

---

**Le Potentiel des matières organiques  
dissoutes pour le traçage hydrogéologique**

## III.1 Les MOD : un traceur naturel potentiel et ses principales techniques analytiques

### III.1.1 Des caractéristiques adéquates d'un bon traceur hydrogéologique

#### III.1.1.1 Les propriétés indispensables d'un traceur hydrogéologique naturel

Un traceur naturel est un élément, une substance, un corps ou un ensemble de molécules, présent naturellement dans l'eau courante de surface et/ou souterraine, dont les variations dans l'espace et/ou dans le temps peut marquer et différencier une masse d'eau particulière, et permet d'identifier son origine ou de repérer son évolution [Office Québécois de la Langue Française (1990)]. Pour cela, un traceur requiert les propriétés suivantes :

- ◇ une stabilité chimique (peu réactive et récalcitrante vis à vis de la biocénose)
- ◇ une tendance à l'adsorption la plus faible possible
- ◇ une bonne solubilité dans l'eau.

A cela s'ajoute une condition pratique importante, à savoir une limite de détection basse et une méthode analytique associée peu coûteuse. Il est vain de vouloir trouver un traceur qui remplisse à 100 % toutes les exigences. Le traceur idéal n'existant pas, le choix du traceur naturel va dépendre de la problématique, de la situation hydrogéologique et des variations de son signal d'entrée.

#### III.1.1.2 Caractéristiques des MOD pour le traçage hydrogéologique

Notre problématique est donc d'obtenir un traceur hydrogéologique naturel dans les eaux souterraines karstiques. En effet, les vitesses de transit dans ce type d'aquifère peuvent être très rapides, avec des temps de séjour généralement inférieurs à un an, pour la zone non saturée (nous l'avons montré pour notre secteur dans la partie II.3.2). Jusque là, seuls certains traceurs isotopiques dans des conditions très particulières ont permis la quantification d'un temps de séjour.

Les MOD semblent, par leurs caractéristiques décrites dans la partie I.3, pouvoir combler ce manque. Tout d'abord, nous avons vu que les petites molécules organiques sont assez solubles dans l'eau. De plus, bien que la plupart des MOD présentes dans une eau du sol soient très rapidement dégradées, certaines d'entre-elles (généralement des résidus terminaux de la biodégradation) ont des structures récalcitrantes vis-à-vis de la biocénose. Elles sont, par conséquent, chimiquement plus stables et peuvent donc séjourner assez longtemps dans l'eau souterraine sans être modifiées ou biodégradées [Bahri *et al.* (2008)]. D'autre part, nous avons vu que le sol est le réservoir principal des MOD mobilisables par l'eau infiltrée (cf. I.2.1). Ainsi, les variations de la nature des MOD du sol dans le temps [Guggenberger *et al.* (1994) ; Hongve (1999) ; Batiot *et al.* (2003b)] et le fait que chaque type de sol possède sa propre composition-type en substances organiques mobilisables pourraient marquer et différencier une masse d'eau particulière ; et, par conséquent, nous permettre d'en identifier

l'origine (traçage spatial) ou encore la période d'entrée dans le système (traçage temporel) dans le système.

A partir de cette analyse, il semble que les MOD peuvent théoriquement être utilisées comme un traceur hydrogéologique. Dans le cas où cela s'avère exact dans la pratique, elles pourraient être un outil très puissant nous donnant à la fois des informations sur la délimitation du bassin d'alimentation et sur le temps de séjour. Cependant, le fait que ces molécules organiques aient une tendance à l'adsorption sur les argiles, nous indique qu'elles ne pourront être utilisées que pour la quantification de temps de séjour assez courts. En outre, ce phénomène ne causera qu'une diminution progressive de la concentration de ces molécules dans l'eau souterraine [Pitois *et al.* (2008)], mais en aucun cas, ne modifiera leur nature. Ceci n'est donc pas réellement un inconvénient. En effet, on retrouve la même situation dans le cas des traçages artificiels : la restitution de traceur à l'exutoire n'est généralement pas complète et une fraction dite « perdue » de ce dernier reste piégé dans le système. La seule conséquence est qu'il faut une concentration assez forte en signal d'entrée et/ou un mode de détection suffisamment sensible.

### III.1.2 *Les principales méthodes de caractérisation des MOD*

Les méthodes d'étude des MOD sont nombreuses, variées et leurs développements récents ont permis des progrès importants de leurs connaissances. Elles sont regroupées en trois catégories :

- Les méthodes d'analyses chimiques permettant d'obtenir les compositions élémentaires et fonctionnelles ; elles sont décrites de façon détaillée dans plusieurs ouvrages comme ceux de Stevenson (1994) et de Klute (1986).
- Les méthodes partiellement destructives qui ont pour objet de dégrader les substances auxquelles elles sont appliquées et permettre d'obtenir des informations sur leurs parties constitutives. La destruction des molécules est obtenue soit par des réactions chimiques, soit par un traitement thermique.
- Les méthodes physiques, non destructives, qui donnent des informations sur les substances sans devoir nécessairement les extraire ou, si c'est le cas, sans toutefois les transformer et les dégrader.

#### III.1.2.1 **Les méthodes destructives**

Leur objet est l'obtention de composés chimiques représentatifs des principales structures moléculaires des MOD. Ces composés sont aussi susceptibles de donner des informations sur la végétation et les conditions climatiques qui ont produit ces substances.

##### III.1.2.1.1 *Méthodes chimiques :*

Les méthodes utilisées sont variées (Tableau III-1). D'une façon générale, les résidus de réactions sont censés représenter le « squelette » moléculaire des MOD. Cependant, l'interprétation

des résultats est délicate pour plusieurs raisons. Les produits de dégradation ne sont pas toujours identifiables et parfois ne donnent aucune information quand les transformations aboutissent à H<sub>2</sub>O et CO<sub>2</sub>, comme dans le cas de l'oxydation. Les nombreux produits obtenus peuvent ne pas provenir des MOD mais des molécules qui leur sont associées. Cette difficulté peut être partiellement évitée par des traitements préalables destinés à les éliminer [Riffaldi & Schnitzer (1972)]. Enfin, les réactifs très agressifs peuvent donner des composés aliphatiques (alcanes, acides gras, acides carboxyliques) résultant de la destruction de structures aromatiques.

Hydrolyse par	Réduction par	Oxydation par	Autres
- par l'eau en milieux alcalins - par l'eau en milieu acide	- l'amalgame de Na - la distillation en présence de Zn	- Cu-NaOH - nitrobenzène en milieu alcalin - acide nitrique - acide peracétique - NaClO - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- dégradation par NaS - dépolymérisation

Tableau III-1 : Méthodes chimiques destructives d'analyses des MOD [Calvet (2003)]

#### III.1.2.1.2 Méthodes thermiques :

Il existe deux méthodes thermiques :

- **La méthode thermogravimétrique** : le chauffage à des températures supérieures à 400 °C provoque la destruction des MOD par pyrolyse et entraîne une perte de masse. L'enregistrement de cette perte de masse en fonction de la température, à laquelle l'échantillon étudié est porté, permet d'obtenir des informations sur la structure des substances [Turner & Schnitzer (1962)].
- **La méthode couplant la pyrolyse et la spectrométrie de masse** : Principalement appliquée pour la MO solide, cette technique utilise des gradients croissants d'énergie thermique (chauffage progressif ou instantané) pour rompre les liaisons des plus faibles au plus fortes. Les composés produits sont ensuite analysés à l'aide d'un spectromètre de masse. On peut alors obtenir une certaine « carte d'identité » des substances organiques. Cette méthode ne donne pas d'informations quantitatives sur les composants structuraux et l'interprétation des résultats peut être faussée par des réactions parasites. Cependant, elle possède plusieurs intérêts, notamment le fait qu'elle devrait permettre de distinguer différents constituants organiques et fournir une information pouvant s'apparenter à une « empreinte digitale » des substances organiques [Stevenson (1994)].

#### III.1.2.2 Les méthodes physiques non destructives

Il existe trois groupes de méthodes non destructives :

- des méthodes spectrométriques permettant d'obtenir des informations relatives aux structures moléculaires (nature des groupes fonctionnels, liaisons, environnements atomiques)
- des méthodes s'adressant aux propriétés colloïdales donnant des informations sur la taille et la forme des particules, les propriétés tensioactives

- des méthodes physico-chimiques se basant sur les propriétés électriques des molécules (charges électriques, polarité) ; c'est le cas, par exemple, des méthodes chromatographiques (sur colonne ionique ou RP-C18).

Les méthodes spectrométriques se sont beaucoup développées en raison d'importants progrès technologiques, tant pour les matériels de spectrométrie que pour les moyens de traiter les informations (traitement du signal). Elles sont basées sur l'utilisation des transitions électroniques, des vibrations intramoléculaires et des propriétés magnétiques (Tableau III-2).

Méthodes	Phénomènes concernés	Informations obtenues
Absorption UV-Visible	Transitions électroniques des électrons de liaison	Caractérisation globale
Fluorescence et Matrice d'Excitation - Emission	Transitions électroniques des électrons de liaison	- Caractérisation globale des fluorophores - Informations sur les liaisons avec les métaux
Absorption Infrarouge et spectroscopie Raman	Vibrations intramoléculaires	Identification des groupes fonctionnels et des structures moléculaires
Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	Propriétés magnétiques des électrons	Détection et caractérisation des radicaux libres
Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	Propriétés magnétiques des noyaux atomiques	Données quantitatives sur les composants structuraux

Tableau III-2 : Méthodes spectrométriques utilisées pour étudier les MOD [d'après Calvet (2003)]

### III.1.3 *Choix des méthodes analytiques des MOD pour notre problématique*

Nous venons de voir qu'il existe beaucoup de méthodes analytiques, permettant de caractériser les MOD ou une partie de celle-ci, qui pourraient nous être utile pour l'élaboration d'un traceur hydrogéologique. Tout d'abord, les faibles concentrations de la MOD dans les eaux souterraines (0.5 à 3 mg/L) nous imposent d'utiliser des moyens analytiques sensibles. D'après nos recherches bibliographiques sur les diverses techniques de caractérisation (cf. III.1.2), les méthodes spectrométriques semblent être les plus adaptées à notre problématique.

D'autre part, nous avons vu que les molécules organiques susceptibles de devenir un traceur sont des résidus de la biodégradation et doivent montrer une variation, notamment dans le temps, de leur nature, due à un état de maturation plus ou moins avancé selon les saisons (cf. III.1.1.2). Les seuls composés organiques du sol qui correspondent à ces deux critères sont des substances dérivées de la décomposition de la lignine (ceux de la cellulose étant très rapidement minéralisés ou adsorbés). Elles sont composées de groupements aromatiques, qui ont des propriétés de fluorescence, et de radicaux libres stables intéressants (Figure III-1).

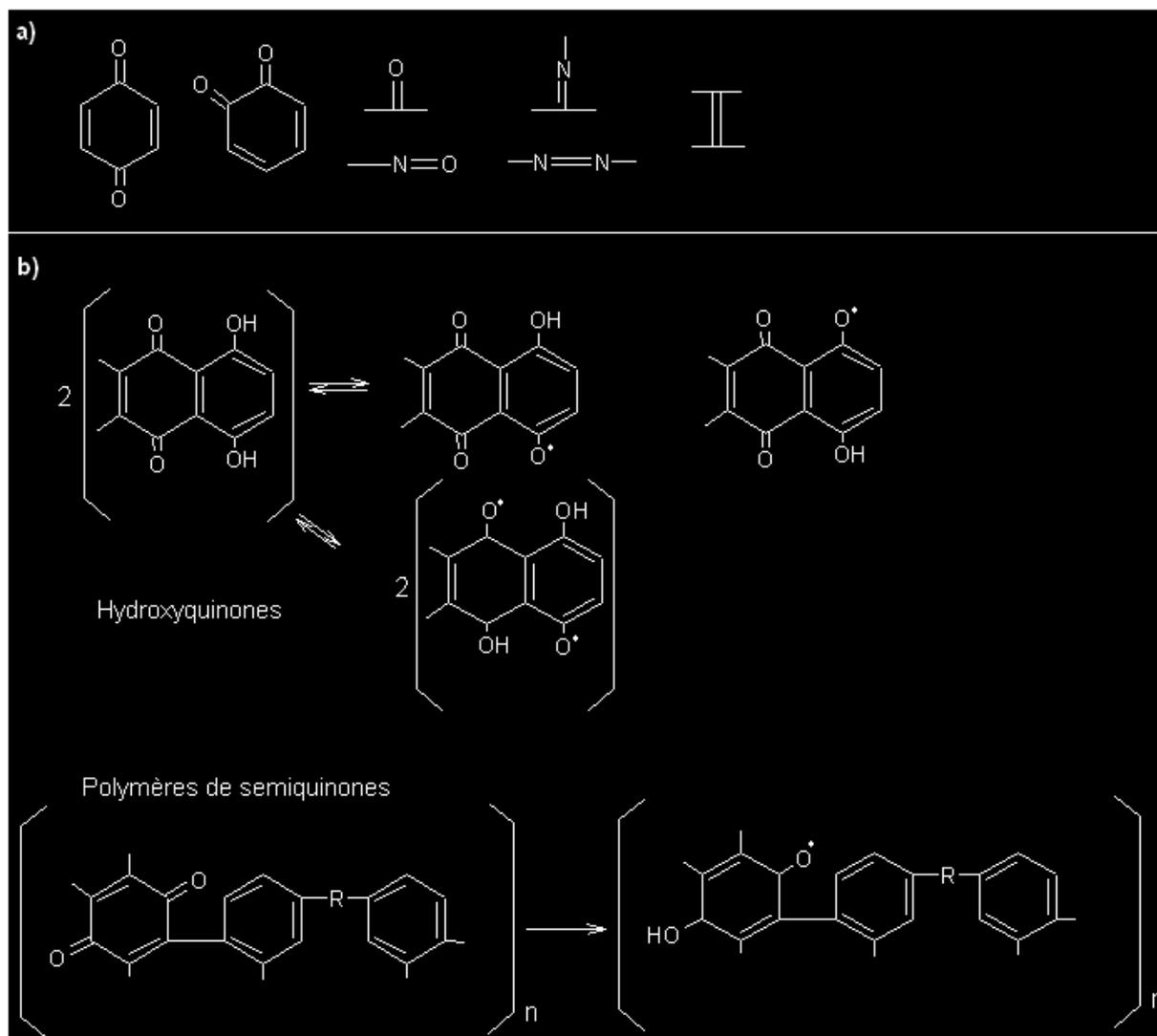


Figure III-1 : Les principaux groupes fluorophores (a) et radicaux libres (b) de la MOD [Calvet (2003)]

