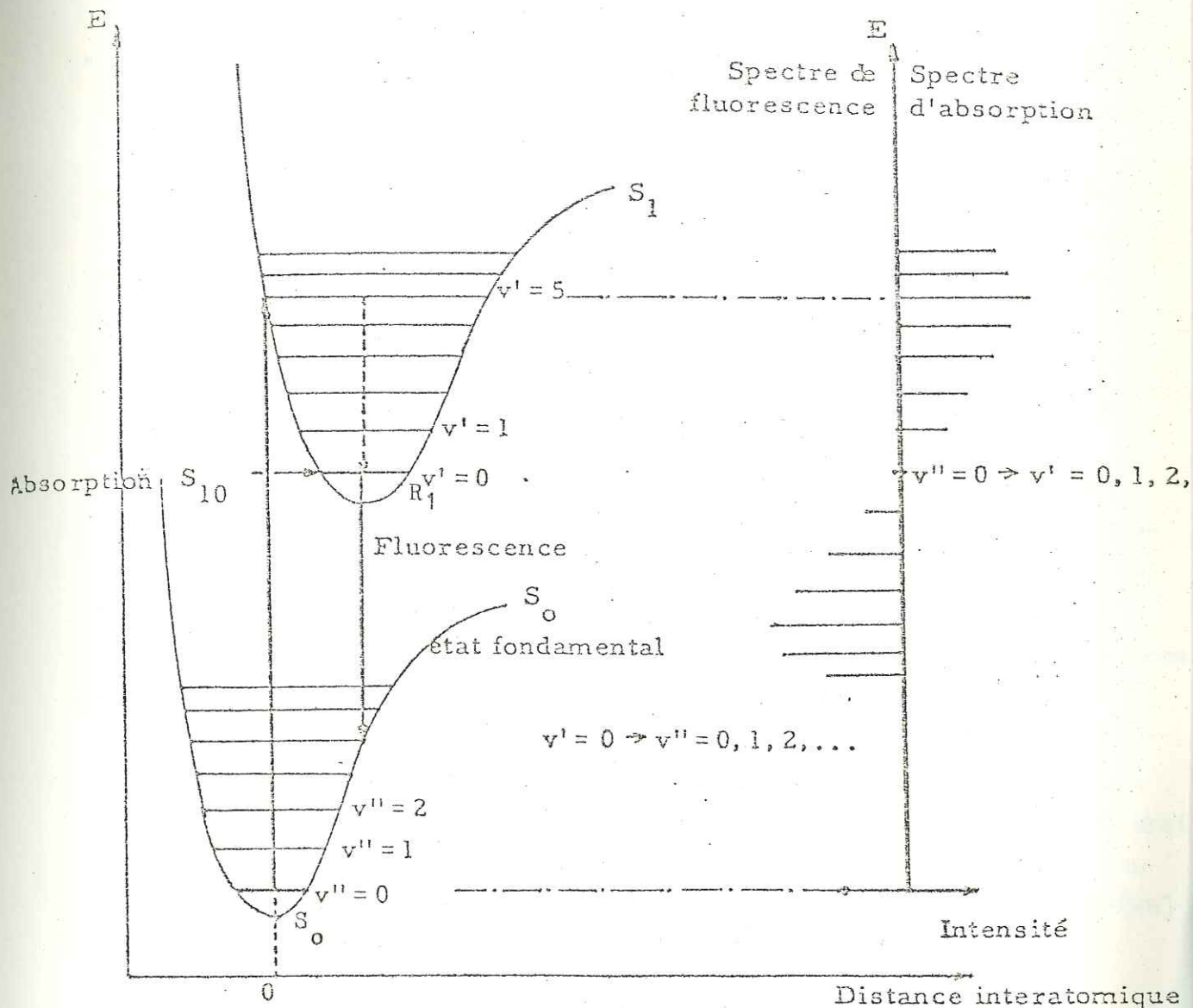


Figure A4: Variation des niveaux d'énergie avec la distance interatomique et spectres d'absorption et de fluorescence. (d'après ANDRE et BOUCHY A5)

Ainsi, alors qu'un transfert d'énergie électronique s'effectue dans des intervalles de temps estimés de l'ordre de 10^{-15} seconde, une modification de distance internucléaire requiert au moins 10^{-12} seconde.

"Cette remarque est à la base du principe de FRANCK CONDON, qui peut s'énoncer ainsi : les transitions électroniques les plus probables sont celles qui ne font intervenir aucun changement des coordonnées des noyaux. On donne à ce type de transitions le nom de transitions verticales".

"Ce principe est très général et vaut pour toutes sortes de molécules. Dans le cas de la molécule diatomique considéré plus haut, ses conséquences sont immédiates. Supposons, qu'à l'état fondamental, la molécule soit dans l'état de vibration le plus bas. Les transitions verticales amènent la molécule à l'état excité avec une énergie supérieure à celle de cet état au plus bas niveau de vibration. Ces transitions peuplent donc des états excités, non seulement électroniquement mais également du point de vue vibrationnel. D'autre part, plusieurs états de vibration voisins peuvent être atteints à partir d'un même état fondamental qui, de surcroît, à une probabilité non nulle d'être vibrationnellement excité.

Le système n'absorbera donc pas pour une fréquence unique mais présentera plusieurs raies d'absorption voisines dont l'intensité dépendra de la probabilité de la transition correspondante (figure A4). Cette structure fine de vibration peut aussi se rencontrer dans des molécules plus complexes et, parfois, dans certains cas très favorables, on peut aussi observer l'influence des niveaux de rotation. Cependant, la résolution forcément limitée des spectrographes et la multiplication des niveaux lorsque la molécule se complique, font que, dans la plupart des cas, même la structure vibrationnelle disparaît et l'on n'observe qu'une seule raie large. Ceci est encore plus vrai en phase condensée (liquide) où toutes sortes d'interactions avec le milieu contribuent à l'élargissement des raies" ([A6], cité par ANDRE et BOUCHY [A5])

A.2.2. DIFFUSION DE LA LUMIERE

A.2.2.1, DIFFUSION ELASTIQUE

Quand on éclaire un liquide avec un faisceau parallèle de lumière monochromatique, une partie généralement faible du rayonnement incident se trouve dispersée dans toutes les directions.

Le phénomène peut être dû à l'hétérogénéité de l'échantillon, c'est l'effet TYNDALL; la dispersion résulte également d'une interaction entre la radiation incidente et les molécules de l'échantillon, c'est l'effet RAYLEIGH. Pour ces deux types de diffusion la longueur d'onde de la radiation dispersée est égale à celle de la lumière incidente.

RAMAN a découvert qu'il existait dans le rayonnement diffusé des radiations d'intensité beaucoup plus faible dont les fréquences différaient de celles de la radiation excitatrice. Les écarts entre les fréquences de la radiation excitatrice et les fréquences des radiations RAMAN sont caractéristiques du solvant.

a) Effet RAYLEIGH [A7]

Les molécules de solvant, soumises à un flux de photons d'énergie $h\nu_0$ subissent des chocs qui se produisent le plus souvent de façon élastique. La collision a pour effet de changer la trajectoire du photon. La radiation diffusée a donc même fréquence que la radiation excitatrice.

Ce phénomène de diffusion est appelé effet RAYLEIGH.

L'intensité de la lumière diffusée est proportionnelle à :

$$\frac{r^6}{\lambda^4} \quad (\text{loi de RAYLEIGH})$$

où r est le rayon de la particule et λ la longueur d'onde de la radiation incidente.

La lumière diffusée RAYLEIGH est polarisée, alors que la lumière de fluorescence ne l'est pratiquement pas.

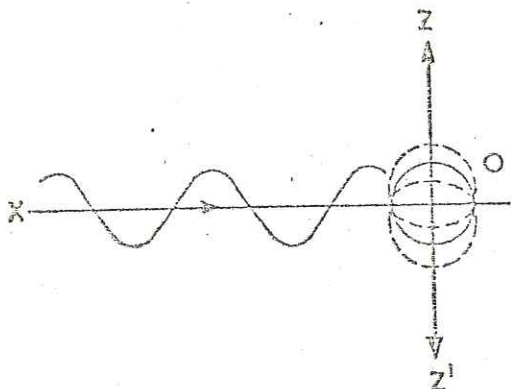


Figure A5: Effet RAYLEIGH: diffusion de la lumière par des particules sphériques. (d'après PARKER A7)

Sur la figure A5, on a représenté une particule sphérique dans sa position moyenne, exposée à un faisceau de lumière polarisé dans le plan de la figure dont le plan de vibration est parallèle à $Z Z'$.

La particule entre en vibration forcée, la direction de vibration étant celle du vecteur du faisceau polarisé incident ; la particule réémet alors la lumière de telle sorte que son plan de polarisation contienne l'axe de vibration.

La lumière incidente non polarisée peut être considérée comme un "mélange" de deux faisceaux lumineux polarisés à angle droit. Si on considère la direction à 90° du rayon incident correspondant à la géométrie de mesure (A.4), la lumière diffusée est complètement polarisée, que la lumière excitatrice le soit ou non.

En pratique, la diffusion RAYLEIGH se trouve en partie dépolarisée (le facteur de dépolarisation, pour les liquides aux températures ordinaires, étant de l'ordre de 0,1). L'emploi d'un polariseur qui arrête la lumière

polarisée permettra d'éliminer la plus grande part de la lumière diffusée.

b) Effet TYNDALL

L'effet TYNDALL est de même nature que l'effet RAYLEIGH, mais ici les "particules" provoquant la diffusion ne sont plus sphériques. La lumière diffusée est, là, moins fortement polarisée que pour l'effet RAYLEIGH, la dépolarisation résultant de la non sphéricité des particules.

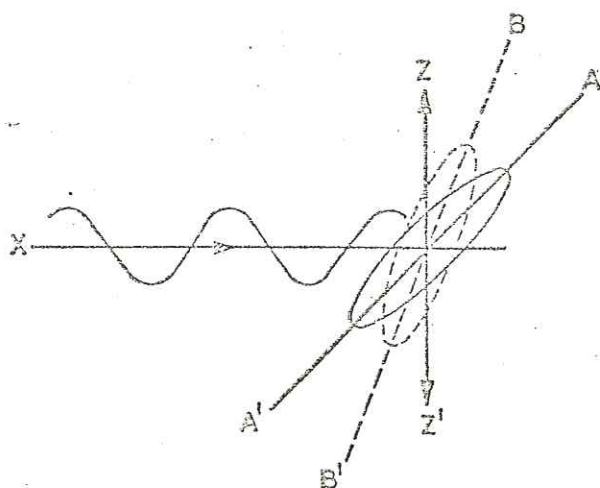


Figure A6: Effet TYNDALL: diffusion de la lumière par des particules non sphériques. (d'après PARKER A7)

La figure A6 représente une particule de forme quelconque orientée dans la direction A A' de plus grande polarisabilité (une telle particule ne possédant plus, comme les particules sphériques, une polarisabilité isotrope). Les oscillations forcées de la particule ont lieu suivant une direction B B' intermédiaire entre la direction de polarisation de la lumière excitatrice et l'axe A A'. La lumière diffusée est émise dans un plan de polarisation passant par B B'. La lumière observée à angle droit du faisceau incident est moins fortement polarisée, que dans le cas de l'effet RAYLEIGH. Dans ce cas, l'emploi d'un polariseur ne réduira plus qu'une partie de la lumière diffusée. Ainsi, pour une suspension, la lumière diffusée sera beaucoup plus intense.

c) Diffusion par les grosses particules.

Quand la dimension des particules est voisine de la longueur d'onde de la lumière incidente, l'intensité de la lumière diffusée n'est plus distribuée symétriquement, elle s'accroît dans la direction du faisceau incident. Pour des particules opaques de dimensions plus grandes que la longueur d'onde la lumière diffusée est accrue par réflexion, et la dépolarisation est considérable.

A.2.2.2. DIFFUSION INELASTIQUE (Effet RAMAN) - [A8]

Plus rarement, le choc entre un photon et une molécule du milieu s'accompagne d'un échange d'énergie. Après la collision, le photon a une énergie $h\nu_d \neq h\nu_o$, on doit alors avoir :

$$h\nu_o - h\nu_d = E_j - E_i$$

E_i = énergie de la molécule avant la collision

E_j = énergie de la molécule après la collision

Deux cas peuvent se produire :

- le photon cède de l'énergie à la molécule ($E_i < E_j$) :
la fréquence ν_d de l'onde diffusée doit vérifier la relation

$$\nu_d = \nu_o - \frac{E_j - E_i}{h} \quad \text{avec } \nu_d < \nu_o$$

en donnant naissance à une raie "RAMAN négative" (raie "STOKES")

- le photon reçoit de l'énergie de la molécule ($E_i > E_j$) :

$$\nu_d = \nu_o + \frac{E_i - E_j}{h} \quad \nu_d > \nu_o$$

en donnant naissance à une raie "RAMAN positive" (raie "anti STOKES").

Aux températures ordinaires, les molécules sont situées dans l'état électronique fondamental et ont donc une énergie vibratoire minimale.

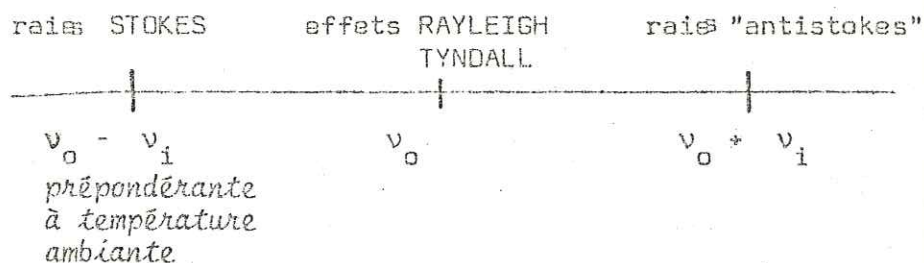
Il est, dans ces conditions, très rare qu'un photon reçoive de l'énergie d'une molécule lors d'un choc inélastique ; ce sont, par conséquent, les raies "RAMAN négatives" (ou "raies STOKES") qui seront visibles.

Il faut noter, ici même, que ce phénomène est tout à fait différent de la fluorescence. En effet, alors que l'effet RAMAN est instantané et que le photon incident peut avoir n'importe quelle énergie pour être diffusé par la molécule, dans la fluorescence, dont nous examinerons les mécanismes plus loin (cf A.2.3.1.), le photon, dont l'énergie doit satisfaire à des règles strictes, est d'abord absorbé par la molécule qui est ainsi portée dans un état excité possédant un temps de vie donné. Cette molécule retourne ensuite à son état fondamental par émission d'un photon moins énergétique que le photon incident.

En résumé, dans la lumière diffusée, nous avons donc 3 sortes de radiations différentes :

ν_0 \longrightarrow Effet TYNDALL ou RAYLEIGH identique à ν exc.
 $\nu_0 - \nu_i$ \longrightarrow Raies "RAMAN négatives"
 $\nu_0 + \nu_i$ \longrightarrow Raies "RAMAN positives"

soit schématiquement :



A.2.3. PHOTOLUMINESCENCE

A.2.3.1. LA FLUORESCENCE [A5][A6][A7][A9][A10][A11]

On définit généralement la fluorescence comme une transition radiative entre états de même multiplicité.

Dans un milieu condensé, à température ordinaire, une molécule polyatomique est dans l'état fondamental singulet S_0 ($V'' = 0$). Par absorption d'un photon, il y a excitation à un certain niveau vibrationnel de S_1 . ($S_{1,v}$ sur la fig A4 ce processus requiert 10^{-15} secondes).

Pour les molécules polyatomiques, il y a en général après les 10^{-12} secondes qui suivent l'absorption du photon, désactivation par collisions jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas de S_1 , l'état $S_{1,0}$. Cet état est appelé "état émissif".

A partir de cet état émissif $S_{1,0}$, le système peut libérer de l'énergie sous forme de photon et revenir à un niveau vibrationnel quelconque de S_0 . Ce processus est appelé fluorescence ; il a une durée comprise entre 10^{-6} seconde et 10^{-1} seconde.

D'après le principe de FRANCK et CONDON, les transitions ont tendance à intervenir entre deux niveaux vibrationnels pour lesquels la distance inter-nucléaire est la même, ce qui explique (figure A4) que les spectres d'absorption et de fluorescence ne se recouvrent pas. Entrant en compétition avec la fluorescence, la conversion interne peut permettre le passage de l'état $S_{1,0}$ à l'état fondamental de S_0 par dissipation d'énergie sous forme de chaleur.

Remarques :

- les bandes du spectre de fluorescence apparaissent à des longueurs d'onde égales ou très légèrement supérieures à celles des bandes d'absorption
- la structure du spectre de fluorescence, à l'état liquide ou gazeux ($p = 10\text{mm Hg}$), ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation à cause de la relaxation vibrationnelle.
- en phase liquide, la forme du spectre d'émission est indépendante du nombre de molécules excitées. En particulier, l'augmentation de la concentration de produit fluorescent n'entraîne pas d'élargissement du spectre de fluorescence.
- pour les molécules possédant un nombre élevé de niveaux vibrationnels, la structure vibrationnelle disparaît généralement et on n'observe alors qu'une seule bande large.

A.2.3.2. PHOSPHORESCENCE

Un processus important concernant l'état excité S_1 est la *conversion intersystème* qui est le passage d'un état singulet à un état triplet (ou vice-versa).

Un certain niveau vibrationnel de S_1 , S_{1V} , par exemple (cf fig. A4) est désactivé généralement par collisions jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas, l'état $S_{1,0}$ est formé.

$S_{1,0}$ peut émettre une fluorescence ou disparaître du milieu en formant l'état triplet T_{1V} (transition intersystème isoénergétique). T_{1V} est désactivé par collisions jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas ; $T_{1,0}$ est formé (cf figure A7) [A7].

Il se produit bien évidemment une dissipation d'énergie car les états triplets ont une énergie plus faible que les états singulets correspondants. Inversement, le passage de T_1 à S_1 n'est pas possible, car T_1 a une énergie plus faible que S_1 ; de cet état triplet il peut y avoir uniquement retour sur S_0 soit par conversion intersystème isoénergétique sur un état vibrationnel élevé de S_0 , soit par émission d'un photon ; c'est la phosphorescence.

Dans tous les cas, le passage de l'état triplet à l'état singulet fondamental est entravé par les états électroniques des deux systèmes respectifs.

En effet, le passage de l'état triplet à l'état singulet doit s'accompagner d'une modification du moment cinétique total et les transitions $T_1 \rightarrow S_0$ s'opposent à la règle quantique de conservation des moments angulaires de spin.

Il en résulte que toutes les transitions, radiatives ou non, s'effectuent plus lentement que dans le cas d'un système de même multiplicité.

Ainsi, les processus de phosphorescence se caractérisent par des durées de vie considérables, comprises entre 10^{-3} (cf 1.4.1.) et 10 secondes. La conversion non radiative $T_1 \rightarrow S_0$ est, de la même façon, plus lente que la conversion $S_1 \rightarrow S_0$.

Pour la phosphorescence, comme pour la fluorescence, les transitions radiatives interviennent entre deux niveaux vibrationnels pour lesquels la distance internucléaire est la même (principe de FRANCK - CONDON), comme par ailleurs T_1 est moins énergétique que S_1 , les spectres d'absorption et de phosphorescence ne se recouvrent pas.

A.2.3.3. ENSEMBLE DES PROCESSUS DE PHOTOLUMINESCENCE

Le diagramme de la figure A7 résume ces processus.

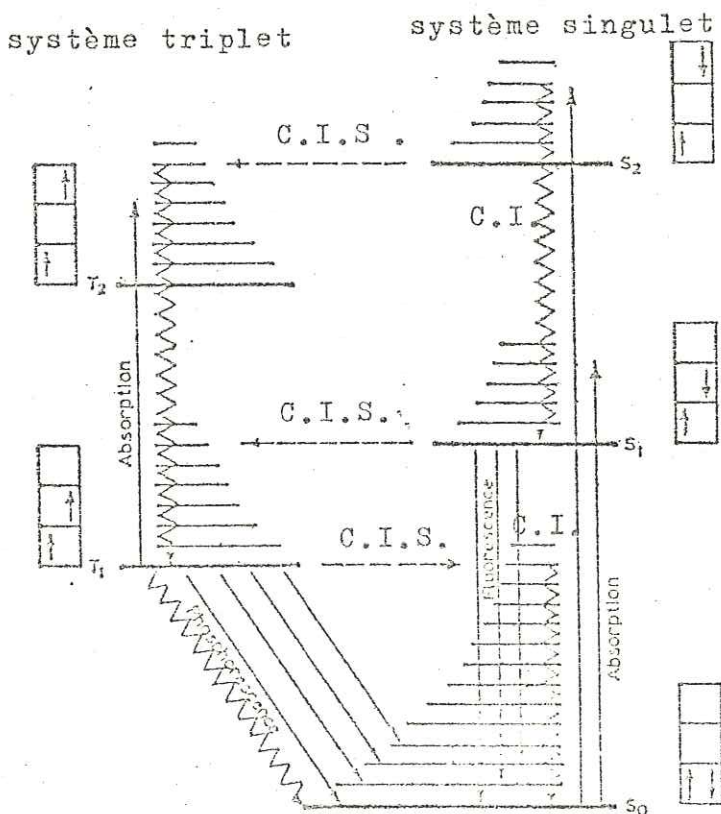


Figure A7: Excitation, fluorescence, phosphorescence et transitions non radiatives. (d'après PARKER A7)

Une lumière d'énergie $h\nu_a$ est absorbée, provoquant le passage d'une molécule de l'état fondamental S_0 à l'état excité singulet S_2 . La conversion interne (CI) de celui-ci vers l'état vibrationnel le plus bas de S_1 peut être suivie de fluorescence, dans laquelle $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_f$. On peut aussi passer de S_1 à S_0 par conversion interne sans radiation. On peut passer de l'état singulet à l'état triplet de S_2 à T_2 ou de S_1 à T_1 par conversion intersystème (CIS). La phosphorescence peut se manifester à partir du dernier état T_1 (perte d'énergie $h\nu_p$). Le retour à S_0 peut aussi s'effectuer par conversion intersystème non radiative. Les lignes ondulées indiquent les processus non radiatifs, tandis que les flèches en traits pleins montrent des transitions s'accompagnant d'absorption ou d'émission de photons [A5].

En résumé, le processus de fluorescence consiste en l'absorption d'un photon $h\nu$ par une molécule qui accède alors à un état singulet excité. Par conversion interne, l'électron redescend sur le niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité singulet S_1 , il y a alors émission d'un photon $h\nu'$ moins énergétique que le photon d'excitation. L'électron se retrouve alors sur un quelconque niveau vibrationnel excité de l'état S_0 , et, de là, par une nouvelle conversion interne, il retombe sur l'état vibrationnel le plus bas de l'état électronique fondamental.

A.2.4. PHOTOCHIMIE CINÉTIQUE [A5]

A.2.4.1. DURÉE DE VIE D'UN ÉTAT EXCITÉ

Quand on supprime l'excitation, l'intensité I de la lumière émise par fluorescence décroît suivant une loi exponentielle :

$$I = I_0 e^{-t/\tau}$$

la constante τ , homogène à un temps, est alors la valeur moyenne de l'existence d'une molécule excitée, appelée *durée de vie*.

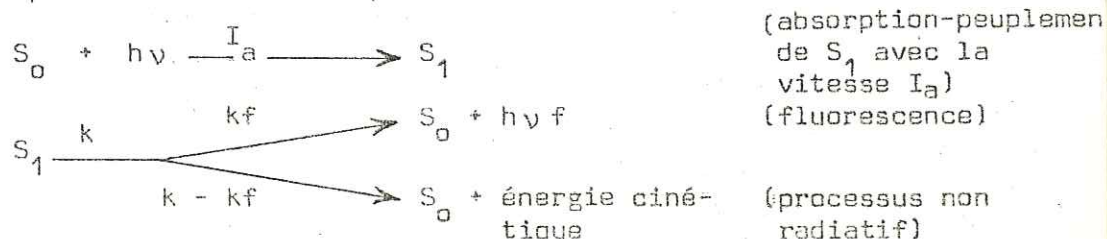
Pour les solutions d'uranine, par exemple, la durée moyenne d'émission est de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-6} sec.

A.2.4.2. ETUDE DE L'ETAT STATIONNAIRE

a) Peuplement de l'état excité

Lorsque l'excitation des molécules est continue et constante en intensité dans le temps, le nombre de molécules promues en un temps donné dans un état excité électronique après excitation, est égal au nombre de molécules dans cet état qui disparaissent du milieu durant le même intervalle de temps ; les vitesses d'apparition et de disparition des molécules excitées sont égales et la concentration en espèces excitées est stationnaire.

Ainsi si nous considérons le cas de la désactivation d'un état excité singulet (S_1), nous pouvons représenter les différents processus de population et disparition de cet état par :



Si (S_1) désigne la concentration en molécules excitées dans l'état S_1 , nous pouvons écrire :

$$\frac{d(S_1)}{dt} = 0 = I_a - k(S_1)$$

conduisant à la détermination de la concentration stationnaire en (S_1) :

$$(S_1) = \frac{I_a}{k}$$

b) Intensité de fluorescence

La vitesse (ou intensité) du processus de fluorescence s'exprime par :

$$I_F^0 = k_f(S_1)$$

soit
$$I_F^0 = \frac{k_f}{k} I_a$$

c) Rendement quantique de fluorescence

Si toutes les molécules excitées par l'absorption d'un photon revenaient à l'état fondamental par un processus radiatif, le rendement quantique de fluorescence serait égal à l'unité.

Or, nous avons vu qu'entraient en compétition avec la fluorescence d'autres phénomènes permettant à la molécule de perdre de l'énergie sans émission de lumière.

Le rendement quantique de fluorescence est défini comme le rapport de l'énergie réémise par fluorescence (I_f) sur l'énergie absorbée (I_A)

$$\phi = \frac{I_f}{I_A}$$

Ce rendement quantique ϕ atteint des valeurs voisines de l'unité pour des solutions de matières colorantes.

A.2.4.3. INHIBITION DE FLUORESCENCE - DROITE DE STERN-VOLMER [A5]

Si de plus, le milieu contient un inhibiteur à la concentration (Q), un nouveau processus de désactivation de S_1 peut intervenir :



Dans ce cas :

$$\frac{d(S_1)}{dt} = 0 = I_a - k(S_1) - k_Q(Q)(S_1)$$

ce qui conduit à :

$$(S_1) = \frac{I_a}{k + k_Q(Q)}$$

et à :

$$I_F = \frac{k_f I_a}{k + k_Q(Q)}$$

Si l'on exprime le rapport I_F^0/I_F des intensités de fluorescence de la substance en l'absence et en présence de Q, toutes autres choses égales par ailleurs, on obtient l'expression analytique de la droite de STERN-VOLMER :

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + \frac{k_Q}{k} (Q) = 1 + k_Q \tau_0 (Q)$$

expression fondamentale dans l'étude cinétique des processus primaires.

A.2.5. RELATION ENTRE STRUCTURE MOLECULAIRE ET FLUORESCENCE

Pour qu'une molécule organique soit lumineuse il faut :


- qu'elle absorbe la lumière
- que les niveaux d'énergie permis correspondent à une transition de fluorescence

A.2.5.1. CONDITIONS REQUISES POUR QU'UNE MOLECULE ABSORBE LA LUMIERE [A13]

a) Présence de groupements chromophores

Ce sont des groupements comportant des doubles liaisons avec des électrons π c'est-à-dire des électrons délocalisés pouvant facilement changer d'orbitales électroniques.

Parmi ces groupements, citons notamment :

- des cycles benzéniques : 
- des groupements $\text{N} \begin{matrix} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{matrix}$
- des groupements carbonyles $\text{>C} = \text{O}$
- des groupements thiocarbonyles $\text{>C} = \text{S}$

b) Présence de groupements auxochromes

La présence de ces groupements sur un chromophore produit un effet dit bathochrome, c'est-à-dire qu'elle provoque un rapprochement des niveaux d'énergie de la molécule, ce qui se traduit par un déplacement de l'absorption vers les grandes longueurs d'ondes. Ce processus facilite l'absorption de la lumière et rend l'excitation de la molécule plus aisée.

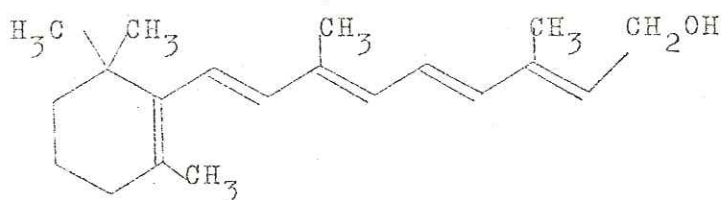
Comme exemples de groupements auxochromes, nous pouvons citer :

- le groupement sulfonique : $-\text{SO}_3\text{H}$
- les radicaux Méthyl et Ethyl $-\text{CH}_3$ et $-\text{C}_2\text{H}_5$
- le radical hydroxyle $-\text{OH}$
- le radical amine primaire $-\text{NH}_2$

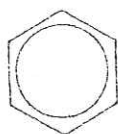
A.2.5.2. CONDITIONS REQUISES POUR QU'UNE MOLECULE SOIT FLUORESCENTE

a) Présence de nombreux électrons π

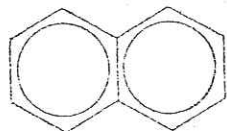
Les électrons π peuvent être apportés par des chaînes carbonées contenant de multiples doubles liaisons conjuguées "carbone-carbone". Ainsi, par exemple, les produits des séries aliphatiques, telle la vitamine A, présentent une fluorescence importante :



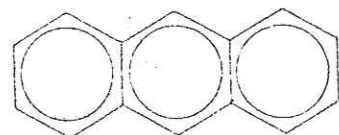
L'effet de la longueur de la chaîne conjuguée sur l'énergie de l'état singulet excité de plus bas niveau énergétique (état émissif), est illustré par la série aromatique suivante :



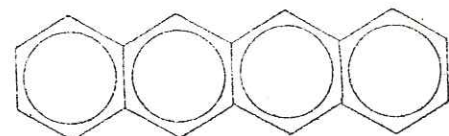
benzène



naphthalène



anthracène



naphthacène

Alors que la molécule de benzène absorbe dans l'ultraviolet (rayonnement de forte énergie) la molécule de naphthacène absorbe dans l'infrarouge (rayonnement de faible énergie). L'augmentation des cycles benzéniques, c'est-à-dire, l'augmentation des électrons π favorise donc la fluorescence [A7].

b) Structure plane de la molécule

La présence d'un grand nombre d'électrons π n'est pas une condition suffisante ; il est en effet nécessaire que ces électrons soient fortement délocalisés et puissent interférer entre eux. On a observé que cette condition était obtenue par un renforcement de la rigidité de la molécule et que la plupart des molécules fortement fluorescentes étaient caractérisées par une structure à la fois rigide et plane [A7].

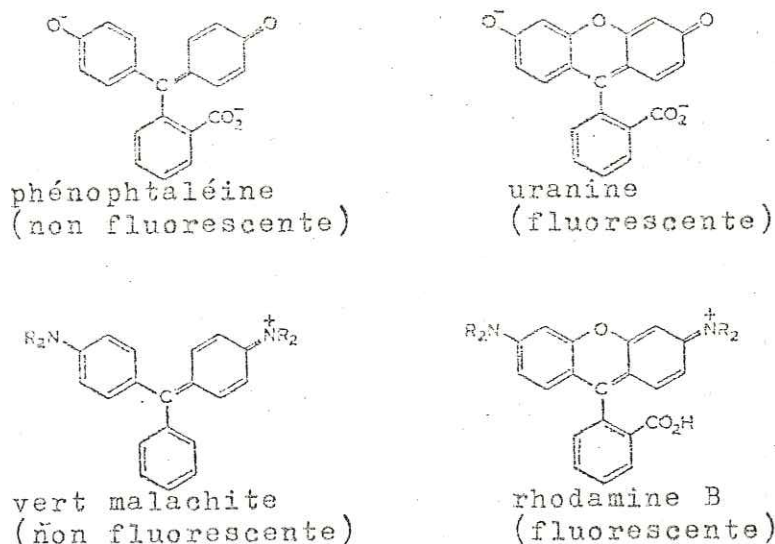


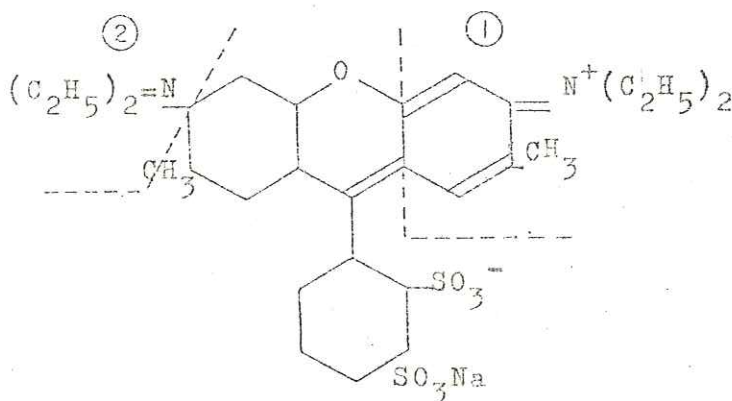
Figure A8: Influence de la structure de la molécule sur la fluorescence (d'après PARKER A7)

La différence entre les formes non fluorescentes et fluorescentes de la figure A8 est la présence, pour ces dernières, d'un pont oxygène qui provoque une augmentation de la rigidité de la molécule.

Dans les formes non fluorescentes, l'absence d'un pont oxygène entre les deux cycles aromatiques rend en effet les rotations et les vibrations des noyaux benzéniques plus faciles. Il en résulte que l'excitation électronique peut être plus aisément dissipée par un phénomène de conversion interne, sans qu'il ne se produise de désexcitations radiatives. Au contraire, une plus grande rigidité de la molécule rend plus difficile la dissipation de l'énergie électronique de vibration et augmente ainsi l'efficacité du phénomène de fluorescence [A7].

A.2.5.3. ETUDE DE LA STRUCTURE D'UN COLORANT XANTHÉNIQUE : EXEMPLE DE LA SULFORHODAMINE G [A13]

La fluorescence de la molécule de sulforhodamine G, dont la structure est représentée ci-dessous résulte de la conjonction des caractères suivants :



a) Présence de nombreux groupements chromophores

Ils sont représentés par les cycles benzéniques comportant trois doubles liaisons conjuguées et par une forme iminoquinonique ou N, doublement lié, est conjugué avec des doubles liaisons (partie 1 de la molécule).

b) Présence de groupements auxochromes

Ce sont les groupements - SO₃H portés par un des noyaux benzéniques

- l'amine aromatique tertiaire (2)
- les radicaux méthyl fixés sur les cycles benzéniques

c) Rigidité de la molécule

Elle est assurée par la présence d'un pont oxygène qui assure la rigidité et la planéité de l'ensemble.

Ainsi les nombreux groupements auxochromes portés par les chromophores, joints à la grande rigidité de la molécule, concourent-ils à faire de la Sulforhodamine G une substance présentant un rendement de fluorescence élevé.

A.3. ETUDE DES DIFFERENTS FACTEURS INFLUANT SUR LA FLUORESCENCE DES SOLUTIONS

De nombreux facteurs influent sur la fluorescence des solutions de colorants xanthéniques.

L'étude de ces différents paramètres fait l'objet d'un nombre considérable de publications. La plupart d'entre elles ont un caractère théorique et concernent généralement la fluoresceine, un des colorants fluorescents les mieux connus. Le but de ce chapitre n'est pas de dresser une liste exhaustive de tous ces travaux mais plutôt d'en résumer les idées maîtresses et d'en dégager les principaux mécanismes, afin de pouvoir en tenir compte et d'en tirer parti, par la suite, dans un but pratique.

Pour l'approche théorique de cet aspect de la fluorimétrie, nous avons largement puisé dans l'étude bibliographique qu'ANDRE [A14] a bien voulu mener pour guider notre travail.

Cette étude bibliographique ainsi que les compléments d'étude qui ont été réalisés par ANDRE et STEINMETZ [A15] son collaborateur, d'une part, et les éclaircissements apportés par Mlle ALARY et ROCHAS, d'autre part, [A13], nous ont permis de compléter de nombreux aspects pratiques des mesures de fluorescence sur lesquelles le SARR n'a pas cessé de poursuivre ses investigations (cf [A1] [A2] [A3] ainsi que [A14] [A16] [A17] [A20] [A21]).

A.3.1. ASPECT THEORIQUE DU PROBLEME

A.3.1.1. DIFFERENTES FORMES STRUCTURALES D'UN COLORANT XANTHENIQUE

La complexité des colorants xanthéniques leur confère une versatilité structurale certaine. Nous en prendrons pour exemple la fluoresceine; ce colorant, outre ses nombreuses formes monomères représentées par les formules développées dans la figure A9, est aussi susceptible de se présenter sous une forme dimère [A14].

a) Formes monomères (exemple de la fluoresceine)

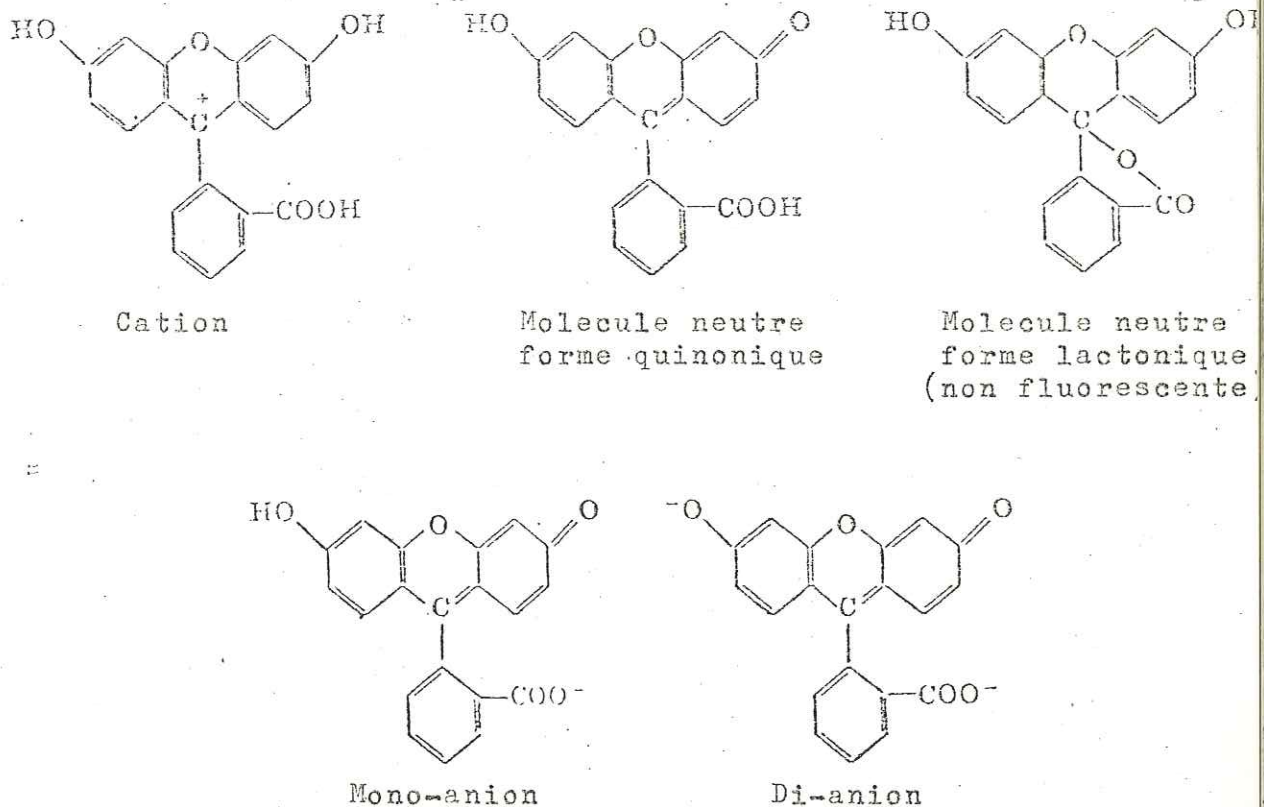
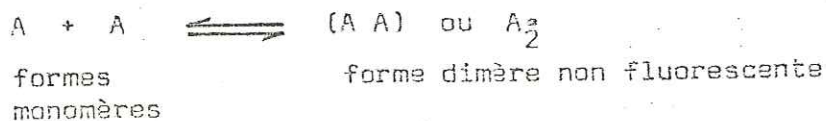


Figure A9: Formes structurales de la fluorescéine.
(d'après ZANKER et PETER cité par ANDRE A14)

b) Formes dimères

Dans certaines conditions, il peut se produire une dimérisation des molécules suivant le schéma :



Cette dimérisation a été mise en évidence également pour la Rhodamine B. (d'après NUTO cité par ANDRE [A14]).

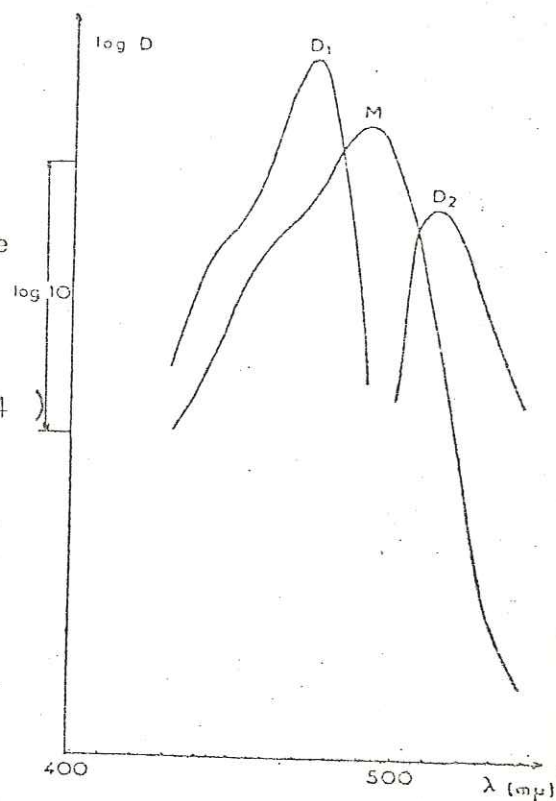
L'absorption de photons peut conduire alors, à la fois, à la promotion dans leur état excité de molécules A et A₂.

Par ailleurs, ces molécules A₂^{*} peuvent émettre une fluorescence de rendement quantique plus faible (ou non) à des longueurs d'onde plus grandes (cas de la fluorescéine).

Selon ANDRE [A14] l'interprétation théorique de la dimérisation du colorant fait intervenir des forces de dispersion de LONDON.

L'apparition des bandes d'absorption D_1 et D_2 (figure A10) a été prévue et interprétée par FORSTER sur la base d'une combinaison des moments dipolaires associés à la transition électronique des deux éléments du dimère.

Figure A10: Bandes d'absorption de la forme monomère (M) et de la forme dimère (D_1 et D_2) de la fluorescéine en solution alcaline aqueuse. L'échelle des ordonnées est logarithmique, l'unité de densité optique est arbitraire. (d'après LAVOREL, cité par ANDRE A14)



Par ailleurs, des transferts d'énergie entre A^* et A_2 peuvent intervenir. Enfin, la rencontre d'une molécule A^* et d'une molécule A peut conduire à la formation d'un complexe appelé *excimère*, stable uniquement à l'état excité



La formation d'excimère est exoénergétique, il en résulte donc que la fluorescence d'excimère a lieu à des longueurs d'onde supérieures à celle de la fluorescence normale.

Par ailleurs, selon PARKER et HATCHARD cités par ANDRE [A14], l'état fondamental du complexe étant dissociatif, le spectre de fluorescence d'excimère est un spectre diffus, sans structure fine de vibration.

A.3.1.2. MECANISMES DE PASSAGE D'UNE FORME STRUCTURALE A UNE AUTRE

a) Réactions protolytiques

Selon ANDRE [A14], FORSTER suppose que la molécule à l'état excité est

susceptible de céder ou de capter un proton à la solution ; l'émission de fluorescence peut intervenir alors à partir des deux formes de l'état excité. Si n et m désignent le nombre de charges positives des formes AH (état fondamental ou état excité) et B (ions présents dans la solution), une réaction protolytique peut être représentée par les processus en équilibre suivants :



ou plus simplement :



Le diagramme énergétique de cette réaction est illustré sur la figure A11.

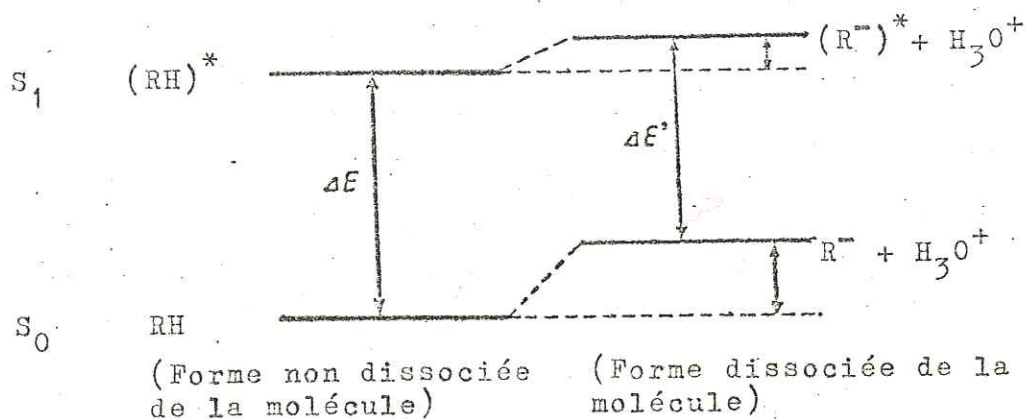


Figure A11: Diagramme énergétique d'une réaction protolytique. (d'après FORSTER cité par ANDRE A14)

ΔE est alors l'énergie requise pour l'excitation de la forme non dissociée RH, $\Delta E'$, l'énergie nécessaire pour exciter la forme dissociée à partir de R^- . E_D et E_D^* sont les énergies de dissociation de RH respectivement dans l'état fondamental et dans l'état excité.

b) Facteurs physiques intervenant sur la réaction protolytique

Les facteurs décisifs qui interviennent dans cet équilibre sont alors les suivants :

- la valeur de l'énergie de dissociation dans l'état excité
- la durée de vie de l'état excité non dissocié.

L'effet de la réaction protolytique sur le spectre d'émission ne peut devenir accessible à l'observation que si la durée de vie de la molécule excitée est supérieure au temps requis par la molécule excitée pour céder ce proton.

Or, la mise en équilibre protonique d'une solution aqueuse acide est très courte devant la durée de vie d'un état excité. En effet, alors que la durée de vie d'un état excité est de l'ordre de quelques nanosecondes (cf [A14]), le temps requis pour que la molécule excitée cède ce proton est, en solution aqueuse, de l'ordre de 10^{-13} seconde.

Le facteur prépondérant est donc le facteur énergétique.

c) Facteurs chimiques et thermodynamiques intervenant sur la réaction protolytique

Il se trouve que les constantes de dissociation (*) des molécules à l'état excité et à l'état fondamental diffèrent, ainsi le pK de l'état fondamental du phénol est de 10, alors que celui de son état excité est de 3,5 .

On montre que les valeurs respectives de ces pK jouent un rôle majeur dans la prépondérance relative des formes dissociées ou non à l'état excité.

On démontre que si pK et pK* caractérisent respectivement les constantes de dissociation des états fondamental et excité, on peut écrire la relation suivante [A14] .

$$pK - pK^* = \log \frac{K^*}{K} = \frac{\Delta E - \Delta E'}{2,3 RT}$$

A.3.2. INFLUENCE DES PHENOMENES CHIMIQUES

A.3.2.1. ROLE DU POTENTIEL HYDROGENE (pH)

a) Domaines d'existence des différentes formes structurales d'un colorant (cas de la fluoresceine) en fonction du pH

Comme nous l'avons vu au paragraphe A.3.1., la fluoresceine peut exister sous cinq formes monomères différentes. C'est la valeur du pH qui détermine la forme moléculaire présente, comme l'indique le tableau suivant où ont été reportés par ANDRE [A14] les positions des maximums d'absorption de la fluoresceine dans le visible ainsi que les coefficients d'extinction ϵ correspondants pour différents pH .

*La constante de dissociation k de : $AH + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$
s'écrit : $K = \frac{(A^-) (H_3O^+)}{(AH)}$

et l'on pose généralement $pK = \text{colog}_{10} K$

pH	max nm	$\epsilon_{\max} \cdot 10^{-4}$ mole ⁻¹ . l.cm ⁻¹	forme dominante
0	437	5,5	cation
3,3	437	1,6	molécule neutre
5,5	455	3,0	mono anion
	475	3,1	mono anion
12	491	8,8	di anion

Le diagramme de la figure A12 représente le mode d'obtention des constantes d'équilibre K_a des différentes formes de la fluoresceïne à partir de la relation :

$$pK_a = pH - \log_{10} \frac{\epsilon - \epsilon_a}{\epsilon_b - \epsilon}$$

où ϵ_a , ϵ_b et ϵ représentent respectivement les coefficients d'extinction pour l'acide, la base et le système en équilibre.

