


Année de programmation 2021 – Domaine Innovation - Action n°1



Etude de l'amélioration de la qualité des produits fluorescents injectés dans les milieux aquatiques lors des opérations de traçage

Rapport à 2 ANS

**Christian DÉFARGE, Nevila JOZJA, Audrey DUFOUR
(Université d'Orléans, Cellule R&D CETRAHE),
Christine DEVOUGE-BOYER, Marie HUBERT-ROUX
(Laboratoire COBRA, UMR 6014, Normandie
Université), Olivier PAILLET (Société PAVIQUA),
Séverine REVIRON (Société COLOREY)**

Décembre 2023

- **AUTEURS**

Christian DÉFARGE, maître de conférences hors-classe exceptionnelle, directeur (Université d'Orléans, Cellule R&D CETRAHE), chercheur (Institut des Sciences de la Terre d'Orléans, Unité Mixte de Recherche 7327, Université d'Orléans/CNRS-INSU/BRGM), christian.defarge@univ-orleans.fr

Nevila JOZJA, ingénieure de recherche, directrice adjointe (Université d'Orléans, Cellule R&D CETRAHE), nevila.jozja@univ-orleans.fr

Audrey DUFOUR, ingénieure d'études (Université d'Orléans, Cellule R&D CETRAHE), audrey.dufour@univ-orleans.fr

Christine DEVOUGE-BOYER, assistante ingénieure (INSA Rouen, Normandie Université, laboratoire COBRA, UMR 6014), christine.devouge-boyer@insa-rouen.fr

Marie HUBERT-ROUX, ingénieure de recherche (Université de Rouen, Normandie Université, laboratoire COBRA, UMR 6014), marie.hubert@univ-rouen.fr

Olivier PAILLET, président-directeur général (société PAVIQUA, 84300 Taillades), olivier.paillet@fluotechnik.com

Séverine REVIRON, responsable laboratoire (société COLOREY, 69380 Lozanne), severine@artecolor.fr

- **CORRESPONDANTE**

OFB : Estérelle VILLEMAGNE, chargée de mission Innovations issues de la R&D et transfert, esterelle.villemagne@ofb.gouv.fr

- **AUTRES CONTRIBUTEURS**

Sarah LEPRINCE, technicienne (INSA Rouen, Normandie Université, laboratoire COBRA, UMR 6014), sarah.leprince@univ-rouen.fr

Léane YON, technicienne (INSA Rouen, Normandie Université, laboratoire COBRA, UMR 6014), leane.yon@insa-rouen.fr

Laura BOM, assistante ingénieure (INSA Rouen, Normandie Université, laboratoire COBRA, UMR 6014), laura.bom@univ-rouen.fr

Droits d'usage : accès réservé à l'OFB jusqu'à publication du rapport final ; libre ensuite

Niveau géographique : mondial

Couverture géographique : Europe

Niveau de lecture : experts, professionnels, étudiants, associations, citoyens

- **SOMMAIRE**

1. Introduction	5
2. Matériels et méthodes.....	11
2.1. Produits sélectionnés par Art E'Color et Fluotechnik.....	11
2.2. Analyses des produits traceurs réalisées à CETRAHE.....	14
2.2.1. Analyse qualitative.....	15
2.2.2. Caractérisation spectrale.....	15
2.2.3. Intensité de fluorescence.....	16
2.2.4. Comportement des traceurs en solution.....	16
2.2.4.1. Stabilité et dégradabilité de l'acide amino G.....	16
2.2.4.2. Stabilité des autres traceurs.....	16
2.2.4.3. Comportement comparé dans une eau naturelle et dans l'eau ultrapure.....	17
2.3. Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA.....	17
2.3.1. Teneur en eau.....	17
2.3.2. Développement de méthodes HPLC/DAD.....	17
2.3.3. Détermination de la teneur en matière sèche.....	19
2.3.4. Analyses complémentaires des sulforhodamines B et G.....	20
2.4. Analyses des produits anti-mousse.....	20
3. Résultats	21
3.1. Caractérisations des produits traceurs réalisées à CETRAHE.....	21
3.1.1. Analyses qualitatives, CE et pH.....	21
3.1.2. Caractérisation spectrale.....	24
3.1.3. Intensité de fluorescence.....	24
3.1.3.1. Uranine.....	24
3.1.3.2. Eosine.....	25
3.1.3.3. Sulforhodamine B.....	26
3.1.3.4. Sulforhodamine G.....	27
3.1.3.5. Naphtionate de sodium.....	28
3.1.3.6. Acide amino G.....	29
3.1.4. Stabilité dans le temps et dégradabilité.....	30
3.1.4.1. Uranine.....	31
3.1.4.2. Eosine.....	33
3.1.4.3. Sulforhodamine B.....	33
3.1.4.4. Sulforhodamine G.....	36
3.1.4.5. Naphtionate de sodium.....	37
3.1.4.6. Acide amino G.....	39
3.2. Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA.....	43
3.2.1. Pureté et teneur en eau.....	43
3.2.1.1. Etalons de référence.....	43
3.2.1.2. Pureté déterminée par HPLC et teneur en eau.....	43
3.2.1.3. Identification des impuretés des sulforhodamines B et G.....	45
3.2.2. Bilan des analyses de composition des produits.....	47
3.3. Relation entre intensité de fluorescence et pureté des produits.....	51
3.3.1. Uranine.....	51
3.3.2. Eosine.....	52
3.3.3. Sulforhodamine B.....	53
3.3.4. Sulforhodamine G.....	54
3.3.5. Naphtionate de sodium.....	55
3.3.5. Acide amino G.....	56
3.4. Analyses des produits anti-mousse.....	58
3.4.1. Analyse de fluorescence.....	58
3.4.2. Formation de mousse dans les uranines et éosines en solution.....	58

4. Conclusions et perspectives	59
4.1. Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux	61
4.2. Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits	68
4.3. Perspectives.....	70
4.3.1. Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux...	70
4.3.2. Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits	70
4.3.3. Action n°3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage	71
5. Glossaire	73
6. Sigles & Abréviations.....	74
7. Bibliographie.....	75
8. Table des illustrations.....	77
9. Annexe 1 : Procédure d'analyse HPLC de l'uranine et de l'éosine	79
10. Annexe 2 : Procédure d'analyse HPLC des sulforhodamines B et G	81
11. Annexe 3 : Procédure d'analyse HPLC du naphthionate de sodium et de l'acide amino G	83
12. Annexe 4 : Identification des impuretés des sulforhodamines B et G par LC/MS– Appareillages et conditions opératoires	85
13. Annexe 5 : Chromatogrammes UV et spectres de masse des sulforhodamines B et G (SB et SG)	86
14. Annexe 6 : Résultats de la caractérisation spectrale des produits traceurs et des MO dissoutes fluorescentes présentes dans l'eau naturelle utilisée	89
15. Annexe 7 : Stabilité des traceurs en solution dans les premières heures à semaines suivant leur préparation	90
16. Annexe 8 : Cartographie sommaire des acteurs du traçage hydrogéologique artificiel à l'aide de produits fluorescents en France (hors traçages réalisés dans le cadre de projets académiques)	94
17. Remerciements.....	95

1. Introduction

Le traçage hydrogéologique artificiel (voir Glossaire ; partie 5 du rapport) est une méthode d'investigation et de contrôle fondamentale pour la gestion et la préservation de la ressource en eau et la protection de l'environnement (Leibundgut *et al.* 2009, Dörfliger *et al.* 2010, Benischke 2021, Pascoletti & Chapuis 2022). À ses utilisations traditionnelles pour la caractérisation des systèmes hydrogéologiques naturels, l'estimation de leurs ressources en eau, la délimitation des aires d'alimentation et des périmètres de protection des ouvrages d'alimentation en eau potable (AEP), s'ajoutent maintenant d'autres préconisations et applications, comme par exemple pour les études préalables à la réalisation des Zones de Rejet Végétalisées (EPNAC 2013), la simulation des opérations de dépollution des sols par injection chimique *in situ* (Waduge *et al.* 2013), ou des fuites potentielles liées aux stockages gazeux profonds (Lafortune *et al.* 2020).

Les produits fluorescents (voir Glossaire) sont les traceurs artificiels les plus utilisés en hydrogéologie (Leibundgut *et al.* 2009). Ce sont des molécules organiques, généralement aromatiques, qui possèdent la propriété d'émettre, une fois excitées par la lumière à une certaine longueur d'onde (d'excitation λ_{Ex}), et tant qu'elles sont excitées, de la lumière à une longueur d'onde (d'émission λ_{Em}) plus élevée (Lakowicz 2006). Le couple λ_{Ex} - λ_{Em} (ou plusieurs couples, pour certaines d'entre elles) est (sont) caractéristique(s) des molécules fluorescentes (appelées fluorophores), et permettent de les détecter et de les quantifier dans les échantillons d'eaux grâce à des spectrofluorimètres, appareils réalisant des spectres de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation et/ou d'émission.

Les traceurs fluorescents sont généralement classés en trois groupes (Käss 1998) :

- ▶ les traceurs xanthéniques, qui incluent notamment ceux dérivant de la fluorescéine comme l'uranine (fluorescéine sodique, CAS 518-47-8) ou l'éosine (CAS 17372-87-1), et les rhodamines comme la sulforhodamine B (CAS 3520-42-1) ou l'aminorhodamine G, encore appelée sulforhodamine G (CAS 61332-27-2) ;
- ▶ les azurants optiques ;
- ▶ les autres traceurs fluorescents comme le naphthionate de sodium (CAS 130-13-2) ou l'acide amino G (CAS 86-65-7).

Plusieurs évaluations ont démontré qu'aucun des traceurs fluorescents actuellement utilisés ne présente de risque pour l'Être humain, ni non plus, pour ceux qui ont été étudiés de ce point de vue, ne forme de sous-produit par oxydation naturelle ou lors des traitements de désinfection mis en œuvre dans les usines de production d'eau potable (Gombert *et al.* 2017). Le risque sanitaire pour le consommateur est considéré comme négligeable pour un niveau d'exposition correspondant à une concentration inférieure à 1 ou 2 mg/L durant 24 h. La réflexion scientifique menée, s'appuyant sur les résultats de tests de génotoxicité et d'écotoxicité, conduit à permettre l'utilisation de ces molécules sans restriction particulière (Field *et al.* 1995, Behrens *et al.* 2001, Carré *et al.* 2007, Leibundgut *et al.* 2009, Gombert & Carré 2011, Gombert *et al.* 2017), sauf en ce qui concerne les rhodamines B, Wt et 6G, dont l'utilisation est déconseillée (Carré *et al.* 2011) ; parmi les traceurs courants cités ci-dessus, seule la sulforhodamine B a montré une réponse positive à certains tests d'écotoxicité (Behrens *et al.* 2001). Cela n'exclut toutefois pas de veiller dans tous les cas à la maîtrise des quantités injectées dans le milieu (Field 2005), ainsi qu'à la qualité de ces produits.

Depuis un certain nombre d'années, pourtant, aussi bien les praticiens des bureaux d'études et d'ingénierie que les laboratoires d'expertise comme la Cellule R&D d'Expertise et de TRANSfert en TRAçages Appliqués à l'Hydrogéologie et à l'Environnement (CETRAHE) de l'Université d'Orléans, constataient des comportements « inédits » des traceurs fluorescents dans le milieu naturel comme au laboratoire, qui pouvaient laisser penser à une baisse de la qualité des produits disponibles dans le commerce (Défarge *et al.* 2020) : des traçages effectués dans des systèmes hydrogéologiques bien connus se traduisaient par exemple par des résultats négatifs pour certains traceurs pourtant injectés avec des quantités qui avaient préalablement donné lieu à des restitutions aux points de suivi habituels ; au laboratoire, on pouvait observer des dégradations inexplicables des traceurs en solution ou de piètres rendements de fluorescence.

Un projet de recherche associant CETRAHE, le bureau d'études *European Water Tracing Services* (EWTS, Aquapôle de l'Université de Liège, Belgique) et le laboratoire COBRA (Unité Mixte de Recherche 6014 CNRS-INSA Rouen Normandie-Université de Rouen Normandie), a été mené entre 2018 et 2020, grâce au soutien financier de l'OFB, pour tâcher de répondre à ces questions en évaluant la qualité des produits disponibles dans le commerce en France pour les six principaux traceurs cités ci-dessus, sur plusieurs plans :

- ▶ pureté des produits (teneurs en composant fluorescent, et en eau pour les traceurs vendus sous forme de poudre) ;

- ▶ absence d'autre composant fluorescent que le traceur vendu, ou de composant gênant la mesure de fluorescence ;

- ▶ rendement de fluorescence (voir Glossaire), évalué à travers des mesures d'intensité de fluorescence de solutions de plusieurs concentrations, permettant également de vérifier la linéarité des réponses obtenues (et donc la possibilité d'établir des droites d'étalonnage pour la mesure de la fluorescence à partir de ces produits) ;

- ▶ stabilité et dégradabilité éventuelle des solutions exposées jusqu'à 6 mois dans 4 conditions distinctes : lumière naturelle, obscurité, froid (4 °C), et à la température de 40 °C.

Les résultats obtenus ont permis d'apporter des informations rassurantes quant à la qualité comme traceurs hydrogéologiques des produits analysés du point de vue de leurs propriétés de fluorescence (Défarge *et al.* 2020) :

- ▶ présence du composé fluorescent avec les caractéristiques spectroscopiques connues (longueurs d'onde d'excitation et d'émission) permettant leur détection ;

- ▶ absence d'autres composants fluorescents, ou parasites pour la mesure spectrofluorimétrique ;

- ▶ proportionnalité de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des traceurs (permettant les analyses quantitatives) ;

- ▶ pour la plupart d'entre eux (acide amino G exclu, voir plus bas), conservation de leur intensité de fluorescence en solution d'eau ultrapure jusqu'à 6 mois en l'absence de lumière, dans toute la gamme des températures rencontrées dans les eaux naturelles.

L'étude a permis par ailleurs de vérifier que l'application d'une correction des mesures de fluorescence par l'aire du pic Raman de l'eau préconisée par Lawaetz & Stedmon (2009) permettait d'obtenir une certaine harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour le même appareil d'un même laboratoire, qui soit suffisante pour qu'une relation de proportionnalité entre intensité de fluorescence en solution et teneur en traceur dans les poudres soit vérifiée sur cet appareil, dans ces conditions contrôlées, d'une série analytique à l'autre, dans la très grande majorité des cas. Cette observation ouvre la possibilité que la mesure d'intensité de fluorescence des solutions dans des conditions ainsi contrôlées, puisse à l'avenir servir de vérification de qualité (en termes de teneur en traceur) des produits commerciaux, sans avoir à en passer par de lourdes et coûteuses analyses de pureté comme celles réalisées dans le cadre de cette étude.

Il est toutefois également ressorti de cette première étude un certain nombre d'observations plus problématiques quant à l'utilisation de ces produits pour les opérations de traçage hydrogéologique (Défarge *et al.* 2020) :

- ▶ la **teneur en traceur fluorescent** des produits commercialisés apparaît tout d'abord très variable, y compris au sein des lots, leur composition étant par ailleurs incontrôlable en raison à la fois des pratiques actuelles des fabricants (qui peuvent y introduire des additifs en vue d'en abaisser les coûts), et de celles des fournisseurs (qui, pour des raisons de maintien de stocks permanents de produits, ont un éventail de plusieurs fabricants pour chaque produit, peuvent procéder à des mélanges entre produits de plusieurs provenances, ou s'approvisionner ponctuellement chez des fournisseurs différents) ;

- ▶ les **fiches techniques des produits** contiennent de ce fait fréquemment des informations inexacts sur les teneurs en traceur, mais également en eau, ou en insolubles (voir plus bas), quand elles sont disponibles (certains revendeurs ayant décidé de ne pas en fournir, en raison de cette impossibilité d'en assurer la fiabilité) ;

► **seules les poudres d'uranine et d'acide amino G ont des teneurs en traceur proches de 100 %**, mais pas de manière systématique, celles de certaines uranines pouvant ne pas dépasser 50 % (et 15 % pour l'uranine vendue en préparation liquide). Les teneurs en traceur des produits vendus comme naphthionate de sodium ne dépassent pas 89 % (en raison notamment d'une forte teneur en eau), celles de l'éosine 87 %, celles des sulforhodamines G et B, 81 et 59 %, respectivement (en raison de la présence d'une part insoluble dans le cas de la sulforhodamine G), certaines éosines et sulforhodamines B pouvant ne pas dépasser 50 % de pureté ;

► les **autres composants** accompagnant obligatoirement les traceurs fluorescents dans les produits commercialisés, incluent de l'eau (souvent liée aux additifs), dont la teneur est incontrôlable après sortie d'usine car elle va varier en fonction des conditions de stockage, transport, manipulation des produits, et, pour les traceurs les moins purs (éosine et sulforhodamines), également des **composants inconnus** pouvant représenter jusqu'à la moitié de la masse sèche des produits vendus sous forme de poudre. Dans le cas de la sulforhodamine G, ces composants complémentaires (liés aux procédés de fabrication) sont, de plus, **insolubles** dans l'eau, mais également dans tous les solvants testés pendant le projet (eau + acide acétique, acétate de sodium, acétate de sodium + méthanol), et constituent donc une part indéterminée, de devenir inconnu, relâchée dans les eaux ;

► la présence d'eau dans les poudres pourrait favoriser leur **contamination microbienne**, laquelle pourrait être à l'origine de phénomènes constatés de **biodégradation** brutale de certains traceurs une fois mis en solution à faible concentration, pouvant aller jusqu'à leur disparition complète ;

► **l'acide amino G une fois mis en solution voit son intensité de fluorescence baisser** (jusqu'à 25 % au bout de 6 mois) même dans les conditions les plus conservatives testées (obscurité et froid) ;

► enfin certains traceurs parmi les plus utilisés (uranine, éosine), forment obligatoirement de la **mousse** au-delà d'une certaine concentration, conduisant donc à une modification de la composition des eaux aux points d'injection, qui peut être non négligeable lorsque les quantités injectées sont importantes.

Ces résultats étaient donc susceptibles d'expliquer les observations des praticiens et des analystes des traçages à l'aide de produits fluorescents résumées plus haut, et qui avaient été à l'origine du premier projet de recherche soumis à l'OFB :

► **résultats négatifs de traçages** effectués dans des systèmes hydrogéologiques bien connus qui avaient préalablement donné lieu à des restitutions aux points de suivi habituels (si la quantité de composé fluorescent injecté est pratiquement moitié moindre que celle calculée pour un produit de pureté supposée proche de 100 %) ;

► **piètres rendements de fluorescence** de certains produits ;

► **dégradations** des traceurs en solution ;

► la formation de **mousse** lors de la mise en solution de traceurs en grandes quantités sur le terrain, fait également partie des observations qui nous avaient été remontées comme particulièrement gênantes par certains praticiens (Défarge *et al.* 2020).

Mais par ailleurs, les composants complémentaires des traceurs dans ces produits (solubles comme insolubles dans le cas de la sulforhodamine G), injectés dans les milieux aquatiques à l'occasion des opérations de traçage, sont susceptibles d'atteindre les captages d'alimentation en eau potable (l'une des principales applications du traçage étant la délimitation des aires d'alimentation et des périmètres de protection de ces ouvrages) ou de rejoindre les sédiments de fond des masses d'eau, et **il semble donc indispensable de mieux comprendre et de préciser la nature et la composition de ces composants actuellement inconnus, les modifications pouvant éventuellement être induites dans les eaux par leur présence, et le cas échéant de limiter au minimum leur rejet dans les milieux naturels.**

Dans un but d'amélioration de la qualité des produits injectés à l'occasion des opérations de traçage par produits fluorescents, les partenaires français du premier projet (CETRAHE et COBRA) se sont donc proposé, encouragés par l'OFB, et accompagnés cette fois-ci des deux fournisseurs français spécialistes des traceurs fluorescents (les sociétés Colorey, dont la marque commerciale est Art E'Color, et Paviqua, dont la marque commerciale est Fluotechnik), de mener un **nouveau projet de trois ans, permettant de répondre aux questions soulevées par le premier projet et qui restaient en suspens, tout en agissant sur plusieurs aspects de la démarche d'amélioration de la qualité de ces produits, et se déclinant en trois volets d'action complémentaires :**

► Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux

Il s'agissait avant tout, en mettant en œuvre des déterminations analytiques nouvelles ou plus poussées, de **déterminer la nature et la variabilité éventuelle des composants complémentaires** :

- formant la part complémentaire et/ou insoluble des poudres de sulforhodamines B et G ;
- pouvant représenter jusqu'à 50 % de certaines poudres d'éosine ;
- impliqués dans l'expression de la fluorescence de l'éosine (une poudre d'éosine analysée lors du premier projet ayant montré une intensité de fluorescence équivalente au produit standard, de pureté proche de 100 %, alors que sa propre pureté n'était que de 75 % : Défarge *et al.* 2020) ;
- éventuellement formés à partir de l'acide amino G en solution, si la baisse de son intensité de fluorescence avec le temps, même dans les conditions les plus conservatives (obscurité et froid ; voir ci-dessus), s'explique par une dégradation du traceur. Cette baisse de fluorescence pourrait également être due à l'évolution du pH de la solution (l'intensité de fluorescence de l'acide amino G chutant rapidement au-dessous de pH 6,5 d'après Smart & Laidlaw 1977), ce qu'on cherchera à déterminer.

On se proposait également d'étudier, contrairement au premier projet où tous les traceurs ont été mis en solution ou dilués à l'aide d'eau ultrapure, le comportement comparé de solutions des mêmes produits **fabriqués à partir d'eau naturelle** (une eau de source karstique influencée par des eaux superficielles riches en matières organiques et bactéries), de façon à évaluer l'impact de ces composants naturels des eaux sur le **devenir, la biodégradation ou la transformation des produits fluorescents dans les milieux aquatiques**. Les processus de biodégradation, soupçonnés d'être à l'origine de la baisse de fluorescence, pouvant aller jusqu'à la disparition complète, de certains traceurs à faible concentration en solution, observée au cours du premier projet (voir ci-dessus), ont déjà été observés dans le milieu naturel ou au laboratoire pour le naphthionate de sodium et l'uranine (Défarge *et al.* 2020).

L'étude sera également élargie à des **traceurs moins, ou devenus moins, utilisés** (pyranine [JAUNE PYRACIDE G], tinopal CBS-X) et à d'**autres produits fluorescents** proposés par les fournisseurs (parmi lesquels on trouve des produits alimentaires comme les E101 [riboflavine et composés], biosourcés et environnementalo-compatibles), du point de vue de leur qualité comme traceurs hydrogéologiques, de leur pureté, et de la détermination des impuretés éventuelles qu'ils pourraient contenir.

Cette action incluait enfin l'étude de la compatibilité avec le traçage hydrogéologique, des **agents antimousse** qu'Art E'Color se propose d'ajouter à ses préparations de traceurs liquides, afin d'éviter la formation de mousse lors des injections d'uranine ou d'éosine en grandes quantités à forte concentration. Il s'agissait de vérifier notamment leur absence de fluorescence ou d'interférence avec la détection et la mesure spectrofluorimétriques.

► Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits

La première manière d'atténuer les impacts de ces composants complémentaires des traceurs, ou néoformés en solution, est d'utiliser les produits les plus purs. Le projet se proposait donc de chercher à **consolider les corrélations qu'on a pu mettre en évidence entre intensité de fluorescence des traceurs en solution, mesurée dans des conditions contrôlées** (et notamment par normalisation des mesures sur un même appareil grâce à une correction par l'aire du pic Raman de l'eau obtenue dans les mêmes conditions ; voir ci-dessus), **et pureté des produits**, sur un plus grand nombre de ceux-ci.

On étudiera également, en lien avec l'action N° 1 du projet, les raisons pour lesquelles il peut apparaître des exceptions à cette règle (cas de l'éosine citée ci-dessus).

Ce deuxième volet de l'étude visait à établir de véritables abaques pouvant permettre d'estimer la pureté des lots de traceurs par simple mesure d'intensité de fluorescence, permettant de pouvoir ainsi **mettre en place une forme de contrôle qualité de ces produits par un laboratoire d'analyses indépendant**.

Ce volet pourra également concerner les traceurs non inclus dans l'étude précédente car moins utilisés, devenus moins utilisés, ou nouvellement proposés par les fournisseurs, sur lesquels des analyses de pureté auront été réalisées lors de l'action N° 1 de l'étude.

► Action n°3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage

Cette action a notamment été poussée par l'OFB, qui souhaitait que ce second projet aille au-delà d'un simple constat basé sur des résultats scientifiques et des recommandations de la part des auteurs de l'étude, comme le projet précédent, mais se traduise par un engagement des principaux acteurs du traçage en France (des fournisseurs aux praticiens, en passant par les donneurs d'ordre), aboutissant à l'injection dans les milieux aquatiques des moindres quantités de produits complémentaires des traceurs fluorescents, en utilisant des produits de plus en plus purs, incitant à la mise à disposition croissante de ceux-ci au détriment des produits de moindre qualité, et potentiellement à l'amélioration de la qualité des produits mis sur le marché (par les fabricants). Ce travail aurait alors pour double effet **d'améliorer les pratiques du traçage hydrogéologique artificiel en aboutissant à un renforcement de la fiabilité de ses résultats, et d'atténuer les impacts éventuels sur les milieux aquatiques des composants complémentaires des agents fluorescents contenus dans les produits mis sur le marché, le tout au service d'une meilleure gestion de la ressource en eau et des milieux aquatiques**.

Pour ce faire, après l'étape qu'a constitué le projet précédent, qui a permis de faire un premier état des lieux de la qualité, pour les applications en traçage hydrogéologique, des produits fluorescents actuellement disponibles dans le commerce, dont les résultats ont été inclus dans un rapport à l'OFB (Défarge *et al.* 2020) assez largement diffusé (une cinquantaine de téléchargements *via* le lien temporaire mis en place par CETRAHE, plus de 1250 « impressions organiques » du fichier incluant résumé, abstract et synthèse opérationnelle mis en ligne *via* le compte *LinkedIn* de la Cellule : <https://fr.linkedin.com/company/cetrahe-université-orléans>), ce second projet vise tout d'abord à améliorer encore la diffusion technologique autour des bonnes pratiques du traçage sur tous les points étudiés dans les actions N° 1 et 2 (voir ci-dessus). L'implication dans le projet, en plus des partenaires académiques du premier projet (CETRAHE et COBRA), des **deux fournisseurs français de produits fluorescents spécialisés dans le traçage** (Art E'Color et Fluotechnik), les seuls à proposer régulièrement l'ensemble des traceurs étudiés (les autres fournisseurs ne commercialisant que de l'uranine, parfois de qualité médiocre : Défarge *et al.* 2020), et à avoir réagi aux propositions de discussion des résultats concernant leurs produits, constituera une première étape dans un **travail de structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage** encouragée par l'OFB.

Les résultats visés par l'action N° 2 de l'étude, à savoir la consolidation, sur un nombre statistiquement plus important de types de traceurs et de lots, et sur un plus grand nombre d'années, de la relation de proportionnalité entre intensité de fluorescence des traceurs en solution et pureté des produits, mise en évidence lors du premier projet, permettant la mise au point d'abaques pouvant servir à exercer facilement un contrôle de teneur et de qualité sur les produits traceurs mis sur le marché par un laboratoire académique indépendant et reconnu (en l'occurrence CETRAHE, avec intervention ponctuelle de COBRA pour des analyses plus poussées), constitueront une deuxième étape dans ce travail de structuration d'une filière française du traçage hydrogéologique à l'aide de produits fluorescents, en renforçant les relations entre fournisseurs et laboratoires académiques experts.

Mais le projet proposé vise à aller plus loin encore dans la structuration de cette filière, en prévoyant de présenter cette fois-ci, comme cela a été fait pour les fournisseurs lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), les résultats obtenus lors de ce second projet (ainsi que les résultats principaux du premier) aux praticiens français du traçage artificiel, et aux collectivités (allant des communes, communautés de communes, syndicats des eaux, aux départements, et aux parcs naturels) et autres donneurs d'ordre

pour lesquels ils effectuent des opérations de traçage, sous la forme d'ateliers techniques en visioconférence. Ces échanges auront pour but de **sensibiliser donneurs d'ordre et praticiens à la nécessité d'un renforcement des exigences en matière de traçage artificiel à l'aide de produits fluorescents, et d'une amélioration des pratiques, qui passe notamment par l'utilisation des produits de la meilleure qualité, fournis par des professionnels confirmés, et de pureté contrôlée par un laboratoire académique indépendant.** Cette mise en relation et ce renforcement des liens entre tous les acteurs, des fabricants de traceurs fluorescents, à travers les fournisseurs, aux donneurs d'ordre, en passant par les laboratoires académiques experts et les praticiens, pourraient se traduire par une forme d'engagement à favoriser et à mettre en œuvre ces meilleures pratiques en matière de traçage.

En perspective, les premiers jalons de structuration d'une filière française du traçage hydrogéologique artificiel à l'aide de produits fluorescents (dont les applications dépassent par ailleurs le domaine de l'eau et des milieux aquatiques au sens strict, puisqu'elles peuvent concerner également par exemple la simulation des opérations de dépollution des sols par injection chimique in situ ou l'évaluation des risques de fuites liées aux stockages gazeux profonds : Défarge *et al.* 2020), sous la forme d'un engagement des principaux acteurs concernés, favoriseront son évolution possible sous forme d'association, ou un futur travail d'agrément dans ce domaine.

Le présent rapport présente les résultats au terme des deux premières années d'étude, qui prévoyaient :

- ▶ l'analyse de la **composition complète de deux lots de sulforhodamines B et G**, sélectionnés chacun par l'un des deux partenaires fournisseurs ;

- ▶ la détermination de la **pureté** et de la **teneur en eau**, et la **caractérisation physico-chimique** (caractères organoleptiques en poudre et en solution, pH et conductivité électrique [CE] des solutions) de **deux lots des six traceurs étudiés lors du premier projet** (en plus des sulforhodamines : uranine, éosine, naphthionate de sodium et acide amino G), sélectionnés chacun par l'un des partenaires fournisseurs, ainsi que de l'éosine du premier projet dont l'intensité de fluorescence en fonction de la pureté se distinguait des autres éosines analysées (voir plus haut) ;

- ▶ la vérification des **propriétés de fluorescence** de l'ensemble de ces traceurs : caractérisation spectrale, linéarité de la relation intensité de fluorescence en fonction de la concentration en solution ;

- ▶ la détermination des **abaques intensité de fluorescence en fonction de la pureté des six traceurs**, incluant les résultats obtenus lors du premier projet ;

- ▶ la détermination des facteurs expliquant la **baisse de l'intensité de fluorescence de l'acide amino G en solution** observée lors du premier projet ;

- ▶ la **comparaison** du comportement de solutions des six traceurs fabriqués à partir d'**eau naturelle** (une eau de source karstique influencée par des eaux superficielles riches en matières organiques et bactéries) et d'**eau ultrapure** (la seule utilisée lors du premier projet), de façon à évaluer l'impact éventuels des **composants biologiques** des eaux sur le devenir, la biodégradation ou la transformation des produits fluorescents dans les milieux aquatiques ;

- ▶ l'étude de la **compatibilité avec le traçage hydrogéologique, des agents antimousse** proposés par le partenaire Art E'Color.

2. Matériels et méthodes

2.1. Produits sélectionnés par Art E'Color et Fluotechnik

Six lots de poudres des produits traceurs fluorescents étudiés (uranine, éosine, sulforhodamine B, sulforhodamine G, naphthionate de sodium et acide amino G) devaient être sélectionnés chaque année pour cette étude par chacun des deux fournisseurs partenaires (Art E'Color et Fluotechnik). À la suite des résultats du premier projet (Défarge *et al.* 2020), Art E'Color a changé de source d'approvisionnement pour l'éosine, la sulforhodamine B et l'acide amino G, les nouveaux produits sélectionnés étant supposés être meilleurs que ceux analysés lors du premier projet, sur la base de tests colorimétriques. Pour la 2^{ème} série d'analyses (2^{ème} année du projet), aucun nouveau lot de sulforhodamine G n'a pu être trouvé par rapport à la 1^{ère}. Fluotechnik a en revanche fourni deux lots distincts de sulforhodamine B pour cette 2^{ème} série d'analyses (**SBf2** et **SBf2bis**, voir ci-dessous).

Les produits sont listés dans le Tableau 1 ci-dessous, avec les références fournisseurs, numéros de lots et dates de livraison, d'une part, et d'autre part, les références que nous avons utilisées tout au long des manipulations, sous la forme :

► **Ua1** = Uranine (**E** : éosine ; **SB** : sulforhodamine B ; **SG** : sulforhodamine G ; **NS** : naphthionate de sodium ; **AG** : acide amino G), fournisseur Art E'Color (**a** ; **f** pour Fluotechnik), Série N°1.

L'éosine issue du premier projet a gardé la référence utilisée dans celui-ci (**F1Ep3** : Défarge *et al.* 2020), ses référence fournisseur, numéro de lot et date de livraison étant rappelés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Références des produits analysés.