En conclusion, les méthodes spectrométriques, les plus adaptées pour répondre à nos attentes, sont la spectrofluorimétrie et la résonance paramagnétique électronique. En effet, en plus d'être extrêmement sensibles, ces techniques analytiques ont, d'une part, prouvé leur intérêt dans la caractérisation des MOD :

- pour la spectrofluorimétrie : Le Coupanec *et al.* (2000) ; Her *et al.* (2003) ; Hunt & Ohno (2007) ; Jiang *et al.* (2008) ; Gonsior *et al.* (2008)
- pour la résonance paramagnétique électronique : Chen *et al.* (2002) ; Flogeac *et al.* (2005) ; González-Peréz *et al.* (2006).

D'autre part, elles présentent l'avantage d'être rapides et peu coûteuses en terme analytique, ce qui est non négligeable dans le cadre d'une possible utilisation opérationnelle des traceurs.

## III.2 Présentation des techniques analytiques utilisées

### III.2.1 *La spectrofluorimétrie : principes et méthodes*

#### III.2.1.1 Théorie de la fluorescence moléculaire

L'émission de rayonnements électromagnétiques par les molécules s'appelle la luminescence. Ce terme regroupe la chimioluminescence, la bioluminescence, la phosphorescence et la fluorescence, selon l'origine de l'émission. Pour ces deux derniers, c'est l'absorption de photons qui conduit à l'état excité. Ainsi, la fluorimétrie est une technique d'analyse basée sur la mesure du flux émis par fluorescence ( $\Phi_f$ ), correspondant à l'énergie des photons émis après le retour à l'état initial.

L'énergie totale d'une molécule est la somme des énergies nucléaires, électroniques, vibrationnelles, rotationnelles et de translation. A température ordinaire, la plupart des molécules sont à l'état électronique fondamental et possèdent une faible énergie vibrationnelle et rotationnelle.

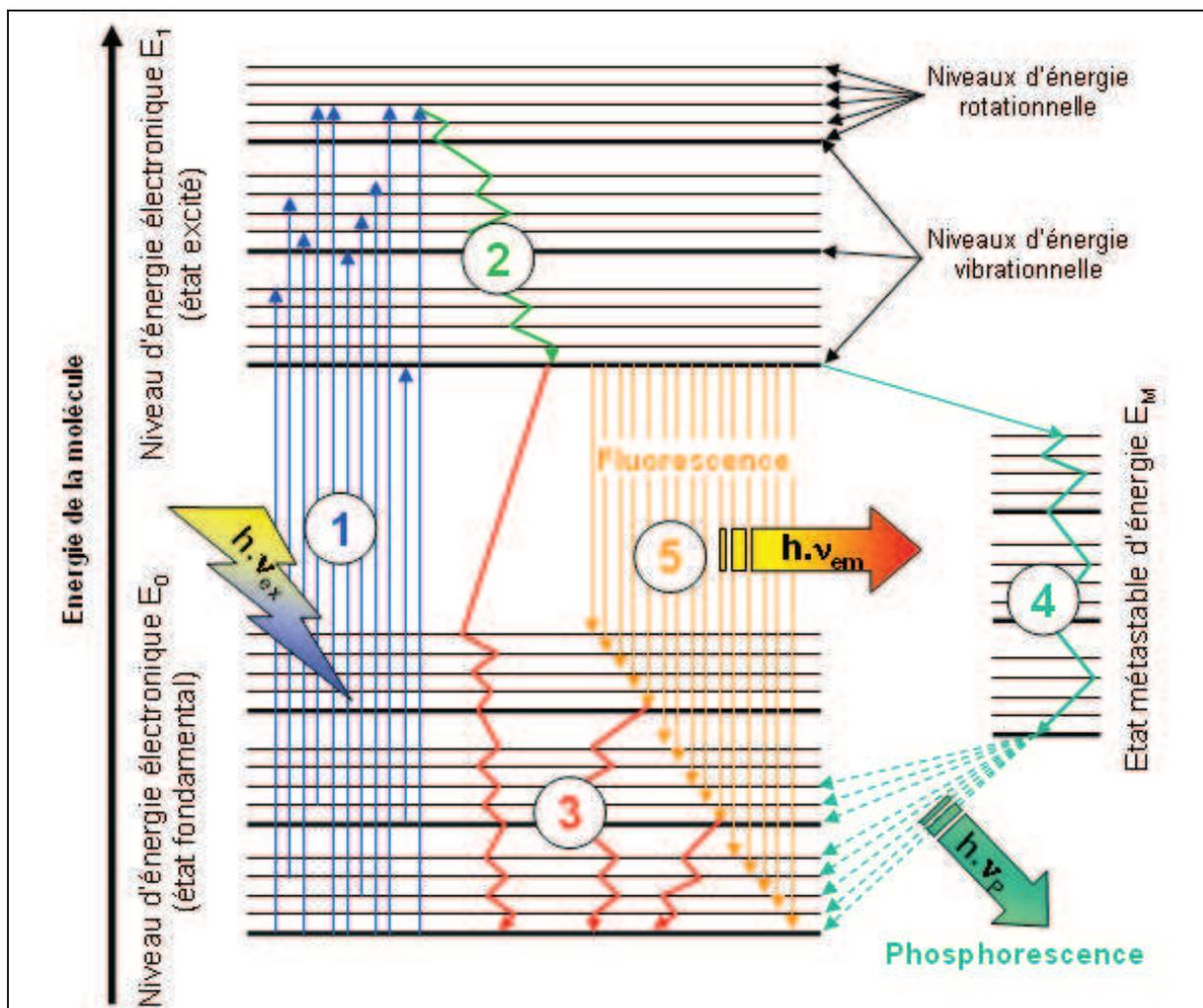


Figure III-2 : Désexcitation de molécules par fluorescence et phosphorescence

L'absorption d'un photon UV-visible, d'énergie  $\hbar \cdot \nu_{\text{ex}} = E_1 - E_0$  (où  $h$  est la constante de Planck égale à  $6.626 \cdot 10^{-34}$  J.s et  $\nu$  est la fréquence de l'onde lumineuse incidente en  $\text{s}^{-1}$ ), peut provoquer une transition électronique à partir de l'état fondamental d'énergie  $E_0$  vers l'état excité d'énergie  $E_1$  (étape 1, Figure III-2). Très vite, l'énergie vibrationnelle et rotationnelle de l'état électronique excité est perdue au moment de chocs entre molécules de la solution. Cette relaxation conduit donc les molécules au niveau d'énergie le plus bas de l'état électronique excité (étape 2, Figure III-2). De cet état excité, légèrement plus stable, existent trois possibilités de retour à l'état fondamental : la désexcitation non radiative (étape 3, Figure III-2), la phosphorescence (étape 4, Figure III-2) et la fluorescence. Ce troisième mode de désexcitation est un phénomène rare et ne concerne donc pas toutes les molécules. La perte d'énergie qui accompagne le retour à l'état fondamental se fait par émission d'un photon de fréquence  $\nu_{\text{em}}$  (étape 5, Figure III-2). La désexcitation partielle due aux chocs entre molécules et le fait que l'énergie retombe sur un niveau vibrationnel et rotationnel quelconque de l'état électronique fondamental expliquent que l'énergie des photons émis par fluorescence soit plus faible que celle des photons qui ont excité les molécules : ainsi, on a  $\nu_{\text{ex}} > \nu_{\text{em}} \Leftrightarrow \lambda_{\text{ex}} < \lambda_{\text{em}}$ , avec  $\lambda = \frac{c}{\nu}$ , où  $\lambda_{\text{ex}}$  et  $\lambda_{\text{em}}$  sont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission en nm et  $c$ , la célérité de la lumière ( $\approx 3 \cdot 10^{17}$  nm.s<sup>-1</sup>)

### III.2.1.2 Choix du modes d'analyses spectrofluorimétriques

- **Analyses spectrofluorimétriques à simple balayage**

Au début de son utilisation, la spectrofluorimétrie de solutions était effectuée à l'aide de modes à simple balayage.

◇ *Le spectre d'émission* est constitué de l'ensemble des rayonnements émis lors de la désexcitation par fluorescence. Il correspond à l'enregistrement de l'intensité de fluorescence de la radiation émise en fonction de la longueur d'onde, pour une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{\text{ex}}$  donnée.

◇ *Le spectre d'excitation* est constitué de l'ensemble des rayonnements qui conduisent à l'état excité à partir duquel se produit la fluorescence. Il correspond donc à la mesure de l'intensité de fluorescence d'une radiation émise de longueur d'onde  $\lambda_{\text{em}}$  donnée en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

- **Analyses spectrofluorimétriques à balayage multiple**

Avec l'avancement technologique et l'amélioration de la résolution spectrométrique, les spectres d'émission ont pu être observés au cours d'une même analyse à diverses longueurs d'onde d'excitation.

◇ *Les spectres à balayage synchrone* sont obtenus par un balayage synchrone des monochromateurs d'excitation et d'émission. Le premier laisse sortir un intervalle étroit centré

autour de  $\lambda_{ex}$ . Le second laisse sortir un intervalle étroit centré autour de  $\lambda_{em}$ .  $\Delta\lambda$  représente la différence entre ces deux longueurs d'onde et est fixé par l'opérateur. Le microprocesseur pilote ensuite la rotation simultanée des deux réseaux en maintenant un écart égal à  $\Delta\lambda$  entre  $\lambda_{ex}$  et  $\lambda_{em}$ . Le fluorimètre mesure alors l'intensité lumineuse émise aux différentes  $\lambda_{em}$ . L'allure de ces spectres va dépendre énormément de la valeur de  $\Delta\lambda$ . Par exemple, un balayage avec un  $\Delta\lambda$  petit simplifiera considérablement l'allure des spectres de mélanges ou de substances qui ont des spectres d'émission et d'excitation complexes.

◇ *Les matrices d'excitation-émission (MEE)* ont considérablement affiné la caractérisation des mélanges organiques en solution. Le spectrofluorimètre se cale tout d'abord sur une première longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{ex}$  et met en mémoire un premier spectre d'émission. Il ajoute ensuite à  $\lambda_{ex}$  l'incrément programmé et met en mémoire un second spectre d'émission. L'incrément de  $\lambda_{ex}$  et l'enregistrement des spectres se poursuivent aussi longtemps qu'ils ont été programmés. On obtient alors en mémoire une famille de spectres d'émission correspondant à des longueurs d'onde d'excitation graduellement augmentées. Tous ces spectres vont alors apparaître sur un même repère. Chacun sera dans un plan parallèle, mais sa position sur la troisième dimension dépendra de la longueur d'onde d'excitation. Les spectres d'émission apparaîtront donc décalés les uns par rapport aux autres donnant l'impression d'une image en trois dimensions [ $\lambda_{em}$  ;  $\lambda_{ex}$  ;  $\Phi_f$ ] (Figure III-3). Ce type de spectre 3D, ou spectre de MEE, apporte, en plus de ceux des différents spectres d'émission qui ont servi à sa construction, de nombreux renseignements sur les composés fluorescents d'un mélange.