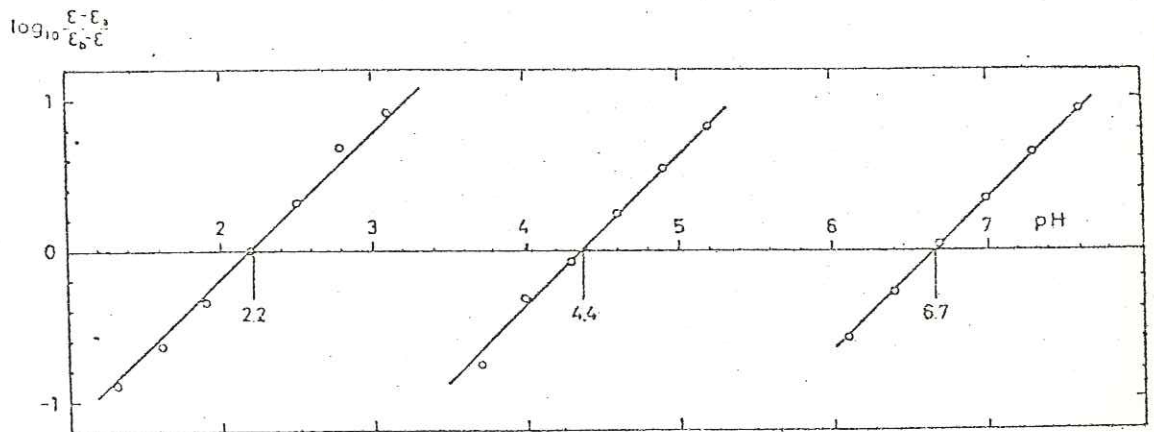


Figure A12: Détermination graphique des valeurs du pK de l'équilibre de dissociation pour les différentes formes de la fluoresceïne. (d'après LINQVIST cité par ANDRE A14)

En fait, les phénomènes sont plus complexes car les pK des états cités diffèrent des pK des états fondamentaux. On montre, en A.3.1.2., qu'il est

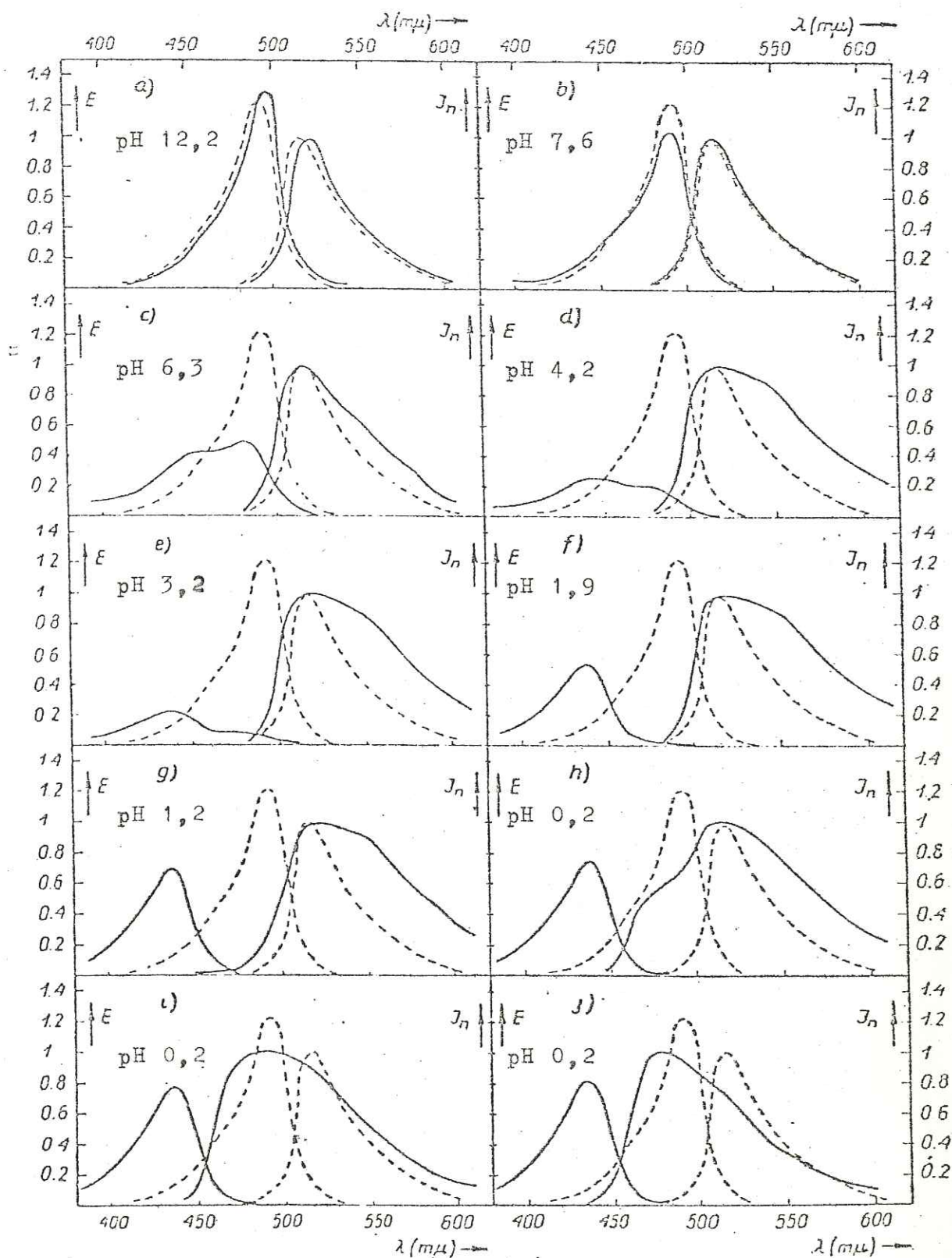


Figure A13: Spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine à différents pH. (en traits discontinus: spectres de référence à pH 10,5). (d'après ROZWADOWSKI, cité par ANDRE A14)

nécessaire de tenir compte de ces nouvelles données pour analyser de façon plus précise les mécanismes de transfert d'une forme à l'autre, mécanismes exposés en A.3.1.2.

b) Caractéristiques de fluorescence de chaque forme structurale

- Spectres d'absorption et d'émission de la fluoresceine

La figure A13 représente les spectres d'absorption et d'émission de fluoresceine mesurés à différents pH à concentration constante en colorant.

- Cas de la Rhodamine B

Le pH influe également sur la forme et le déplacement des spectres. Les données citées par ANDRE [A14] à ce sujet semblent néanmoins indiquer que ces effets sont moins marqués que pour la fluoresceine.

c) Influence du pH sur la durée de vie de l'état émissif (S_1) et le rendement de fluorescence

Les modifications de la durée de vie de l'état émissif et du rendement de fluorescence sont représentées sur les figures A14 et A15.

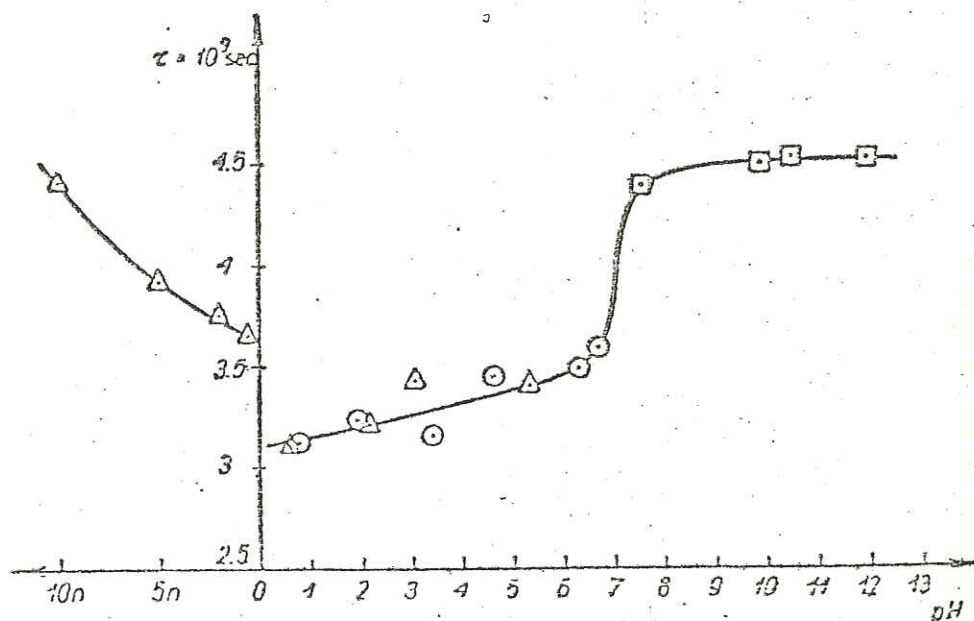


Figure A14: Durée de vie de l'état émissif en fonction du pH. avec H_2SO_4 , avec HNO_3 , avec NH_3 . (d'après ROZWADOWSKI cité par ANDRÉ A⁴14)

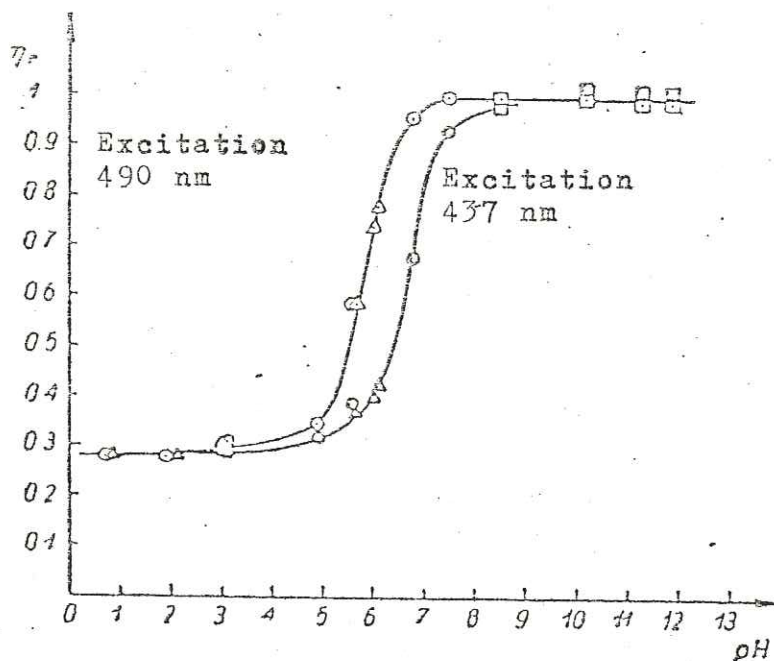


Figure A15: Rendement de fluorescence en fonction du pH. (d'après ROZWADOWSKI cité par ANDRE A14)

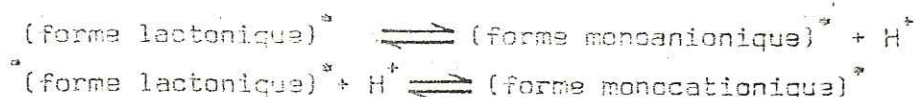
- En milieu acide si les formes monoanioniques et lactoniques de la fluoresceine sont présentes, l'absorption de la lumière a lieu pour $\lambda = 437 \text{ nm}$ (maximum d'absorption pour les pH faibles, cf tableau A.3.2.1a) et conduit à la formation d'états excités électroniques dont un n'est pas fluorescent (forme lactonique). Dans ce cas, le rendement d'émission de fluorescence est plus faible puisque l'énergie excitatrice a été partagée.

De plus, pendant la durée de vie de la forme monoanionique excitée électriquement, celle-ci peut se mettre en équilibre avec la forme lactonique non fluorescente excitée électriquement, selon :



En admettant que la forme anionique soit moins acide à l'état excité que dans l'état fondamental (cf A.3.1.2.c), la forme monoanionique peut, en partie, disparaître du milieu par le processus (1), ce qui entraîne, selon ROZWADOWSKI, une diminution de la durée de vie de l'état émissif [A14].

Cependant, dans les conditions où la forme lactonique est seule présente dans le milieu, on ne devrait pas observer de fluorescence. La fluorescence observée provient vraisemblablement de la forme monoanionique, ou monoanionique excitée électriquement, formées en fonction du pH selon les processus suivants :



Aux très fortes valeurs de la concentration en ions H^+ , il y aurait formation et donc émission de la forme monocationique de la fluoresceine.

- En milieu basique la forme dianionique est alors responsable à la fois de l'absorption et de l'émission [A14].

d) Influence du pH sur les mesures d'intensité de fluorescence

De nombreux expérimentateurs ont examiné l'influence du pH sur les mesures de concentration effectuées par fluorimétrie. Toutes les mesures reportées sur les diagrammes ci-après (figures A16 A17 et A18) ont été effectuées avec les combinaisons de filtres colorés décrites en A.4.3.3. .

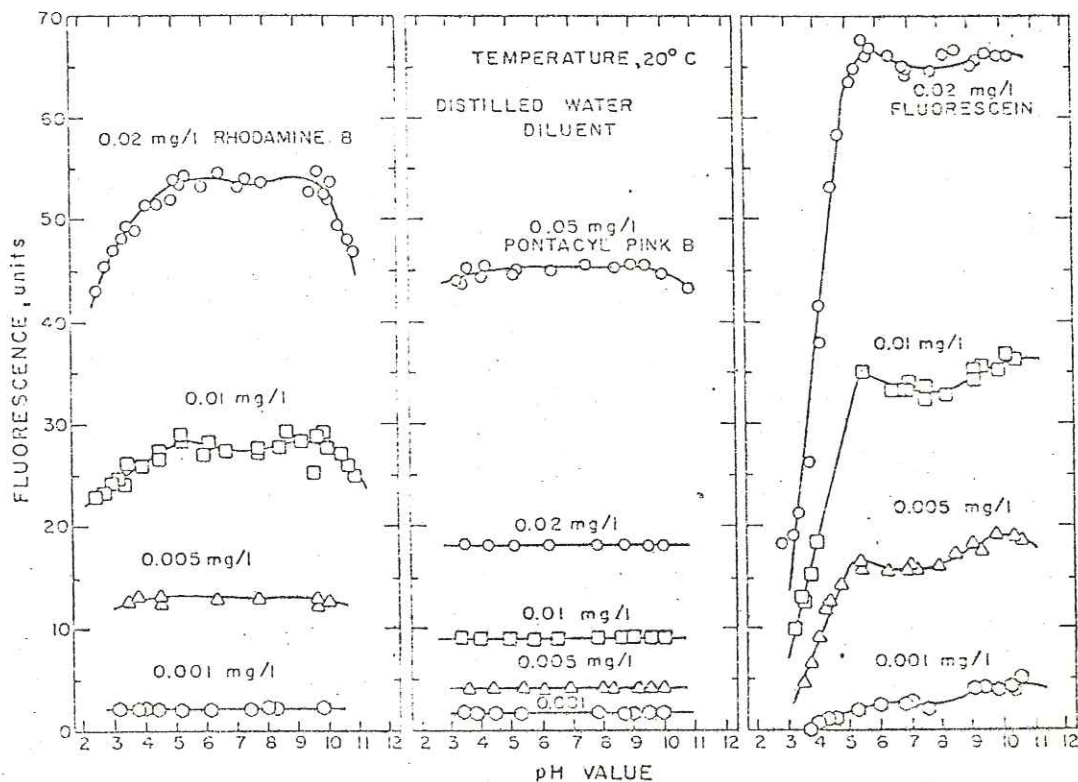


Figure A16: Variation du signal de fluorescence en fonction du pH pour la Rhodamine B, la Sulforhodamine B (Pontacyl pink B) et la fluoresceine. (d'après FEUERSTEIN et SELLECK A4)

Tous ces diagrammes établissent que le signal de fluorescence ne varie pas sensiblement dans la gamme des pH couramment observés dans les eaux naturelles.

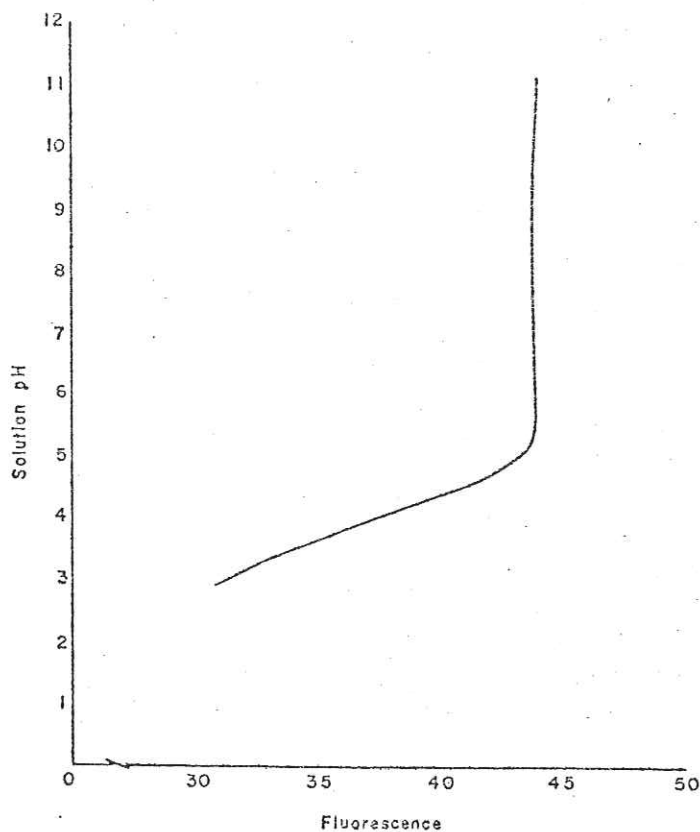


Figure A17: Variation du signal de fluorescence en fonction du pH pour la Rhodamine Wt. (d'après SIVERTS A18 et MOSER A19)

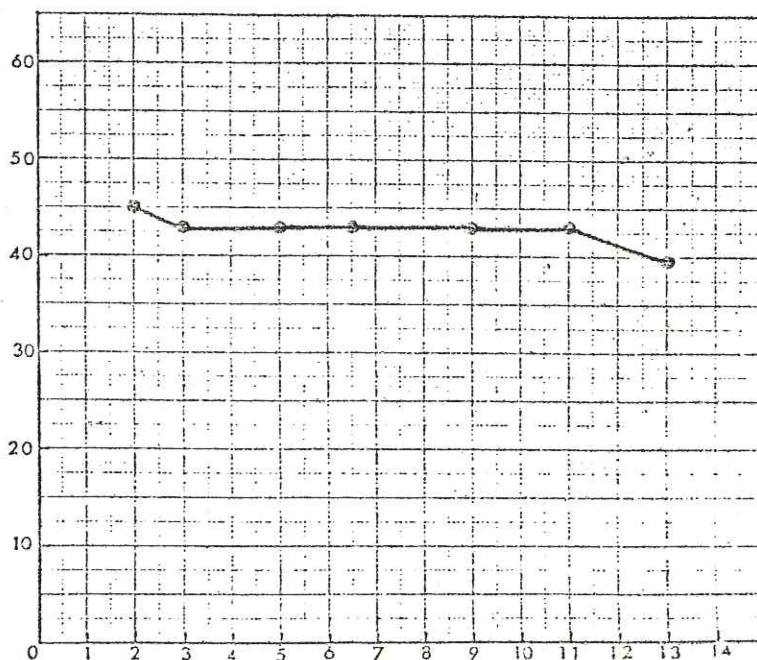


Figure A18: Variation du signal de fluorescence en fonction du pH pour la Sulforhodamine G. (d'après LACHENAL et DESCLEE A16)

Si l'on a à marquer des eaux sortant de la gamme de pH comprise entre 6 et 9, on devra, avant l'analyse quantitative, se replacer dans cette gamme par un ajustement du pH.

Dans le cas d'une mesure en continu et dans l'hypothèse d'un pH fortement acide, on pourra procéder à des corrections en se servant des courbes précitées.

A.3.2.2. INFLUENCE DES SELS

En dehors de l'effet inhibiteur possible d'un sel (cf A.3.2.4.), la présence de celui-ci est responsable de l'augmentation de la force ionique de la solution (*) et, par suite, de la diminution de l'activité(**); il modifie de ce fait le (ou les) équilibre (s) entre les formes successives du produit fluorescent (cf ANDRE [A14]), au même titre que le pH (cf A.3.1.1.) .

A.3.2.3. INFLUENCE DU SOLVANT

a) désactivation non radiative

Les molécules de traceurs en solution subissent l'influence des molécules du solvant, influence qui se manifeste par des chocs incessants (ce qui se traduit notamment par une multiplication des niveaux vibrationnels d'énergie et un élargissement des raies d'absorption et d'émission qui se recouvrent partiellement et deviennent de larges régions d'absorption et d'émission). Les désactivations non radiatives résultant des transferts d'énergie survenant au cours de ces chocs, dépendront de la nature des molécules de solvant rencontrées [A11] .

L'influence de la viscosité du solvant est traitée en A.3.4.2.b. .

* le coefficient d'activité d'un ion est une fonction décroissante de la force ionique du milieu

** la force ionique est la demi-somme des termes obtenue en multipliant les concentrations de chaque ion, exprimées en molarités, par le carré de leur valence.

b) Déplacement des spectres

On montre qu'un accroissement de la polarité du solvant entraîne un déplacement des spectres de fluorescence vers de plus basses énergies (déplacement vers le rouge) [A11] .

c) Exaltation de fluorescence

Selon BOUCHARD (cité par SCHOULER [A17]), interviendrait l'effet d'induction spécifique du solvant (ou effet DEBYE) qui est lié à la polarité du solvant. LUCATU cité par GRABCZAK [A20] a montré que si l'on ajoute à des solutions de Rhodamine ou d'Uranine contenant des extincteurs de fluorescence, des substances telles que l'alcool méthylique, l'alcool éthylique des polyalcools ou de l'acétone, l'intensité de fluorescence était une fonction croissante de la concentration de cet élément provoquant l'exaltation.

Précisons que l'interprétation donnée par LUCATU pour rendre compte de l'exaltation de fluorescence (à savoir, peptisation par les exaltateurs d'agrégats formés sous l'action des extincteurs) n'a pas été jugée satisfaisante par ANDRE [A14] qui la considère comme incompatible avec les théories généralement admises.

A.3.2.4. INHIBITEURS DE FLUORESCENCE

La présence de certains ions dans une solution de fluoresceine a comme conséquence :

- une modification des spectres d'excitation et d'émission
- une décroissance de l'intensité de fluorescence

a) Expression analytique de l'inhibition de fluorescence

Les mécanismes d'extinction de fluorescence par les inhibiteurs font l'objet de multiples controverses. Une revue des travaux effectués dans ce domaine a été donnée par ANDRE [A14] .

Il semble que le mécanisme d'extinction prépondérant fasse intervenir un transfert de charges dans l'état excité, entre les ions salins et les formes

ioniques du produit fluorescent, conduisant à une désactivation non radiative. Ce mécanisme s'ajoute aux autres processus de désactivation déjà évoqués en A.2.4.2.a.

L'ensemble des processus de désactivation apparaît dans le bilan établi en A.2.4.3. (relation de STERN VOLMER).

Par cette relation il est possible, en mesurant le rendement de fluorescence en fonction de la concentration en ion inhibiteur, de déterminer, connaissant la durée de vie de l'état singulet excité, la constante de désactivation du corps fluorescent par l'extincteur de fluorescence (droite de STERN-VOLMER cf A.2.4.3. [A5] [A14]).

b) Nature des inhibiteurs

MAJUNDAR cité par ANDRE [A14] a étudié l'efficacité d'inhibition d'un grand nombre d'ions. Selon lui, l'efficacité des principaux ions est, par ordre décroissant, la suivante :

ions	$I^- > CNS^- > Br^- > Cl^- > C_2O_4^{2-} > C_2H_3O_2^-$
Variation du potentiel Red Ox	0,54v \longrightarrow 1,36v

Ce même auteur établit que l'effet désactivant des ions varie dans le même sens que leur potentiel Red Ox, un transfert de charges étant d'autant plus aisé que le potentiel d'ionisation est plus faible.

c) Inhibition par les halogénures

L'inhibition de fluorescence a préoccupé le SARR pour de nombreuses raisons exposées par MOLINARI dans son introduction à l'étude d'ANDRE [A14] . En effet, certaines études d'hydrologie s'effectuent en milieu marin, d'autres font apparaître la nécessité de travailler en milieu à haute salinité, d'autres enfin requièrent la mise en oeuvre simultanée de traceurs fluorescents et de l'ion iodure, traceur dont l'importance a été soulignée par MOLINARI [A2] .

Aux fortes concentrations, comme le montre la figure A19, l'inhibition de fluorescence par les halogénures est considérable, sauf pour le chlorure comme CALMELS l'a confirmé au SARR [A21] . L'extinction par l'ion iodure a fait l'objet d'une étude particulière d'ANDRE et STEINMETZ [A15] évoquée plus loin.

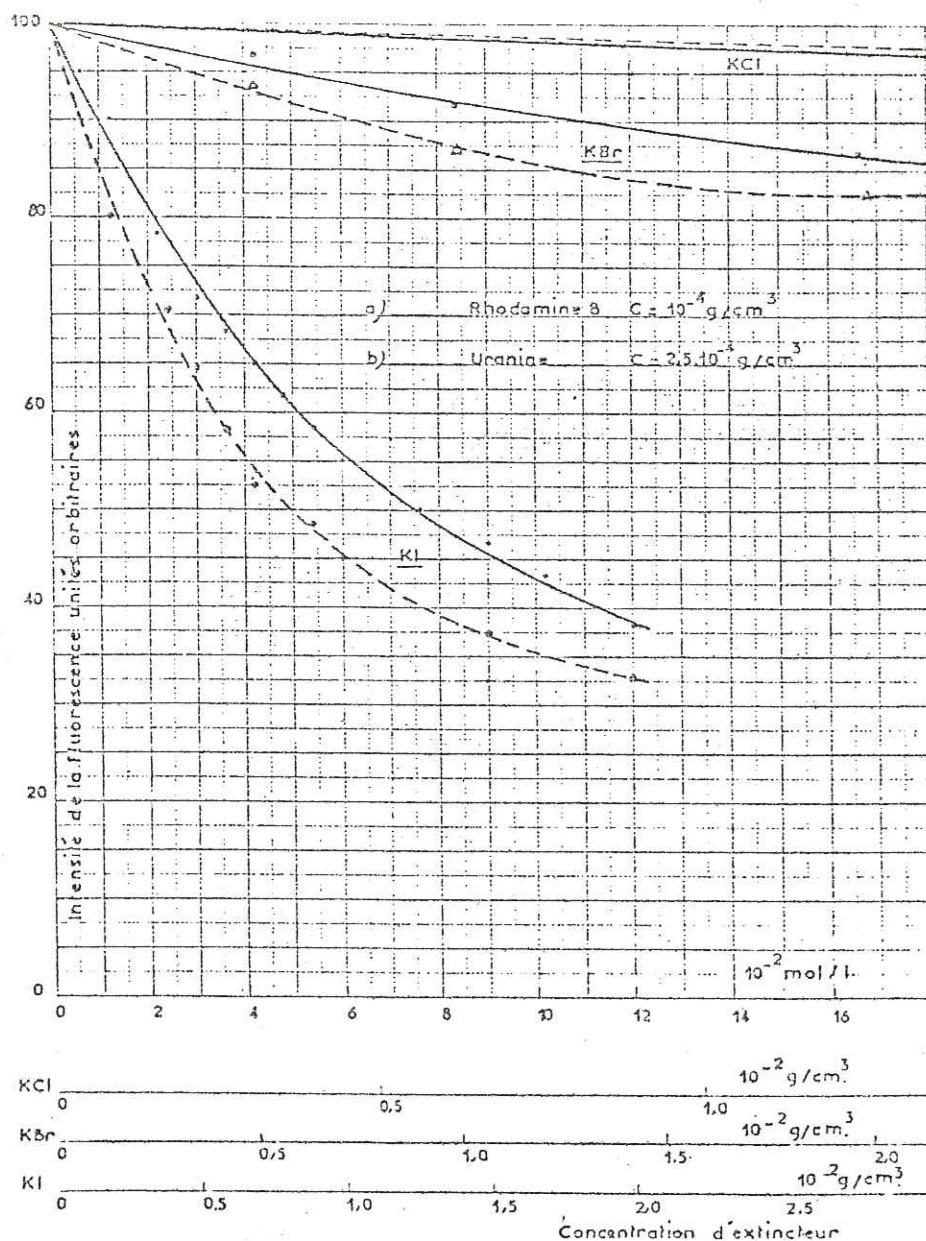


Figure A19: Extinction de la fluorescence de la Rhodamine B et de l'uranine par les ions chlorure, bromure et iodure. (d'après LUCATU cité par GRABZAK A20)

En milieu marin, FEUERSTEIN et SELLECK [A4] ont montré qu'en fonction de l'augmentation de la teneur en sels dans l'eau, l'intensité de fluorescence diminuait.

Une très faible décroissance est notée pour la Rhodamine B et la Sulforhodamine G alors que l'Uranine décroît de façon notable.

Ces auteurs ne donnent aucune précision sur ce taux de décroissance.

d) Mesure d'un traceur fluorescent en présence d'ions iodure

Pour que le mécanisme de désactivation puisse intervenir, il faut que les

molécules de substance fluorescente à l'état singulet et les ions inhibiteurs migrent les uns vers les autres (cf A.3.2.4.a).

ANDRE et STEINMETZ [A15] ont suggéré de réduire le phénomène de désactivation en faisant obstacle à la diffusion des molécules, c'est-à-dire en augmentant la viscosité de la solution (cf A.3.4.2.) et éventuellement, en réduisant la température (cf A.3.4.3.).

Ainsi ces auteurs montrent qu'en augmentant la viscosité par addition de glycérine dans l'eau, l'effet inhibiteur pour l'ion iodure par exemple est réduit de 80% et, qu'en associant à l'augmentation de viscosité une diminution de température, l'effet inhibiteur de l'ion I^- peut être réduit de 90% [A15].

A.3.3. INFLUENCE DES PHENOMENES PHOTOCHIMIQUES

La photodégradation des produits fluorescents est un phénomène général. Par ailleurs, les produits de photolyse apparaissant dans le milieu sont susceptibles de perturber le phénomène en réalisant une absorption parasite ou une désactivation de l'état excité fluorescent.

A.3.3.1. DEGRADATION PHOTOCHIMIQUE

a) Aspect théorique

Les traceurs fluorescents peuvent être excités, nous l'avons vu au chapitre A. dans un état triplet (T) à la suite d'une transition intersystème. Ce serait dans cet état triplet de grande durée de vie (de l'ordre de 10^{-2} seconde) que surviendraient les réactions responsables de la dégradation photochimique des colorants fluorescents.

b) Travaux expérimentaux

Les travaux expérimentaux effectués ne sont pas rigoureux; les résultats ont été établis lors d'expériences de terrain, et prêtent à de nombreux commentaires.

Le fait, par exemple, que le flux lumineux agissant sur le traceur ne puisse pas être déterminé de façon quantitative, conduit à des résultats qui ne peuvent être que relatifs.

Les observations de FEUERSTEIN et SELLECK [A4] résumées dans le tableau ci-après ont été confirmées au SARR par LACHENAL et DESCLEE [A15].

	ciel nuageux	forte insolation
Rhodamine B	- 0,02 % /h	50 % en 31 h
Sulfo Rhodamine B	- 0,01 % /h	50 % en 68 h
Uranine	- 0,25 % /h	50 % en 3 h

Ces expérimentateurs et d'autres auteurs cités par MOLINARI [A2] ont tous mis en évidence le très mauvais comportement de l'Uranine vis-à-vis de la lumière solaire et le fait que la photodécomposition semble être indépendante de la concentration en traceur. Ce phénomène dépendrait essentiellement de la nature du traceur et de l'intensité de l'insolation.

Paradoxalement, les essais effectués au SARR par Mlle DELAUNE et nous-même ont montré que, quel que soit le traceur, le signal de fluorescence d'un échantillon placé dans la cellule de mesure d'un fluorimètre restait pratiquement immuable pendant des durées d'irradiation supérieures à 10 heures.

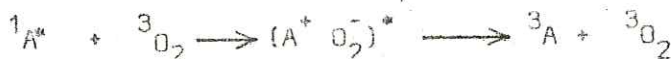
On notera que, selon YGUERABIDE (cité par ANDRE [A14]), la présence d'un solvant comme l'alcool améliore la stabilité photochimique de solutions de colorants comme la Rhodamine B.

A.3.3.2. PHOTO OXYDATION PAR L'OXYGENE MOLECULAIRE

a) Aspect théorique

L'oxygène et d'autres gaz paramagnétiques tel que NO sont rendus responsables de l'extinction de fluorescence d'une molécule organique excitée dans son état singulet S_1 par passage à l'état triplet T_1 par une transition intersystème.

Le processus de transition intersystème semble s'effectuer par l'intermédiaire d'un complexe transitoire entre le soluté excité et la molécule d'oxygène:



Comme on l'a vu en A.2.1.2. l'état triplet reparé dans cette expression

par l'exposant 3 ainsi formé se caractérise par un temps de vie beaucoup plus long que celui de l'état singulet excité. Il sera plus susceptible de favoriser des processus de désactivation non radiatifs par collisions, provoqués par des impuretés telles que l'oxygène (ou des impuretés produites par la photodécomposition du soluté) [A11].

b) Travaux expérimentaux

FEUERSTEIN et SELLECK [A4] ont montré que l'agitation d'une solution de traceurs fluorescents à l'abri de la lumière en présence d'air provoquait une perte de l'intensité de fluorescence. Ces mesures qualitatives ont été confirmées à plusieurs reprises au SARR par STRICH et ROCHON et vérifiées par nous-même. Une agitation dans un erlen en verre, à l'abri de la lumière, à 25°C, provoque une oxydation se traduisant par :

Rhodamine B	:	60 % de perte en 48 h
Rhodamine WT	:	50 % de perte en 48 h
Sulforhodamine G	:	30 % de perte en 48 h

A.3.3.3. PHOTO OXYDATION PAR DES IONS METALLIQUES

La présence de certains ions métalliques tel Fe^{3+} dans des solutions de traceurs fluorescents augmente le taux de conversion intersystème dans les molécules organiques de ces substances [A11].

LINSCHITZ et PEKKARINEN cités par GUILBAULT [A11] invoquent la formation d'un complexe à l'état excité entre un ion métallique et un état singulet excité d'une molécule de traceur fluorescent dans lequel l'ion agit comme donneur d'électrons.

Certains auteurs tels WARNES, DODSON et WEHRY, cités par [A11], en prenant l'exemple de la riboflavine, ont montré qu'il y a transfert d'énergie du singulet de la riboflavine à un état excité de l'ion métallique Fe^{2+} .

LINDQVIST cité par ANDRE [A14] signale, qu'en présence d'un cation Fe^{3+} , la dégradation photochimique de la fluoresceine est plus importante qu'en présence de O_2 et correspondrait au processus :



T_1 étant un corps fluorescent à l'état triplet excité et X^+ un produit non fluorescent.

A.3.3.4. PHOTOREDUCTION

Cette photoréduction n'est mise en évidence qu'avec des réducteurs forts. On a vu en effet en A.3.2.4. que des réducteurs faibles, comme certains alcools, loin de diminuer la fluorescence des solutions de traceurs fluorescents, au contraire l'exaltaient.

LINDQVIST cité par ANDRE [A14] a utilisé comme réducteur l'Éthylène-diamine tetracétique (EDTA) et l'Allyl-thiouré (ATU) et a montré qu'il réagissent avec l'état triplet de l'uranine selon le processus :



où R est une forme réduite de la fluoresceine.

A.3.4. INFLUENCE DES CONDITIONS PHYSIQUES

A.3.4.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTANCE FLOUORESCENTE

a) Aspect théorique

L'augmentation de la concentration fait apparaître les formes dimères. La présence de ces formes se traduit, comme on l'a montré en A.3.1.1.b. par

- des déplacements des spectres d'absorption et d'émission
- des modifications du rendement quantique d'émission

En outre, selon ANDRE et BOUCHY [A5], si la concentration en corps fluorescent A augmente, la probabilité de rencontre entre A^* et A, pendant la vie de A^* augmente. Le choc entre deux molécules A^* et A peut alors conduire à un processus d'auto-désactivation du type :



Un autre processus est susceptible de survenir : avec l'augmentation de la concentration, l'émission de fluorescence peut être réabsorbée par une autre molécule de produit fluorescent qui réémet à son tour une fluorescence ce processus est appelé *emprisonnement de l'émission* [A14].

b) Travaux expérimentaux

Cette influence de la concentration est parfaitement *reversible*. Quand

la concentration décroît, la forme dimère disparaît pour redonner le monomère fluorescent correspondant.

Effet de cellule : à forte concentration, la fraction de la solution se trouvant près de la source lumineuse absorbe plus de radiation que le reste de la cellule qui est ainsi soumise à un effet de filtre.

C'est cet effet de filtre, exprimé dans la Loi de BEER-LAMBERT (cf A.4.1.1.b.) qui rend compte de la non linéarité de la relation "Intensité de fluorescence en fonction de la concentration" pour des solutions très fortement concentrées de colorants xanthéniques.

L'effet de concentration n'interviendra jamais dans les mesures courantes, notre objectif résidant dans l'analyse des concentrations faibles.

A.3.4.2. INFLUENCE DE LA VISCOSITE DU SOLVANT

a) Influence sur la fluorescence en absence d'inhibiteur

La fluorescence d'un composé est affectée par la viscosité du milieu, elle augmente avec la viscosité. En effet, une augmentation de viscosité s'accompagne d'une réduction du nombre de collisions moléculaires et des transferts électroniques intersystèmes d'énergie $S_1 \rightarrow T_1$ aboutissant à des états non fluorescents [A11].

b) Influence sur l'extinction

La désactivation des molécules de fluoresceine par des sels résulte d'une interaction donneur-accepteur entre la molécule de colorant à l'état excité et les ions présents dans le milieu.

Pour que la désactivation puisse se produire il faut que la fluoresceine à l'état excité singulet et l'iodure, par exemple, migrent l'un vers l'autre. Si on limite la diffusion moléculaire en augmentant la viscosité de la solution, on limitera l'efficacité de la réaction. Les travaux d'ANDRE et STEINMETZ [A15] présentés en (A.3.2.3.) ont montré que l'extinction de fluorescence par KI peut, de cette façon, être atténuée de 90 %.

A.3.4.3. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

a) Considérations théoriques - transition $S_1 \rightarrow T_2$ [A19]

L'influence de la température sur la fluorescence des solutions est expliquée par la présence d'un second état triplet (T_2) placé légèrement plus haut sur le diagramme des niveaux d'énergie que S_1 . Dans ce cas, la transition intersystème $S_1 \rightarrow T_2$ est favorisée par l'augmentation de température.

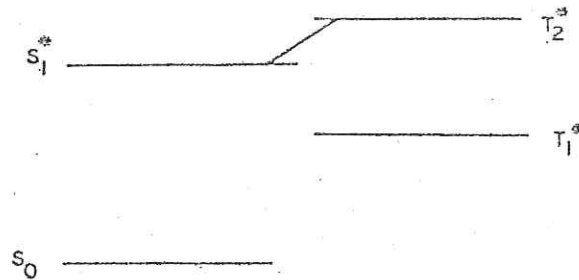


Figure A20: Diagramme d'une transition intersystème favorisée par une augmentation de température. (d'après GUILBAULT [A11])

La transition $S_1 \rightarrow T_2$ aboutissant à un état non fluorescent, on comprend alors qu'une augmentation de la température, pour la plupart des colorants provoque une diminution de la fluorescence [A11].

b) Influence sur la viscosité

Température et viscosité sont deux paramètres étroitement liés, la viscosité diminuant avec l'augmentation de température. Or, nous avons vu en (A.3.4.2.) que, lorsque la viscosité du milieu diminuait, la fluorescence diminuait aussi.

Température et viscosité conjuguent donc leurs effets sur la fluorescence. Ces effets sont parfaitement réversibles. [A7].

c) Travaux expérimentaux

Les travaux expérimentaux de FEUERSTEIN et SELLECK [A4] les ont conduit à proposer une formule empirique reliant intensité de fluorescence et température :

$$F = F_0 e^{-nt}$$

où F est l'intensité de la fluorescence à la température à laquelle s'effectue la mesure

F_0 est l'intensité de la fluorescence correspondant à une température de 0°C

t est la température à laquelle s'effectue la mesure

n est une constante pour un traceur donné

Ils ont déterminé n expérimentalement pour les trois traceurs suivants :

	Rhodamine B	Sulforhodamine B	Uranine
n	- 0,017	- 0,029	- 0,003

Au SARR, SCHOUER [A17] confirmant les travaux de MOSER [A19] a déterminé le taux de diminution de la fluorescence en fonction de la température pour la Rhodamine WT. Ces résultats joints aux résultats collationnés par ailleurs par MOLINARI [A2] sont regroupés dans le tableau suivant :

	Rh B	SulfoRh B	Uranine	Rh WT	SulfoRh G
perte de fluorescence en % par °C avec augmentation de la temp.	- 2,7%	- 2,9%	- 0,36%	- 1,6%	0%

En pratique, au laboratoire, les cellules de mesures sont thermostatées et l'influence de la température est éliminée. Pour des mesures in situ, il peut être nécessaire de faire les corrections en se reportant au tableau ci-dessus.

A.3.5. PANORAMA RECAPITULATIF DES PHENOMENES INFLUANT SUR LA FLUORESCENCE

A.3.5.1. LES TROIS GRANDES CLASSES DE MECANISMES INFLUANT SUR LA FLUORESCENCE DES SOLUTIONS

On peut dégager de notre exposé théorique (A.3.1.) par lequel débutait le présent chapitre, comme de l'examen détaillé des différents paramètres affectant la fluorescence (A.3.2. à 4.), trois grandes classes de mécanisme influant sur la fluorescence des solutions, à savoir :

- les mécanismes qui provoquent des modifications structurales du corps fluorescent

- ceux qui, modifiant seulement les états énergétiques, provoquent un déplacement et une altération des spectres d'émission et de fluorescence
- enfin, ceux qui, favorisant les processus de désactivation non radiatifs, provoquent une diminution du rendement quantique de fluorescence

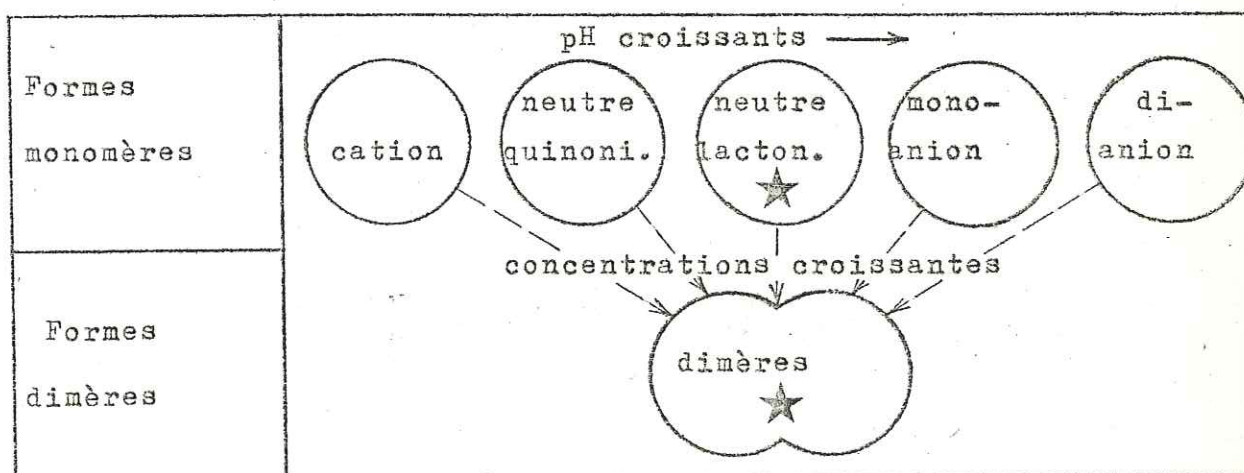
Ce classement est évidemment très schématique et ne peut prétendre dénouer l'extrême intrication des phénomènes réels.

Dans les considérations qui suivent, comme dans celles qui précèdent, il est le plus souvent fait appel à l'exemple de la fluoresceine, colorant qui a évidemment fait l'objet des études les plus approfondies.

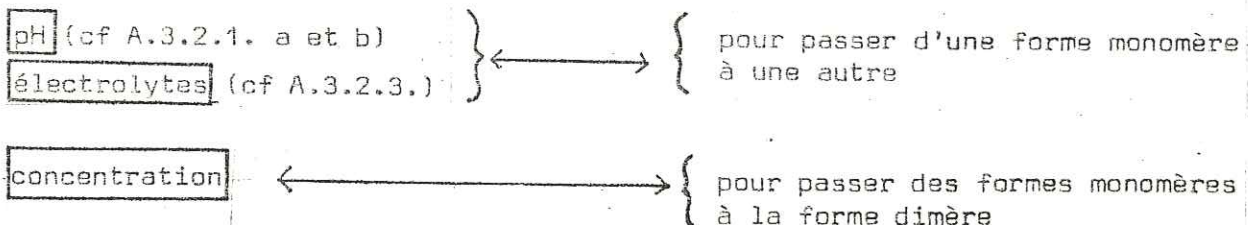
On doit néanmoins considérer que la plupart des conclusions qui s'en dégagent peuvent être étendues à tous les colorants xanthéniques, et, sans doute, à bien d'autres produits fluorescents.

A.3.5.2. FACTEURS PROVOQUANT DES MODIFICATIONS STRUCTURALES DU PRODUIT FLUORESCENT

Le schéma suivant dresse le tableau des formes structurales de la fluoresceine dont deux d'entre elles (la forme neutre lactonique et la forme dimère) présentent des fluorescences faibles ou négligeables (★).



Les facteurs essentiels permettant de passer d'une des formes structurales à l'autre, et, provoquant par conséquent, le changement de nature des spectres, sont :



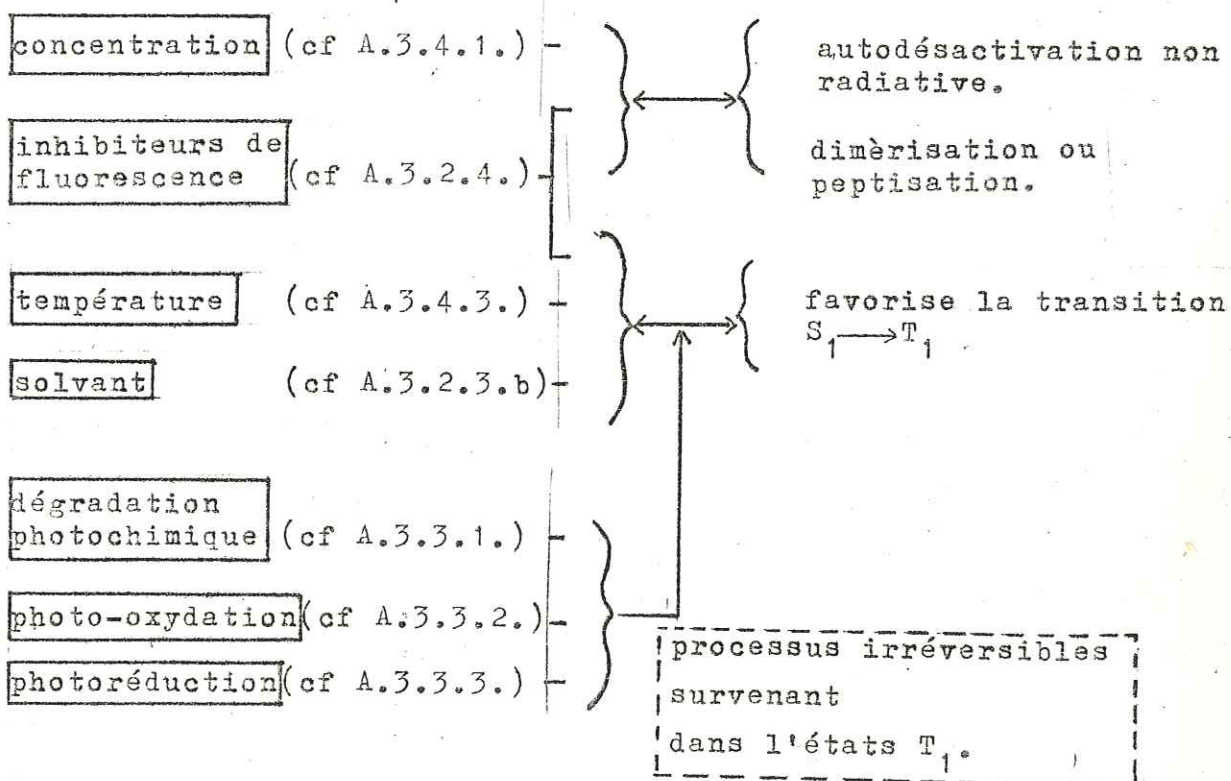
A.3.5.3. FACTEUR PROVOQUANT LE DEPLACEMENT ET L'ALTERATION DES SPECTRES

Tout en notant que le déplacement et l'altération des spectres peuvent aussi avoir pour cause les facteurs précédents (A.3.5.2.), le facteur qui produit spécifiquement cet effet est :

nature du solvant (cf A.3.2.3.b)

A.3.5.4. FACTEURS MODIFIANT LE RENDEMENT QUANTIQUE DE FLUORESCENCE

a) Facteurs favorisant les processus de désactivation



On notera que, à l'exception de la plupart des phénomènes photochimiques, ces phénomènes sont, en général, réversibles.

b) Facteurs entravant l'action des facteurs précédents

viscosité (cf A.3.4.3b) \longleftrightarrow réduit la mobilité des ions

solvant (cf A.3.2.3.c) \longleftrightarrow s'oppose aux effets de concentration

A.4. OPTIMISATION DES MESURES DE FLUORESCENCE

A.4.1. RAPPELS SUR LES MESURES DE FLUORESCENCE

A.4.1.1. PRINCIPE DE LA MESURE

a) Colorimétrie et fluorescence

Deux techniques optiques peuvent être employées pour mesurer la concentration d'un produit fluorescent en solution :

- la mesure colorimétrique basée sur le phénomène d'absorption réservée aux substances non fluorescentes.
- la mesure fluorimétrique reposant sur le phénomène de fluorescence que présentent certains produits en solution.

Le gain majeur de sensibilité de la mesure de fluorescence sur la colorimétrie est lié au principe même de la fluorescence.

Alors qu'une mesure de colorimétrie s'effectue par différence des intensités respectives des faisceaux lumineux d'entrée et de sortie, en fluorimétrie c'est le faisceau de sortie seul qui, en pratique, est analysé, et le rapport "signal/bruit", qui caractérise la qualité de la mesure, est considérablement amélioré.

En outre, la fluorimétrie, qui requiert la sélection successive des rayonnements d'excitation et d'émission, présente l'avantage de constituer un système de discrimination à deux étages, les sélecteurs, monochromateurs ou filtres primaire et secondaire, étant pratiquement indépendants l'un de l'autre.

b) absorptiométrie : loi de BEER-LAMBERT

La loi de BEER-LAMBERT s'exprime par la relation :

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

où

$\log_{10} \frac{I_0}{I}$	est la densité optique ou absorbance de la solution
c	la concentration en mole l^{-1}
l	le chemin optique en cm
ϵ	le coefficient d'extinction molaire

c) Cas des faibles concentrations : relation entre intensité de fluorescence et concentration

Loi de BEER-LAMBERT appliquée à la fluorescence

Plusieurs auteurs donnent des relations empiriques entre l'intensité de fluorescence et la concentration [A17]. Nous retiendrons celle donnée par PARKER A7.

Par définition on écrit que l'intensité de fluorescence est égale au taux de lumière absorbée en quanta.sec.⁻¹ multiplié par le rendement quantique de fluorescence (cf A.2.4.2.c) :

$$F = (I_0 - I)\phi$$

En appliquant la loi de BEER-LAMBERT l'expression devient :

$$F = I_0(1 - e^{-x})\phi \quad \text{avec } x = 2,3 \text{ ccl}$$

soit, en faisant un développement limité :

$$F = I_0 \cdot x \left(1 - \frac{x}{2} + \frac{x^2}{6} \dots \dots \dots \right) \phi$$

Si la densité optique de la solution est faible, ce qui est généralement le cas, l'expression devient :

$$F = I_0 \cdot 2,3 \text{ ccl} \phi$$

Discussion de l'équation obtenue [A7]

L'erreur introduite dans cette équation en négligeant les autres termes du développement limité peut être interprétée comme un effet de filtre dû à la solution lorsque les concentrations augmentent (cf A.3.4.1.). Ce phénomène n'apparaît que pour de très fortes concentrations (de l'ordre de $10^{-5} \text{ kg.l}^{-1}$), ce qui ne se produit jamais en fluorimétrie. Cette équation indique que pour une substance donnée en solution diluée, l'intensité de fluorescence est proportionnelle au produit de la concentration par l'intensité de lumière excitatrice I_0 .

Cette expression montre, de plus, la différence fondamentale entre fluorimétrie et absorptiométrie. Dans l'absorptiométrie la concentration est proportionnelle à $\log_{10} \frac{I_0}{I}$ et le facteur limitant le minimum de concentration détectable est le minimum mesurable de la différence $(I_0 - I)$, ce qui donne, dans le meilleur des cas 10^{-8} M.l^{-1} . A11.

En fluorimétrie, la sensibilité n'est en principe limitée que par le maximum de puissance de la source lumineuse et non pas par la précision avec laquelle on peut mesurer une intensité de lumière. On peut alors descendre en sensibilité jusqu'à $10^{-12} \text{ M.l.}^{-1}$ [A11]. En fait, il faut adopter un compromis entre l'intensité de la source lumineuse et la dégradation photochimique du traceur.

A.4.1.2. PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT D'UN APPAREIL DE FLUORESCENCE

a) Schéma optique (fig A 21)

La lumière émise par la source (S) traverse un monochromateur primaire (F_1) (filtre ou réseau) qui sélectionne la longueur d'onde d'excitation propre à provoquer la fluorescence de l'échantillon à mesurer. La lumière monochromatique traverse la cellule, et excite la fluorescence de l'échantillon. La longueur d'onde de fluorescence émise, plus grande que la longueur d'onde d'excitation, est sélectionnée par un monochromateur secondaire (F_2). Elle est ensuite détectée et amplifiée par un photomultiplicateur puis enregistrée.

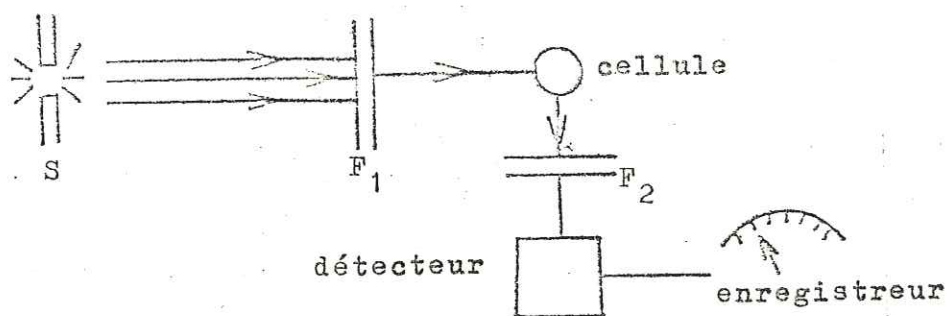


Figure A21: Schéma optique d'un appareil de fluorescence.
(d'après A23)

b) Géométrie de la cellule de mesure

Suivant la géométrie de la cellule de mesure, on aura différents types de courbes de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration.