FOURNISSEUR	DESIGNATION PRODUIT	REFERENCE FOURNISSEUR	NUMERO DE LOT	DATE DE LIVRAISON	REFERENCE ETUDE
1^{ère} série					
Art E'Color	Fluorescéine SN conc.	AY73	7822	07/03/2022	Ua1
	Eosine YB	AR87	OU42190/AR/22	30/03/2022	Ea1
			SP14005283	23/04/2019	F1Ep3
	Sulforhodamine B conc.	AR52	FG/20-21/0601	30/03/2022	SBa1
	Sulforhodamine G	AR50	DS/1125/21-22		SGa1
	Naphtionate de sodium	-	UC/410/1819	07/03/2022	NSa1
Acide amino G	-	602	AGa1		
Fluotechnik	Fluorescéine	-	P221097001	16/03/2022	Uf1
	Eosine	-	SP14005734		Ef1
	Sulforhodamine B	-	SP15000248		SBf1
	Sulforhodamine G	-	32/01		SGf1
	Naphtionate de sodium	-	207		NSf1
	Acide amino G	-	101		AGf1
2^{ème} série					
Art E'Color	Fluorescéine SN conc.	AY73	7864	09/12/2022	Ua2
	Eosine YB	AR87	65/11/2022	23/04/2019	Ea2
SP14005283			F1Ep3		
Art E'Color	Sulforhodamine B conc.	AR52	FG/21-22/3590	09/12/2022	SBa2
	Naphtionate de sodium		301/E		NSa2
	Acide amino G		801		AGa2
Fluotechnik	HOLACID Fluorescein Conc		KS31S	08/02/2023	Uf2
	Eosine	Acid Red 87	SI/076/08/22	02/11/2022	Ef2
			SI/075/08/22		SBf2
	Sulforhodamine B	Acid Red 52	845/22-23	24/04/2023	SBf2bis
			32/01	16/03/2022	SGf1
	Sulforhodamine G	Acide Red 50	15/01	02/11/2022	SGf2
	Naphtionate de sodium		403	03/02/2023	NSf2
Acide amino G		0023392120	AGf2		

D'autres produits issus du premier projet ont pu être réanalysés à titre de comparaison, ou certains résultats les concernant peuvent être rappelés dans le présent rapport. Tous ces produits ont gardé les références utilisées lors du premier projet, sous la forme :

F1Up1 = Fournisseur N°1, Uranine (**E** : éosine ; **SB** : sulforhodamine B ; **SG** : sulforhodamine G ; **N** : naphthionate de sodium ; **AG** : acide amino G), poudre, Série N°1, pour les produits achetés pour le premier projet.

TCUp1 = Traceur CETRAHE, Uranine (**N** : naphthionate de sodium ; **AG** : acide amino G), poudre, Stock N°1, pour les traceurs anciens conservés à CETRAHE.

P1U = Fournisseur de Produit standard N°1, Uranine (**E** : éosine ; **SB** : sulforhodamine B ; **SG** : sulforhodamine G ; **N** : naphthionate de sodium ; **AG** : acide amino G), pour les produits standards.

Les indications de composition, de pureté, de teneur en eau, de solubilité et de pH incluses dans les fiches techniques des produits fournies par les fabricants sont reportées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Les produits ont été réceptionnés à chaque fois par CETRAHE, et des aliquotes ont été répartis entre les deux laboratoires. Le flaconnage utilisé pour les aliquotes destinés aux analyses de pureté réalisées au laboratoire COBRA a fait l'objet d'un nettoyage poussé : eau du robinet courante, puis éthanol, eau ultrapure (système Millipore Direct Q3), et séchage à l'étuve à 105 °C pendant 24 h. Tous les aliquotes ont été conservés jusqu'à leur analyse dans du verre, à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur.

Les **agents antimousse** qu'Art E'Color se propose d'ajouter à ses préparations de traceurs liquides sont au nombre de deux :

► le **FLUXAIR 85 S GR Nymco**, qui est un mélange de cire de polyéthylène et d'esters d'acides gras dans de l'huile végétale ;

► le **LUCRAFOAM E 100 CONC Levaco Chemicals**, qui est un mélange de mono- et diglycérides d'acides gras alimentaires E 471.

Tableau 2 : Indications de composition, pureté et solubilité des produits, ainsi que de pH, incluses dans les fiches techniques des fabricants.

FOURNISSEUR	DESIGNATION PRODUIT	REFERENCES ETUDE	COMPOSITION, PURETE, SOLUBILITE	pH
Art E'Color	Fluorescéine SN conc.	Ua1 Ua2	Teneur en colorant > 90 % Teneur en chlorures < 0,1 % Taux d'humidité ≤ 10 % Taux d'insolubles dans l'eau < 0,1 % Solubilité dans l'eau > 500 g /L à 20 °C	Environ 8-11 en solution aqueuse (à 20 °C)
	Eosine YB	Ea1 Ea2	Soluble dans l'eau et l'éthanol	Environ 7 ± 1 à 0,1 %
		F1Ep3	Taux d'humidité < 10 %	6-8 (à 20 °C, en solution aqueuse à 10 g/L)
	Sulforhodamine B conc.	SBa1 SBa2	Teneur en colorant ≥ 90 % w/w Taux d'insolubles dans l'eau ≤ 0,2 % Teneur en eau ≤ 7 % w/w Teneur en NaCl ≤ 2 % w/w Teneur en Na ₂ SO ₄ ≤ 1 % w/w Solubilité dans l'eau : 1,5 %	6,5-9,0 (solution à 1 %)
	Sulforhodamine G	SGa1	Pureté (HPLC) : 87 à 91 % Insolubles < 0,2 % Teneur en cadmium < 4 ppm Teneur en plomb < 5 ppm Teneur en arsenic < 5 ppm Teneur en mercure < 3 ppm Solubilité dans l'eau : environ 5 g/L à température ambiante ; 10 g/L à 90 °C	Environ 6,5-7,5
	Naphthionate de sodium	NSa1	Pureté (HPLC) ≥ 74 % Teneur en NaCl < 26 % Soluble dans l'eau (environ 190 g/L)	Environ 7-9 en solution aqueuse à 10 g/L
		NSa2	Pureté ≥ 75% Taux d'insolubles dans l'eau < 1%	-
Acide amino G	AGa1 AGa2	Pureté ~ 80 % Soluble dans l'eau	-	
Fluotechnik	Fluoresceine Uranine	Uf1	Pureté ≥ 90% Teneur en chlorure ~ 7 % Teneur en eau ~ 5 % Solubilité > 500 g/L	~ 9
	Eosine	Ef1	Pureté minimale : 85 % Solubilité 300 g/L	-
		Ef2	Pureté : 90% Taux d'insolubles dans l'eau : 0,05% Teneur en plomb : 1 ppm Teneur en fer : 30 ppm	9,2
	Sulforhodamine B	SBf1	Solubilité 50 g/L	-
		SBf2bis	Pureté (HPLC) : 95,5% Insolubles : 0,15%	6,5
	Sulforhodamine G	SGf1	Pureté : 89-90% (min 85%) Solubilité ~ 5 g/L	5 - 8
		SGf2	Pureté : 89-90% (min 85%)	
	Naphthionate de sodium	NSf1	Pureté minimale : 75 % Insolubles ~ 0,12 % Solubilité ~ 200 g/L	-
		NSf2	Pureté : 75,0% α-naphthylamine : 0,18% Insolubles dans l'eau : 0,12% Arsenic : 0,008 ppm Mercure : 0,028 ppm	-
Acide amino G	AGf1	Pureté minimale : 80 % Solubilité < 5 g/L	-	

2.2. Analyses des produits traceurs réalisées à CETRAHE

À part dans le cas des expériences de suivi du comportement des solutions de traceurs en présence d'eau naturelle (voir ci-dessous), toutes les mises en solution de traceurs en poudre et dilutions ont été réalisées à température ambiante, avec de l'eau ultrapure (système Millipore Direct Q3). Pour l'uranine et l'acide amino G, qui nécessitent une correction de pH car leurs intensités de fluorescence sont plus faibles aux pH acides des eaux ultrapures qu'aux pH courants dans les eaux naturelles (habituellement compris entre 7,2 et 7,6, et rarement inférieurs à 6 ou supérieurs à 8 : Rodier *et al.* 2009 ; Smart & Laidlaw 1977 pour l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du pH de ces deux traceurs, Leibundgut *et al.* 2009 pour celle de l'uranine), celle-ci a été réalisée par ajustement préalable de l'eau ultrapure à $\text{pH} \geq 8$ à l'aide d'un tampon Tris-HCl (Chlorhydrate de Tris 1 M, pH 8,0 de Fisher Bioreagents).

L'eau naturelle utilisée pour les expériences de suivi du comportement des traceurs en présence d'une charge microbiologique probable est celle de la source du Bouillon à Orléans la Source, qui est la résurgence karstique la plus en amont de celles donnant naissance au Loiret, affluent de la Loire de 12,6 km de long. Cette émergence est alimentée à 80 % par des pertes de la Loire, dont les plus éloignées se situent à une vingtaine de km à l'est du Bouillon, et dont le temps de circulation dans le système karstique du Val d'Orléans est de 48 à 100 h selon les périodes ; 16 % de l'alimentation du Bouillon sont des eaux de Loire ayant séjourné plus longuement dans le milieu souterrain, les 4 % restants étant constitués par des infiltrations à partir de la surface (Binet *et al.* 2012, 2017).

Une étude de la qualité bactériologique des eaux de la Loire et du Bouillon (Livrozet 1984) a montré que la charge en bactéries y est la plus forte en été, en fin d'étiage long, en l'absence de pluies, en raison de la prolifération de micro-organismes planctoniques photosynthétiques en Loire ; une fois engouffrés avec les eaux dans les conduits karstiques souterrains, où ils ne peuvent plus réaliser de photosynthèse, ni, pour ceux qui le font en Loire, consommer de bactéries, leur biomasse favorise l'activité bactérienne biodégradatrice, qui renforce l'anoxie du système et abaisse les teneurs en O_2 dissous des eaux émergeant au Bouillon (Albéric & Lepiller 1998 ; en l'absence d'activité biologique, teneur en O_2 dissous et température des eaux sont inversement corrélées, tandis qu'au Bouillon, les mêmes paramètres mesurés lors de campagnes menées par CETRAHE depuis 2014 ne présentent qu'un R^2 de 0,5).

Des prélèvements d'eaux du Bouillon en fin d'été de la 2^{ème} année du projet (2023) ne cadrant pas avec le planning des analyses (celles à faire de 4 à 6 mois de mise en contact des traceurs en solution avec ces eaux auraient empiété sur la 3^{ème} année du projet, consacrée aux autres traceurs fluorescents ; voir Introduction, Action N° 1), on a choisi de les réaliser au début de l'été, entre le 19 juin et le 3 juillet, période caractérisée par une très faible pluviosité depuis la mi-mai, et des températures de l'air atteignant 23 à 33 °C (site <https://www.infoclimat.fr/observations-meteo/temps-reel/orleans-bricy/07249.html> consulté le 6 octobre 2023). Les teneurs en O_2 dissous (9,1 à 11,9 %) et les températures (17,4 à 18,0 °C) du Bouillon au moment des prélèvements étaient proches des valeurs mesurées par Livrozet (1984) pendant la période de plus forte charge bactérienne de son étude (fin d'été 1982 : 6,8 à 9,6 % et 16,0 à 16,5 °C, respectivement, avec des températures maximales de l'air de 18,7 à 30,1 °C). Les faibles teneurs en O_2 de l'eau naturelle utilisée pour nos expériences doivent donc assurer qu'elle contenait une charge bactérienne également proche des maximums annuels, bien que probablement légèrement inférieure, la teneur en O_2 dissous du Bouillon pouvant descendre jusqu'à des valeurs proches de 5 % (résultats inédits CETRAHE), et nos valeurs étant un peu supérieures à celles de Livrozet (1984) pour des températures également légèrement supérieures.

Les prélèvements ont été réalisés par trois fois, à chaque fois dans un délai maximum de 24 h avant le début des expériences et des mesures à t_0 , dans une bouteille en verre fumé de 2,5 L préalablement nettoyée à l'acide chlorhydrique, puis 5 fois à l'eau du robinet courante, et 3 fois à l'eau ultrapure (système Millipore Direct Q3), avant d'être rincée encore 3 fois *in situ* avec l'eau du Bouillon, et remplie et bouchée sous l'eau. Ils ont été aussitôt placés à l'abri de la lumière et de la chaleur dans une glacière remplie de blocs réfrigérants, et transférés au réfrigérateur du laboratoire dans un délai d'une demi-heure, où ils ont été ensuite conservés jusqu'au début des manipulations.

Les prises d'essai des poudres ont été effectuées à l'aide d'une balance de précision Fisherbrand Analytical Series au 1/10^{ème} de mg. Il a été réalisé à chaque fois une solution mère à une concentration de 0,1 g/L, à partir de laquelle il a été fabriqué pour les besoins analytiques une deuxième solution à 1 mg/L, puis des solutions de concentrations inférieures jusqu'à 10 µg/L à l'aide de pipettes de précision en verre de 1 à 5 mL, au 1/100^{ème} de mL. La dissolution des poudres a été réalisée dans une cuve à ultrasons pendant 30 min. Toutes ces opérations ont été réalisées avec des instruments en verre de laboratoire, les solutions ayant été préservées de la lumière, sauf pendant le temps minimum strictement nécessaire à certaines manipulations.

2.2.1. Analyse qualitative

Les observations et analyses suivantes ont été réalisées :

- ▶ Sur les produits en poudre :
 - traces éventuelles d'humidité, visuellement, dans l'emballage de vente ;
 - couleur à l'œil nu, dans une spatule.
- ▶ Sur les poudres mises en solution, à la concentration de 0,1 g/L :
 - formation éventuelle de mousse ;
 - présence éventuelle, à l'œil nu, de particules non dissoutes après 30 min d'agitation en cuve à ultrasons ;
 - odeur éventuelle ;
 - couleur à l'œil nu dans un récipient en verre blanc ;
 - conductivité électrique (CE) à 25 °C (grâce à un appareil WTW Multi 340i équipé d'une sonde TetraCon 325) ;
 - pH (grâce à un appareil Thermo Scientific Orion Star Plus équipé d'une sonde pH/température Orion 9107).

Les mesures de CE et de pH ont été réalisées aussitôt après la fabrication des solutions diluées. Des mesures de CE et de pH de l'eau naturelle, de l'eau ultrapure utilisée pour les dilutions, et de l'eau à pH ajustée par le tampon Tris-HCl utilisée dans les cas de l'uranine et de l'acide amino G, ont été effectuées juste avant celles réalisées sur les solutions de traceurs, et après étalonnage des appareils.

2.2.2. Caractérisation spectrale

La caractérisation spectrale des produits a consisté à vérifier par spectrofluorimétrie que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des traceurs commercialisés correspondaient aux valeurs données dans la littérature (voir Annexe 6), que la forme des pics ne traduisait pas la présence de sous-produits ou d'impuretés, et que d'autres composés fluorescents n'étaient pas également présents. Dans le cas de l'acide amino G présentant plusieurs longueurs d'onde d'excitation caractéristiques (250 nm, 305 nm et 350 nm) pour une longueur d'onde d'émission à 447 nm, il a été décidé cette fois-ci, et à la différence du premier projet (Défarge *et al.* 2020) pour lequel la longueur d'onde de travail correspondait au maximum cité dans la littérature (Käss 1998) de choisir la longueur d'onde présentant un maximum d'intensité et dont le pic est le mieux défini. Le pic d'excitation à 250 nm, dont l'intensité est la plus importante, étant proche de la limite de mesure de l'appareil et moins bien défini, le second pic à 305 nm, d'intensité plus forte que celui à 350 nm, a été retenu pour ce projet (Annexe 6).

Les analyses ont été réalisées sur un spectrofluorimètre Hitachi F2500, dans des cuves en quartz à deux faces miroitées.

On a d'abord procédé à la réalisation de spectres en double balayage en excitation et émission (spectres de fluorescence totale ou *Excitation-Emission Matrix* en anglais : Buzady *et al.* 2006) sur des solutions à 10 µg/L des produits, afin de faire une première détermination des longueurs d'onde caractéristiques du produit et de la pureté de celui-ci (absence d'autres

composés fluorescents que le traceur vendu). Les conditions d'analyses ont été : voltage = 700 V ; excitation entre 250 et 620 nm ; émission entre 300 et 650 nm ; fentes = 5 nm.

Les longueurs d'onde déterminées ont ensuite été utilisées pour réaliser des spectres d'excitation, et d'émission, respectivement, sur des solutions concentrées à 10 µg/L, à 700 V, avec des fentes de 2,5 nm.

2.2.3. Intensité de fluorescence

En raison de l'impossibilité de déterminer les véritables rendements de fluorescence (voir Glossaire) des produits, du fait du manque de standards de rendement connu pour l'ensemble des traceurs étudiés, l'évaluation de leur pouvoir de fluorescence a été menée en comparant leurs intensités de fluorescence dans les mêmes conditions expérimentales.

Ces mesures ont été réalisées en photométrie (voir Glossaire), sur le spectrofluorimètre Hitachi F2500, à 700 V, avec des fentes de 2,5 nm, sur deux solutions de chaque produit aux concentrations de 10 et 15 µg/L (pour l'uranine) ou 10 et 25 µg/L (pour les autres traceurs), aux longueurs d'onde qui avaient été déterminées par caractérisation spectrale (ces gammes de concentrations couvrent le domaine des applications de terrain du traçage hydrogéologique et des analyses au laboratoire, l'uranine à des concentrations supérieures à 15 µg/L donnant généralement, à la tension de 700 V, des intensités supérieures au maximum mesurable sur le spectrofluorimètre utilisé). Pour un même traceur, les mesures de fluorescence de tous les produits pour toutes les concentrations ont été réalisées aussitôt après la fabrication des solutions diluées, et à la suite, dans un laps de temps maximum d'une demi-heure.

La lampe du spectrofluorimètre a été laissée allumée au moins une demi-heure avant de débiter une série de mesures. La première mesure de chaque série a été répétée jusqu'à obtenir des valeurs stables. Ensuite, et à chaque fois, les mesures ont été tripliquées.

Une acquisition de l'aire du pic Raman (voir Glossaire) de l'eau ultrapure à 350 nm a été faite avant chaque série de mesures, afin d'appliquer ensuite une correction des intensités mesurées pour les traceurs (en divisant l'intensité du pic caractéristique du traceur par l'aire du pic Raman de l'eau correspondante : Lawaetz & Stedmon 2009), qui prenne en compte les variations des conditions instrumentales (intensité émise par la lampe du spectrofluorimètre notamment).

L'intensité de fluorescence de cette eau ultrapure, et, pour l'uranine et l'acide amino G, de l'eau à pH ajusté à 8 par le tampon Tris-HCl, a été ensuite déterminée aux longueurs d'onde caractéristiques du traceur analysé à la suite, jusqu'à obtenir trois valeurs constantes.

2.2.4. Comportement des traceurs en solution

2.2.4.1. Stabilité et dégradabilité de l'acide amino G

Au cours de la première année de l'étude, après mesure de l'intensité de fluorescence à t_0 (voir 2.2.3 ci-dessus), les solutions d'acide amino G préparées ont été placées à l'obscurité, à la température du laboratoire, dans des fioles en verre bouchées, pour une durée de 6 mois. Des mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les solutions à t_0 , au bout de 4 h, puis de 24 h, 2 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois, 4 mois et 6 mois.

2.2.4.2. Stabilité des autres traceurs

À la suite des mesures d'intensité de fluorescence à t_0 effectuées pour les autres traceurs (voir 2.2.3 ci-dessus), il a été décidé d'utiliser les solutions préparées pour suivre l'évolution de leur intensité de fluorescence dans les premiers jours à semaines suivants, pendant lesquels le premier projet avait montré qu'elle pouvait être assez variable, sous l'effet, conjugué ou pas, de la cinétique de dissolution des poudres, de l'évolution du pH des solutions, ou de la température ambiante (Défarge *et al.* 2020). Comme pour les solutions d'acide amino G (voir 2.2.4.1 ci-dessus), elles ont été placées à l'obscurité, à la température du laboratoire, dans des fioles en verre bouchées. Des mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les solutions à t_0 , au bout de 1, 3 ou 11 h, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et/ou 15 jours, 3 semaines, jusqu'à 1 mois et demi à 2 mois (selon les traceurs).

2.2.4.3. Comportement comparé dans une eau naturelle et dans l'eau ultrapure

Au cours de la deuxième année de l'étude, on a préparé, pour chaque produit traceur, parallèlement aux solutions préparées avec l'eau ultrapure, des solutions de mêmes concentrations (voir ci-dessus 2.2.3) avec l'eau naturelle de la source du Bouillon (voir plus haut). Dans le cas de l'uranine et de l'acide amino G, on n'a toutefois pas ajusté le pH de l'eau du Bouillon avec le tampon Tris-HCl, de façon à ne pas modifier la composition naturelle de cette eau. Après mesure de l'intensité de fluorescence à t_0 (voir 2.2.3 ci-dessus), les solutions préparées ont été placées dans des flacons en verre brun bouchés, à l'obscurité, au laboratoire, pour une durée de 6 mois.

Des mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les solutions à t_0 , au bout de 2 ou 3 jours, 1 semaine, 3 semaines, 1 mois, 2,5 ou 3 mois, et 4,5 ou 5 mois, selon les traceurs. Les mesures à 6 mois seront réalisées en janvier 2024. Pour un même traceur, toutes les mesures de fluorescence de tous les produits, pour toutes les concentrations, ont été réalisées à la suite dans les mêmes conditions instrumentales, dans un laps de temps maximum de 2 h. Ces solutions ont été conservées continuellement à l'obscurité, sauf pendant le temps minimum strictement nécessaire au remplissage de la cuve d'analyse du spectrofluorimètre.

La lampe du spectrofluorimètre a été laissée allumée au moins une demi-heure avant de débiter une série de mesures. La 1^{ère} mesure de chaque série a été répétée jusqu'à obtenir des valeurs stables. Un blanc sur de l'eau ultrapure a été réalisé au début de chaque série de mesures. Les mesures ont été répétées à chaque fois 3 fois. Une acquisition de l'aire du pic Raman de l'eau ultrapure à 350 nm a été réalisée avant chaque série de mesures (voir ci-dessus 2.2.3). Des échantillons d'eau ultrapure, d'eau ultrapure à pH ajusté avec le tampon Tris-HCl, et d'eau de la source du Bouillon ont été conservés à l'obscurité avec les solutions de traceurs et analysés en parallèle, de façon à surveiller l'éventuelle évolution de leur intensité de fluorescence avec le temps.

2.3. **Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA**

L'objectif de cette partie était de déterminer la pureté des traceurs commerciaux, c'est-à-dire leur teneur massique en principe actif fluorescent. Cette pureté ne peut être estimée que si l'on dispose d'étalons de pureté connue, afin de comparer les produits commerciaux à ces derniers. Dans un premier temps, des produits de référence de pureté connue et certifiée ont été achetés. Grâce aux étalons de référence, une méthode de quantification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) a été développée, validée, puis appliquée à la détermination de la pureté des traceurs commerciaux. On a également réalisé des dosages de l'eau résiduelle sur les traceurs commerciaux.

2.3.1. Teneur en eau

Les teneurs en eau ont été réalisées par différence de pesée après chauffage à 150 °C pendant 30 min sur thermobalance HG53 de Mettler Toledo

2.3.2. Développement de méthodes HPLC/DAD

Trois méthodes ont dû être développées, la première pour l'uranine et l'éosine ; la seconde pour les sulforhodamines B et G, et la troisième pour l'acide amino G et le naphthionate de sodium. Les procédures d'analyse par HPLC sont détaillées en Annexes 1 à 3.

Les chromatogrammes des solutions étalons sont donnés dans les Figures 1 à 6 ci-dessous. On peut noter une bonne séparation des différents principes actifs. Pour l'éosine à 540 nm (Figure 2), on note la présence d'un pic minoritaire à 10,3 min, le pic majoritaire se situant à 12,1 min. Concernant l'uranine (Figure 1), le pic est présent à 9,4 min. La méthode permet d'analyser ces deux composés simultanément. Sur les Figures 5 et 6, on note une excellente séparation des pics entre le naphthionate de sodium ($t_r = 6,1$ min) et l'acide amino G ($t_r = 9,1$ min) ce qui permet de doser simultanément ces deux composés sans interférence. Dans le cas

des sulforhodamines (Figures 3 et 4), on peut noter que la sulforhodamine B à 560 nm présente deux pics : un pic majoritaire à 8,78 min et un autre à 7,21 min (Figure 3). Ainsi, seules les sulforhodamines B et G ne sont pas correctement séparées en raison de ce pic (probablement isomère de la sulforhodamine B) à 7,21 min qui coélué avec la sulforhodamine G (7,06 min). Il a été nécessaire d'injecter séparément les sulforhodamines B et G lors de l'étalonnage.

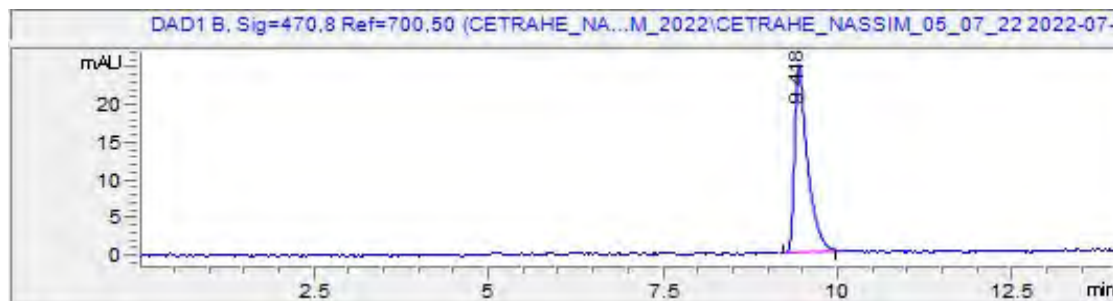


Figure 1 : Chromatogramme pour l'analyse de l'urarine à 470 nm.

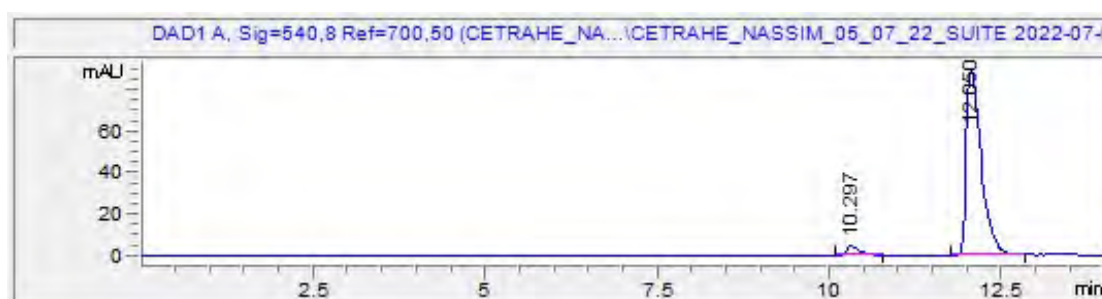


Figure 2 : Chromatogramme pour l'analyse de l'éosine à 540 nm.

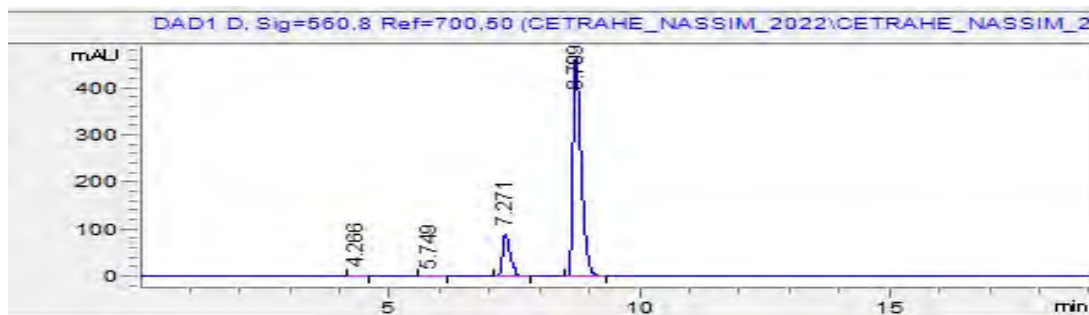


Figure 3 : Chromatogramme pour l'analyse de la sulforhodamine B à 560 nm.

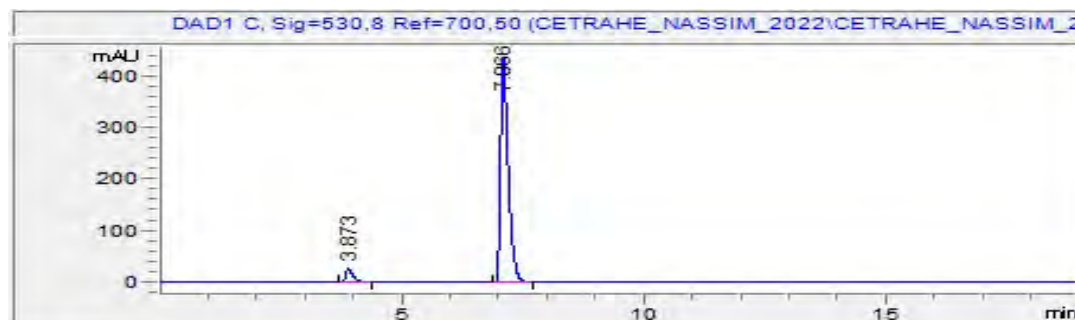


Figure 4 : Chromatogramme pour l'analyse de la sulforhodamine G à 530 nm.



Figure 5 : Chromatogramme pour l'analyse du naptionate de sodium à 320 nm.



Figure 6 : Chromatogramme pour l'analyse de l'acide amino G à 248 nm.

Un certain nombre de critères d'assurance qualité ont été contrôlés lors de la mise en place de ces méthodes d'analyse, à savoir :

- ▶ linéarité de la gamme d'étalonnage ;
- ▶ répétabilité de la préparation de la gamme d'étalonnage ;
- ▶ répétabilité de préparation d'échantillon ;
- ▶ justesse de la méthode.

L'ensemble de ces critères ont pu être validés (voir Tableau 3 ci-dessous).

Tableau 3 : Critères de validation des méthodes (Défarge et al.2020).

	URANINE	EOSINE	SULFORHODAMINE B	SULFORHODAMINE G	NAPHTIONATE DE SODIUM	ACIDE AMINO G
Linéarité (R ²)	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	0,998	0,998
Répétabilité gamme CV (%)	4,5 %	4,9 %	1,7 %	1,5 %	3,4 %	2,3 %
Répétabilité analyse étalon CV (%)	< 1 %	< 2 %	< 0,5 %	< 0,5 %	< 0,5 %	< 2 %
Justesse (écart relatif %)	< 3 %	< 3 %	< 3 %	< 1,5 %	< 3 %	< 5 %

2.3.3. Détermination de la teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche a été déterminée à l'aide d'une thermobalance de marque Mettler Toledo. La pesée est de 0,2 g puis l'échantillon est porté à 150 °C pendant 30 min, à la suite de quoi on procède à une nouvelle pesée.

2.3.4. Analyses complémentaires des sulforhodamines B et G

Les analyses suivantes ont été réalisées :

► Détermination de la teneur en insolubles pour la sulforhodamine G. Les particules insolubles ont été séparées par centrifugation et pesées. La teneur a pu être calculée et exprimée en g/100 g.

► Analyse des particules insolubles en MEB-EDX. Un Microscope Electronique à Balayage (MEB) muni d'un détecteur EDX (émission dispersive des rayons X) de paillasse JCM-7000 NeoScope de chez Jeol a été utilisé pour identifier et quantifier les éléments chimiques présents.

► Identification des impuretés par LC-MS. L'identification des impuretés des sulforhodamines B et G a été réalisée par LC/MS sur deux appareillages différents : un appareil de type piège ionique et un appareil haute résolution de type Q-TOF. Les méthodes sont détaillées en Annexe 4.

2.4. Analyses des produits anti-mousse

Les deux produits sélectionnés par Art E'Color sont :

► le **FLUXAIR 85 S GR Nymco**, qui est un mélange de cire de polyéthylène et d'esters d'acides gras dans de l'huile végétale ;

► le **LUCRAFOAM E 100 CONC Levaco Chemichals**, qui est un additif alimentaire E 471 composé de mono- et diglycérides d'acides gras alimentaires.

Dans un premier temps, des spectres en double balayage excitation et émission (voir 2.2.2) de chacun des deux produits anti-mousse ont été réalisés, afin de vérifier que ceux-ci ne sont pas fluorescents ou n'interfèrent avec la mesure de la fluorescence pour les deux traceurs concernés par cet essai (uranine et éosine).

La seconde étape a consisté à provoquer la formation de mousse lors de la mise en solution des cinq produits traceurs qui en avaient formé lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) : trois uranines (**F1Up1**, **F2Up1** et **F4Up2**) et deux éosines (**F1Ep1** et **F2Ep1**). Pour cela, une quantité croissante de chacun des cinq produits fluorescents en poudre a d'abord été ajoutée à 50 mL d'eau ultrapure, sous agitation magnétique, pour obtenir la formation de mousse.

3. Résultats

3.1. Caractérisations des produits traceurs réalisées à CETRAHE

Dans cette partie seront présentés les résultats des analyses qualitatives des produits traceurs, en poudre et en solution, de leurs CE et pH en solution, de leurs propriétés de fluorescence (caractérisation spectrale, intensité en fonction de la concentration), et de leur stabilité dans le temps et leur éventuelle biodégradabilité.

3.1.1. Analyses qualitatives, CE et pH

Les résultats complets des analyses qualitatives réalisées sont regroupés dans le Tableau 4 ci-dessous.

La tendance à la formation de grumeaux en raison de l'hygroscopie des poudres fait partie des caractéristiques qui avaient été couramment observées lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) pour l'acide amino G et le naphthionate de sodium ; seuls l'acide amino G sélectionné par Art E'Color la 1^{ère} année (**AGa1**) et le naphthionate de sodium Fluotechnik la 2^{ème} (**NSf2**) étant dans ce cas cette fois-ci (Tableau 4). La poudre de sulforhodamine B sélectionnée par Art E'Color la 2^{ème} année (**SBa2**) montre des traces d'humidité (Tableau 4), ce qui avait été également constaté sur une sulforhodamine B sélectionnée par Fluotechnik lors du 1^{er} projet (ainsi que sur une uranine venant d'un 3^{ème} fournisseur : Défarge *et al.* 2020).

Lors du premier projet, toutes les sulforhodamines avaient présenté des difficultés à être entièrement dissoutes (Défarge *et al.* 2020), ce qui n'est le cas que pour les sulforhodamines G cette fois-ci (Tableau 4).

Comme cela avait déjà été noté lors du premier projet, ces observations montrent que les fiches techniques des sulforhodamines G (indiquant une solubilité de l'ordre de 5 g/L, et un taux d'insolubles $\leq 0,2$ % dans celle du produit sélectionné par Art E'Color : Tableau 2) sont fausses de ce point de vue, et n'ont toujours pas été corrigées.