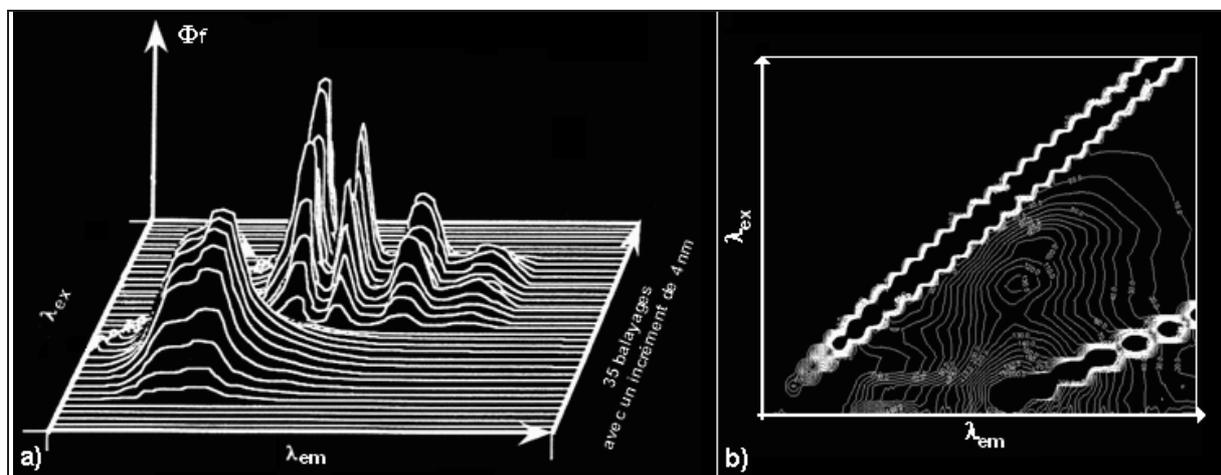


Figure III-3 : Allure du spectre de MEE [sous forme de pics (a), sous forme de courbes de niveau (b)]

En raison des concentrations et de la nature des échantillons étudiés (à savoir des mélanges complexes de substances organiques à des concentrations de COD variant de 0.5 mg/L à 30 mg/L), nous avons choisi d'étudier la fluorescence à l'aide des spectres de MEE. En effet, cette technique très sensible présente l'avantage de nous offrir rapidement une vue globale des fluorophores présents dans

la solution, pour un coût et un volume analytique faible (1 mL suffit). Les paramètres utilisés pour programmer le spectrofluorimètre sont décrits dans le Tableau III-3.

	Début	Fin	Pas
Longueur d'onde d'émission	215 nm	530 nm	0.5 nm
Longueur d'onde d'excitation	215 nm	530 nm	15 nm
Nombre de scan(s)		22	
Vitesse du scan		1200 nm/min	
Ouverture des monochromateurs		10 nm	

Tableau III-3 : Paramétrage du spectrofluorimètre pour obtention des spectres de MEE

### III.2.1.3 Méthodes analytiques

#### III.2.1.3.1 Conditionnement des échantillons

Des échantillons de lixiviats de sols et d'eaux souterraines ont été analysés par spectrofluorimétrie. Ces prélèvements ont été effectués dans les mêmes flacons en verre servant à l'échantillonnage pour une analyse en COT (cf. II.3.1.4). Aucun ajout chimique n'a été fait afin de ne pas détériorer les structures fluorescentes de l'échantillon. Ces derniers ont été conservés à 4 °C dans l'obscurité et analysés dans les plus brefs délais. Les échantillons de lixiviats ont subi en plus une filtration sur filtre de 0.7 µm en fibres de verre (préalablement chauffé à 550 °C pendant 6 heures), afin d'éliminer la partie particulaire du carbone organique, qui est somme toute très faible dans nos échantillons.

#### III.2.1.3.2 Appareillage et linéarité

Toutes les analyses spectrofluorimétriques ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre LS55 de Perkin-Elmer (Figure III-4), localisé à l'INRA d'Avignon (UMR Climat, Sol et Environnement) jusqu'en 2007, puis à l'INRA de Montpellier (UMR INRA-SupAgro Biogéochimie du Sol et de la Rhizosphère).

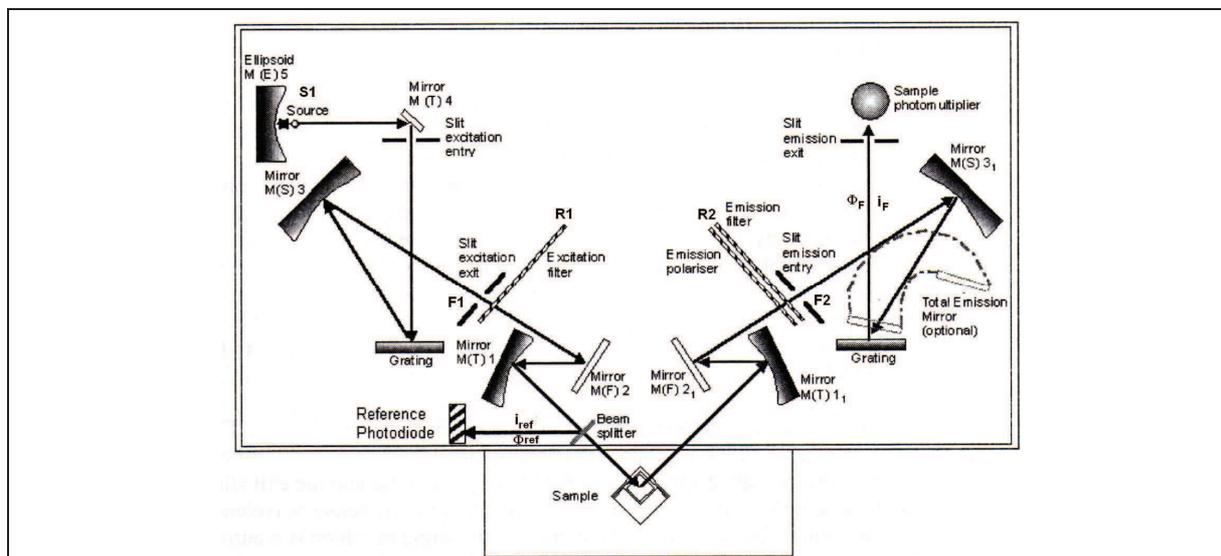


Figure III-4 : Schéma de fonctionnement du spectrofluorimètre LS55 [PerkinElmer-instruments (2000)]

La source  $S_1$  (lampe au Xénon) émet un rayonnement continu qui est dispersé par le réseau  $R_1$  du monochromateur dont la fente de sortie laisse passer un intervalle spectral étroit centré autour de  $\lambda_{ex}$ . Ce faisceau est ensuite divisé en deux par un diviseur de faisceau (miroir semi-transparent) qui forme un faisceau de référence  $\Phi_{ref}$  qui va frapper le récepteur photométrique de référence (une barrette de diodes) fournissant un signal  $i_{ref}$  et un faisceau d'excitation qui se dirige vers la cuve (en quartz, de section carrée et de contenance  $1\text{ cm}^3$ ). Il provoque une éventuelle fluorescence qu'un monochromateur d'émission recueille à  $90^\circ$  par rapport au faisceau incident. La position du réseau  $R_2$  détermine la longueur d'onde  $\lambda_{em}$  des radiations de flux  $\Phi_f$  qui frappent le récepteur photométrique de mesure (une autre barrette de diodes) fournissant un signal d'intensité  $i_f$ . Les fentes  $F_1$  et  $F_2$  des deux monochromateurs sont réglables selon que l'on veut augmenter ou diminuer la sensibilité et inversement la spécificité de la mesure (pour nos mesures, les fentes sont réglées à 10 nm). Les deux signaux électriques sont numérisés et traités par le logiciel FLWinLab qui en fait le rapport et affiche les résultats.

Pour qu'une analyse spectrofluorimétrique quantitative soit possible, la proportionnalité entre l'intensité de fluorescence  $\Phi_f$  et la concentration  $C$  doit être conservée. Dans le cas de fortes teneurs en substances organiques (et « a fortiori » en fluorophores), on peut observer soit une non-linéarité de la relation croissante  $\Phi_f = f(C)$ , soit une diminution voire une extinction de fluorescence. Les anglo-saxons parlent de « quenching ». Ce phénomène peut s'expliquer par l'augmentation du nombre de chocs entre molécules, qui favorise les désexcitations non radiatives, et la formation de dimères ou de trimères non fluorescents due à la réaction entre-elles de molécules excitées. Ainsi, la linéarité du spectrofluorimètre doit être vérifiée lors de l'analyse de solutions concentrées (c'est le cas pour les lixiviats de sol). La Figure III-5 montre l'intensité de fluorescence des couples (330 nm ; 440 nm) de lixiviats PA et PE2 ayant subi des dilutions successives. D'après ces tests, la linéarité est maintenue jusqu'à une concentration de 20 mg/L de COD. Ainsi, le cas échéant, les échantillons, présentant une concentration en COD supérieure, ont été dilués pour être dans la gamme de concentration où la précédente relation est linéaire ; puis l'intensité de fluorescence a été corrigée par le facteur de dilution.

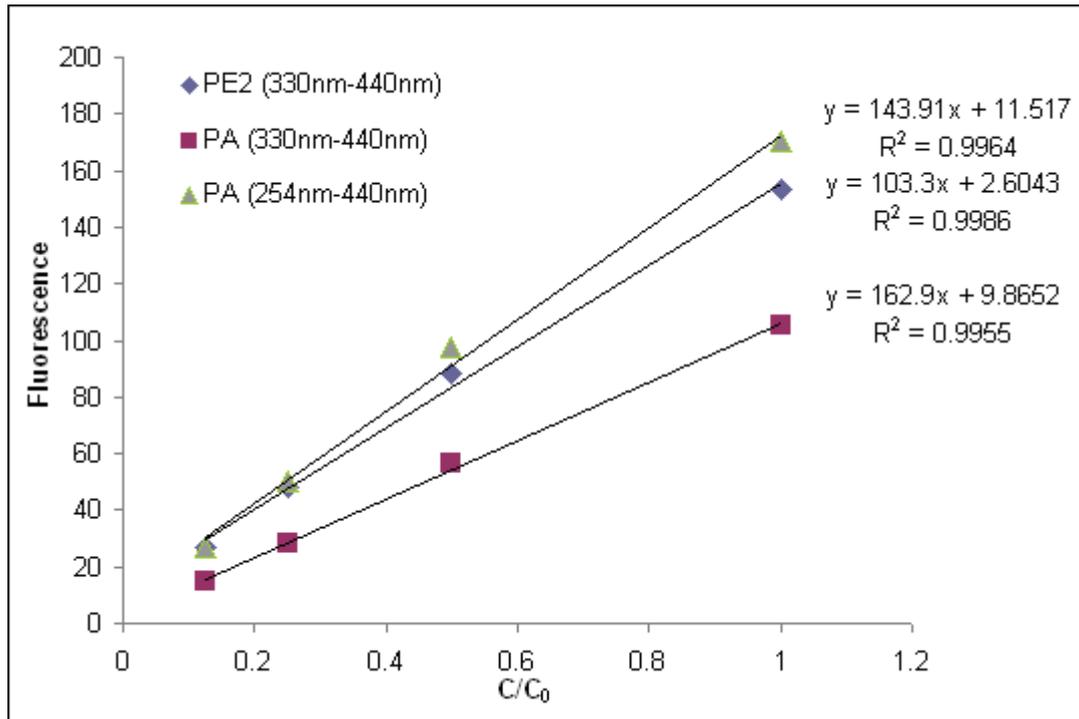


Figure III-5 : Test de linéarité sur des échantillons de sol concentrés

### III.2.1.3.3 Corrections des rayonnements parasites

- **Correction du Raman de l'eau**

L'interférence du Raman de l'eau correspond à une diffusion par les molécules du rayonnement d'excitation qui se fait avec modification de la longueur d'onde. Les molécules de solvant étant les plus nombreuses, ce sont elles qui vont être responsables de la quasi-totalité de l'effet Raman. La fréquence du rayonnement émis dépend de celle du rayonnement d'excitation. Dans un spectre d'émission, l'effet Raman se présentera sous forme de bandes de fréquences qui dépendent du solvant et de la longueur d'onde d'excitation. Il sera d'autant plus gênant que le soluté fluorescent sera en faible concentration. Dans notre cas, les données brutes des eaux souterraines doivent nécessairement être corrigées du Raman de l'eau [Senesi *et al.* (1989) ; Coble *et al.* (1993) ; Coble (1996) ; Del Castillo *et al.* (1999) ; McKnight *et al.* (2001) ; Ohno (2002) ; Zepp *et al.* (2004)]. Nous avons donc réalisé une série de dix MEE d'eau Milli-Q (Résistivité = 18 MΩ.cm ; COT < 0.1 mg/L), afin de définir un blanc moyen de l'appareil. Tous les échantillons d'eaux souterraines ont été corrigés à l'aide de ce dernier (Figure III-6).

- **Dispersion de Rayleigh, effet Tyndall et harmoniques**

La dispersion de Rayleigh est une diffusion par les molécules en solution (ou par la cuve elle-même) du rayonnement d'excitation dans toutes les directions sans modification de la longueur d'onde. Elle correspond donc à une réémission de lumière à la même longueur d'onde que la lumière incidente. Elle peut poser problème dans le cas où l'intensité de fluorescence des substances est faible, comparée à la radiation d'excitation. Dans notre cas, les échantillons d'eau souterraine pourraient en être affectés.

L'effet Tyndall correspond, quant à lui, à une diffusion par les molécules en suspension (colloïdes) du rayonnement d'excitation dans toutes les directions sans modification de longueur d'onde. Il se confond donc par ses effets à la dispersion de Rayleigh [Rouessac & Rouessac (1998)]. Dans notre cas, les échantillons lixiviés peuvent en être affectés, malgré leur filtration. Cependant, cela reste négligeable comparé à l'intensité de fluorescence des substances.

Les harmoniques sont des pics de fluorescence qui apparaissent à des longueurs d'onde, multiples de la longueur d'onde d'excitation.