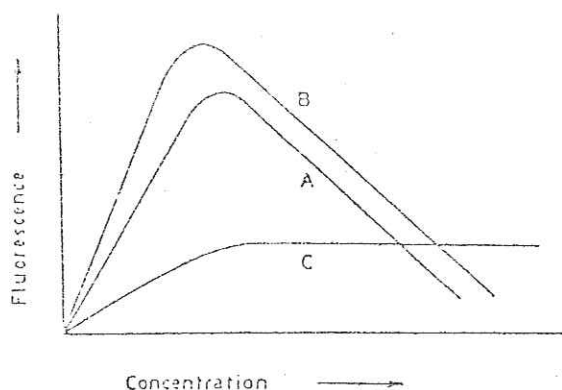





Figure A22: Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour trois géométries de cellules données. (d'après GUILBAULT A11)

- A Détecteur en ligne 
- B Détecteur à 90° 
- C Détecteur de surface 

La plupart des appareils de mesure utilisés, comme ceux dont nous disposons correspondent au cas de figure B, pour les raisons de polarisation de la lumière diffusée évoquées en (A.2.2.1.). Les concentrations analysées comprises entre 10^{-11} kg.l⁻¹ à 10^{-5} kg.l⁻¹, sont toutes situées sur la part montante linéaire de la droite (B).

A.4.1.3. SPECTROMETRIE OPTIQUE

Alors que dans un fluorimètre, la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission (ou de fluorescence) sont fixes, et ont pour valeurs respectives la valeur du pic d'excitation et d'émission du produit à analyser, dans un spectrofluorimètre, on peut faire varier de façon constante la longueur d'onde d'excitation ou la longueur d'onde d'émission, ou encore les deux à la fois. (cf A.5.2.)

a) Spectres d'excitation et d'absorption

Dans l'équation dérivée de la loi de BEER-LAMBERT qui donne l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration (cf A.4.1.1.c), l'intensité de fluorescence est proportionnelle à $I_0 \phi$. Comme l'on fait de sorte que l'intensité de la lumière excitatrice (I_0) reste constante dans le domaine de longueurs d'onde concerné, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à $I_0 \phi$.

Or, pour des molécules de traceurs xanthéniques en solution, ϕ est voisin de l'unité (cf A.2.4.2.c) et, ce, pour toutes les longueurs d'onde. Il en

que le spectre d'excitation d'une solution diluée de traceur fluorescent sera proportionnel à ϵ et qu'il sera la réplique du spectre d'absorption du composé "A7". Dans la suite du texte nous ne ferons plus de distinction entre spectre d'excitation et spectre d'absorption.

Un spectre d'excitation est obtenu en faisant varier les longueurs d'onde d'excitation, en laissant la longueur d'onde d'émission fixe et voisine de la valeur du pic de fluorescence. Le spectre est alors une courbe qui représente l'intensité de l'excitation, pour une longueur d'onde d'émission donnée, en fonction des longueurs d'ondes d'excitation.

b) Spectre d'émission ou de fluorescence

Un spectre d'émission est obtenu en gardant la longueur d'onde d'excitation fixe (que l'on choisit en général voisine du pic d'absorption du traceur), en faisant varier les longueurs d'onde d'émission. Le spectre représente l'intensité de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation donnée en fonction de la longueur d'onde d'émission (voir figure A13 les spectres d'absorption et d'émission de la fluoresceine).

Comme l'émission de fluorescence se produit toujours à partir du niveau vibrationnel le plus bas du premier état excité de la molécule, la forme du spectre d'émission est toujours la même, indépendante de la longueur d'onde de la lumière excitatrice et donc caractéristique du produit analysé (cf A.2.3.1.).

C'est à partir du spectre de fluorescence que l'on fait la discrimination et le dosage des traceurs fluorescents. Nous verrons qu'il est possible de faire varier à la fois les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour mettre en oeuvre ce que nous appelons "méthode du pas constant" préconisée par BEHRENS (cf A.5.2.) .

c) Phénomènes parasites

Ces phénomènes résultent de la présence de la matrice et, éventuellement, de l'hétérogénéité de l'échantillon analysé. Ils se traduisent, pour les effets RAYLEIGH et TYNDALL, par une diffusion de la lumière sans modification de la longueur d'onde (cf A.2.2.1.), et, pour l'effet RAMAN, par l'émission d'un signal parasite susceptible d'interférer avec les spectres des différents traceurs analysés (cf A.2.2.2.). Intervient également la lumière

diffusées par la cuvette de mesure.

Nous verrons dans le paragraphe A.4.2. comment minimiser au mieux ces phénomènes.

A.4.1.4. DESCRIPTION SOMMAIRE ET FONCTIONNEMENT DU FLUORIMÈTRE UTILISÉ

a) Les différents éléments A22

La figure A23 montre les différents éléments du système optique du fluorimètre "TURNER 111" et son principe de fonctionnement.

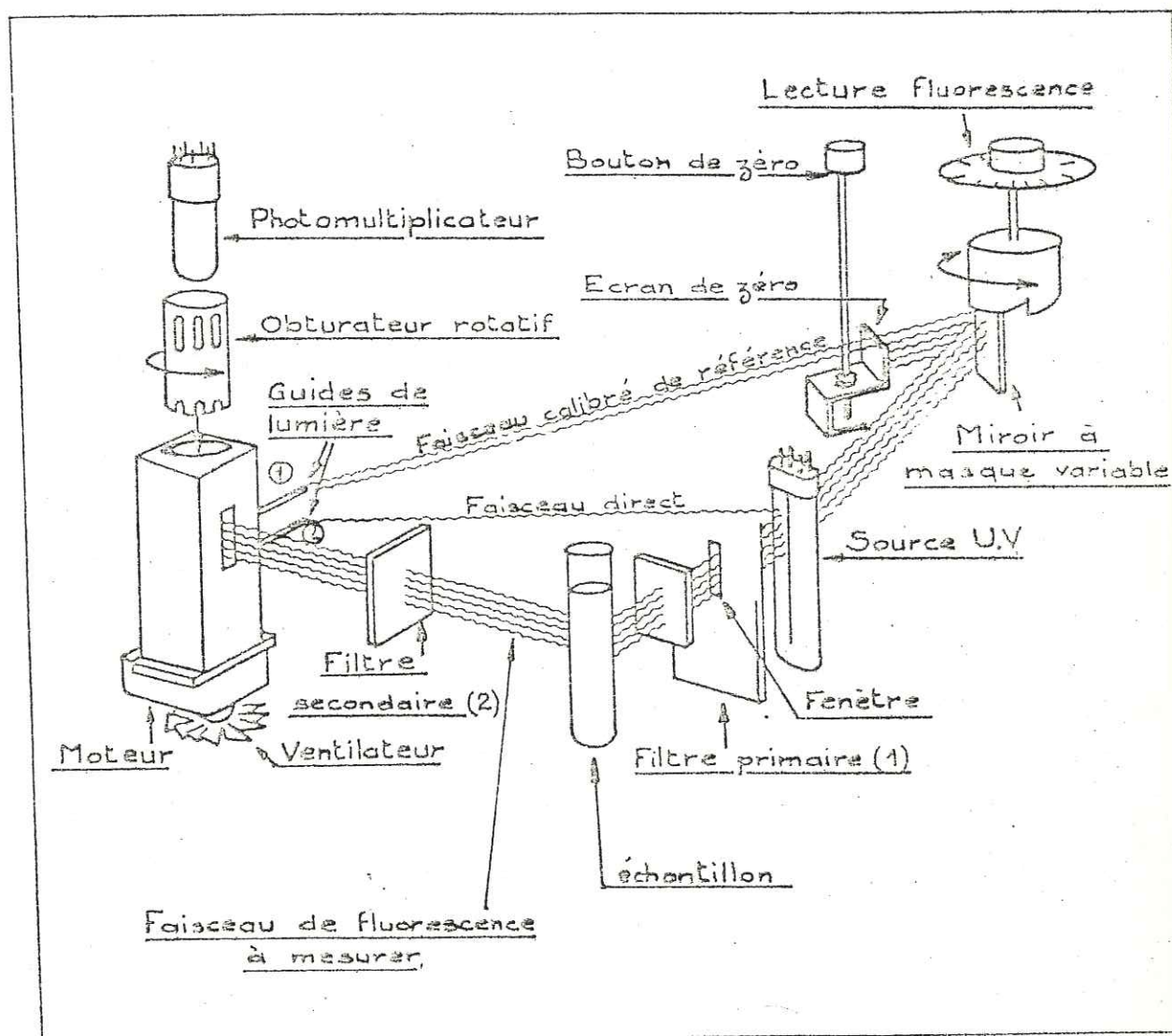


Figure A21: Schéma optique du fluorimètre "TURNER 111".
(d'après A22)

- La source de lumière qui est une lampe à vapeur de mercure

- une fenêtre coulissante percée de quatre diaphragmes pouvant laisser passer plus ou moins de lumière excitatrice suivant la sensibilité désirée
- une cuvette de mesure contenant l'échantillon à analyser placée dans une cellule thermostatée
- les filtres primaire et secondaire
- le photomultiplicateur

b) Fonctionnement de l'appareil A22 A24

L'appareil fonctionne selon une méthode de zéro réaliant à chaque instant l'égalité d'intensité entre deux faisceaux lumineux.

La source lumineuse éclaire l'échantillon après passage par une fenêtre (de dimension réglable) et d'un filtre sélectif pour le rayonnement d'excitation (filtre primaire). La solution émet ainsi sa fluorescence qui éclaire un photo-multiplificateur après passage par un filtre sélectif pour le rayonnement de fluorescence (filtre secondaire). Ce même photomultiplicateur reçoit alternativement, à travers un obturateur rotatif, ce faisceau de fluorescence et un faisceau calibré de référence. L'intensité du faisceau de référence est ajustée au moyen d'un miroir à masque variable actionné par un moteur asservi au signal du photomultiplicateur.

Le repérage de la position d'équilibre du servomoteur fournit la lecture de la fluorescence.

Au faisceau de fluorescence de la solution se superpose un faisceau direct qui, lors de l'absence du faisceau de fluorescence, éclaire le photomultiplicateur de façon à fournir le signal minimal nécessaire à la commande du servomoteur. Ce moteur asservi tourne dans un sens dépendant du signal d'erreur (signal d'erreur continu figure A 24). On obtient ce signal d'erreur en comparant la phase du signal fourni par le photomultiplicateur (figure A 24 b résultant de la composition des faisceaux de fluorescence direct et calibré de référence) et la phase d'un signal fourni par une cellule photoélectrique à gaz éclairée à l'infrarouge (de façon à ne pas perturber le signal du photomultiplicateur) après passage de l'obturateur rotatif (figure A 24 A).

Lorsque le signal fourni par le photomultiplicateur est constant (égalité du faisceau calibré de référence et du faisceau direct additionné du faisceau de fluorescence (fig. A 24 B b et d) le disque de lecture de fluorescence est stable.

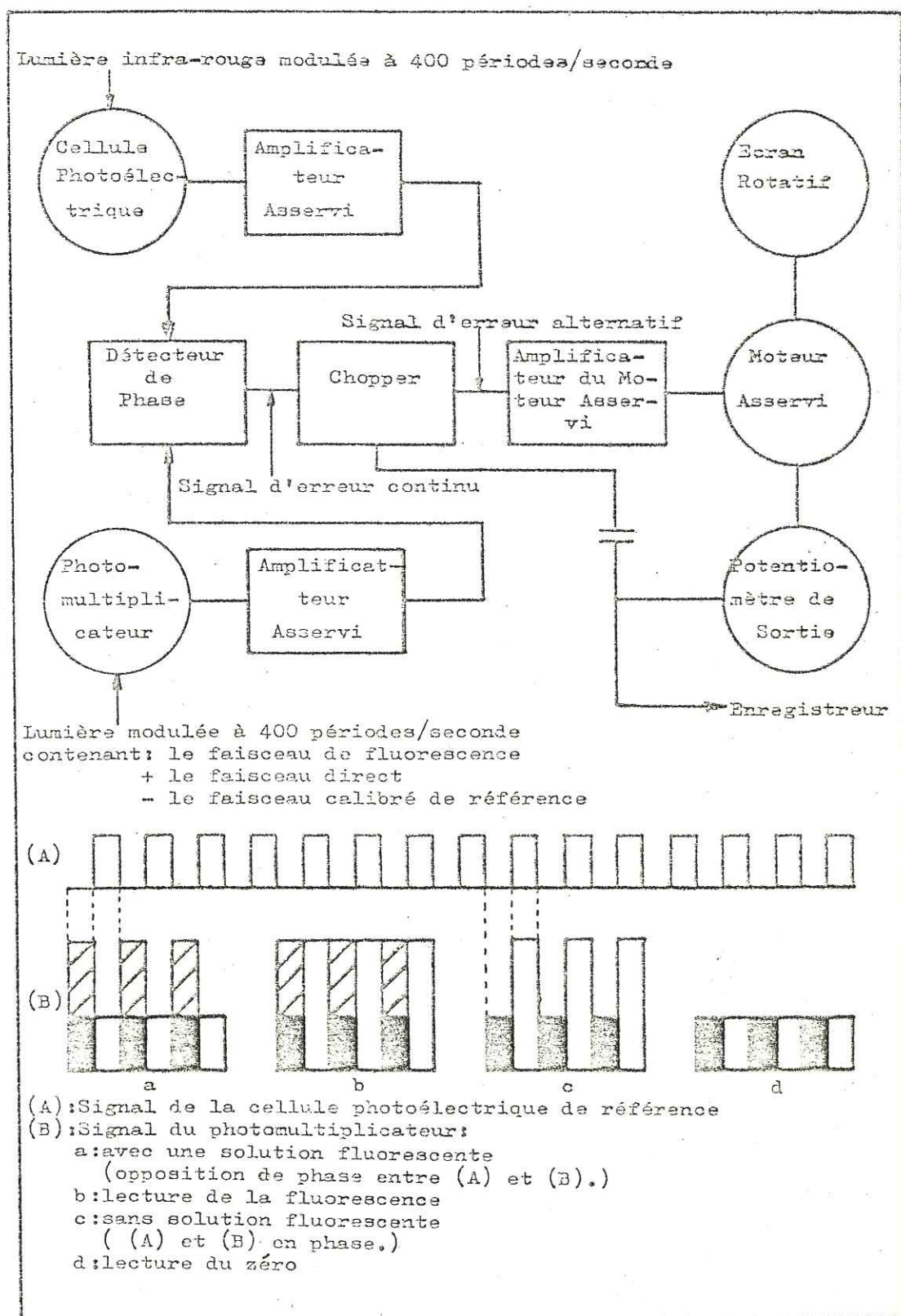


Figure A24: Schéma de fonctionnement du fluorimètre "TURNER" 111
(d'après SCHOULER A17)

La rotation du masque déplace un cadran gradué de 0 à 100 et une tension comprise entre 0,2 et 10,2 mV est fournie pour un enregistreur.

L'interprétation des signaux délivrés par cet appareil a été analysée par COROMPT A25 .

c) Influences extérieures A24

sensibilité à la lumière

Le fluorimètre "TURNER 111" est très sensible à l'éclairement de sa face arrière. Le zéro varie de six divisions suivant que la face arrière est placée à l'obscurité ou soumise à un éclairage violent

sensibilité à la température

La lecture du zéro varie de 10,5 divisions pour une variation de température de 31°C. Il faudra donc, lorsqu'on l'emploiera sur le terrain, vérifier le zéro assez fréquemment.

tension d'alimentation

La tension d'alimentation a une influence sur le zéro de l'appareil. Il est donc conseillé de l'utiliser avec une alimentation stabilisée.

d) Mise en oeuvre

au laboratoire

Le fluorimètre est équipé d'un circuit de thermostatisation pour éliminer l'influence de la température sur la mesure de fluorescence et d'une alimentation stabilisée

sur le terrain

Il est alimenté par un petit groupe électrogène portatif. La cellule de laboratoire thermostatée est remplacée par une cellule de mesure en continu.

A.4.1.5. DESCRIPTION SOMMAIRE ET FONCTIONNEMENT DU SPECTROFLUORIMÈTRE

a) Les différents constituents

La figure A 25 montre les différents composants du système optique du spectrofluorimètre "TURNER 430".

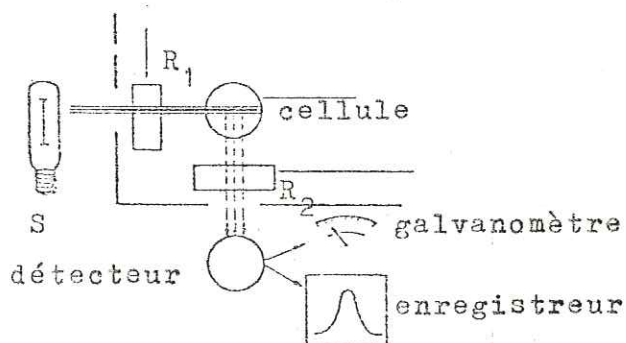


Figure A25: Schéma simplifié du spectrofluorimètre "TURNER 430".
(d'après A23)

- la source lumineuse : c'est une lampe Xenon fournissant un fort spectre continu de 250 nm à 700 nm
- les monochromateurs à réseaux
- la cellule de mesure
- un photomultiplicateur
- un enregistreur

b) Principe de fonctionnement

Le principe de fonctionnement est le même que pour le fluorimètre mais ici les filtres sont remplacés par des monochromateurs à réseaux qui permettent d'obtenir des spectres (cf A.4.1.3.). L'exploration des longueurs d'onde se fait par un moteur synchrone qui peut entraîner soit le monochromateur primaire, soit le monochromateur secondaire, soit encore les deux à la fois (cf A.5.2.)

A.4.2. PROBLEME DE LA FLUORESCENCE DU BLANC

Mesurer une grandeur physique au moyen d'une chaîne de mesure, c'est, dans tous les cas, discriminer un signal d'un *bruit de fond* parasite, ce bruit de fond prenant naissance lors du codage, de l'amplification et de la détection du signal.

En fluorimétrie, outre ce "bruit de fond" que l'on peut qualifier d'électronique, intervient la *fluorescence du blanc* : c'est-à-dire, le signal produit par l'eau (ou tout autre solvant) en absence de toute substance fluorescente. Le signal enregistré, qui se traduit en spectrofluorimétrie par l'obtention d'un spectre, ou en fluorimétrie par une mesure analogique, est donc la résultante des trois composantes suivantes :

signal de fluorescence + bruit de fond de l'appareil + fluorescence du blanc

Optimiser la mesure implique une minimisation des deux composantes parasites pour favoriser au maximum le signal de fluorescence, c'est-à-dire, une amélioration du rapport signal/bruit.

On définit la limite de détection comme le seuil de concentration en deça duquel le signal ne se distingue plus du bruit de fond (cf A.4.4.4.). En passant en revue les différents composants de la chaîne de mesure, nous allons essayer de montrer leur influence respective sur le bruit de fond et dans quelle mesure on peut espérer favoriser le signal de fluorescence.

A.4.2.1. LUMIERE DIFFUSEE RAYLEIGH-TYNDALL

Le problème de la lumière diffusée parasite qui apparaît à la longueur d'onde d'excitation se pose tout particulièrement pour les très faibles concentrations en traceurs. En effet, le signal de fluorescence, toujours très voisin de la longueur d'onde d'excitation pour les substances xanthéniques, est alors masqué par le pic du rayonnement diffusé direct.

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier le comportement de ce pic "lumière diffusée" en fonction des divers paramètres suivants :

- la longueur d'onde de la lumière d'excitation et d'émission
- la matrice employée
- la turbidité
- la nature et la forme de la cuvette de mesure

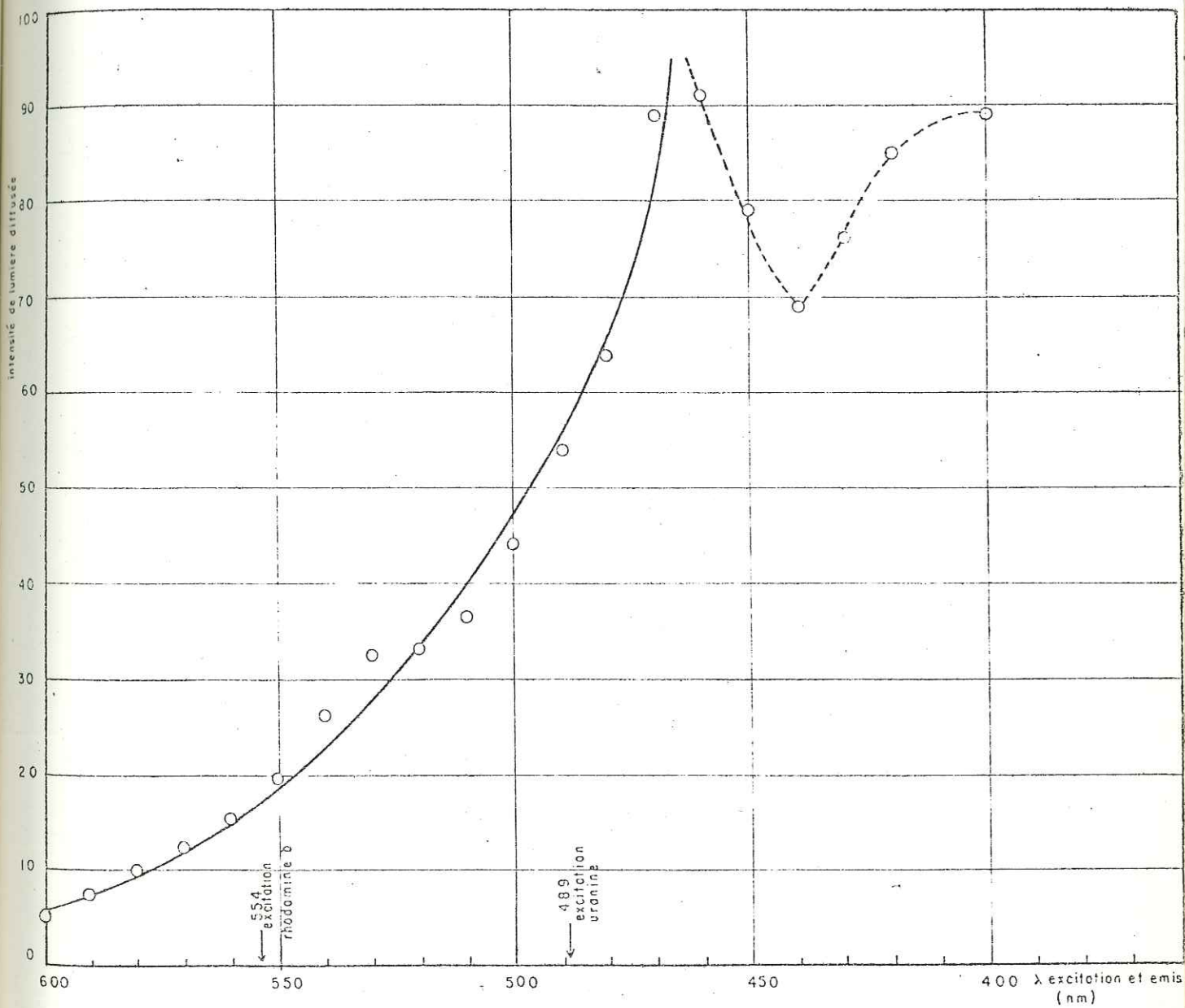


Figure A26: Variation de la lumière diffusée par de l'eau bidistillée en fonction de la longueur d'onde d'excitation. (Les longueurs d'onde des optimums d'absorption des rhodamines et de l'uranine ont été indiqués)

a) Influence de la longueur d'onde

Nous savons que, plus une radiation électromagnétique a une fréquence élevée, c'est-à-dire, une longueur d'onde petite, plus elle est énergétique et plus la quantité de lumière diffusée par le milieu est importante.

C'est ce que traduit la loi de la diffusion de RAYLEIGH pour les solutions et le phénomène de TYNDALL pour les colloïdes et les particules en suspension, établissant que l'intensité de la lumière diffusée par les "particules" d'un milieu est proportionnelle à $\tau \cdot \lambda^{-4}$ (cf A.2.2.1.). La proportion de lumière diffusée est donc beaucoup plus grande dans le violet que dans le rouge, le coefficient λ^{-4} étant six fois plus grand pour $\lambda = 455$ nm que pour $\lambda = 700$ nm.

On a représenté sur le diagramme de la figure A 26 la variation de l'intensité de la lumière diffusée RAYLEIGH en fonction de sa longueur d'onde. Cette mesure a été effectuée sur le spectrofluorimètre "TURNER 430" avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission identiques, une cuvette en quartz une sensibilité de mesure identique à celles des expériences ultérieures, le milieu diffusif étant de l'eau distillée.

Nous constatons que l'intensité de la lumière diffusée est inversement proportionnelle à λ .

Toutes choses étant par ailleurs égales, l'intensité de la lumière diffusée à la longueur d'onde de 489 nm (qui est la longueur d'onde optimale d'excitation de l'uranine) est triple de celle que l'on observe à 554 nm (longueur d'onde optimale d'excitation des Rhodamines (B ou WT)). A faible concentration le pic de lumière diffusée constitue la part essentielle du bruit de fond de fluorescence.

Remarque : la chute brutale du signal pour des longueurs d'onde inférieures à 470 nm résulte sans doute de la diminution de la sensibilité de la photocathode au-delà de la plage habituelle de mesure.

b) Influence de la matrice

En se plaçant dans les mêmes conditions de mesure que précédemment, nous nous sommes efforcés d'apprécier les importances relatives des effets RAYLEIGH et TYNDALL, en réalisant les essais décrits pages suivantes :

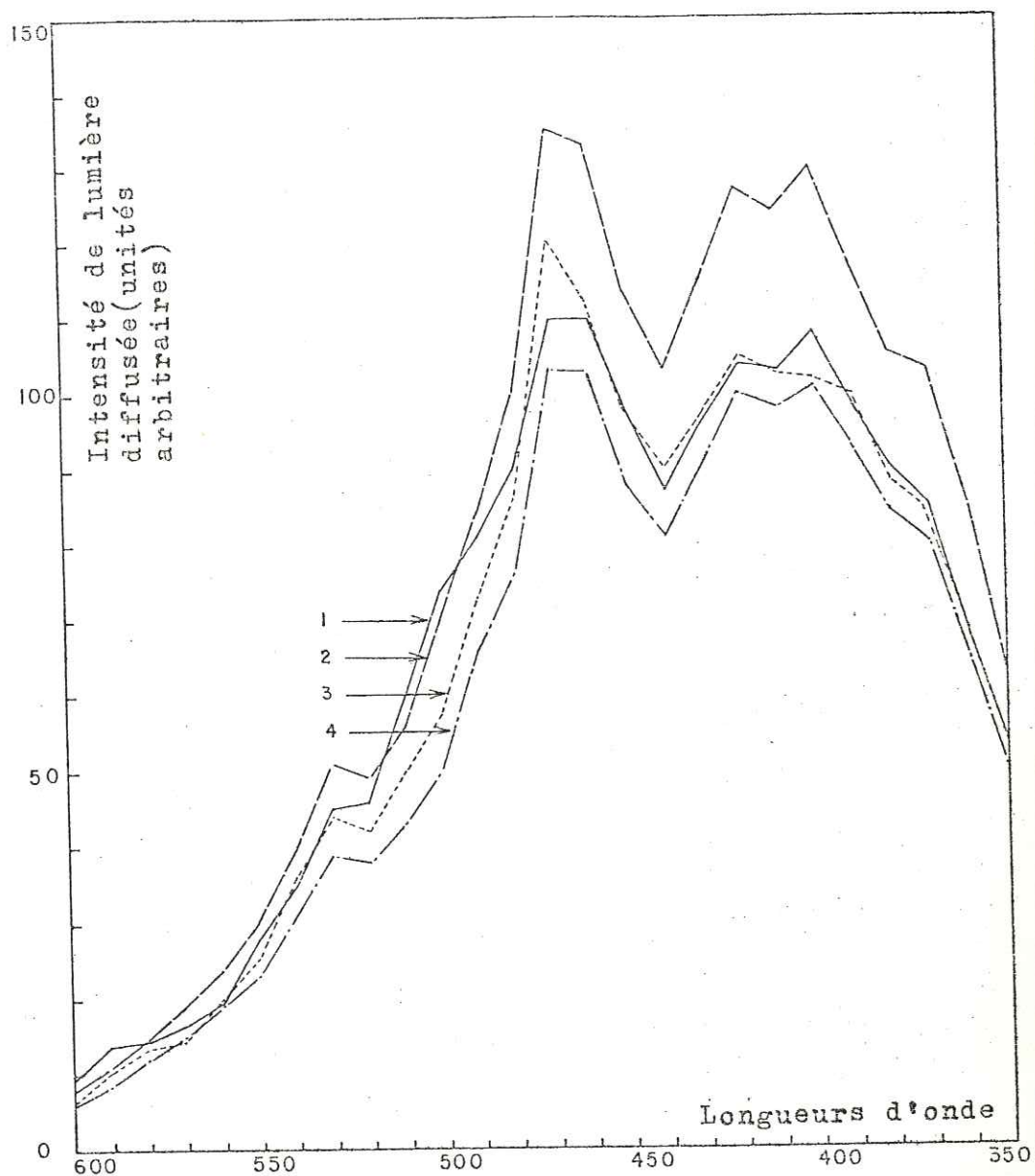


Figure A27: Variation de l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde pour quatre matrices d'eaux naturelles. 1: eau bidistillée, 2: eau source HEPAR, 3: eau des ABATILLES, 4: eau de GRENOBLE.

Comparaison de quatre matrices d'eaux naturelles

Pour les quatre eaux étudiées (eau bidistillée, eau de Grenoble, eau des Abatilles, eau Source Hepar, dans l'ordre croissant de concentration de sels dissous), nous avons obtenu des courbes pratiquement de même forme (cf. figure A 27). Les différences d'intensité observées semblent ne pas dépendre uniquement de leur teneur en sels dissous.

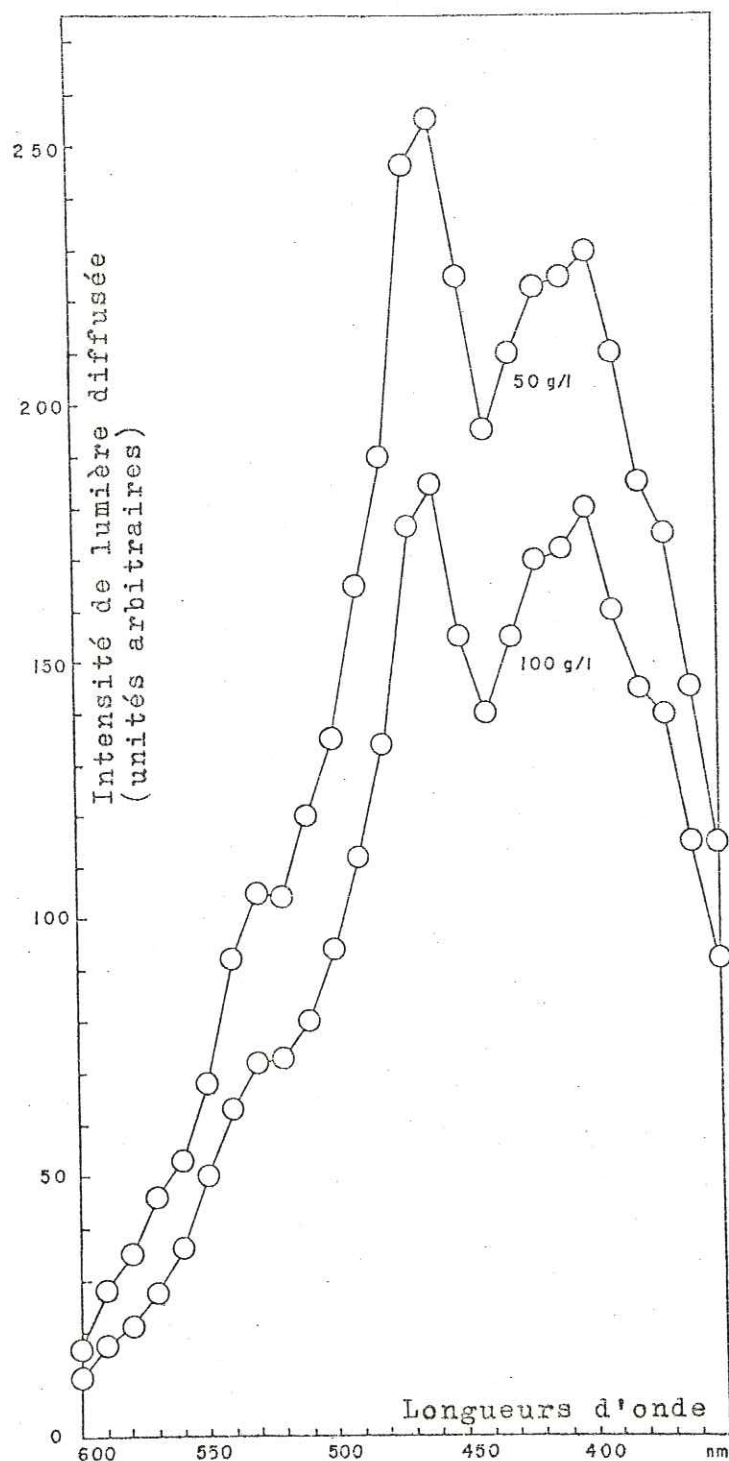


Figure A28: Variation de l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde pour deux saumures de concentration respectives de 50g/l et de 100g/l de NaCl. (Echelle d'intensités identique à celle de la figure A27)

Comparaison de saumures de concentrations différentes

La présence de chlorure de sodium amplifie la diffusion de la lumière. Notons cependant que l'intensité de la lumière diffusée dans le cas d'une saumure à 100 g/l est inférieure de moitié à celle d'une saumure à 50 g/l (cf figure A28).

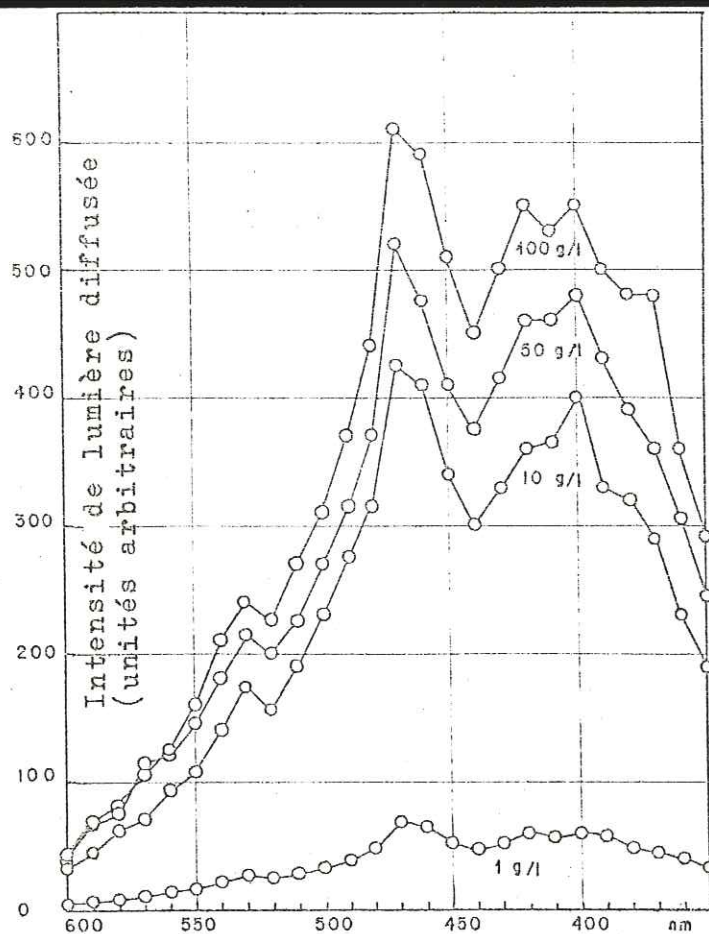


Figure A29:
Variation de l'intensité de la lumière diffusée en fonction de la longueur d'onde pour quatre valeurs de concentration de sulfate d'alumine. (Echelle d'intensité identique à celle de la figure A27 et A28.)

Comparaison de solutions de sulfate d'alumine de concentrations différentes

Pour le sulfate d'alumine, contrairement au phénomène observé dans le cas du chlorure de sodium, le rayonnement diffusé croît avec la concentration en soluté (cf Figure A29) et se révèle beaucoup plus intense que dans le cas des saumures.

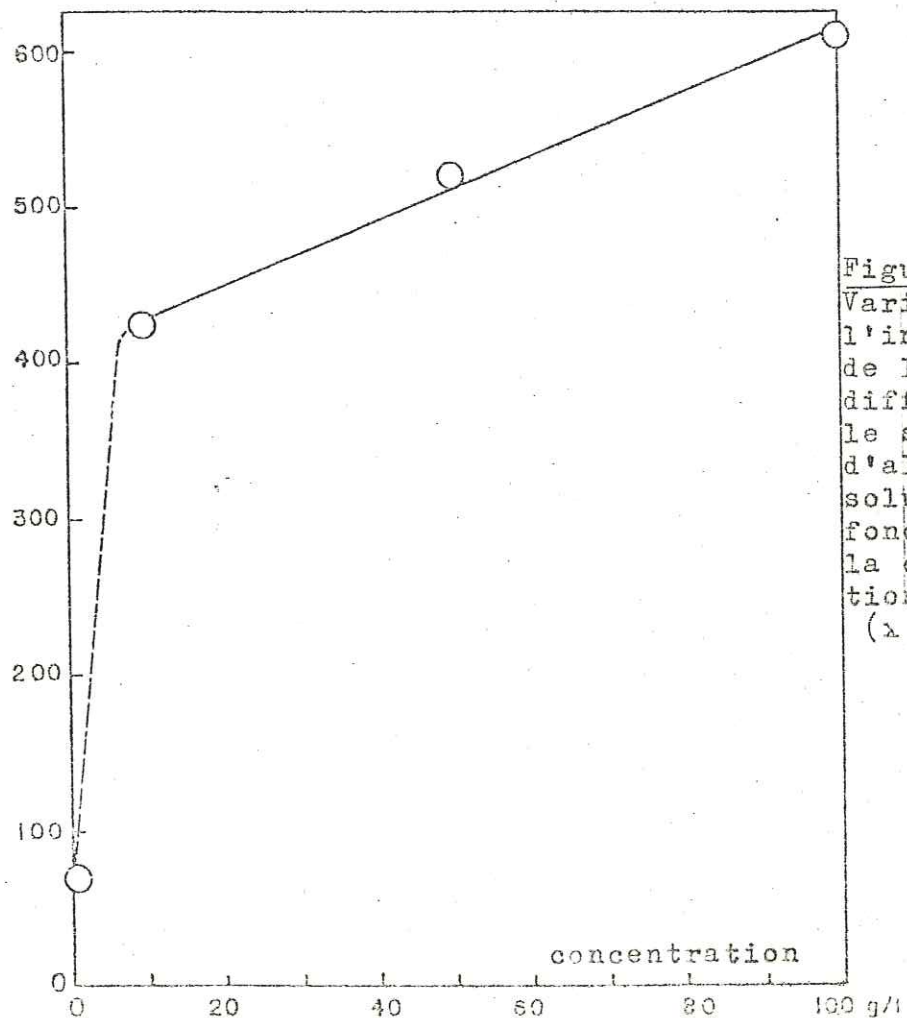


Figure A30:
Variation de l'intensité de la lumière diffusée par le sulfate d'alumine en solution, en fonction de la concentration (λ 470 nm)

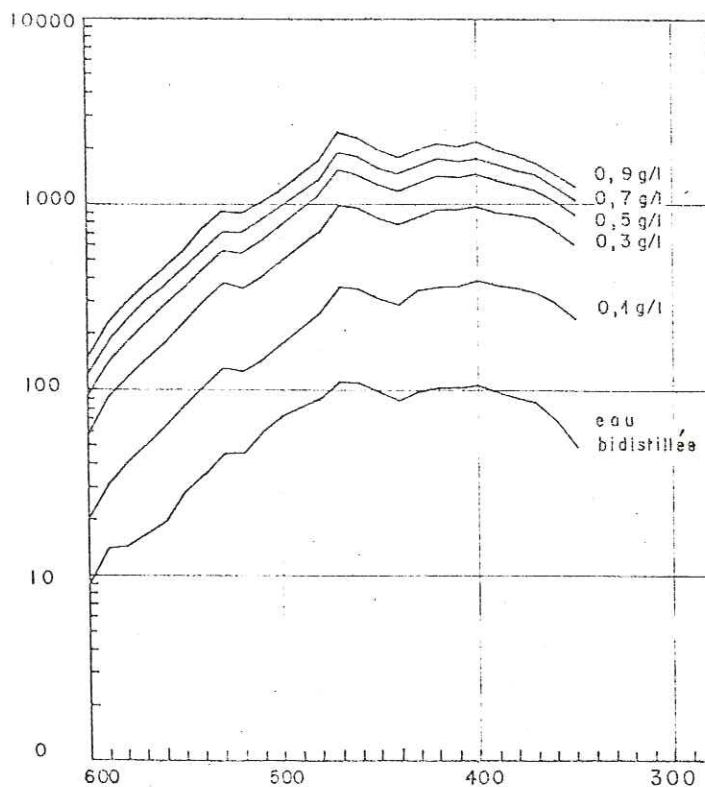


Figure A31: Variation de l'intensité de la lumière diffusée par des suspensions de bentonite en fonction de la longueur d'onde.

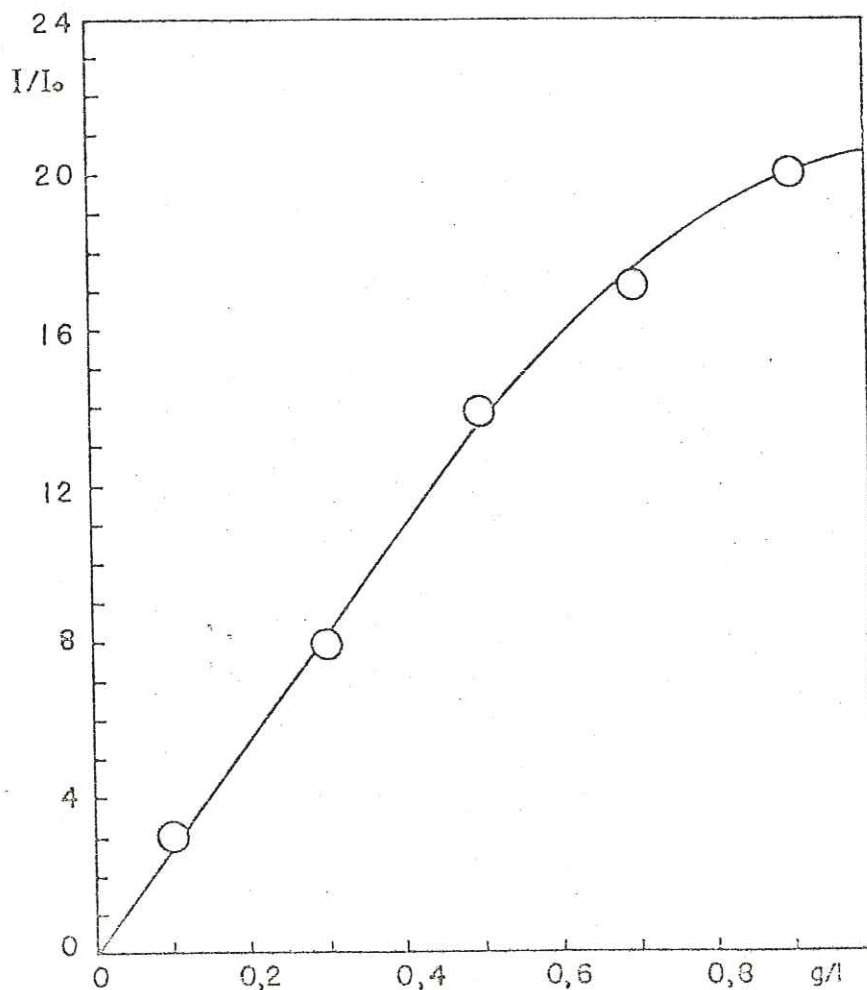


Figure A32: Variation de l'intensité de la lumière diffusée par des suspension de bentonite en fonction de leurs concentrations. (Longueur d'éclairement de 470nm)

L'interprétation de ces résultats fait appel aux mécanismes évoqués en A.2.2.1. :

- Dans les domaines de concentrations faibles, la lumière diffusée est négligeable, l'effet RAYLEIGH étant efficacement atténué par le polariseur (cf A.2.2.1.a).
- Pour les concentrations moyennes (à partir de 10 g/l environ) deux cas se présentent selon la nature de la solution :
Si, comme on peut le présumer pour le sulfate d'alumine, on n'a pas affaire à une solution vraie, la formation d'agrégat de molécules fait intervenir l'effet TYNDALL non atténué par le polariseur, l'intensité de lumière mesurée est alors proportionnelle à la concentration et l'appareil fonctionne en néphélomètre (cf c) à partir d'une certaine concentration critique (cf fig A 30).
Dans le cas du chlorure de sodium qui constitue avec l'eau une solution vraie, cet effet TYNDALL n'apparaît pas.
- Au-delà, pour les très fortes concentrations, l'effet d'écran devient prépondérant et l'intensité de la lumière mesurée décroît.

c) Influence de la turbidité

Dans cette expérience la sensibilité de l'appareil a dû être diminuée, le signal de lumière diffusé étant trop intense, ce qui nous a conduits par ailleurs à adopter une représentation semi-logarithmique.

La figure A31 représente l'intensité de la lumière diffusée pour des suspensions de bentonite de "concentrations" comprises entre 10^{-1} g/l et 9.10^{-1} g/l .

L'intensité du signal provoqué par la diffusion sur de grosses particules (cf A.2.2.1.c) est pratiquement proportionnelle, pour un couple de longueurs d'onde données, à la quantité du matériau en suspension (cf figure A32).
Là encore l'appareil fonctionne en néphélomètre.

d) Influence de la cuvette de mesure

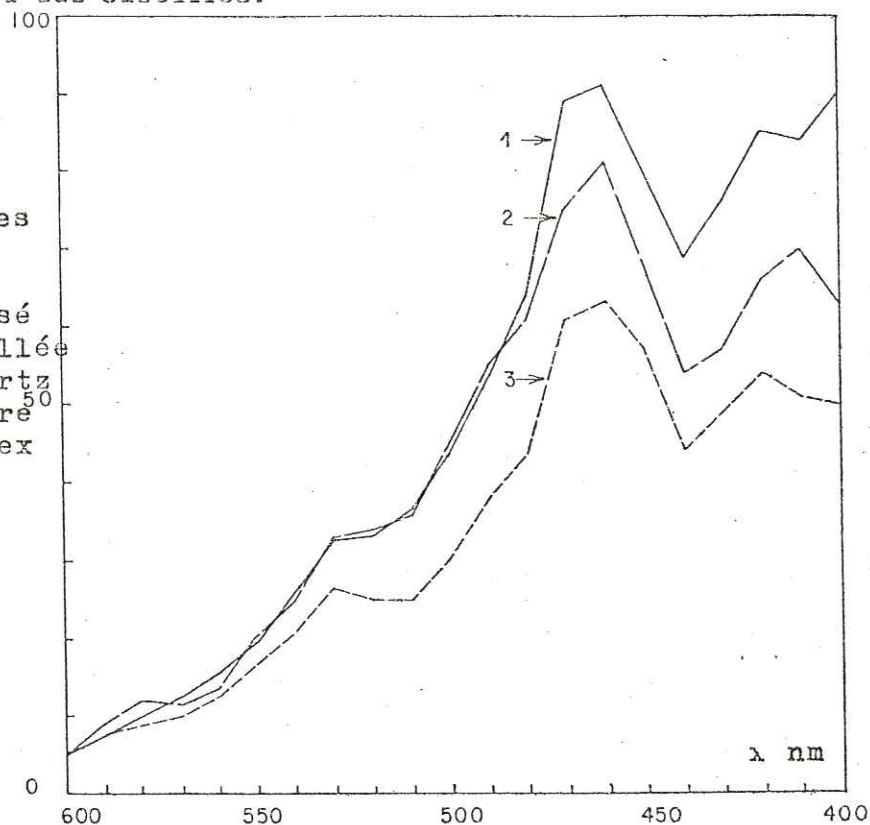
nature des cuvettes

La figure A33 permet d'apprécier l'influence de la nature des cuvettes de mesures. Les mesures ont été effectuées dans

les mêmes conditions expérimentales que a) et b), la matrice étant l'eau distillée.

Figure A33:
Influence de la nature des cuvettes de mesure sur l'intensité du rayonnement diffusé par l'eau bidistillée

1-	cuvette	en quartz
2-	cuvette	en verre
3-	cuvette	en pyrex



Les courbes obtenues ont même allure, seule l'intensité du signal change : si nous classons les cuvettes en fonction de l'intensité croissante du rayonnement diffusé nous avons :

cuvette pyrex ronde < cuvette verre ronde < cuvette carrée quartz

anisotropie des cuvettes

Les variations d'orientation d'une cuvette cylindrique de pyrex préalablement réparée se traduisent par des différences de signal de l'ordre de quelques pour cent.

e) Conclusions pratiques sur les effets de la lumière diffusée RAYLEIGH-TYNDALL

Un traceur fluorescent, analysé à faible concentration ($10^{-10} \text{ kg l}^{-1}$) présente un pic de lumière diffusé d'autant plus fort que sa longueur d'onde d'excitation est petite. L'intensité de la lumière diffusée varie en fonction de la teneur en sel dissous dans l'eau ; elle dépend de la nature et de la quantité du sel présent, mais n'est pas forcément proportionnelle à la

concentration en sels.

En fonction de la nature du sel et de la concentration se manifeste :

- l'effet RAYLEIGH fortement diminué par la présence du polariseur
- l'effet TYNDALL qui ne peut pas être réduit par un polariseur.

Lorsque l'on aura une suspension il faudra donc procéder à une centrifugation de l'échantillon avant l'analyse. L'effet de lumière diffusée est minimal pour une éprouvette en pyrex dans une gamme de longueurs d'onde de 600 à 350 nm.

Il faut repérer l'éprouvette si l'on souhaite améliorer la reproductibilité des mesures.

A.4.2.2. DIFFUSION RAMAN

Dans le paragraphe (A.2.2.2.), nous avons vu que les raies RAMAN les plus aisément observables étaient de longueurs d'onde supérieures à celle de la lumière diffusée RAYLEIGH-TYNDALL. Les différences de fréquence $\Delta\nu$ entre la raie diffusée et les raies RAMAN sont caractéristiques du solvant et ne dépendent que du solvant. Il est donc intéressant de montrer l'influence de la diffusion RAMAN de l'eau sur le spectre de fluorescence, car il participe à la fluorescence du "blanc" et peut, dans certains cas d'analyse de très faibles concentrations, être confondu avec un traceur fluorescent.

a) Raies RAMAN de l'eau

Les raies RAMAN de l'eau apparaissent pour les nombres d'onde* suivants : [A8]

$$\nu_1 = 3219 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{vibration de valence antisymétrique})$$

$$\nu_2 = 1627 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{vibration de déformation})$$

$$\nu_3 = 3445 \text{ cm}^{-1} \quad (\text{vibration de valence symétrique})$$

b) Intensité et position du spectre RAMAN de l'eau en fonction de la longueur d'onde de la lumière excitatrice

Position du spectre RAMAN de l'eau

La figure A 34 représente un spectre RAMAN obtenu sur le spectrofluorimètre à haute sensibilité. Pour une longueur d'onde d'excitation de 370 nm, le spectre RAMAN apparaît à

* On appelle nombre d'onde ν l'inverse de la longueur d'onde exprimée en centimètres. C'est le nombre d'onde par centimètre.