Les résultats mettent en évidence une forte homogénéisation des valeurs de CE et pH des solutions d'uranine et d'acide amino G préparées à partir des poudres sélectionnées par les deux partenaires fournisseurs (Tableau 4), due à l'eau ultrapure à pH ajusté grâce au tampon Tris-HCl utilisée pour les mises en solution dans le cas de ces deux traceurs (voir 2.2). Les résultats de la 2^{ème} année d'analyses montrent que c'est également le cas pour tous les traceurs quand ils sont mis en solution dans l'eau naturelle utilisée, même si c'est dans une moindre mesure pour la CE, celle de l'eau ultrapure tamponnée étant 6 à 10 fois supérieure à celle de l'eau naturelle (Tableau 4) ; sauf dans le cas des sulforhodamines, les CE des solutions fabriquées à partir d'eau naturelle restent classées dans le même ordre que celles des solutions à l'eau ultrapure (Tableau 4), ce qui traduit une influence significative des composants des poudres sur la CE.

En ce qui concerne le pH des solutions préparées avec les différents types d'eau la 2^{ème} année, par produit, les résultats semblent logiques pour tous les traceurs : la mise en solution de l'uranine conduit à une homogénéisation des pH des solutions autour de 8, quelle que soit l'eau utilisée (Tableau 4), le pH de ce traceur étant de 8 à 11 (valeurs données pour des concentrations différentes toutefois : Tableau 2) ; la mise en solution des poudres d'éosine et de naphthionate de sodium conduit à une baisse du pH par rapport à l'eau naturelle (de pH autour de 7,9) et une augmentation par rapport à l'eau ultrapure (de pH autour de 5,1 ; Tableau 4), les deux traceurs ayant un pH plutôt neutre à basique en solution (Tableau 2) ; la mise en solution des sulforhodamines conduit à une baisse du pH à la fois par rapport à l'eau naturelle et à l'eau ultrapure (Tableau 4), les deux traceurs ayant un pH acide à neutre en solution (Tableau 2) ; l'acide amino G conduit à une baisse du pH par rapport aux eaux naturelle et ultrapure, qui est empêchée par l'effet du tampon (Tableau 4).

Tableau 4 : Bilan des analyses qualitatives, et de CE et pH à 0,1 g/L pour les produits traceurs.

REFERENCE PRODUIT	CE à 25 °C µs/cm	CE eau ultrapure tamponnée	pH	pH eau ultrapure tamponnée	Observations particulières		
1^{ère} série							
Ua1	2 130	2080	7,92	7,96	-		
Uf1	2 120		7,94				
Ea1	29	2	5,69	5,38	CE mesurée à J+1 (problème électrode)		
Ef1	32		5,97				
F1Ep3	34		5,97				
SBa1	13	1	5,57	5,37	pH long à se stabiliser		
SBf1	57		5,78		Poudre très noire		
SGa1	17	1	5,35	5,54	Léger dépôt sur les bords du bécher, solution trouble		
SGf1	96		5,40		Léger dépôt sur le fond au départ, solution moins trouble que SGa1		
NSa1	28	1	5,64	5,28	CE mesurée à J+1 (problème électrode)		
NSf1	25		5,54				
AGa1	2 030	1 978	7,90	7,87	Gros morceaux dans poudre		
AGf1	2 030		7,91		-		
2^{ème} série							
REFERENCE PRODUIT	Type d'eau	CE à 25 °C µs/cm	CE eau	pH	pH eau	Observations particulières	
Ua2	Eau naturelle	352	304	7,86	7,92	-	
Uf2		345		7,88			
Ua2	Eau ultrapure	60	1	8,25	5,52		
Uf2		45		8,06			
Ua2	Eau ultra pure tamponnée	2820	2790	7,95	8,04		
Uf2		2810		7,91			
Ea2	Eau naturelle	331	305	7,70	7,91		
Ef2		327		7,71			
F1Ep3		331		7,68			
Ea2	Eau ultrapure	30	1	5,89	5,09		
Ef2		28		5,72			
F1Ep3		31		6,27			
SBa2	Eau naturelle	303	294	7,46	7,83	Sba2 : poudre humide à la pesée Sbf2 : poudre plus noire que SBa2	
SBf2		304		7,64			
SBf2bis		312		7,53			
SBa2	Eau ultrapure	16	1	5,90	5,94		
SBf2		20		5,99			
SBf2bis		24		4,82			
SGf1	Eau naturelle	404	302	7,65	7,85	En l'absence de nouveau produit Art E'Color (voir 2.1), on a choisi de doubler le suivi de celui fourni par Fluotechnik (SGf2) par celui de la 1 ^{ère} série du même fournisseur (SGf1)	
SGf2		387		7,80			
SGf1	Eau ultrapure	104	26	5,57	5,91		
SGf2		105		5,51			5,13
NSa2	Eau naturelle	321	302	7,69	7,85		Gros grumeaux dans NSf2
NSf2		318		7,73			
NSa2	Eau ultrapure	31	1	5,69	5,13		
NSf2		26		5,45			
AGa2	Eau naturelle	341	306	7,05	7,81	-	
AGf2		340		7,05			
AGa2	Eau ultrapure	113	1	3,43	4,85		
AGf2		113		3,49			
AGa2	Eau ultra pure tamponnée	1891*	1845	7,88	7,83		
AGf2		1892*		7,87			

On a porté en face de chaque produit la CE et le pH de l'eau (ultrapure pour les 2 séries, naturelle pour la série 2 uniquement) ayant servi aux mises en solution. Pour l'urarine et l'acide amino G, il s'agit d'une eau à pH ajusté par un tampon Tris-HCl pH 8,0 (voir 2.2).

Pour les solutions préparées à partir d'eau ultrapure non tamponnée (autres traceurs que l'uranine et l'acide amino G, et uranine et acide amino G lors de la 2^{ème} année du projet), on peut faire les observations suivantes (Tableau 4) :

► Uranine. Les poudres sélectionnées par les deux partenaires fournisseurs la 2^{ème} année sont distinctes du point de vue CE et pH des solutions à 0,1 g/L, les valeurs de **Ua2** étant supérieures à celles de **Uf2**.

► Eosine. Les CE de tous les produits en solution sont très proches (28 à 34 $\mu\text{S}/\text{cm}$: Tableau 4), celles du produit **F1Ep3** étant par ailleurs conformes à la valeur obtenue lors du premier projet (38 $\mu\text{S}/\text{cm}$: Défarge *et al.* 2020). Les pH sont plus variables (5,69 à 6,27 : Tableau 4), les deux produits les plus proches (**F1Ep3** et l'éosine sélectionnée par Fluotechnik la 1^{ère} année : **Ef1**) ayant des références et numéros de lot montrant que les deux produits proviennent du même fournisseur (Tableau 1).

► Sulforhodamine B. Du point de vue de leur CE, trois groupes de produits peuvent être distingués (Tableau 4) : le produit sélectionné par Fluotechnik la 1^{ère} année (**SBf1**), avec une CE de 57 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et dont la couleur de la poudre est la plus noire ; ceux sélectionnés la 2^{ème} année (**SBf2** et **SBf2bis**), avec des CE de 20 et 24 $\mu\text{S}/\text{cm}$; enfin les produits sélectionnés par Art E'Color (**SBa1** et **SBa2**), qui proviennent du même fournisseur (Tableau 1), dont les CE sont les plus faibles : 13 et 16 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La CE de **SBf1** le rapproche du produit standard *Sigma Aldrich* analysé lors du premier projet (CE = 52 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dont la teneur en sulforhodamine B avait été estimée à 83,7 % (Défarge *et al.* 2020).

Les pH en solution des produits proches sont en revanche très éloignés les uns des autres : 5,57 et 5,90 pour Art E'Color ; 4,82 et 5,99 pour Fluotechnik (Tableau 4).

► Sulforhodamine G. En tenant compte de la qualité légèrement dégradée de l'eau ultrapure utilisée pour fabriquer les solutions de ce traceur la 2^{ème} année (avec une CE de 26 $\mu\text{S}/\text{cm}$, contre 1 à 2 habituellement : Tableau 4), les produits sélectionnés par Fluotechnik montrent des CE proches (96 à 105 $\mu\text{S}/\text{cm}$), très peu variables pour celui analysé les deux années (**SGf1** : Tableau 4), et très supérieures à celle du produit sélectionné par Art E'Color (**SGa1** : 17 $\mu\text{S}/\text{cm}$), qui se rapproche de celle du produit standard *Sigma Aldrich* analysé lors du premier projet (19 $\mu\text{S}/\text{cm}$), dont la teneur en sulforhodamine G avait été estimée à 99,5 % (Défarge *et al.* 2020).

La proportion des insolubles, en revanche, paraît, à l'œil, supérieure dans ce dernier produit (**SGa1**) à ce qu'elle est dans celui sélectionné par Fluotechnik (**SGf1** : Tableau 4).

En tenant compte des pH variables des eaux ultrapures utilisées (y compris la 2^{ème} année pour les deux produits qui ont dû être analysés, à la suite d'une erreur de manipulation, à un jour de distance : Tableau 4), on peut considérer que les pH en solution des trois produits analysés sont proches, car proches deux à deux (Tableau 4).

► Naphtionate de sodium. Les produits sélectionnés par les deux fournisseurs ont des CE et pH en solution distincts, légèrement plus élevés dans le cas des produits Art E'Color, et proches d'une série à l'autre (Tableau 4).

Ces valeurs sont également assez proches de celles du produit standard *Sigma Aldrich* analysé lors du premier projet (CE = 30 $\mu\text{S}/\text{cm}$ et pH = 5,56 ; comparer avec Tableau 4), dont la teneur en naphtionate de sodium avait été estimée entre 77,96 et 79,90 % (Défarge *et al.* 2020).

► Acide amino G. Les poudres sélectionnées par les deux partenaires fournisseurs la 2^{ème} année (**AGa2** et **AGf2**) sont très proches du point de vue CE et pH des solutions à 0,1 g/L (Tableau 4).

3.1.2. Caractérisation spectrale

Les résultats complets de la caractérisation spectrale des traceurs commerciaux (détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des composés fluorescents qu'ils contiennent ; voir 2.2.2) sont regroupés dans l'Annexe 6.

Ils sont tout à fait conformes à ceux obtenus lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), en particulier :

► **Aucun autre composé fluorescent que le traceur vendu n'a été, dans chaque cas, identifié dans les produits analysés.**

► **Les maximums d'excitation et d'émission sont conformes aux données de la littérature (Annexe 6).**

► **L'analyse de la forme des pics n'a par ailleurs montré aucune anomalie particulière qui pourrait traduire la présence de sous-produits parasites.**

Du point de vue des caractéristiques spectrales, tous les produits commerciaux analysés jusque-là dans le cadre des deux projets sont donc de qualité conforme à une utilisation comme traceurs hydrogéologiques.

3.1.3. Intensité de fluorescence

Le but de ce volet de l'étude étant d'évaluer les rendements de fluorescence (voir 2.2.3) des produits, de les comparer entre eux, et de vérifier la linéarité de leur intensité de fluorescence en fonction de leur concentration en solution (et donc la possibilité d'établir des droites d'étalonnage pour la mesure de la fluorescence à partir de ces produits), on ne présentera dans cette section 3.1.3 que les mesures d'intensité réalisées sur les solutions fabriquées à partir d'eau ultrapure ou, dans le cas de l'uranine et de l'acide amino G, d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (voir 2.2). Les mesures d'intensité réalisées la 2^{ème} année sur les solutions fabriquées à partir d'eau naturelle et, dans le cas de l'uranine et de l'acide amino G, d'eau ultrapure non tamponnée, sont présentées dans la section suivante (3.1.4).

Les mesures d'intensité de fluorescence réalisées sur des solutions de deux concentrations différentes de chaque produit traceur sont présentées dans les Figures 7 à 12 ci-dessous. Les résultats sont présentés et discutés ci-après par type de traceur. Dans chaque cas, ils sont représentés à la fois sous forme de graphiques en barres permettant de comparer les intensités de fluorescence mesurées pour chaque produit aux différentes concentrations, et sous forme de courbe *intensité = f(concentration)*, en incluant l'intensité mesurée pour une concentration nulle sur un blanc d'eau ultrapure dans les mêmes conditions ; cette dernière représentation correspond aux droites d'étalonnage qui sont utilisées pour déterminer la concentration des traceurs dans les eaux analysées au laboratoire. Les intensités ont été corrigées par soustraction de l'intensité mesurée sur le blanc d'eau ultrapure analysé au début de chaque série de mesures. En raison de l'application d'une correction par l'aire du pic Raman de l'eau (voir 2.2.3), les valeurs d'intensité sont portées en *Unités Raman* (U.R. : Lawaetz & Stedmon 2009).

3.1.3.1. Uranine

Les résultats obtenus pour les uranines sont présentés dans la Figure 7 ci-dessous. Les quatre produits montrent des comportements comparables, et notamment une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution (ce qui était déjà le cas pour les uranines analysées lors du premier projet, à partir du moment où il avait été choisi d'expérimenter un ajustement du pH par le tampon Tris-HCl : Défarge *et al.* 2020).

L'ordre des intensités de fluorescence aux deux concentrations (10 et 15 µg/L : Figure 7) est semblable, indépendant de la série, et permet de classer les produits par intensité décroissante, qui devrait indiquer une concentration en traceur également décroissante, d'après les résultats obtenus lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) : **Uf2 > Ua1 > Uf1 > Ua2.**

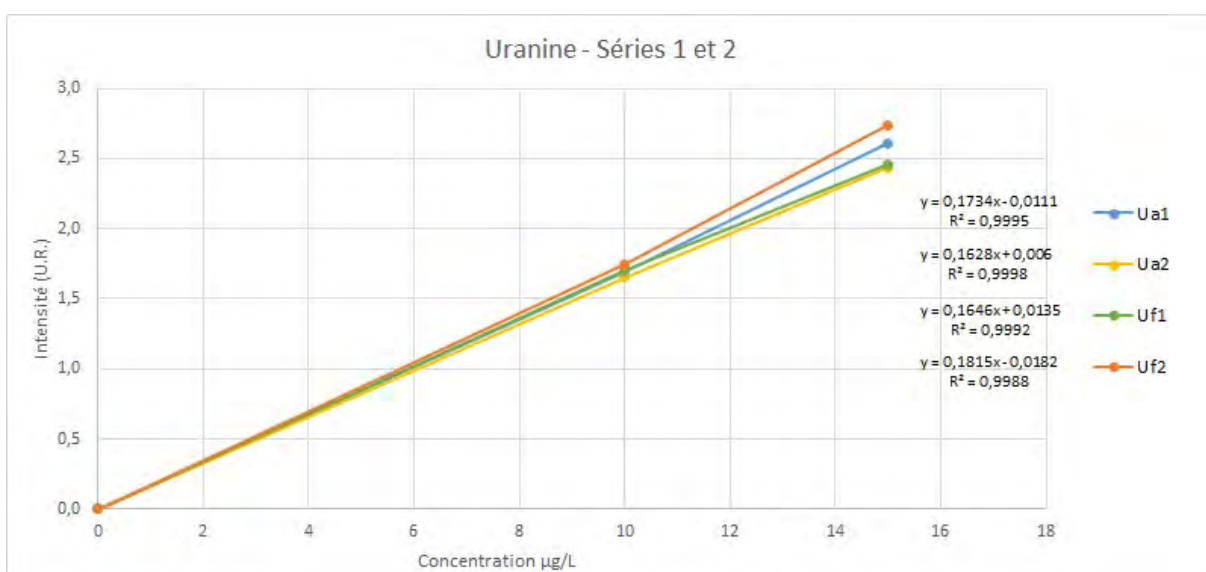
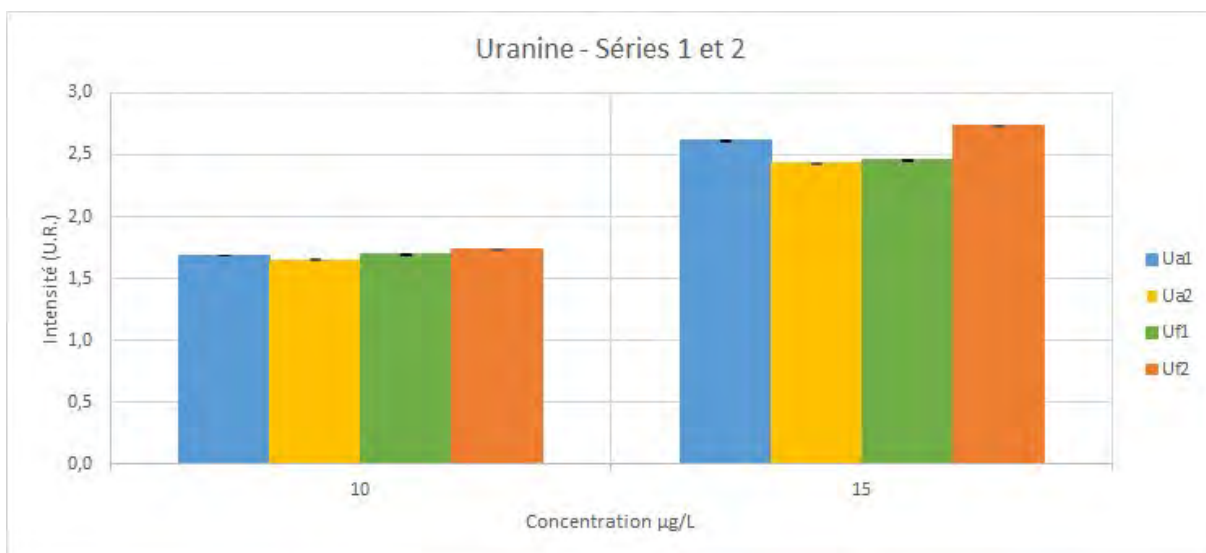


Figure 7 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'uranine étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

3.1.3.2. Eosine

Les résultats obtenus pour les éosines sont présentés dans la Figure 8 ci-dessous. Les cinq produits (celui issu du premier projet, **F1Ep3**, ayant été réanalysé dans les deux séries) montrent des comportements comparables, et notamment une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution (ce qui était déjà le cas pour les éosines analysées lors du premier projet : Défarge *et al.* 2020).

Les intensités de fluorescence sont en revanche systématiquement supérieures, pour un même fournisseur, lors de la 2^{ème} série, ce qui est également le cas pour le produit analysé deux fois, ce qui traduit une influence des conditions analytiques, pas complètement corrigée par la méthode de Lawaetz & Stedmon (2009).

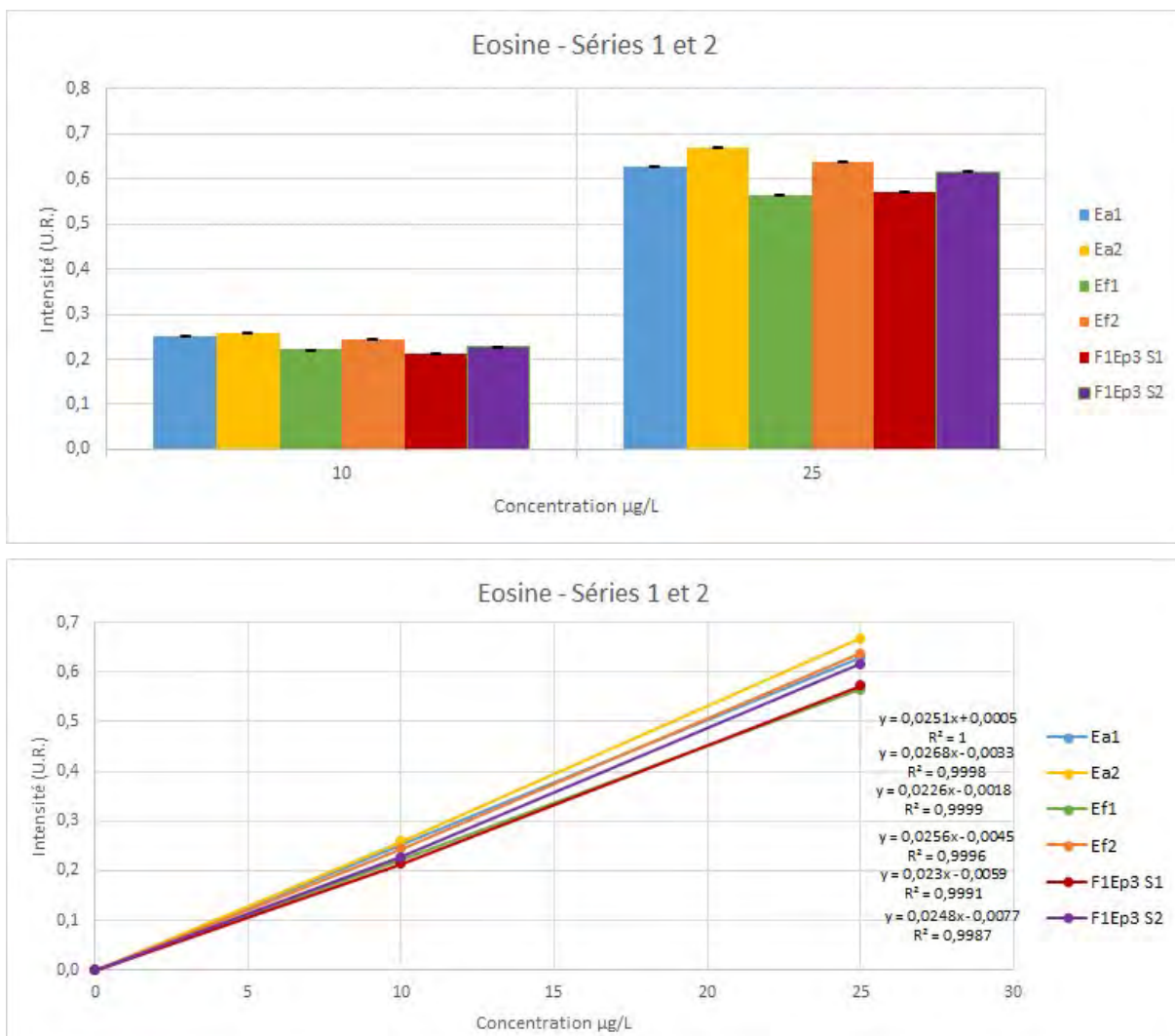


Figure 8 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'éosine étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

Les valeurs d'intensité de fluorescence du produit issu du premier projet restent toutefois proches d'une série à l'autre, et proches de celles obtenues à l'époque, aux deux concentrations (0,21-0,23 contre 0,24 à 10 µg/L, et 0,57-0,62 contre 0,59 à 25 µg/L : Figure 8 et Défarge et al. 2020), ce qui confirme une nouvelle fois que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour un même appareil d'un même laboratoire (Défarge et al. 2020).

3.1.3.3. Sulforhodamine B

Les résultats obtenus pour les sulforhodamines B sont présentés dans la Figure 9 ci-dessous. Les cinq produits montrent une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution, quoique globalement légèrement inférieure à ce qui avait été obtenu pour les sulforhodamines B du premier projet (dont les R^2 étaient de 0,999 ou 1 : Défarge et al. 2020). Une linéarité imparfaite pouvant traduire un défaut de dissolution des poudres qui avait été noté pendant le premier projet (Défarge et al. 2020), les mesures ont été refaites au bout de 24 h lors de la 1^{ère} série, ce qui améliore effectivement légèrement le R^2 pour les deux produits (de 0,9970 à 0,9971 pour **SBa1** ; de 0,9831 à 0,9996 pour **SBf1**).

L'ordre des intensités de fluorescence aux deux concentrations (10 et 25 µg/L : Figure 9) est semblable, indépendant de la série, et permet de classer les produits par intensité décroissante, qui devrait indiquer une concentration en traceur également décroissante,

d'après les résultats obtenus lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) : **SBa1** > **SBa2**-**SBf2** > **SBf2bis** > **SBf1**. Ce classement, même s'il ne recoupe pas parfaitement celui des CE des produits en solution (**SBa1-SBa2** < **SBf2-SBf2bis** < **SBf1** ; voir 3.1.1), indiquerait tout de même une influence sur l'augmentation de la CE, de composants autres que la sulforhodamine B dans les poudres.

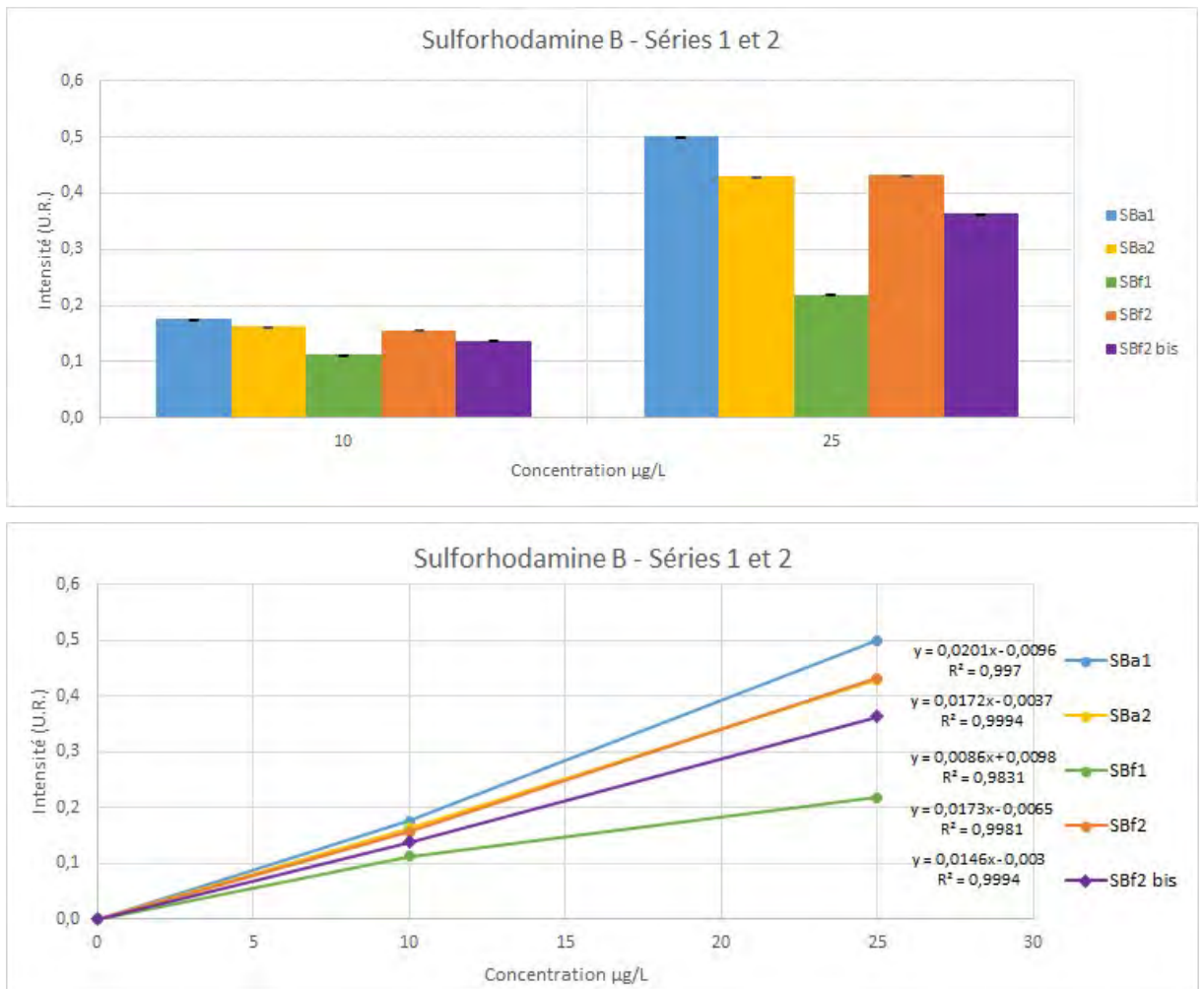


Figure 9 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine B étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; au centre et en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

3.1.3.4. Sulforhodamine G

Les résultats obtenus pour les sulforhodamines G sont présentés dans la Figure 10 ci-dessous. Les quatre produits montrent globalement une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution, avec quelques nuances (Figure 10). Une linéarité imparfaite pouvant traduire un défaut de dissolution des poudres qui avait été noté pendant le premier projet (Défarge *et al.* 2020), en raison des difficultés de dissolution des poudres notées plus haut (voir 3.1.1), les mesures ont été refaites au bout de 4 jours pour les produits de la 1^{ère} série, ce qui améliore effectivement nettement le R² du produit sélectionné par Fluotechnik (**SGf1** : R² = 0,9915 à 1), mais pas celui sélectionné par Art E'Color (**SGa1** : R² = 0,9991 à 0,9989). Les résultats des analyses des produits Fluotechnik effectuées lors de la 2^{ème} série apparaissent les plus proches (Figure 10), comme c'était également le cas de leurs CE et pH en solution (Tableau 4).

Le produit sélectionné par Art E'Color (**SGa1**) se distingue par une intensité de fluorescence significativement supérieure à celles des produits sélectionnés par Fluotechnik (**SGf1 et SGf2**), aux deux concentrations (Figure 10), ce qui devrait indiquer une concentration en traceur supérieure, d'après les résultats obtenus lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020). Les CE également nettement supérieures des produits

Fluotchnik (96 à 105 vs. 17 $\mu\text{S}/\text{cm}$: Tableau 3) seraient alors dues dans ce cas à la présence dans la poudre d'autres composants que le traceur.

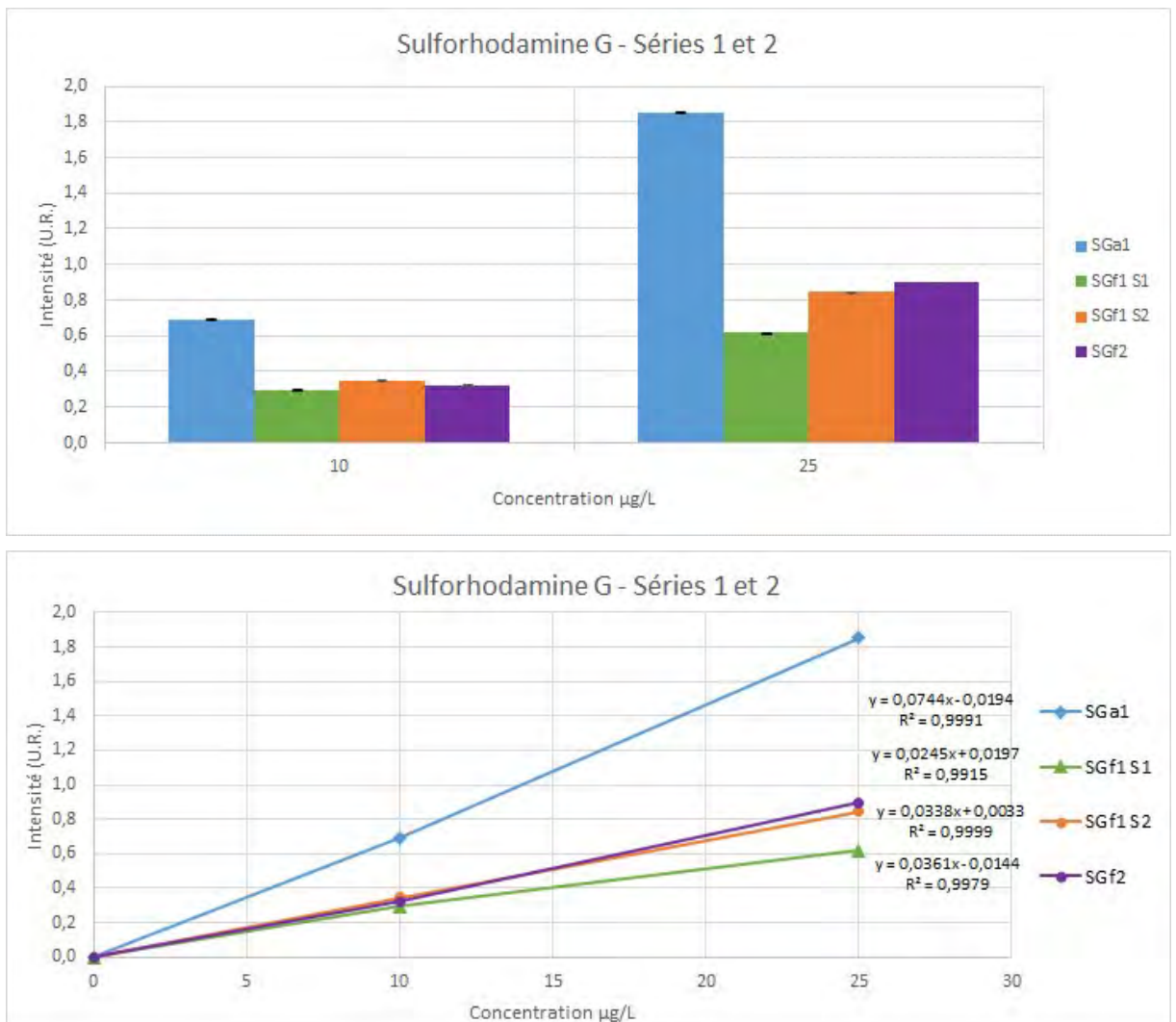


Figure 10 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine G étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; au centre et en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

Les intensités de fluorescence des produits Fluotchnik sont très proches à 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, mais plus éloignées à 0,25 $\mu\text{g}/\text{L}$ pour le produit analysé lors des deux séries (**SGf1** : Figure 10), ce qui traduit une influence des conditions analytiques, pas complètement corrigée par la méthode de Lawaetz & Stedmon (2009). Les difficultés de dissolution des sulforhodamines G (voir 3.3.1) pourraient également expliquer ce relatif manque d'homogénéité des intensités d'une série à l'autre.