Pour éviter ses derniers rayonnements parasites, l'idéal est de ne pas travailler à des longueurs d'onde proche du rayonnement d'excitation  $\lambda_{ex}$  [en nm] et de ses harmoniques  $(k+1)\lambda_{ex}$ ,  $k \in \mathbb{N}^*$ . C'est pourquoi, nous nous intéresserons aux massifs de fluorescence, dont la longueur d'onde d'émission est comprise entre  $[\lambda_{ex} + 20 \text{ nm}]$  et  $[2\lambda_{ex} - 20 \text{ nm}]$  (Figure III-6).

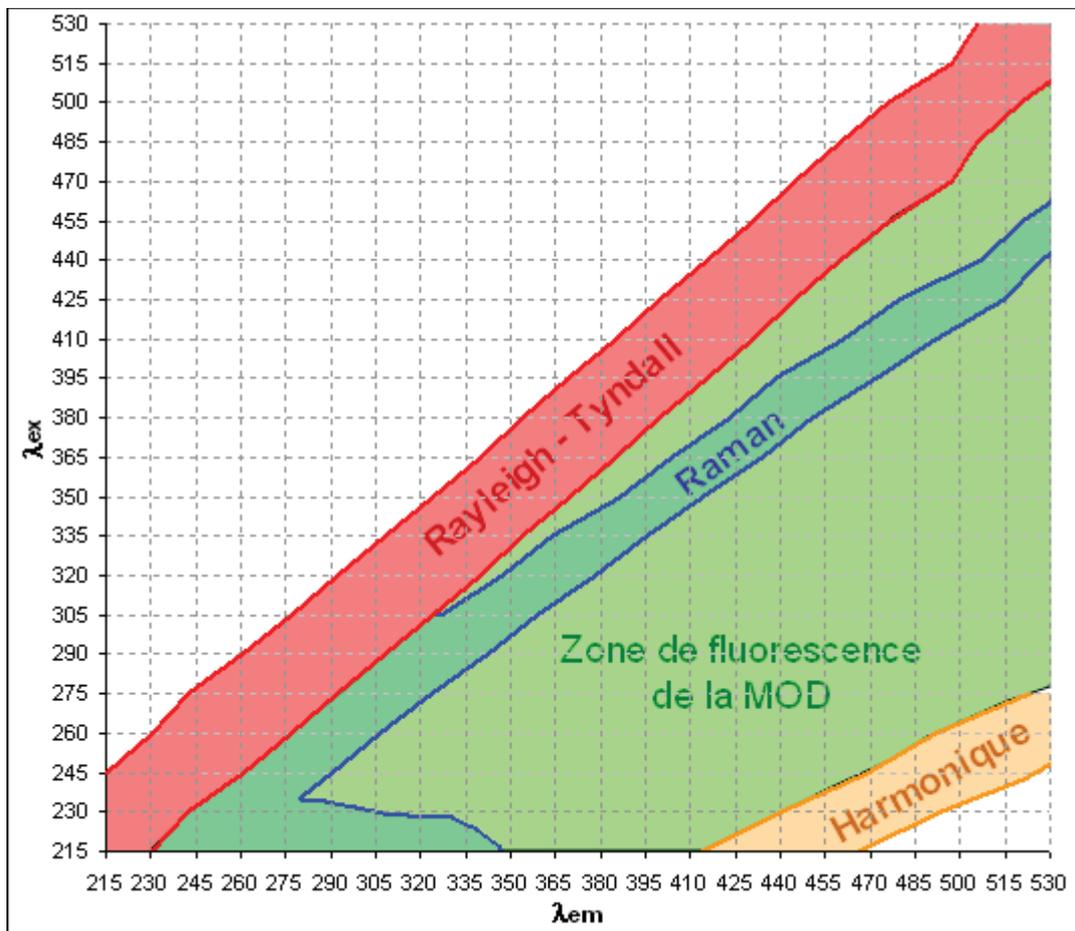


Figure III-6 : Positionnement des rayonnements parasites et de la zone d'analyse dans les MEE

#### III.2.1.3.4 Méthodes d'interprétation des matrices d'excitation-émission

Depuis que Coble *et al.* (1990) ont utilisé les MEE pour caractériser les MOD dans les eaux marines, de nombreux auteurs ont commencé à définir différentes méthodes d'interprétation de ces spectres. Ces dernières peuvent aller d'une simple description qualitative des massifs mis en évidence (méthode globale), à l'utilisation d'indices de fluorescence ou leur rapport correspondant à un couple

d'excitation-émission bien particulier (indices ponctuels), à une bande d'émission particulière pour une longueur d'onde d'excitation donnée (indice surfacique) ou encore au volume des différents massifs caractérisés (indice volumique).

La méthode globale a permis d'identifier un certain nombre de types de fluorophores à partir de la position relative des massifs de fluorescence dans la MEE. C'est ainsi que de nombreuses nomenclatures de fluorophores (Tableau III-4) ont vu le jour [Coble (1996) ; Marhaba & Lippincott (2000) ; Marhaba *et al.* (2000) ; Parlanti *et al.* (2000)]. Il est donc possible de distinguer les massifs protéiniques à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission courtes, des massifs fulvico-humiques à des longueurs d'onde d'émission plus grandes [Baker (2001)].

Fluorophore Name: (Coble, 1996)	Fluorophore Name: (Parlanti <i>et al.</i> , 2000)	Fluorophore Name: (Marhaba <i>et al.</i> , 2000; Marhaba and Lippincott, 2000)	Fluorophore type	Ex/Em wavelength (nm) at max fluorescence intensity	Author
A	$\alpha'$	Hydrophobic acid fraction (HPOA)	Humic-like	237-260/400-500	
C	$\alpha$		Humic-like	300-370/400-500	
M	$\beta$		Marine Humic-like	312/380-420	
B	$\gamma$	Hydrophobic neutral fraction (HPON)	Protein-like (Tyrosine-like)	225-237/309-321 and 275/310	
T	$\delta$	Hydrophobic base fraction (HPOB) Hydrophilic acid fraction (HPIA) Hydrophilic neutral fraction (HPIN)	Protein-like (Tryptophan-like)	225-237/340-381 and 275/340	
Chlorophyll a				431/670	(Moberg <i>et al.</i> , 2001)
Chlorophyll b				435/659	(Moberg <i>et al.</i> , 2001)
Naphthalene			XOM—landfill leachate	220-230/340-370	(Baker and Curry, 2004)
			Fluorescent whitening agent	260/430 260/540 400/460	(Westerhoff <i>et al.</i> , 2001)

**Tableau III-4 : Nomenclature des fluorophores aquatiques [Hudson *et al.* (2007)]**

Les méthodes suivantes ont été empruntées au mode d'interprétation des spectres à simple balayage. Les indices ponctuels sont généralement des rapports entre une intensité de fluorescence maximum et la concentration en MOD [on peut citer comme exemple la fluorescence relative de Zsolnay *et al.* (1999) (Figure III-7)] ; soit entre deux intensités de fluorescence de deux couples excitation-émission donnés [on peut citer l'exemple de l'indice de fluorescence de Zsolnay *et al.* (1999), des rapports entre les maxima des massifs de fluorescence identifiés, comme  $\frac{\alpha'}{\alpha}$ ,  $\frac{\beta}{\alpha}$  et  $\frac{\gamma}{\alpha}$  de Parlanti *et al.* (2000), ou encore le BIX de Parlanti & Vacher (2005)].

Les indices surfaciques sont plus rares. Ce sont des rapports entre surfaces du spectre d'émission, bornées à différentes longueurs d'onde d'émission. Dans la littérature il existe le HIX de Zsolnay *et al.* (1999) qui est décrit comme le rapport de surfaces  $\frac{H}{L}$  du spectre d'émission à 254 nm de longueur d'onde d'excitation (Figure III-7), où H correspond à l'ensemble des molécules fluorescentes dont les longueurs d'onde d'émission se situent dans le quart supérieur de celles encadrant le massif de fluorescence global, et L, dans quart inférieur. L'avantage de ces types d'indice

par rapport aux précédents est que l'on prend en compte non plus une simple intensité de fluorescence, qui n'intègre pas la diversité des MOD, mais un ensemble (ou une famille) de molécules émettant une fluorescence à une longueur d'onde d'excitation donnée. Ainsi le HIX est le rapport entre une quantité de molécules qui possèdent une fluorescence aux grandes longueurs d'onde et une quantité de molécules qui possèdent une fluorescence aux petites longueurs d'onde.

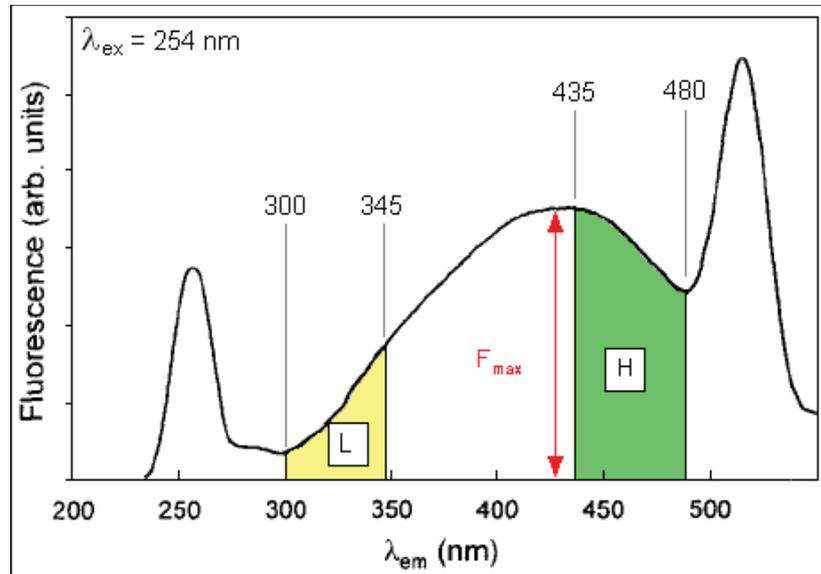


Figure III-7 : Localisation des surfaces et de l'intensité utilisées dans le calcul du HIX et de la fluorescence relative [Zsolnay *et al.* (1999)]

D'autres méthodes visent à décomposer les spectres d'émission en différentes composantes de type log-normal, après un ajustement algorithmique des paramètres des courbes composantes [Djikanović *et al.* (2007) ; Siano & Metzler (1969)].

Toujours dans l'idée d'améliorer la représentativité des indices de fluorescence calculés à partir des MEE, nous pouvons travailler sur des indices volumiques correspondant à des rapports de volumes des massifs identifiés. Actuellement, la littérature ne nous offre très peu d'exemples de ce type [Chen *et al.* (2003)]. Cependant, Bro (1997) a réussi à fournir un outil mathématique capable de décomposer les MEE en différents massifs types. Cet outil se nomme PARAFAC et a fait l'objet de récentes utilisations dans la caractérisation des MOD fluorescents des eaux naturelles : Stedmon & Markager (2005) ; Hall *et al.* (2005) ; Holbrook *et al.* (2006) ; Luciani *et al.* (2008).

### III.2.2 La Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) : principes et méthodes

#### III.2.2.1 **Théorie de la résonance de spin électronique : exemple de l'électron libre**

Nous nous attacherons ici à exposer de manière simpliste les principaux mécanismes mis en jeu dans la théorie de la RPE. Le phénomène de résonance paramagnétique électronique dépend de la présence pour une espèce donnée d'une couche électronique incomplète, et donc d'électrons non

appariés, le magnétisme de spin disparaissant quand les électrons sont arrangés par paire. Dans le cas simple d'un électron libre, le moment magnétique est  $\vec{\mu}_e = -g_e \beta \vec{S}$ , où  $g_e$  est le facteur spectrométrique de l'électron libre (sans le moment orbital) égale à 2.00232 ;  $\beta$  est le magnéton de Bohr égal à  $0.9274 \cdot 10^{-23} \text{ J.T}^{-1}$  ; et  $\vec{S}$  est le spin de l'électron. En effet, l'électron a un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par le nombre quantique de spin  $\vec{S}$  dont les valeurs propres  $\pm 1/2$  correspondent aux deux orientations que peut prendre le spin dans un champ magnétique : l'une parallèle, l'autre antiparallèle au champ.

Il en résulte deux populations d'électrons, ayant chacun un état quantique différent. Malgré cela, les deux groupes se retrouvent au même niveau d'énergie à l'état fondamental (on parle de dégénérescence) et ne peuvent être distingués. Si un champ magnétique statique  $\vec{B}$ , suffisamment élevé, est appliqué, on observe une levée de dégénérescence permettant la séparation des deux populations d'électrons en  $(2\|\vec{S}\| + 1)$  niveaux d'énergie : c'est l'effet Zeeman (Figure III-8), qui peut être décrit par l'Hamiltonien simplifié  $H = \vec{\mu}_e \cdot \vec{B} = g_e \beta \vec{S} \cdot \vec{B}$ . Dans l'exemple d'une population d'électrons libres et pour un champ statique  $\vec{B}_r$ , on obtient deux sorte de populations, de niveaux

d'énergie :  $E_1 = -\frac{1}{2} g_e \beta B_r$  et  $E_2 = \frac{1}{2} g_e \beta B_r$ , qui sont quantifiées par la distribution de Boltzmann :

$$\frac{N_{\text{sup}}}{N_{\text{inf}}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}}, \text{ où } N_{\text{sup}} \text{ et } N_{\text{inf}} \text{ sont les populations d'électrons respectivement de spin } \frac{1}{2} \text{ et } -\frac{1}{2} ; k \text{ la}$$

constante de Boltzmann ( $1.380658 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$ ) ; T la température en °K.