Figure A34: Spectre RAMAN de l'eau pour une longueur d'onde d'excitation de 370 nm.

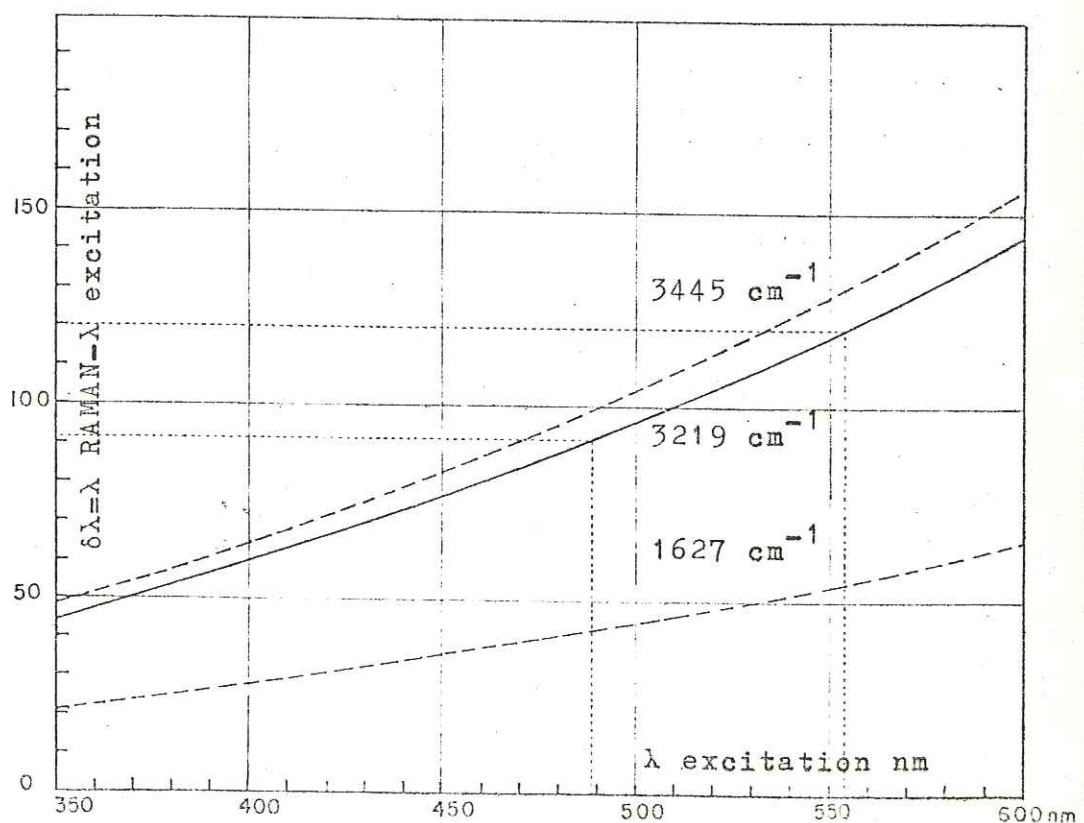
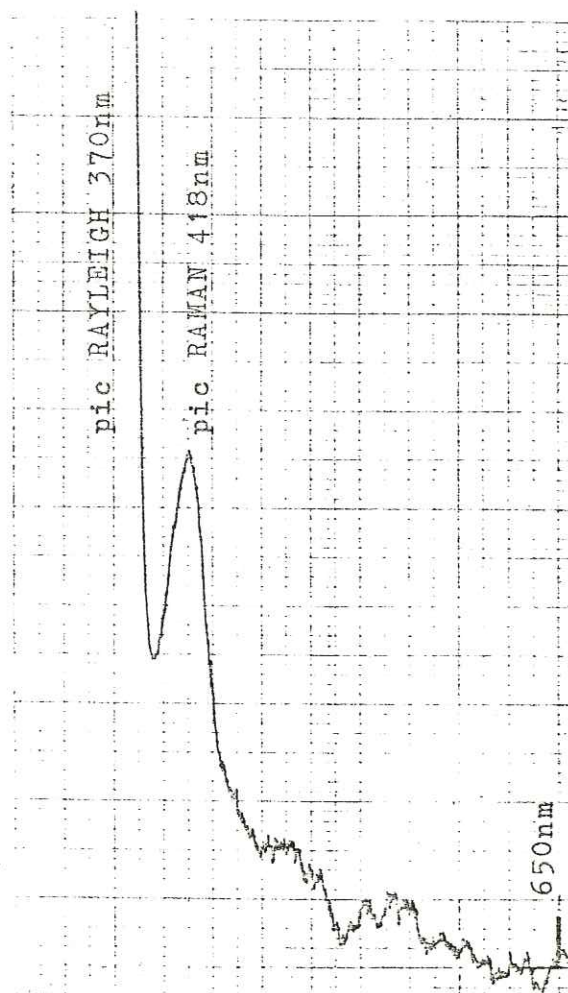


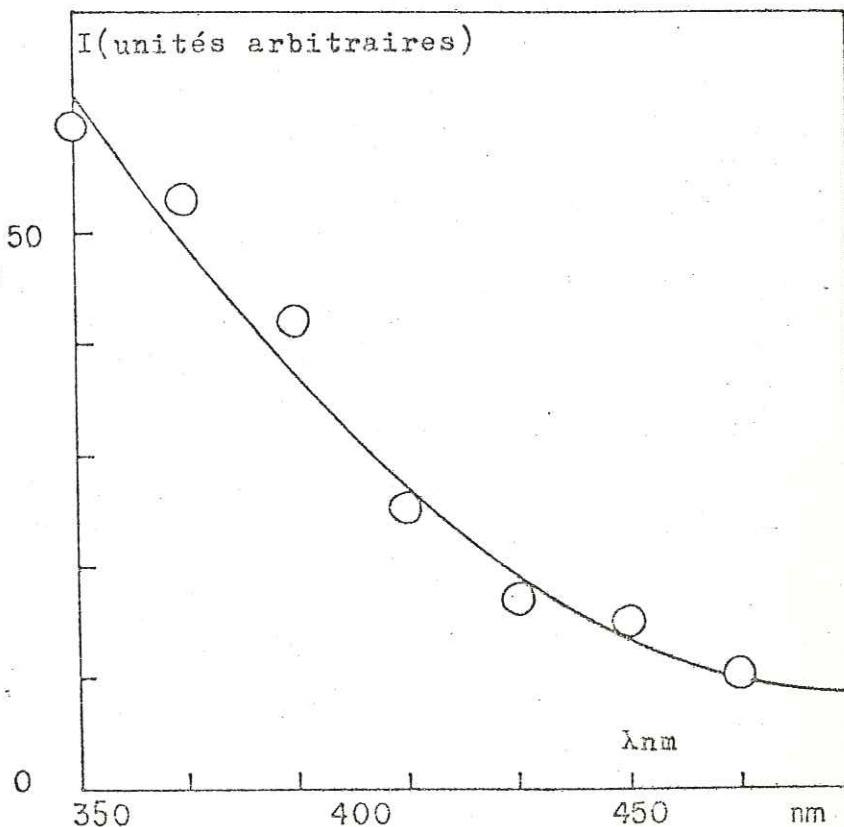
Figure A35: Evolution, en fonction de la longueur d'onde d'excitation de la différence de longueur d'onde entre les raies RAMAN et l'excitation.

418 nm.

Au cours de toutes nos expériences, nous n'avons observé que les raies RAMAN négatives ou raies STOKES correspondant aux nombres d'onde ν_1 : 3219 cm^{-1} et ν_2 : 3445 cm^{-1} . Ces deux raies sont confondues. Les autres raies RAMAN plus faibles n'apparaissent pas (figure A 34).

Sur la figure A 35 nous avons représenté l'évolution, en fonction de la longueur d'onde d'excitation, de la différence $\Delta\lambda$ entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde du pic RAMAN correspondant (pic résultant du chevauchement des raies ν_1 et ν_2). Nous remarquons que, pour ce pic RAMAN observable cette différence $\Delta\lambda$ varie entre un minimum de 60 nanomètre (nm) pour une longueur d'onde d'excitation de 400 nm à 145 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 600 nm, et que, pour les optimums d'excitation de l'uranine et de la Rhodamine B ou WT, ces différences $\Delta\lambda$ correspondantes sont respectivement 92 nm et 120 nm.

Figure A36: Intensité 50 du pic RAMAN de l'eau en fonction de la longueur d'onde d'excitation.



La figure A 36 représente la variation d'intensité du pic raman de l'eau en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Cette intensité augmente avec l'énergie de la lumière d'excitation.

c) Conclusion

Lors des mesures de faibles concentrations de traceurs, l'intensité relative de l'effet RAMAN de l'eau devient suffisamment importante pour prêter à confusion. Cette ambiguïté peut être levée si l'on prend soin de procéder à un enregistrement du spectre de la matrice (bruit de fond) et de situer avec précision les abscisses relatives des différents phénomènes émissifs ou dispersifs supputés.

A.4.3. PROBLÈME DE LA SÉLECTION DES LONGUEURS D'ONDE

Nous avons vu que tous les traceurs fluorescents ont des longueurs d'onde d'excitation et d'émission caractéristiques, les longueurs d'onde d'excitation étant naturellement plus courtes que les longueurs d'onde d'émission.

Que ce soient des appareils à filtres ou des appareils à monochromateurs, on s'applique en général à sélectionner une longueur d'onde d'excitation la plus monochromatique possible et voisine de la longueur d'onde du maximum d'absorption (ou d'excitation) de la substance fluorescente - c'est le rôle du filtre ou du monochromateur primaire - puis à sélectionner, par un filtre ou monochromateur secondaire, la longueur d'onde de fluorescence qui seule est analysée.

Un des problèmes majeurs en fluorimétrie réside donc dans le choix des longueurs d'onde d'excitation et d'émission, c'est-à-dire, le choix des filtres primaires et secondaires pour les fluorimètres, et, des caractéristiques et du réglage des monochromateurs, pour les spectrofluorimètres.

A.4.3.1. LES FILTRES COLORES A 17

Ce sont en général des filtres en verre teinté. Il en existe deux grandes catégories.

a) Les filtres passe-bande

Ils ne laissent passer la lumière que dans une région déterminée du spectre. Ils sont caractérisés par la longueur d'onde du pic de transmission.

La monochromatisme peut être amélioré par la combinaison de plusieurs de ces filtres.

Ce type de filtres est utilisé comme filtre primaire pour sélectionner une longueur d'onde d'excitation.

b) Les filtres passe-haut

Ces filtres laissent passer uniquement les longueurs d'onde supérieures à une valeur de "coupe" donnée, en bloquant toutes les longueurs d'onde inférieures. Ce sont les filtres secondaires des fluorimètres qui, ainsi, évitent l'interférence avec la longueur d'onde d'excitation. Par convention, la coupe d'un tel filtre est définie par la longueur d'onde correspondant à une transmission de 37 % .

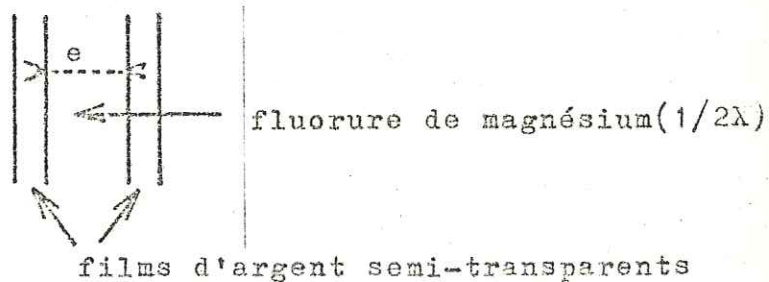
c) Les filtres atténuateurs

Il existe également des filtres atténuateurs capables de réduire la transmission de lumière de fluorescence lorsque l'on a affaire à des fortes concentrations et que la lecture de fluorescence est hors de l'échelle de mesure du fluorimètre. Nous avons obtenu les spectres d'absorption de ce type de filtre et vérifié que leur transmission était pratiquement constante de 480 nm à 710 nm.

A.4.3.2. LES FILTRES INTERFERENTIELS

Ces filtres sont constitués d'une couche transparente de bas indice de réfraction, tel que le fluorure de Magnésium, enserré entre deux films d'argent semi-transparentes. Les interférences se produisent lorsque la différence de chemin optique est égale à la longueur d'onde ou à un multiple de celle-ci.

Schéma d'un filtre
interférentiel



$$\lambda = \frac{2e}{n}$$

e = épaisseur du diélectrique

n = ordre d'interférence

Ce motif élémentaire peut être répété et on peut obtenir des largeurs de bande passante aussi fines que 8 nm, avec une transmission de l'ordre de 60 % .

Les filtres interférentiels dont nous avons disposé étaient réalisés par la firme allemande SCHOTT. Ils sont employés comme filtres primaires pour sélectionner les longueurs d'onde d'excitation.

A.4.3.3. CHOIX DES COMBINAISONS DE FILTRES

Les filtres primaires et secondaires doivent être complémentaires. Le filtre secondaire sera choisi de façon à bloquer toutes les longueurs d'onde transmises par le filtre primaire, et il ne devra laisser passer que les longueurs d'onde de fluorescence.

a) Cas des filtres colorés

Le tableau suivant résume les combinaisons de filtres colorés généralement utilisés pour les deux grandes catégories de traceurs fluorescents [A 17]

TRACEUR	excitation nm	FILTRE PRIMAIRE	émission nm	FILTRE SECONDAIRE
URANINE	489	WRATTEN 47 B + WRATTEN 2A	515	WRATTEN 2A - 12
RHODAMINES - solutions chargées	554	WRATTEN 5 - 46	572	5 - 90 (Corning 3-66 + Corning 4-97)
- solutions claires		CORNING 1-60 + WRATTEN 58		WRATTEN 23A

b) Cas des filtres interférentiels

Le tableau suivant montre les combinaisons entre les filtres interférentiels primaires et les filtres colorés correspondant au secondaire dont l'emploi est préconisé par MOSER et ses collaborateurs [A 19] .

TRACEURS	FILTRES PRIMAIRES INTERFERENTIELS	FILTRES SECONDAIRES COLORES
URANINE	DAL 483 nm T = 39 %	OG 515
RHODAMINE B, WT	DAL 554 nm T = 35 %	OG 590
SULFORHODAMINE G	DAL 526 nm T = 30 %	OG 570

c) Comparaison des caractéristiques des différentes catégories de filtres

Sur les figures A 37, A 38, et A 39 nous avons superposé :

- les spectres d'excitation des principaux traceurs fluorescents .
- les spectres de transmission des filtres primaires correspondants .

Les spectres d'excitation des différents produits ont été tracés en intensités relatives (représentation linéaire) et normés en amplitude pour faciliter leur comparaison. Les spectres d'absorption des filtres sont représentés en absorbance ou densités optiques (représentation semi-logarithmique, cf 4.1.1.

De la même façon nous avons représenté, figures A 40, A41 et A 42,

- les spectres d'émission des principaux traceurs fluorescents
- les spectres de transmission des filtres secondaires correspondants

d) Conclusions

De l'examen et de la confrontation de ces différents spectres, on peut tirer les conclusions générales suivantes :

- Les filtres interférentiels sont plus sélectifs. Leurs spectres montrent que la lumière d'excitation transmise est plus monochromatique

Figure A37: Spectres d'excitation de différents traceurs fluorescents:
 1-uranine
 2-sulforhodamine G
 3-rhodamines (B ou Wt)

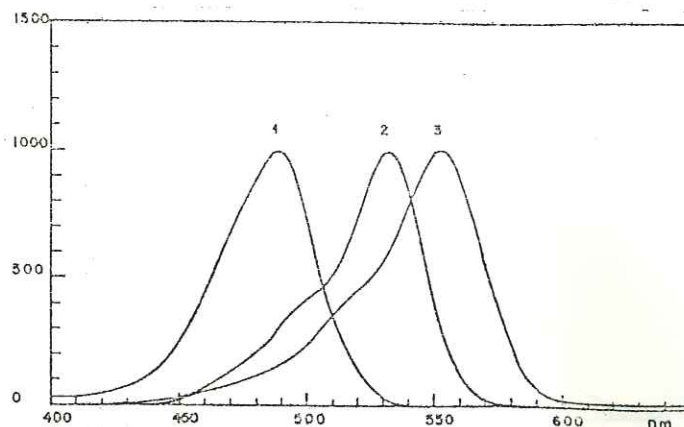


Figure A38: Spectres de transmission des filtres primaires recommandés pour la mesure des rhodamines et sulforhodamines:

- 1-Filtre interférentiel pour la mesure de la sulforhodamine G. DAL 526
- 2-Filtre interférentiel pour la mesure des rhodamines. DAL 554
- 3-Filtres colorés pour la mesure des solutions de rhodamines "claires" CORNING 1-60 et WRATTEN 58.
- 4-Filtre coloré pour la mesure des solutions de rhodamines "chargées" WRATTEN 5-46.

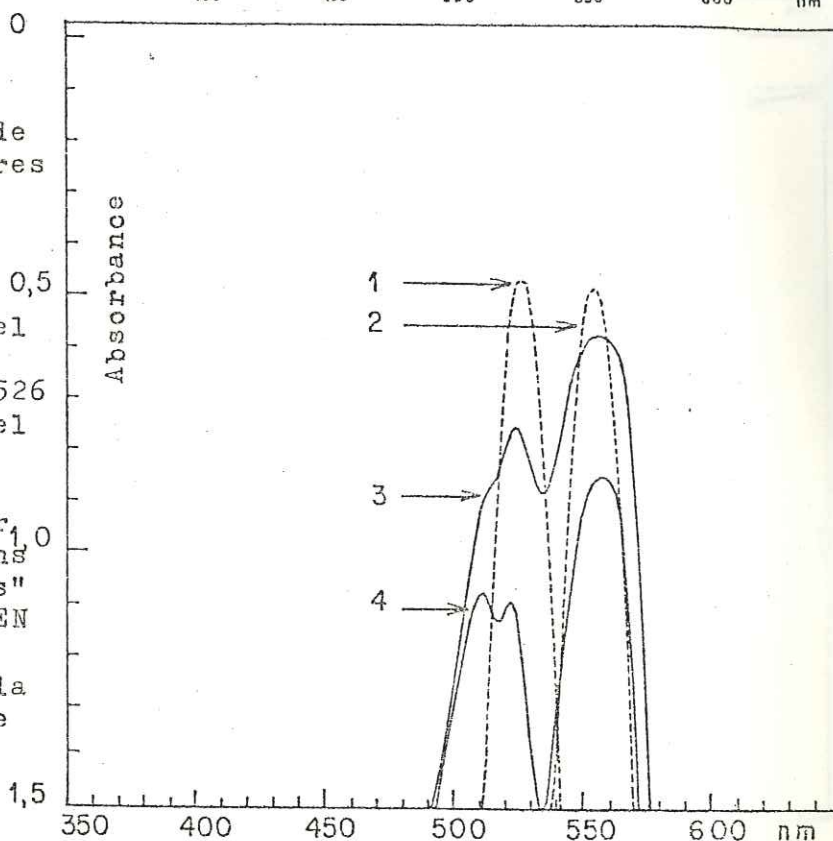


Figure A39: Spectres de transmission des filtres primaires recommandés pour la mesure de l'uranine:

- 1-association des filtres colorés WRATTEN 47 B et WRATTEN 2 A.
- 2-Filtre interférentiel DAL 483.

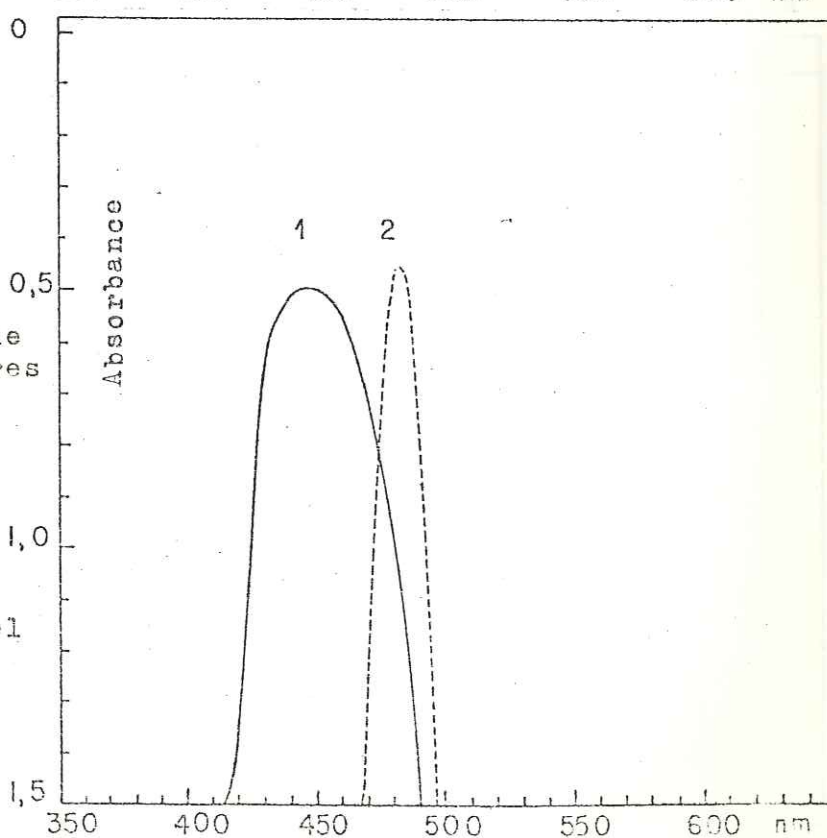


Figure A40: Spectres d'émission de différents traceurs fluorescents:

- 1-uranine
- 2-sulforhodamine G
- 3-rhodamines (B ou Wt)

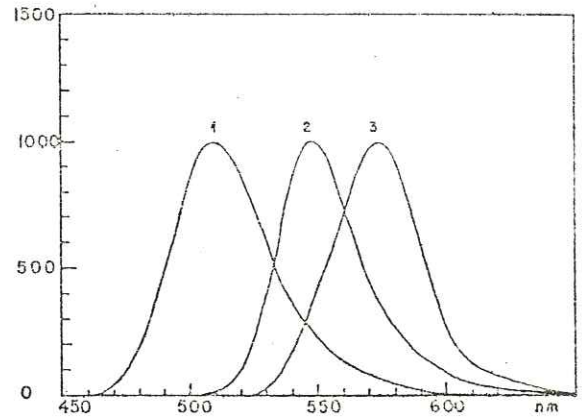


Figure A41: Spectres de transmission des filtres secondaires recommandés pour la mesure des rhodamines et sulfo-rhodamines:

- 1-Filtre coloré pour la mesure de la sulfo-rhodamine G: OG 570
- 2-Filtre coloré pour la mesure des rhodamines. OG 590.
- 3-Filtre coloré pour la mesure des solutions de rhodamines "claires" WRATTEN 23 A.
- 4-Filtre coloré pour la mesure des solutions de rhodamines "chargées" (5-90=CORNING 3-66 + CORNING 4-97)

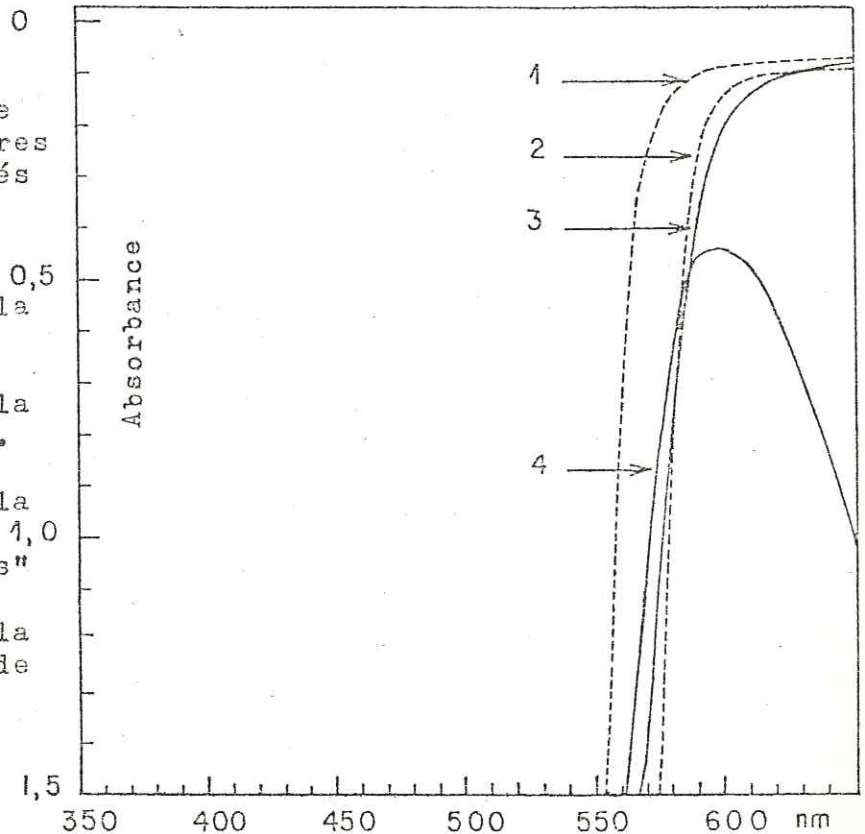
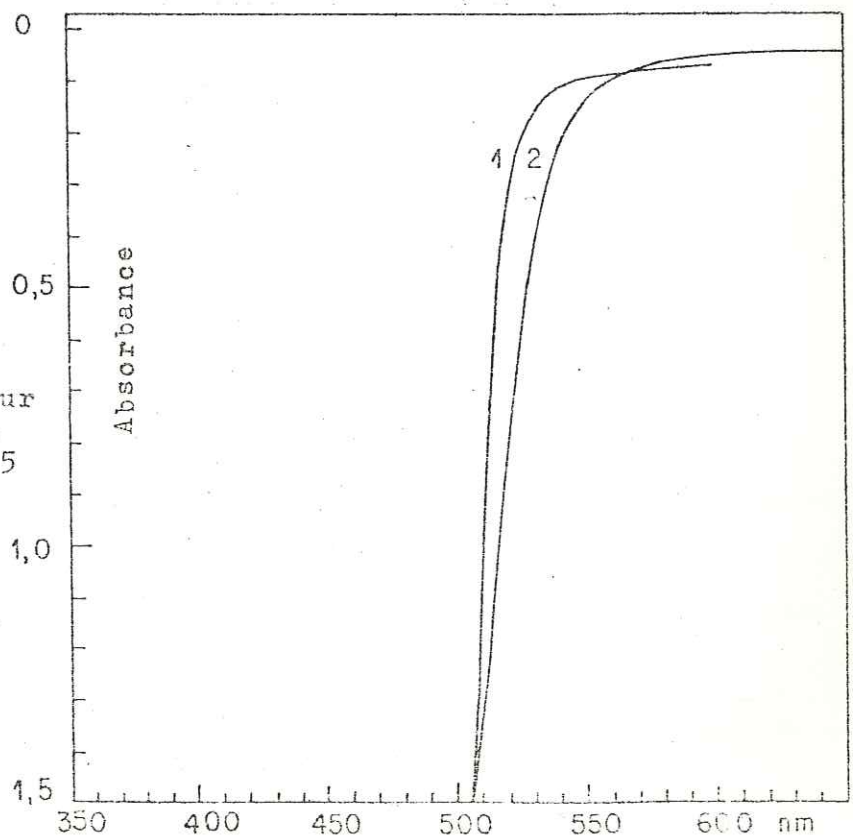


Figure A42: Spectres de transmission des filtres secondaires pour la mesure de l'uranine

- 1- Filtre coloré OG 515
- 2- Filtre coloré WRATTEN 2A-12.



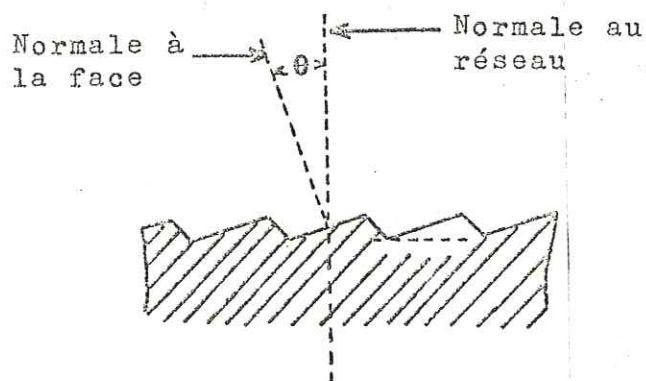
- les longueurs d'onde d'excitation transmises par les filtres interférentiels coïncident mieux avec les pics d'absorption des différents produits
- Bien que moins sélectifs, les filtres colorés primaires laissent passer une quantité de lumière supérieure

A.4.3.4. LES MONOCHROMATEURS A RESEAUX

a) Généralités sur les réseaux

Les réseaux sont constitués d'un grand nombre de gravures parallèles extrêmement rapprochées, de l'ordre de 10 000 lignes par cm. Les caractéristiques essentielles de ces réseaux sont l'inclinaison des rayures et leur densité.

Les interférences produites par les réflexions de la lumière sur les gravures obéissent à la loi de BRAGG, qui précise la longueur d'onde du rayonnement réfléchi en fonction de l'angle d'incidence.



$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

n = ordre de diffraction

λ = longueur d'onde de la radiation réfléchie

d = intervalle séparant deux gravures consécutives

θ = l'angle d'incidence

Schéma d'un réseau par réflexion

On montre que le pouvoir de résolution est proportionnel à la fois au nombre de lignes et à la dimension du réseau.

Les avantages d'un réseau sont les suivants :

- 1 Une résolution uniforme et une dispersion linéaire pour toutes les longueurs d'onde
- 2 Plus de 80 % de la radiation incidente est dispersée dans le premier ordre
- 3 Toutes les longueurs d'onde peuvent être dispersées
- 4 Un prix moindre qu'un prisme

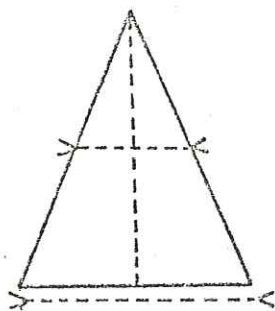
b) Elimination des phénomènes de diffraction d'ordre supérieur à 1

L'inconvénient majeur pour un réseau est qu'avec la longueur d'onde sélectionnée il laisse passer également $\frac{\lambda}{2}$, $\frac{\lambda}{3}$ etc. ...

Ces phénomènes de second ordre sont évités par l'emploi de la cuvette en verre pyrex qui bloque toutes les longueurs d'onde au-dessous de 285 nm. Entre 285 nm et 570 nm nous n'aurons donc pas de manifestation du second ordre. Il est possible également d'utiliser le filtre "TURNER 110 816 2A" qui coupe les longueurs d'onde au-dessous de 415 nm, ce qui évitera une manifestation de la diffraction de second ordre sur la gamme de longueurs d'onde allant de 415 nm à 830 nm, gamme qui comprend tous les traceurs fluorescents Xanthéniques.

c) Caractéristiques des réseaux équipant le spectrofluorimètre TURNER 430

Le spectrofluorimètre "TURNER 430" est équipé de monochromateurs à réseaux. La largeur de bande d'excitation est fixée à 15 nanomètres, la largeur de bande passante d'émission peut être réglée à 15 ou 60 nm. On définit généralement la sélectivité d'un réseau par la largeur de bande à mi-hauteur du spectre de transmission (voir schéma ci-dessous)



Mode d'évaluation de la sélectivité d'un réseau.

Ces monochromateurs, de sélectivité comparable aux filtres interférentiels utilisés sur le fluorimètre (cf A.4.3.4.), sont les éléments distinctifs majeurs du spectrofluorimètre "TURNER 430".

A.4.4. COMPARAISON DES PERFORMANCES RESPECTIVES DES FLUORIMETRES ET SPECTROFLUORIMETRES

Les deux facteurs, sensibilité et sélectivité, dépendent essentiellement du

type d'appareil employé. Si, dans leur principe, spectrofluorimètre et fluorimètre ne présentent pas de différence, il n'en est pas de même du point de vue de leurs éléments constitutifs.

A.4.4.1. LES SOURCES DE LUMIERE

a) Fluorimètre

Sur la plupart des fluorimètres ce sont des lampes à vapeur de mercure qui ont la particularité de présenter un spectre de raies très intense caractéristique du mercure. Sur le fluorimètre "TURNER 111", quatre lampes sont disponibles, couvrant toute la gamme des longueurs d'onde (cf SCHOULER [A 17]). Pour un traceur déterminé, l'intérêt est donc d'avoir une lampe qui a une raie de son spectre le plus voisin possible de la longueur d'onde d'excitation du produit et, avec un filtre passe-bande approprié, de supprimer toutes les autres raies du spectre. On dispose ainsi d'une source de lumière très intense.

b) Spectrofluorimètre

Sur un spectrofluorimètre au contraire, il est nécessaire de disposer d'une source de lumière ayant un spectre d'émission continu. Le spectrofluorimètre que nous utilisons est équipé d'une lampe à arc Xénon qui présente un fort spectre continu pour une gamme de longueurs d'onde de 250 à 700 nm. Une telle lampe présente en outre l'avantage d'une grande stabilité.

A.4.4.2. SENSIBILITE DE MESURE

a) Concentrations minimales détectables sur le fluorimètre TURNER

incertitude de mesure due à l'instabilité de l'appareil

Le signal de fluorescence d'un échantillon est calculé en soustrayant au signal le bruit de fond. Sur le fluorimètre TURNER modèle 111, chacune de ces mesures est affectée d'une incertitude résultant de l'instabilité de l'appareil que FEUERSTEIN et SELLECK [A 4] évaluent à $\pm 0,5$ unités de mesure. Les lois de composition de deux distributions

aléatoires permettent d'écrire que l'écart-type de la différence de deux distributions de POISSON est donné par

$$\sigma_d = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$$

$$\text{d'où } \sigma_d = \sqrt{(0,5)^2 + (0,5)^2} = 0,707 \text{ unité}$$

concentration minimale détectable

On peut convenir comme HOURS (*) de définir la concentration minimale détectable par

$$S = 2\sigma_b$$

où S représente le signal et σ_b l'écart-type du bruit de fond.

Cette condition signifie que, pour toute mesure unique satisfaisant à cette relation, la probabilité pour que le signal (calculé par différence entre la mesure et le bruit de fond) soit effectivement délivré par l'échantillon, est égale à 0,975.

Dans le cas du fluorimètre TURNER modèle 111 la CMD est par conséquent de

$$2 \times 0,707 = 1,4 \text{ unité}$$

b) Comparaison entre les sensibilités maximales de mesure de fluorimètres équipés de filtres colorés et de filtres interférentiels

Les courbes étalonnage que nous avons tracées pour le sulforhodamine G avec les deux catégories de filtres donnent, avec une cellule de mesure de petit volume (éprouvettes) les résultats suivants :

- CMD (filtres colorés) = $8 \cdot 10^{-11}$ kg/l
- CMD (filtres interférentiels) = $4 \cdot 10^{-10}$ kg/l

Ces résultats n'ont qu'une valeur théorique. En pratique la sensibilité de la mesure dépend des fluctuations naturelles qui affectent le bruit de fond. Bien que l'on ne puisse prétendre que ces fluctuations obéissent aux lois de POISSON, l'on peut présumer que l'importance des fluctuations naturelles en bruit de fond est liée à son amplitude. Or, ce bruit de fond est considérablement réduit par l'emploi de filtres interférentiels, comme en témoignent les mesures effectuées sur de l'eau pure :

- BDF (filtres colorés) = 3 unités
- BDF (filtres interférentiels) = 1 unité

* HOURS R. Les applications industrielles des traceurs radioactifs
Rapport 2-1 CEN SACLAY (1963)

A.4.4.3. SELECTIVITE

Comme nous l'avons vu en A.4.3. les filtres colorés laissent passer des intensités lumineuses considérables mais sont moins sélectifs que les filtres interférentiels et les monochromateurs qui présentent des sélectivités comparables. L'amélioration de la sélectivité permet de réduire l'importance relative des phénomènes parasites de diffusion (effets RAYLEIGH, TYNDALL, RAMAN) et de fluorescence des matrices. L'abaissement du bruit de fond s'accompagnant, comme on l'a présumé en A.4.4.2.b, d'une réduction des incertitudes de mesure, l'emploi de filtres interférentiels et de monochromateurs peut apporter, dans certains cas, une amélioration de la sensibilité de la mesure.

On montrera par ailleurs que l'augmentation de la sélectivité permet de réaliser des mesures simultanées de plusieurs traceurs fluorescents. De surcroît, la substitution d'un spectrofluorimètre à un fluorimètre apporte, par le tracé de spectres, l'énorme avantage de :

- soustraire graphiquement le bruit de fond dans le cas d'une analyse à basse concentration
- identifier un traceur inconnu par ses caractéristiques spectrales
- distinguer une fluorescence parasite d'une fluorescence provoquée par un traceur

A.4.5. COMPARAISON DE TROIS SPECTROFLUORIMETRES

Il nous a semblé intéressant de comparer les performances de notre spectrofluorimètre "TURNER 430" avec d'autres appareils :

- le spectrofluorimètre FARAN de l'U.E.R. de Pharmacie de GRENOBLE
- le spectrofluorimètre PERKIN-ELMER utilisé par MOSER [A19]

Cette comparaison a été effectuée à partir des caractéristiques spectrales des traceurs fluorescents couramment utilisés en hydrologie.

L'usage du spectrofluorimètre étant essentiellement réservé à l'obtention de spectres de traceurs fluorescents, nous nous sommes limités à des comparaisons dans notre domaine d'utilisation particulier.

A.4.5.1. CARACTERISTIQUES COMPAREES DES SPECTRES DE TRACEURS FLUORESCENTS
OBTENUS PAR LES DIFFERENTS APPAREILS

Pour les trois spectrofluorimètres, nous avons tracé les spectres d'excitation et d'émission de l'Uranine, la Rhodamine B, la Rhodamine WT et la sulforhodamine G.

Tous ces spectres ont été normés en amplitude dans le but de caractériser leur "résolution", c'est-à-dire leur largeur à mi-hauteur (voir les exemples des figures A43a et b)

Les résultats de ces mesures sont rassemblés dans les deux tableaux ci-dessous :

Produit		largeur du pic à mi-hauteur		
		TURNER	FARAN	PERKIN ELMER
E M I S S I O N	URANINE	43	34,5	38,5
	Rh B	35	34	33
	Rh WT	39	42,5	34,5
	Sulfo Rh G	36	33	36

Produit		largeur du pic à mi-hauteur		
		TURNER	FARAN	PERKIN ELMER
E X C I T A T I O N	URANINE	42,5	36	44
	Rh B	40	39	44
	Rh WT	41	41,5	38
	Sulfo Rh G	38,5	38,5	39

Pour les spectres d'excitation, nous avons le classement suivant par ordre de "résolutions" moyennes croissantes :

PERKIN-ELMER, TURNER, FARAN

Pour l'émission, le classement est le suivant :

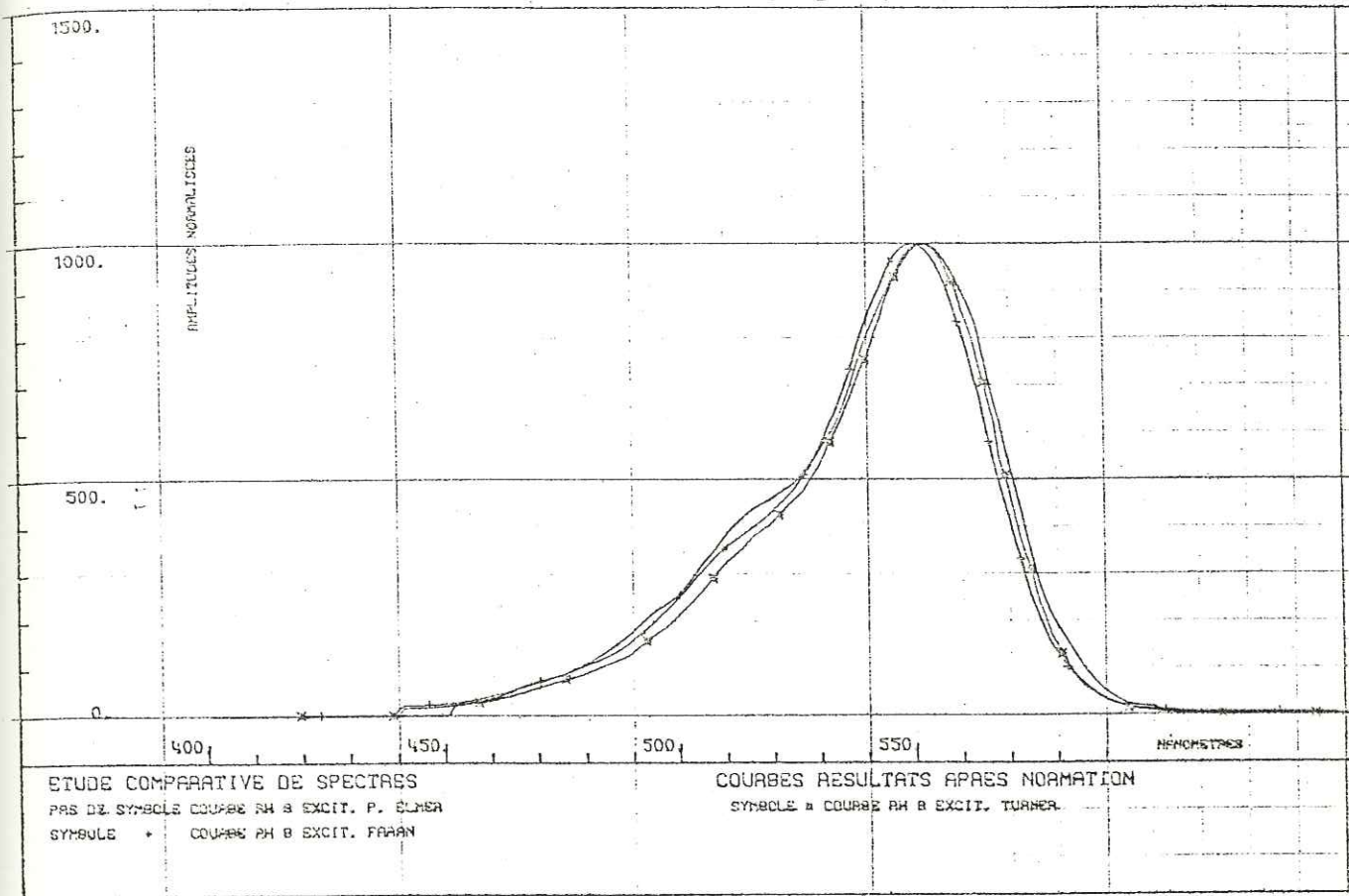
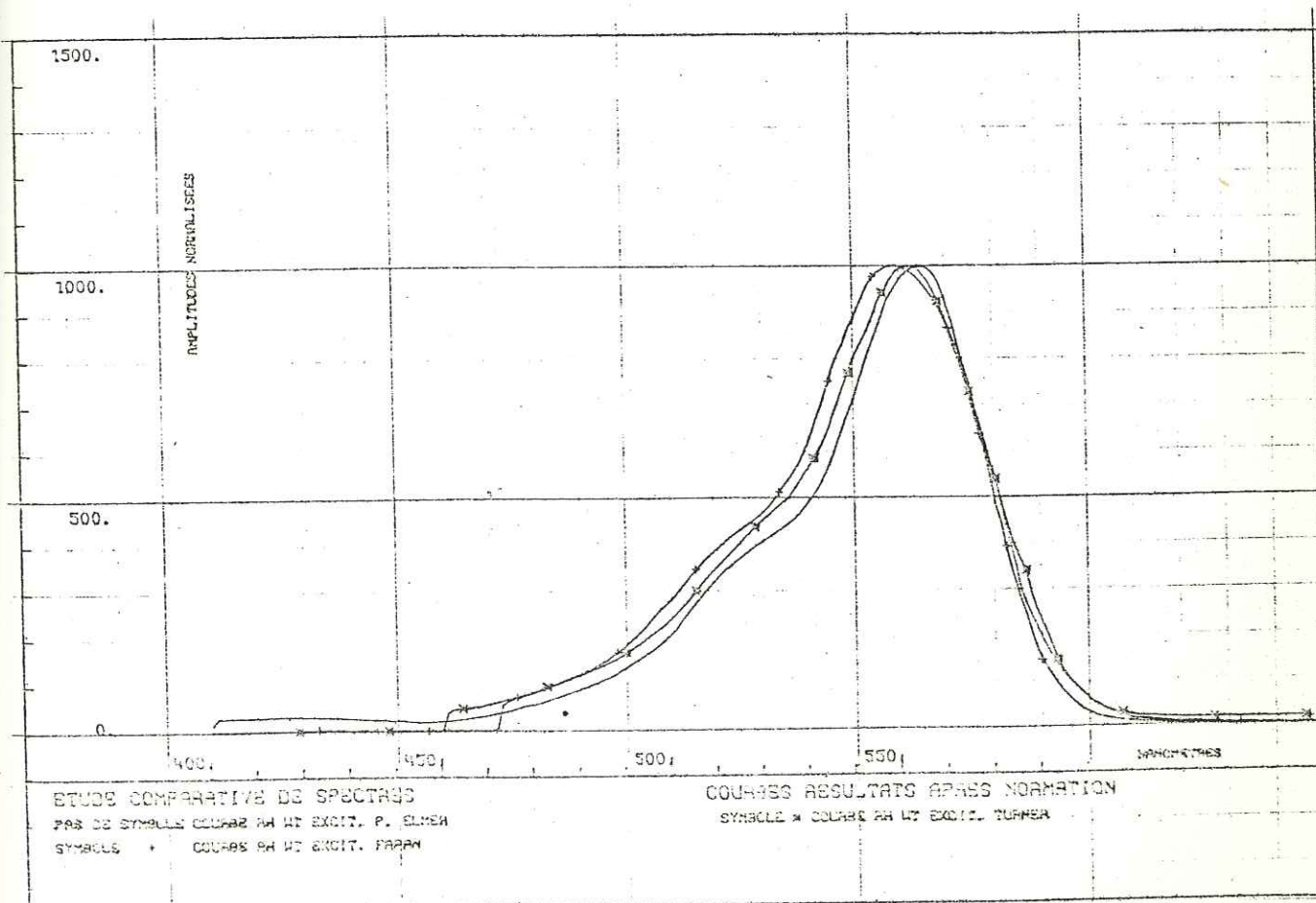


Figure A43a et A43b: Exemples de spectres normés en amplitude pour l'étude comparée de trois spectrofluorimètres.



TURNER, FARAN, PERKIN-ELMER

Dans les deux cas les différences sont peu sensibles.

A.4.5.2. POSITION RELATIVE DES PICS D'EXCITATION ET D'EMISSION PAR RAPPORT
A LEUR POSITION THEORIQUE

Les résultats qui sont rassemblés dans le tableau ci-dessous montrent que les positions relatives des pics fluctuent notablement et semblent devoir souligner la nécessité, pour les expérimentateurs, de procéder à des étalonnages en longueurs d'onde.

	TRACUR	abscisse théorique nm	abscisse TURNER nm	abscisse FARAN nm	abscisse PERKIN-ELMER nm
spectres d'excitation	RHODAMINE WT	554	553	549	555
	RHODAMINE B	554	552,5	550	552,5
	SULFORHOD. G	530	531	523	532
	URANINE	489	488	483	487
spectres d'émission	RHODAMINE WT	572	574	572	577
	RHODAMINE B	572	570,5	571	577
	SULFORH. G	550	548	548	552
	URANINE	514	510	508	513

A.4.5.3. CONCLUSION

Les mesures comparatives effectuées confirment les faibles répercussions des performances des appareils sur la qualité pratique des mesures, en raison du fait que les spectres que nous nous proposons de tracer ont des formes extrêmement étalées. Pour cet usage, les performances de notre appareil peuvent être estimées satisfaisantes.

A.4.6. CONCLUSION

L'étude des conditions de mesure et des différents paramètres entrant en jeu, nous font mieux comprendre les difficultés de mise en oeuvre de la méthode d'analyse par fluorescence.

En particulier, nous mettons en évidence :

- Les différents facteurs limitants et la manière dont on peut les minimiser : effet RAYLEIGH-TYNDALL, effet RAMAN qui sont vis-à-vis de la mesure de fluorescence des phénomènes parasites
 - L'influence des différents composants des deux types d'appareils sur l'analyse :
 - . Le fluorimètre, en général plus sensible, mais moins sélectif et ne levant pas l'incertitude entre un bruit de fond souvent élevé et un signal de fluorescence proprement dit
 - . Le spectrofluorimètre, plus sélectif et levant l'indétermination, quant à la nature du traceur analysé, par l'obtention d'un spectre de fluorescence caractéristique.
-

A.5. DISCRIMINATION SIMULTANEE DE PLUSIEURS TRACEURS FLUORESCENTS

A.5.1. POSITION DU PROBLEME

Comme on a pu le remarquer en A.1.2., tous les traceurs fluorescents xanthéniques employés en hydrologie ont des longueurs d'onde d'excitation et d'émission proches.

Le cas extrême est représenté par la rhodamine WT et la rhodamine B qui ont le même spectre d'excitation à 554 nanomètres et le même spectre d'émission à 572 nanomètres. Avec les mêmes caractéristiques spectrales, ces deux traceurs ne pourront être distingués par analyse spectrofluorimétrique dans une solution où ils seraient tous deux présents.

Les conditions d'analyse simultanée les plus favorables sont présentées par les couples Uranine, Rhodamine (B ou WT) dont les longueurs d'onde d'excitation (489 - 554 nm) et d'émission (515 - 572 nm) diffèrent de $\Delta\lambda$ 65 nm pour l'excitation et de 57 nm pour l'émission. Ce sont les deux couples de traceurs dont les spectres sont les plus distincts, et, généralement, la discrimination spectrofluorimétrique est aisée car il n'y a pas interférence entre leurs spectres respectifs.

La discrimination demeure encore réalisable pour un mélange d'Uranine et de Sulforhodamine G, les décalages entre leurs spectres respectifs, bien que moins importants (cf A.1.2.) permettant là encore de distinguer ces traceurs. Cependant, lorsque les deux composés sont présents dans le mélange à des concentrations très différentes ($\frac{1}{50}$ par exemple), l'analyse quantitative de l'un et de l'autre peut être largement faussée [A26] [A27].

Lors d'une opération de marquage, il est souvent très intéressant d'employer plusieurs traceurs fluorescents simultanément. Il faudra donc être capable de les doser quantitativement lorsqu'ils seront présents dans un mélange. Plusieurs chercheurs se sont attachés à résoudre ce problème. BAUER [A27], en partant des considérations évoquées en (A.3.2.1.) sur le déplacement apparent du spectre de l'Uranine en fonction du pH, discrimine Uranine et Sulforhodamine G, lorsque l'un des traceurs est présent dans le mélange à une concentration très différente de l'autre. En opérant en milieu

fortement acide (pH 1 à 2) la forme cationique de la fluoresceïne est favorisée, cette forme cationique présentant un pic d'excitation à 437 nm, il n'y aura plus d'interférence avec le spectre de la sulforhodamine G (530 nm).

Il faut noter cependant qu'il est rare que la différence de concentration justifie la mise en oeuvre de cette technique lorsque l'on emploie conjointement l'uranine et la sulforhodamine G. Cette méthode ne permet pas de toute manière l'emploi de plus de deux traceurs fluorescents simultanément.

BEHRENS et ses collaborateurs A28 ont mis en oeuvre une technique purement spectrofluorimétrique dont les possibilités, du fait même des caractéristiques spectrales des traceurs fluorescents xanthéniques, demeurent très restreintes.

Nous avons d'abord essayé dans un premier temps d'améliorer la technique spectrofluorimétrique de BEHRENS par un traitement numérique des spectres obtenus. Puis nous avons collaboré avec MOLINARI à une étude avec Mlle ALARY et ROCHAS de l'U.E.R. de Pharmacie de GRENOBLE, collaboration qui nous a conduits à la mise au point de deux procédés originaux de discrimination de traceurs fluorescents, l'un par chromatographie, l'autre par l'emploi d'un solvant sélectif. Pour ces deux techniques, l'analyse quantitative est effectuée par spectrofluorimétrie.