Les valeurs d'intensité de fluorescence du produit analysé lors des deux séries d'analyse (SGf1) restent toutefois globalement proches d'une série à l'autre (0,30 et 0,35 à 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, et 0,62 et 0,85 à 25 $\mu\text{g}/\text{L}$: Figure 10), ce qui confirme une nouvelle fois que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une certaine harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour un même appareil d'un même laboratoire (Défarge et al. 2020).

3.1.3.5. Naphtionate de sodium

Les résultats obtenus pour les poudres de naphtionate de sodium sont présentés dans la Figure 11 ci-dessous. Les quatre produits montrent des comportements légèrement différents, mais dans tous les cas des linéarités de la relation entre intensité de

fluorescence et concentration en solution excellentes et extrêmement proches (Figure 11) ; c'était déjà le cas pour les produits analysés lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020).

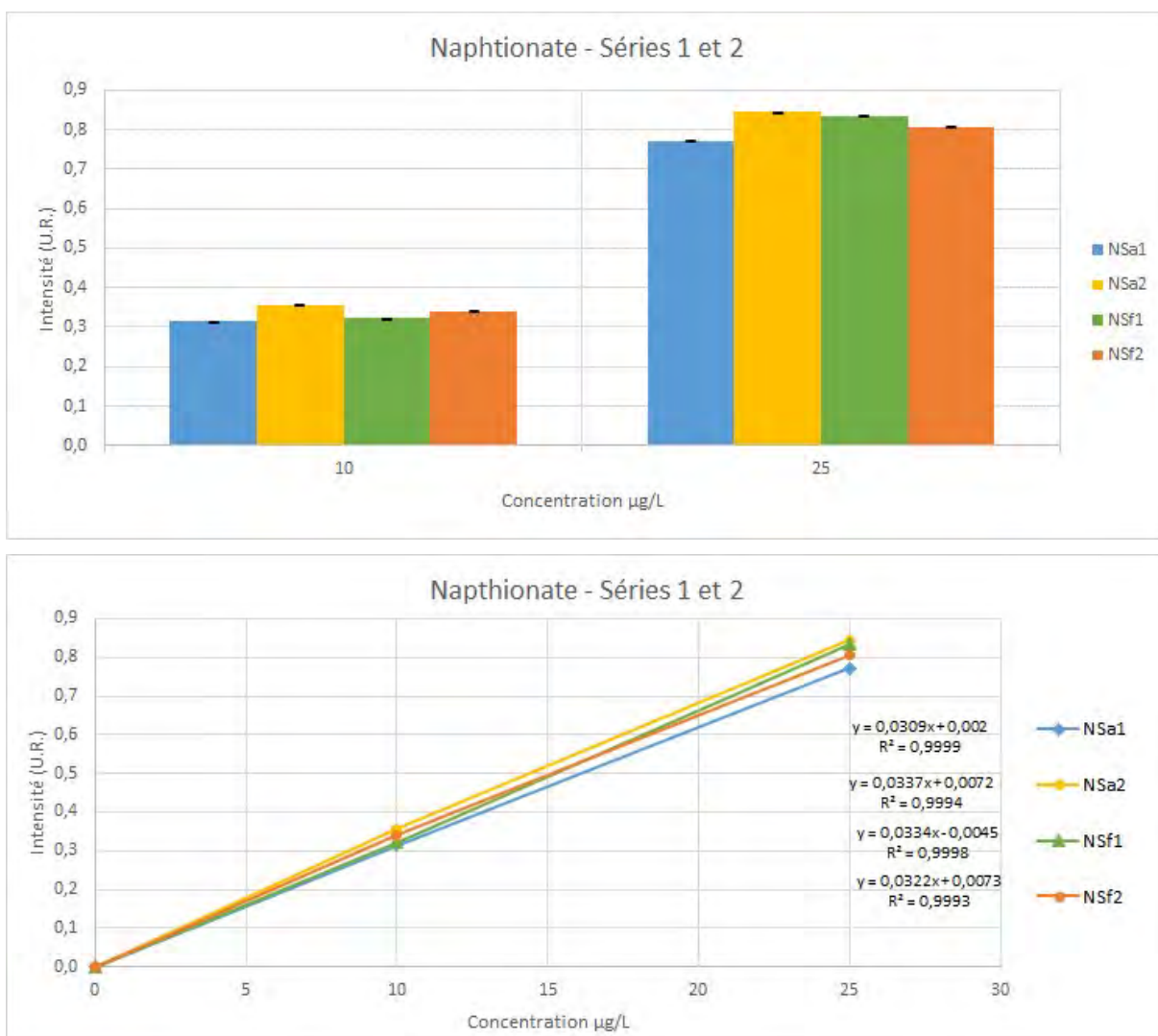


Figure 11 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de naphthionate de sodium étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

Du point de vue intensité de fluorescence en solution, les produits sélectionnés par Art E'Color encadrent ceux sélectionnés par Fluotechnik, le produit de la 2^{ème} série (**NSa2**) montrant les intensités les plus fortes, et celui de la 1^{ère} série (**NSa1**) les plus faibles, ce classement ne recoupant pas les valeurs de CE mesurées (voir Tableau 4).

3.1.3.6. Acide amino G

Les résultats obtenus pour les poudres d'acide amino G sont présentés dans la Figure 12 ci-dessous. Les quatre produits montrent une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution (ce qui était déjà le cas pour les poudres d'acide amino G analysées lors du premier projet : Défarge *et al.* 2020).

L'ordre des intensités de fluorescence n'est pas parfaitement cohérent entre les deux concentrations (10 et 25 µg/L : Figure 12), et donne le classement suivant : **AGa1-AGf1** > **AGf2** > **AGa2**. Cet ordre pourrait indiquer une concentration en traceur également décroissante, d'après les résultats obtenus lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), mais les intensités de fluorescence étant supérieures, pour un même fournisseur, lors de la 1^{ère} série, on ne peut exclure une influence des conditions analytiques, qui ne serait pas complètement corrigée par la méthode de Lawaetz & Stedmon (2009).

Les deux produits de la 2^{ème} série ont les comportements les plus proches (Figure 12), ce qui est cohérent avec leurs CE et pH en solution également très proches (voir Tableau 4).

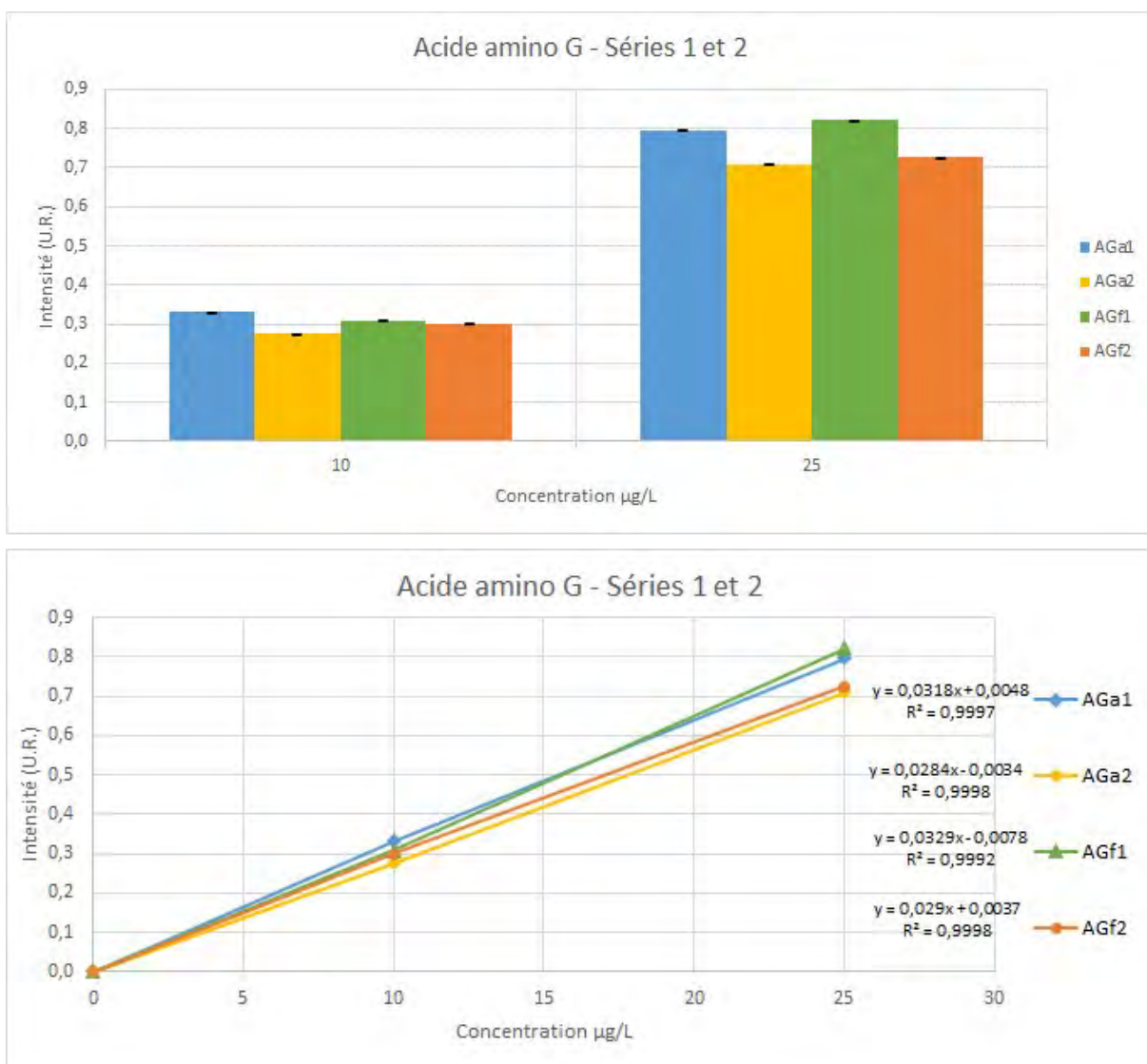


Figure 12 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'acide amino G étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

3.1.4. Stabilité dans le temps et dégradabilité

Les courbes d'évolution avec le temps, à l'obscurité et à la température ambiante (du laboratoire CETRAHE), de l'intensité de fluorescence des solutions de deux concentrations différentes de chaque produit (10 et 15 ou 25 µg/L : voir 2.2.4), préparées avec de l'eau ultrapure, de l'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl pH 8 (pour l'uranine et l'acide amino G : voir 2.2.4), et/ou de l'eau naturelle (de la source karstique du Bouillon : voir 2.2), sont présentées ci-dessous (Figures 13 à 19) et dans l'Annexe 7 (pour les suivis de stabilité des solutions des traceurs autres que l'acide amino G, dans les premières heures à semaines suivant leur préparation, réalisées la 1^{ère} année du projet : voir 2.2.4.2), par type de traceur. Les courbes, réalisées la 2^{ème} année du projet, qui montrent l'évolution comparée de l'intensité de fluorescence des produits dans l'eau naturelle et dans l'eau ultrapure à pH ajusté (pour l'uranine et l'acide amino G) ou pas (tous les traceurs : Figures 13-17 et 19), sont précédées d'un graphe présentant les intensités de fluorescence des solutions concernées à t₀.

L'intensité de fluorescence est exprimée en % d'intensité résiduelle par rapport à l'intensité mesurée à t₀, fixée arbitrairement à 100 %. Les intensités ont été préalablement corrigées par soustraction de l'intensité mesurée sur le blanc d'eau ultrapure, d'eau ultrapure à pH ajusté avec le tampon Tris-HCl, ou d'eau de la source du Bouillon, qui a été conservé à l'obscurité

avec les solutions de traceurs (voir 2.2.4.2), puis par l'aire du pic Raman de l'eau (voir 2.2.3). La température, envisagée *a posteriori* comme facteur pouvant expliquer certains résultats, est celle de l'air, à l'instant précis de la mesure, enregistrée à la station météorologique la plus proche du laboratoire CETRAHE (<https://www.infoclimat.fr/observations-meteo/temps-reel/orleans-bricy/07249.html>), consulté le 15 novembre 2023.

3.1.4.1. Uranine

Les résultats obtenus pour l'uranine sont présentés dans la Figure 13 ci-dessous et dans l'Annexe 7. Les intensités de fluorescence à t_0 des produits dans l'eau ultrapure sont distinctement inférieures à ce qu'elles sont dans l'eau ultrapure à pH ajusté avec le tampon Tris-HCl et dans l'eau naturelle, qui sont proches, très légèrement supérieures pour les deux produits et aux deux concentrations pour cette dernière (Figure 13). Ce résultat était attendu puisqu'il a été montré que l'intensité de l'uranine en solution, constante de pH 7 à 11, chute rapidement avec le pH au-dessous de 7 d'après Smart & Laidlaw (1977), et même en deçà de 9 d'après Käss (1998) ; les intensités dans les trois types d'eaux reflètent donc l'influence respective des pH de celles-ci, qui était à 5,52 pour l'eau ultrapure, 8,04 pour l'eau tamponnée et 7,92 pour l'eau naturelle (Tableau 4). La légère différence d'intensité entre les solutions dans l'eau tamponnée et l'eau naturelle, non explicables par la différence de pH, peut être attribuée à la contribution de la fluorescence de matières organiques (MO) présentes dans l'eau naturelle.

Les résultats obtenus dans l'eau ultrapure non tamponnée posent toutefois question : la différence d'intensité avec les autres eaux est très différente aux deux concentrations pour les deux produits, et l'intensité des solutions à 10 $\mu\text{g/L}$ augmente ensuite progressivement jusqu'à 3 semaines pour atteindre un plateau correspondant à des intensités proches, et proches de celles des deux autres types de solutions de même concentration (résultats bruts non montrés dans la Figure 13, où l'intensité de fluorescence est exprimée en % par rapport à l'intensité à t_0). Par ailleurs, les intensités brutes à t_0 étaient plus élevées, notamment à 15 $\mu\text{g/L}$, que celles habituellement mesurées à CETRAHE dans les mêmes conditions.

Un nouveau suivi a donc été reproduit sur l'un des produits (**Uf2**), avec suivi du pH et de la CE des solutions à 10 et 15 $\mu\text{g/L}$; les résultats obtenus jusqu'ici sont portés dans le Tableau 5 ci-dessous. Les intensités habituelles ont été retrouvées à t_0 , celle de la solution à 10 $\mu\text{g/L}$ évoluant peu jusqu'à 12 jours, celle de la solution à 15 $\mu\text{g/L}$ augmentant de 25 %. Les intensités de fluorescence inhabituellement élevées lors du 1^{er} suivi (Figure 13) pourraient donc être dues au pH moins acide de l'eau ultrapure (5,52 contre 4,22, se traduisant par un pH de la solution à 0,1 g/L de 8,06 contre 7,22 : comparer Tableaux 4 et 5 ; la baisse d'une unité de pH < 7 se traduit par la baisse de 20 à 40 % de la fluorescence de l'uranine : Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998). Toutefois, le pH de la solution à 10 $\mu\text{g/L}$ du 2^{ème} suivi évolue également d'une unité (Tableau 5), sans que son intensité de fluorescence change ; et celui de la solution à 15 $\mu\text{g/L}$ fluctue entre 4,76 et 5,16 (Tableau 5) alors que sa fluorescence augmente dans le même temps. **L'augmentation similaire de la CE des solutions (Tableau 5), traduisant la possible libération de composés dissous, ne permet pas non plus de conclure à ce stade, mais pourrait être une piste d'explication.**

Tableau 5 : Evolution avec le temps du pH et de la CE des solutions d'uranine Uf2 à 10 et 15 $\mu\text{g/L}$ fabriquées à partir d'eau ultrapure.

	pH à 0,1 g/L	pH eau ultrapure	CE à 25 °C à 0,1 g/L ($\mu\text{s/cm}$)	CE eau ultrapure		pH à 10 $\mu\text{g/L}$	CE à 25 °C à 10 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{s/cm}$)	pH à 15 $\mu\text{g/L}$	CE à 25 °C à 15 $\mu\text{g/L}$ ($\mu\text{s/cm}$)
t_0	7,22	4,22	59	1		4,37	3	5,10	2
4 j.	-	-	-	-		4,60	5	4,76	13
12 j.	-	-	-	-		5,31	17	5,16	14

En dehors du cas des solutions à 10 $\mu\text{g/L}$, les 5 autres solutions d'uranine ont un comportement similaire avec le temps jusqu'à 4,4 mois, sauf celle à 15 $\mu\text{g/L}$ préparée dans l'eau naturelle avec le produit **Uf2**, dont l'intensité de fluorescence résiduelle baisse entre 2,4 et 4,4 mois jusqu'à atteindre près de 80 %, contre plus de 93 % pour les autres solutions ; la solution à 10 $\mu\text{g/L}$ du même traceur dans l'eau naturelle montre également à 4,4 mois l'intensité résiduelle la plus faible du groupe des autres solutions (Figure 13).

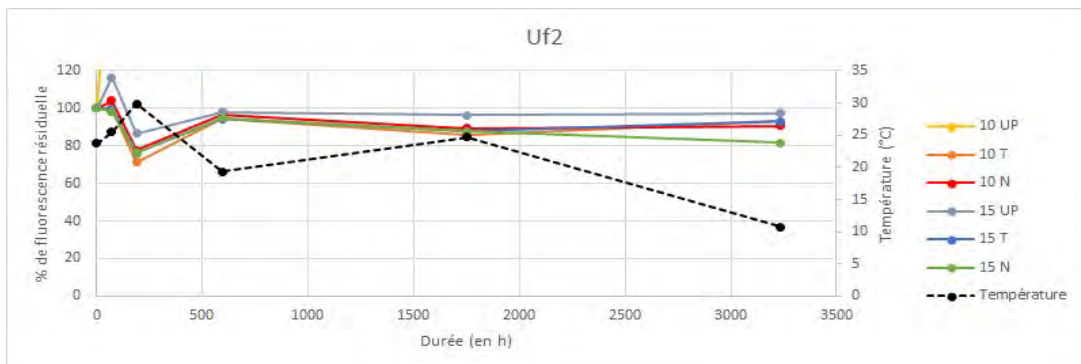
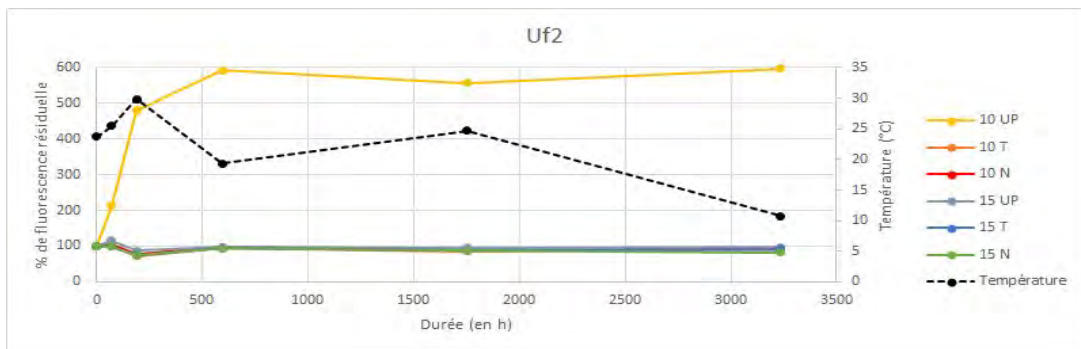
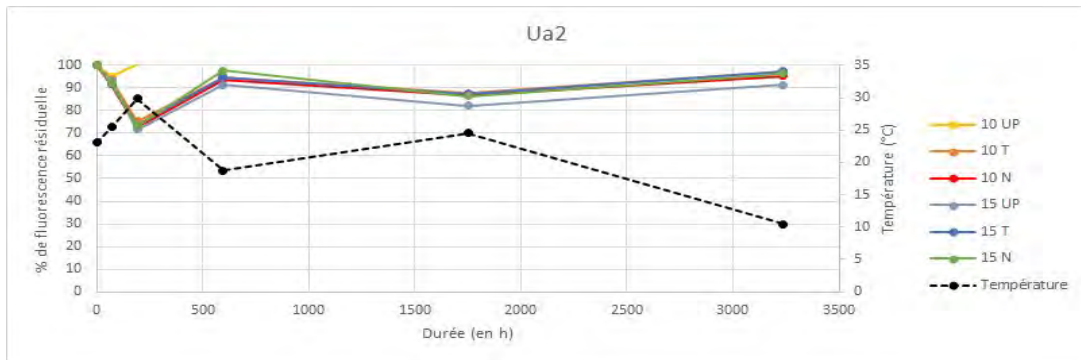
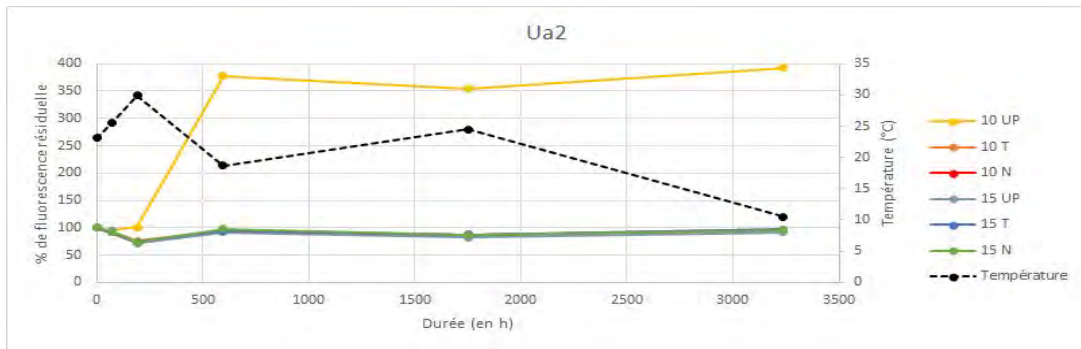
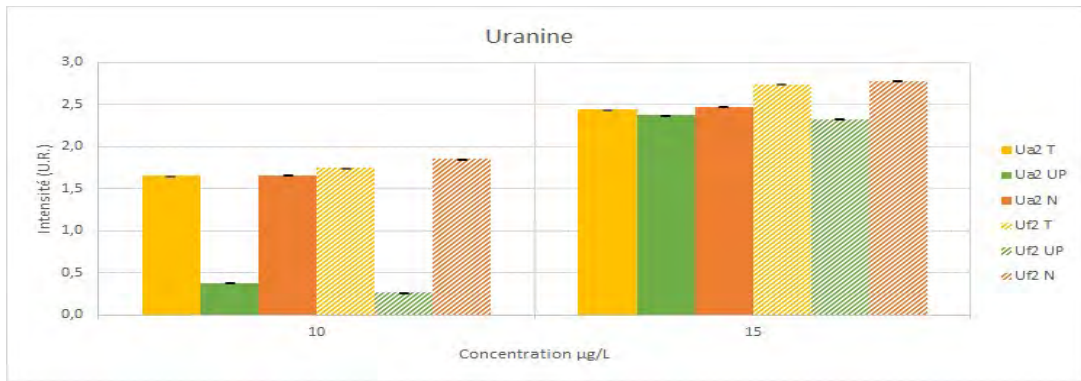


Figure 13 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'uranine de concentration 10 et 15 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N), d'eau ultrapure (U) et d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (T). En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 4 mois par produit.

Les fluctuations parallèles d'intensité résiduelle de la plupart des solutions, avec un minimum à 1 semaine, une remontée à 3 semaines, suivie d'une nouvelle baisse, moins marquée, à 2,4 mois, avant une remontée à 4,4 mois, apparaissent majoritairement liées aux fluctuations de température (Figure 13 ; voir également Annexe 7 pour les résultats de la 1^{ère} année), l'intensité de fluorescence variant en sens inverse de celle-ci (Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998, Défarge *et al.* 2020).

3.1.4.2. Eosine

Les résultats obtenus pour les poudres d'éosine sont présentés dans la Figure 14 ci-dessous et dans l'Annexe 7. Les intensités de fluorescence à t_0 de chaque produit sont similaires quel que soit le type d'eau utilisé pour fabriquer les solutions (Figure 14). Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature, qui montrent que la fluorescence de l'éosine est indépendante du pH au-dessus de 5,4 (Leibundgut *et al.* 2009), correspondant au domaine de pH de nos solutions (voir Tableau 4, même si les valeurs données le sont à la concentration de 0,1 g/L).

Toutes les solutions d'éosine ont un comportement semblable avec le temps jusqu'à 4,5 mois (Figure 14), et montrent notamment des fluctuations d'intensité résiduelle de fluorescence similaires à celles observées pour la plupart des solutions d'uranine, avec toutefois des minima moins marqués (comparer Figures 13 et 14), cohérents avec la moindre dépendance de la fluorescence de l'éosine à la température connue dans la littérature (Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009, Défarge *et al.* 2020 ; voir également Annexe 7 pour les résultats de la 1^{ère} année). Contrairement à l'uranine, aucune solution ne présente à 4,5 mois une intensité de fluorescence résiduelle inférieure à 88 % (Figure 14).

3.1.4.3. Sulforhodamine B

Les résultats obtenus pour les poudres de sulforhodamine B sont présentés dans la Figure 15 ci-dessous et dans l'Annexe 7. Les intensités de fluorescence à t_0 des produits dans l'eau ultrapure sont généralement inférieures à ce qu'elles sont dans l'eau naturelle (Figure 15). Ce résultat, qui ne peut être attribué aux différences de pH des solutions préparées avec les deux types d'eau (Tableau 4), étant donné que la sulforhodamine B garde sa fluorescence maximale entre pH 3,5 et 10 (Smart & Laidlaw 1977), est probablement dû à la contribution de la fluorescence de MO présentes dans l'eau naturelle.

Comme dans le cas de la plupart des solutions d'uranine (Figure 13) et de l'éosine (Figure 14), les solutions de sulforhodamine B montrent des fluctuations d'intensité résiduelle de fluorescence parallèles, mais toutefois différentes de celles des deux premiers traceurs, avec notamment un seul minimum, à 2,5 mois (comparer Figures 15 et 13-14). De plus, leur amplitude est distinctement supérieure à celles des deux premiers traceurs (Figures 15 et 13-14), effet dû à la température (déjà observé lors du 1^{er} projet : Défarge *et al.* 2020), ce traceur étant l'un des plus dépendants à ce facteur, avec un coefficient de température environ 10 fois supérieur aux autres traceurs étudiés ici (Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998).

Dans les premiers jours suivant la mise en solution des produits, certaines fluctuations de l'intensité de fluorescence résiduelle ne peuvent être expliquées par l'évolution de leur température, puisqu'elles évoluent dans le même sens que celle-ci : il s'agit pour l'essentiel de baisses de fluorescence de solutions préparées avec l'eau naturelle (**SBa2** 25N, **SBf2** 10N et 25N, **SBf2bis** 10N et 25N : Figure 15 ; voir également Annexe 7 pour les résultats de la 1^{ère} année).

On observe généralement, pour les trois produits étudiés, un écart d'intensité résiduelle de fluorescence entre les solutions des deux concentrations préparées dans la même eau, malgré des évolutions parallèles, les intensités résiduelles des solutions à 10 µg/L étant distinctement supérieures à celles des solutions à 25 µg/L (Figure 15) ; ce phénomène n'a pas été observé dans le cas de l'uranine ou de l'éosine (comparer Figures 15 et 13-14).

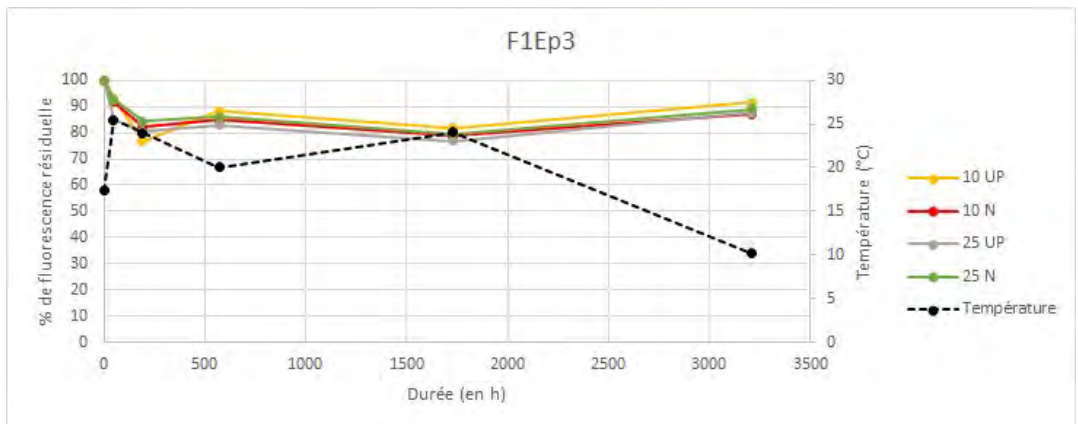
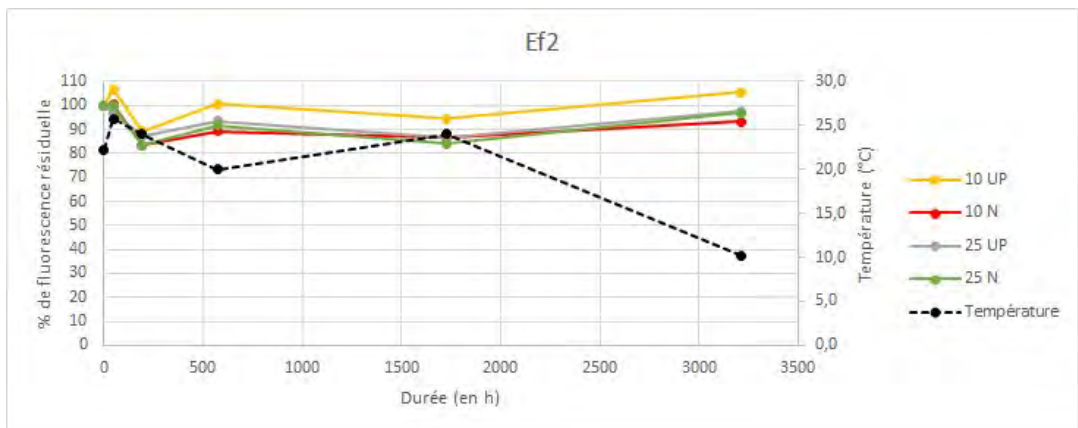
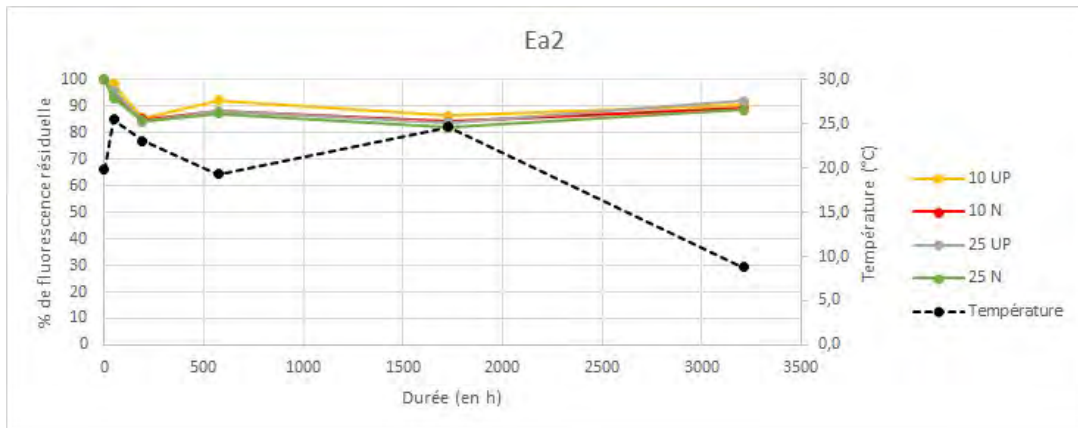
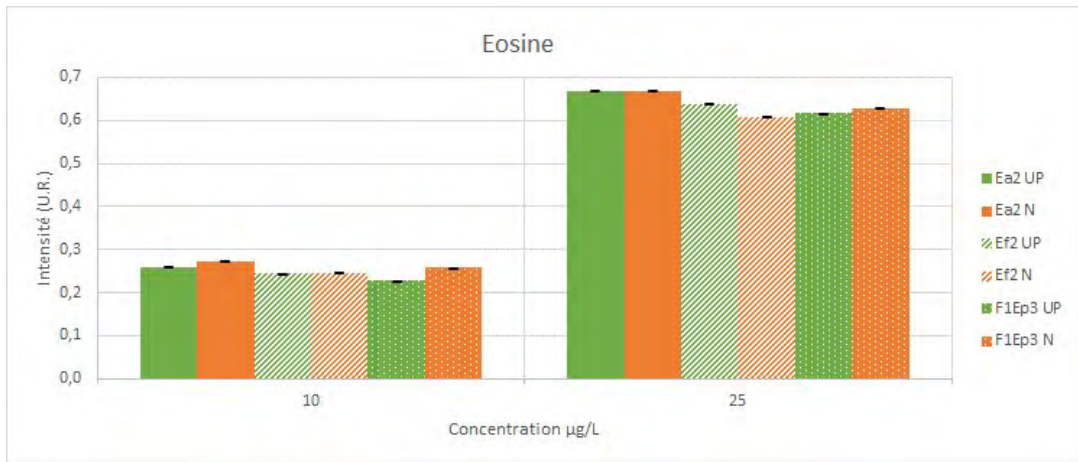


Figure 14 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'éosine de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 4 mois par produit.