Si on applique un champ magnétique oscillant  $\vec{B}_t$  ( $\ll \vec{B}$ ) à une fréquence  $\nu_r$ , en plus et orthogonal à  $\vec{B}$  sur ce même électron libre, on peut provoquer des transitions électroniques entre les niveaux d'énergie Zeeman adjacents : c'est le phénomène de résonance et  $\nu_r$  est la fréquence de résonance donnée par :  $\hbar \nu_r = E_2 - E_1 = g_e \beta B_r$

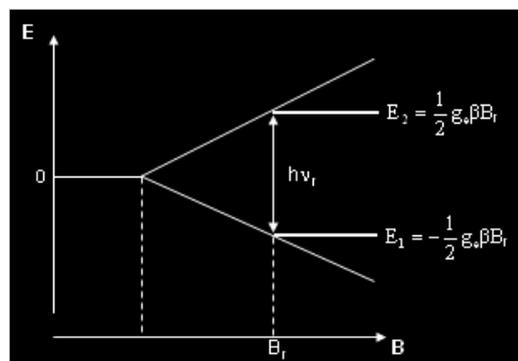


Figure III-8 : Diagramme énergétique de l'effet Zeeman pour un électron libre

Cependant, cette étude est encore insuffisante pour expliquer que l'on a une absorption de quanta d'énergie  $h\nu_r$ . En effet, dans notre cas d'une population de N électrons libres, si nous

considérons que, sous l'effet d'un champ magnétique statique, il existe uniquement deux niveaux d'énergie, par l'application d'un champ oscillant perpendiculaire au champ statique, les électrons vont passer du niveau inférieur au niveau supérieur et inversement, avec une probabilité égale (P). Ainsi, l'évolution par rapport au temps de la population du niveau inférieur ( $N_{inf}$ ) peut être décrite par l'équation :

$$\frac{dN_{inf}}{dt} = P(N_{sup} - N_{inf}) = -nP$$

n étant la différence de population entre le niveau inférieur et le niveau supérieur ( $N_{sup}$ ).

$$\text{Or on a aussi : } \begin{cases} n = N_{inf} - N_{sup} \\ N = N_{inf} + N_{sup} \end{cases} \Leftrightarrow N_{inf} = \frac{N+n}{2} \Leftrightarrow \frac{dN_{inf}}{dt} = \frac{1}{2} \frac{dn}{dt}$$

$$\text{On obtient alors : } \frac{dn}{dt} = -2nP \Leftrightarrow n(t) = n_0 e^{-2Pt}$$

L'absorption d'énergie dans un système correspond à une augmentation de l'énergie totale (E) de ce dernier :  $\frac{dE}{dt} > 0$ .

$$\text{Or : } E = N_{inf} E_{inf} + N_{sup} E_{sup} \Leftrightarrow \frac{dE}{dt} = E_{inf} \frac{dN_{inf}}{dt} + E_{sup} \frac{d(N - N_{inf})}{dt} \Leftrightarrow \frac{dE}{dt} = -\Delta E \frac{dN_{inf}}{dt} = nP \Delta E$$

Ainsi, pour que nous puissions observer une absorption, il faut que le peuplement du niveau inférieur soit plus important que celui du niveau supérieur (soit  $n > 0$ ), ce qui est le cas à l'instant  $t = 0$  (cf. distribution de Boltzmann). Mais après un temps suffisamment long, le peuplement du niveau inférieur devient égal au peuplement du niveau supérieur ( $n \rightarrow 0$  quand  $t \rightarrow \infty$ ). Par conséquent, nous ne pouvons plus observer d'absorption ( $\frac{dE}{dt} \rightarrow 0$  quand  $n \rightarrow 0$ ). Ce phénomène s'appelle la saturation.

Elle est rarement décelable pour des valeurs habituelles du champ magnétique haute fréquence à la température ambiante, ce qui montre qu'il existe d'autres phénomènes qui provoquent le passage des électrons du niveau supérieur au niveau inférieur. L'ensemble de ces phénomènes est connu sous le nom de relaxation paramagnétique, correspondant à une transition non radiative intrinsèque (relaxation spin-spin) ou due à des interactions avec l'environnement proche de l'électron (relaxation spin-réseau), auxquels on associe un temps de relaxation.

En supposant qu'il n'y ait pas de variation de structure du radical au cours du temps, la largeur  $\Delta B$  des raies d'absorption est alors une fonction des temps de relaxation et est donc caractéristique de l'espèce paramagnétique au même titre que la fréquence de résonance  $\nu_r$  (ou le champ de résonance  $B_r$ ) et l'amplitude du signal d'absorption à volume équivalent.

### III.2.2.2 Appareillage et calibration

Le spectromètre est conçu pour répondre à la condition de résonance :  $h\nu_r = g_e\beta B_r$ . En pratique, on travaille à fréquence fixe et on balaie en champ. Les différentes fréquences disponibles commercialement sont : L (1 GHz), S (3 GHz), X (10 GHz), Q (35 GHz), W (95 GHz) et H (280 GHz). Le spectromètre RPE utilisé au Laboratoire SPrAM du CEA de Grenoble est à bande X avec un électroaimant de 0 à 1.2 T typiquement pour une fréquence de 9-10 GHz (Figure III-9). La source haute fréquence (HF) est une diode Gunn, délivrant une onde à fréquence fixe, stabilisée par un contrôleur automatique de fréquence (AFC). La puissance de l'onde émise est faible (< 250 mW). Un atténuateur logarithmique permet de travailler jusqu'à de très faibles puissances de quelques  $\mu\text{W}$ , afin d'éviter les effets physiques de saturation. En effet, la probabilité de transition (P) entre les niveaux d'énergie étant proportionnelle à la puissance de l'onde électromagnétique, l'équilibre en nombre entre les populations est atteint plus rapidement (rappel :  $n(t) = n_0 e^{-2Pt} \rightarrow 0$  quand  $P \rightarrow \infty$ ).

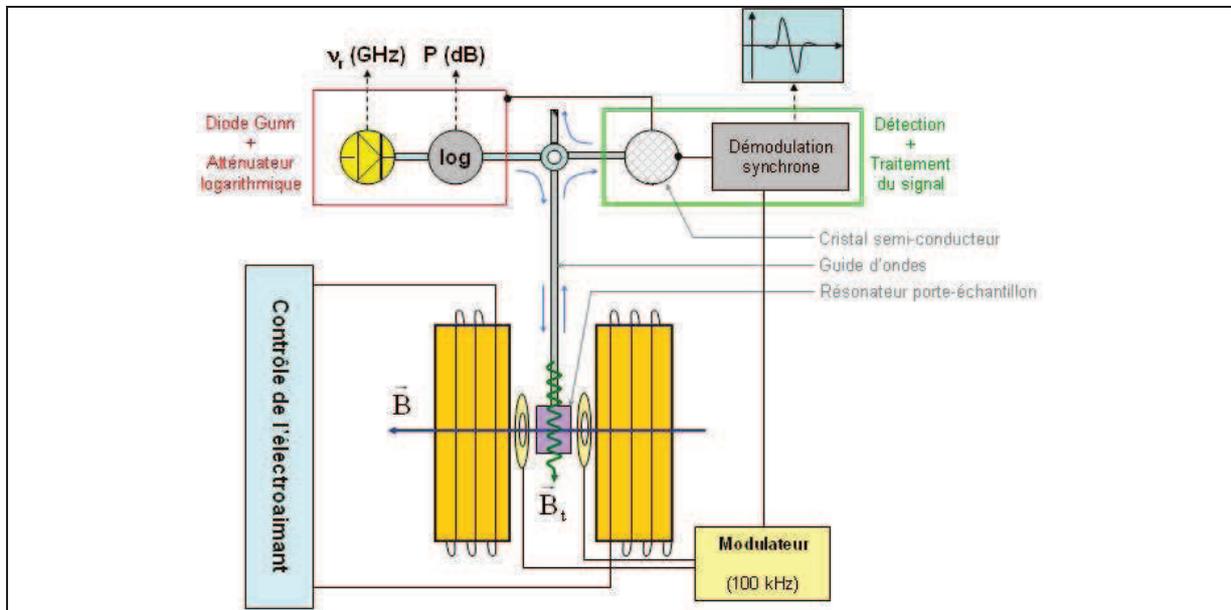


Figure III-9 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre RPE

L'utilisation d'ondes électromagnétiques de 3 cm de longueur d'onde impose l'utilisation de guides d'ondes (Figure III-10a) et de résonateurs (Figure III-10b).

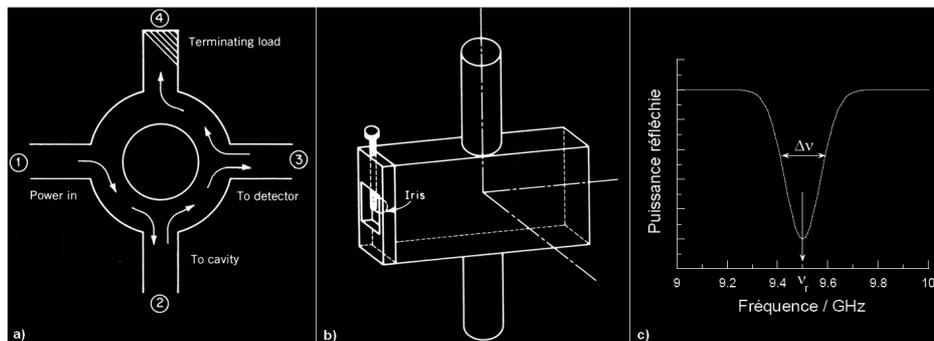


Figure III-10 : Guide d'ondes à quatre voies(a), résonateur porte-échantillon(b) et « dip » du résonateur(c) [Turek (2005)]

La puissance réfléchiée par le résonateur est minimale à la résonance : on observe alors le « dip » de la cavité comme dans la Figure III-10c. On va donc caler le système sur cette fréquence, afin d'accorder le résonateur. Ce dernier a un facteur qualité qui est donné par le rapport de la fréquence de résonance sur la largeur de résonance à mi-hauteur :  $Q = \frac{\nu_r}{\Delta\nu}$ . Ainsi, plus le facteur de qualité est élevé, plus le résonateur est sensible (mais aussi plus difficile à accorder...). Dans notre cas, il s'agit d'un résonateur rectangulaire double ER 410DR de ®Bruker BioSpin, ayant un facteur qualité de 100 à 300.

Le porte-échantillon est un tube cylindrique en quartz ultra pur (pas d'impuretés paramagnétiques et peu de pertes diélectriques) de 3 mm de diamètre. Afin de s'affranchir des variations du signal dues au volume de l'échantillon, nous avons rempli le tube, pour chaque analyse, de façon à ce que la cavité de mesure du résonateur soit pleine.

En pratique, on amène donc une onde incidente sur le résonateur (à une fréquence proche de 9.8 GHz) et on récupère l'onde réfléchiée, dont l'intensité est très faible (nulle si la cavité est parfaitement accordée), qui est envoyée sur un détecteur (cristal semi-conducteur). On mesure donc la modification de l'accord de la cavité induit par l'absorption d'énergie de l'échantillon à sa fréquence de résonance. Comme le signal de manière générale est faible, on applique une modulation sur le champ magnétique principal et on extrait du détecteur le signal par démodulation à la même fréquence (généralement 100 kHz) de façon synchrone (Figure III-11). Ce filtrage est réalisé pour ces raisons de sensibilité que l'on ne détecte pas l'absorption mais sa dérivée.