A.5.2. METHODE DE DISCRIMINATION SPECTROFLUORIMETRIQUE DITE "DU PAS CONSTANT" ET ESSAIS D'AMELIORATION

A.5.2.1. PRINCIPES ET AVANTAGES DE LA METHODE

Dans une mesure spectrofluorimétrique classique la longueur d'onde d'excitation est laissée fixe, à la valeur maximale d'absorption du produit à analyser. On obtient alors un spectre de fluorescence en faisant varier de façon continue les longueurs d'onde d'émission. Si l'on a plusieurs traceurs présents dans l'échantillon à analyser, il faudra faire autant de spectres d'émission qu'il y a de traceurs, en prenant pour chaque traceur présumé la valeur correspondante de la longueur d'onde d'excitation.

Partant du fait que pour tous les traceurs xanthéniques la différence entre

la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission est pratiquement la même (entre 20 et 25 nm) BEHRENS et ses collaborateurs du laboratoire d'hydrogéologie de MUNICH ont proposé en 1969 de faire varier parallèlement la valeur de la longueur d'onde d'excitation et d'émission en gardant entre elles une différence $\Delta\lambda$ de l'ordre de 25 nm, correspondant à la différence de longueur d'onde entre pic d'excitation et pic d'émission de tous les traceurs xanthéniques.

On obtient ainsi des "spectres combinés" (excitation, émission) qui présentent les avantages suivants :

- les maxima d'excitation et de fluorescence étant atteints en même temps, on a un pic d'amplitude maximale plus étroit que lorsque la longueur d'onde d'excitation est laissée fixe
- la lumière diffusée (effet RAYLEIGH-TYNDALL), gênante à basse concentration est, de cette manière, réduite au minimum (cf A.4.2.1.)
- l'effet RAMAN de l'eau est éliminé car il se manifeste pour des $\Delta\lambda$ largement supérieur à 25 nm sur toute la gamme de 450 à 600 nm intéressant les produits xanthéniques (cf A.4.2.2.b)
- l'exploration des longueurs d'onde entre 600 et 400 nm avec un $\Delta\lambda$ ou "pas" constant compris entre 20 et 25 nm analyse tous les traceurs fluorescents présents dans l'échantillon et, cela, en une seule opération.

Toutes ces considérations nous ont amenés à modifier notre spectrofluorimètre "TURNER 430" pour obtenir de tels spectres. Cette modification consiste à relier cinématiquement par un train d'engrenages amovibles les axes de rotation des deux monochromateurs.

A notre connaissance, aucun appareil n'est prévu par son constructeur pour permettre un déroulement simultané des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission.

Cette méthode de discrimination dite "du pas constant" s'est confirmée extrêmement fructueuse et a été par la suite systématiquement appliquée à toutes les analyses de routine que nous avons effectuées.

A.5.2.2. LIMITES DE DISCRIMINATION

a) Discrimination Uranine - Rhodamines

D'après A26 "le pouvoir de résolution de la méthode est si grand que l'on peut déterminer quantitativement les colorants Uranine et Rhodamine B ou WT placés dans un mélange avec un rapport de 1/1000" (cf figure A44 ci-après).

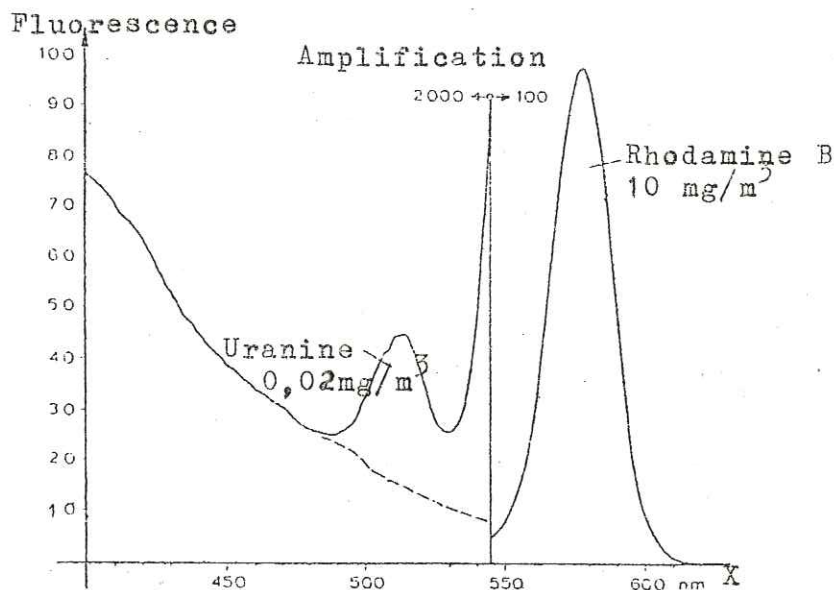


Figure A44: Détection spectrofluorimétrique d'uranine et de rhodamine B à concentrations différentes (respectivement $2 \cdot 10^{-11}$ et 10^{-8}) dans la même solution. Enregistrement au PERKIN-ELMER 203, excitation à 25 nm en dessous de la longueur d'onde d'analyse. (d'après BEHRENS A26).

En présence de hautes concentrations de rhodamine B (10^{-8}), la lumière de fluorescence de l'uranine est en partie absorbée par la rhodamine B extra, tandis qu'inversement, la lumière de fluorescence de la rhodamine n'est pas perturbée par l'uranine A26. On peut corriger cette influence par un étalonnage avec des solutions témoins correspondantes.

b) Discrimination Uranine - Sulforhodamine G

On peut déterminer l'uranine quantitativement en présence de sulforhodamine jusqu'à un rapport de concentration de 1/50 A26. On doit soustraire de la hauteur du pic de l'uranine une petite fraction de l'amplitude du pic sulforhodamine G, pic que l'on doit déterminer dans des solutions témoins. De la même façon, la détermination inverse de la sulforhodamine G en présence de fortes concentrations d'uranine est possible. [A26]

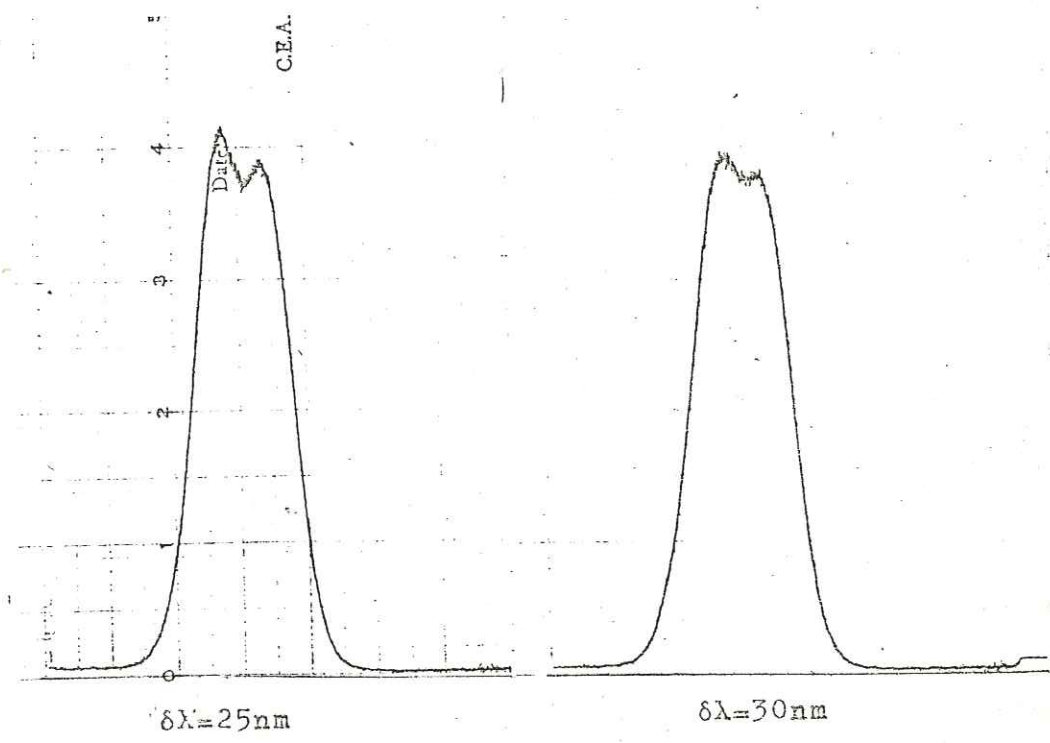
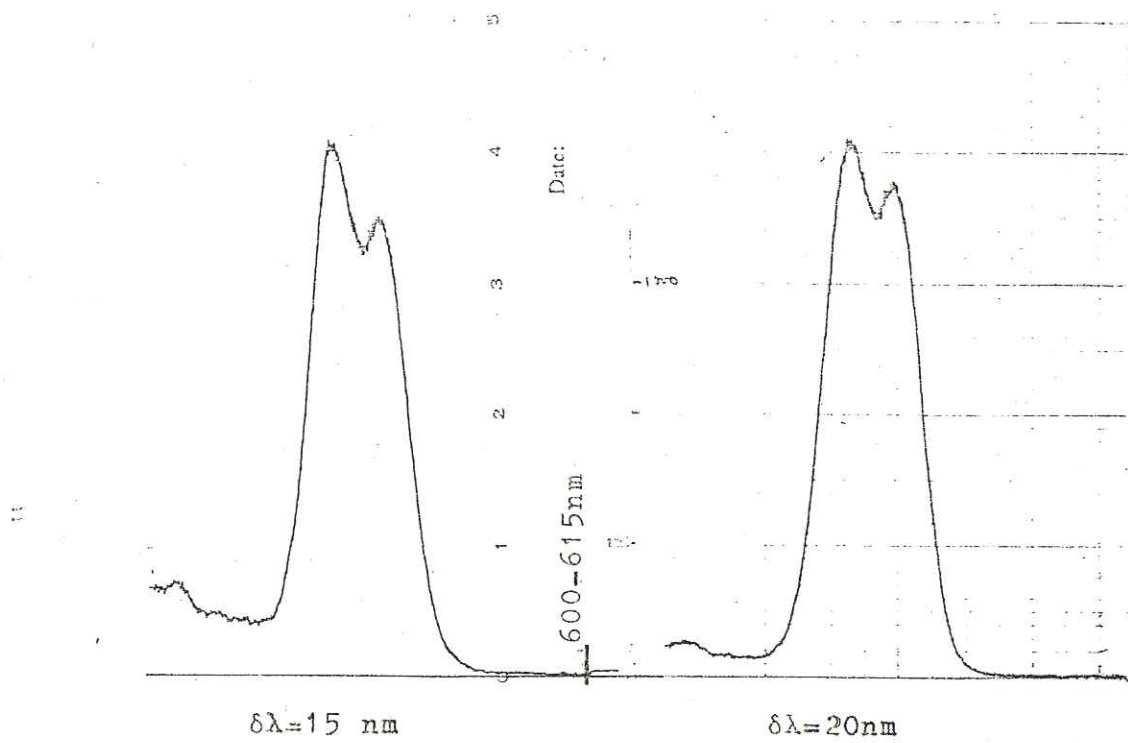


Figure A45: Spectres à "pas constant" effectués pour différentes longueurs de pas $\delta\lambda$, d'un mélange de sulforhodamine C et de rhodamine Wt à des concentrations respectives de $1,4 \cdot 10^{-8}$ et $8,6 \cdot 10^{-8}$ kg/l. (Les valeurs indiquées en abscisses sont respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'émission.)

c) Discrimination Sulforhodamine G - Rhodamine B ou WT

L'application directe de la méthode du pas constant, pour la discrimination de la sulforhodamine G de la Rhodamine (B ou WT) montre clairement les limites de la méthode (Fig. A45). L'interférence des deux spectres, distant seulement d'une vingtaine de nanomètres, est pratiquement totale.

A.5.2.3. ESSAI D'OPTIMISATION DU "PAS" DE LA METHODE DU "PAS CONSTANT"

(CAS D'UN MELANGE DE RHODAMINE WT ET DE SULFORHODAMINE G)

a) Objectif

Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, la forme du spectre d'émission reste la même (cf A.2.1.3.). Néanmoins, son intensité diminue considérablement lorsque la longueur d'onde d'excitation s'éloigne du pic d'absorption. On s'est proposé de rechercher un "pas" ($\Delta\lambda$) qui permette d'améliorer la discrimination, fût-ce au détriment de la sensibilité.

b) Résumé des essais effectués

Pour chaque traceur pris séparément et pour une concentration donnée de 10^{-7} kg/l nous avons caractérisé l'incidence du pas de mesure ($\Delta\lambda$) sur le "spectre combiné", d'après les critères suivants :

- abscisse du pic par rapport au pic d'émission
- amplitude du signal
- amplitude du bruit de fond
- rapport signal/bruit
- "résolution", définie par le quotient de la largeur du pic à mi-hauteur par l'amplitude du signal
- indice de dissymétrie du spectre, défini arbitrairement par :
largeur à mi-hauteur du côté des petites longueurs d'onde/
largeur à mi-hauteur du côté des grandes longueurs d'ondes

c) Résultats

Ces résultats sont représentés sur les figures A46 et A47.

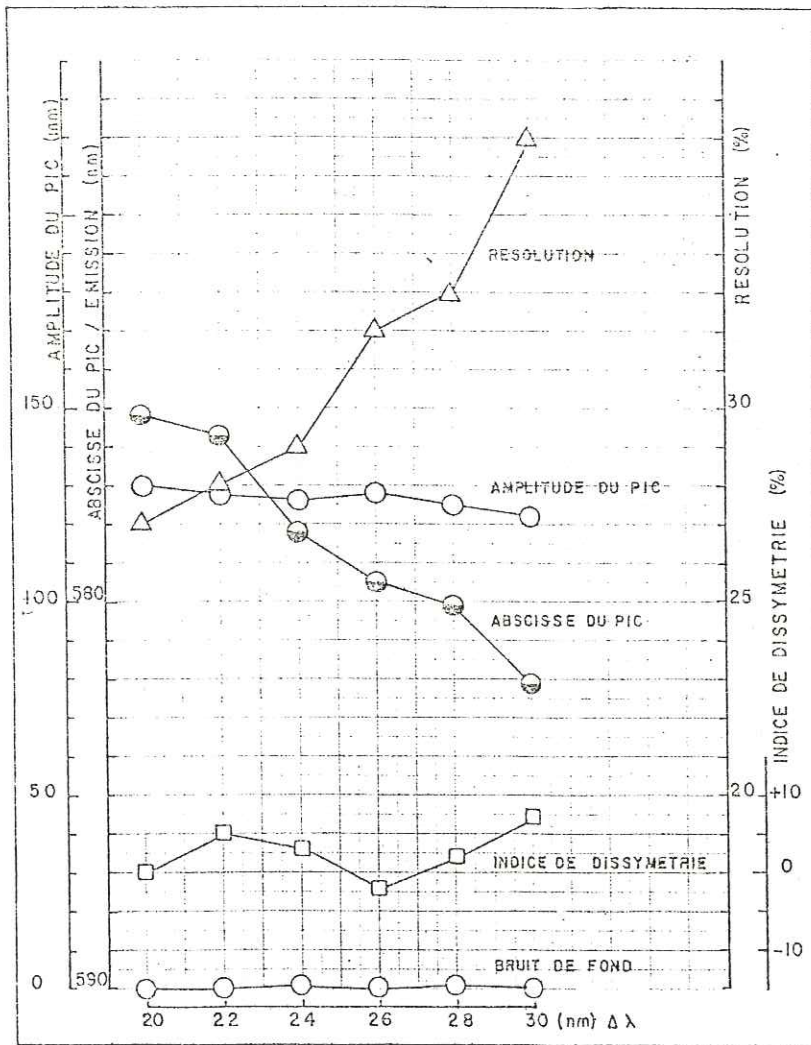


Figure A46 et A47: Etude des "spectres combinés" de la rhodamine Wt et de la sulforhodamine G obtenus par la méthode du "pas constant pour des pas ($\delta\lambda$) variant entre 20 et 30 nm. On notera que le réglage en amplification des signaux était différent pour l'une et l'autre série de mesures. Il importe par conséquent de préciser ici que les sensibilités de détection de la sulforhodamine G et de la rhodamine Wt sont dans un rapport variant de 7 à 4,5 pour des concentrations variant de 10^{-7} à 10^{-9} .

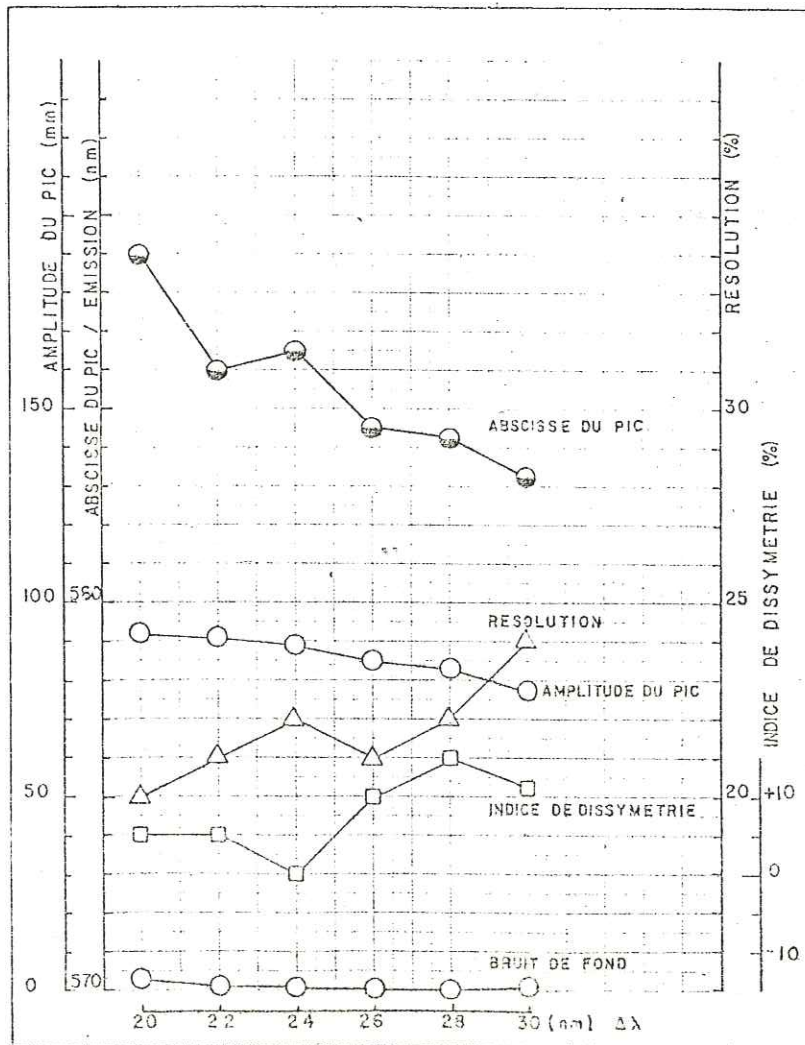


Figure A47

Les conclusions suivantes, communes aux deux traceurs, peuvent être dégagées

- l'amplitude du pic diminue faiblement lorsque le pas de mesure passe de 20 à 30 nm
- dans le même temps la résolution est améliorée ainsi que le rapport signal/bruit
- l'indice de dissymétrie est minimum pour $\Delta\lambda = 20$ nm.
- l'abscisse du pic varie avec le pas et, ce, dans le même sens pour les deux produits. L'écart entre les abscisses respectives des pics semblent augmenter légèrement avec le pas de mesure

L'ensemble des résultats devrait inciter à travailler avec un $\Delta\lambda$ relativement élevé. Or les essais présentés sur la figure A45, effectués pour quatre $\Delta\lambda$ différents et pour un rapport de concentrations rhodamine WT/sulforhodamine G = 6,15, mettent en évidence un résultat opposé à celui auquel les données précédentes devraient conduire. C'est en effet pour $\Delta\lambda = 15$ nm que la discrimination semble être optimale.

Aussi, pour la suite des essais avons-nous convenu d'une solution de compromis consistant à adopter la valeur de pas de mesure intermédiaire de 20 nm.

Pour ces essais de discrimination, le rapport des concentrations des deux traceurs dans le mélange n'a pas été choisi au hasard. En effet, pour des concentrations identiques en sulforhodamine G et en rhodamine WT, le spectre du mélange n'est pas différencié, la sensibilité de détection de la sulforhodamine G étant largement supérieure à celle de la rhodamine WT (cf légende des figures A46 et A47).

La modification de l'amplification du signal, pratiquée en cours d'analyse par BEHREN S A26 (cf figure A44) n'apportant pas dans le cas du couple "sulforhodamine G - rhodamine WT" d'amélioration sensible, nous avons déterminé, sur la base d'explorations à amplification constante, dont l'exemple a été donné figure A45, les limites du rapport des concentrations relatives des deux traceurs permettant d'envisager une analyse quantitative de chacun des deux produits.

Ces limites seraient les suivantes :

$$2,5 < \text{Rhodamine WT/Sulforhodamine G} < 20$$

A.5.2.4. APPLICATION A LA METHODE DU PAS CONSTANT DES TECHNIQUES D'ANALYSE
D'UN SPECTRE COMPLEXE PAR LA METHODE DES MOINDRES CARRÉS

Nous nous proposons dans un premier temps d'essayer de discriminer ces deux traceurs dans la gamme de concentrations relatives les plus favorables pour, ensuite, si la méthode le permettait, l'appliquer pour des spectres interférant totalement.

a) Principe de la méthode : analyse d'un spectre complexe par la méthode des moindres carrés [A26]

Cette méthode, couramment utilisée en spectrométrie gamma pour l'analyse d'un spectre complexe, a été transposée à l'analyse des spectres de mélanges de deux produits fluorescents.

Son principe est le suivant : un sélecteur dont les canaux sont numérotés 1,i, n enregistre le spectre d'un mélange contenant m produits fluorescents numérotés 1,j,m. On dispose des spectres de référence correspondant à des concentrations connues de chacune des substances prises isolément. Echantillons de référence et mélanges à analyser sont mesurés dans les mêmes conditions. L'intensité de fluorescence dans le canal i de l'échantillon j est a_{ij} , l'intensité du mélange b_i . Soit X_j le rapport de la concentration inconnue à celle de l'échantillon correspondant, on a alors :

$$b_i = \sum_{j=1}^m a_{ij} X_j + Z_i$$

Z_i étant l'erreur fortuite.

Cette méthode suppose que, quelles que soient les concentrations, la forme du spectre de chaque produit est un invariant ; nous nous en sommes assurés avant d'entreprendre l'étude (cf figure A48).

Les meilleures valeurs de X_j seront obtenues en minimisant R, somme des carrés de Z^2

$$R = \sum_{i=1}^n Z_i^2 = \sum_{i=1}^n \left[b_i - \sum_{j=1}^m a_{ij} X_j \right]^2$$

On dérive l'expression ci-dessus par rapport à X_j et on égale à 0 pour obtenir une minimisation de R. On obtient ainsi une série de m équations 1, K, m de la forme suivante pour la k^{ème} :

$$\sum_{j=1}^m X_j \sum_{i=1}^n a_{ik} a_{ij} = \sum_{i=1}^n a_{ik} b_i$$

Dans le cas qui nous intéresse, m nombre de constituants du mélange est égal à 2 :

$$X_1 \sum_{i=1}^n a_{i1}^2 + X_2 \sum_{i=1}^n a_{i1} a_{i2} = \sum_{i=1}^n a_{i1} b_i$$

$$X_1 \sum_{i=1}^n a_{i1} a_{i2} + X_2 \sum_{i=1}^n a_{i2}^2 = \sum_{i=1}^n a_{i2} b_i$$

BIBLIOTHEQUE
CRETECH - SCIENCES
UNIVERSITAIRE

La résolution de ce système nous donnera les valeurs de X_1 et X_2 , d'où les valeurs inconnues de la concentration A_1 et A_2 .

b) Mise en oeuvre de la méthode

Tous ces calculs ont été effectués sur ordinateur sous les conseils de M. JUNOD, ingénieur au CENG, grâce au programme "GASPARD" mis au point par lui-même pour la séparation de spectres γ complexes au SARR [A31]. Les spectres de fluorescence des deux étalons sulforhodamine G et rhodamine WT ainsi que le spectre du mélange ont été relevés à la table de lecture du SARR et mis sur cartes perforées, puis traités par "GASPARD". Tous les spectres sont relevés à partir de la même abscisse origine, ici 450 nm, et analysés par l'intermédiaire de 200 canaux différents.

c) Cas de la discrimination sulforhodamine G - rhodamine WT

Les spectres de plusieurs mélanges binaires ont été relevés selon la méthode exposé en b) ci-dessus ainsi que les spectres de deux échantillons de rhodamine WT et de sulforhodamine G pris isolément. La figure A49 représente un exemple de spectres relevés à la table de lecture de deux étalons rhodamine WT et sulforhodamine G avec un mélange binaire.

Résultats obtenus

On a reproduit figure A50 les tableaux récapitulatifs relatifs aux 22 séries de mélanges traités.

Le premier tableau indique les concentrations respectives des produits présents dans chaque mélange.

Le second tableau résume les principaux résultats.

- Sur la première ligne les concentrations calculées en chacun des deux produits (Rh WT et sulforh. G dans l'ordre) concentrations rapportées aux concentrations des deux étalons de référence $5 \cdot 10^{-9}$ kg/l chacun

- sur la seconde ligne figurent les écarts-type

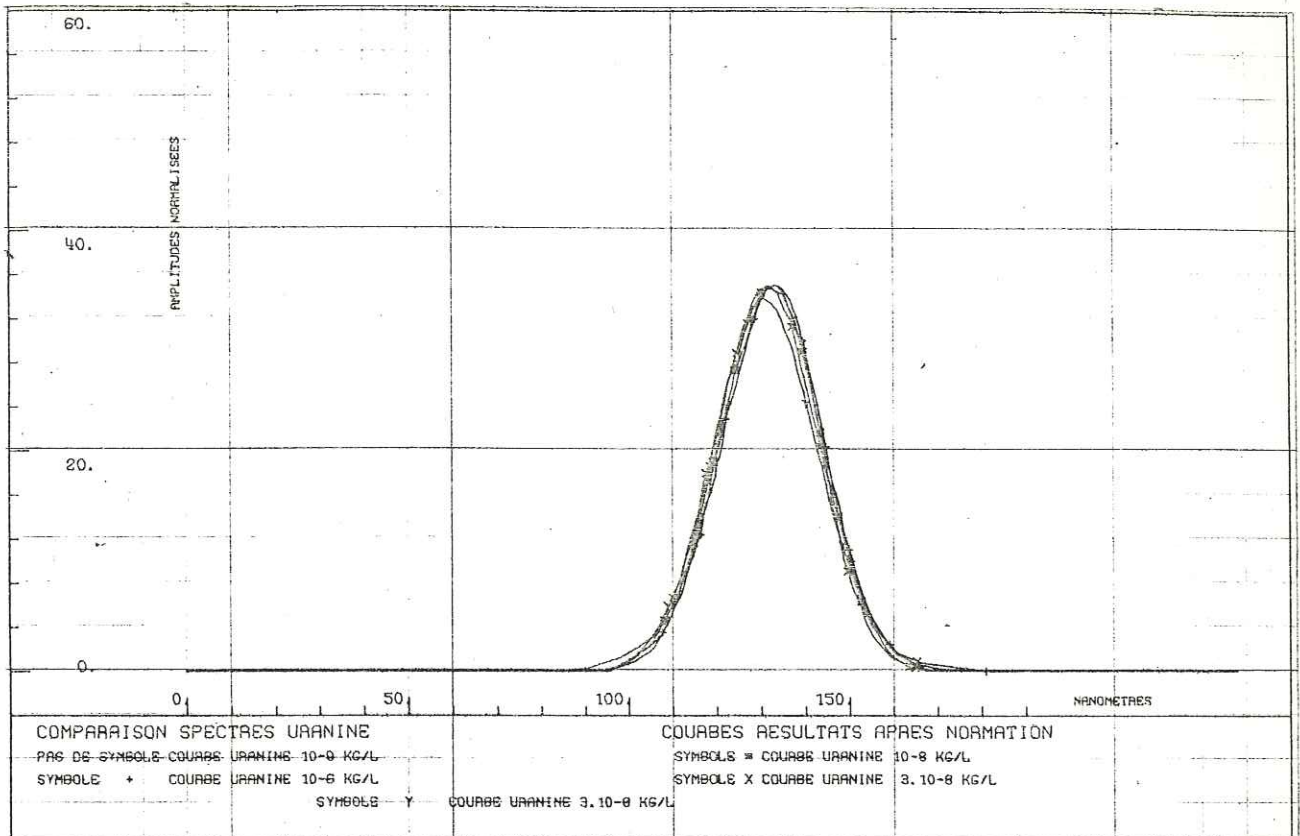


Figure A48: Série de spectres étalon d'urine à des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-9} . (courbes normées en surface)

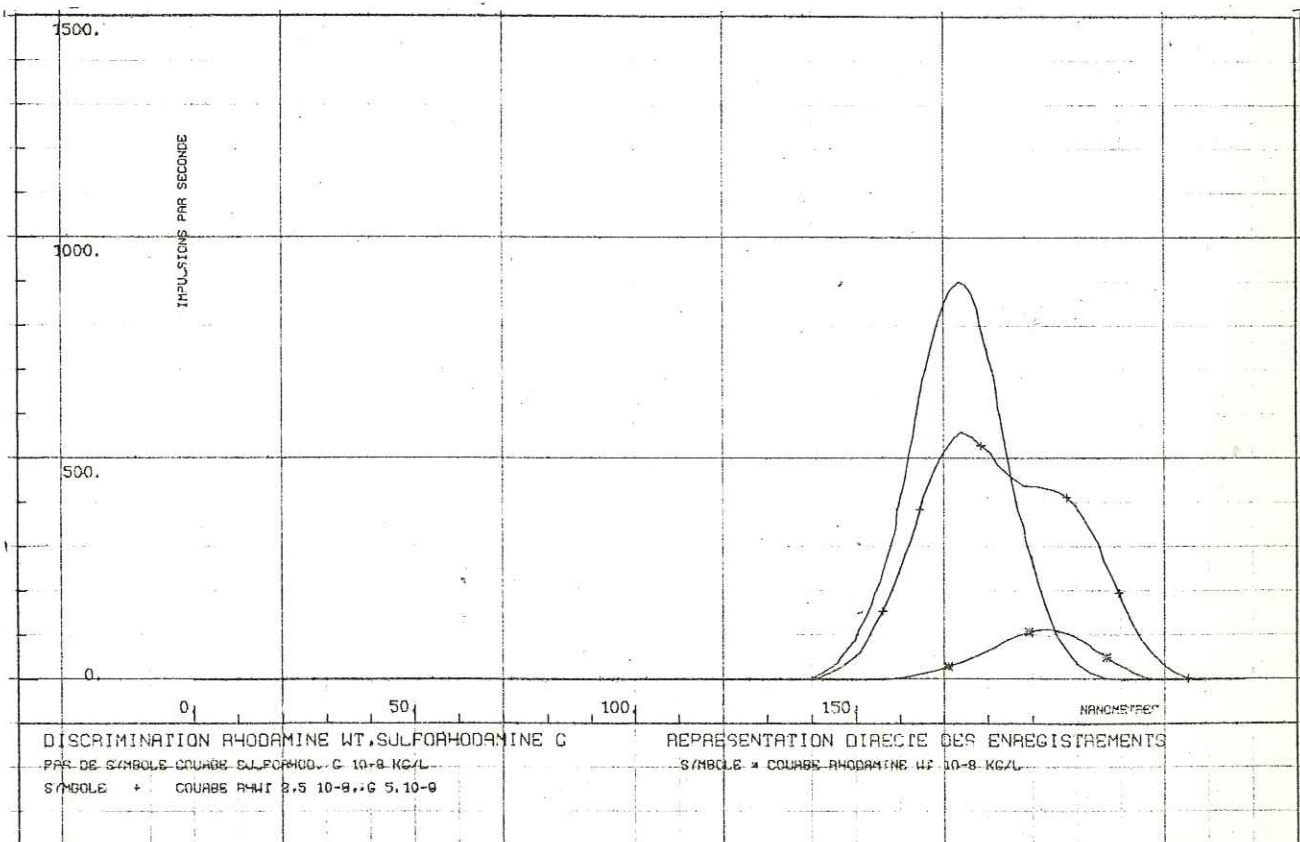


Figure A49: Exemple de spectres (relevés à la table de lecture) de deux étalons de Rhodamine Wt et de Sulforhodamine G à même concentration (10^{-7} kg/l) et d'un mélange binaire de deux traceurs, la concentration en Rh Wt étant cette fois cinq fois supérieure à celle de la Sulforhodamine G.

Figure A50 : Tableau récapitulatif des essais de discrimination de Rhodamine Wt et de Sulforhodamine G dans 22 mélanges binaires.

1 RHWT 5.10-9,SG 5.10-10	12 RHWT 8.10-8,SG 2.10-3
2 RHWT 2,5.10-9,SG 5.10-10	13 RHWT 3,3.10-8,SG 1,610-8
3 RHWT 2,5.10-9SG 2,5.10-9	14 RHWT 8,8.10-8,SG 1,410-9
4 RHWT 2,5.10-8,SG5.10-10	15 RHWT 3,7.10-8,SG 1,310-8
5 RHWT 5.10-8,SG 5.10-10	16 RHWT 2,5.10-8SG 2,5.10-9
6 RHWT 5.10-9,SG 2,5.10-9	17 RHWT 2,5.10-8,SG 5.10-9
7 RHWT 5.10-8,SG 5.10-9	18 RHWT 5.10-8,SG 2,5.10-9
8 RHWT 5.10-8,SG 2,5.10-8	19 RHWT 5.10-9,SG 5.10-9
9 RHWT 5.10-8,SG 5.10-8	20 RHWT 2,5.10-8SG 2,510-9
10 RHWT 6.10-8,SG3,310-8	21 RHWT 5.10-10,SG 5.10-10
11 RHWT 7,5.10-8SG2,5.10-8	22 RHWT 2,5.10-8,SG5.10-10
1 0.1938E-21 0.6254E 00 0.1389E-02 0.7724E-01 ***** % 12.35 %	12 0.6907E 00 0.2912E 00 0.2072E-01 0.2048E-01 3.00 % 7.46 %
2 0.1938E-21 0.4367E 00 0.7657E-01 0.0424E-01 ***** % 14.72 %	13 0.6425E 00 0.3297E 00 0.2199E-01 0.2339E-01 3.42 % 7.25 %
3 0.3536E 00 0.1947E-21 0.4536E-01 0.4555E-01 5.02 % ***** %	14 0.1638E-21 0.6505E 00 0.2377E-01 0.1724E 00 ***** % 26.51 %
4 0.1938E-21 0.8501E 00 0.4534E-01 0.8074E-01 ***** % 10.56 %	15 0.1038E-21 0.7918E 00 0.1716E 00 0.1093E 00 ***** % 13.80 %
5 0.1938E-21 0.9163E 00 0.8032E-01 0.7031E-01 ***** % 7.87 %	16 0.8630E 00 0.1062E 00 0.1377E-01 0.1094E-01 1.56 % 10.11 %
6 0.7959E 00 0.1807E 00 0.1333E-01 0.7711E-02 1.70 % 4.27 %	17 0.6510E 00 0.3233E 00 0.2050E-01 0.2112E-01 3.15 % 6.53 %
7 0.1938E-21 0.8735E 00 0.7670E-02 0.1380E 00 ***** % 20.73 %	18 0.1938E-21 0.7565E 00 0.2101E-01 0.1333E 00 ***** % 18.35 %
8 0.7934E 00 0.1844E 00 0.1908E-01 0.1758E-01 2.40 % 6.53 %	19 0.8763E 00 0.1267E 00 0.4179E-01 0.2290E-01 4.77 % 13.07 %
9 0.3599E 00 0.1113E 00 0.2408E-01 0.1950E-01 2.37 % 17.07 %	20 0.1938E-21 0.1131E 01 0.2279E-01 0.2181E 00 ***** % 19.29 %
10 0.7633E 00 0.1433E 00 0.2340E-01 0.2181E-01 2.25 % 11.57 %	21 0.1938E-21 0.1947E-21 0.2171E 00 0.2161E 00 ***** % ***** %
11 0.7600E 00 0.2041E 00 0.4043E-01 0.0000E-01 2.10 % 17.25 %	22 0.1938E-21 0.8501E 00 0.2111E 00 0.8076E-01 ***** % 10.56 %

- sur la troisième ligne, les erreurs relatives pour un écart-type

Commentaires

Les importantes erreurs et discordances observées dans les tableaux de la figure A50 peuvent notamment résulter des faits suivants :

- il n'a pas été tenu compte, dans cette première approche, de la non linéarité du signal de fluorescence
- la représentativité et la précision du tracé des spectres de référence n'ont pas été vérifiées

Mais la cause essentielle semble résider dans des décalages d'abscisses des données spectrales.

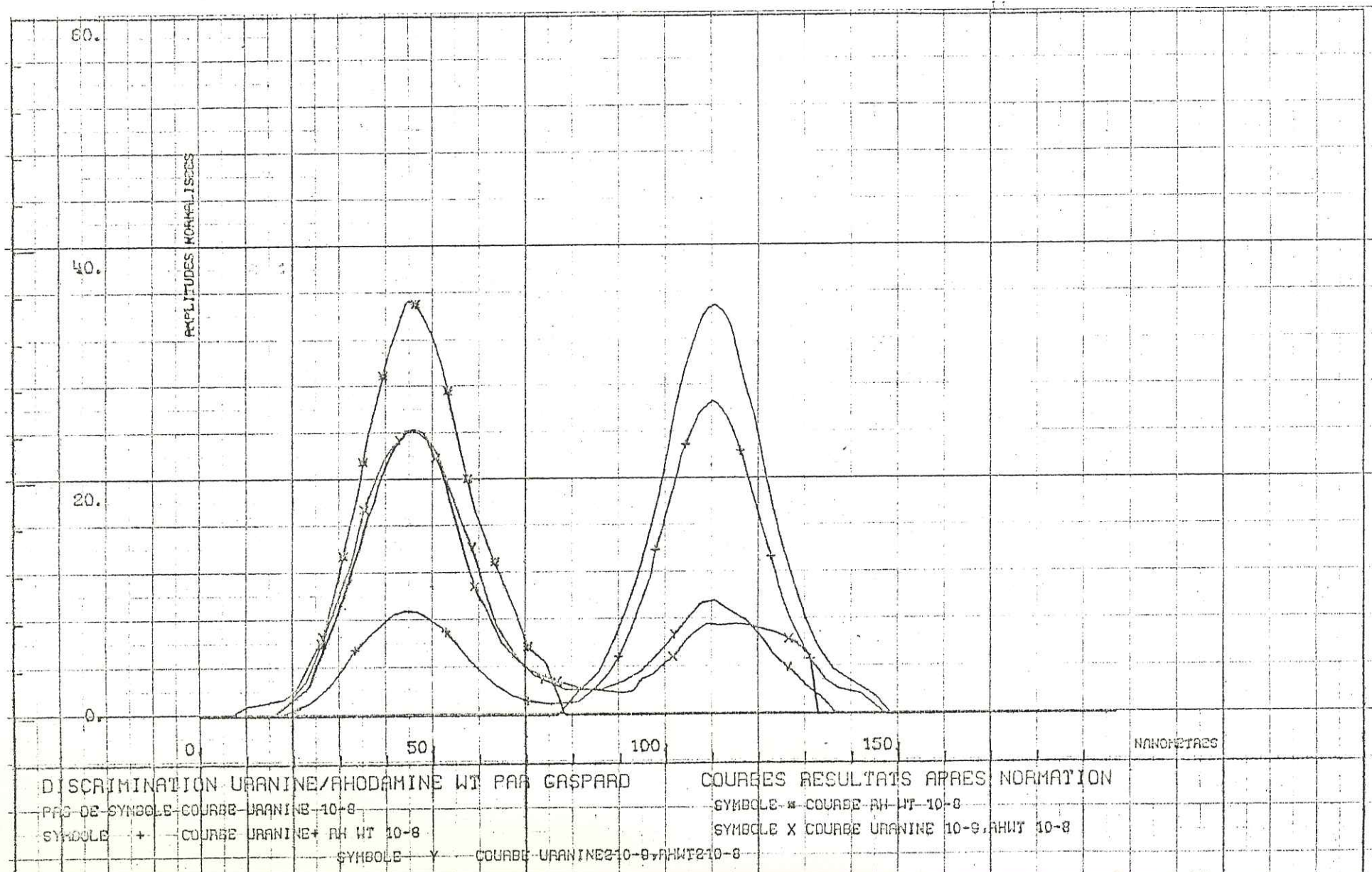
Comme le traitement est entrepris à partir des dénombrements effectués sur chacun des 200 canaux de largeur identique découpant chacun des spectres, il est fondamental que le calage en abscisse des différents spectres relevés soit parfait. Quand nous avons commencé cette expérimentation, nous ne possédions pas d'enregistreur de spectre très précis et les décalages pouvaient être de l'ordre de 4 nm. Lors du relevé des spectres à la table de lecture, il est également difficile d'obtenir une précision supérieure à 2 nm. Il en résultait que les canaux analysés par l'ordinateur ne correspondaient pas aux mêmes abscisses d'un spectre à l'autre.

Bien que nous ayons procédé à plusieurs essais de recalage de l'origine, opération rendue possible par le programme lui-même, nous n'avons pas obtenu d'amélioration des résultats. Ceci mettant hors de cause le décalage d'origine supputé, semble devoir imputer l'échec de la méthode à la mauvaise définition relative des données d'entrée, c'est-à-dire, des spectres élémentaires de chacun des deux traceurs.

d) Essai de discrimination Rhodamine WT - Uranine pour le cas de concentrations très différentes des deux produits présents.

La mauvaise définition des courbes ayant été en partie attribuée à l'inertie mécanique de l'enregistreur utilisé, nous avons entrepris de mettre en œuvre la méthode dans le cas de discrimination le plus aisé, à partir de spectres obtenus avec un enregistreur galvanométrique rapide d'inertie nulle de type "VISICORDER".

Figure A51 : Exemple de spectres (relevés à la table de lecture) de deux étalons d'uranine et de Rhodamine Wt ainsi que de trois mélanges binaires de ces deux traceurs (courbes normées en surface)



Résultats et commentaires

Les essais que nous avons entrepris sur une gamme de concentrations relatives étendue n'ont malheureusement donné de résultats positifs que dans le cas de concentrations voisines. La discrimination de ces traceurs étant, comme on l'a montré en 5.2.2.c, relativement aisée pour des concentrations de même ordre de grandeur, l'emploi de cette méthode de discrimination relativement complexe et coûteuse ne se justifie que lorsque les concentrations relatives des deux traceurs sont très différentes.

La figure A51 où sont représentés, après normation en surface, les spectres de trois mélanges binaires et de deux échantillons de référence, dénote un certain nombre d'irrégularités de relevés graphiques. On peut présumer que la résolution de ces problèmes graphiques, comme de ceux qui ont été évoqués plus haut (étalonnages en longueurs d'onde et en amplitude de signal) devrait permettre d'aboutir par ce type de traitement à des résultats de qualité supérieure.

e) Conclusions

Après cette série d'essais infructueux nous étions contraints de convenir que, si la méthode dans son principe était séduisante, elle demandait des conditions expérimentales trop sévères. Selon M. JUNOD, la forme étalée des spectres de produits fluorescents rend l'analyse moins précise que dans le cas des spectres γ complexes pour lesquels le programme a été élaboré.

Les obstacles rencontrés et la brièveté du délai dont nous disposions nous ont conduits à renoncer pour le moment à cette étude. Il est tout au moins apparu qu'un tel traitement dont il ne faut pas dissimuler la lourdeur et aussi le coût, ne pourrait être appliqué que dans des cas très spécifiques et relativement exceptionnels.

A.5.3. METHODE DE DISCRIMINATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET ANALYSE SPECTROFLUORIMETRIQUE

A.5.3.1. PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

On utilise des plaques de verre recouvertes d'une pellicule de 250 μ d'épaisseur environ d'un mélange de gel de silice et de plâtre. Une petite quantité du mélange à séparer est posé sur la plaque. Un solvant organique approprié déplace, en fonction de leur coefficient de partage, les différents composants du mélange, plus ou moins loin de leur position initiale. On opère dans une enceinte saturée afin d'éviter l'évaporation qui interromprait le processus de migration.

A.5.3.2. MISE EN OEUVRE DE LA METHODE

a) Mise au point du solvant

La difficulté majeure de la séparation par chromatographie est la mise au point du solvant.

Ce problème a été résolu, pour les traceurs xanthéniques employés en hydrologie, par Mlle ALARY et ROCHAS, à l'U.E.R. de Pharmacie à l'Université Scientifique et Médicale de GRENOBLE. Le solvant employé est un mélange de Butanol et d'Ethanol alcalinisé par de l'ammoniaque [A29].

b) Le support

Il est constitué par un mélange de gel de silice et de plâtre MERCK.

A.5.3.3. RESULTATS OBTENUS

a) Analyse qualitative

Mlle ALARY et ROCHAS sont parvenus à séparer par chromatographie sur couche mince dans un mélange composé d'Uranine, de Rhodamine B, de Rhodamine WT, de Sulforhodamine G et de Sulforhodamine B, chacun des constituants. Dans les conditions expérimentales retenues, la séparation des cinq traceurs

est remarquable, chacun d'eux, visualisé par sa coloration (les concentrations adoptées pour ces essais qualitatifs étant de 10^{-6} kg/l) occupant un emplacement distinct sur la plaque chromatographique A29.

b) Analyse quantitative

Ces résultats encourageants nous ont incités à rechercher la possibilité de parvenir, par ce procédé, à des séparations quantitatives. L'étude a porté sur un couple de traceurs dont la discrimination, extrêmement malaisé, est susceptible de rendre d'éminents services en hydrologie souterraine (cf B.1.2.2.), le couple Rhodamine WT - Sulforhodamine G.

Dans une première série d'essais on a procédé à l'"étalonnage". Après avoir réalisé les gammes suivantes de dilution de chacun des traceurs, on a fait subir à chacune de ces solutions une chromatographie avec le solvant organique choisi.

Traceurs	Concentration en kg l^{-1}								
Rhodamine WT	.	.	.	10^{-9}	$2 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-9}$	10^{-8}	$2 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$
Sulforhodamine G	10^{-10}	$2 \cdot 10^{-10}$	$4 \cdot 10^{-10}$	10^{-9}	$2 \cdot 10^{-9}$	$4 \cdot 10^{-9}$	10^{-8}	$2 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$

Après grattage des plaques, récupération du traceur et remise en solution aux concentrations initiales, les courbes d'étalonnage de chacun des traceurs ayant subi une chromatographie ont été tracées.

Cette expérience nous a permis d'examiner l'influence de la chromatographie sur la linéarité de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration. La figure A52, courbes 1A et 2A, montre que la limite pratique de détection semble être de $2 \cdot 10^{-9}$ kg l^{-1} pour la rhodamine WT et $4 \cdot 10^{-9}$ kg l^{-1} pour la sulforhodamine G

Dans une deuxième série d'essais il a été effectué des mélanges isoconcentration de sulforhodamine G et de rhodamine WT, en partant des mêmes solutions-mère. Après chromatographie de ces mélanges, nous devrions obtenir, si les produits étaient correctement séparés, deux courbes d'étalonnage coïncidant avec les courbes d'étalonnage obtenues dans la première série d'expérience

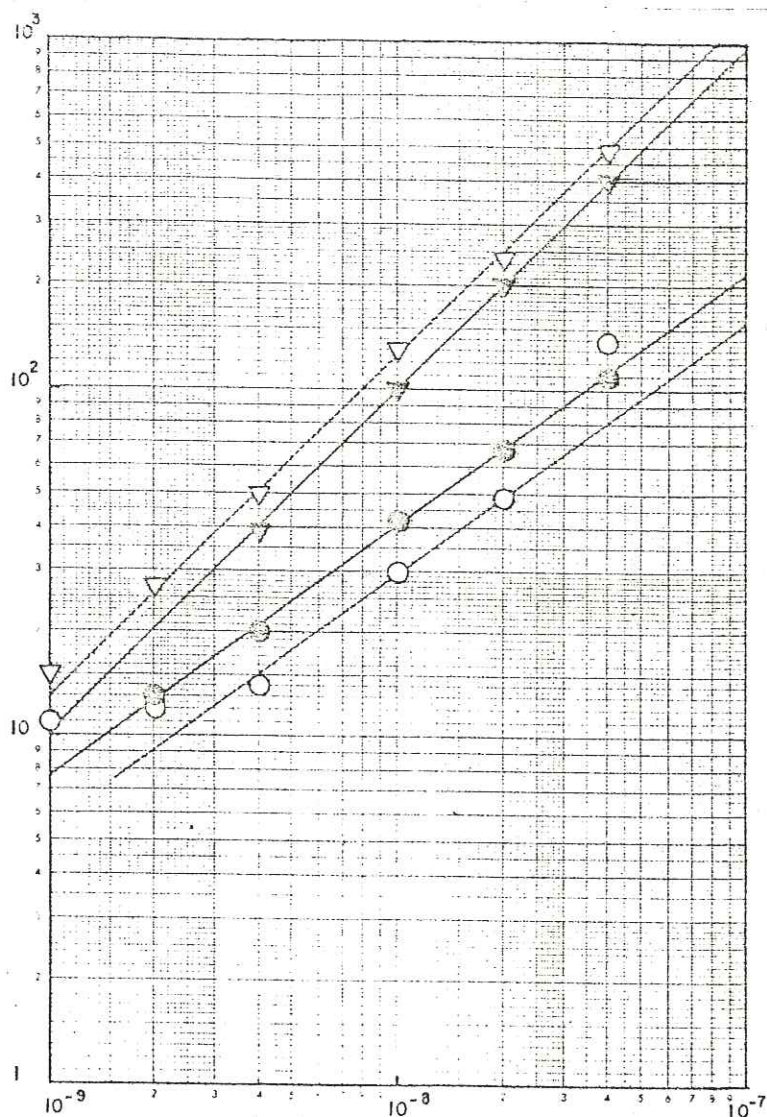


Figure A52 : Etude de la séparation par chromatographie sur couche mince de Rhodamine Wt et de Sulforhodamine G en solution.

1A (cercles noirs-trait continu) Etalonnage d'une solution de RH Wt ayant subi la chromatographie.

1B (cercles blancs-trait interrompu) Résultat de mesure de RH Wt extraite par chromatographie du mélange binaire isoconcentration

2A (triangles noirs-trait continu) Etalonnage d'une solution de Sulforhodamine G ayant subi la chromatographie.

2B (triangles blancs-trait interrompu) Résultat de mesure de Sulforhodamine G extraite par chromatographie du mélange binaire isoconcentration.

(En abscisse, les concentrations; en ordonné les intensités de fluorescence)

La figure A 52, courbes 1B et 2B, montre :

- la bonne linéarité des deux gammes ayant subi la chromatographie
- une perte apparente de traceur d'environ 25% dans le cas de la Rhodamine WT
- une majoration d'environ 20% des concentrations pour la Sulforhodamine G

Conclusion :

Pour les deux gammes d'extraction, chaque point est minoré ou majoré systématiquement, mais la linéarité est conservée. Au stade actuel des investigations, il n'est pas encore possible de préciser les causes de ces écarts ; on peut néanmoins considérer comme satisfaisante cette méthode qui, au prix d'un étalonnage soigneux permet d'envisager une séparation quantitative et qui peut être appliquée, comme nous l'avons vu en (a), à la séparation de n'importe quel couple de rhodamines.

c) Inconvénients de la chromatographie sur couche mince

La manipulation est très longue et, de plus, elle est délicate. Cette méthode peut cependant servir de procédé de référence car elle présente l'avantage de permettre de séparer et de doser quantitativement toutes les rhodamines.