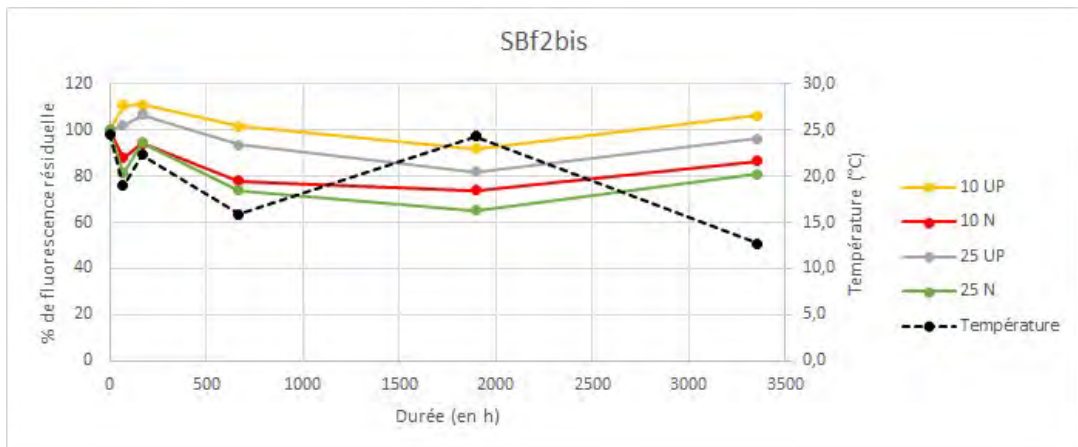
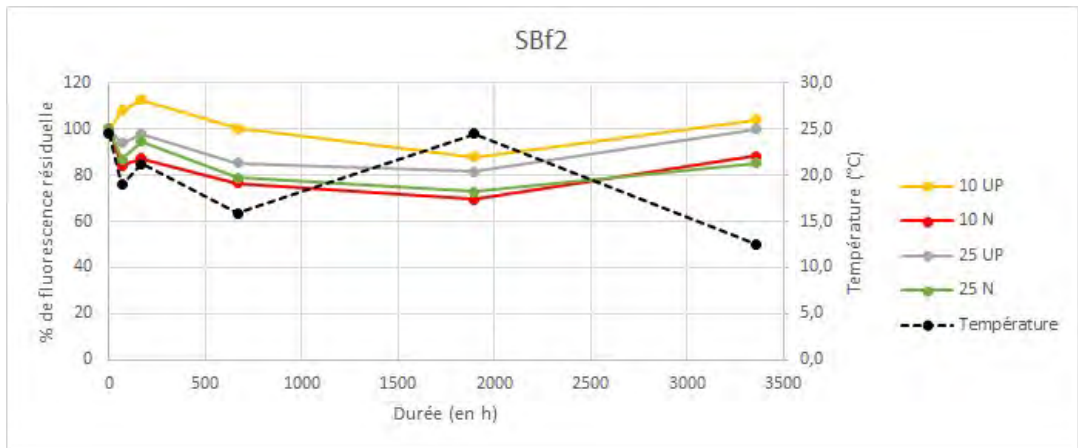
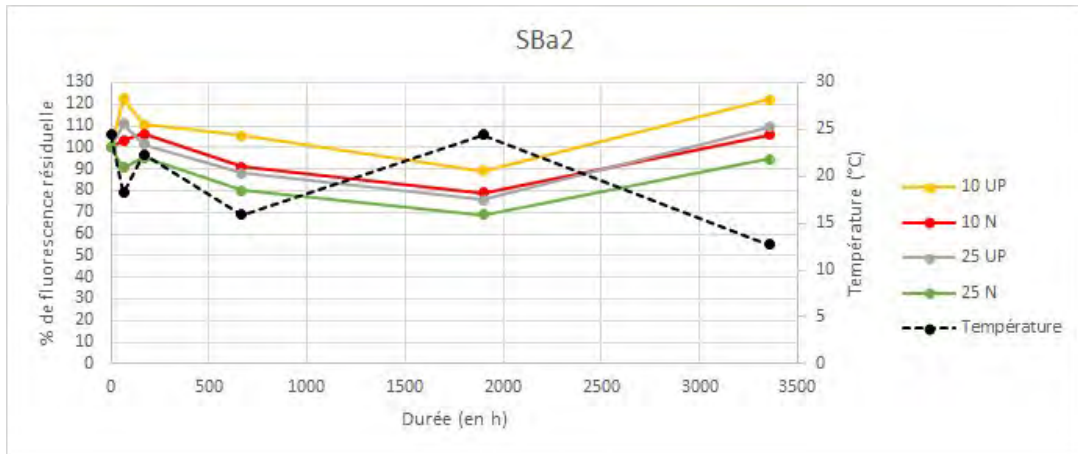
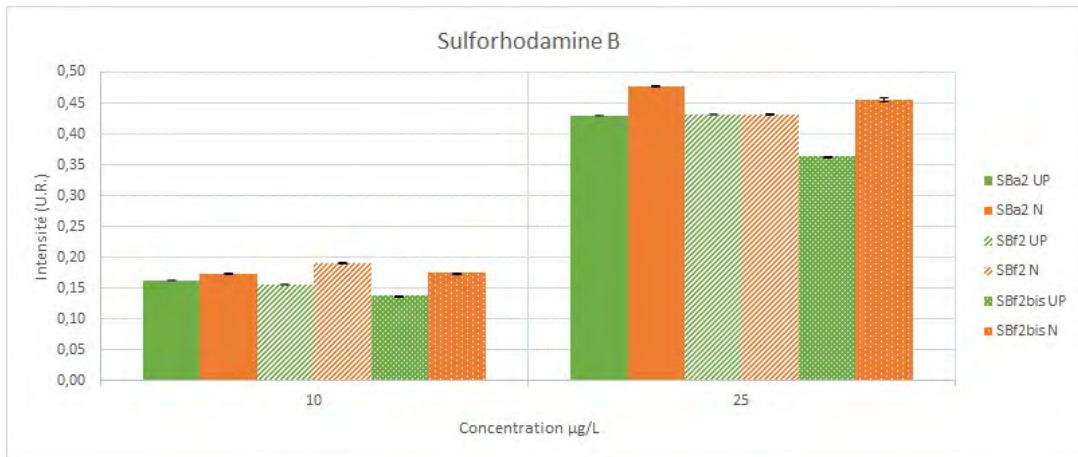


Figure 15 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de sulforhodamine B de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 4 mois par produit.

Les solutions préparées avec l'eau naturelle montrent des intensités résiduelles de fluorescence significativement inférieures à celles des solutions préparées avec l'eau ultrapure à partir de 3 jours aux deux concentrations pour les trois produits (Figure 15). Cette différence d'intensité de fluorescence résiduelle évolue peu en moyenne par la suite pour trois des solutions (**SBf2** 10N, **SBf2bis** aux deux concentrations : Figure 15), mais augmente légèrement avec le temps entre 1 semaine et 1 mois dans le cas de **SBa2** 10N, entre 1 semaine et 4,5 mois dans le cas de **SBf2** 25N, et entre 2,5 et 4,5 mois dans le cas de **SBa2** 25N (Figure 15). Elle se situe dans une fourchette de 15 à 19 % pour toutes les solutions au bout des 4,5 mois (Figure 15).

3.1.4.4. Sulforhodamine G

Les résultats obtenus pour les poudres de sulforhodamine G sont présentés dans la Figure 16 ci-dessous et dans l'Annexe 7. Les deux produits **SGf1** et **SGf2** ont dû être analysés, à la suite d'une erreur de manipulation, à un jour de distance, expliquant l'allure différente des courbes d'évolution de la température les premiers jours (Figure 16).

Les intensités de fluorescence à t_0 des produits dans l'eau ultrapure sont distinctement inférieures à ce qu'elles sont dans l'eau naturelle (Figure 16). Comme dans le cas de la sulforhodamine B, ce résultat ne peut être attribué aux différences de pH des solutions préparées avec les deux types d'eau (Tableau 4), étant donné que la sulforhodamine G garde sa fluorescence maximale entre pH 3,5 et 10,5 (Leibundgut *et al.* 2009), et est probablement dû à la contribution de la fluorescence de MO présentes dans l'eau naturelle.

Le décalage entre les deux produits les premiers jours de suivi (Figure 16) permet de vérifier que, comme dans le cas de la sulforhodamine B (voir ci-dessus 3.1.4.3), certaines fluctuations de l'intensité de fluorescence résiduelle des solutions ne peuvent être expliquées par l'évolution de leur température, ce qui est par ailleurs cohérent avec la faible dépendance de la fluorescence de la sulforhodamine G à la température (Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009, Défarge *et al.* 2020). En particulier, si l'intensité de toutes les solutions baisse jusqu'à 2 (**SGf2**) ou 3 jours (**SGf1**), pour remonter ensuite jusqu'à 7 (**SGf2**) ou 8 jours (**SGf1**), cette évolution n'est conforme à une évolution inverse de la température que dans le cas de **SGf1** (Figure 16 ; voir également Annexe 7 pour les résultats de la 1^{ère} année). La cinétique de dissolution des poudres pourrait donc intervenir dans ces évolutions des premiers jours après la fabrication des solutions (voir 3.1.1 et Défarge *et al.* 2020 pour les difficultés de dissolution des poudres de sulforhodamine G).

Le comportement des deux produits en solution dans l'eau naturelle sont très différents, tandis que leur comportement dans l'eau ultrapure sont proches (Figure 16). L'intensité résiduelle de fluorescence de **SGf1** dans l'eau naturelle baisse par rapport à son intensité dans l'eau ultrapure aux deux concentrations, au bout d'1 semaine à la concentration de 10 µg/L, à partir de 3 mois pour 25 µg/L, jusqu'à atteindre à 5 mois moins de 55 %, et moins de 44 %, respectivement (soit une différence moyenne de 40 % par rapport aux solutions préparées dans l'eau ultrapure : Figure 16). Une baisse d'intensité résiduelle de fluorescence de **SGf2** dans l'eau naturelle par rapport à son intensité dans l'eau ultrapure ne se constate par contre qu'à la concentration de 10 µg/L, entre 1 et 2 semaines, jusqu'à atteindre à 5 mois une différence d'intensité de 14 % entre les deux solutions ; à la concentration de 25 µg/L, les intensités résiduelles des solutions préparées dans l'eau naturelle et dans l'eau ultrapure ne se différencient par contre pas, jusqu'à présent (5 mois : Figure 16).

Par ailleurs, un écart d'intensité résiduelle de fluorescence entre les solutions des deux concentrations préparées dans l'eau ultrapure de ce produit (**SGf2**) étant par ailleurs observé, comme dans le cas des sulforhodamines B (voir 3.1.4.3 ci-dessus), et contrairement à l'autre sulforhodamine G (Figure 16), on peut donc s'interroger sur la réalité de sa baisse de fluorescence dans l'eau naturelle par rapport à l'eau ultrapure.

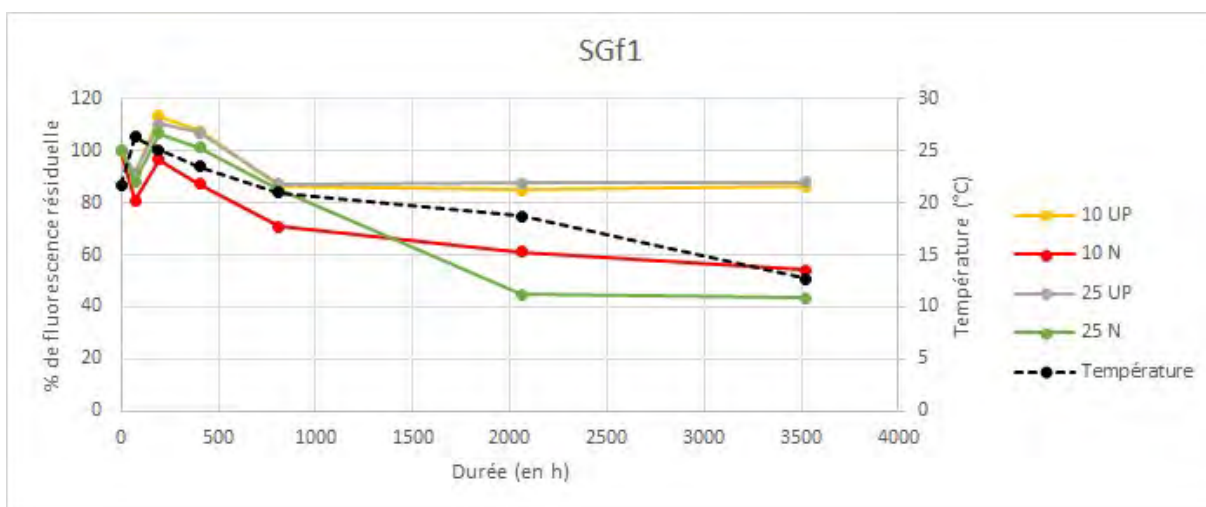
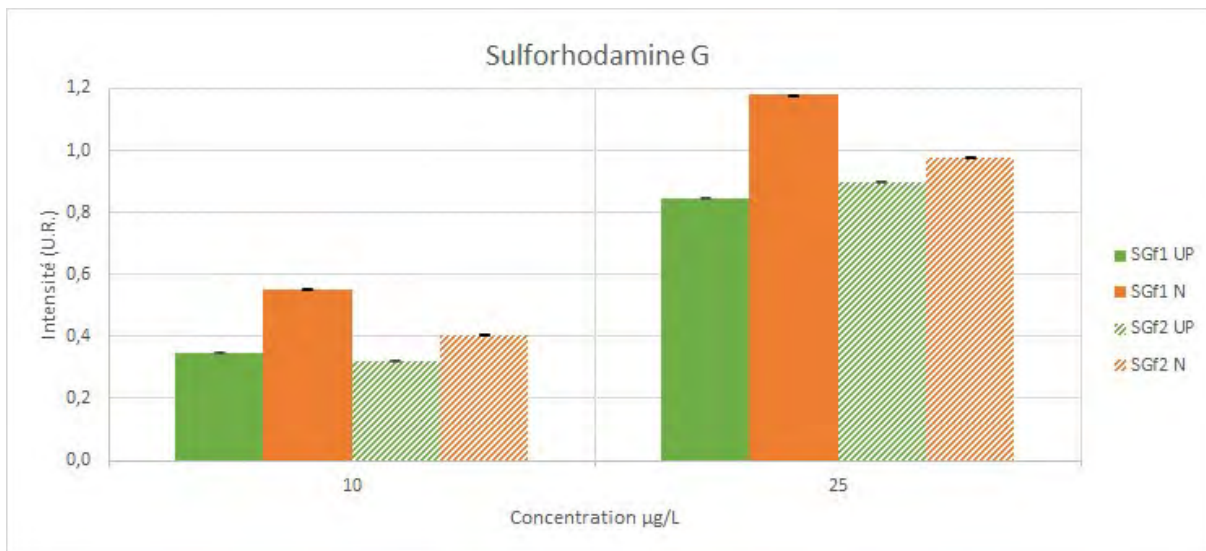


Figure 16 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de sulforhodamine G de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 4 mois par produit.

3.1.4.5. Naphionate de sodium

Les résultats obtenus pour les poudres de naphionate de sodium sont présentés dans la Figure 17 ci-dessous et dans l'Annexe 7. Les intensités de fluorescence à t₀ des produits dans l'eau ultrapure sont inférieures à ce qu'elles sont dans l'eau naturelle (Figure 17). Ce résultat, qui ne peut être attribué aux différences de pH des solutions préparées avec les deux types d'eau (Tableau 4), étant donné que le naphionate de sodium garde sa

fluorescence maximale entre pH 4 et 10 (Käss 1998), est probablement dû à la contribution de la fluorescence de MO présentes dans l'eau naturelle.

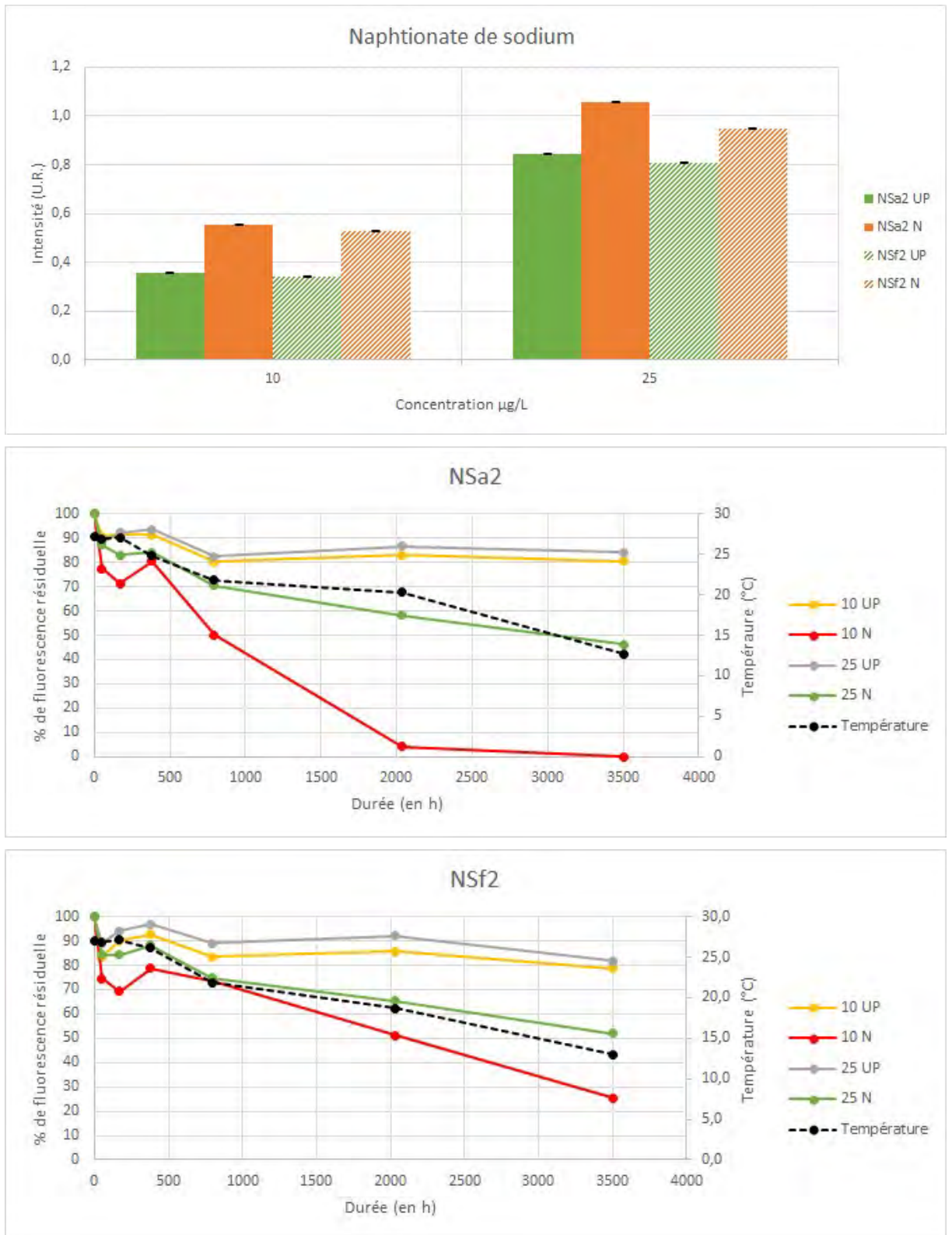


Figure 17 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de naphtionate de sodium de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 4 mois par produit.

Le comportement des solutions de naphtionate de sodium est très différent, selon qu'elles ont été préparées avec l'eau ultrapure ou naturelle (Figure 17). Les premières montrent des fluctuations d'intensité résiduelle de fluorescence parallèles tout au long du suivi,

l'intensité variant peu à partir de 1 mois et jusqu'à 5 mois (Figure 17). Un effet de la température sur ces fluctuations ne peut être impliqué que jusqu'à 2 semaines de suivi (Figure 17) ; certains des résultats du premier projet (Défarge *et al.* 2020) semblaient pourtant confirmer une expérience citée par Leibundgut *et al.* (2009), selon laquelle le naphthionate de sodium pourrait avoir une sensibilité à la température légèrement supérieure à celle des autres traceurs analysés ici, sauf la sulforhodamine B (ce que sembleraient également montrer les résultats de la 1^{ère} année de projet, voir Annexe 7).

Les solutions préparées avec l'eau naturelle montrent une évolution parallèle entre elles jusqu'à 2 semaines, qui peut également difficilement être expliquée par le seul effet de la température, avec des intensités résiduelles de fluorescence significativement inférieures à celles des solutions préparées avec l'eau ultrapure à partir de 2 jours pour les deux produits, particulièrement à la concentration de 10 µg/L (Figure 17). L'écart avec l'intensité des solutions dans l'eau ultrapure s'accroît ensuite avec le temps, à partir de 2 semaines pour la solution du produit **NSa2** à 10 µg/L et celle du produit **NSf2** à 25 µg/L, d'1 mois pour **NSa2** à 25 µg/L et **NSf2** à 10 µg/L (Figure 17).

Les solutions à 25 µg/L dans l'eau ultrapure des deux produits ont ensuite un comportement similaire, avec une intensité de fluorescence résiduelle autour de 50 % à 5 mois (correspondant à un écart d'environ 30 % avec les solutions dans l'eau ultrapure : Figure 17). Les solutions à 10 µg/L ont un comportement significativement différent, à la fois des solutions à 25 µg/L, et entre elles : la baisse de leur intensité de fluorescence résiduelle est significativement supérieure, celle-ci atteignant près de 25 % à 5 mois pour **NSf2** (soit un écart de plus de 55 % avec la solution de même concentration du même produit dans l'eau ultrapure), celle de **NSa1** n'étant plus que de 4 % à 2 mois, aucune fluorescence de cette solution n'étant plus détectée que par spectrométrie à 5 mois (résultats non montrés dans ce rapport), l'intensité résiduelle devenant inférieure à celle de l'eau naturelle (Figure 17), qui en est retranchée (voir 2.2.4.3).

3.1.4.6. Acide amino G

Les résultats obtenus pour les poudres d'acide amino G sont présentés dans les Figures 18 (obtenue la 1^{ère} année avec de l'eau ultrapure à pH ajusté à 8) et 19 (comparaison eau naturelle et eau ultrapure, à pH ajusté ou pas, réalisée la 2^{ème} année) ci-dessous.

L'acide amino G était le seul des traceurs étudiés lors du 1^{er} projet qui voyait son intensité de fluorescence résiduelle baisser avec le temps dans toutes les conditions d'exposition, de manière parallèle pour les trois températures de conservation à l'obscurité (température du laboratoire, < 4 °C et + 40 °C), et dans les deux laboratoires (CETRAHE et EWTS : Défarge *et al.* 2020). La baisse de fluorescence, de l'ordre de quelques % au maximum jusqu'à 3 mois, pouvait déjà atteindre 20 % au bout de 4 mois (2^{ème} série à CETRAHE : Défarge *et al.* 2020), et 25 % au bout de 6 mois (2^{ème} série à CETRAHE, contre 27 à 35 % pour la 1^{ère} série où la baisse d'intensité de la lampe du spectrofluorimètre s'était ajoutée à la décroissance due au produit lui-même : Défarge *et al.* 2020).

Le phénomène de décroissance avec le temps de l'intensité de fluorescence de l'acide amino G en solution n'est pas observé de manière générale cette fois-ci, jusqu'à 6 mois pour le produit **AGa1** la 1^{ère} année, au moins jusqu'à 4 mois pour **AGf1** (ces deux produits ayant été préparées avec de l'eau ultrapure à pH ajusté à 8 : Figure 18), jusqu'à 3 mois pour les produits analysés la 2^{ème} année, y compris ceux préparés avec l'eau ultrapure non tamponnée (Figure 19), les seuls pouvant être véritablement comparés avec les produits analysés lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020).

Le pH avait été évoqué comme facteur possible d'explication de la baisse d'intensité de fluorescence des solutions d'acide amino G avec le temps, constatée lors du 1^{er} projet (même si celui des solutions mères à 0,1 g/L avait peu varié en 15 mois : Défarge *et al.* 2020), l'intensité de fluorescence de l'acide amino G chutant rapidement au-dessous de pH 6,5 d'après Smart & Laidlaw (1977). Les pH mesurés cette fois-ci montrent de nouveau peu d'évolution avec le temps jusqu'à présent, avec une très légère augmentation de 7,9 à 8 au bout de 6 mois la 1^{ère} année (Figure 18), et une stabilisation au bout de quelques semaines autour des mêmes valeurs pour les solutions préparées avec l'eau naturelle comme avec l'eau ultrapure tamponnée la 2^{ème} année, autour de 3 à 4 pour l'eau ultrapure non tamponnée, après une légère augmentation lors des premières semaines de suivi pour les premières (de pH 7 à 8), ou une très légère baisse suivie d'une remontée pour toutes celles préparées avec de l'eau ultrapure, tamponnée ou pas (Figure 19).

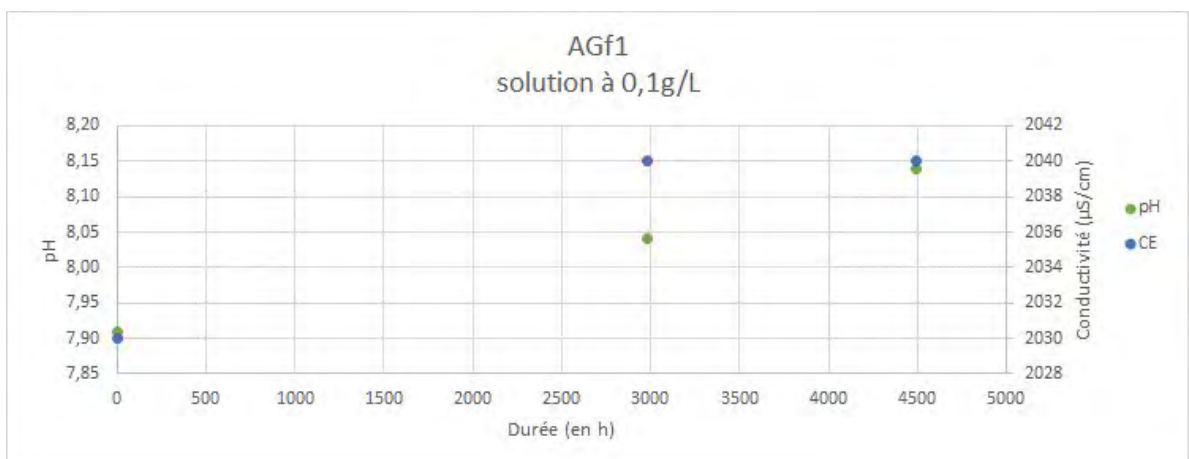
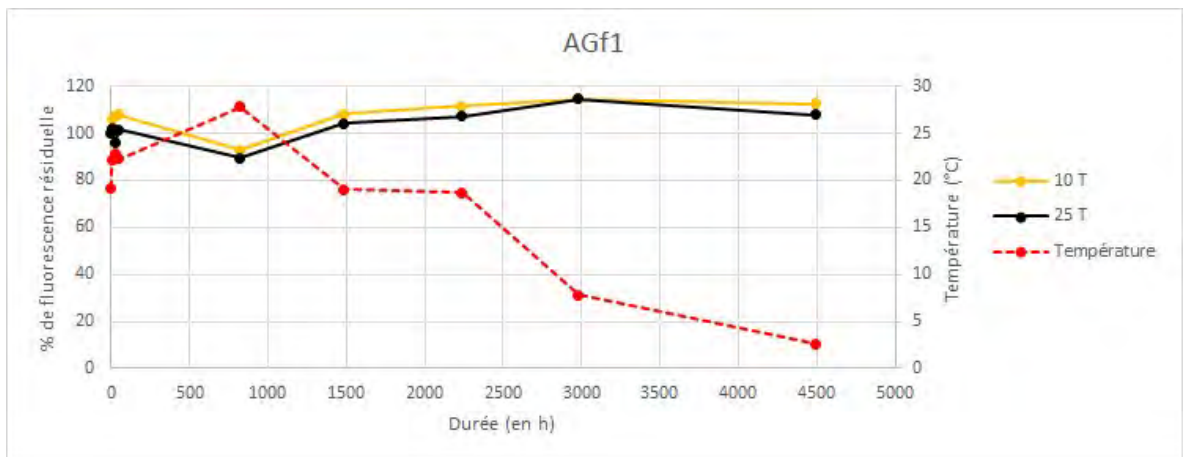
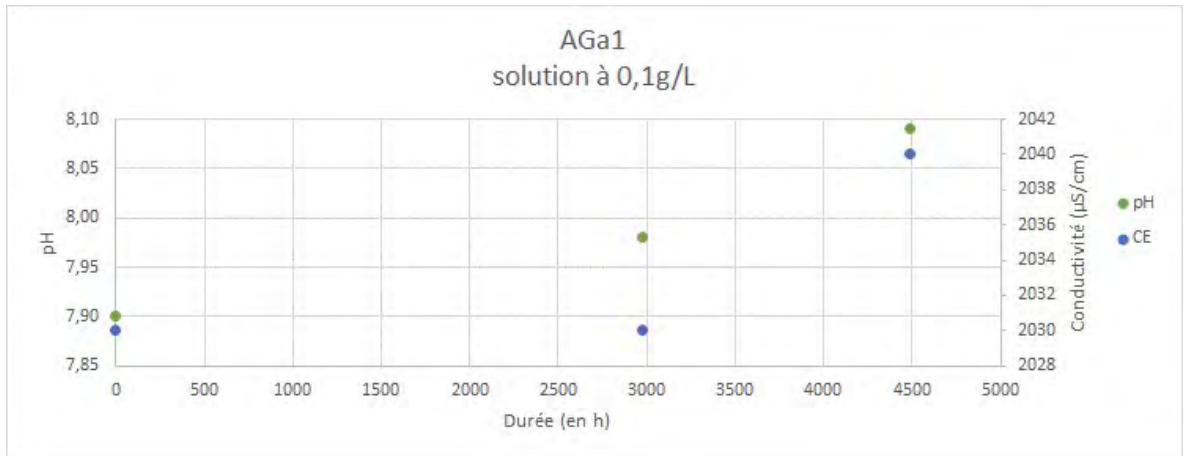
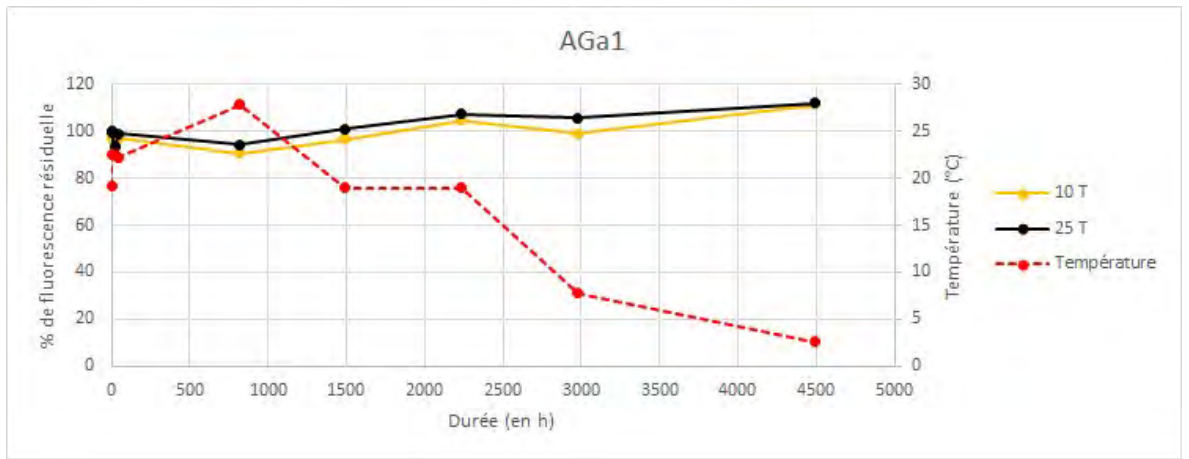


Figure 18 : Evolution avec le temps de l'intensité de fluorescence des solutions d'acide amino G à 10 et 25 µg/L fabriquées à partir des poudres des deux fournisseurs, et du pH et de la CE de la solution mère à 0,1 g/L. La fluorescence est portée en % d'intensité résiduelle par rapport à la mesure effectuée à t₀, fixée arbitrairement à 100 %.

Dans tous les cas, ces évolutions du pH des solutions s'accompagnent d'une légère augmentation de la CE avec le temps (Figures 18 et 19), suggérant qu'elles pourraient être dues à la dissociation de constituants des molécules composant les produits.

Les fluctuations parallèles d'intensité résiduelle de fluorescence de la plupart des solutions lors des deux années de suivi (Figures 18 et 19) semblent plus probablement expliquées par les variations de température, l'intensité de fluorescence variant en sens inverse de celle-ci, même si l'acide amino G est l'un des moins sensibles à ce facteur (Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998, Défarge *et al.* 2020 ; à partir de 4 mois la 1^{ère} année, Figure 18, à 4,5 mois la 2^{ème} année, Figure 19, la température de l'air extérieur n'est plus représentative de la température du laboratoire en raison de la mise en route du chauffage du bâtiment).

Les intensités de fluorescence à t_0 des produits dans l'eau ultrapure, tamponnée ou pas, sont distinctement inférieures (et peu différentes entre elles) à ce qu'elles sont dans l'eau naturelle, sauf dans le cas du produit **AGa2** à 25 µg/L (Figure 19). Contrairement au cas de l'uranine (voir 3.1.4.1), ces différences entre les trois types d'eau ne peuvent être expliquées par les différences de pH, puisque celui des solutions à 0,1 g/L était à 3,4-3,5 pour l'eau ultrapure, 7,9 pour l'eau tamponnée, et 7,05 pour l'eau naturelle (Figure 19), les dilutions supplémentaires effectuées avec les mêmes eaux pour aboutir aux solutions à 10 et 25 µg/L ne pouvant que rapprocher le pH de celles fabriquées avec les eaux tamponnée et naturelle, et celui de celles fabriquées avec l'eau ultrapure ne pouvant dépasser 4,85 (Tableau 4).

Les intensités de fluorescence plus élevées des solutions fabriquées avec l'eau naturelle doivent donc être attribuées à la contribution de la fluorescence des MO que cette dernière contient. Le comportement particulier de la solution à 25 µg/L du produit **AGa2**, dont l'intensité de fluorescence ne se différencie pas, contrairement aux trois autres solutions dans l'eau naturelle, de celles des solutions dans l'eau ultrapure, tamponnée ou pas (Figure 19), pourrait être dû à la difficulté de faire des prélèvements uniformément représentatifs dans des solutions contenant encore des matières en suspension, dont des MO dans ce cas précis, dont certaines pourraient participer à la fluorescence mesurée (l'eau de la source du Bouillon a en effet été utilisée dans son état naturel, non filtrée, puisqu'une filtration aurait éliminé des solutions fabriquées, les micro-organismes dont ces expériences visaient à évaluer l'impact sur la dégradation des traceurs).