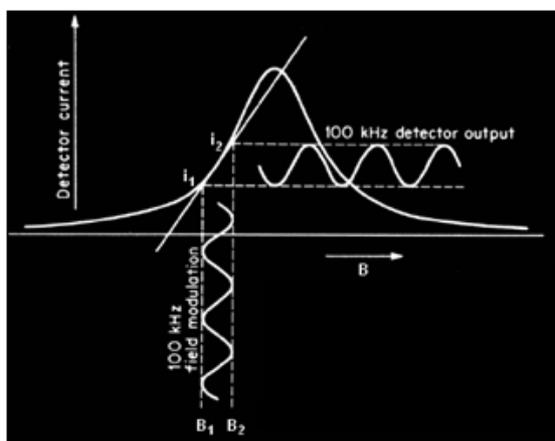


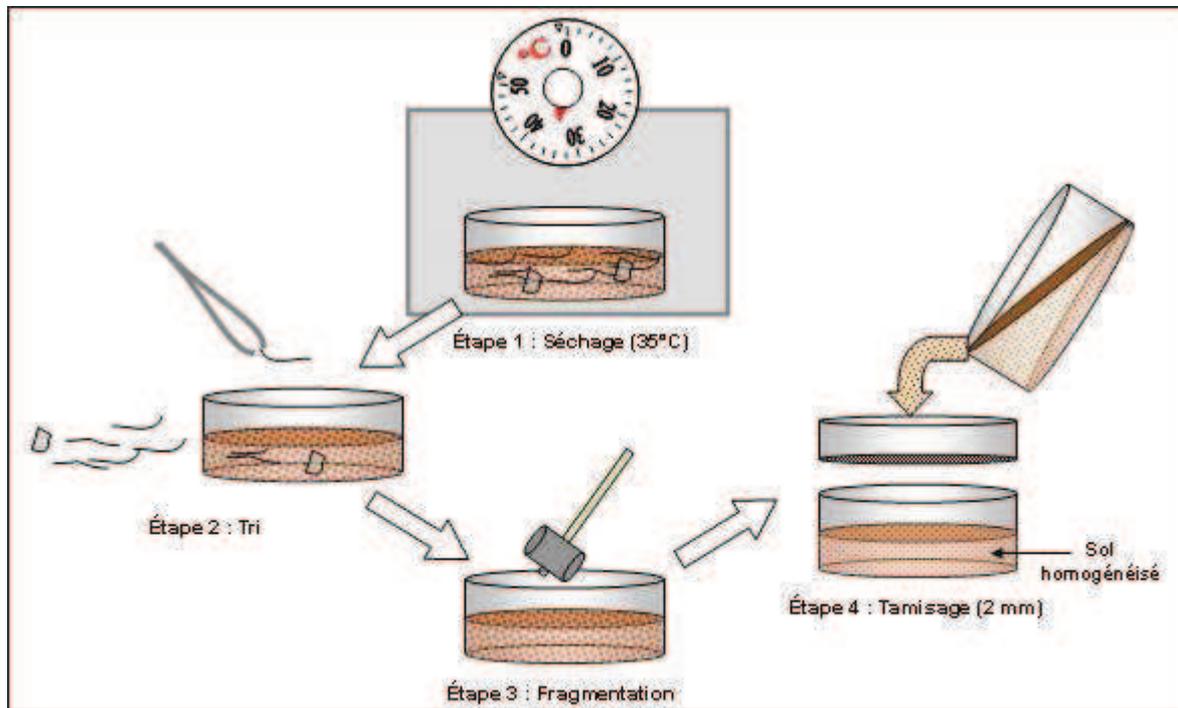
Figure III-11 : Effet de la modulation du champ statique sur le signal d'absorption [d'après Turek (2005)]

### III.2.2.3 Méthodes analytiques des spectres RPE

#### III.2.2.3.1 Conditionnement des échantillons

Toutes les analyses en RPE ont été réalisées sur des échantillons solides. Les prélèvements de sol ont subi une homogénéisation, afin d'éviter que les fragments grossiers entraînent d'importants vides d'air dans le porte-échantillon, qui peuvent altérer le signal RPE. Pour cela, les sols échantillonnés ont été tout d'abord séchés en étuve à une température inférieure à 35 °C, pendant 12h.

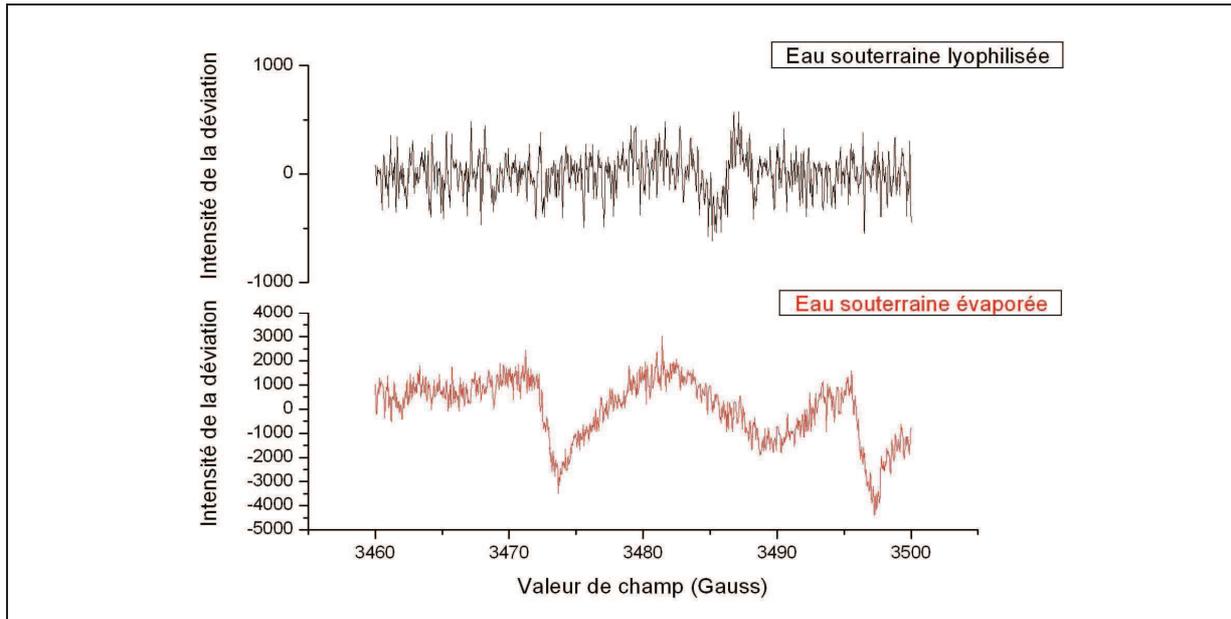
Puis, nous avons réalisé un tri pour supprimer les fragments grossiers (restes de végétaux et minéraux grossiers). Ensuite, nous avons procédé à une fragmentation douce à l'aide d'un maillet et un tamisage à 2 mm (Figure III-12).



**Figure III-12 : Protocole de préparation des échantillons de sol en vue d'une analyse en RPE**

Les échantillons d'eau souterraine quant à eux doivent être ramenés à un résidu solide afin de pouvoir les analyser en RPE. En effet, les concentrations extrêmement faibles ne nous permettent pas de réaliser des mesures RPE en solution à cause des perturbations diélectriques dues aux molécules d'eau, qui risquent de bruyier le signal. Le résidu solide peut être obtenu de différentes manières, notamment la lyophilisation et l'évaporation totale à température ambiante, afin d'altérer le moins possible les radicaux organiques. Nous avons donc réalisé des tests afin de choisir la meilleure technique altérant le moins les signaux RPE.

D'après les signaux obtenus en analyse RPE (Figure III-13), il s'avère que le résidu de l'évaporation à température ambiante nous donne un signal distinct comparativement au lyophilisat, pour lequel le signal RPE n'est pas interprétable. Spencer *et al.* (2007) ont déjà montré que la congélation/décongélation des échantillons de MOD entraîne une modification du signal de fluorescence, causée par un changement de la structure des fluorophores. Cette extinction du signal RPE pourrait donc être expliquée par une modification de la structure des espèces paramagnétiques. Nous avons donc choisi de travailler sur les résidus d'évaporation à 35 °C, obtenus à partir de 10 L d'eau souterraine, cette technique de concentration semblant être la moins agressive vis-à-vis de la structure des espèces paramagnétiques. Ce protocole d'évaporation à température ambiante a été testé sur d'autres échantillons d'eau souterraine et a donné des résultats tout à fait cohérents [Pépin-Donat *et al.* (2010)].

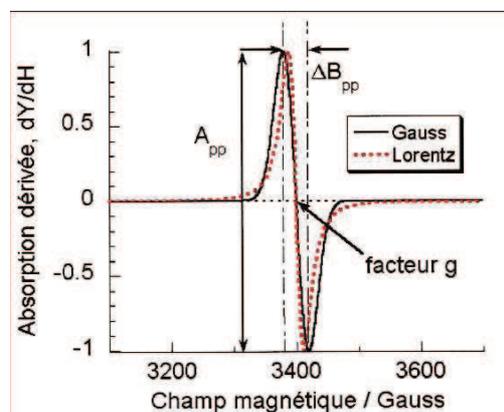


**Figure III-13 : Comparaison des signaux RPE d'un lyophilisat et d'un résidu d'évaporation d'une eau souterraine observés à une atténuation de 10 dB, un gain de  $10^5$  et un module de 0.8**

### III.2.2.3.2 Signification et interprétation des spectres RPE

Du fait de l'utilisation d'une modulation à acquisition du signal, le spectre RPE obtenu est la dérivée de l'absorption résonante. A partir des équations de Bloch, on peut montrer que la représentation graphique de cette puissance absorbée peut être décrit par une courbe soit lorentzienne, en général pour des échantillons solides, soit gaussienne. Compte tenu de la signification physique du signal d'absorption, chaque espèce paramagnétique sera caractérisée par les paramètres suivants (Figure III-14) :

- ◇ l'amplitude pic-à-pic ( $A_{pp}$ ), qui nous renseigne sur une quantité relative de l'espèce paramagnétique
- ◇ la largeur de raie pic-à-pic ( $\Delta B_{pp}$ ), nous renseignant sur la nature de l'espèce paramagnétique
- ◇ la position en champ de la résonance (nous permettant de déterminer le facteur  $g$ ), qui nous renseignent aussi sur la nature de l'espèce paramagnétique.



**Figure III-14 : Forme des courbes obtenues et paramètres mesurés [Turek (2005)]**

Cependant, dans notre cas, il est possible que le signal obtenu soit plus complexe à cause de la présence de plusieurs espèces paramagnétiques. Ainsi, il nous faut extraire du spectre brut, l'ensemble des raies qui le composent par déconvolution. Pour cela, nous avons simulé les spectres expérimentaux, afin d'obtenir les caractéristiques de chaque raie, qui compose le signal RPE obtenu. La Figure III-15 montre l'allure d'un spectre RPE d'un échantillon et sa décomposition en deux raies de  $\Delta B_{pp}$  différentes, telles que (A) = (B) + (C). Enfin, la littérature nous apprend que le radicaux de type semi-quinone présents dans les matières organiques naturelles sont caractérisés par un facteur g compris entre 2.0028 et 2.0055, ainsi qu'une largeur de raie pic à pic inférieure à 7 G [Pépin-Donat *et al.* (2010)].

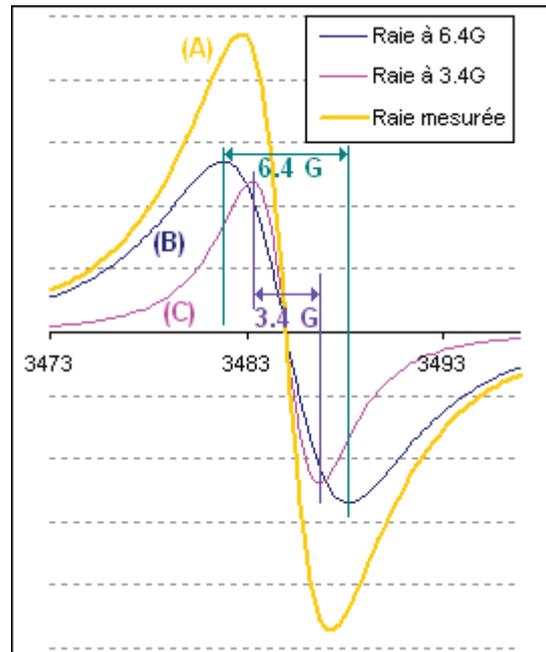


Figure III-15 : Exemple d'une décomposition de spectre RPE

### III.3 Caractérisation du potentiel traceur « MOD »

Nous allons donc appliquer ces différentes méthodes de caractérisation de la MOD à notre site d'étude, en gardant toujours en tête l'objectif de ce travail, à savoir le développement de méthodes de traçage hydrogéologique à partir des substances organiques dissoutes. Nous avons vu dans la partie II.1.2.2, que la seule origine possible des MOD présents dans les écoulements souterrains est le sol pour notre site d'étude. La connaissance du signal d'entrée de notre traceur est importante. C'est pourquoi, nous avons essayé de caractériser, tout d'abord, des molécules ou des familles de molécules présentes dans le sol. Puis, nous avons appliqué les mêmes techniques aux échantillons d'eau souterraine.

#### III.3.1 Traitement et premières interprétations de la spectrofluorimétrie

##### III.3.1.1 Variations saisonnières de la nature des MOD du sol : mesures de terrain

Grâce au fluorimètre de terrain GGUN-FL30 (cf. II.2.3), nous pouvons mesurer en continu une plage de fluorescence centrée sur le couple d'excitation-émission 350 nm - 427 nm, pour les écoulements B et D. D'après la nomenclature de Parlanti *et al.* (2000), ce couple se situe au niveau du massif «  $\alpha$  » (cf. III.2.1.3.4). Nous avons donc suivi cette intensité de fluorescence, ou plus précisément le rapport entre ce dernier et la concentration en COD (afin de s'affranchir des variations de concentration), pour les lixiviats de sol.