A.5.4. METHODE DE DISCRIMINATION PAR SEPARATION CHIMIQUE ET ANALYSE SPECTROFLUORIMETRIQUE

A29

Devant la lourdeur de mise en oeuvre de la méthode de séparation par chromatographie, Mlle ALARY et ROCHAS, à partir de considérations sur les propriétés chimiques des différentes rhodamines, ont développé un autre procédé de séparation.

A.5.4.1. ASPECT CHIMIQUE DU PROBLEME

Les Rhodamines B ou WT, carboxyliques, ont un comportement d'acides faibles ($R\text{COOH}^+$) en solution aqueuse.

La Sulforhodamine G, au contraire, avec un groupement $R^+ SO_3^- H^+$ a un comportement d'acide fort.

En milieu acide la sulforhodamine G est soluble dans l'eau, alors que la rhodamine WT est insoluble dans l'eau mais soluble dans certains solvants organiques tels que le chloroforme ou la méthylisobuthylcétone (m.i.c.)

A.5.4.2. PROCEDE DE SEPARATION

Une solution aqueuse d'un mélange de rhodamine B ou WT et de sulforhodamine G est introduite dans un tube à essais. On ajoute le solvant organique, par exemple du chloroforme, et on acidifie par de l'acide sulfurique à un pH de l'ordre de 5. Puis on émulsionne le chloroforme par agitation ; la rhodamine WT (ou B) passe en solution dans le solvant organique qui décanse au fond du tube lorsque l'agitation cesse, alors que la sulforhodamine G restera dans la partie aqueuse surnageante.

A.5.4.3. RESULTATS OBTENUS

Dans une première expérience, il a été effectué trois gammes de dilutions de sulforhodamine G aux concentrations suivantes :

$$10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} \text{ kg l}^{-1}$$

L'analyse spectrofluorimétrique, quel que soit le milieu (neutre, chlorhydrique ou sulfurique) montre que les écarts étaient négligeables. Cependant, pour se prémunir de tout risque d'extinction de la fluorescence par l'anion Cl^- , il a été jugé préférable d'acidifier à pH 4 à 5 avec de l'acide sulfurique faiblement concentré.

a) Séparation et analyse spectrofluorimétrique d'un mélange Rhodamine WT - Sulforhodamine G

Plusieurs séries d'essais ont été réalisées pour apprécier le rendement de la séparation Rhodamine WT - Sulforhodamine G. Les résultats sont rassemblés sur le diagramme de la figure A53.

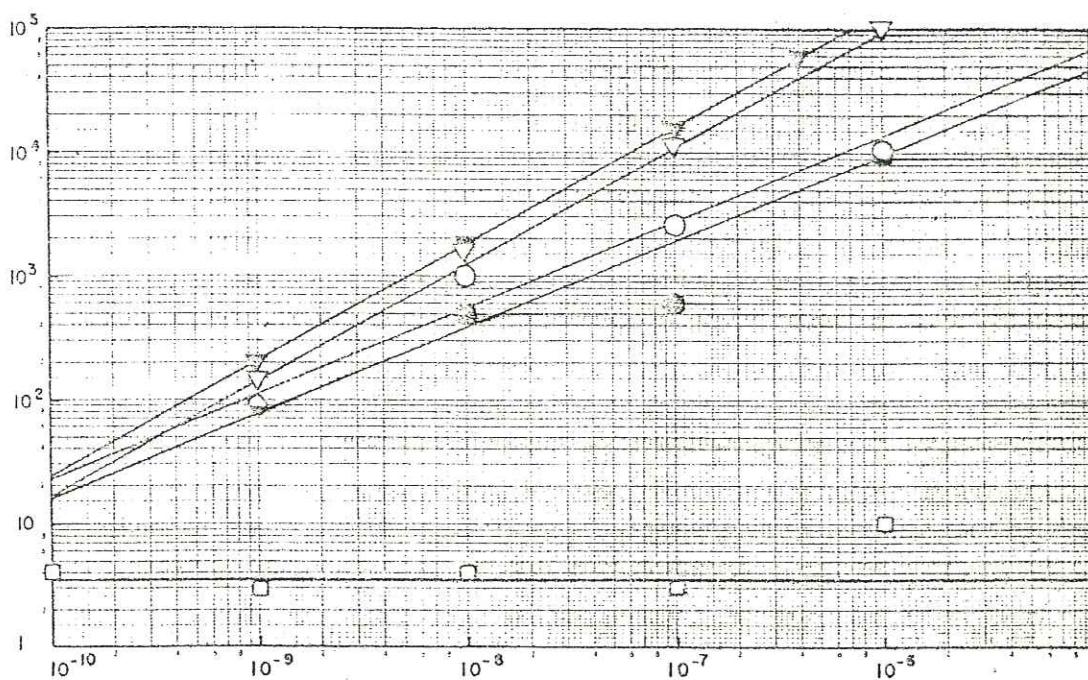


Figure A53 :Etude de la séparation par voie chimique et extraction liquide-liquide d'un mélange de Rhodamine Wt et de Sulforhodamine G

1A (cercles noirs-trait continu) Etalonnage d'une solution chloroformique de Rhodamine Wt ayant subi le traitement.

1B (cercles blancs,trait interrompu) Résultat de mesure de RH Wt en solution chloroformique extraite du mélange binaire isoconcentration.

2A (triangles noirs-trait continu) Etalonnage d'une solution aqueuse de Sulforhodamine G ayant subi le traitement.

2B (triangles blancs-trait discontinu) Résultat de mesure de Sulforhodamine G dans le résidu aqueux du mélange binaire isoconcentration.

3 (carrés blancs-trait discontinu long) Résultat de mesure de RH Wt dans le résidu aqueux de la solution chloroformique 1B.

(En abscisse les concentrations;en ordonné les intensités de fluorescence)

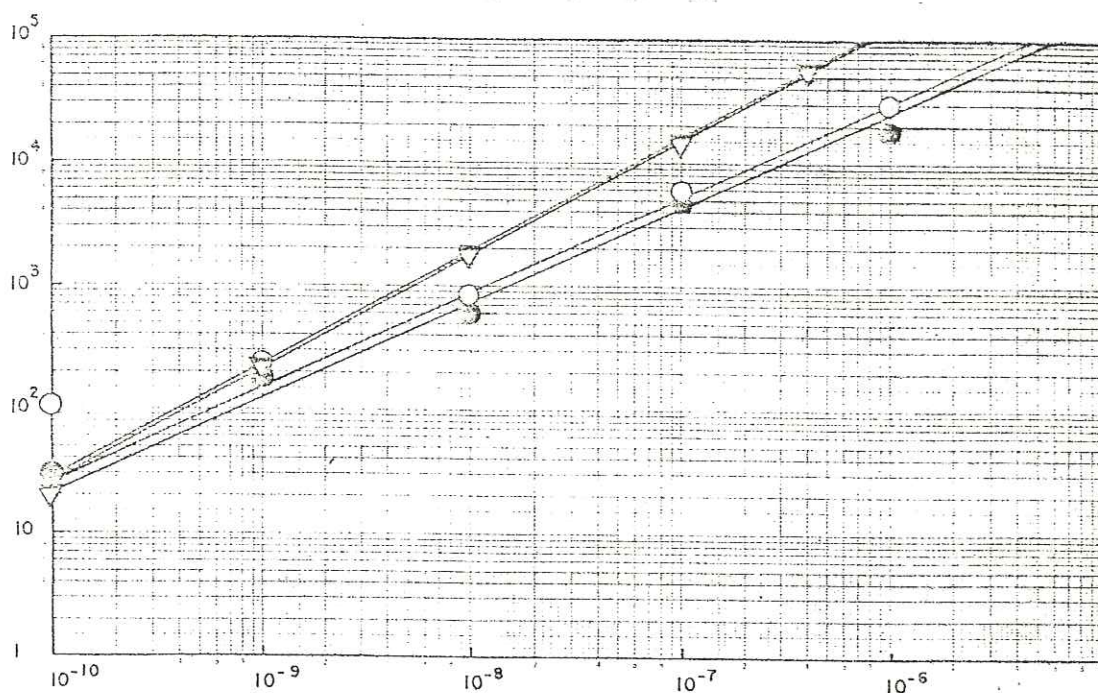


Figure A54 : Etude de la séparation par voie chimique et extraction liquide-liquide d'un mélange de Rhodamine B et de Sulforhodamine G.

L'identification des graphes est identique à celle de la figure A53, la substitution près de la Rhodamine B à la Rhodamine Wt.

Toutes les mesures ont été effectuées, après traitement, sur des solutions de référence de rhodamine WT et de sulforhodamine G et de mélanges à concentrations égales de ces deux colorants, à des concentrations comprises entre 10^{-10} et 10^{-6} kg/l.

Résultats et commentaires

- Les graphes 1A et 1B permettent de juger du rendement d'extraction de la Rhodamine WT en éliminant l'influence du solvant et de l'acidification
- Les graphes 2A et 2B permettent d'évaluer le rendement d'extraction de la sulforhodamine G

L'ensemble de ces graphes permet de considérer les rendements d'extraction comme très satisfaisants

- Le graphe 3 confirme qu'il ne subsiste aucune trace de Rhodamine WT dans la phase aqueuse.

b) Séparation et analyse spectrofluorimétrique d'un mélange de Rhodamine B et de Sulforhodamine G

La suite d'expériences est rigoureusement la même que pour le cas précédent. La figure A54 présente les résultats obtenus.

Ces résultats sont comparables aux résultats précédents avec des taux d'extraction supérieurs.

A.5.5. CONCLUSION SUR LES PROCÉDES DE DISCRIMINATION DES TRACEURS FLUORESCENTS

Avant d'entreprendre cette étude il était acquis qu'il n'y avait pas de difficulté majeure pour discriminer l'Uranine d'un autre traceur fluorescent. L'objectif des investigations entreprises consistait à cerner les possibilités de distinguer rhodamines et sulforhodamines entre elles, afin de pouvoir mettre en oeuvre, lors d'opérations de marquages simultanées, au moins trois traceurs fluorescents distincts.

La discrimination par spectrofluorimétrie, selon la méthode préconisée par BEHRENS n'a pas abouti aux résultats que la littérature laissait entrevoir.

Le traitement automatique des spectres sur lequel nous avons fondé nos espoirs d'amélioration de performances a échoué sur des subtilités d'une mesure que nous maîtrisons encore insuffisamment.

En collaboration avec Mlle ALARY et ROCHAS et sur une suggestion de MOLINARI nous avons entrepris de procéder à des séparations par chromatographie sur couche mince. Ce procédé s'est révélé offrir une résolution remarquable, et ce, pour tous les traceurs fluorescents dont l'emploi est envisageable à l'heure actuelle.

Il est néanmoins difficile d'attendre de ce procédé, qui peut rendre d'éminents services dans des mesures ayant valeur d'expertise, mais dont la mise en oeuvre devient laborieuse pour des concentrations très faibles, des résultats quantitatifs précis.

La méthode de séparation chimique par extraction liquide-liquide préconisée par Mlle ALARY et ROCHAS a l'avantage d'une plus grande simplicité mais est limitée à deux produits à choisir l'un dans le groupe des rhodamines, l'autre dans le groupe des sulforhodamines.

Ce procédé de séparation qui donne d'excellents résultats a permis d'atteindre, d'ores et déjà, notre premier objectif.

Ainsi, les importants résultats acquis dans les trois directions que nous avons défrichées, font entrevoir des perspectives de discrimination plus efficaces et plus complètes encore.

2^{ÈME} P A R T I E

APPLICATION A L'HYDROGEOLOGIE



B.1. METHODOLOGIE ET CHOIX DES TRACEURS FLUORESCENTS EN HYDROGEOLOGIE

B.1.1. RAPPELS SUR LA METHODOLOGIE DES TRACEURS [B1]

B.1.1.1. DISTRIBUTION DES TEMPS DE SEJOUR

a) Définition

Reprenons ici, pour l'essentiel, l'exposé général de MOLINARI dans son récent rapport sur les techniques des traceurs. [B1]

"Quelle que soit la nature des problèmes posés (qu'il s'agisse d'une étude de circulation en hydrologie souterraine, de la simulation d'une pollution, etc. ...), on a toujours affaire à des phénomènes de transfert de masses et leur solution repose toujours sur l'obtention de l'information définissant les modalités spatiotemporelles du ou des transferts à étudier". L'information la plus complète que l'on puisse fournir sur ces modalités de transfert, est, pour n'importe quel système considéré, la *réponse impulsionnelle* de ce système pour le fluide étudié".

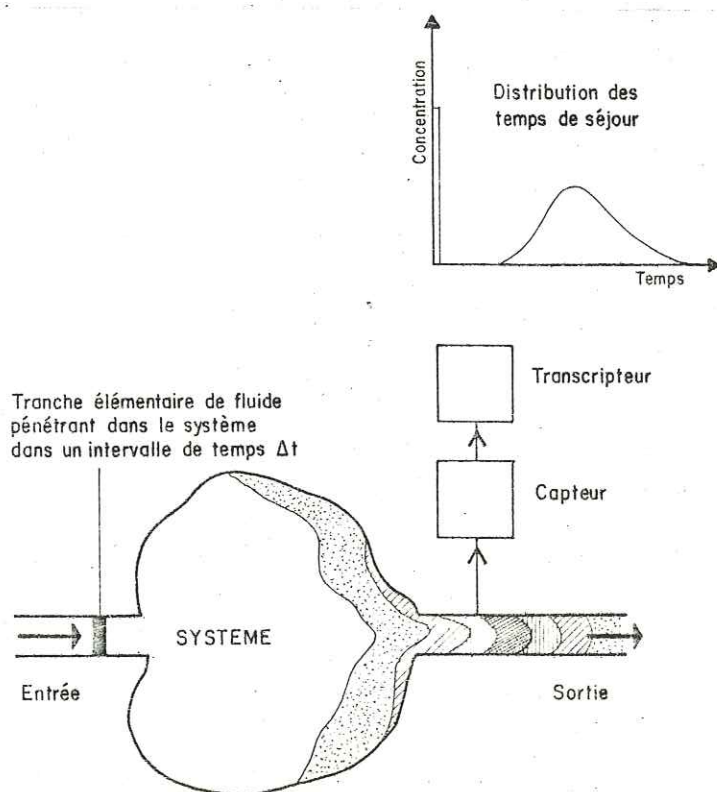


Figure B1 : Schéma d'obtention de la distribution des temps de séjour (D.T.S.) d'un système. (d'après MOLINARI [B1])

"Pour préciser cette notion, considérons, dans des conditions d'écoulement que l'on supposera permanentes, une tranche élémentaire de fluide pénétrant dans un système quelconque et observons, en sortie de ce système, les modalités de restitution de cette tranche élémentaire (fig. B1)

"Toutes les particules de fluide ayant pénétré au même instant dans le système ne subiront pas le même sort à sa traversée, ne serait-ce qu'en raison de la diversité des trajectoires suivies".

".... la restitution des fluides ou des substances présentera un "étalement" que l'on pourra ramener à une distribution fréquentielle caractéristique du sort subi par chaque fluide ou substance étudiée".

"Pour des conditions hydrodynamiques données, cette D.T.S. est un invariant du système".

"L'existence de ces D.T.S. doit attirer l'attention sur l'erreur courante qui consiste à invoquer "le" temps de transit à travers un système, notion qui n'a pas de réalité physique, les temps de séjour étant toujours compris dans une certaine gamme dont l'étalement peut quelquefois être considérable (B1).

b) Mode d'obtention

Comme le pense MOLINARI [B1]

"Pour obtenir ces D.T.S., il suffit de caractériser une tranche élémentaire de fluide pénétrant dans le système. Cette condition est aisément obtenue en "marquant" cette tranche dans un laps de temps le plus bref possible au moyen d'un *indicateur* (ou *traceur*) aisément identifiable."

"Dans tous les cas, l'on doit s'attacher à obtenir un marquage significatif et, faute de pouvoir caractériser indistinctement toutes les particules de la tranche élémentaires de fluide pénétrant dans le système, l'injection idéale est obtenue par introduction du traceur de telle façon qu'il soit réparti de manière homogène dans cette population".

"A une échelle modeste, l'on peut obtenir cette homogénéité par brassage. Ainsi, le marquage correct d'une tranche verticale d'aquifère peut être assuré par circulation forcée du traceur dans le forage d'injection. Dans le cas où l'on est dans l'impossibilité de maîtriser les flux d'entrée, la condition de marquage est satisfaite si l'on prend soin d'injecter, en tout point d'une section de passage, des masses de traceur proportionnelles aux débits de transit locaux. Ce mode d'injection est représenté schématiquement figure B.2." B1.

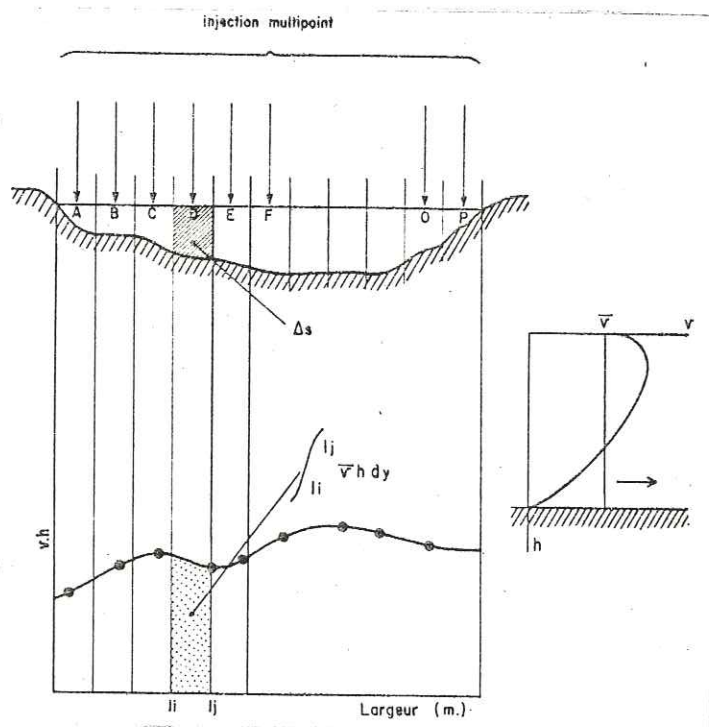


Figure B2 : Marquage homogène, par "injections multipoints" d'une tranche élémentaire d'écoulement dans un cours d'eau. La quantité de traceur injectée dans chaque élément de section doit être proportionnelle au débit local. Les vitesses moyennes locales sont généralement obtenues directement par intégration du champ des vitesses, en déplaçant à vitesse constante le moulinet sur la verticale de mesure. [B1]

B.1.1.2. EXPLOITATION DES DISTRIBUTIONS DES TEMPS DE SEJOUR (D.T.S.)

a) Informations fournies par les D.T.S.

L'étude de la courbe de restitution du traceur à la sortie du système permet d'atteindre des paramètres caractéristiques des modalités de transfert de l'eau dans le système étudié. Les informations obtenues sont de deux types :

- détermination de vitesses
- établissement de bilans de traceurs

Détermination de vitesses

Si le traceur simule correctement le comportement de l'eau, on pourra, par sa D.T.S., obtenir :

- le temps de transit des particules de fluide les plus rapides dans le transfert, cette indication est particulièrement intéressante dans le cas, par exemple, de simulation d'un rejet de pollution pour la détermination d'un périmètre de protection.

- le temps modal, ou temps de l'abscisse du sommet de la courbe, c'est le temps le plus probable de transit des molécules du fluide en mouvement
- le temps moyen donné par l'abscisse du centre de gravité de la courbe "concentration-temps".

Comme très souvent la distance entre le point d'injection et l'exutoire est connue ou déterminera ainsi :

- . la vitesse des particules de fluide les plus rapides
- . la vitesse modale, ou vitesse la plus probable
- . la vitesse moyenne

Etablissement d'un bilan

La quantité de traceur restituée à un exutoire est égale au produit

$$q \ c \ dt$$

ou q et c sont respectivement le débit et la concentration à l'instant t . Si l'on connaît, outre la D.T.S., la variation de débit à l'exutoire, le bilan de traceur A s'obtient par intégration du produit précédent

$$A = \int_{t=t_{\text{arrivée}}}^{t^{\alpha}} q \ c \ dt$$

En hydrologie karstique si ce taux de restitution est voisin de 100 % on pourra alors affirmer que tous les exutoires ont été pris en compte. Au contraire un très mauvais taux de restitution indiquera que des points d'exurgences peuvent avoir échappé à l'investigation, si l'on admet la conservation de traceur (c'est généralement le cas en hydrologie de surface et en hydrologie karstique, mais ne l'est pas toujours dans un milieu à perméabilité en petit où les risques de rétention sont considérables).

b) Relations analytiques entre l'entrée et la sortie d'un système

On montre que des relations analytiques simples existent entre l'entrée et la sortie d'un système et qu'il existe des méthodes mathématiques permettant d'obtenir la distribution des temps de séjour d'un système lorsque celle-ci n'est pas directement accessible [B1]

c) Modèles mathématiques d'écoulement

On est capable de définir mathématiquement les D.T.S. de systèmes idéaux simples que l'on qualifie de modèles élémentaires, et de n'importe quelle de leurs combinaisons entre eux.

On se préoccupe depuis peu d'ajuster les distributions des temps de séjour obtenues en hydrologie à des modèles mathématiques. Ce genre d'ajustement peut susciter des objections chaque fois (et c'est extrêmement fréquent en hydrologie) que le régime d'écoulement n'est pas permanent. Ces réserves émises, l'ajustement à des modèles mathématiques permet de dégager les aspects essentiels des phénomènes étudiés. On se satisfait à l'heure actuelle de comparaisons avec les modèles les plus simples que sont les mélangeurs parfaits et les pistons diffusionnels ou leur association.

B.1.2. PRATIQUE DE LA MESURE

B.1.2.1. ETALONNAGE

En principe, l'étalonnage devrait suffire pour toutes les mesures. En réalité dans de nombreux domaines, on ne se satisfait pas de ces courbes d'étalonnage et on procède à des mesures comparatives entre les quantités de traceur injectées et les quantités restituées.

Ainsi l'on prend soin de procéder à une prise d'échantillon dite "prise aliquote" qui consiste à prélever une certaine proportion de la masse totale injectée.

Pour les traceurs fluorescents cette précaution s'impose systématiquement, car, d'une part, les produits fluorescents ou les solutions fluorescentes industrielles ne présentent pas une qualité constante (certains produits colorants sont accompagnés de charges dont la proportion n'est pas précisé par le fabricant), et, d'autre part, on a constaté que certaines solutions industrielles paraissent décanter sensiblement, ce qui s'accompagne d'une variation de la concentration de la solution résiduelle avec le temps.

Il faut remarquer en outre que la relation de proportionnalité entre signal de fluorescence et concentration du produit fluorescent n'est qu'approchée; en fait cette relation a un caractère exponentiel assez marqué, différent d'un colorant à l'autre, et, nous le présumons, dépendante de la pureté et de la qualité du produit.

Aussi a-t-on admis que pour toutes les études d'hydrologie, il était nécessaire de procéder systématiquement avant toute expérience au prélèvement d'une partie aliquote de la masse totale du traceur injectée et au tracé d'une courbe d'étalonnage relatif à partir d'une série de dilutions de ces prises aliquotes.

Parallèlement à la prise d'une aliquote, on prélève avant l'injection, à tous les points de mesure retenus des échantillons d'eau afin d'en déterminer les bruits de fond respectifs.

B.1.2.2. MESURES

a) "In situ"

Un des grands intérêts des traceurs fluorescents est de pouvoir être mesuré "in situ". Pour ce faire on a recours au fluorimètre "TURNER 111". L'appareil est alors équipé d'une cellule de mesure en continu, il est relié à une petite pompe qui l'alimente en permanence en eau à analyser. La courbe intensité de fluorescence en fonction du temps est alors directement fournie ; elle est relevée sur un enregistreur. L'énergie électrique est fournie à l'ensemble par un groupe électrogène portatif.

Des années de pratique de ces mesures au SARR ont souligné certains inconvénients de ces mesures "in situ" et notamment l'influence de facteurs tels que : la variation de la tension d'alimentation, l'éclairage, les variations de température etc. ... sur le signal fourni par l'appareil.

Ces facteurs affectent notablement la précision de la mesure, proscrivant ainsi toutes mesures correctes de bilan.

b) En laboratoire

Pour cette raison depuis quelques années le SARR procède systématiquement à des prélèvements d'échantillons qui sont mesurés en laboratoire sur fluorimètre et maintenant sur spectrofluorimètre avec toute la précision et les précautions requises.

L'enregistrement sur le terrain des concentrations des traceurs, même avec une imprécision relative importante, reste dans la majorité des cas utile, sinon indispensable, ne serait-ce que pour préciser la durée et les modalités de l'échantillonnage.

B.1.3. CHOIX D'UN TRACEUR FLUORESCENT EN HYDROLOGIE

Ce choix sera fonction de l'environnement dans lequel sera employé le traceur.

B.1.3.1. HYDROLOGIE DE SURFACE

En hydrologie de surface, pour des mesures de débits ou des déterminations du temps de séjour sur un cours d'eau ou encore pour des études de courantologie marine, le facteur déterminant dans le choix d'un traceur fluorescent sera sa stabilité photochimique.

L'Uranine devrait être proscrite pour sa trop grande sensibilité à la lumière solaire (cf A.3.3.1.).

La sulforhodamine B et la Sulforhodamine G présentent des difficultés de mise en solution. Ces deux traceurs sont relativement peu fixés [A4]. La sulforhodamine B devra être employée avec circonspection lorsque l'on effectuera des mesures en continu car la fluorescence de ce produit est très sensible aux variations de température (cf A.3.4.3.).

Les rhodamines B et WT présentent l'avantage d'être livrées en solution et sont donc d'un emploi plus aisé que les deux traceurs précédents. La

Rhodamine WT présente un meilleur comportement que la Rhodamine B. Cependant pour des raisons de coût il lui est souvent préféré la Rhodamine B, au détriment parfois de la qualité des résultats, ce dernier traceur étant sujet à des phénomènes de rétention parfois intenses.

B.1.3.2. MILIEU KARSTIQUE

Il existe une grande analogie entre l'emploi des traceurs fluorescents en milieu karstique et en hydrologie de surface. En général, les surfaces de contacts entre le traceur et le milieu sont du même ordre de grandeur dans les deux milieux. Il faut noter évidemment, qu'ici, la décomposition photochimique ne jouant plus, l'emploi de l'Uranine, traceur fluorescent ayant le meilleur comportement devra être recommandé.

B.1.3.3. HYDROLOGIE SOUTERRAINE

Le problème majeur rencontré dans ce cas sera le problème de la rétention du traceur par le terrain. En effet, les surfaces de contact, donc des possibilités d'interactions entre le traceur et le milieu sont ici considérables.

Bien que les traceurs salins de faible encombrement stérique et à caractère anionique fortement marqué soient généralement préférés aux traceurs fluorescents, on peut utiliser avec succès (cf B.4 et B.5) l'Uranine qui a la propriété d'être faiblement fixée, ainsi que la Sulforhodamine G et la Rhodamine WT.

B.1.4. LES ESSAIS EFFECTUES SUR LE TERRAIN

Nous avons retenu pour illustrer l'emploi des traceurs fluorescents en hydrogéologie, certains des essais réalisés par le SARR auxquels nous avons eu l'opportunité de participer (soit au cours de leur exécution sur le terrain, soit au laboratoire en effectuant les mesures et en procédant à leur interprétation.

Une étude d'hydrologie de surface faisant l'objet du chapitre B2 a été entreprise sur le cours supérieur de la DIEGE, sur le bassin expérimental du même nom, afin d'évaluer les contributions relatives des différents bassins versants élémentaires par des mesures de débits par dilutions au fil de l'eau, mesures complétées par des mesures de distribution des temps de séjour.

Dans le chapitre suivant nous rendons compte d'une expérience de multi-traçage en milieu karstique réalisée dans le massif du VERCORS afin de préciser certaines des zones d'alimentation de la résurgence de GOULE BLANCHE.

Dans le quatrième chapitre nous décrivons une expérience de marquages multiples en milieu saturé à perméabilité en petit sur le bassin expérimental de l'HALLUE pour préciser les modalités hydrodynamiques d'écoulement de la nappe.

Enfin, dans le dernier chapitre nous évoquons une série d'essais effectués pour déterminer, sur le site de la nappe alluviale de LYON, les conditions hydrodynamiques de transfert vertical de rejets superficiels en milieu non saturé.

B.2. HYDROLOGIE DE SURFACE

Dans le cadre d'une convention de recherches passée entre la D.G.R.S.T. et le laboratoire SARR du C.E.N. GRENOBLE, nous avons eu à mettre en oeuvre des traceurs fluorescents en hydrologie de surface associés à un traceur salin, l'iodure de sodium.

B.2.1. CADRE DE L'ETUDE

B.2.1.1. OBJECTIF DES ESSAIS

L'objectif de ces essais consistait à évaluer par jaugeage continu les apports au fil de l'eau sur le cours supérieur de la DIEGE, afin de préciser, dans au moins deux conditions hydrodynamiques différentes, les contributions relatives des bassins versants élémentaires. Ces essais ont été associés à des mesures de Distributions des temps de séjour (D.T.S.) dans le but de déterminer les caractéristiques de transfert de l'eau sur les sections de mesures retenues.

B.2.1.2. PRESENTATION GEOGRAPHIQUE ET GEOLOGIQUE [B2] [B3]

Le bassin versant de la DIEGE est situé à l'ouest du Massif Central sur le plateau de MILLEVACHES, au Nord ouest d'USSEL. La DIEGE reçoit en rive gauche la LIEGE. La DIEGE est un affluent rive droite de la DOROGNE. Le bassin versant a été retenu comme bassin versant expérimental représentatif par EdF. Il a une superficie de 225 km² et une altitude moyenne de 775 m. (cf carte de situation, fig. B3).

Le bassin versant de la DIEGE repose entièrement sur les terrains cristallins et cristallophyllens du socle hercynien. La répartition schématique du substratum est la suivante :

Migmatites	70 %
Granites	20 %
Gneiss	10 %

(Voir fig. B4 : schéma géologique)

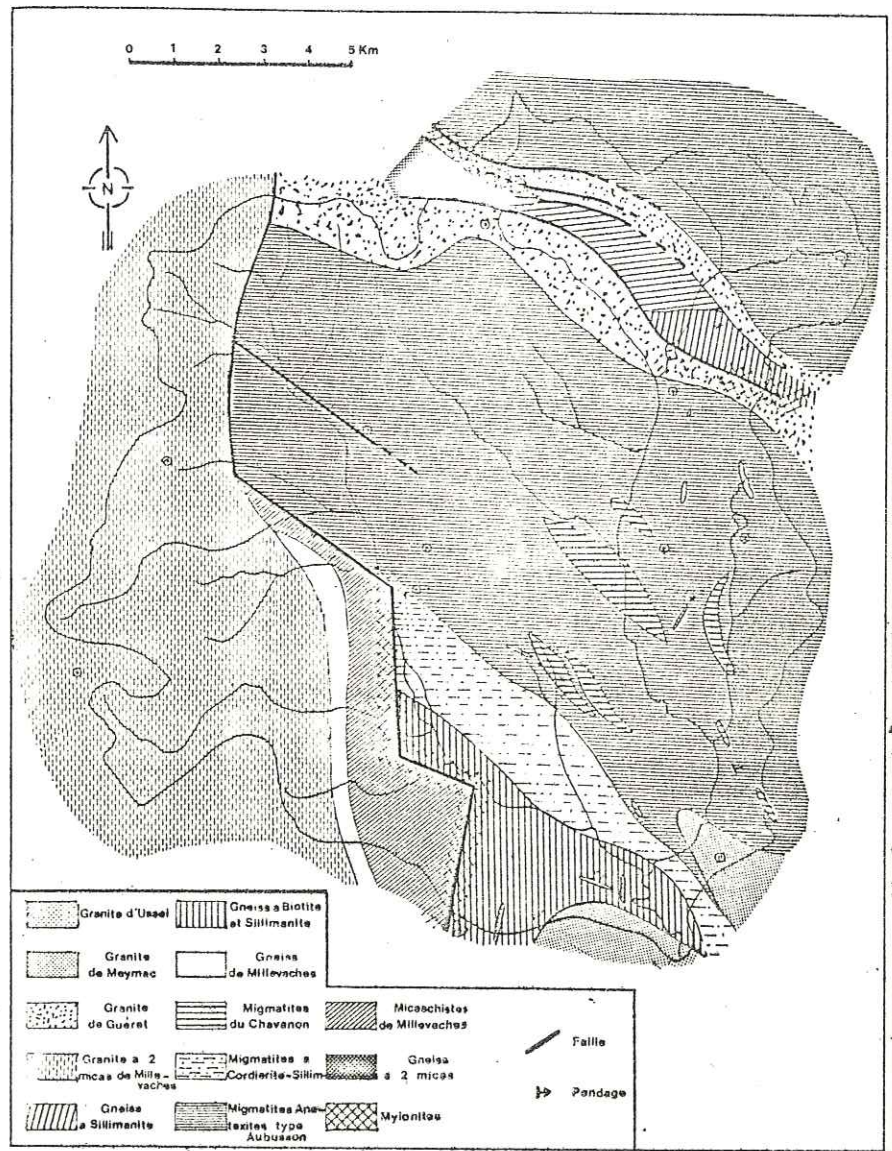


Figure B4 : Scéma géologique du bassin versant de la DIEGE.
(d'après CORMARY et ANGLES B3)

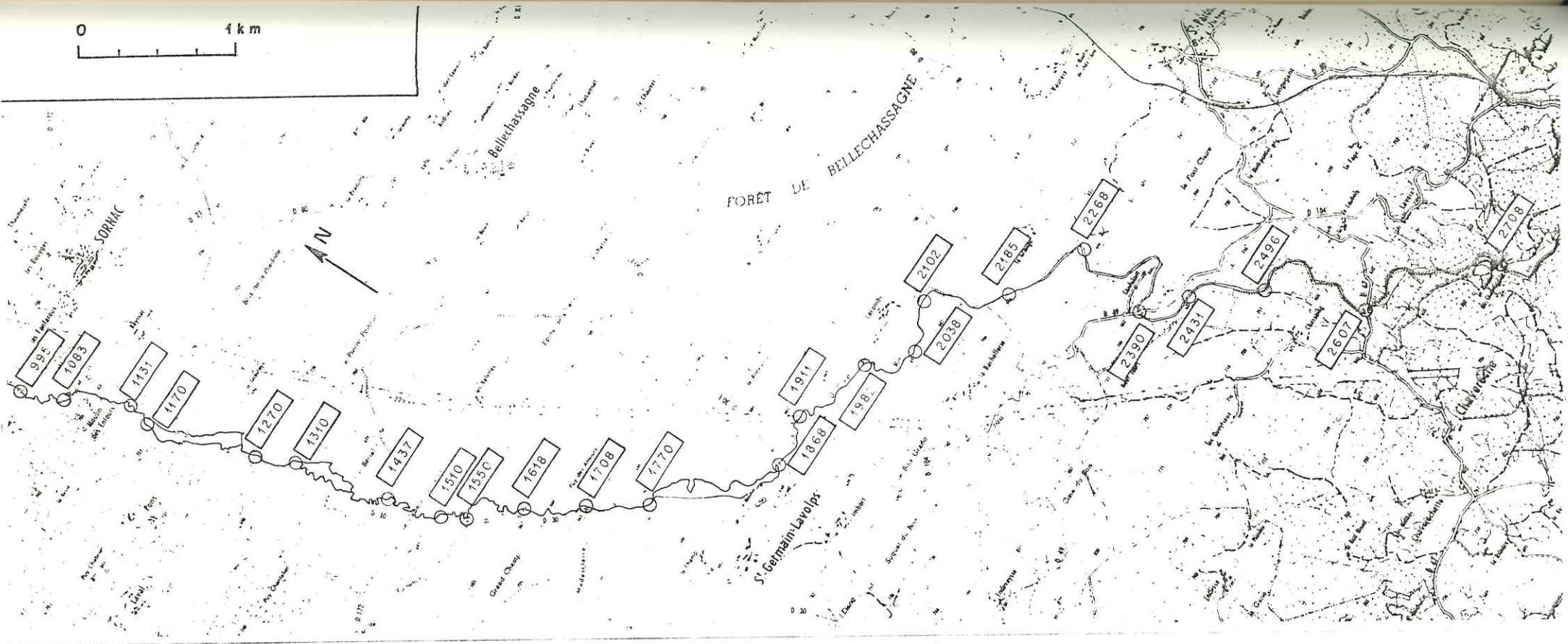
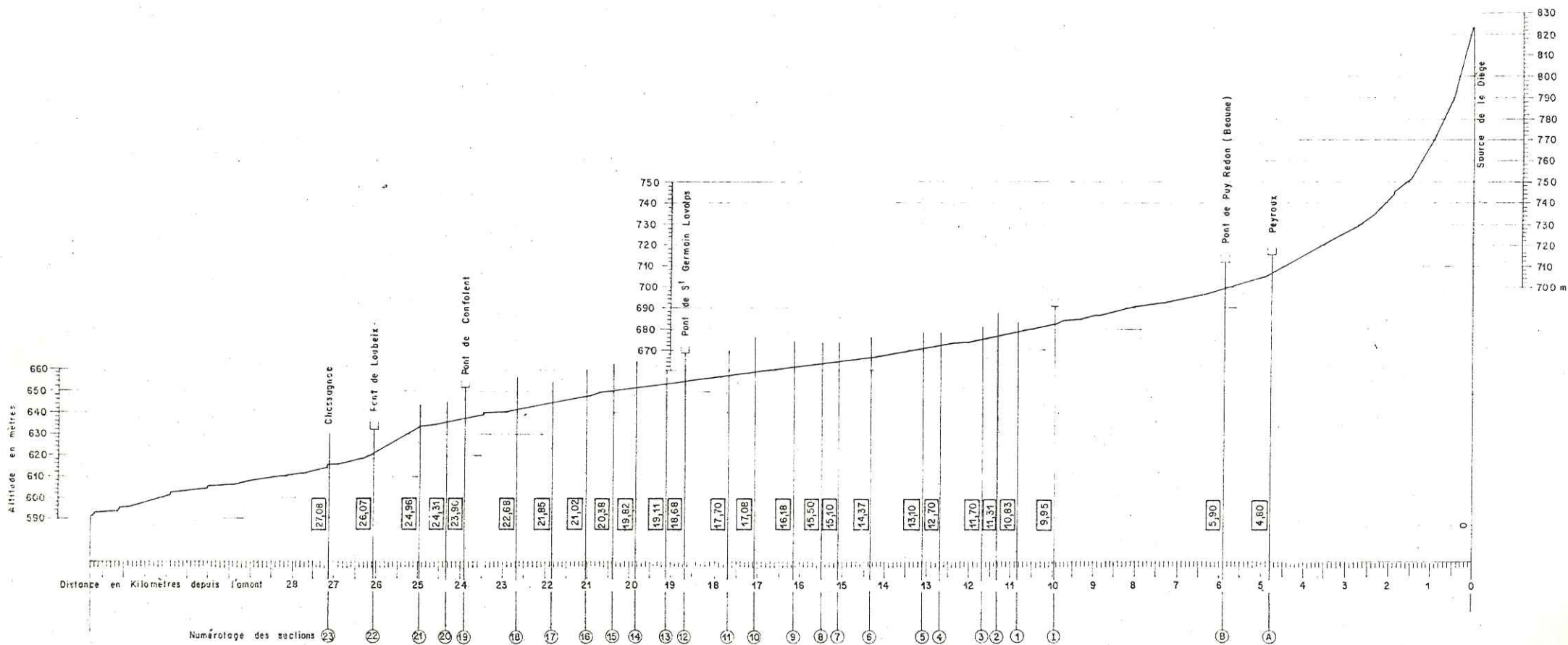


Figure B5 : Réduction de la carte topographique au 1/25000 montrant l'implantation des points de mesures.

Figure B6 : Profil en long du cours supérieur de la DIEGE avec le repérage hectométrique des stations de mesures.



PROFIL EN LONG DU COURS SUPERIEUR DE LA DIEGE (d'après l'Institut Géographique National.)

En surface ces roches subissent une altération qui les transforme en gres composé d'un mélange de quartz, de micas et de kaolinite [B3].

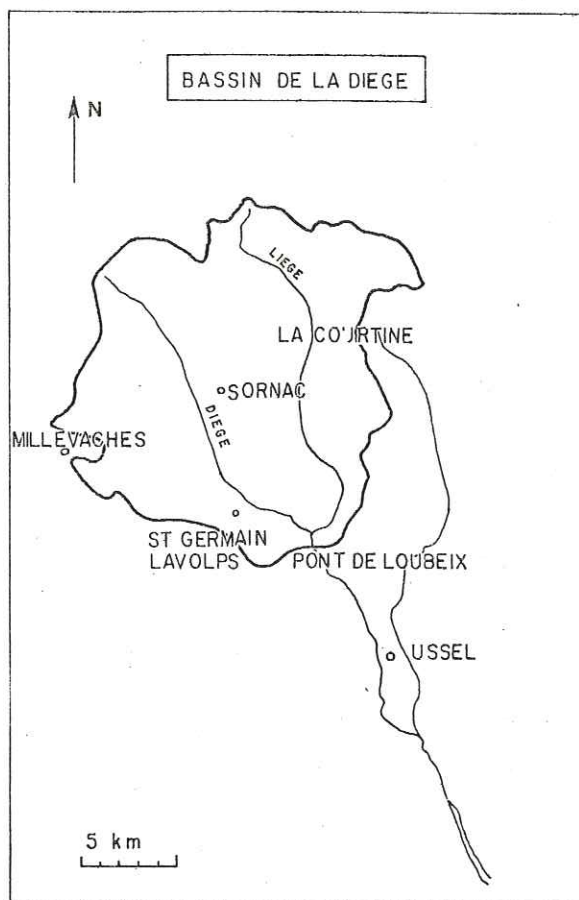


Figure B3 : Bassin versant de la DIEGE. (carte de situation) (d'après CORMARY et ANGLES B3)

B.2.1.3. SITUATION DES SECTIONS DE MESURES

La carte topographique au 1/50 000^e de la figure B5 et le profil en long du cours supérieur de la DIEGE de la figure B6 précisent l'implantation des sections de mesures.

B.2.2. PRINCIPE ET MODE OPERATOIRE DES ESSAIS [B4] [B5]

B.2.2.1. JAUGEAGE PAR DILUTION

La méthode de jaugeage par dilution consiste à mesurer dans le cours d'eau le taux de dilution d'un traceur dont on connaît la concentration au point d'injection.

La mesure n'a de sens que si la dispersion du traceur a préalablement intéressée la totalité de la masse d'eau en mouvement et si le débit du cours d'eau ne varie pas au cours de l'essai. Cette condition dite de bon mélange se traduit par la relation valable en tout point d'une section de mesure :

$$\int_0^{\infty} c(t) dt = \text{constante}$$

où c est la concentration locale et instantanée du traceur.

Ce résultat ne peut être atteint avec une approximation suffisante qu'au-delà d'une certaine distance du point d'injection appelée "distance minimale de bon mélange".

La méthode choisie ici est celle de l'injection continue à débit constant. Un prélèvement instantané suffit lorsque le palier de concentration est atteint.

Q et q sont les débits respectifs du cours d'eau et de la solution injectée.

C et c sont respectivement les concentrations de traceur dans la solution mère d'injection et dans le cours d'eau à la section de mesure lorsque le palier de concentration est atteint.

Alors on peut écrire

$$Cq = cQ$$

relation qui permet de calculer le débit Q .

On démontre que le front de montée de la courbe concentration-temps du traceur à la section de mesure est l'intégrale de la distribution des temps de séjour du traceur entre le point d'injection et cette même section.

Il est donc nécessaire pour obtenir un palier de concentration à la section de mesure, de procéder à une injection à la section d'entrée d'une durée supérieure à cette D.T.S. La connaissance de cette D.T.S. est donc indispensable pour optimiser les conditions de mesure c'est-à-dire réduire au minimum le temps d'injection et préciser les dates de prélèvements.

L'évaluation de la durée d'injection et de la quantité de traceur à injecter avec toute la précision requise lors des mesures de débit sur un bief dépend évidemment de l'étalement de la D.T.S. de ce bief.

On a pu ainsi s'assurer qu'avec une durée maximale d'injection autorisée par le matériel du SARR il était possible d'observer un palier de concentration de durée satisfaisante à plus de 16 km du point d'injection au pont de SORNAC (I).

Une bonne connaissance des D.T.S. intermédiaires a été indispensable pour programmer les tournées de prélèvements des opérateurs (cf figure B9).

B.2.2.2. OBTENTION DES D.T.S.

a) Injection multipoints

Les mesures de D.T.S. effectuées sur la DIEGE ont été obtenues au moyen de Rhodamine WT et d'Uranine.

L'injection s'est faite selon le processus d'injection multipoints décrit en B.1.

En effet, la DIEGE, bien qu'étant un petit cours d'eau d'un débit de l'ordre de quelques m^3/s , présentait lors des opérations de marquages à certaines sections d'injection, plusieurs bras principaux. Cette injection multipoints avait pour but de diminuer la distance de bon mélange qui aurait été redhibitoire quand on sait - différentes formules empiriques s'accordent sur ce point - que la distance de bon mélange est grosso modo proportionnelle à la largeur du lit.

b) Mesures en continu "in situ" et prélèvements d'échantillons

Comme c'est l'usage au SARR les mesures de D.T.S. ont été effectuées avec des fluorimètres continus (cf B.1.).

Ainsi par exemple, pour les D.T.S. 22 et 23 (cf B.2.3.), après l'injection de 300 ml de Rhodamine WT au "pont de CONFOLENS" (19), il a été installé deux fluorimètres continus l'un à la première section de mesure en aval : "Pont de LOUBEIX" (22), l'autre à la deuxième section de mesure au "Pont de CHASSAGNAC" (23).

La mesure en continu, moins précise cependant que la mesure au laboratoire, nous a servi ici à guider les prélèvements manuels effectués aux sections de mesure.

Parallèlement à l'enregistrement en continu, nous prélevions, toutes les cinq minutes, trois échantillons : rive droite, milieu, rive gauche, afin de nous assurer que la condition de bon mélange était bien satisfaite.

La mesure en continu, en visualisant le passage du traceur, permet d'éviter des erreurs considérables.

En septembre 1972, par exemple, lors de notre seconde campagne d'essais, les débits étaient considérablement plus faibles que lors de la campagne précédente, en mai 1972. Les temps d'arrivée des D.T.S. ainsi que leur "étalement" étaient près du double de ceux observés au cours de la première campagne. Sans l'assistance des fluorimètres continus il y a tout lieu de croire que des opérateurs, même avisés, auraient procédé à un échantillonnage incomplet. L'observation "in situ" permet également d'augmenter la cadence d'échantillonnage au cours de la phase cruciale du passage de la D.T.S. (c'est-à-dire au cours de la "montée" et du "sommet" de la "vague" de traceur) et au contraire d'espacer les prélèvements tout au long de la décroissance toujours très lente.

C'est bien évidemment au laboratoire que seront déterminées à partir des échantillons prélevés, avec toute la précision requise, les D.T.S. recherchées.

B.2.3. ESSAIS EFFECTUES

Le tableau ci-après résume les essais auxquels nous avons participé. Pour chaque section d'injection de traceurs des prélèvements sont effectués à deux sections de mesure en aval. L'intérêt est un gain de temps évident minimisant ainsi les fluctuations du débit de la rivière pendant les mesures.

Quatre sections d'injection avaient été retenues donnant 8 D.T.S. dont certaines ont été représentées planche B9 .

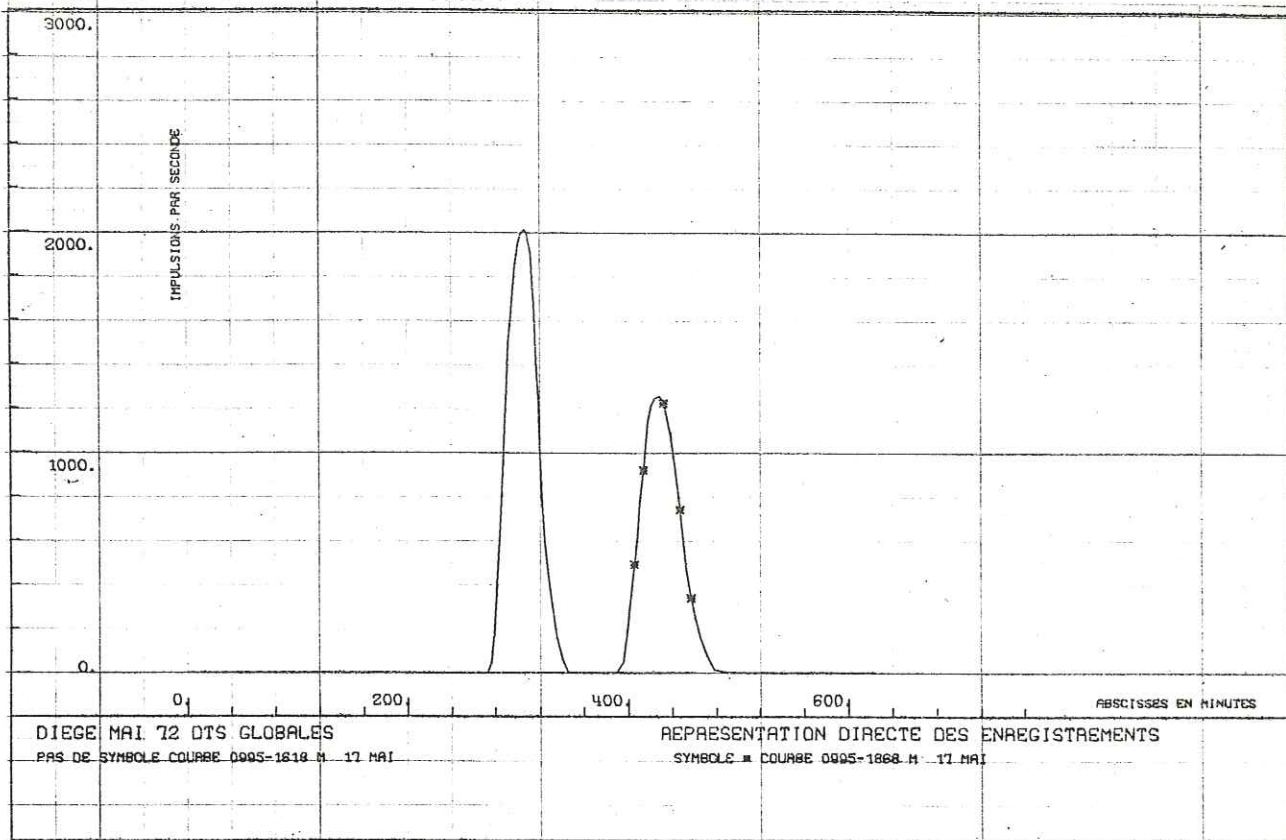
Les figures B7 et B8 représentent les deux D.T.S. en cascade obtenues pour le point d'injection I aux deux sections de mesures (9) et (12). La figure B9 représente l'évolution des différentes D.T.S. en fonction de la distance par rapport aux points d'injection. (le point 0 des abscisses étant la section d'injection I du Pont de SORNAC).

A partir du tableau ci-après et de la figure B9 on peut déterminer :

- les différentes vitesses pour chaque section et par interpolation pour tous les points des différents traceurs considérés

SECTIONS D'INJECTION					SECTIONS DE MESURES			
N°	LIEU DIT	DATE	HEURE	MASSE DE TRACEUR INJECTEE	N°	LIEU DIT	Q(m ³ /s)	LONGUEUR DU TRONCON (km)
A	MOULIN DE PEYROUX	26/9	10h09	200 ml Rh WT 20 %	B	PONT DE BEAUNE		1,100
					I	PONT DE SORNAC		5,200
I	PONT DE SORNAC	27/9	8h50	400 ml Rh WT 20 %	9	PONT DE SAINT	0,46	6,200
					12	GERMAIN LAVOLPS	0,60	8,700
12	PONT DE SAINT GERMAIN LAVOLPS	27/9	11h	400 ml Rh WT 20 %	19	PONT DE CONFOLENS	1,1	5,200
					22	PONT DU LOUBEIX	1,4	6,400
19	PONT DE CONFOLENS	28/9	9h	300 ml Rh WT 20 %	22	PONT DU LOUBEIX	1,4	2,200
					23	PONT DE CHASSAGNAC		3,200

TABLEAU RESUMANT LES D.T.S. EFFECTUEES



Figures B7 et B8 : D.T.S.en cascade obtenues pour le point d'injection I aux deux sections de mesures 9 et 12.