Nos résultats remettent par ailleurs en question ceux de Smart & Laidlaw (1977), les seuls disponibles à notre connaissance concernant l'influence du pH sur la fluorescence de l'acide amino G en solution, selon lesquels celle-ci chute rapidement au-dessous de pH 6,5, puisqu'ils démontrent que des solutions dans l'eau ultrapure du même produit à la même concentration peuvent avoir des fluorescences très proches dans une gamme de pH allant de 3,4-4,9 (eau ultrapure) à 7,8-7,9 (eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl : Figure 19 et Tableau 4).

La question de l'influence du tampon utilisé sur l'expression de la fluorescence et/ou la modification chimique en solution de la molécule d'acide amino G peut être posée, mais le même questionnement peut également s'appliquer aux résultats de Smart & Laidlaw (1977), puisqu'ils ont de plus utilisé trois tampons différents (de pH 4, 7, et 9,2, respectivement), ainsi que de l'acide chlorhydrique et de la soude, pour amener leurs solutions d'acide amino G aux différents pH (leurs courbes d'évolution de la fluorescence de rhodamines en fonction du pH, ajusté avec un seul tampon et trois acides différents, mettent d'ailleurs en évidence l'influence de ces ajouts de produits dans l'expression de la fluorescence).

Toutefois, le fait que nos solutions aient la même fluorescence entre 3,4 et 7,9 dans l'eau ultrapure, tamponnée ou pas (et une fluorescence supérieure ou égale avec l'apport des MO de l'eau naturelle : Figure 19), semble bien indiquer que l'acide amino G est à son maximum de fluorescence dans toute cette gamme de pH. Par ailleurs, les résultats du 1^{er} projet avaient montré que la baisse d'intensité de fluorescence des solutions d'acide amino G avec le temps ne semblait pas pouvoir être attribuée au pH, puisque celui des solutions mères à 0,1 g/L avait peu varié en 15 mois (Défarge *et al.* 2020), et l'expérience de laboratoire de CETRAHE avec des eaux naturelles de pH variés confirme que ce paramètre n'a pas d'impact sur la fluorescence de ce traceur, à la différence de l'uranine.

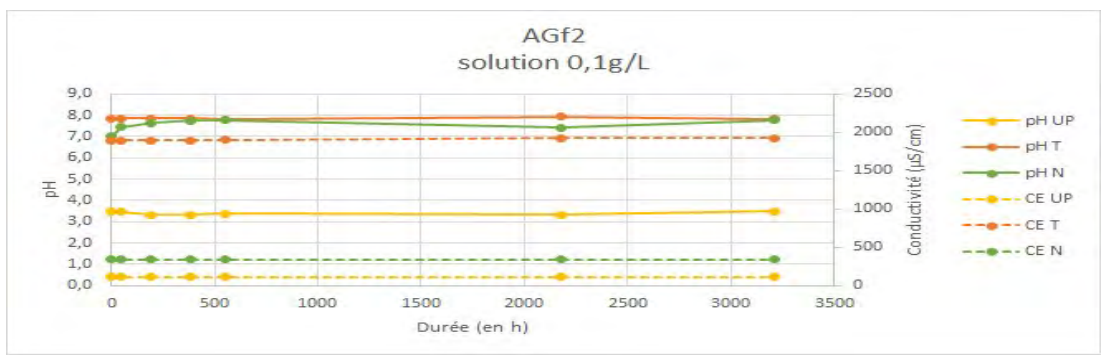
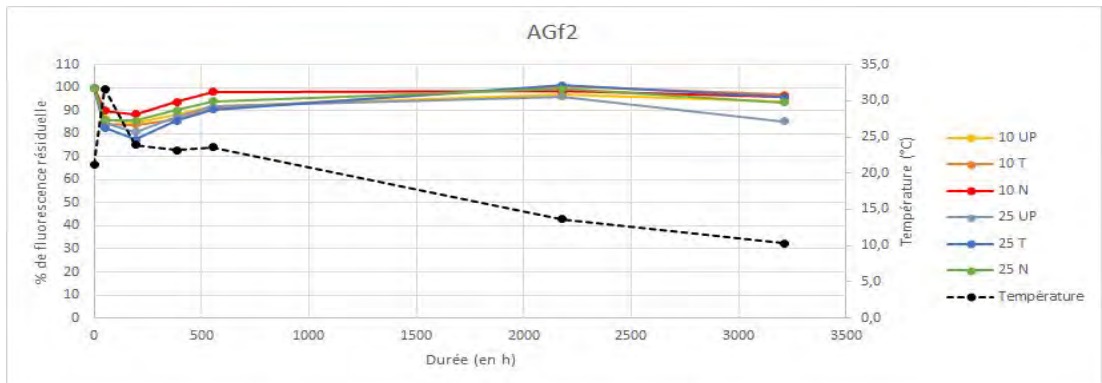
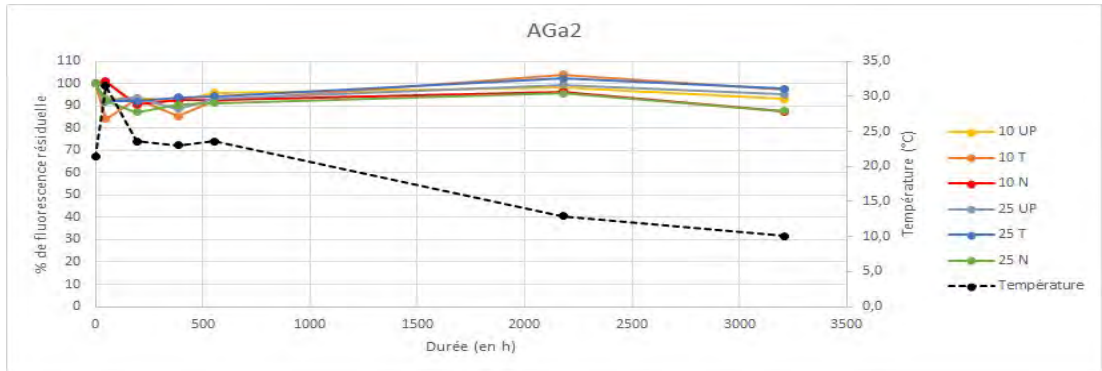
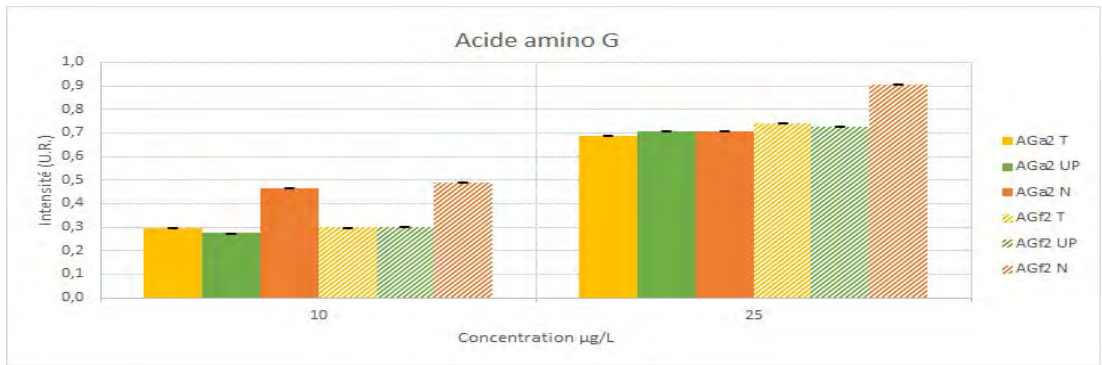


Figure 19 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'acide amino G de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N), d'eau ultrapure (U) et d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (T), et de leurs pH et CE à 0,1 g/L. En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 4 mois par produit.

3.2. Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA

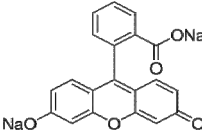
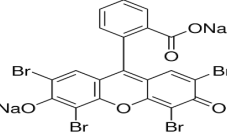
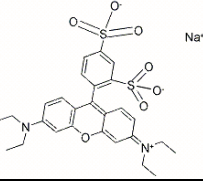
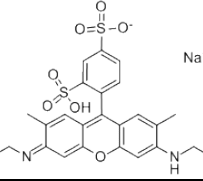
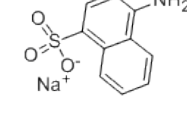
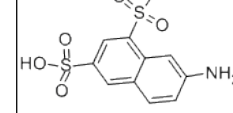
Dans cette partie seront présentés les résultats des analyses de composition des produits traceurs réalisées à COBRA la 1^{ère} année du projet. Ceux obtenus sur les produits analysés à CETRAHE la 2^{ème} année du projet seront présentés dans le rapport final 2024.

3.2.1. Pureté et teneur en eau

3.2.1.1. Etalons de référence

Des produits de référence de pureté certifiée ont été utilisés pour mener les étalonnages. Les caractéristiques des produits de référence de l'uranine, l'éosine, des sulforhodamines B et G, du naphthionate de sodium et de l'acide amino G, sont données dans le tableau récapitulatif suivant (Tableau 6).

Tableau 6 : Caractéristiques des étalons de référence utilisés.

	URANINE	EOSINE Acid red 87	SULFORHODAMINE B	SULFORHODAMINE G aminorhodamine	NAPHTIONATE DE SODIUM Sodium 4-amino-1- naphthalenesulfonate	ACIDE AMINO G 7-Amino-1,3- naphthalenedisulfonic acid
CAS	518-47-8	17372-87-1	3520-42-1	5873-16-5	123333-48-2	86-65-7
Formule						
Formule moléculaire	C ₂₀ H ₁₀ Na ₂ O ₅	C ₂₀ H ₆ Br ₄ Na ₂ O ₅	C ₂₇ H ₂₉ N ₂ NaO ₇ S ₂	C ₂₅ H ₂₅ N ₂ NaO ₇ S ₂	C ₁₀ H ₈ NNaO ₃ S	C ₁₀ H ₉ NO ₆ S ₂
Masse molaire(g/mol)	376,27	691,8	580,6	552,6	245,23	303,3
Solubilité dans l'eau	500 g/L (1)	100 g/L (1)			188 g/L (2)	
λ utilisées	470 nm	540 nm	560 nm	530 nm	320 nm	248 nm
Fournisseur	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich	VWR / Sigma Aldrich	Fisher Scientific
Référence fournisseur	30181	53019	230162	230561	70862 (2)	1639610000
N° lot	BCBT6608 / BCCC1797	BCBS2178V / A0393531	MKBR0527V	MKBT6246V	BCBM9933V (2)	A0239985
Pureté certifiée ou déterminée	98,4 % / 98,8 %	99,7% / 94,0 %	83,7%	99,5%	79,9% / 77,9 %	99,6%

Source des données : (1) <http://www.chemicalbook.com> ; (2) Sigma Aldrich. Les données apparaissant en double correspondent à 2 produits acquis et analysés dans 2 séries différentes.

3.2.1.2. Pureté déterminée par HPLC et teneur en eau

Les résultats complets des analyses de pureté des produits commerciaux déterminés par HPLC, de leur teneur en eau, en autres composés détectés et des particules insolubles

sont donnés dans le Tableau 7 ci-dessous. Toutes les analyses ont été tripliquées. Les sulforhodamines G présentent une part d'insolubles non négligeable. Des tests de solubilisation montrent que ces particules sont partiellement solubles dans l'eau à pH basique mais insolubles en milieu organique. Cela confirme donc que la sulforhodamine G des fournisseurs est de qualité médiocre de ce point de vue, alors que la fiche technique du produit **SGa1** affiche un taux d'insolubles $\leq 0,2 \%$ (Tableau 2).

Tableau 7 : Bilan de composition des produits traceurs

TRACEUR	ECHANTILLON	TENEUR EN TRACEUR (g/100 g) +/- écart-type	TENEUR EN EAU (g/100 g) +/- écart-type	AUTRES COMPOSES DETECTES (g/100 g) +/- écart-type	INSOLUBLES (g/100 g) +/- écart-type	TOTAL (g/100 g)
Uranine	Ua1	95,1 ± 0,3	6,57 ± 0,38			101,7
	Uf1	90,5 ± 0,1	7,76 ± 0,19			98,2
Eosine	Ea1	87,9 ± 0,8	10,72 ± 0,34	5,03 ± 0,08		103,6
	Ef1	89,2 ± 0,5	6,34 ± 0,23	5,82 ± 0,05		101,4
	F1Ep3 2022	79,4 ± 0,23	13,4	3,7		96,4
	F1Ep3 2019	75,7	6,1			81,8
Sulforhodamine B	SBa1	96,2 ± 4,4	8,03 ± 0,31	< 2		104,2
	SBf1	52,3 ± 0,2	6,25 ± 0,22	2,2 ± 0,1		60,7
	F1SBp1 2022	50,2 ± 0,5	4,9*	< 2		55,1
	F1SBp1 2017	59,0	4,9			63,9
	F2SBp1 2022	50,7 ± 0,9	4,9*	< 2		54,7
	F2SBp1 2017	58,9	4,9			63,8
	F2SBp3 2022	38,5 ± 0,9	4,0*	4,1 ± 0,2		46,6
Sulforhodamine G	SGa1	48,8 ± 1,9	11,52 ± 0,81	18,1 ± 0,9	45,9 ± 1,7	124,4
	SGf1	34,7 ± 4,5	5,56 ± 0,17	8,8 ± 1,2	16,0 ± 4,2	65,0
	F1SGp1 2022	44,5 ± 4,1	12,5*	7,1 ± 0,8	45,2 ± 0,3	109,3
	F1SGp1 2017	68,9	12,5		Non réalisé	81,4
Naphthionate de sodium	NSa1	80,6 ± 1,2	20,26 ± 0,14			100,9
	NSf1	83,3 ± 1,2	20,46 ± 0,14			103,8
Acide amino G	AGa1	95,3 ± 1,5	2,56 ± 0,09			97,9
	AGf1	93,0 ± 0,7	2,20 ± 0,12			95,2

Trois sulforhodamines B et une sulforhodamine G du premier projet ont été réanalysées avec les produits de cette année ; leurs teneurs en traceur mesurées lors du premier projet (2017-19) sont alors portées dans une ligne au-dessous des teneurs obtenues en 2022.

* Valeurs reportées correspondant à celles de 2017 car il n'y avait plus assez de matière pour refaire une teneur en eau en 2022.

Une analyse en MEB-EDX a pu mettre en évidence 3,2 %, et 4%, de chrome Cr dans les insolubles de **SGa1**, et **SGf1**, respectivement. Les Figures 20 et 21 ci-dessous le mettent en évidence, alors que la composition chimique de la sulforhodamine G ($C_{25}H_{25}N_2NaO_7S_2$) ne montre pas la présence d'atome de chrome. L'identification reste à mener.

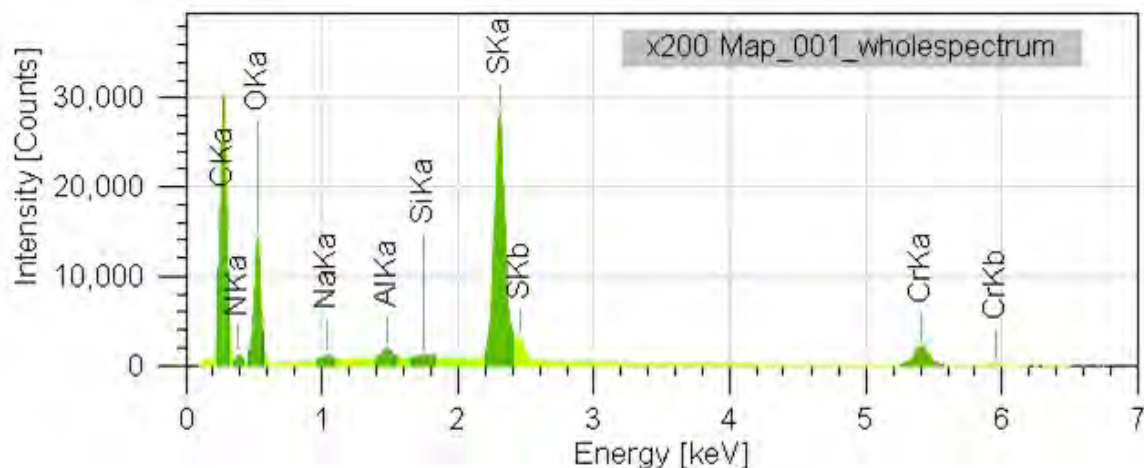


Figure 20 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGa1.

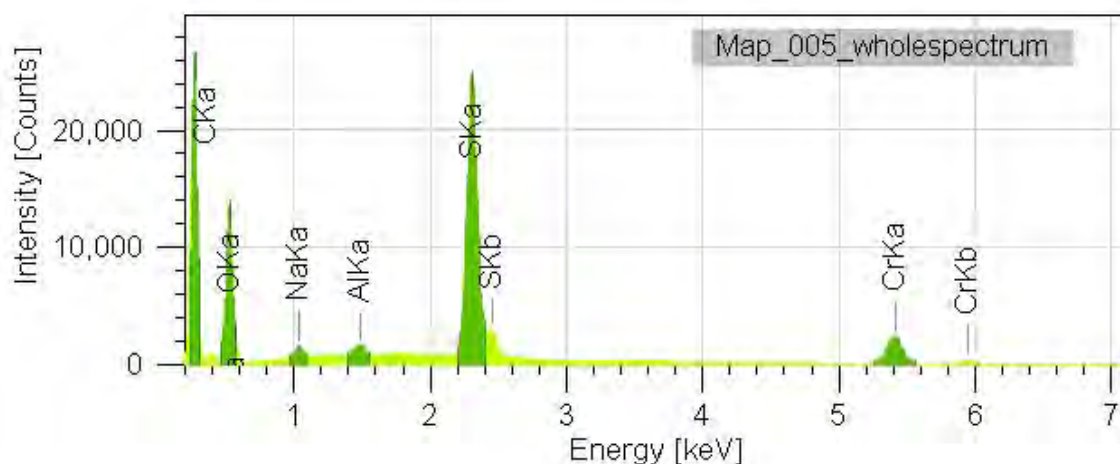


Figure 21 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGF1.

3.2.1.3. Identification des impuretés des sulforhodamines B et G

Dans un premier temps, les sulforhodamines B et G ont été analysées en spectrométrie de masse en infusion, et des expériences de fragmentation multiple (MSn) ont été menées afin d'établir une systématique de fragmentation. Puis, pour identifier les impuretés, les échantillons ont été analysés en couplage LC-MS sur deux analyseurs complémentaires : sur un piège à ions afin de réaliser des expériences de fragmentation MSn et sur un Q-TOF pour accéder aux formules moléculaires par la mesure des masses précise. Quelques exemples de chromatogrammes et spectres de masse sont présentés en Annexe 5.

Pour les sulforhodamines B, 8 impuretés majoritaires ont été mises en évidence. Quatre d'entre elles étaient déjà décrites dans la littérature (Chen *et al.* 2002, Gosetti *et al.* 2015), elles correspondent aux ions à m/z 531, 503 (2 isomères) et 475 en ESI(+), voir Tableau 8 et Figure 22 ci-dessous.

Tableau 8 : Impuretés connues des sulforhodamines B (d'après Chen *et al.* 2002, Gosetti *et al.* 2015).

Molécule	tr (min)	m/z mesuré	m/z calculé	Erreur (ppm)	Formule moléculaire proposée	DBE	Forme	Observations
SB	8,7	559,1572	559,1573	-0,2	$C_{27}H_{31}N_2O_7S_2$	13,5	$[M + H]^+$	SB, ($C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$)-559
Impuretés et produits dégradés connus	7,6	531,1266	531,1260	1,1	$C_{25}H_{27}N_2O_7S_2$	13,5	$[M + H]^+$	559 - C_2H_4
	6,2	503,0948	503,0947	0,2	$C_{23}H_{23}N_2O_7S_2$	13,5	$[M + H]^+$	559 - $(C_2H_4)_2$
	4,8	503,0958	503,0947	2,2	$C_{23}H_{23}N_2O_7S_2$	13,5	$[M + H]^+$	
	3,5	475,0629	475,0634	-1,1	$C_{21}H_{19}N_2O_7S_2$	13,5	$[M + H]^+$	559 - $(C_2H_4)_3$

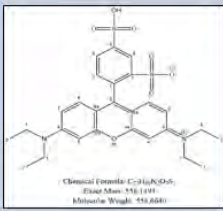
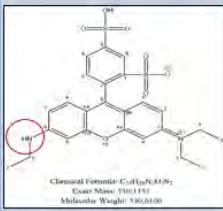
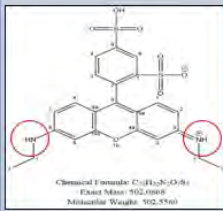
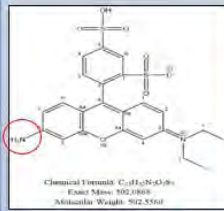
Molécule	Sulforhodamine B (<i>m/z</i> 559, tr 8,6 min)	Impureté 1 (<i>m/z</i> 531, tr 7,4 min)	Impureté 2 (isomère 1) (<i>m/z</i> 503, tr 6,1 min)	Impureté 2 (isomère 2) (<i>m/z</i> 503, tr 4,8 min)
Structure de la molécule	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂ Exact Mass: 559.1572 Molecular Weight: 559.6841	 Chemical Formula: C ₂₆ H ₂₉ N ₂ O ₇ S ₂ Exact Mass: 545.1433 Molecular Weight: 545.6700	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂ Exact Mass: 502.5509 Molecular Weight: 502.5509	 Chemical Formula: C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂ Exact Mass: 502.5509 Molecular Weight: 502.5509

Figure 22 : Structures des impuretés connues des sulforhodamines B (d'après Chen et al. 2002, Gosetti et al. 2015). Les cercles rouges entourent les fonctions des impuretés qui les distinguent de la sulforhodamine B.

Des formules moléculaires pour les 4 autres impuretés inconnues ont été proposées (voir Tableau 9 ci-dessous), basées sur les spectres de fragmentation, les mesures de masse précise et la cohérence des valeurs de DBE (Double Bond Equivalent correspondant au nombre d'insaturations).

Tableau 9 : Impuretés inconnues des sulforhodamines B.

Molécule	tr (min)	<i>m/z</i> mesuré	<i>m/z</i> calculé	Erreur (ppm)	Formule moléculaire proposée	DBE	Forme	Observations
SB	8,7	559,1572	559,1573	-0,2	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂	13,5	[M + H] ⁺	SB, (C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂), 559
Impuretés et produits dégradés inconnus	8,1	545,1433	545,1416	3,1	C ₂₆ H ₂₉ N ₂ O ₇ S ₂	13,5	[M + H] ⁺	(C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂) - CH ₂
	9,8	685,1327	685,1348	-3,1	C ₃₂ H ₃₃ N ₂ O ₉ S ₃	17,5	[M + H] ⁺	(C ₃₄ H ₃₇ N ₂ O ₉ S ₃) - C ₂ H ₄
	10,9	713,1657	713,1661	-0,6	C ₃₄ H ₃₇ N ₂ O ₉ S ₃	17,5	[M + H] ⁺	C ₃₄ H ₃₇ N ₂ O ₉ S ₃
	3,3	611,0809	611,0828	-3,1	C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₁₀ S ₃	13,5	[M + H] ⁺	531, (C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₇ S ₂) + SO ₃

Pour les sulforhodamines G, 11 impuretés majoritaires ont été mises en évidence (Tableau 10 ci-dessous), 3 impuretés connues (1 impureté correspondant à la sulforhodamine B, ainsi que les 2 isomères de l'impureté 2 décrite pour la sulforhodamine B, voir Figure 22 ci-dessus) et 8 impuretés inconnues (Tableau 11 ci-dessous, exemple pour **SGf1**).

Tableau 10 : Impuretés connues des sulforhodamines G (SGf et SGa1).

Produit	t_r (min)	m/z mesuré	m/z calculé	Erreur (ppm)	Formule brute proposée	DBE	Forme structure	Espèce
SGf	7,6	531,1270	531,1260	1,9	$C_{25}H_{27}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	SG
		529,1112	529,1103	1,7	$C_{25}H_{25}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	8,7	559,1582	559,1573	1,6	$C_{27}H_{31}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	Impureté SB
		557,1412	557,1416	-0,7	$C_{27}H_{29}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	4,9	503,0934	503,0947	-2,6	$C_{23}H_{23}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	Impureté 2
		501,0786	501,0790	-0,8	$C_{23}H_{21}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
6,3	503,0951	503,0947	0,8	$C_{23}H_{23}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	Impureté 2	
	501,0808	501,0790	3,6	$C_{23}H_{21}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻		
SGa	7,6	531,1266	531,1260	1,1	$C_{25}H_{27}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	SG
		529,1111	529,1103	1,5	$C_{25}H_{25}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	4,9	503,0962	503,0947	3,0	$C_{23}H_{23}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	Impureté SB
		501,0790	501,0790	0	$C_{23}H_{21}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	8,7	559,1563	559,1573	-1,8	$C_{27}H_{31}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	Impureté 2
		557,1403	557,1416	-2,3	$C_{27}H_{29}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	6,3	503,0949	503,0947	0,4	$C_{23}H_{23}N_2O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	Impureté 2
		501,0763	501,0790	-5,4	$C_{23}H_{21}N_2O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	

Tableau 11 : Impuretés inconnues des sulforhodamines G (exemple de SGf).

Produit	t_r (min)	m/z mesuré	m/z calculé	Erreur (ppm)	Formule proposée	DBE	Forme	
SGf	7,8	685,1345	685,1348	-0,4	$C_{32}H_{31}N_3O_7S_3$	17,5	[M + H] ⁺	
		683,1202	683,1192	1,5	$C_{32}H_{29}N_3O_7S_3$	18,5	[M - H] ⁻	
	10,1	685,1348	685,1348	0,0	$C_{32}H_{31}N_3O_7S_3$	17,5	[M + H] ⁺	
		683,1167	683,1192	-3,7	$C_{32}H_{29}N_3O_7S_3$	18,5	[M - H] ⁻	
	10,4	685,1340	685,1348	-1,2	$C_{32}H_{31}N_3O_7S_3$	17,5	[M + H] ⁺	
		683,1207	683,1192	2,0	$C_{32}H_{29}N_3O_7S_3$	18,5	[M - H] ⁻	
	7,1	517,1146	517,1103	8,3	$C_{24}H_{23}N_3O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	
		515,0932	515,0947	-2,9	$C_{24}H_{21}N_3O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	6,5	-	-	-	-	-	-	-
		515,0934	515,0947	-2,5	$C_{24}H_{23}N_3O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	6,1	517,1087	517,1103	-3,1	$C_{24}H_{23}N_3O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	
		515,0944	515,0947	-0,6	$C_{24}H_{21}N_3O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	
	7,9	545,1411	545,1416	-0,9	$C_{26}H_{25}N_3O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	
		-	-	-	-	-	-	-
	6,7	545,1068	545,1052	-2,9	$C_{26}H_{25}N_3O_7S_2$	13,5	[M + H] ⁺	
		543,0898	543,0896	0,4	$C_{26}H_{23}N_3O_7S_2$	14,5	[M - H] ⁻	

En conclusion, toutes les impuretés mises en évidence pour les échantillons de sulforhodamines B et G sont des molécules de structure très proches des sulforhodamines, donc des molécules également fluorescentes très probablement.

3.2.2. Bilan des analyses de composition des produits

Les conclusions suivantes peuvent être tirées des analyses des produits traceurs sélectionnés la 1^{ère} année du projet :

► **Uranine.** Les produits sélectionnés par Art E'Color (**Ua1**) et Fluotechnik (**Uf1**) sont de très bonne pureté, supérieure à 90 %, avec une teneur en eau proche de 7 %, **Ua1** étant légèrement de meilleure qualité avec une pureté supérieure à 95 %, expliquant son intensité de fluorescence également légèrement supérieure (voir 3.1.3.1), et une teneur en eau légèrement inférieure (Tableau 7).

De ce point de vue, les fiches techniques des fabricants sont conformes, à l'exception de la teneur en eau du produit **Uf1**, qui n'est pas ~ 5 % (Tableau 2), mais légèrement supérieure (7,76 % : Tableau 7), mais il avait déjà été relevé lors du premier projet qu'il devrait être précisé sur ces fiches que le taux d'humidité est celui en sortie d'usine, qui peut ensuite varier en fonction des conditions de transport, de conservation, et ambiantes au moment des analyses (Défarge *et al.* 2020).

► **Eosine**. Les nouveaux produits sélectionnés par Art E'Color (**Ea1**) et Fluotechnik (**Ef1**) ont des puretés moyennes de 88-89 %, distinctement supérieures à celle du produit issu du premier projet (**F1Ep3**), dont la pureté est de 79 % (contre 75 % mesurée à l'époque : Tableau 7). D'autres composés ont été détectés et quantifiés à hauteur de 5, 6, et 4 %, respectivement (Tableau 6). Les teneurs en eau respectives des produits sont de 11,6 et 13 % (Tableau 7).

Parmi le faible nombre d'indications contenues dans les fiches techniques (« pureté minimale : 85 % » pour **Ef1** ; « taux d'humidité < 10 % » pour **F1Ep3** : Tableau 2), seule la première est donc correcte, mais la non-conformité du taux d'humidité peut être expliquée par les mêmes raisons que dans le cas de l'uranine (voir ci-dessus).

Ces résultats ne sont par ailleurs pas cohérents avec les mesures de CE et pH (Tableau 4), et surtout d'intensité de fluorescence (Figure 8), qui montrent un produit **Ef1** beaucoup plus proche de **F1Ep3** (et provenant du même fabricant : voir 3.1.1) que de **Ea1**. Conformément à ce qui avait été observé lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), **F1Ep3** a une intensité de fluorescence équivalente à celle d'un produit beaucoup plus riche en éosine (89,2 contre 79,4 ou 75,7 % : Tableau 7). Mais l'intensité de fluorescence et la pureté sont également déconnectées dans le cas des deux nouveaux produits, puisque, à teneurs en éosine équivalentes (87,9 et 89,2 % : Tableau 7), le produit **Ea1** montre une intensité de fluorescence distinctement supérieure à celle de **Ef1** (Figure 8), alors que sa teneur en eau est également distinctement supérieure (10,72 contre 6,34 % : Tableau 7).

Ces nouveaux résultats appuieraient donc l'une des hypothèses émises lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) pour expliquer la déconnection entre intensité de fluorescence et pureté dans le cas de l'éosine, à savoir la participation à la fluorescence des solutions, des composants complémentaires de ce traceur, qui sont présents dans les poudres à hauteur de 3,7 à 5,8 % (Tableau 7). Ces composants seraient proches chimiquement de l'éosine, puisqu'ils ne s'en distinguent pas par analyse spectrofluorimétrique (voir 3.1.2).

On cherchera à les identifier, et donc à confirmer cette hypothèse, lors de l'exploitation des résultats obtenus sur les produits analysés à CETRAHE la deuxième année du projet (voir 4.1).

► **Sulforhodamine B**. Les résultats confirment ceux obtenus en solution par les mesures de CE et de pH (Tableau 4), et d'intensité de fluorescence (Figure 9) : les deux produits sont très différents, la sulforhodamine B sélectionnée par Art E'Color (**SBa1**) ayant une pureté proche de 100 %, et près de deux fois supérieure à celle du produit sélectionné par Fluotechnik (**SBf1**), ainsi qu'à celles des produits analysés au cours du premier projet (50 à 60 % : Tableau 7).

Le produit sélectionné par Art E'Color a donc une pureté équivalente aux meilleures poudres d'uranine et d'acide amino G (Tableau 7, et Défarge *et al.* 2020). Par ailleurs, sa fiche technique (Tableau 2) est conforme de ce point de vue (« teneur en colorant ≥ 90 % »), de même que pour le taux d'insolubles (< 2 % : Tableau 7 ; ≤ 2 % sur la fiche technique : Tableau 2). Seule sa teneur en eau est non conforme (8 %, contre ≤ 7 % sur la fiche technique : Tableaux 2 et 7), pour les raisons déjà invoquées dans le cas de l'uranine et de l'éosine (voir ci-dessus).

Dans le cas du produit sélectionné par Fluotechnik (**SBf1**), en raison d'un même faible taux d'insolubles que pour **SBa1** (voir Tableau 7), une interrogation persiste sur la présence de composés solubles en phase aqueuse qui ne seraient pas analysables par HPLC, et qui représenteraient 40 % environ de la masse du produit. Ils pourraient être responsables de la CE environ 5 fois supérieure en solution de ce produit (57 contre 13 µS/cm : Tableau 4). On peut penser à des sels, métaux et autres minéraux, ce qu'on cherchera à vérifier par ICP-MS et MEB EDX.

Huit impuretés (et/ou produits de dégradation) ont été mises en évidence dans les deux produits (voir 3.2.1.3). Les impuretés majoritaires, observées en UV et en MS, correspondent à

des composés de structure proche de celle de la sulforhodamine B, avec des groupements C_2H_4 en moins par exemple.

Les produits du premier projet réanalysés avec les nouveaux produits montrent des puretés inférieures à celles mesurées la première fois (avec des différences de 9 à 11 % : Tableau 7). Ceci pourrait indiquer une dégradation des poudres ; toutefois, l'exemple de l'éosine réanalysée, et montrant une pureté supérieure à celle du premier projet (79,4 contre 75,7 % : Tableau 7), incite à la prudence. La différence pourrait être également due à la dégradation des étalons utilisés pour la détermination de la pureté.

► Sulforhodamine G. Comme dans le cas de la sulforhodamine B, les résultats confirment ceux obtenus en solution par les mesures de CE et de pH (Tableau 4), et d'intensité de fluorescence (Figure 10) : les deux produits sont très différents, la sulforhodamine G sélectionnée par Art E'Color (**SGa1**) ayant une teneur en traceur proche de 49 %, contre moins de 35 % pour le produit sélectionné par Fluotechnik (**SGf1**), une teneur en eau de 11,5 %, contre 5,6 %, et par ailleurs un taux d'insolubles de 46 %, contre 16 % (Tableau 7).