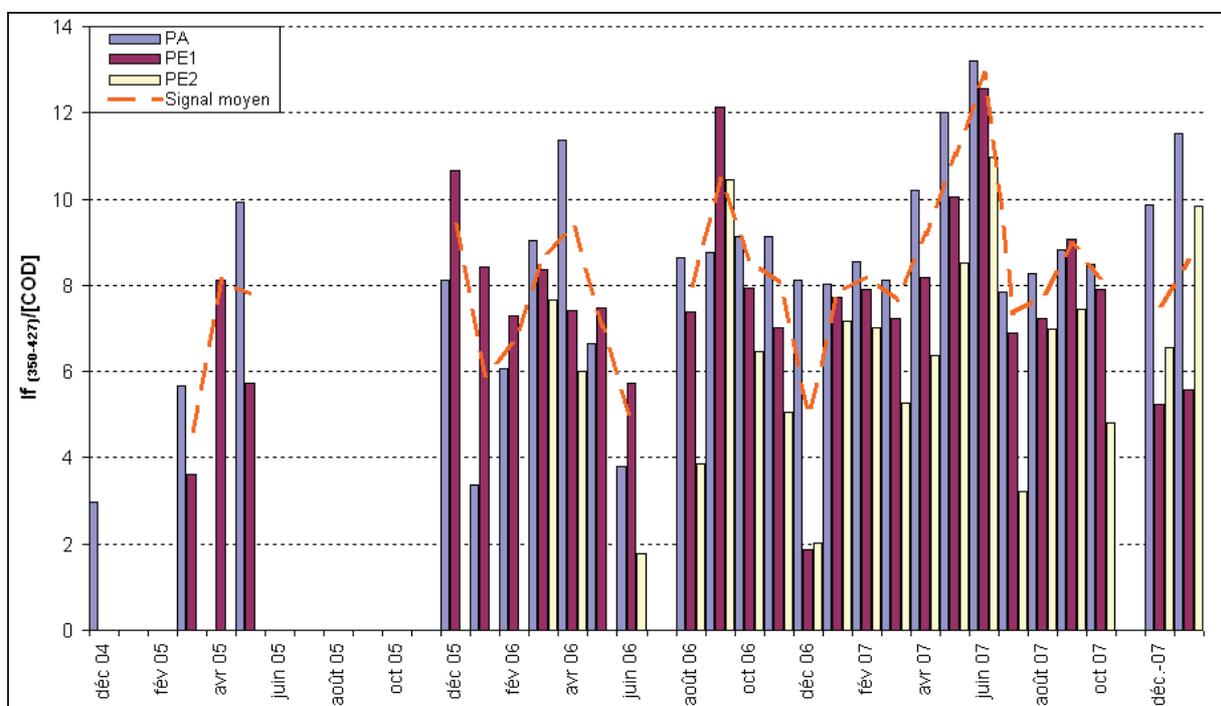


Figure III-16 : Variation de l'indice de fluorescence  $I_{f(350-427)}/COD$  des lixiviats de sol

La Figure III-16 montre une variation intra-annuelle du rapport  $\frac{If_{(350-427)}}{COD}$ . En effet, nous pouvons remarquer des périodes de fortes fluorescences entre les mois de mars et mai, et les mois août et octobre. Il s'avère donc que le suivi de cet indice de fluorescence permet d'approcher la variation de la nature des MOD du sol au cours de l'année, qu'avaient décrite Guggenberger & Zech (1993) et Hongve (1999), et que les molécules fluorescentes responsables de cette variation sont bien entraînées par les eaux d'infiltration dans le système. Ainsi, le signal d'entrée de ces molécules devra être pondéré par les pluies efficaces.

### III.3.1.2 Caractérisation des massifs de fluorescence des MEE

Malgré des résultats encourageants, le précédent indice ne représente pas l'ensemble des fluorophores pouvant être entraînés dans l'hydrosystème par les eaux d'infiltration. Les MEE vont nous aider à répondre à cette question, en nous donnant les grandes familles de fluorophores présents à la fois dans les sols et dans les eaux souterraines.

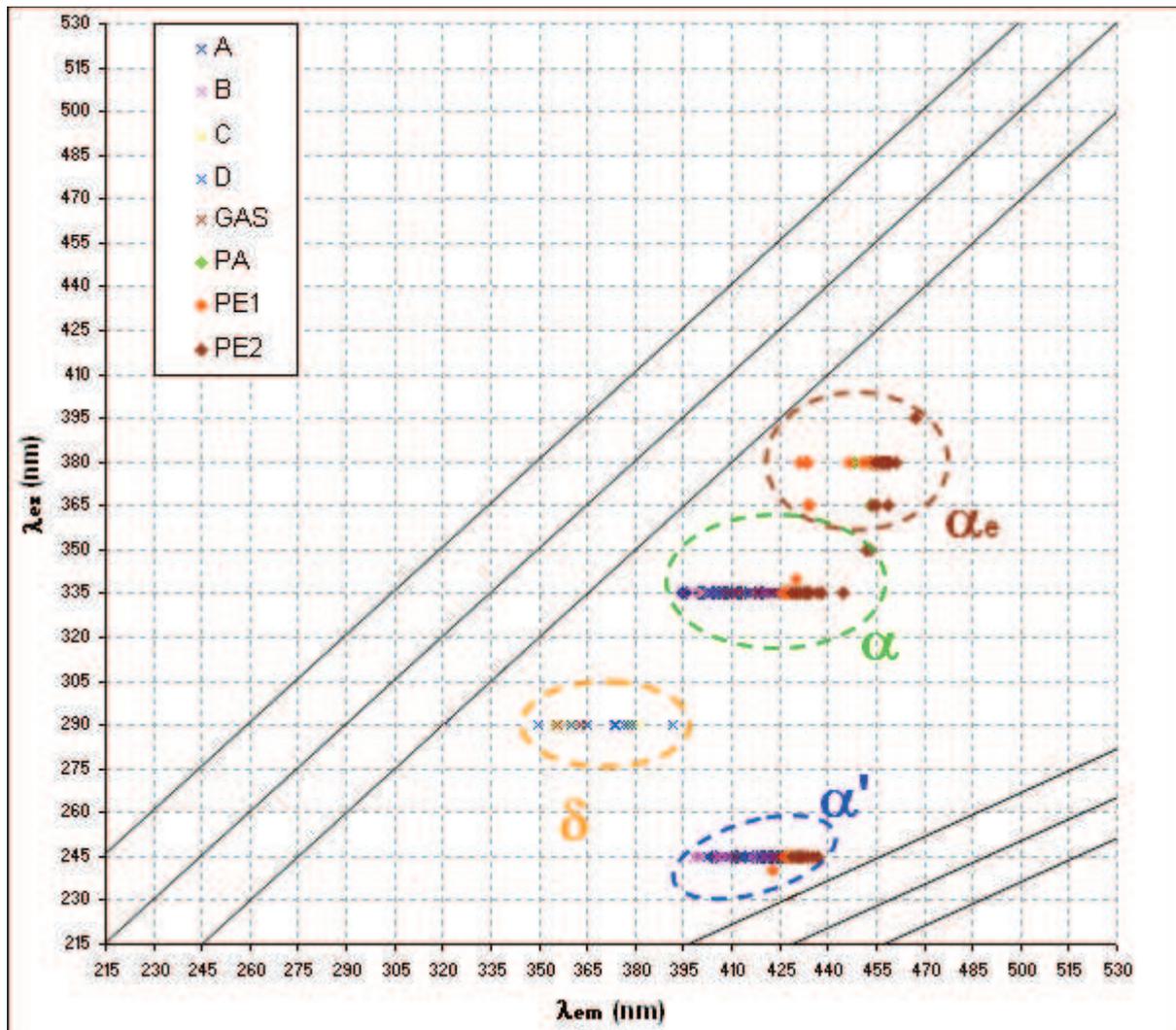


Figure III-17 : Position des maxima de fluorescence des différents massifs rencontrés dans les MEE des sols et des eaux souterraines (n = 215)

Les MEE des sols et des eaux souterraines (Figure III-17) nous permettent de caractériser quatre grandes familles de fluorophores. Certains sont présents aussi bien dans les eaux souterraines et le sol : les massifs  $\alpha$  et  $\alpha'$  sont représentatifs de molécules de type fulvico-humique. Contrairement à eux, le massif  $\delta$ , correspondant à des molécules de type protéinique, n'est visible que dans les échantillons d'eaux souterraines. Ceci peut être expliqué par le fait que le massif  $\alpha$ , parfois très imposant pour les lixiviats, peut masquer la possible présence du massif  $\delta$ . D'autre part, ce dernier n'est visible que pour les échantillons du LSBB, possédant les plus courts temps de séjour moyens (GAS, C et D). Ceci tend à nous montrer que les molécules protéiniques, représentées par ce massif  $\delta$ , ont une durée de vie très courte dans le système. Le massif  $\alpha_e$ , le seul n'entrant pas dans la nomenclature de Parlanti *et al.* (2000), n'est présent que dans les lixiviats de sol et se présente toujours sous la forme d'un épaulement du massif  $\alpha$ . Miano *et al.* (1988) et Senesi *et al.* (1991) ont montré que plus le degré de polymérisation d'une molécule organique fluorescente est grand, plus ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont grandes. Ainsi, l'épaulement  $\alpha_e$  peut être assimilé à une MOD à très haut poids moléculaire. Les grosses molécules étant les premières à s'adsorber, il est logique de ne plus les retrouver dans les eaux souterraines. Le Tableau III-5 résume les plages de longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents massifs de fluorescence, ainsi que leur couple ( $\lambda_{ex}$ - $\lambda_{em}$ ) moyen, pour nos échantillons. Dans le cadre de notre problématique, il apparaît clairement que seuls les massifs  $\alpha$  et  $\alpha'$  ont un intérêt pour le traçage hydrogéologique, puisque ce sont les seuls que l'on peut suivre à la fois dans les sols et les écoulements souterrains.

	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Couples ( $\lambda_{ex}$ - $\lambda_{em}$ ) moyens	Caractérisation
$\alpha_e$	365-410	425-470	(380-455)	MOD fulvico-humique à haut poids moléculaire
$\alpha$	320-365	390-460	(335-416)	MOD fulvico-humique
$\alpha'$	230-260	390-445	(245-423)	
$\delta$	275-305	345-400	(290-345)	MOD protéinique

Tableau III-5 : Plage des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des maxima des massifs de fluorescence

### III.3.1.3 Variations des spectres de fluorescence 3D

Nous allons maintenant étudier de façon qualitative les variations de l'allure des MEE, suivant la position et les propriétés de l'écoulement dans le système karstique. Dans l'ordre des temps de séjour moyens croissants, nous avons deux écoulements transmissifs (GAS, de type drain et C, plus diffus), un écoulement « épikarstique » (D) et deux écoulements capacitifs (A et B) (cf. II.3.2).

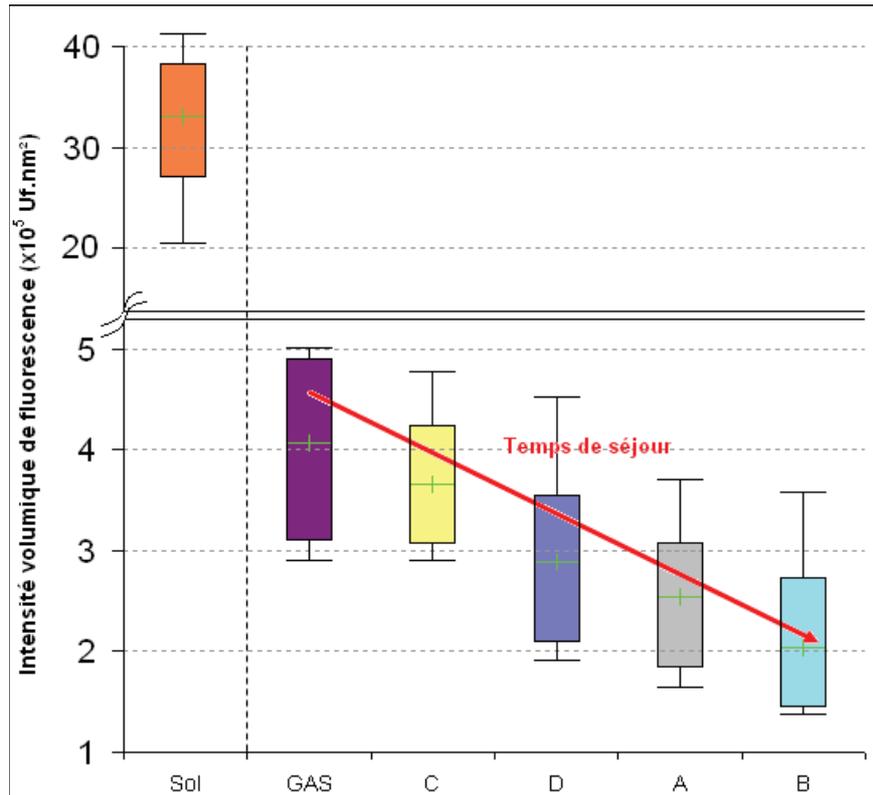


Figure III-18 : Variation de l'intensité volumique de fluorescence moyenne selon le temps de séjour relatif

La Figure III-18 nous montre l'évolution du volume, délimité par la surface des MEE correspondant à la zone de fluorescence des MOD, décrite dans la Figure III-6, et le plan origine ( $\lambda_{ex}$  ;  $\lambda_{em}$ ). Nous appellerons ce volume, intensité volumique de fluorescence ( $I_v f$ ) des MOD :

$$I_v f = \iint_{(\lambda_{ex}; \lambda_{em})} I f d\lambda_{ex} d\lambda_{em}$$

Nous pouvons remarquer que plus le temps de séjour de l'écoulement augmente, plus  $I_v f$  est faible. D'autre part, la valeur de l'intensité volumique de fluorescence des sols est très nettement supérieure à celle des eaux souterraines. Cette diminution de fluorescence globale est à mettre en parallèle avec la diminution de la concentration des MOD dans un hydrosystème (cf. I.3.1.2).

Les Figure III-19a et Figure III-19b montrent le déplacement progressif du maximum de fluorescence des massifs  $\alpha$  et  $\alpha'$ , présents à la fois dans les sols et les eaux souterraines. Nous pouvons remarquer que, pour une longueur d'onde d'excitation donnée, la longueur d'onde d'émission correspondant au maximum de fluorescence a tendance à diminuer lorsque le temps de séjour relatif augmente. D'après les conclusions de Miano *et al.* (1988) et de Senesi *et al.* (1991), ceci peut être dû à une diminution de la taille des molécules organiques fluorescentes au cours du temps dans un système hydrogéologique.