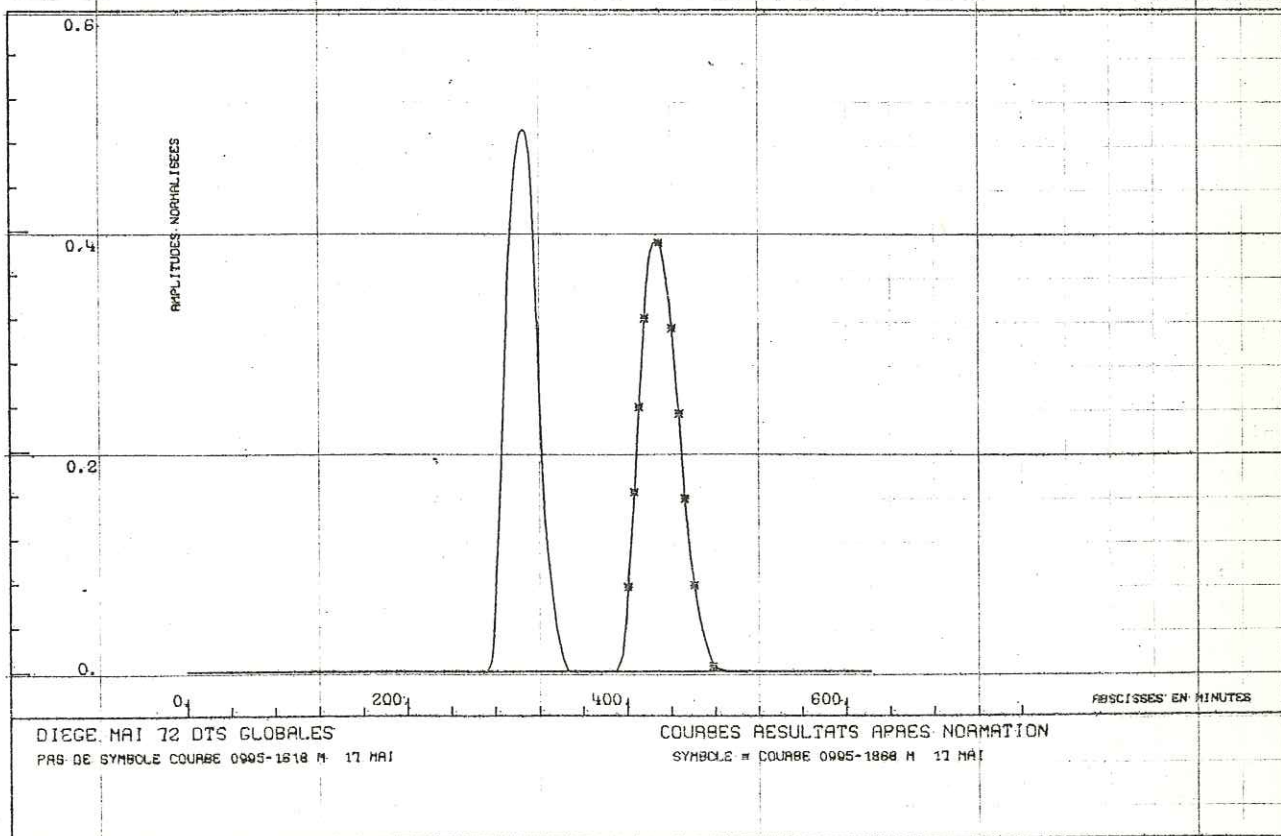
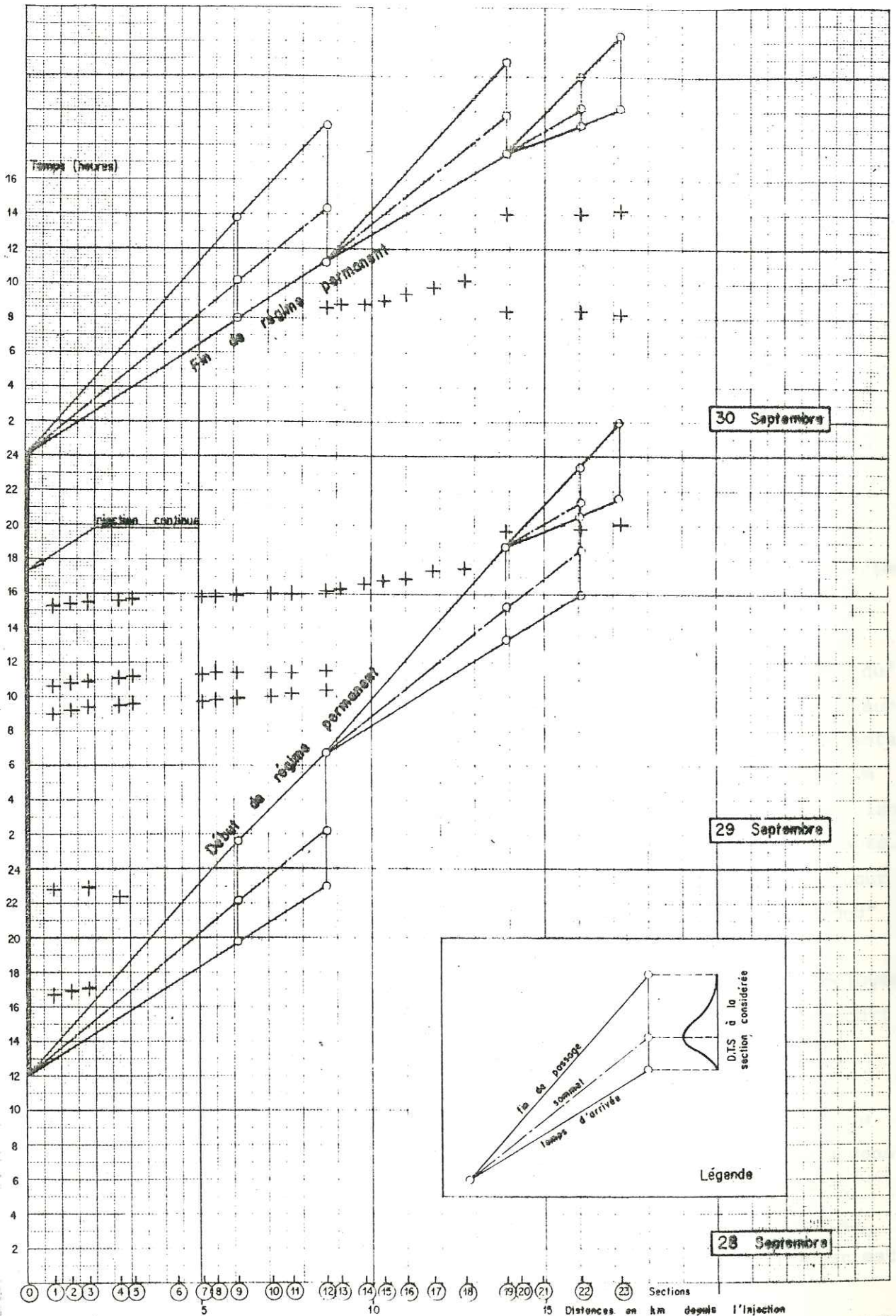


Figure B9 : Evolution des D.T.S. en fonction de la distance pour les trois sections de mesures : "Pont de SORNAC" (1); "Pont de St GERMAIN LAVOLPS" (12) et "Pont de CONFOLENS" (19).



- la connaissance de ces D.T.S. permet de connaître le débit d'un palier de concentration à une distance quelconque d'une section d'injection. Ceci met en évidence l'intérêt de la mesure "in situ" de ces traceurs.

Remarques :

- Connaissant la réponse impulsionnelle à une section de mesure on aurait pu également calculer le débit instantané à cette même section à partir de l'expression :

$$Q = M \frac{1}{\int_{t_1}^{t_2} c dt}$$

Inversement, si le débit est calculé par une autre méthode, on peut vérifier si le bilan de traceur est bien égal à l'unité et déceler ainsi une éventuelle anomalie de comportement du traceur

- Il peut arriver, en effectuant plusieurs D.T.S. en série qu'il y ait interférence des différentes vagues de traceur; on aura alors intérêt à choisir des traceurs fluorescents différents tels que Rhodamine WT et sulforhodamine G, par exemple. On évitera d'employer de l'Uranine si le bief de mesure est long, car sa décomposition photochimique risque d'être importante. On notera que sur ce site particulier le bruit de fond pour l'Uranine était d'environ le double que le "bruit de fond" habituel de l'eau.
Lors de la première campagne où l'Uranine avait été employée, les masses injectées ont été majorées pour garder un rapport signal/bruit satisfaisant.

- La masse de traceur à utiliser est évidemment fonction du débit. On s'arrange pour que la concentration maximale dans la section de mesure la plus en aval soit de l'ordre de 10^{-9} kg/l, ce qui donne une marge de sécurité suffisante. Avec cette concentration la masse de traceur à injecter est alors de

$$M = C \times T \times Q$$

kg kg/m³ s m³/s

- C : la concentration moyenne d'analyse que l'on s'est fixé
 10^{-9} kg/l (10^{-6} kg/m³)
- T : le temps de passage de la vague à la section de mesure
- Q : le débit à la section de mesure
- M : la masse de traceur à injecter : $M = 10^{-6}$ T.Q

B.2.4. COMMENTAIRES SUR LES RESULTATS OBTENUS

Exemple des D.T.S. obtenues sur le bief expérimental "Pont de CONFOLENS - Pont du LOUBEIX".

Cinq D.T.S. ont été effectuées sur ce tronçon de rivière correspondant chaque fois à un débit différent enregistré sur le liminigraphe du Pont de LOUBEIX.

La gamme des débits va de $5,4$ m³/s en avril 1972 à $1,5$ m³/s en septembre 1972.

La figure B10 représente les D.T.S. pour ces débits différents.

La figure B11 représente les mêmes D.T.S. en temps réduit. Elle se superpose pratiquement, ce qui montre que le phénomène de transfert est identique entre $1,4$ m³/s et $4,2$ m³/s et qu'il peut s'assimiler à un écoulement piston-diffusion.

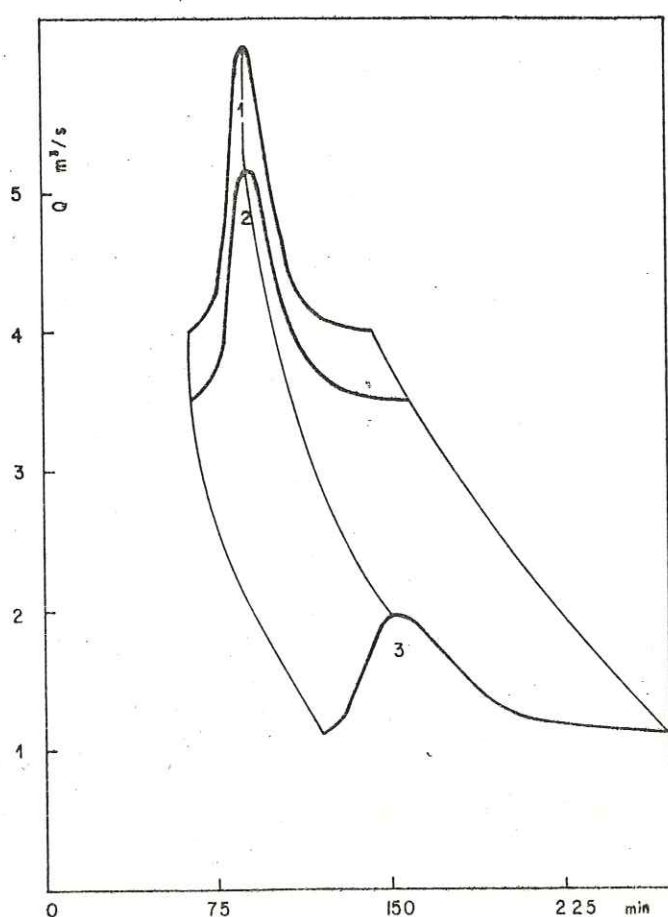


Figure B12 : Variation des D.T.S. en fonction du débit sur la DIEGE.

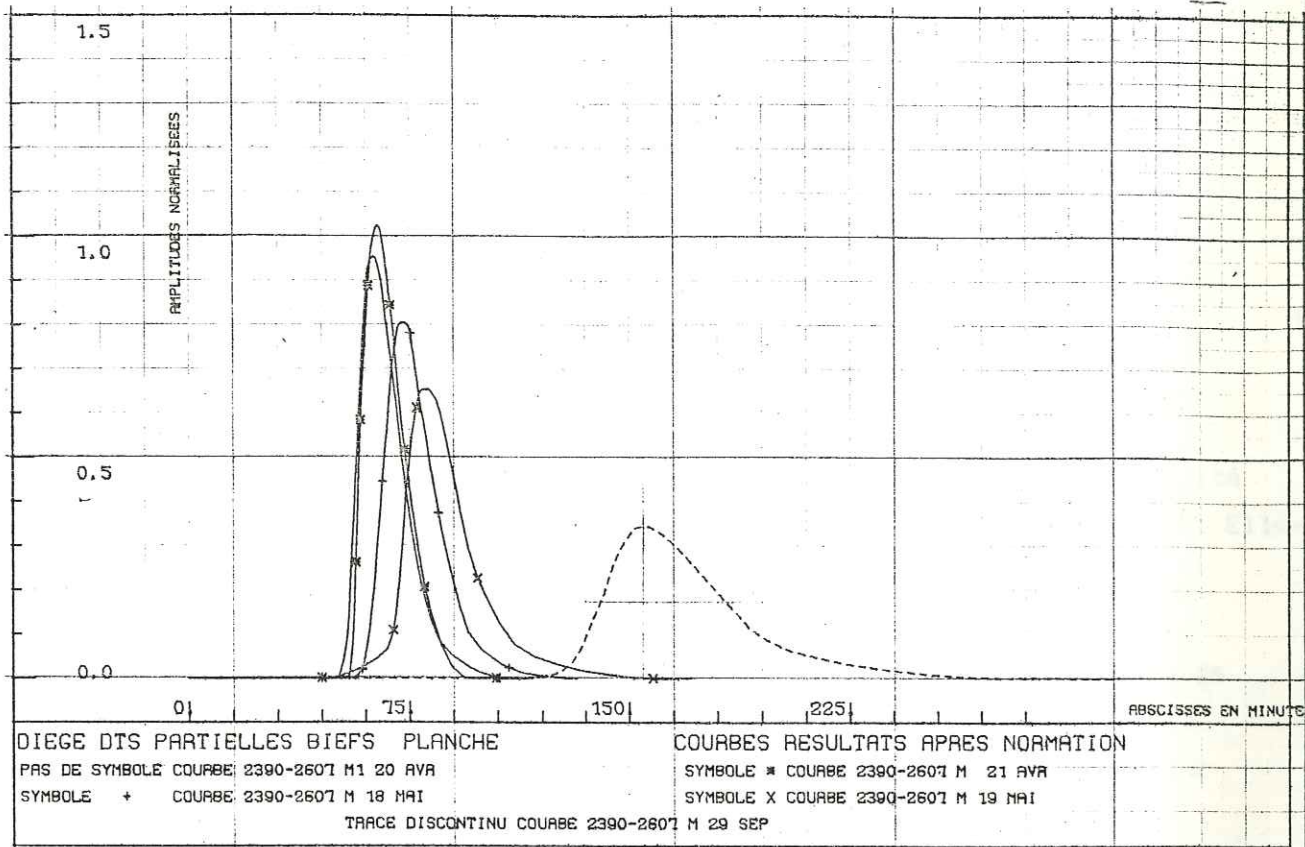


Figure B10 : D.T.S. pour des débits différents sur le bief expérimental : "Pont de CONFOLENS"-"Pont du LOUBEIX".

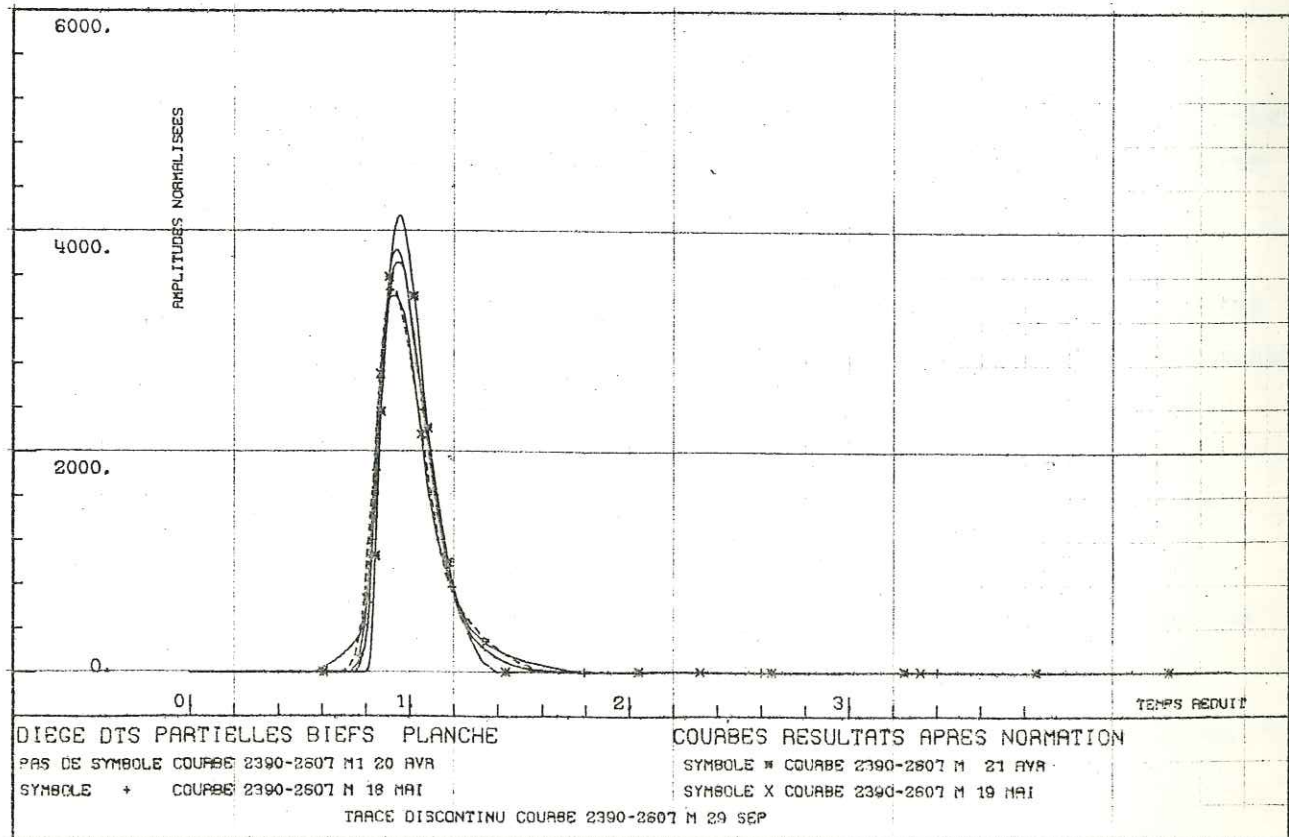


Figure B11 : D.T.S. de la figure B10 représentées en temps réduit.

Une étude plus systématique de ces résultats ainsi que ceux des autres campagnes d'essais, effectuées dans le cadre de ce contrat d'étude, doit faire l'objet d'une publication.

B.2.5. CONCLUSIONS

Ces expériences de marquage de la DIEGE montre l'intérêt et la facilité de mise en œuvre des traceurs fluorescents en hydrologie de surface. Elles permettent de préciser :

- . Les réponses impulsionnelles et les D.T.S. de différents traceurs, fournissant ainsi les vitesses caractérisant le transfert de l'eau à chaque section de mesure et par extrapolation à chaque point de la section considérée
- . Leur mesure "in situ" permet de "visualiser" et de préciser sur le terrain de manière semi quantitative les différents paramètres, ce qui permet de piloter le déroulement des opérations.
- . Par la mesure des débits au fil de l'eau on obtient l'évolution des apports et leur situation, ce qui permet de déterminer des successions de biefs "morts" et de biefs "vifs"

Bien évidemment les conditions requises pour ce type d'essai sont celles que connaissent tous les hydrologues pratiquant l'hydrométrie par dilution de traceurs :

- Permanence des conditions hydrologiques pendant toute la durée de ces expériences (d'où l'intérêt d'opérer le plus rapidement possible par des D.T.S. en cascade)
 - Absence de zone "d'eaux mortes", de retenues, de chevelus de petits canaux, etc. ...
 - Un écoulement plutôt turbulent pour avoir un bon mélange des traceurs
-

B.3. HYDROGEOLOGIE KARSTIQUE

Illustrons l'emploi des traceurs fluorescents en milieu karstique avec une expérience de multitraçage que nous avons réalisée dans le massif du VERCORS, dans la région de VILLARD DE LANS.

B.3.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Ces essais de coloration ont été effectués par le Service d'Applications des Radioéléments et des Rayonnements du C.E.N.G. en collaboration avec le professeur SARROT-REYNAUD de l'Institut DOLOMIEU, à la demande de la Direction Départementale de l'Agriculture de l'Isère, pour contribuer à préciser les périmètres de protection du réseau karstique de GOULE BLANCHE en vue de son exploitation pour l'alimentation en eau de l'agglomération de VILLARD DE LANS.

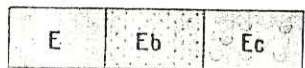
L'étude a été circonscrite au système de failles Est-Ouest où des circulations karstiques avaient été mises en évidence par MANGIN au cours de travaux antérieurs.

On s'est proposé de renouveler ces expériences en les complétant :

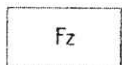
- par des mesures quantitatives de temps et de modalité de transit
- par des mesures quantitatives de bilan de récupération de traceurs
- par des observations supplémentaires sur des scialets et émergences dont les relations avec l'axe de circulation principale pouvait être supputées.

B.3.2. SITUATION GEOGRAPHIQUE ET GEOLOGIQUE

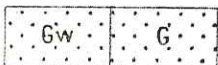
B.3.2.1. COUPES GEOLOGIQUES ET CARTE DE LA REGION DE VILLARD DE LANS



E : Eboulis et produits d'altération ou de solifluction superficielles
 Eb : Eboulements à gros blocs
 Ec : Couloirs boueux



Fz : Alluvions modernes



Gw : Moraines würmiennes
 G : Glacière local (Vercors)



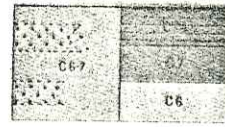
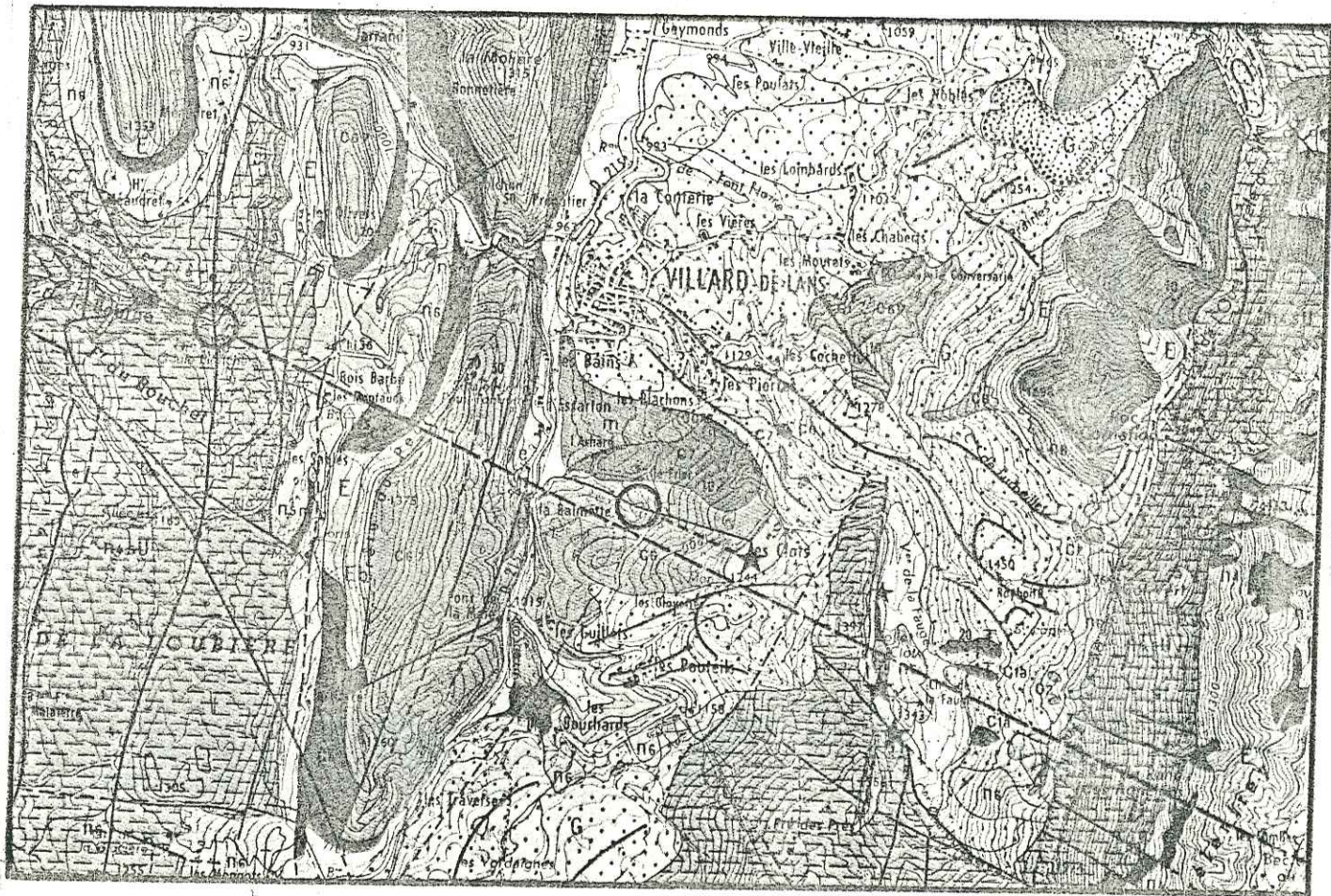
Vallum morainique



m : Miocène indifférencié (molasses et poudingues)



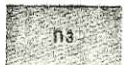
Eocène continental



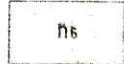
C67 : Crétacé supérieur (Sénonien) indifférencié (avec lentilles gréseuses)
 C7a : Maëstrichtien (Calcaires à Orbitoides)
 C7 : Maëstrichtien (Calcaires à silex ou calcaires à grain fin)
 C6 : Campanien ("Lauzes" et formations biodétritiques diverses)



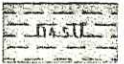
C1 : Albien indifférencié
 C1a : Vraconien



n3 : Hauterivien



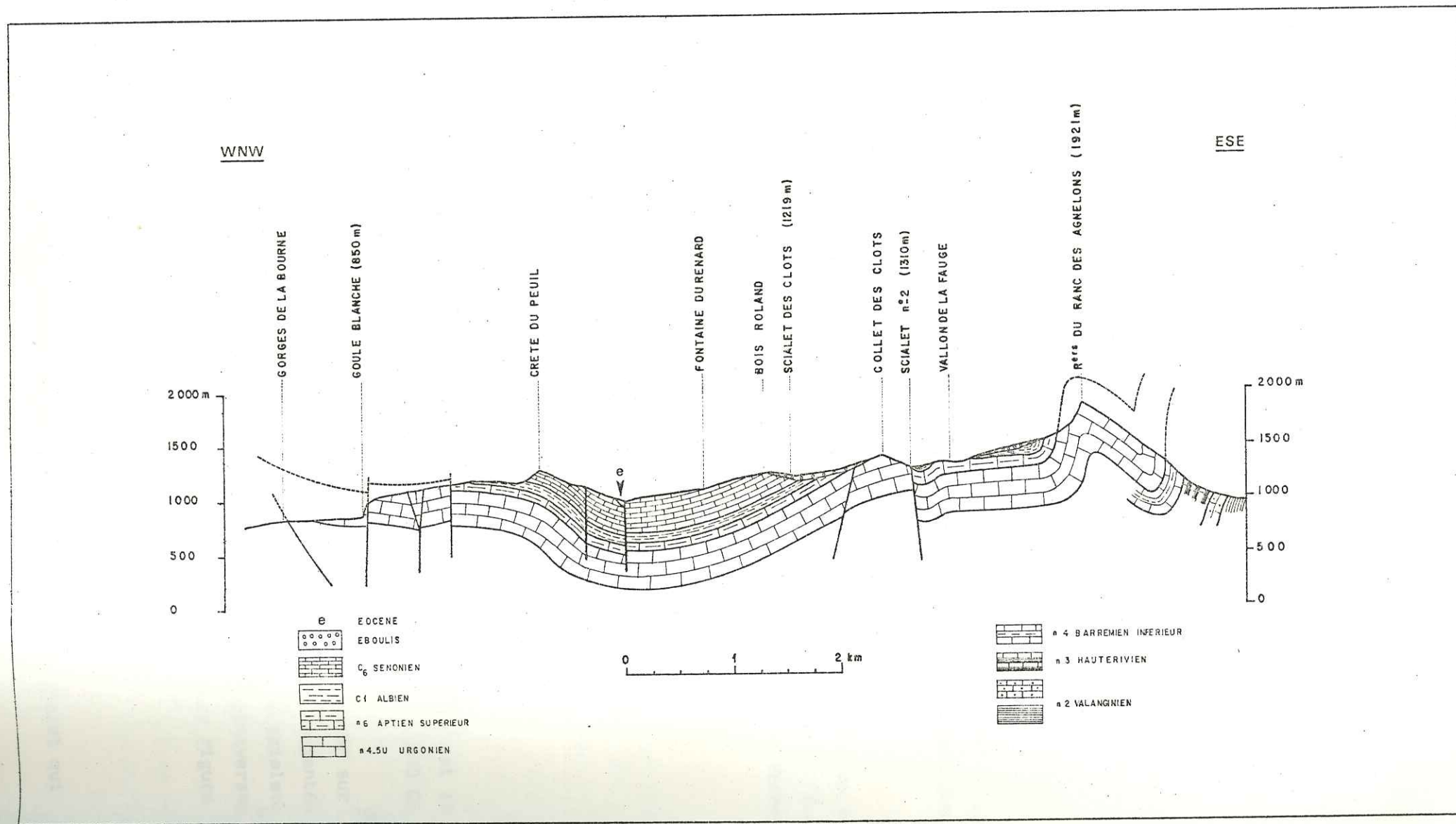
n6 : "Lumachelle" (Gargasien-Clansayésien)



n4 stf : Urgonien

Figure B13 : Reproduction de la carte géologique au 1/50000 de la région de VILLARD de LANS et situation des scialets d'injection et des principaux points de prélèvements.

Figure B14 : Coupe géologique GOULE BLANCHE - LA FAUGE représentant la superposition des karsts Urgonien et Sénonien isolés par l'Albien.



Le massif subalpin du VERCORS présente de grandes unités structurales orientées NNE - SSE .

La carte géologique de la figure B13 , où ont été situés les différents scialets d'injections ainsi que les points de prélèvements, représente la terminaison sud du synclinal à coeur molassique de SAINT NIZIER - VILLARD DE LANS.

Le synclinal est orienté SSE - NNE avec son axe plongeant vers le NNE. Au sud de VILLARD DE LANS, il se divise en deux branches, l'une en direction de CORRENCON, l'autre en direction de LA FAUGE, séparées par le horst urgonien de la "Cote 2000".

Des accidents parallèles aux structures affectent ce synclinal, mais il en existe également un certain nombre qui leur sont perpendiculaires.

Dans la zone qui nous intéresse, le synclinal est limité à l'Est par le pli couché du RANC DES AGNELONS et à l'Ouest par la structure anticlinale des Gorges de la BOURNE.

La coupe de la figure B14 : GOULE BLANCHE - LA FAUGE, perpendiculaire aux structures, montre l'ossature du synclinal : les marnes et sables de l'ALBIE enserrés entre le substratum des calcaires massifs urgoniens et les formations de calcaire senonien litées.

B.3.2.2. SITUATION DES POINTS D'INJECTIONS

a) Le vallon de la FAUGE

Situé à environ trois kilomètres au sud-est de VILLARD DE LANS, c'est là que se termine la branche sud-est du synclinal de ST NIZIER - VILLARD DE LANS.

Les trois scialets d'injection prennent naissance dans "l'urgonien" sur la bordure ouest du vallon. Ils sont alignés sur la faille Est, orientée Nord-Sud, du petit horst "urgonien" de la Cote 2000. Les trois scialets, distants d'environ 1,5 km sont en liaison avec des fractures transverses différentes. On les a représentés sur la coupe schématique de la figure B15

b) La doline des CLOTS

Situé environ à 1,5 km à l'ouest du Vallon de la FAUGE, le scialet qui

s'ouvre en son centre a été comblé par un remblayage de gros blocs. Il est situé dans les formations sénoniennes du synclinal de VILLARD DE LANS. (cf la coupe de la figure B16).

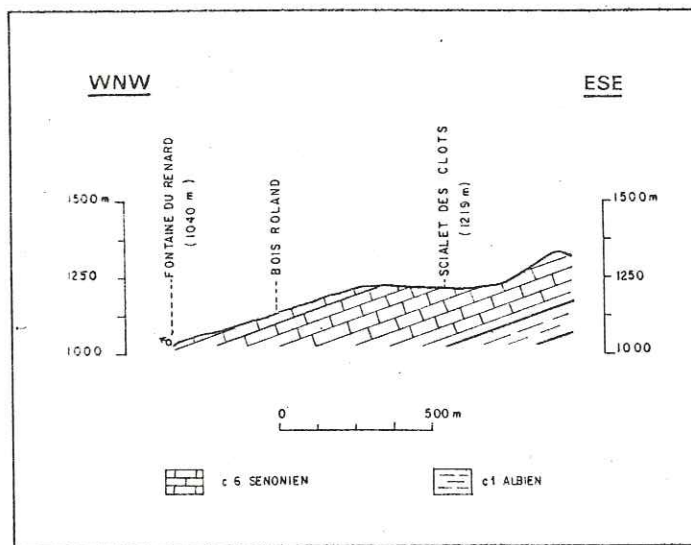


Figure B16 : Coupe géologique scialet des CLOTS - Fontaine du RENARD.

B.3.2.3. SITUATION DES POINTS DE PRELEVEMENTS

a) Point N° 1 : FONT DU RENARD

C'est une résurgence située à 2 km environ au sud de VILLARD DE LANS non loin du Hameau du FRIER. Elle sort dans le sénonien sur une faille qui remonte jusqu'à la doline des CLOTS. Elle est partiellement captée.

b) Point N° 2 : FONTAINE AYMARD

C'est une grosse résurgence captée servant à l'alimentation en eau de VILLARD DE LANS, située à la base d'un pointement sénonien à 1 km environ du Hameau des PIERRES en rive gauche du ruisseau de la FAUGE.

c) Point N° 3 : FONT DE LA MAIE

C'est une résurgence située à 2,5 km au sud de VILLARD DE LANS au lieu-dit "Le FONT DE LA MAIE". Elle est partiellement captée, Elle est située dans le sénonien sur une faille remontant jusqu'aux pertes du Ruisseau des NARCES.

d) LES POUTEILS

C'est un point de prélèvement que l'on a rajouté ensuite. C'est une petite source située dans l'Aptien (Lumachelle) au pied de la remontée mécanique des Pouteils. Elle se situe dans le prolongement de la cuvette des CLOTS et à la latitude du scialet N° 1.

e) Point N° 4 : GOULE BLANCHE

C'est une grosse résurgence située en rive gauche de la BOURNE à la base de la falaise urgonienne à l'intersection d'une faille NS et ED . Ses eaux sont captées et turbinées à la centrale de la Haute Bourne.

B.3.3. CONDITIONS DE DEROULEMENT DES ESSAIS [B8] [B9]

B.3.3.1. OPERATIONS D'INJECTIONS

Les opérations d'injection sur lesquelles on trouvera des précisions sur le tableau ci-joint, ont été effectuées dans l'après-midi du vendredi 11 mai 1973 de façon sensiblement simultanée.

Le marquage du scialet des CLOTS a été effectué avec de l'iodure de sodium (NaI , $2\text{H}_2\text{O}$).

B.3.3.2. OPERATIONS DE PRELEVEMENTS

Les opérations de prélèvements ont pu être effectuées dans les meilleures conditions grâce au concours de MM PICHAND et CHABERT des centrales de la Haute Bourne et de Goule Blanche, et de MM VILLARD et AUGIER des Services Techniques de la Ville de VILLARD DE LANS.

Le point de prélèvement des "POUTEILS" a été ajouté à partir du 13 mai afin de déceler une éventuelle circulation Nord-Sud depuis le point d'injection des CLOTS.

Pour les points de prélèvements de FONT DU RENARD et de FONT DE LA MAIE, nous disposons de préleveurs automatiques.

B.3.3.3. CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES

La date des essais a été imposée par l'évolution rapide de la fonte des neiges sur les versants du vallon de la FAUGE.

Nous avons bénéficié, le jour de l'injection, de débits d'infiltrations substantiels dans le Vallon de la FAUGE, ces débits ont pu être évalués (cf tableau).

Par contre, les apports étaient déjà taris dans la doline des CLOTS au niveau du scialet. Nous avons été contraints de procéder à l'installation d'une canalisation d'adduction et d'un réservoir tampon de 10m^3 nous permettant d'effectuer les injections de traceur dans des conditions d'écoulement satisfaisantes (injection de près de 100m^3 d'eau).

Le peu de temps imparti pour ces essais ne nous a pas permis d'effectuer les aménagements nécessaires à la FONTAINE DU RENARD pour réaliser des mesures précises de débit.

Une section de mesure a été aménagée le 29 mai, le débit était de l'ordre de 40 l/s, débit bien inférieur au débit estimé lors des opérations d'injections et au cours du passage de la vague de traceur.

Les débits écoulés à GOULE BLANCHE durant le passage du colorant ont été précisés par les turbines de la centrale de la Haute Bourne.

B.3.4. MESURES

B.3.4.1. DETERMINATION DES DISTRIBUTIONS DES TEMPS DE SEJOURS (D.T.S.)

Nous sommes ici en régime non permanent et l'interprétation des D.T.S. s'avère délicate. Les D.T.S. seront représentatives d'un régime transitoire.

Les D.T.S. permettront néanmoins de déterminer :

- le temps d'arrivée du début de la "vague" de traceur (les molécules d'eau les plus rapides de l'écoulement) information capitale dans un tel problème de détermination du temps minimal d'arrivée d'une substance polluante.
- le temps correspondant à l'abscisse du sommet de la courbe concentration-temps qui est le temps le plus probable de transfert de l'eau dans l'aquifère.

B.3.4.2. ETABLISSEMENT D'UN BILAN DE RESTITUTION

Le grand intérêt de l'utilisation des traceurs fluorescents est de pouvoir effectuer des mesures quantitatives très sensibles afin d'établir un bilan de restitution des différents traceurs utilisés.

Pour cela il suffit de mesurer le plus précisément possible le débit des exutoires et connaître exactement la masse de traceur injectée (cf B.1.)

Alors

$$M = \int_{t=0}^t q(t) c(t) dt$$

où $\int_{t=0}^t c(t) dt$ est la réponse impulsionnelle du système et $q(t)$ est la variation des débits de l'exutoire considéré en fonction du temps. L'intégrale donne la masse M du traceur récupéré que l'on peut alors comparer à la masse M_0 de traceur injectée.

Les figures B18 et B19 représentent sur le même graphique la courbe "débits en fonction du temps" et la courbe concentration du traceur en fonction du temps à la résurgence de GOULE BLANCHE pour l'Uranine et la Rhodamine WT.

L'intégrale des produits élémentaires ($q c dt$) est effectuée à la machine et l'on a ainsi directement la masse de traceur restituée. C'est ce que montre la figure B20a .

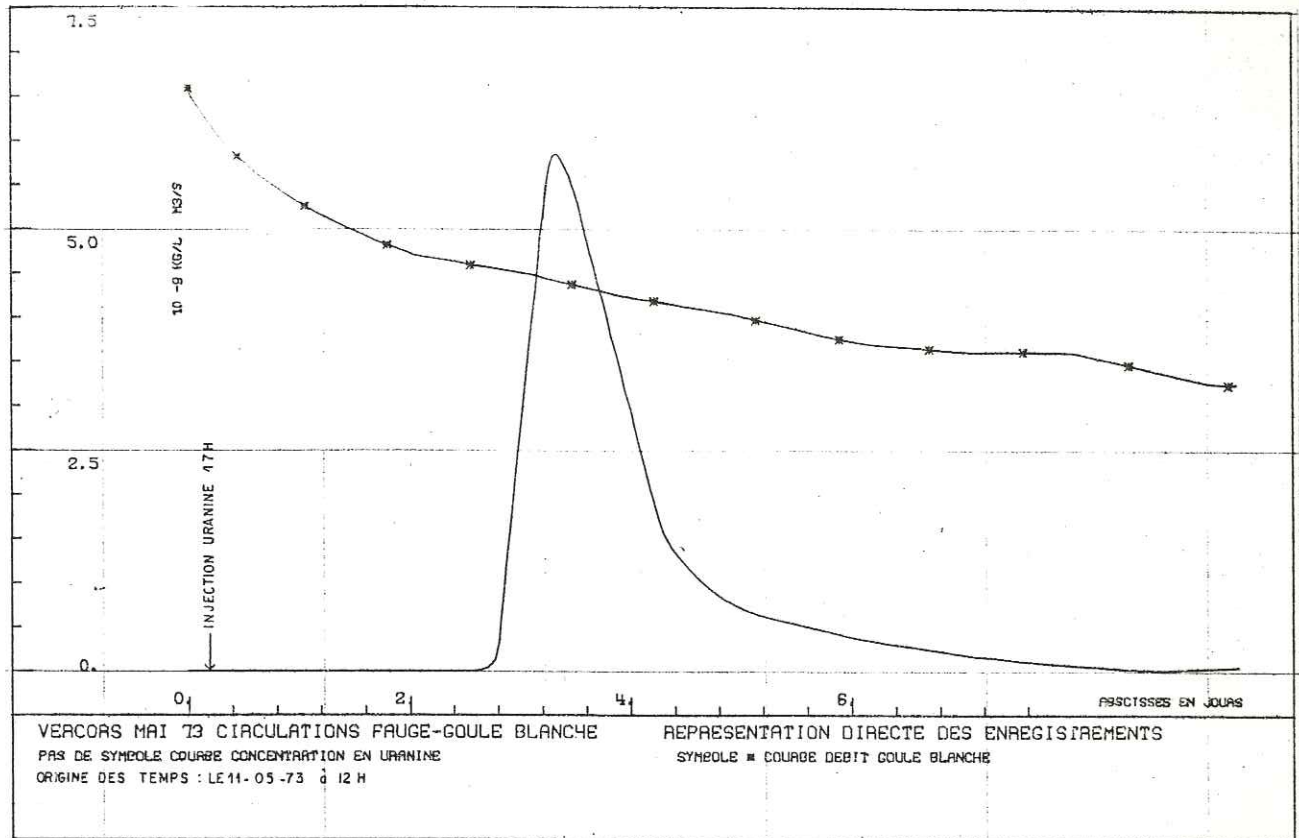


Figure B18 : Courbe de restitution de l'uranine et courbe de débit à la résurgence de GOULE BLANCHE.

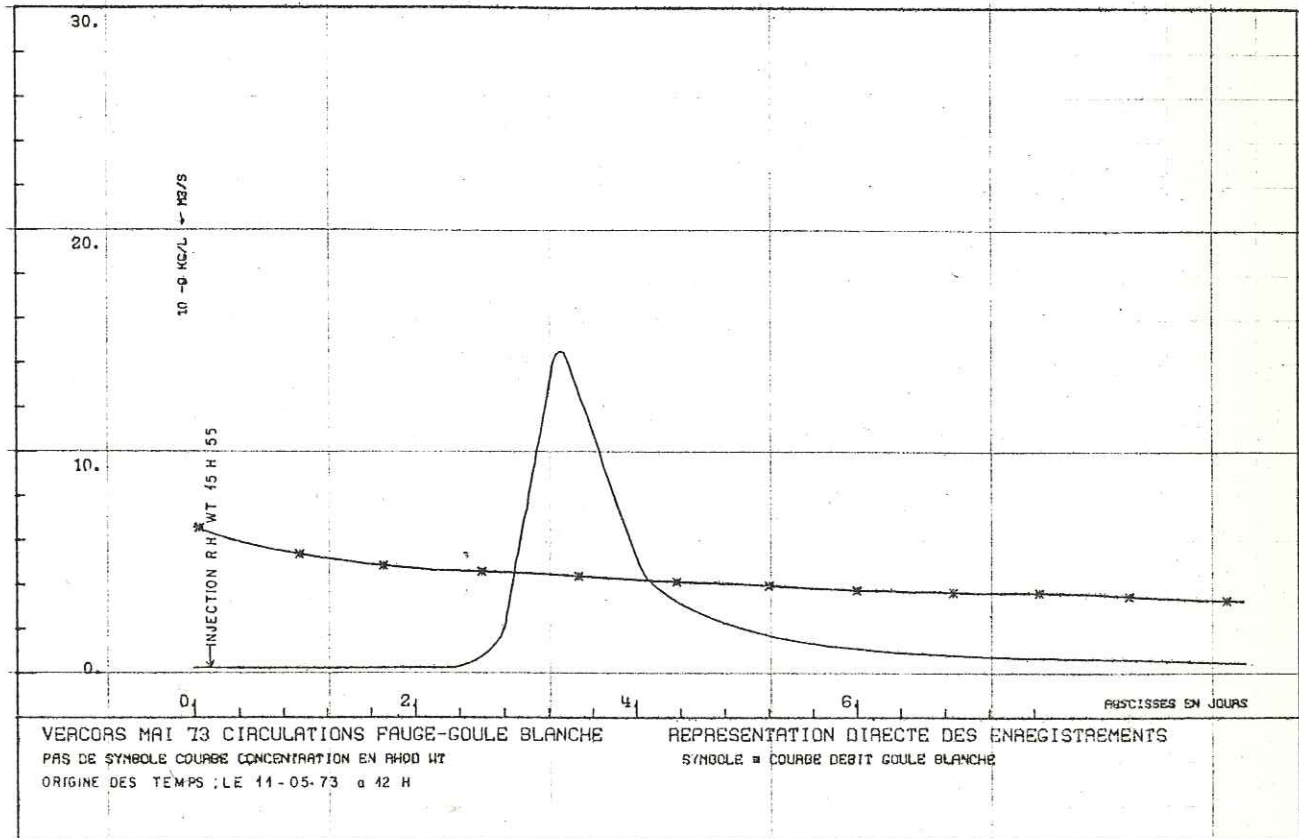


Figure B19 : Courbe de restitution de la Rhodamine Wt et courbe de débit à GOULE BLANCHE.

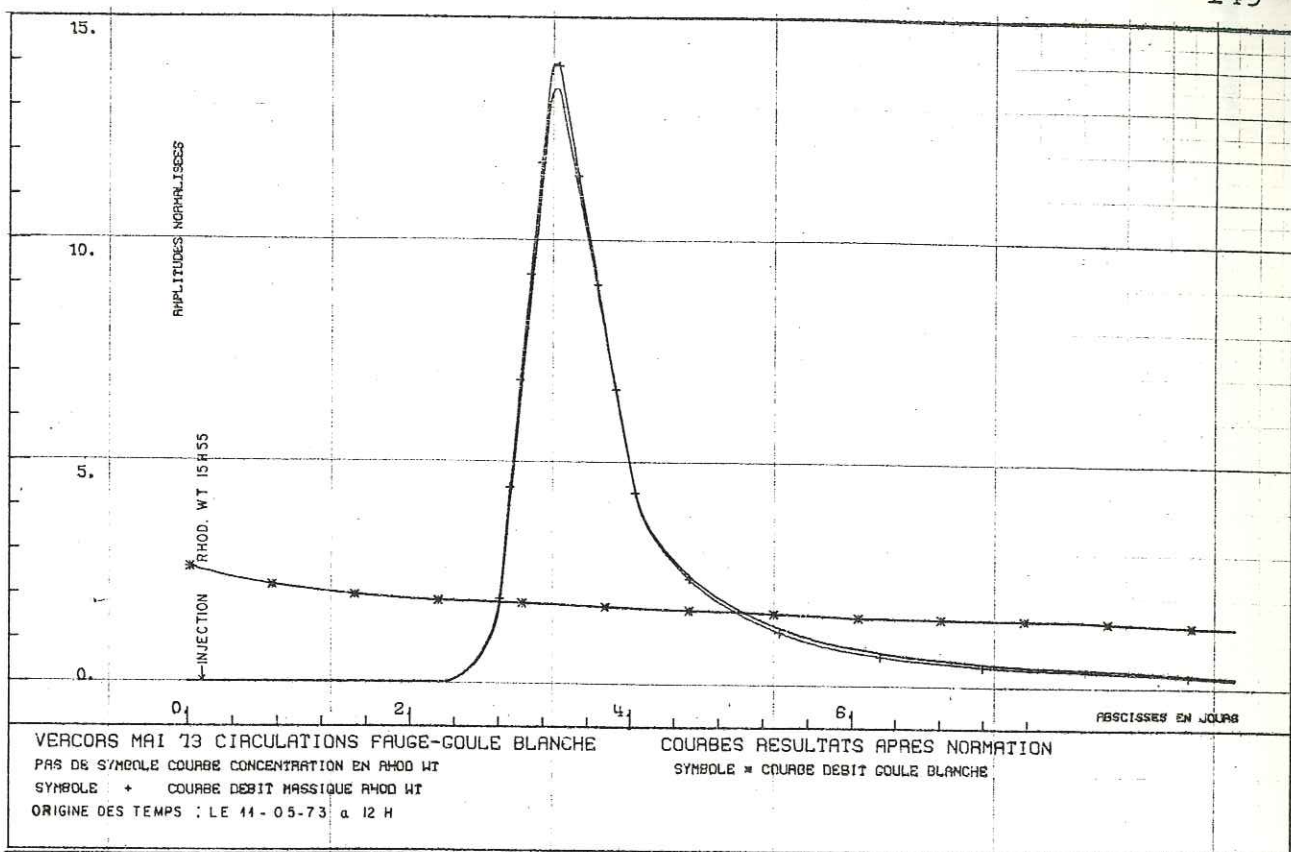


Figure B20a : Exemple, pour la Rhodamine Wt, de l'integration des produits élémentaires q.c.dt effectués à la machine.

B.3.5. RESULTATS

Le tableau ci-après ainsi que la planche synoptique de la figure B20b résument les résultats obtenus.