Comme cela avait été observé lors des mises en solution (voir 3.1.1, Tableau 4), la sulforhodamine G est le seul des six traceurs étudiés à comporter une part d'insolubles dans toutes ses poudres, part de plus non négligeable (voir Tableau 7), ces particules étant insolubles en milieu organique, mais solubles en phase aqueuse en milieu basique. Les techniques d'analyse pour l'identification de ces particules restent à mettre en place.

La fiche technique du produit sélectionné par Art E'Color (Tableau 2) est donc très éloignée de la réalité à la fois pour les indications de pureté (« pureté [HPLC] : 87 à 91 % », contre 49-51 % en réalité : Tableau 7) et de taux d'insolubles (« < 0,2 % », contre 44-48 % en réalité : Tableau 7). La fiche technique du produit sélectionné par Fluotechnik ne contient qu'une indication de solubilité, similaire à celle du produit Art E'Color, et donc vraisemblablement inexacte elle aussi (Tableau 2).

Onze impuretés (et/ou produits de dégradation) ont pu être mises en évidence (Tableau 10). De même que pour la sulforhodamine B (voir ci-dessus), les impuretés majoritaires observées en UV et en MS correspondent à des composés de structure proche de celle de la sulforhodamine G, avec un groupement C_2H_4 en moins par exemple (Impureté 2 du Tableau 10). Comme dans le cas de la sulforhodamine B sélectionnée par Fluotechnik, une interrogation persiste sur la présence de composés solubles en phase aqueuse qui ne seraient pas analysables par HPLC, qui représenteraient 35 % environ de la masse du produit (Tableau 7), et qui expliqueraient la grosse différence de CE observée entre les deux produits en solution (96 $\mu S/cm$ pur **SGf1**, contre 17 $\mu S/cm$ pour **SGa1** : Tableau 4). Ces espèces sont très certainement des métaux, minéraux ou sels, ce qui pourra être vérifié ultérieurement par ICP-MS et MEB EDX (voir 4.1).

Comme dans le cas de la sulforhodamine B (voir ci-dessus), le produit issu du premier projet réanalysé avec les deux nouveaux produits montre une pureté inférieure à celle mesurée la première fois (45 %, contre 69 % : Tableau 7).

► Naphtionate de sodium. Les deux produits (**NSa1** et **NSf1**) ont des puretés proches, légèrement supérieure pour celui sélectionné par Fluotechnik (83,3 %, contre 80,6 % pour celui sélectionné par Art E'Color : Tableau 7), ce qui est conforme aux résultats de mesure d'intensité de fluorescence (voir 3.1.3.5). Leur teneur en eau est également très proche, de l'ordre de 20 % (Tableau 7).

Ces valeurs sont globalement les mêmes pour toutes les poudres de naphtionate de sodium analysées depuis le premier projet (voir Défarge *et al.* 2020), ce qui en fait le traceur fluorescent à la qualité la plus constante parmi les six étudiés.

Pour les valeurs de pureté, elles sont par ailleurs conformes aux indications des fiches techniques (Tableau 2) : « pureté (HPLC) ≥ 74 % » pour celui sélectionné par Art E'Color ; « pureté minimale : 75 % » pour celui sélectionné par Fluotechnik, pour lequel une indication d'insolubles $\sim 0,12$ % est également confirmée par nos analyses, qui n'en ont pas détecté dans cette poudre (voir Tableau 2).

► Acide amino G. Comme dans le cas du naphtionate de sodium, les deux produits ont des puretés similaires, légèrement supérieure dans ce cas pour celui sélectionné par Art E'Color

(**AGa1** : 95,3 % ; contre 93,0 % pour celui sélectionné par Fluotechnik, **AGf1** : Tableau 7), et proches de celles de la plupart des produits analysés au cours du premier projet (96-98 % : Défarge *et al.* 2020). Leurs teneurs en eau sont également très proches : 2,56 et 2,20 % (Tableau 7).

Contrairement au naphthionate de sodium, leur légère différence de pureté est indistinguable par les mesures d'intensité de fluorescence (voir Figure 12).

Pour les valeurs de pureté, les seules portées sur leurs fiches techniques (Tableau 2), l'indication de celui sélectionné par Fluotechnik est plus juste (« pureté minimale : 80 % ») que pour celui sélectionné par Art E'Color (« pureté ~ 80 % »), comme cela avait déjà été noté lors du premier projet (voir Défarge *et al.* 2020).

3.3. Relation entre intensité de fluorescence et pureté des produits

Dans cette partie sont reportés les résultats comparés des analyses d'intensité de fluorescence en solution des produits traceurs réalisées à CETRAHE (voir 3.1.3), en fonction des analyses de leur pureté effectuées à COBRA (voir 3.2.1.2), dans le but de vérifier les corrélations qu'on a pu mettre en évidence lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) entre intensité de fluorescence des traceurs en solution, mesurée dans des conditions contrôlées (et notamment par normalisation des mesures sur un même appareil grâce à une correction par l'aire du pic Raman de l'eau obtenue dans les mêmes conditions ; voir ci-dessus), et pureté des produits, sur un plus grand nombre de ceux-ci.

Cette comparaison s'inscrit dans le volet d'action n° 2 du projet : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits (voir 1. Introduction). Ce deuxième volet de l'étude vise à établir de véritables abaques pouvant permettre d'estimer la pureté des lots de traceurs par simple mesure d'intensité de fluorescence, et donc de mettre en place une forme de contrôle qualité de ces produits par un laboratoire d'analyses indépendant.

Les résultats complets sont portés dans les Figures 23 à 28 ci-dessous, qui incluent ceux obtenus sur les produits de la 1^{ère} année de ce second projet (des mises à jour ont toutefois été opérées pour les sulforhodamines, voir sections 3.3.3 et 3.3.4, notamment les Figures 25 et 26), et ceux obtenus dans les mêmes conditions dans le cadre du premier projet (Défarge *et al.* 2020) :

► pour l'éosine, la sulforhodamine B et le naphthionate de sodium, les résultats des 2^{ème} et 3^{ème} séries d'analyses du premier projet, qui sont les seules comparables au projet actuel car une correction des intensités par l'aire du pic Raman de l'eau leur avait été appliquée ;

► pour la sulforhodamine G, les résultats de la 3^{ème} série d'analyses du premier projet, puisqu'elle n'avait pu être achetée pour la 2^{ème} série d'analyses ;

► pour l'uranine, les résultats de la 3^{ème} série d'analyses du premier projet, puisque la seule où avait été appliqué un ajustement du pH par le tampon Tris-HCl.

En ce qui concerne l'acide amino G, ce second projet ayant introduit une double modification par rapport au premier (Défarge *et al.* 2020), un ajustement du pH par tampon Tris-HCl (voir 2.2) et une mesure d'intensité de fluorescence à un autre pic d'excitation-émission (voir 2.2.2 et Annexe 6), les produits du premier projet ont été réanalysés en photométrie dans les mêmes conditions que les deux produits récents.

3.3.1. Uranine

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 23 ci-dessous. Les résultats obtenus confirment ceux du premier projet (sur une seule série d'analyses à l'époque : Défarge *et al.* 2020), avec d'excellentes corrélations entre les deux paramètres ($R^2 = 0,8835$ à $0,9203$: Figure 23 ; les R^2 obtenus lors du premier projet étaient de $0,8398$ et $0,9751$: Défarge *et al.* 2020).

Dans le cas des uranines, la teneur en traceur des poudres est donc bien le facteur prédominant contrôlant l'intensité de fluorescence des solutions, et l'ensemble des résultats des deux projets jusque-là confirment que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour le même appareil d'un même laboratoire, qui soit suffisante pour que des abaques *pureté = f(intensité de fluorescence)* basés sur la relation de proportionnalité entre les deux paramètres puissent permettre d'introduire à l'avenir une forme de contrôle qualité des produits traceurs, par un laboratoire spécialisé dans ces analyses.

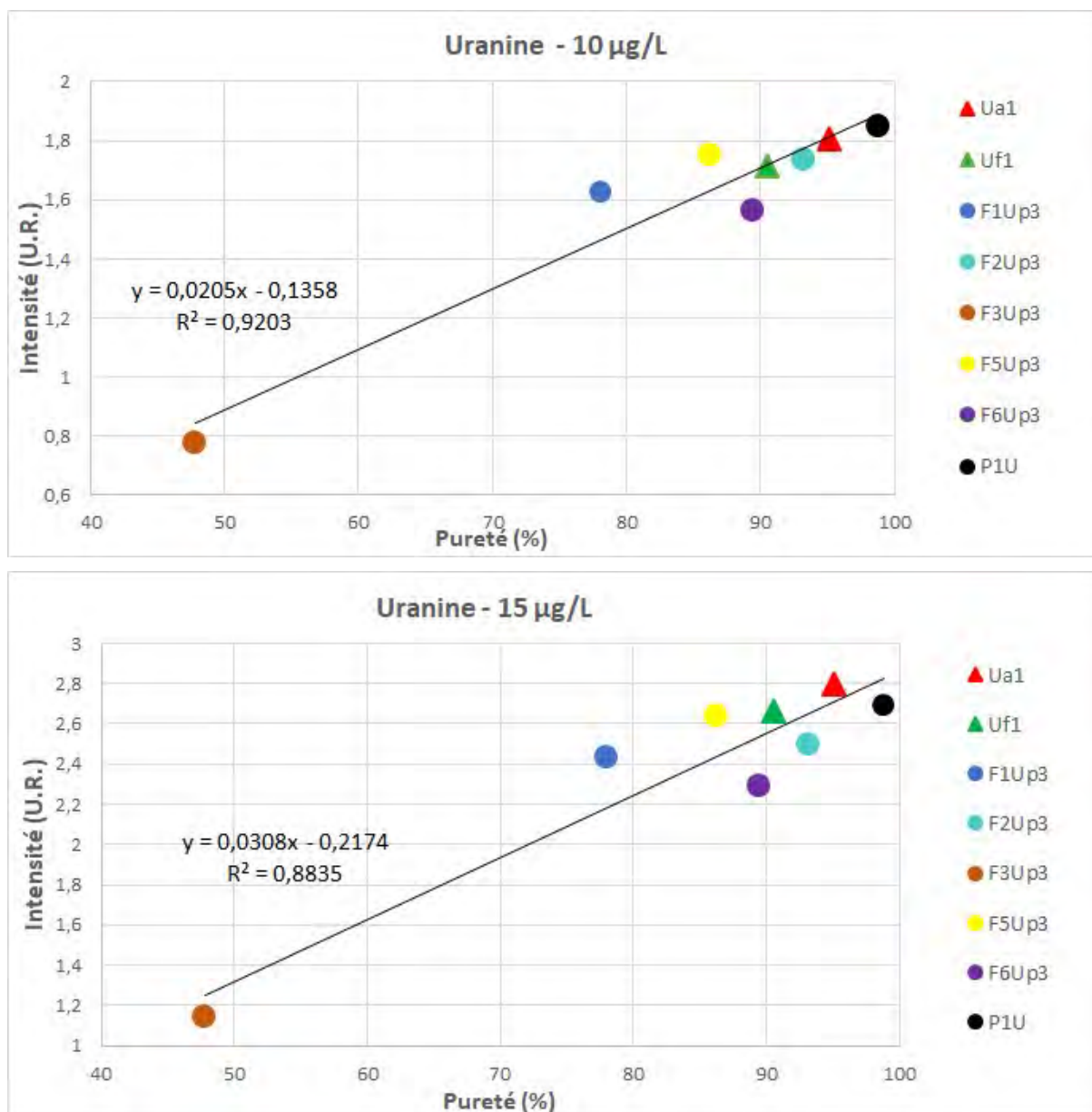


Figure 23 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 15 µg/L (en bas), et teneur en uranine des poudres ayant servi à les fabriquer.

3.3.2. Eosine

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 24 ci-dessous. La corrélation entre les deux paramètres apparaît nettement moins bonne que celle obtenue avec les seuls produits du premier projet (avec des R^2 de 0,5800 et 0,6475, contre 0,7235 à 0,8776 à l'époque : Défarge *et al.* 2020), dont on avait déjà fait remarquer qu'elle pourrait être meilleure si la teneur en traceur du produit **F1Ep3** était effectivement plus proche de 85 à 94 % (pureté des produits montrant la même intensité de fluorescence en solution) que de 76 % (Défarge *et al.* 2020). Si l'on ne tient pas compte de ce produit, les R^2 ne remontent toutefois qu'à 0,7226 et 0,7188, et sont donc encore loin de celles qu'on peut observer pour l'uranine (voir 3.3.1 ci-dessus).

Un phénomène similaire peut être constaté, puisque le produit **F1Ep3** a une intensité de fluorescence extrêmement proche du produit **Ef1**, et distinctement inférieure à celle du produit **Ea1** (Figure 8), alors que sa pureté (79,4 % : Tableau 7) est très inférieure à celles des deux nouveaux produits, lesquels ont des concentrations en traceur extrêmement proches (87,9 et 89,2 %, respectivement : Tableau 7), tout en ayant des fluorescences distinctes (Figure 8).

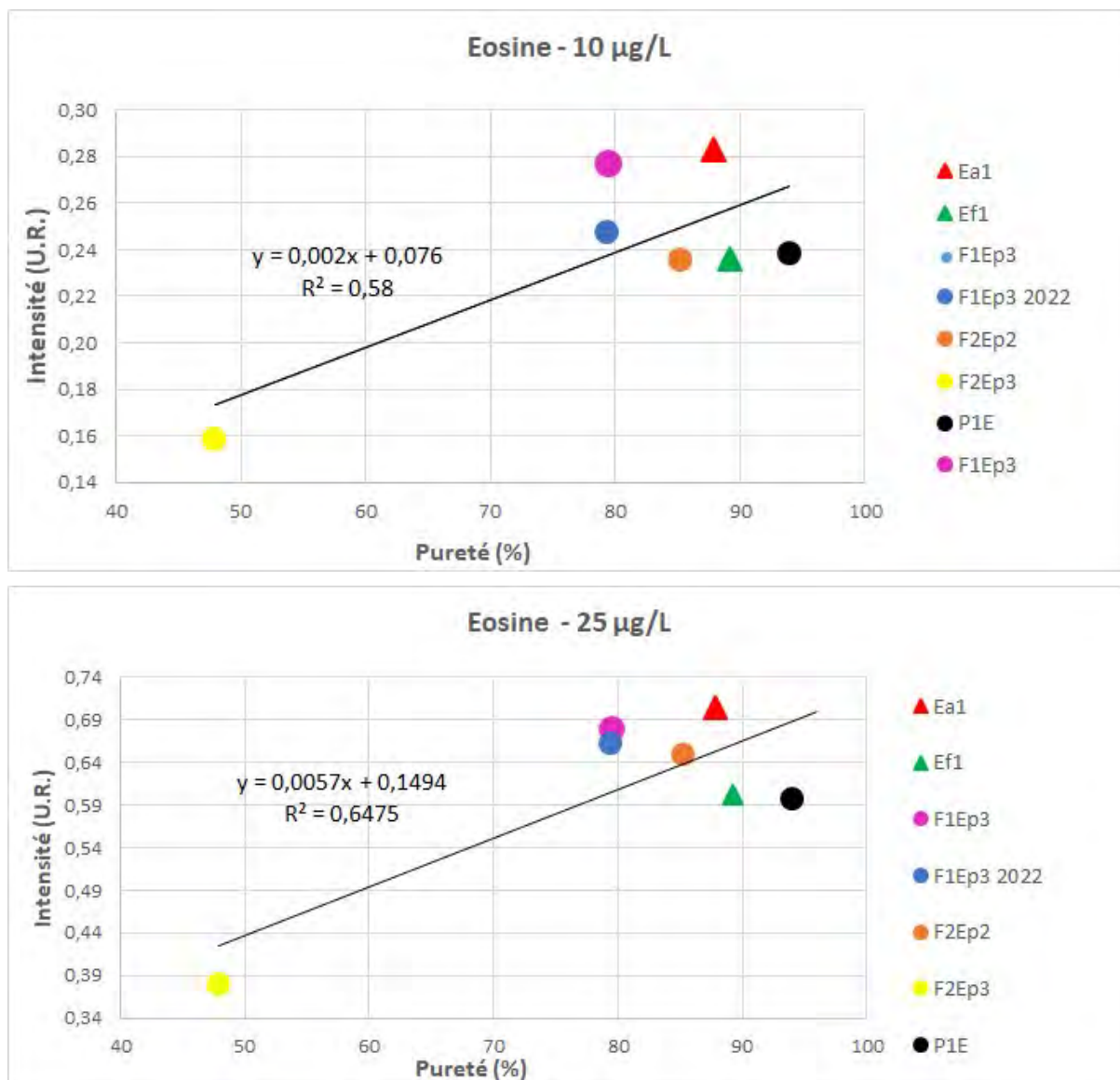


Figure 24 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en éosine des poudres ayant servi à les fabriquer.

Comme cela avait déjà été souligné lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), des éléments d'explication pourraient être les différences de teneur en eau des éosines, très variables (de 6,34 à 13,4 % cette fois-ci, celle du produit **F1Ep3** ayant doublé entre 2019, où elle était proche de 6 %, et 2022 : Tableau 7), ou les composants complémentaires, qui ont été estimés à 3,7 à 5,82 % du total cette fois-ci, et notamment 3,7 % pour **F1Ep3** (Tableau 7), contre 13 % en 2019 (Défarge *et al.* 2020) ; ces composants pourraient participer à la fluorescence, sans être décomptés dans la pureté (hypothèse calquée sur le cas de l'uranine, dont l'éosine est chimiquement proche, et dont la fluorescence est liée à l'anion du sel alcalin formé en solution : Käss 1998). Ces hypothèses seront explorées durant l'exploitation des résultats obtenus à COBRA sur les produits analysés à CETRAHE la deuxième année du projet.

3.3.3. Sulforhodamine B

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 25 ci-dessous. Les résultats obtenus confirment ceux du premier projet, qui montraient, malgré un faible nombre de données utilisables ne permettant pas de tirer de véritable conclusion, une tendance générale à l'augmentation de l'intensité de fluorescence en fonction de la teneur en traceur des poudres (Défarge *et al.* 2020). Complétés par ceux obtenus sur les deux nouveaux produits (**SBa1** et **SBf1**), les résultats complets des deux

projets jusque-là montrent d'excellentes corrélations entre intensité de fluorescence des traceurs en solution et pureté des poudres ayant servi à les fabriquer : $R^2 = 0,8807$ à $0,9304$: Figure 25).

Les impuretés mises en évidence dans les poudres de sulforhodamine B étant des molécules de structure très proche (voir 3.2.1.3), donc des molécules également probablement fluorescentes puisque la fluorescence est majoritairement due aux cycles aromatiques (Lakowicz 2006), on a complété la relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté par la relation entre l'intensité de fluorescence et la teneur des produits en sulforhodamine B + impuretés ; le résultat n'est pas fondamentalement changé, mais on peut toutefois noter que les R^2 obtenus pour les deux concentrations sont cette fois-ci identiques ($0,9022$: Figure 25).

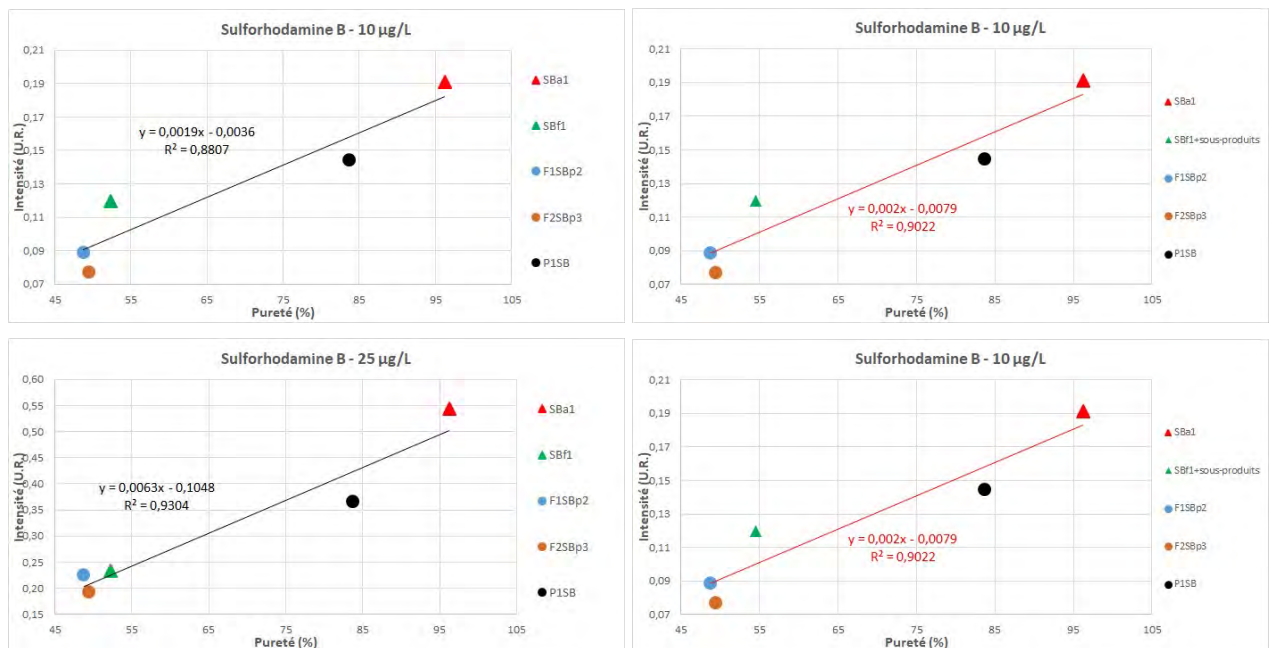


Figure 25 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en sulforhodamine B pure (à gauche) et sulforhodamine B + sous-produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.

Comme dans le cas de l'uranine (voir 3.3.1 ci-dessus), la teneur en sulforhodamine B des poudres est donc bien le facteur prédominant contrôlant l'intensité de fluorescence des solutions, et l'ensemble des résultats des deux projets jusque-là confirment que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour le même appareil d'un même laboratoire, qui soit suffisante pour que des abaques $\text{pureté} = f(\text{intensité de fluorescence})$ basés sur la relation de proportionnalité entre les deux paramètres puissent permettre d'introduire à l'avenir une forme de contrôle qualité des produits traceurs, par un laboratoire spécialisé dans ces analyses.

3.3.4. Sulforhodamine G

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 26 ci-dessous. Les corrélations entre les deux paramètres sont encore plus faibles que dans le cas de l'éosine (voir 3.3.2), avec des R^2 de 0,3372 et 0,4479 (Figure 26) ; aucune comparaison n'est possible dans ce cas avec le premier projet, pour lequel on ne disposait que d'un nombre insuffisant de données utilisables (Défarge *et al.* 2020).

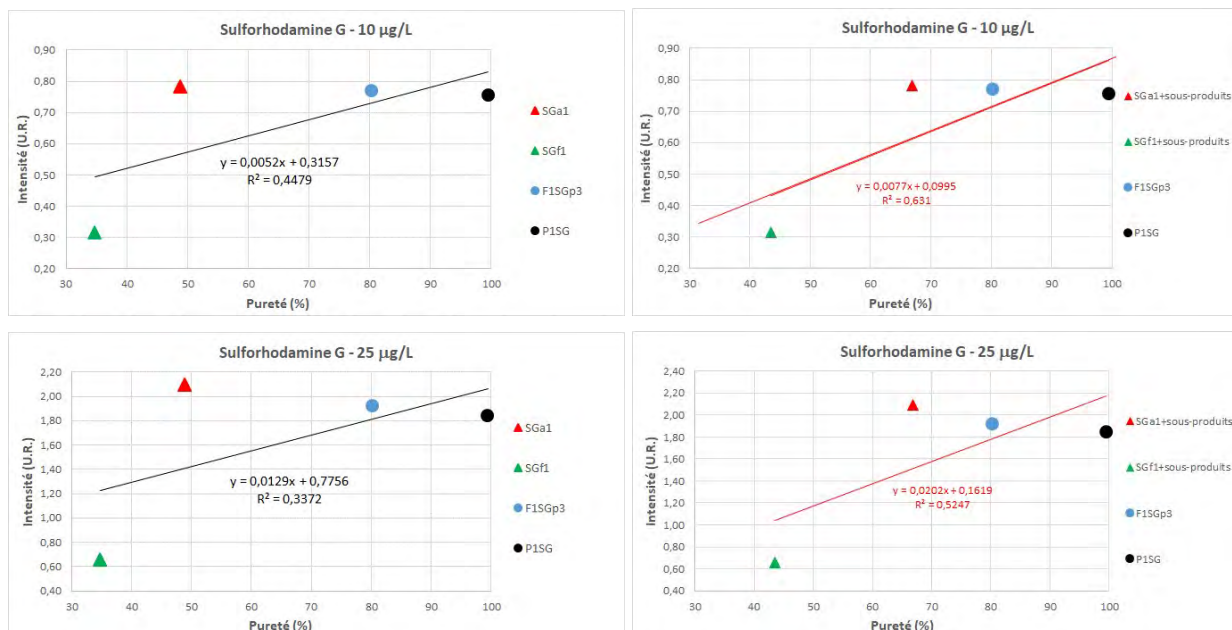


Figure 26 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en sulforhodamine G pure (à gauche) et sulforhodamine G + sous- produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.

Les impuretés mises en évidence dans les poudres de sulforhodamine G sont, comme dans le cas de la sulforhodamine B (voir ci-dessus 3.3.3), des molécules de structure très proche (voir 3.2.1.3), donc des molécules également probablement fluorescentes puisque la fluorescence est majoritairement due aux cycles aromatiques (Lakowicz 2006). On a donc complété la relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté par la relation entre l'intensité de fluorescence et la teneur des produits en sulforhodamine G + impuretés ; contrairement au cas de la sulforhodamine B, les corrélations sont améliorées, avec des R^2 passant de 0,3372-0,4479 à 0,5247-0,6310 (Figure 26), soit dans la gamme de ceux observés pour l'éosine (voir 3.3.2).

Comme l'éosine, la sulforhodamine G se caractérise par une teneur en eau des poudres très variable (de 5,56 à 12,50 % : Tableau 7), et cette caractéristique pourrait donc également expliquer la faible corrélation entre intensité de fluorescence et teneur en traceur (voir 3.3.2).

3.3.5. Naphtionate de sodium

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 27 ci-dessous.

Les corrélations entre les deux paramètres sont les plus faibles observées parmi les six traceurs étudiés, avec des R^2 de 0,0723 et 0,2359 (Figure 27), comparables à ceux mesurés lors du premier projet ($R^2 = 0,0076$ à 0,4031 : Défarge *et al.* 2020).

Dans ce cas, il semble que ce phénomène puisse être essentiellement dû à la forte hygroscopicité des poudres de ce traceur, dont les teneurs en eau mesurées sur l'ensemble des deux projets jusqu'ici a toujours été supérieure à 20 % (voir Tableau 7, et Défarge *et al.* 2020).

Toutefois, la faible dispersion des valeurs de pureté pour ce traceur (dont la qualité est la plus constante parmi les six étudiés : voir ci-dessus 3.2.2), combinée à une incertitude de 1,2 % (voir Tableau 7), pourrait également entrer en ligne de compte.

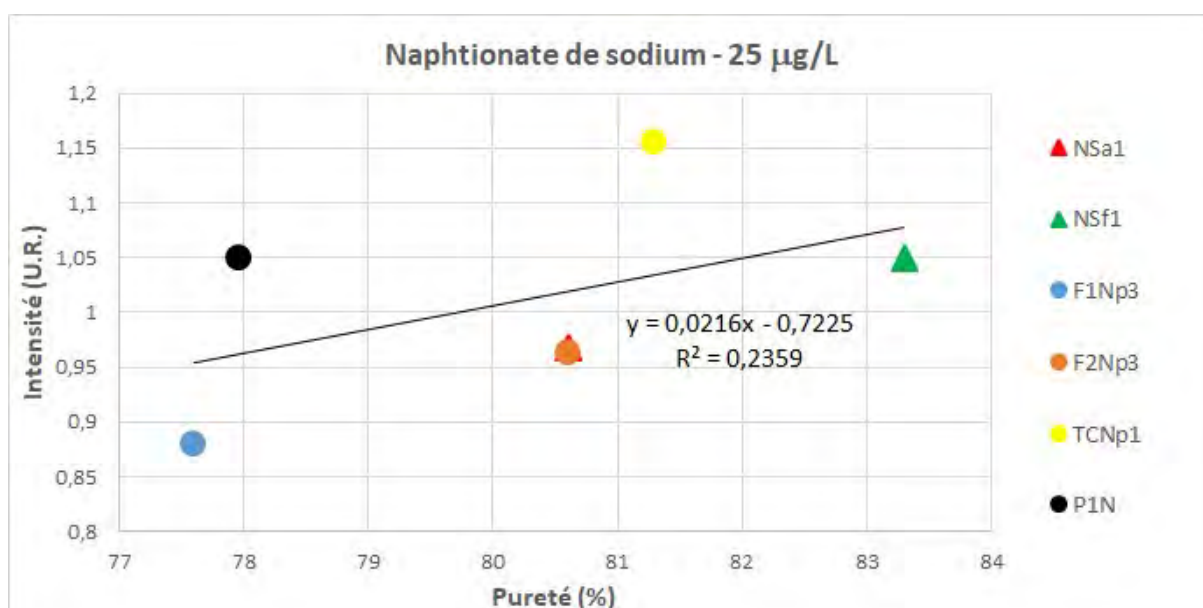
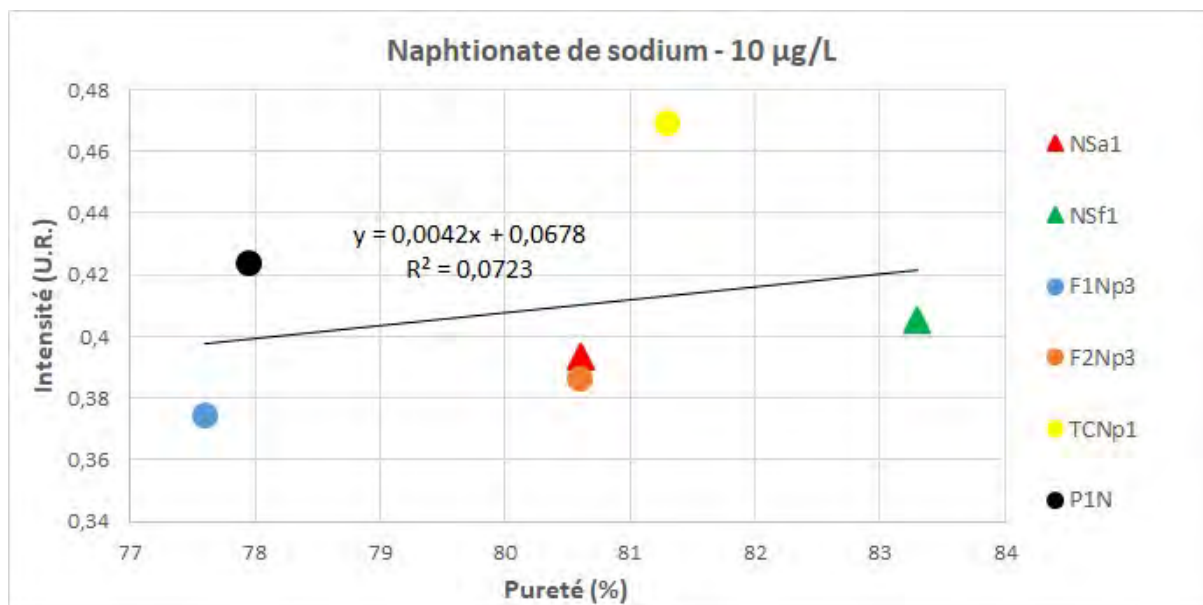


Figure 27 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en naphtionate de sodium des poudres ayant servi à les fabriquer.

3.3.5. Acide amino G

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 28 ci-dessous.

Les résultats obtenus confirment ceux du premier projet, l'ajustement du pH des solutions par le tampon Tris-HCl (voir 2.2) et l'utilisation des longueurs d'onde testées à l'époque par EWTS (voir 2.2.2 et Annexe 6) ayant permis d'obtenir cette fois-ci à CETRAHE, aux deux concentrations de 10 et 25 µg/L (Figure 28), des corrélations entre les deux paramètres équivalentes à celles observées lors du premier projet pour les solutions à 25 µg/L à EWTS et dans les deux laboratoires à 10 µg/L (avec des R^2 de 0,8196 et 0,8698, contre 0,8138 à 0,9728 lors du premier projet : Défarge *et al.* 2020), et donc de corriger la relation calculée à l'époque pour les solutions à 25 µg/L à CETRAHE ($R^2 = 0,2132$: Défarge *et al.* 2020).