En conclusion, les MEE peuvent rendre compte à la fois de l'évolution de la concentration des MOD et de leur dépolymérisation au cours du temps dans un hydrosystème karstique. De ce fait, le déplacement des maxima de fluorescence peut être considéré comme un traceur qualitatif des temps de

séjour, qui plus est plus sensible que le carbone organique total (COT). En effet, Garry *et al.* (2008) avait réussi à différencier les écoulements observés au LSBB selon leur temps de séjour moyen grâce au COT. Cependant, contrairement à ce nouveau marqueur, ce dernier ne permettait pas séparer C de D, et A de B.

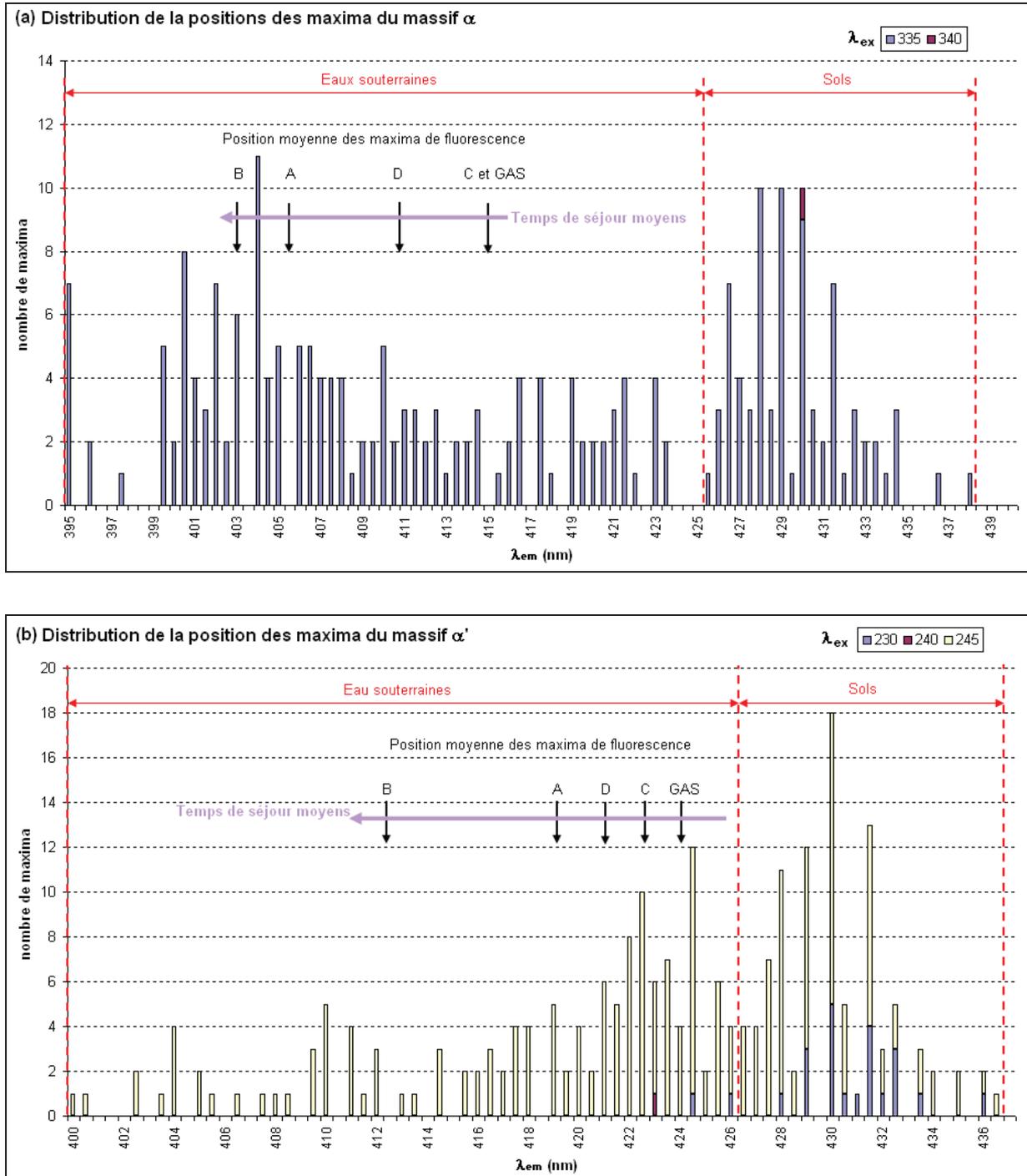


Figure III-19 : Position des maxima de fluorescence des massifs  $\alpha$  et  $\alpha'$  selon le temps de séjour relatif

### III.3.2 *Examen qualitatifs des spectres RPE*

Nous avons pu remarquer que les MEE ne nous permettent pas de différencier nos différents types de sol les uns par rapport aux autres. C'est pourquoi, l'utilisation d'une technique de caractérisation plus sensible comme la RPE peut s'avérer fructueuse.

#### III.3.2.1 **Une méthode de différenciation fine des types de sol**

La Figure III-20 nous montre les spectres RPE des sols SA, correspondant au sol de la plaque lysimétrique PA, SE1, correspondant au sol de la plaque lysimétrique PE1, et SE2, correspondant au sol de la plaque lysimétrique PE2, prélevés le même jour. On remarque tout d'abord que l'allure générale des courbes de SA et SE1 sont relativement semblables comparativement à celle de SE2. Il apparaît donc que, contrairement aux MEE, la RPE permet bien de différencier le lithosol et la rendzine présents sur le site du LSBB.

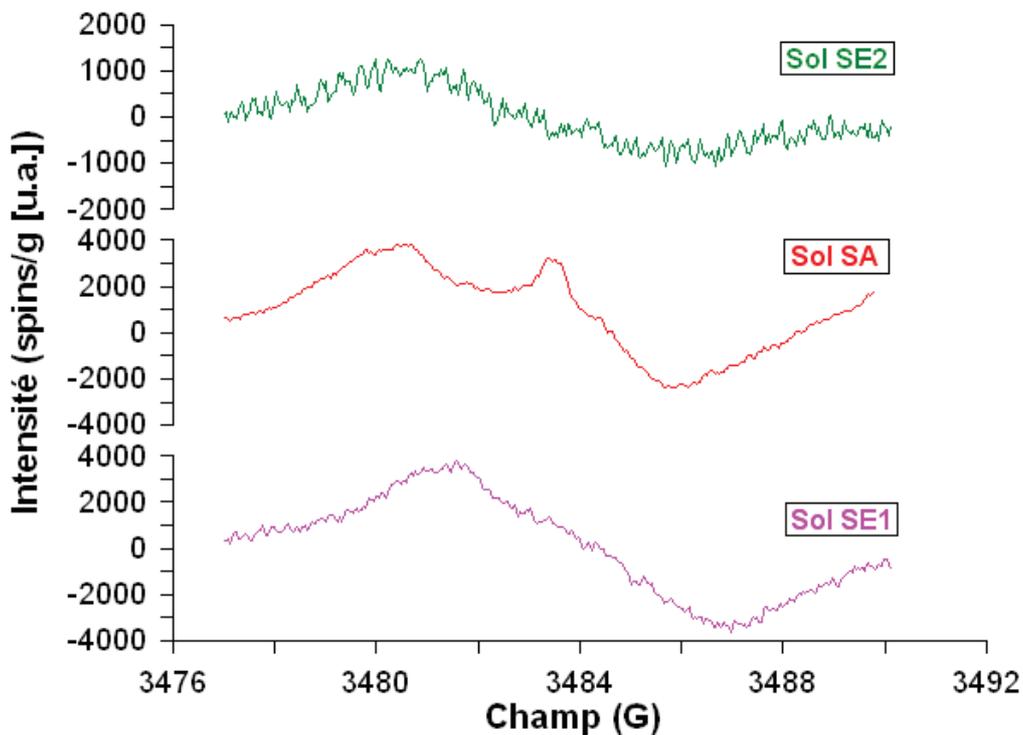


Figure III-20 : Comparaison des spectres RPE entre les trois types de sol rencontrés

La décomposition des spectres RPE (Tableau III-6) montre l'existence de deux espèces paramagnétiques différentes : une raie à 6.2 G et une autre à 5.2 G. Cependant, on peut remarquer que le sol SE2 ne contient qu'une seule espèce paramagnétique. Ainsi, la rendzine et le lithosol se différencient par la présence de la raie à 6.2 G. D'autre part, on peut remarquer que les deux lithosols se différencient par teneur relative en espèces paramagnétiques  $\pi$  et  $\omega$ .

	Raie	Facteur g	$\Delta B_{pp}$ (G)	Champ central (G)	Intensité (u.a.)	Intensité relative (%)
SA	$\omega$	2.0040	6.2	3485	300000	39
	$\pi$	2.0046	5.2	3484	470000	61
SE1	$\omega$	2.0040	6.2	3485	400000	22
	$\pi$	2.0046	5.2	3484	1410000	88
SE2	$\pi$	2.0046	5.3	3483	282000	100

 Tableau III-6 : Décomposition des spectres RPE des sols [d'après Pépin-Donat *et al.* (2010)]

Les deux grands types de sol ayant une signature RPE bien différente, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle cette technique de caractérisation fine pourra nous indiquer si l'une des deux zones de sol fait partie ou non du bassin d'alimentation. Nous verrons dans le Chapitre IV : l'intérêt de l'espèce paramagnétique  $\omega$  pour le traçage spatial et temporel.

### III.3.2.2 Variations temporelles du signal RPE des sols

Maintenant, il est intéressant de savoir si la RPE peut aussi décrire une évolution temporelle de la MOD des sols.

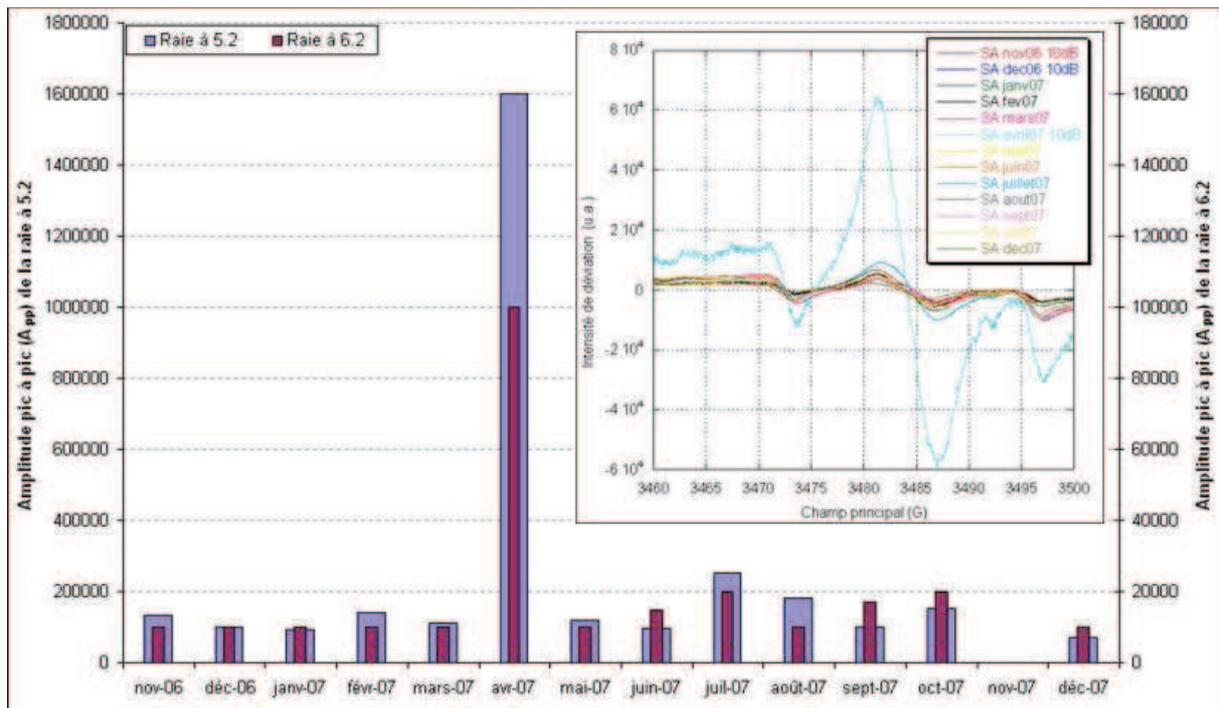


Figure III-21 : Evolution mensuelle du spectre RPE d'un sol (SA)

La Figure III-21 nous montre l'évolution de l'amplitude pic à pic ( $A_{pp}$ ) des deux raies présentes dans le sol SA au cours du temps. Nous pouvons remarquer cette grandeur quantitative (elle représente la quantité de l'espèce paramagnétique) varie au cours de l'année. Il s'avère donc qu'une période donnée peut être marquée par une quantité plus grande d'une espèce paramagnétique (ici l'échantillon

du mois d'avril à un  $A_{pp}$  beaucoup plus grand que pour les autres mois de l'année). Ceci démontre encore une fois le fort potentiel de la RPE pour le traçage hydrogéologique.