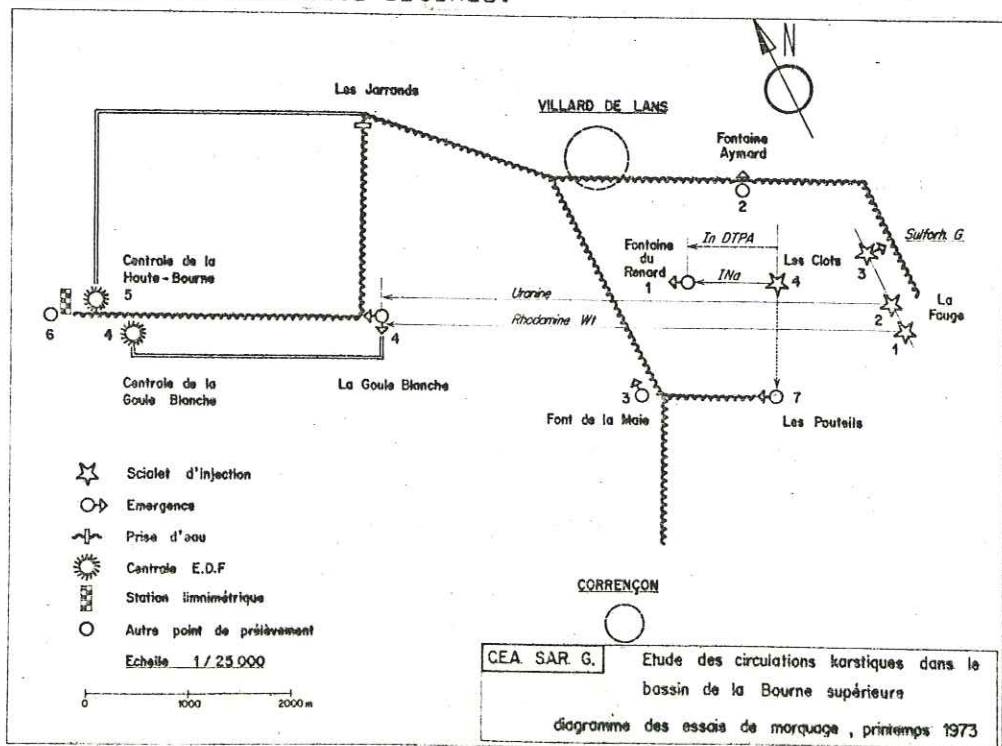


Figure B20b
Planche synoptique des essais

ESSAIS du 11 MAI 1973

CIRCULATIONS KARSTIQUES - MISES EN EVIDENCE

Points d'injection	Système les CLOTS Font du RENARD	Système LA FAUGE GOULE BLANCHE		
	SCIALET DES CLOTS	LA FAUGE		
		SCIALET 1	SCIALET 2	SCIALET 3
Nature et quantité du traceur	NaI, 2H ₂ O 10 kg	Rhodamine Wt 15 l sol. à 20% (3 kg ~ Rh B)	Uranine 3 kg	Sulforhodamine G en sol. dans méthanol. 500 g
Date et heure d'injection	11/05/73 20H15	11/05/73 15H55	11/05/73 17H00	11/05/73 16H15
Conditions d'injection	Volume total d'eau d'entraînement introduit dans le scialet : 95 m ³	10 l/s (estimé)	≈ 0,04 l/s	≈ 3 l/s
Résurgences où le traceur est apparu- débit	Font du RENARD Débit moyen estimé : 60-70 l/s	GOULE BLANCHE 3,21 m ³ /s		Ruisseau de LA FAUGE
Temps d'arrivée	12h	60h	65h	< 3h
Temps modal (abscisse du sommet de la courbe)	15h	76h	75h	inconnu
Proportion de traceur récupéré	≈ 100 %	≈ 36 %	≈ 64 %	inconnu
Distance à vol d'oiseau	875 mètres	5 500 mètres	5 100 mètres	inconnu
"Vitesse moyenne"	55 m/h	56 m/h	54 m/h	----

Les mesures effectuées à FONT DE LA MAIE et à FONTAINE AYMARD n'ont décelé la présence d'aucun des traceurs injectés. Nous n'avons pas trouvé non plus de trace de NaI à la source des POUTEILS.

B.3.6. CONCLUSIONS

Cet essai au cours duquel ont été mis en oeuvre simultanément trois traceurs fluorescents et un traceur chimique a permis en une seule campagne d'injections et de prélèvements de révéler l'indépendance des deux systèmes de circulation karstiques :

- LA FAUGE - GOULE BLANCHE : circulation dans le karst urgonien
- Scialet des CLOTS - FONT DU RENARD : circulation dans le karst senonien

les deux systèmes étant isolés à l'échelle du traçage par l'ALBIEN.

Le fait de pouvoir établir un bilan de traceurs nous permet de dire que tout l'iodure de sodium est ressorti à la Fontaine du RENARD et qu'il ne faut donc pas s'attendre à ce qu'il y ait d'autre circulation partant de la doline des CLOTS.

C'est ce que nous ont montré les analyses négatives de FONTAINE AYMARD., les POUTEILS et FONT DE LA MAIE.

Pour l'injection d'Uranine dans le Scialet N° 2, nous pouvons pratiquement être certain que les infiltrations de ce scialet ne débouchent qu'à la résurgence de GOULE BLANCHE. Quant au taux de récupération de 36 % de Rhodamine WT il peut se faire dans ce cas qu'une partie du traceur ait trouvé une autre résurgence.

Ce marquage a d'autre part soulevé le problème hydrogéologique de FONTAINE AYMARD.

Si l'on s'attendait à ne rien déceler dans les prélèvements de FONT DE LA MAIE (vraisemblablement alimentée d'une part par les pertes du Ruisseau des Narces, et d'autre part par des pertes du Ruisseau de Corrençon) nous étions persuadé de trouver une partie de l'iodure de sodium injectée aux CLOTS à FONTAINE AYMARD. Or, il n'en a rien été.

Pendant le temps qu'a duré l'expérience, cette résurgence avait un débit de l'ordre de 30 l/s. Elle est captée pour l'alimentation en eau de VILLARD DE LANS et c'est la seule source de la ville qui ne soit pas traitée. Sa température est stable et après de fortes pluies elle ne présente pas de trouble. Elle a donc une alimentation profonde et une filtration importante.

Ne provenant ni des CLOTS ni du Vallon de la FAUGE, il faut donc chercher l'alimentation en eau de cette résurgence vers l'est ou le nord par des infiltrations se produisant sur les versants Sud-ouest et Est du plateau du "CORNAFION" et la combe de LURBEILLET.

Notre idée était de trouver un scialet d'injection dans la combe de LURBEILLET et de refaire un marquage, mais malgré plusieurs jours de prospection, la végétation luxuriante de la combe ne nous a pas permis de découvrir le scialet espéré.

L'interprétation de la forme des courbes de restitution sera abordée dans la publication prévue pour rendre compte des mesures détaillées de ces essais et exposer les méthodes d'investigation du SARR.

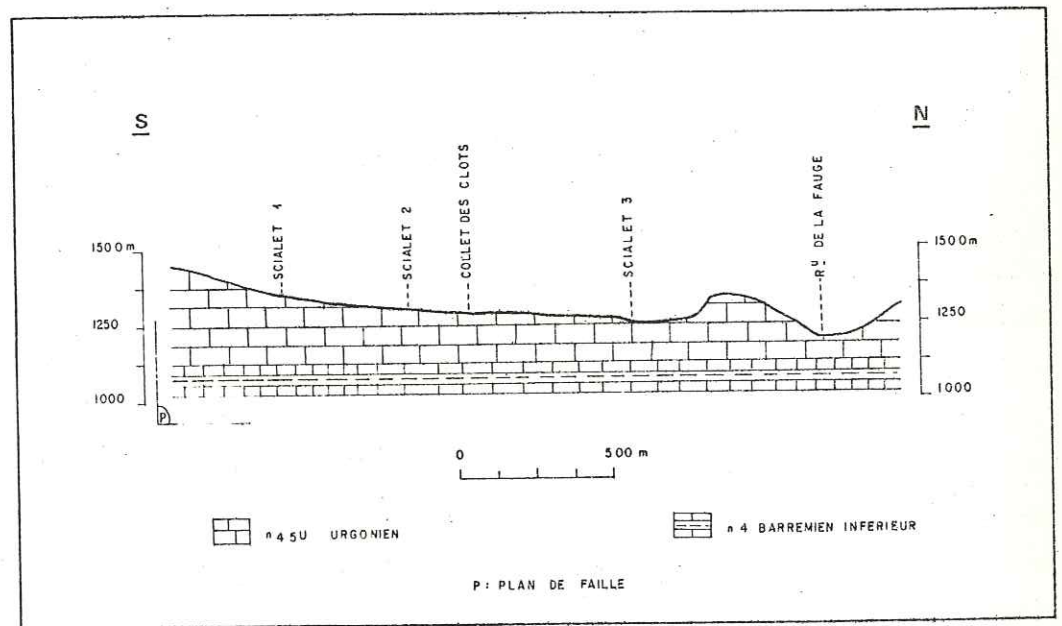


Figure B15 : Schéma des scialets d'injection du vallon de LA FAUGE. (cf B. 3.2.2.)

B.4. HYDROLOGIE EN MILIEU SATURE

B.4.1. CADRE DE L'ETUDE

B.4.1.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Le but de l'étude était de déterminer à l'aide d'un multitraçage, les temps de transit nappe-rivière et de mettre en évidence les circulations souterraines sur le site de FRECHENCOURT dans le cadre d'une convention passée entre la D.G.R.S.T. et le laboratoire SARR du C.E.N.G.

B.4.1.2. DESCRIPTION DU SITE DE FRECHENCOURT

a) Présentation géographique et géologique

L'HALLUE est un petit affluent rive droite de la SOMME situé à une dizaine de kilomètres au Nord-Est d'AMIENS. Son bassin a une superficie de 219 km². Son altitude moyenne est de 96m (cf carte du bassin figure B21).

La formation géologique majeure du bassin est représentée par la craie senoniene. Elle sert d'aquifère à "la nappe de la craie". Elle est limitée à sa base par le toit imperméable des marnes du turonien moyen. En surface un peu de tertiaire affleure mais il est la plupart du temps recouvert par des limons (cf carte géologique de la figure B22). Sur le site de FRECHENCOURT l'aquifère a une puissance d'environ 45 m et la nappe se vidange par de grosses sources, au droit du cimetière de Frechencourt, qui apparaissent au pied d'une "falaise". Ces sources rejoignent ensuite l'HALLUE.

b) Situation des puits d'injections

Les points d'injections représentés sur la figure B24 sont des puits

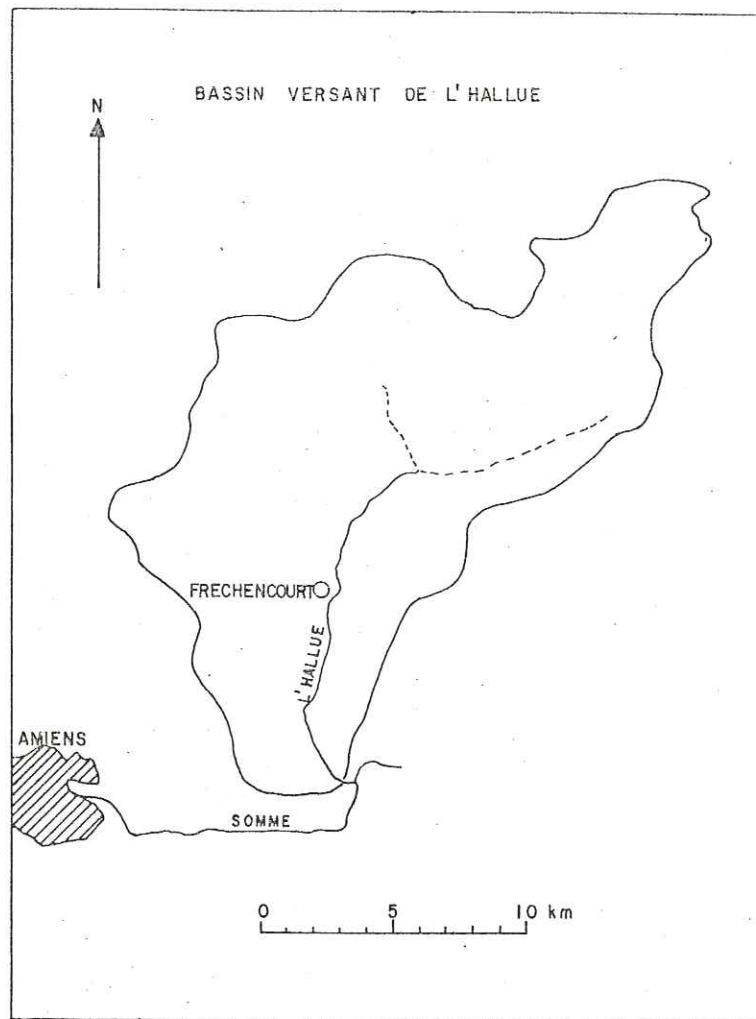


Figure B21 : Bassin versant de l'HALLUE.

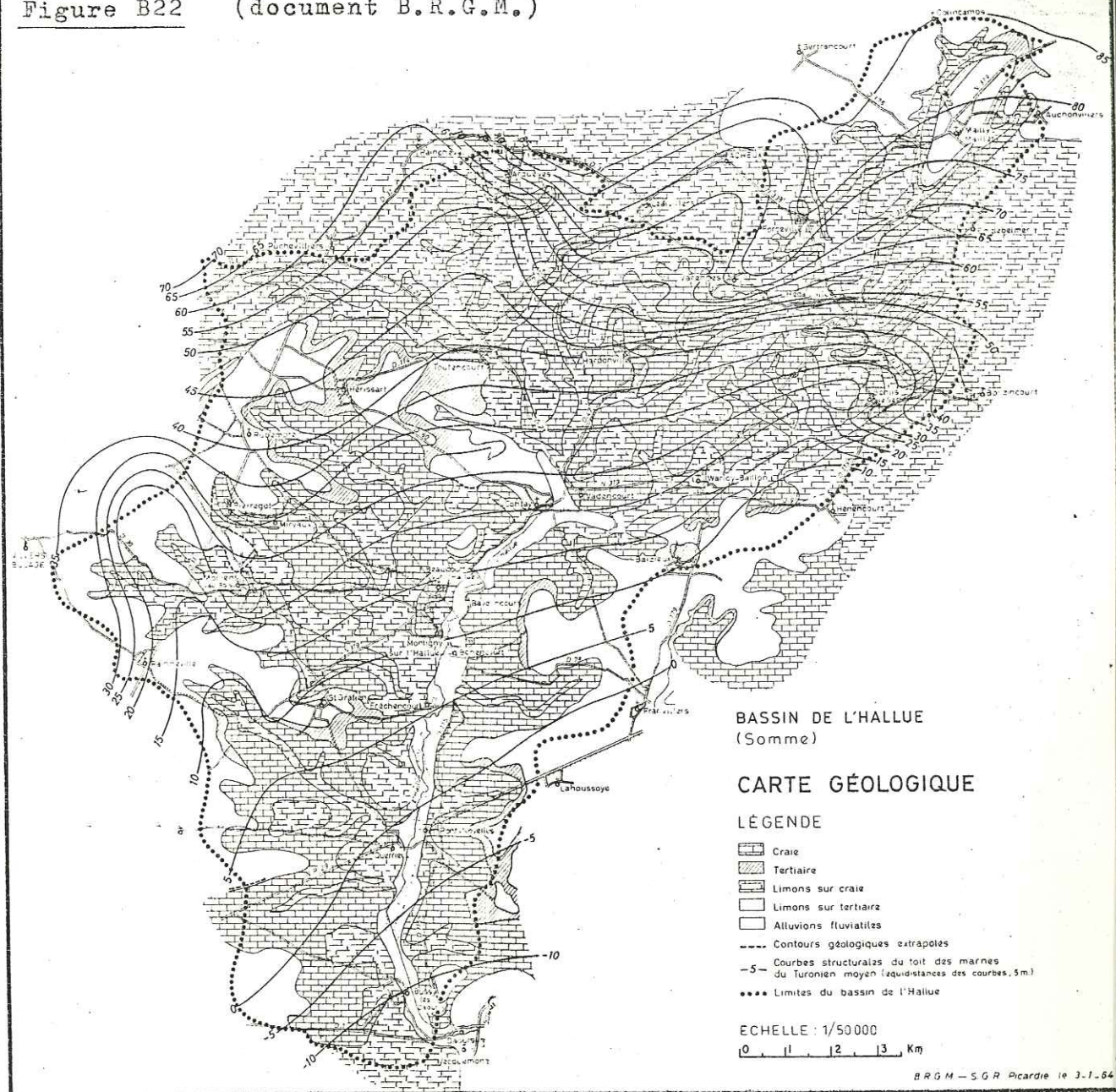
fermiers, plus ou moins désaffectés, creusés dans la craie. Le niveau de la nappe était à environ 18 m de profondeur le 17 novembre 1972.

c) Situation des points d'observation

Les points de prélèvements sont les sources situées au pied de la falaise au sud du village de FRECHENCOURT. Ces sources se présentent comme d'énormes entonnoirs creusés dans la craie où l'on voit l'eau arriver en bouillonnant. Après avoir formé une espèce de marécage elles rejoignent l'HALLUE.

La coupe de la figure B24 représente la structure des terrains intéressés par l'opération de marquage et le niveau de la nappe.

Figure B22 (document B.R.G.M.)



B.4.2. CONDITIONS DE DEROULEMENT DES ESSAIS

B.4.2.1. OPERATIONS D'INJECTION

Les injections de traceurs se sont étendues sur plusieurs jours entre le 13 et le 25 novembre 1972. Avant chaque injection on s'est assuré que le puits n'était pas colmaté. Le traceur était poussé par l'injection de 3m³ d'eau environ en une heure.

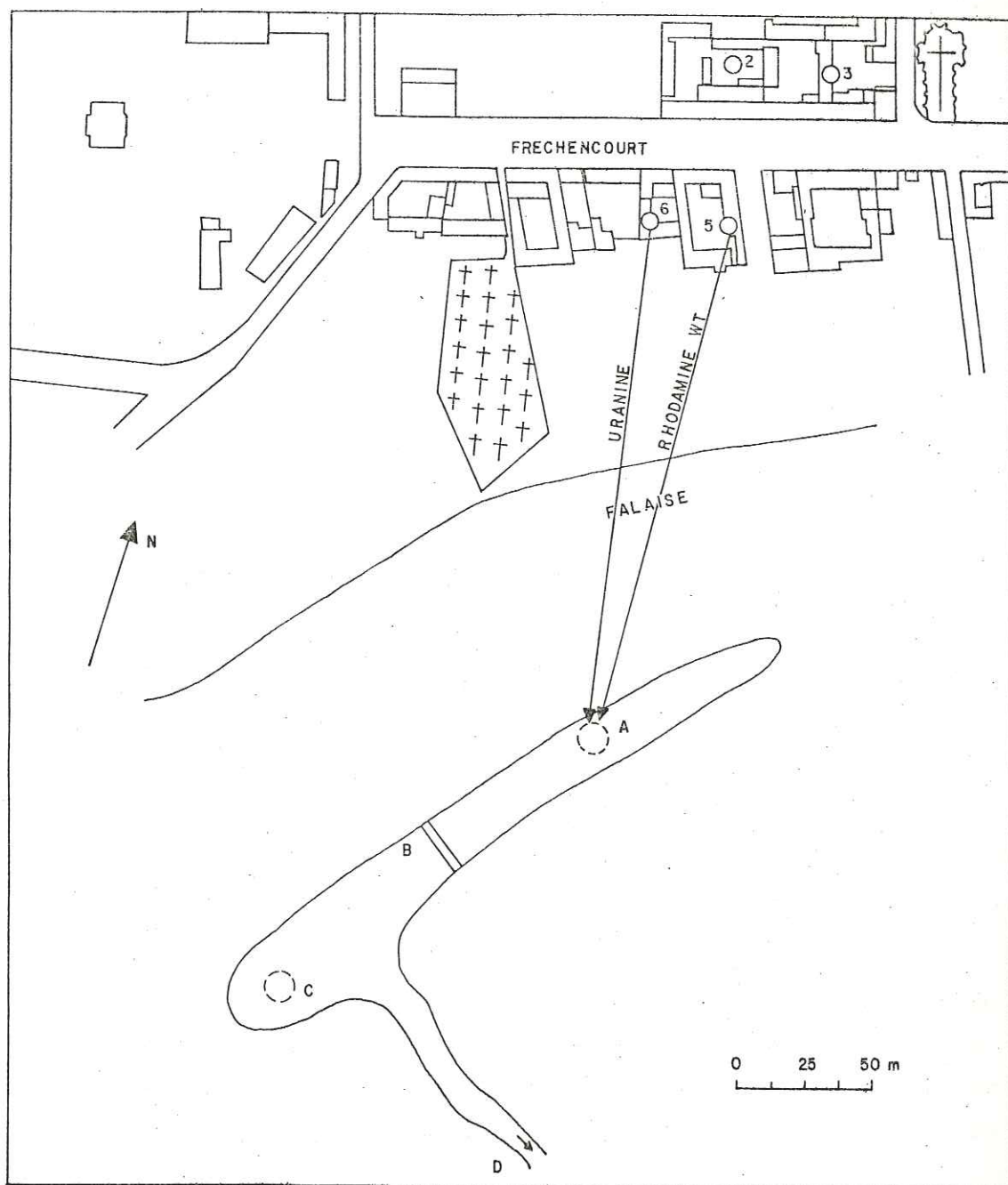


Figure B23 : Situation des points d'injection et de prélèvements du site de FRECHENCOURT.

B.4.2.2. OPERATIONS DE PRELEVEMENTS

Elles ont été rendus possible grâce à M. COMMON du B.R.G.M. qui nous a envoyé les échantillons de prélèvements pendant 5 mois. La fréquence des prélèvements était hebdomadaire.

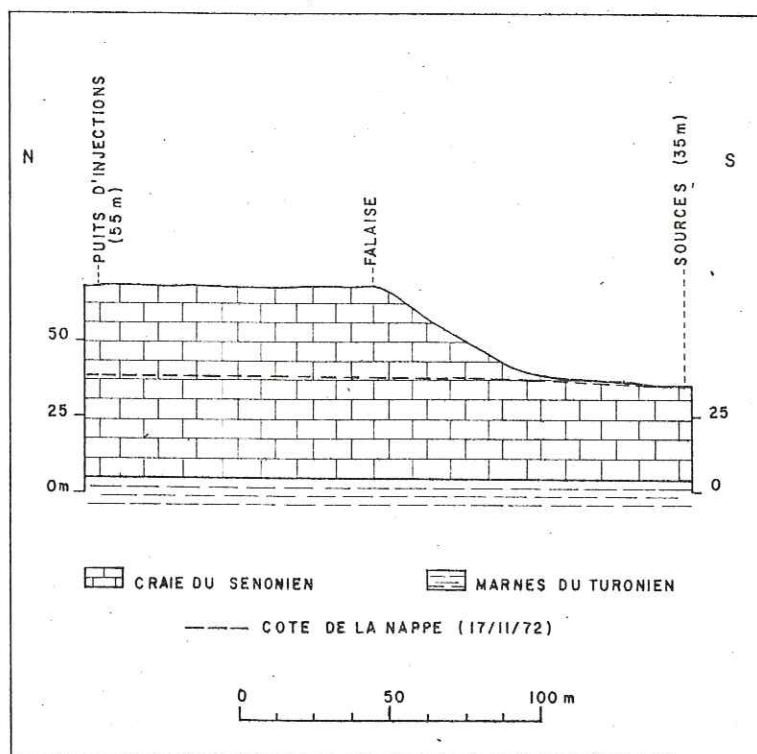


Figure B24 : Coupe géologique du site de FRECHENCOURT.

B.4.2.3. CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES

Entre le 13 et le 25 novembre 1972, l'HALLUE était en étiage et présentait un débit d'environ 200 l/s. Les sources débitaient quelques dizaines de l/s. La nappe était à environ 18 mètres de profondeur, ce qui représentait une dénivellation de deux à trois mètres entre les points d'injection et les exutoires distants d'environ 200 mètres pour le point A et 250 m pour le point B.

Nous devons donc nous attendre à des temps de transit relativement longs, bien que la distance en ligne droite soit peu importante.

B.4.3. RESULTATS DES ESSAIS

Trois traceurs fluorescents ont été mis en oeuvre : Uranine, Rhodamine WT et Sulforhodamine G. En parallèle, il a été injecté un traceur salin l'iodure de sodium, réputé pour avoir une fixation moindre que les traceurs xanthéniques.

Alors que pour le marquage de VILLARD DE LANS, la Sulforhodamine G avait été discriminée naturellement par le réseau karstique il a fallu ici employer la méthode chimique du solvant organique décrite en A.5.4. pour pouvoir analyser simultanément les trois traceurs fluorescents employés.

L'iodure de sodium et la sulforhodamine G, injectés dans les puits N°s 2 et 3 situés les plus loin des exutoires, ne sont pas ressortis aux points d'observation pendant les 5 mois qu'ont duré les prélèvements. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

	numéro du puits d'injection			
	2	3	5	6
Nature du traceur injecté	Sulforh. G	NaI	Rhodamine WT	Uranine
Quantité	500 g	4 kg	300 g	500 g
Date de l'injection	20/11/72	22/11/72	17/11/72	17/11/72
Pts d'observation/traceur	A - B - C - D -	- - - -	† - -	† - -
Temps d'arrivée -----	A ----- B -----		5 jours 28 jours	8 jours 18 jours
Temps de passage -----	A ----- B -----		>5 mois >5 mois	>5 mois >5 mois
Distance en mètres-----	A ----- B -----			200 250
Vitesse modale m/j-----	A ----- B -----		4,1 5,6	4 5,6

La vitesse de transfert la plus probable est de 4m/j pour le point d'observation A et d'environ 5,6 m/j pour B. Les vitesses des molécules les plus rapides sont de 40 m/j environ pour la Rhodamine WT au point A et 25 m/j pour l'Uranine au point A. Les courbes de la figure B25 représentent les D.T.S. des deux traceurs fluorescents pour les deux points de mesure considérés.

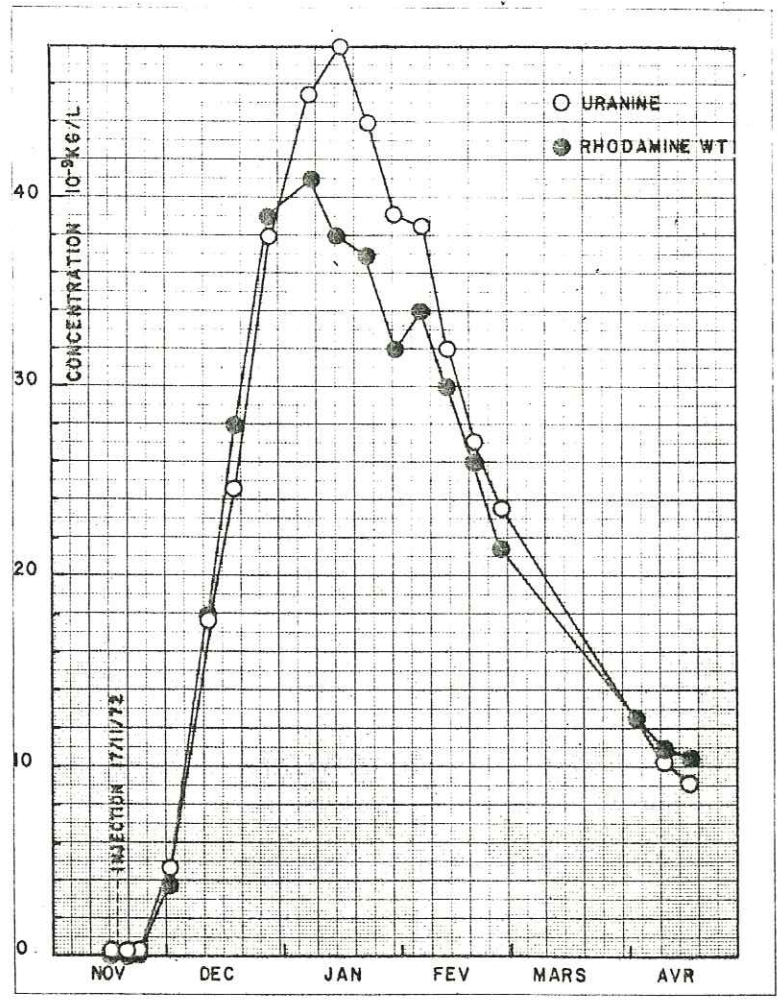


Figure B25 : Courbes de restitution en Rhodamine Wt et en uranine obtenues lors de la coloration de FRECHENCOURT.

B.4.4. CONCLUSIONS

Nous avons essayé, lors des essais, de construire un batardeau dans le but d'effectuer des jaugeages au moulinet pour déterminer les débits des sources. Malheureusement, il nous a été impossible de réaliser ce projet, les sections de mesures étant trop importantes. L'eau ayant une vitesse pratiquement nulle, nous n'avons pas pu effectuer de mesures de débits. De toute façon, il était impossible d'avoir une idée précise du débit des sources durant les quelques 5 mois qu'a duré le passage de la "vague" de traceurs.

Bien qu'étant dans l'impossibilité d'établir un bilan de restitution, on peut cependant, en prenant un temps de passage d'environ 250 à 300 jours en extrapolant les courbes de restitution et un débit moyen de 10 l/s aux exutoires, avoir une idée du taux de restitution.

Ce taux de restitution serait ainsi de 60 % pour l'URANINE, mais il serait sans doute à majorer car le débit estimé de 10 l/s correspond à un débit d'étiage.

La rétention de l'Uranine par le milieu (craie) serait donc finalement faible.

L'Uranine semble donc relativement bien adaptée, ainsi d'ailleurs que la Rhodamine WT, pour un marquage en milieu saturé.

L'Iodure de sodium injecté dans le puits N° 3, le plus éloigné des exutoires, ainsi que la Sulforhodamine G, ne sont pas ressortis. L'Iodure de sodium avait été utilisé parallèlement aux trois traceurs fluorescents car il est admis qu'il présente généralement un meilleur comportement. Si l'on exclut le risque de confinement de ces deux traceurs non restitués dans, ou à proximité des puits d'injection - puits abandonnés de longue date - il faut supposer qu'ils ont emprunté une direction de cheminement plus à l'Ouest, échappant ainsi aux points d'observation.

B.5. ETUDE DU TRANSIT VERTICAL EN MILIEU NON SATURE

B.5.1. CADRE DE L'ETUDE

B.5.1.1. OBJECTIF

Cette série de mesures a été entreprise par le laboratoire SARR du C.E.N. GRENOBLE à la demande de l'Agence de Bassin Rhône-Méditerranée-Corse dans le but de préciser les conditions de transfert de substances polluantes, entre la surface du sol et une nappe aquifère, en zone non saturée.

Des essais ont été effectués sur trois sites de la nappe de LYON, localisés à VAULX EN VELIN, MEYZIEUX CHEF LIEU, et à MEYZIEUX au lieu dit "LE GRAND LARGE".

Nous ne ferons état que des expériences réalisées sur le site de VAULX EN VELIN.

B.5.1.2. SITUATION ET AMENAGEMENT DU SITE

Le site retenu, VAULX EN VELIN, est situé à deux kilomètres au Nord-Est de VILLEURBANNE.

La coupe de la figure B26 montre les formations traversées par les différents traceurs employés.

Il s'agit de formations glaciaires et fluvioglacières reposant sur la molasse.

La géométrie d'injection définie sur la planche B26 montre la disposition adoptée pour la souille de rejet compte tenu d'une direction présumée de l'écoulement de la nappe vers l'Ouest. La surface de la souille était d'environ 2m^2 .

Pour le deuxième essai sur ce site, dans le but d'éliminer les effets de la couche d'argile, une cavité de 1 m 40 de profondeur et de $0,5\text{m}^2$ de section a été creusée à 4 m 80 du forage.

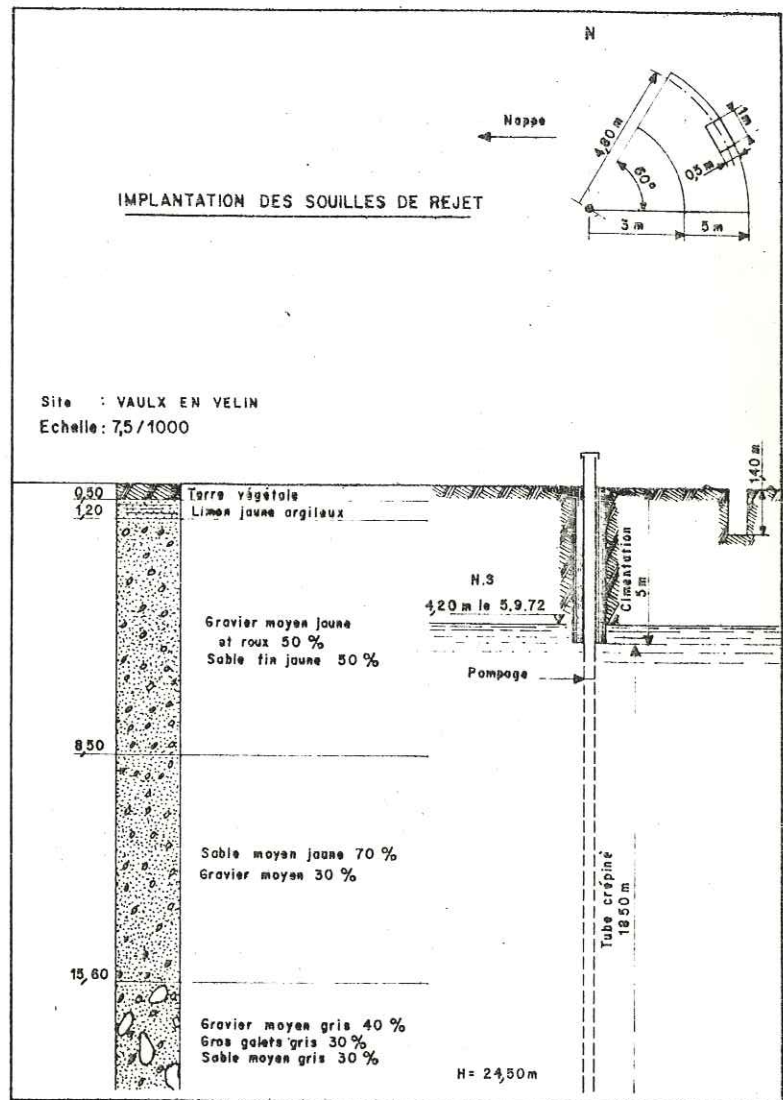


Figure B26 : Log de forage et croquis de l'expérience de coloration du site de VAULX en VELIN.

Dans le forage, le pompage était assuré par une pompe immergée dont le débit était de l'ordre de $19 \text{ m}^3/\text{h}$. L'eau était rejetée à environ 100 m en aval du forage par rapport à la direction présumée de l'écoulement de la nappe.

Le forage était équipé d'un tube crépiné en P.V.C. de 200 mm de diamètre cimenté sur toute la hauteur de la zone non saturée pour éliminer tout cheminement préférentiel le long du tube (cf figure A26).

B.5.1.3. CHOIX DES TRACEURS

Il était nécessaire d'avoir recours à des traceurs mesurables "in situ" pour visualiser le transit, car a priori il était impossible d'évaluer les temps de transfert à travers la couche non saturée entre la souille d'injection et le forage de pompage.

Sur le site de VAULX EN VELIN nous avons fait appel à deux traceurs fluorescents, l'Uranine et la Rhodamine WT.

B.5.2. DEROULEMENT DES ESSAIS

B.5.2.1. TRANSFERT VERTICAL EN TERRAIN IMPREGNE A TRAVERS LA COUCHE D'ARGIL

Le rabattement constaté au cours du pompage était de 4 cm.

L'injection a été effectuée par déversement manuel du traceur à la surface de l'eau remplissant la cuvette d'épandage.

B.5.2.2. TRANSFERT VERTICAL EN TERRAIN IMPREGNE SOUS LA COUCHE D'ARGILE

Un arrêt du rejet pendant 45 minutes a permis au colorant injecté au fond de la souille de pénétrer dans le sol. Il faut noter que sur ce site le débit maximum absorbé par le terrain malgré la souille importante effectuée n'a été que d'environ 350 l/h.

B.5.3. RESULTATS OBTENUS ET CONCLUSION DE L'ESSAI

Le tableau ci-après indique les résultats obtenus lors des deux essais sur le site de VAULX EN VELIN.

FORAGE SITE N° de l'ESSAI	VAULX-EN-VELIN 1	VAULX-EN-VELIN 2
Conditions expérimentales Nature du rejet, Etat de l'horizon Débit	Epandage Non imprégné 400 l/h	Rejet Imprégné 350 l/h
Débit moyen de pompage	18,8 m ³ /h	18,9 m ³ /h
Date d'injection Heure	06.09.72 8 h	11.09.72 18 h
Quantité d'eau introduite dans les souilles avant l'injection	6,2 m ³	29 m ³
Nature et masse du traceur injecté	Rhodamine WT 300 ml de solution 20% Rh.8	Uranine 15 g
Temps d'arrivée	27 h	13 h
Temps de transit le plus probable (sommet)	estimation 70 h	36 h
Proportion de traceur récupéré	après 53 h de pompage 1,0 %	après 63 h de pompage 15,4 %

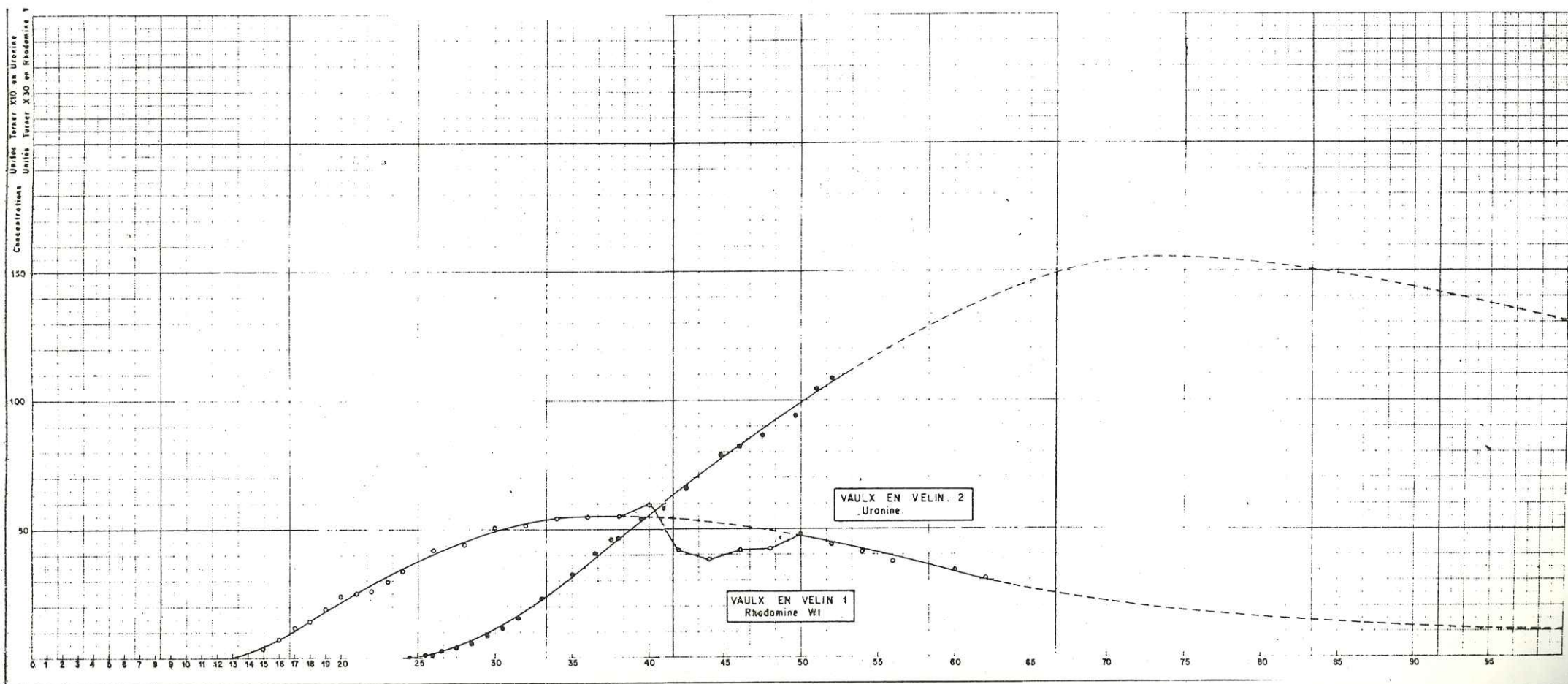
Les courbes de restitution des deux traceurs employés sont représentées sur la figure B27.

Les phénomènes étant relativement longs, toute la "vague" de traceur n'a pas été mesurée dans son intégralité. Les calculs de restitution ont donc été effectués sur des courbes extrapolées (pointillés).

Les essais de VAULX EN VELIN, consistaient à mesurer dans des conditions pratiquement identiques, les temps de transit, avec et sans traversée de la couche d'argile. La différence des temps d'arrivée du traceur entre les deux essais, soit 14 heures (cf tableau) permet d'évaluer le temps de transit minimal à travers les 1,40 m d'argile.

Cette vitesse de transit minimal (temps d'arrivée) est ici de l'ordre de 10 cm/heure. B10

Figure B27 : Courbes de restitution en Rhodamine Wt et uranine sur le site de VAULX en VELIN.



B.5.4. CONCLUSIONS

Lors du creusement de la souille pour le deuxième essai, on s'est rendu compte qu'une grande quantité de Rhodamine WT employée lors du premier essai était restée fixée dans l'argile, ce qui explique le taux très faible de restitution de ce traceur (1%).

Il faut également invoquer le fait que les taux de restitution ont été calculés sur des courbes extrapolées, qui dans le cas de l'Uranine, n'avaient pas encore atteint leur valeur modale. Il est donc vraisemblable que le taux de restitution a été minimisé.

Il faut enfin noter que sur les autres sites étudiés, il a été utilisé des traceurs salins (NaI) et radioactifs (I^{131}) et que leur taux de restitution sont du même ordre de grandeur. Ceci est dû au fait que la tranche de terrain non saturé est relativement importante et que toutes les substances traçantes couramment employées en hydrologie présentent une grande affinité pour des matériaux non saturés tel que l'argile ou les "sables".

Cet essai était destiné à déterminer le temps de transit minimal d'une substance polluante éventuelle à travers la couche non saturée dans le but de protéger un aquifère. Si l'on considère qu'une substance polluante a un comportement voisin des traceurs fluorescents employés (fixation par le terrain), les résultats obtenus donnent une bonne approximation du temps de transit minimal et du temps de transit le plus probable, permettant ainsi une intervention efficace pour la protection de l'aquifère.

C O N C L U S I O N

L'étude qui a été réalisée concerne la catégorie de traceurs artificiels dont l'utilisation s'est révélée ces dernières années comme la plus fluctueuse en Hydrologie.

L'objectif fixé consistait à perfectionner les méthodes de mesure et surtout à faire le point sur les méthodes d'analyse susceptibles d'autoriser la mesure simultanée de plusieurs traceurs fluorescents dont l'emploi conjoint est souhaitable dans de nombreux problèmes d'hydrogéologie.

Cette tâche s'est révélée plus ample et plus ardue qu'il n'y paraissait. Les phénomènes de fluorescence se caractérisent, en effet, par une grande complexité et les nombreux paramètres qui les régissent et les affectent n'étaient ni tous recensés ni bien connus.

En outre, cette étude reposait sur la mise en oeuvre d'un nouvel appareillage dont le fonctionnement n'était encore qu'imparfaitement maîtrisé.

Ce travail, facilité et valorisé par la collaboration entre Mademoiselle le Professeur ALARY et Monsieur ROCHAS à l'U.E.R. de Pharmacie de l'U.S.M. de GRENOBLE et nous-mêmes d'une part, et par les précieuses contributions de Monsieur ANDRE Chargé de Recherches au C.N.R.S. à l'I.P.N. de NANCY d'autre part, nous a permis de contribuer à la mise au point de méthodes originales de discrimination de plusieurs traceurs fluorescents.

Pour la partie expérimentale, il nous a été donné de participer en totalité ou en partie à de nombreuses études d'Hydrologie et d'Hydrogéologie réalisées par le S.A.R.R. Ces études illustrent l'intérêt des traceurs fluorescents, dont l'emploi est maintenant systématique en Hydrologie, et l'utilité d'une mise en oeuvre simultanée de plusieurs traceurs dont la présente étude a précisé les conditions d'analyse.

Cette étude, faisant le point de nos connaissances actuelles sur l'utilisation et l'analyse par spectrofluorimétrie de traceurs xantheniques, pourra

sans doute, être poursuivie et élargie avec la mise au point -dans les années à venir- d'autres traceurs fluorescents de performances au moins équivalentes ou supérieures. Ces progrès s'accompagneront d'une plus large diffusion de ces techniques appelées à rendre de plus éminents services dans toutes les disciplines de l'Hydrologie et, notamment, de l'Hydrogéologie.

BIBLIOGRAPHIE

GENERALITES SUR LES TRACEURS EN HYDROGEOLOGIE

- [A1] MOLINARI J
Les traceurs isotopiques en hydrologie
Annales des Mines (octobre 1969) pp 13-38
- [A2] MOLINARI J
Les traceurs salins et fluorescents en hydrologie
CEA-CENG DR/SAR-G/69 - 15 (1969) 36pp
- [A3] STRICH A
Recherches sur la structure moléculaire de la Rhodamine WT
CEA-CENG SAR-G/70 - 234/AS (1970) 12pp
- [A4] FEUERSTEIN D L SELLECK R E
Fluorescent tracers for dispersion measurements
Journal of the Sanitary Engineering Division (1963) Vol.89 N° SA4
Part 1 pp1-21

GENERALITES SUR LA FLUORESCENCE

- [A5] ANDRE J C BOUCHY M
Cours sur la fluorescence, la phosphorescence et leur mesure
Laboratoire de Chimie Générale E.R.A. N° 136 du CNRS NANCY (1974) 70 pp
- [A6] BARRIOL J RIVAIL J L
Spectroscopies de la molécule
(1971)
- [A7] PARKER C A
Photoluminescence of solutions
Elsevier Publishing Company (1968) 543pp

- [A8] BAVEREZ M
Les spectroscopies optiques : B.Spectroscopie Raman (1973) 29 pp
Cours de Techniques Spectroscopiques
Centre de Perfectionnement des Industries Chimiques ENSIC NANCY
- [A9] BRESLOW R
Mecanismes des Réactions organiques
Ediscience Paris (1970) 294pp
- [A10] ELLIS D W HERCULES D M OHNESORGE W E PARIS J P ROGERS L B
VAN DUUREN B L WEBER G WEHRY E L WINEFORDNER J D
Fluorescence and Phosphorescence Analysis
Interscience Publishers New York London Sydney (1967) 258pp
- [A11] GUILBAULT G
Practical fluorescence : theory, methods and techniques
Marcel Dekker, inc. New York (1973) 664pp
- [A12] BRUHAT G
Cours de physique générale - Optique 1
Masson editeur Paris
- [A13] ALLARY J ROCHAS J
Communication privée

ETUDES SUR LA FLUORESCENCE DES SOLUTIONS

- [A14] ANDRE J C
Processus physiques et chimiques de désactivation des états excités de
la fluoresceine
Laboratoire de Chimie Générale 1 rue Grandville NANCY (1974) 50pp
- [A15] ANDRE J C STEINMETZ D
Techniques de mesure de la concentration de fluoresceine, utilisée en
hydrologie comme traceur fluorescent, en présence de sels
Laboratoire de Chimie Générale 1 rue Grandville NANCY (1974) 11pp

- [A16] LACHENAL R DESCLEE B
Mesure de la dilution de la Sulforhodamine G au moyen d^u fluorimètre continu Turner 111 - Comparaison avec la Rhodamine B
CEA-CENG DR/SAR/G 66-23/RL.MC (1966) 9pp
- [A17] SCHOULER E
Fluorescence et fluorimétrie
CEA-CENG DR/SAR-G/70-27/ES (1970) 28pp
- [A18] SIVERTS L E
Application of the dye dilution technique to periodic summation of streamflow from mountain watersheds
Colorado State University (December 1967) thesis 111pp
- [A19] MOSER H NEUMAIER F BATSCHE H BEHRENS H DROST W HAIDER H
BAUERT W THIELE H
Forschungsstelle für Radiohydrometrie (1965)
- [A20] GRABCZAK J
L'extinction de fluorescence dans les solutions de Rhodamine B et d'Uranine
CEA-CENG DR/SAR-G/70-199 (1970)
- [A21] GALMELS P
Contrôle de la compatibilité de sel marin et d'uranine dans un essai de traceur en hydrogéologie
CEA-CENG DR/SAR-G/70-198/ (1970)

MESURE DE TRACEURS FLUORESCENTS

- [A22] Anonyme
- [A23] Operating and service manual of the Turner model 430 spectrofluorimeter
G.K. TURNER Associates Palo Alto Calif. USA (1970) 77pp
- [A24] DESCLEE B
Mesure de la dilution de la Rhodamine B au moyen d fluorimètre continu Turner
CEA-CENG DR/SAR-G/66-16 (1966) 29pp

- [A25] COROMPT P
 Corrections des erreurs apportées par les changements de sensibilité
 sur le fluorimètre Turner 111
 CEA-CENG AR-G/int/73.1 (1973) 5pp

ETUDE SUR LA DISCRIMINATION DES TRACEURS FLUORESCENTS

- [A26] BEHRENS H NEUMAIER F
 Untersuchungen zum quantitativen Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen
 bei ihrer Anwendung als hydrologische Markierungsstoffe
 Hydrogeologische Arbeiten in Bayern MUNCHEN (1971)
- [A27] BAUER F
 Untersuchungen über die Verwendbarkeit von zwei Fluoreszenzfarbstoffen
 im Rahmen eines Färbeversuches
 Geol. JB/C2/S 61)73/7 Abb HANOVER (1972)
- [A28] BEHRENS H
 Gesellschaft für Strahlenforschung M.B.H.
 Institut de Radiohydrométrie Rapport GSF R 25 (1969)
- [A29] ALARY J ROCHAS J MOLINARI J CHARRIERE R
 Séparations physicochimiques de colorants xanthéniques utilisés comme
 traceurs en hydrologie
 (Publication en cours)
- [A30] MALET G
 Analyse quantitative des produits de fission par spectrographie γ
 Rapport CEA N°2226 (1962) 50pp
- [A31] JUNOD E
 GASPARD, Programme de traitement de spectres gamma
 Application particulière à l'analyse par activation
 CEA-CENG DR/SAR-G/67-37/EJ (1967) 11pp

APPLICATIONS PRATIQUES

(EMPLOI DES TRACEURS)

- [B1] MOLINARI J
Les techniques de traceurs dans l'étude des problèmes de pollution
Nuisance et Environnement Edition Hors Série STAP (1973) 17pp
- [B2] Anonyme
Données de base des bassins versants d'investigation en France
D.G.R.S.T. D.A.T.A.R. S.P.E.P.E. B.E.P. Avril-Septembre 1969
- [B3] CORMARY Y ANGLES M
Modèles déterministes des relations pluies-débits sur la Diège
EDE LNG Note 7/71 Mai 1971 30pp
- [B4] MOLINARI J
Mesure des débits par traceurs radioactifs
Techniques et Sciences Municipales Avril 1968 pp133-146
- [B5] ANDRE H
Hydrométrie pratique des cours d'eau.
Division technique générale, Service de la Production Hydraulique
Electricité de France GRENOBLE 1964 88pp
- [B6] GAILLARD B CHARRIERE R MARION D
Bassin de la Diège, étude des apports sur le cours supérieur de la Diège
CEA-CENG ARG/73.11/BG/MC (1973) 8pp
- [B7] GUIZERIX
Expérience de traceurs réalisés en France dans le cadre d'études sur
la pollution thermique des cours d'eau
Nuclear techniques in environmental pollution SALZBOURG (1970)
- [B8] MOLINARI J SARROT REYNAULD J CHARRIERE R
Etude par multitraçage des circulations karstiques le long du système
de failles Est-Ouest LA AUGÉ - GOULE BLANCHE
CEA-CENG ARG/73-27/JM/MC Juin 1973
CEA-CENG ARG/73-270/JM/EG Septembre 1973

[B9]

MOLINARI J SARROT REYNAULD J CHARRIERE R

Perspectives nouvelles dans l'utilisation des traceurs en hydrogéologie
karstique

Application à l'étude par multitraçage des circulations karstiques le long
du système de failles Est-Ouest LA FAUGE - GOULE BLANCHE

[B10]

CALMELS P

Etude des modalités de transit vertical en zone non saturée

CEA-CENG AR.G/72-30/JM/DP (1972) 10pp

BIBLIOTHEQUE
GROUPE - SCIENCES
UNIVERSITAIRE

Dernière page d'une thèse

VU

Grenoble, le

Le Président de la thèse

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke, positioned above a solid horizontal line.

Vu, et permis d'imprimer,

Grenoble, le

Le Président de l'Université
Scientifique et Médicale