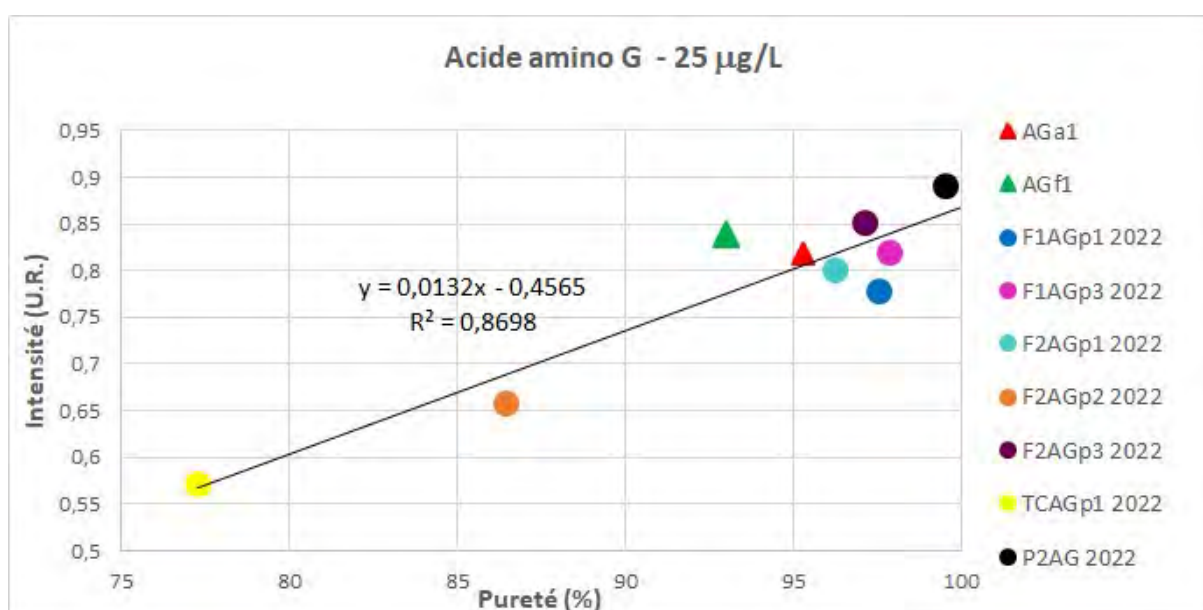
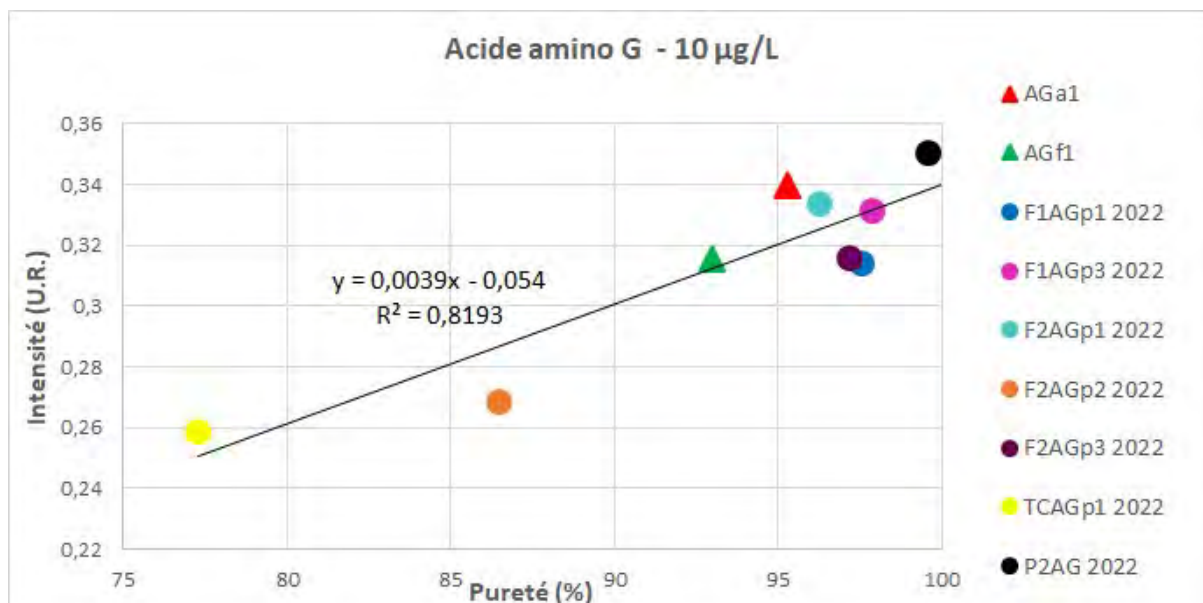


Figure 28 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en acide amino G des poudres ayant servi à les fabriquer.

Comme dans le cas de l'uranine et de la sulforhodamine B (voir 3.3.1 et 3.3.3 ci-dessus), la teneur en acide amino G des poudres est donc bien le facteur prédominant contrôlant l'intensité de fluorescence des solutions, et l'ensemble des résultats des deux projets jusque-là confirment que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour le même appareil d'un même laboratoire, qui soit suffisante pour que des abaques *pureté = f(intensité de fluorescence)* basés sur la relation de proportionnalité entre les deux paramètres puissent permettre d'introduire à l'avenir une forme de contrôle qualité des produits traceurs, par un laboratoire spécialisé dans ces analyses.

3.4. Analyses des produits anti-mousse

Dans cette partie sont présentés les résultats des essais réalisés sur les produits anti-mousse, le FLUXAIR 85 S GR Nymco et le LUCRAFOAM E 100 CONC.

3.4.1. Analyse de fluorescence

Les spectres en double balayage excitation et émission des deux produits, dans de l'eau ultrapure, montrent que le produit LUCRAFOAM E 100 CONC n'est pas fluorescent (voir Figure 29, droite, ci-dessous) et que le produit FLUXAIR 85 S GR Nymco ne fluoresce pas aux longueurs d'onde caractéristiques de l'uranine et de l'éosine (voir Figure 29, gauche).

Ces deux produits ne risquent donc pas d'interférer avec la détection, ou l'intensité de fluorescence de ces traceurs.

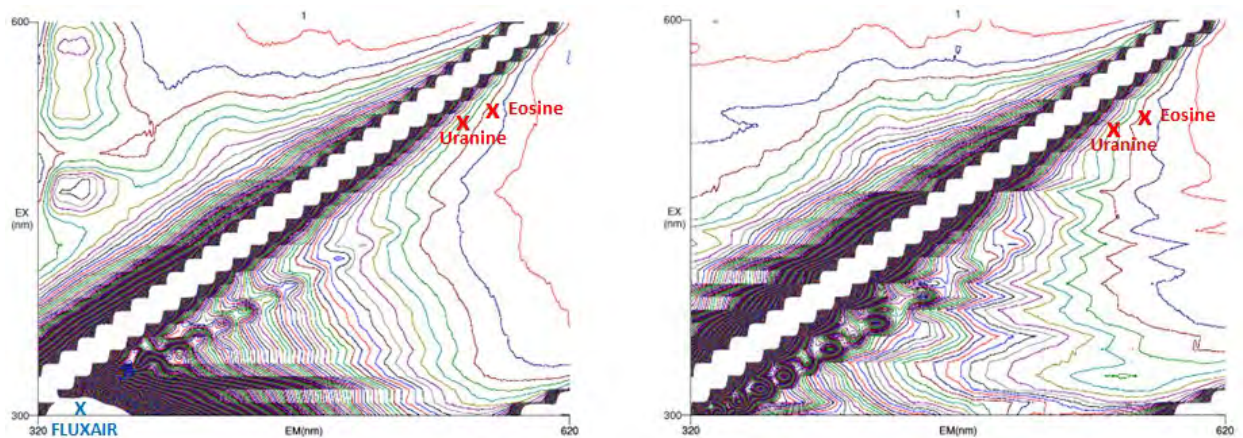


Figure 29 : Spectres en double balayage excitation – émission des produits FLUXAIR 85 S GR Nymco (gauche) et LUCRAFOAM E 100 CONC (droite).

Les pics principaux de l'uranine et de l'éosine sont repérés par des croix rouges, le pic de fluorescence du produit FLUXAIR 85 S GR Nymco étant noté en bleu.

3.4.2. Formation de mousse dans les uranines et éosines en solution

Lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), la formation de mousse lors de la mise en solution des traceurs avait été relevée pour cinq produits parmi les uranines (**F1Up1**, **F2Up1** et **F4Up2**) et les éosines (**F1Ep1** et **F2Ep1**), à partir de 100 mg/L pour **F4Up2** (à EWTS), et à partir de 500 mg/L pour l'ensemble des autres produits (à COBRA). Ces cinq produits ont été réutilisés pour ce nouveau projet (voir protocole au 2.4).

Aucune mousse n'a été observée pour les uranines lors de la mise en solution, sous agitation magnétique, et ce à des concentrations supérieures à 30 g/L, et jusqu'à 79 g/L pour **F4Up2**.

De même, aucune mousse n'a été observée pour les éosines lors de la mise en solution, sous agitation magnétique, et ce jusqu'à des concentrations supérieures à 66 g/L.

L'expérience d'Art E'Color indiquerait que la formation obligée de mousse (rapportée dans le premier rapport : Défarge *et al.* 2020) ne s'observe qu'en production, à grande échelle (container de 1000 L), et à des concentrations très élevées (de l'ordre de 300 g/L pour l'uranine par exemple).

Les observations du premier projet au laboratoire, à des concentrations jusqu'à 3 000 fois inférieures, seraient donc accidentelles, et ne pouvaient permettre de simuler les formations de mousse lors de la mise en solution de traceurs en grandes quantités sur le terrain, signalées comme gênantes par certains praticiens (voir 1. Introduction).

4. Conclusions et perspectives

Même s'ils ne faisaient pas partie des objectifs prioritaires de ce second projet d'étude de la qualité, pour les traçages hydrogéologiques, des produits traceurs actuellement disponibles dans le commerce (voir 1. Introduction), un certain nombre de résultats obtenus permettent de compléter et de confirmer ceux du premier projet (Défarge *et al.* 2020) :

► **Tout d'abord, tous les produits analysés jusque-là dans le cadre des deux projets sont d'excellente qualité du point de vue des propriétés de fluorescence des molécules les composant, avec notamment :**

► **présence du composé fluorescent avec les caractéristiques spectroscopiques connues dans la littérature (longueurs d'onde d'excitation et d'émission permettant leur détection dans les eaux), absence d'autres composants fluoresçant à des longueurs d'onde différentes ;**

► **proportionnalité de l'intensité de fluorescence des traceurs en fonction de leur concentration en solution, autorisant les analyses quantitatives.**

Dans le cas des sulforhodamines toutefois, des composants complémentaires solubles, de structure proche (voir 3.2.1.3), pourraient fluorescer aux mêmes longueurs d'onde que ces traceurs et contribuer ainsi à l'intensité de fluorescence des produits en solution. Si leur impact paraît faible dans le cas de la sulforhodamine B (voir 3.3.3) où ils ne représentent que 2 à 4 % du total (Tableau 7), dans le cas de la sulforhodamine G, où ils atteignent 7 à 18 % (Tableau 7), ils sont pour partie responsables de la faible corrélation entre intensité de fluorescence en solution et teneur en traceur (voir 3.3.4).

Les abaques que ce projet cherche à mettre au point (voir Introduction, Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits) permettraient donc d'estimer la teneur en composants fluorescents, et non la pureté, des poudres de sulforhodamines, en fonction de leur intensité de fluorescence en solution.

Dans le cas de l'éosine, les résultats obtenus font ressortir que le cas du produit particulier mis en évidence lors du premier projet, qui montrait une fluorescence comparable aux produits de puretés comprises entre 85 et 94 %, alors que la sienne n'était que de 76 % (Défarge *et al.* 2020), n'est pas isolé (voir 3.3.2). Cette absence de corrélation entre pureté et fluorescence (confirmée par les R² relativement faibles : voir 3.3.2) pourrait indiquer la participation à la fluorescence en solution de ces poudres de composants proches de l'éosine, et donc ayant les mêmes caractéristiques spectroscopiques (en termes de couple de longueurs d'onde d'excitation et d'émission), qui seraient présents dans les poudres ou se formeraient en solution.

Cette hypothèse est basée sur une analogie avec les sulforhodamines, et également avec l'uranine, dont l'éosine est chimiquement proche, et dont on sait que la fluorescence est liée à l'anion du sel alcalin formé en solution (Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009) ; ce pourrait être également le cas pour les poudres de sulforhodamine G (voir 3.3.4).

► **Comme cela avait déjà été mis en évidence lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), les résultats obtenus jusque-là dans ce second projet confirment également que les fiches techniques des produits fournis par les fabricants, qui n'ont pas été modifiées, sont en revanche fréquemment fausses (comparer Tableaux 2 et 7) :**

► **la teneur en eau de l'uranine sélectionnée par Fluotechnik (Uf1) est de $7,76 \pm 0,19$ % et non ≈ 5 % comme indiqué sur sa fiche technique ;**

► **celle de l'éosine sélectionnée par Art E'Color (Ea1) dépasse les 10 % maximum indiqués ($10,72 \pm 0,34$ % : Tableau 2) ;**

► **celle de la sulforhodamine B sélectionnée par Art E'Color (SBa1) dépasse les 7 % maximum indiqués ($8,03 \pm 0,31$ % : Tableau 2) ;**

► **les caractéristiques de la sulforhodamine G sélectionnée par Art E'Color (SGa1) sont très éloignées de celles indiquées sur sa fiche technique, avec une pureté de $48,8 \pm 1,9$ % seulement au lieu de 87 à 91 %, et une teneur en insolubles de $45,9 \pm 1,7$ % au lieu de $\leq 0,2$ % ;**

► la pureté de l'acide amino G sélectionné par Art E'Color 'AGa1) n'est pas $\approx 80\%$ comme indiqué sur sa fiche technique, mais de $95,3 \pm 1,5\%$ (Tableau 7), l'indication portée sur celle du produit sélectionné par Fluotechnik (AGf1 : pureté minimale : 80% ; Tableau 2) étant dans ce cas plus juste.

Comme on l'avait déjà relevé en conclusion du premier projet (Défarge *et al.* 2020), les teneurs en eau des poudres au moment de leur analyse ou de leur utilisation ne peuvent être contrôlées par les fabricants, car elles dépendent des conditions de conservation et ambiantes au moment des manipulations. Il faudrait donc que les fiches techniques des produits précisent que le taux d'humidité indiqué pour les poudres est celui mesuré en sortie d'usine.

Comme on l'avait également déjà souligné en conclusion du premier projet (Défarge *et al.* 2020), les indications fautives de pureté pour la sulforhodamine G sont beaucoup plus problématiques, puisqu'elles conduisent à injecter, lors des opérations de traçage, une masse de traceur surestimée (d'un facteur 2 dans ce cas précis, puisque la pureté réelle est environ moitié moindre que la pureté indiquée).

Les poudres d'uranine et d'acide amino G sélectionnées la 1^{ère} année pour cette étude sont, par contre, de très bonne pureté ($90,5$ à $95,1\%$, et $93,0$ à $95,3\%$, respectivement : Tableau 7), c'est-à-dire au niveau de la plupart des produits sélectionnés par les mêmes fournisseurs analysés lors du premier projet (seule une uranine, fournie par Art E'Color à l'époque, n'en contenait que 78% au lieu de $> 91\%$ pour les autres produits, et un acide amino G, fourni par Fluotechnik, seulement $86,5\%$ au lieu de $> 96\%$ pour les autres produits : Défarge *et al.* 2020).

Les poudres de naphthionate de sodium ont les puretés moyennes ($80,6$ et $83,3\%$: Tableau 7) des produits analysés lors du premier projet ($77,6$ à $88,5\%$: Défarge *et al.* 2020), limitées par le caractère hygroscopique de ces poudres (Défarge *et al.* 2020).

De ce point de vue, les fiches techniques des produits contenant ces trois traceurs sont exactes, hormis le cas de l'acide amino G signalé ci-dessus, mais dont la pureté est, dans ce cas, sous-estimée (Tableau 2).

Il faut noter enfin que certaines fiches techniques ne portent aucune indication de pureté (éosine Ea1 et sulforhodamines B et G SBf1 et SGf1 : voir Tableau 2), alors que leurs teneurs en traceur sont loin à très loin des 100% sur lesquels sont basés les calculs des praticiens (respectivement 88% , 52 et 35% : Tableau 7).

La qualité des fiches techniques des produits traceurs commercialisés doit, de manière générale, être soigneusement améliorée.

► Les résultats obtenus au cours de ces deux premières années du second projet confirment enfin que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une harmonisation des mesures de fluorescence entre séries d'analyses pour un même appareil d'un même laboratoire, mise en évidence lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), puisque l'éosine F1Ep3 réanalysée les deux années dans le cadre du projet en cours montre des valeurs d'intensité de fluorescence en solution très proches de celles obtenues à l'époque, aux deux concentrations ($0,21-0,23$ contre $0,24$ à $10\ \mu\text{g/L}$, et $0,57-0,62$ contre $0,59$ à $25\ \mu\text{g/L}$: Figure 8 et Défarge *et al.* 2020), et que celles de la sulforhodamine G SGf1 analysée lors des deux séries d'analyses sont globalement proches d'une série à l'autre ($0,30$ et $0,35$ à $10\ \mu\text{g/L}$, et $0,62$ et $0,85$ à $25\ \mu\text{g/L}$: Figure 10).

Les résultats spécifiques obtenus ces deux premières années du projet en cours sont résumés ci-dessous selon les volets d'action prévus (voir 1. Introduction).

4.1. Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux

Les deux sulforhodamines B sélectionnées la 1^{ère} année pour ce projet sont de qualités très différentes, expliquant leurs caractéristiques qualitatives et leurs CE et pH en solution très éloignés (Tableau 4) :

► celle sélectionnée par Art E'Color (**SBa1**) a une excellente pureté (96,2 % : Tableau 7), comparable à celles des meilleures poudres d'uranine ou d'acide amino G (voir 3.2.1.2) ;

► celle sélectionnée par Fluotechnik (**SBf1**) a une pureté faible (52,3 % : Tableau 7), située dans la moyenne de celles analysées lors du premier projet (48,8 à 59,0 % : Défarge *et al.* 2020).

Trois des sulforhodamines B analysées lors du premier projet ont été réanalysées cette fois-ci, et leurs teneurs sont de 8 à 11 % inférieures à ce qui avait été déterminé à l'époque (Tableau 7).

Toutes les poudres de sulforhodamine B contiennent des impuretés solubles, nombreuses (douze au total), de compositions proches de celle du traceur (voir 3.2.1.3), mais en proportion faible (< 2 à 4 % : Tableau 7). Dans le cas de **SBf1**, elles seraient accompagnées par des composants solubles en phase aqueuse non analysables par HPLC, qui représenteraient 40 % environ de la masse du produit. Aucun de ces produits ne contient en revanche de composants insolubles, contrairement aux conclusions du premier projet, qui l'avait déduit de difficultés de mises en solution de ces poudres (Défarge *et al.* 2020).

Les deux sulforhodamines G sélectionnées la 1^{ère} année (**SGa1** et **SGf1**) sont également distinctes, mais dans une moindre mesure, alors que leurs CE en solution sont beaucoup plus éloignées que ne le sont celles des sulforhodamines B (Tableau 4). Leurs puretés sont toutefois toutes les deux faibles (34,7 et 48,8 % : Tableau 7), et encore inférieures à celles des produits analysés lors du premier projet (63,8 à 80,3 % : Défarge *et al.* 2020). La sulforhodamine G du premier projet qui a été réanalysée cette fois-ci (**F1SGp1**) a également une pureté faible, comprise entre celles des deux nouveaux produits (44,5 % : Tableau 7), alors qu'elle avait été évaluée à 68,9 % à l'époque (Tableau 7).

Comme les sulforhodamines B, elles contiennent des impuretés solubles, nombreuses (onze), de compositions proches de celle du traceur (dont de la sulforhodamine B : voir 3.2.1.3), mais cette fois-ci en proportion notable, et très variable d'un produit à l'autre (de 7 à 18 % : Tableau 7). Dans le cas de **SGf1**, elles seraient accompagnées par des composants solubles en phase aqueuse non analysables par HPLC, qui représenteraient 35 % environ de la masse du produit (Tableau 7).

Leurs parts d'insolubles sont également significatives et très variables (d'où leurs comportements distincts au moment de la mise en solution : Tableau 4), celle du produit sélectionné par Art E'Color étant proche de celle du produit issu du premier projet (45,9 contre 45,2 % : Tableau 7), tandis que celle du produit Fluotechnik n'est que de 16,0 % (Tableau 7), et dans la moyenne des valeurs obtenues pour les produits du premier projet (8 à 24 % : Défarge *et al.* 2020). Ces insolubles contiennent également un **proportion de 3 à 4 % de Cr**, dont l'origine reste à déterminer (voir 3.2.1.2).

Dans le cas des éosines, outre les particularités de leurs propriétés de fluorescence rappelées plus haut (avec des intensités pas uniquement liées à la pureté), on observe également un découplage de la pureté et des caractéristiques chimiques en solution : les deux produits sélectionnés la 1^{ère} année pour ce projet ont des compositions très proches et distinctes du produit issu du premier projet (teneur en éosine de 87,9 et 89,2 %, contre 79,4 % : Tableau 7), alors que du point de vue CE et pH, le produit sélectionné par Fluotechnik (**Ef1**) est très proche du produit du premier projet (**F1Ep3**), tandis que le nouveau produit Art E'Color (**Ea1**) se distingue d'eux par une CE et un pH inférieurs (Tableau 4). Par ailleurs, les valeurs de CE et pH pour le produit **F1Ep3** sont conformes à celles obtenues lors du premier projet (voir 3.1.1), mais sa composition déterminée cette fois-ci est distincte, avec notamment une teneur en éosine supérieure (79,4 contre 75,7 % : Tableau 7).

Les éosines se caractérisent également par une part non négligeable de composants complémentaires solubles (3,7 à 5,8 % : Tableau 7), qui pourraient être chimiquement proches du traceur puisqu'ils ne s'en distinguent pas par analyse spectrofluorimétrique (voir 3.1.2), et pourraient alors expliquer en partie la relative déconnection entre intensité de fluorescence et pureté.

Le comportement spécifique en solution de l'acide amino G, qui était le seul traceur parmi ceux testés lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) à subir une dégradation quelles que soient ses conditions d'exposition, avec des intensités de fluorescence résiduelle qui pouvaient chuter jusqu'à 20 % au bout de 4 mois, et 25 % au bout de 6 mois dans les conditions les plus conservatives (obscurité et froid), n'a pas été réobservé (voir 3.1.4.6). Son comportement lors du premier projet avait été soupçonné d'être dû à une évolution de son pH en solution, aboutissant à une baisse de son intensité de fluorescence, puisque selon Smart & Laidlaw (1977), celle-ci, constante entre pH 6,5 et 10,5, chuterait rapidement au-dessous de 6,5 dans le domaine des pH acides.

Nos résultats remettent toutefois en question ceux de Smart & Laidlaw (1977), puisqu'ils démontrent que des solutions d'acide amino G dans l'eau ultrapure du même produit à la même concentration peuvent avoir des fluorescences très proches (et correspondant donc vraisemblablement au maximum de fluorescence de ce traceur), dans une gamme de pH allant de 3,4 (eau ultrapure) à 7,9 (eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl : Figure 19 et Tableau 4) ; ces données confirment par ailleurs l'expérience de laboratoire de CETRAHE, selon laquelle l'uranine est le seul des 6 traceurs étudiés dans les deux projets financés par l'OFB à être sensible au pH dans la gamme rencontrée dans les eaux naturelles et jusqu'à ceux, acides, des eaux ultrapures (voir Tableau 4).

Aucun ajustement du pH à 8 par le tampon Tris-HCl, analogue à celle pratiquée jusque-là pour la seule uranine, ne sera donc à l'avenir nécessaire pour l'analyse spectrofluorimétrique de l'acide amino G dans le cadre d'opérations courantes de traçages.

La baisse de l'intensité de fluorescence des solutions d'acide amino G observée lors du 1^{er} projet pourrait donc avoir été provoquée par une dégradation (peut-être d'origine biologique, voir plus bas) du traceur avec le temps. Le projet de déterminer les composés éventuellement formés lors de cette dégradation (voir Introduction, Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux) ne pourra être mené, étant donné qu'elle n'a pas été réobservée pour les produits de ce second projet.

L'étude du comportement comparé, à l'obscurité et à la température du laboratoire, de solutions des traceurs fabriquées avec de l'eau naturelle et de l'eau ultrapure, avait pour but principal (voir Introduction, Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux) d'évaluer l'influence de possibles biodégradations microbiennes sur ces molécules, soupçonnées d'être à l'origine de la baisse de fluorescence, pouvant aller jusqu'à la disparition complète, de certains traceurs à faible concentration en solution, observée au cours du premier projet ((Défarge *et al.* 2020). Les eaux naturelles contiennent toutefois une part de MO fluorescentes (qui représenterait 40 à 60 % de la fraction dissoute de la MO : Liu *et al.* 2018), comprenant notamment des composés humiques issus des sols, et des acides aminés et pigments d'origine microbienne, sans compter d'éventuels contaminants comme des hydrocarbures (Coble *et al.* 2014). Ces MO fluorescent principalement dans un domaine de λ_{Ex} de 240 à 440 nm et de λ_{Em} de 300 à 675 nm (Fellman *et al.* 2010, Larmagnat & Neuweiler 2011, Coble *et al.* 2014), et sont donc susceptibles d'interférer au moment de la mesure spectrofluorimétrique avec les traceurs artificiels étudiés ici, principalement avec le naphthionate de sodium et l'acide amino G (voir Annexe 6). Les composants fluorescents naturels gênants sont principalement ceux de type M, correspondant à des composés humiques de faible poids moléculaire, pouvant traduire l'influence d'une biodégradation bactérienne des composés humiques de plus haut poids moléculaire (type C : Fellman *et al.* 2010, Coble *et al.* 2014, Gabor *et al.* 2014 ; la dénomination M vient de *Marine*, leurs premières mises en évidence dans les eaux d'estuaires les ayant identifiés à des composés humiques néoformés dans ces eaux par biodégradation des composés humiques terrestres apportés par les fleuves).

Nos résultats confirment la présence dans l'eau de la source du Bouillon (analysée aussitôt après son prélèvement) de deux composés fluorescents dominants, un de type C (identifié par son pic A_c), et un de type de type M (Annexe 6), avec un rapport d'intensité de fluorescence de 5 à 3,5 entre les deux (résultat non montré dans le présent rapport). La présence du composé M dans l'eau naturelle ayant servi à fabriquer certaines solutions explique leurs écarts d'intensités avec les solutions des mêmes produits aux mêmes concentrations fabriquées avec de l'eau ultrapure dans le cas du naphthionate de sodium (voir 3.1.4.5) et de l'acide amino G (voir 3.1.4.6). D'autres MO doivent également être impliquées dans les différences d'intensité de fluorescence globalement observées entre solutions dans l'eau naturelle et solutions dans l'eau ultrapure des autres traceurs (voir 3.1.4.1 à 3.1.4.4), avec des écarts toutefois inférieurs à ceux des deux premiers traceurs, sauf dans le cas de la sulforhodamine G : < 0,03 pour l'éosine (Figure 14), < 0,09 pour la

sulforhodamine B (Figure 15), 0,04-0,10 pour l'uranine (en ne prenant en compte que les solutions de pH équivalent : Figure 13), et 0,08-0,33 pour la sulforhodamine G (Figure 16), contre 0,14-0,22 pour le naphthionate de sodium (Figure 17) et 0,17-0,19 pour l'acide amino G (Figure 19).

Les intensités brutes de fluorescence mesurées dans l'eau naturelle montrent également des écarts entre celles mesurées aux longueurs d'onde proches de celles des composés naturels de type M (378-388 pour l'intensité brute de fluorescence du naphthionate de sodium et 434-440 pour celle de l'acide amino G) et celles aux longueurs d'onde des autres traceurs (uranine : 17, éosine : 8-9, sulforhodamine B : 5-6, sulforhodamine G : 5-9). Le fort accroissement d'intensité de fluorescence qu'apporteraient des MO naturelles aux solutions de sulforhodamine G par rapport à celles fabriquées à partir d'eau ultrapure (0,08 à 0,033 Unités Raman : Figure 16) pose donc question, étant donné le faible niveau de fluorescence de l'eau naturelle aux longueurs d'onde de ce traceur, équivalent à celui de la sulforhodamine B, qui est cohérent avec l'absence connue de fluorescence de composés aquatiques naturels ou d'origine anthropique dans ce domaine (voir plus haut). Sauf à envisager que les données de la littérature sont, comme dans le cas de l'acide amino G, à remettre en cause (voir ci-dessus), la différence de pH entre solutions dans l'eau naturelle et dans l'eau ultrapure (voir Tableau 4) ne peuvent pas non plus être en cause, étant donné que la sulforhodamine G garderait sa fluorescence maximale entre pH 3,5 et 10,5 (Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009).

La spécificité des poudres de sulforhodamine G par rapport aux 5 autres traceurs étudiés ici étant leur difficulté à être mises en solution (voir 3.1.1 et Défarge *et al.* 2020) en raison d'une proportion importante de composants insolubles (voir 3.2.1.2), l'accroissement de leur fluorescence dans l'eau naturelle par rapport à l'eau ultrapure (Figure 16) pourrait donc être dû à une augmentation de leur solubilité au pH plus élevé de l'eau naturelle (Leibundgut *et al.* 2009 ; voir également 3.2.1.2 pour les tests ayant prouvé la solubilisation partielle de ces insolubles à pH basique, et le Tableau 4 pour les valeurs comparées de pH des deux types de solutions) ou à des interactions chimiques du traceur avec des composés présents dans cette eau (Leibundgut *et al.* 2009).

Les intensités brutes de fluorescence des échantillons d'eau naturelle conservés dans les mêmes conditions, et mesurées au même pas de suivi, que les solutions de traceurs (voir 3.1.4) évoluent peu jusqu'à présent avec le temps pour celles mesurées aux longueurs d'onde de l'uranine, de l'éosine ou des sulforhodamines B et G (montrant tout juste une très légère augmentation), ont tendance à augmenter plus nettement dans le cas du naphthionate de sodium (de 378-388 à t_0 , à une fourchette de 430-620 ensuite), et, pour l'acide amino G, à baisser au bout de 2 à 8 jours (jusqu'à 299-361, contre 434-440 à t_0) pour réaugmenter ensuite progressivement jusqu'à 370-390 entre 3 et 4,5 mois (données brutes non présentées dans ce rapport) ; les fluctuations observées n'ont pas de lien direct avec les fluctuations de température. On observerait donc globalement, jusqu'à 4,5 mois de suivi, une production ou libération avec le temps (à partir des MO présentes dans l'eau naturelle) de composés organiques fluorescents, principalement des composés humiques de faible poids moléculaire de type M (puisqu'ils sont détectables aux longueurs d'onde du naphthionate de sodium ou de l'acide amino G, voir Annexe 6), probablement issus, pour ces derniers, de la biodégradation *in vitro* des composés humiques de plus haut poids moléculaire de type C (Annexe 6), après une période de 2 à 8 jours de dégradation précoce d'une partie des composés de type M présents au départ dans l'eau naturelle (déductibles de la baisse d'intensité brute observée sur ce laps de temps aux longueurs d'onde de l'acide amino G) ; on cherchera à vérifier cette hypothèse en réalisant des spectres d'excitation-émission sur les échantillons d'eau naturelle au terme des 6 mois de suivi (en janvier 2024).

Ces observations sont importantes à noter pour interpréter les baisses relatives des intensités résiduelles de fluorescence, pouvant aller jusqu'à sa disparition complète, des solutions de naphthionate de sodium (Figure 17), de sulforhodamine B (Figure 15), et de une des sulforhodamines G (**SGf1** : Figure 16), fabriquées à partir de l'eau naturelle, par rapport à celles fabriquées à partir d'eau ultrapure ; elles permettent en effet d'assurer que ces baisses ne concernent que les traceurs dissous susmentionnés, puisqu'à leurs longueurs d'onde respectives on ne constate aucune dégradation des MO naturelles fluorescentes des solutions, et même une légère (pour les sulforhodamines) à nette (naphthionate de sodium) augmentation de la fluorescence due à celles-ci (voir ci-dessus). Cette vérification était particulièrement cruciale dans le cas du naphthionate de sodium, puisque l'intensité brute de fluorescence des MO naturelles représente à t_0 environ 20 à 50 % de celle des solutions de ce traceur dans l'eau naturelle (à 25 et

10 µg/L, respectivement), contre moins de 1 % dans le cas des sulforhodamines (résultats bruts non reportés dans ce rapport).

Ces phénomènes de baisse, parfois jusqu'à la quasi-disparition, de l'intensité résiduelle de fluorescence des traceurs en solution à l'obscurité (Figures 15 à 17) sont donc similaires à ceux observés au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), à la différence qu'ils avaient concerné alors des solutions fabriquées exclusivement avec de l'eau ultrapure, l'urarine (sur le seul cas d'une poudre conservée à CETRAHE depuis plus de 3 ans) et l'acide amino G en plus du naphthionate de sodium (et jamais des poudres de sulforhodamine B ou G), et essentiellement à la concentration de 1 µg/L, et non à 10, 15 ou 25 µg/L, à la seule exception d'une solution d'acide amino G à 10 µg/L.

Le naphthionate de sodium est cette fois-ci aussi le traceur le plus affecté, mais également à des concentrations de 10 et 25 µg/L, celles à 10 µg/L étant les plus touchées, l'une d'entre elles voyant sa fluorescence quasiment disparaître au bout de 5 mois (Figure 17). L'ensemble de ces résultats paraissent donc confirmer l'hypothèse d'une biodégradation progressive de ce traceur en solution, par les micro-organismes, vraisemblablement bactériens, présents dans l'eau naturelle ; ceux du 1^{er} projet, non apportés par de l'eau naturelle, proviendraient des poudres elles-mêmes, ce qui expliquerait leur moindre impact, en raison d'une charge microbienne moins importante que celle contenue dans l'eau naturelle.

En se basant sur les écarts d'intensité de fluorescence résiduelle entre solutions dans l'eau naturelle et dans l'eau ultrapure, on peut estimer les taux de destruction de ce traceur en solution dus à la biodégradation par les micro-organismes présents dans l'eau de la source du Bouillon, entre 30 à 80 % au bout de 5 mois (selon les produits et les concentrations : Figure 17), et à 10-15 % entre 2 jours et 2 semaines (Figure 17), correspondant aux durées de suivi de la plupart des opérations de traçage courantes.

Une biodégradation microbienne du naphthionate de sodium avait déjà été documentée au laboratoire dans des échantillons d'eau prélevés dans le milieu naturel, mais non évaluée quantitativement (Goldscheider *et al.* 2001, cités par Leibundgut *et al.* 2009).

L'intervention de processus de biodégradation par les micro-organismes présents dans l'eau de la source du Bouillon peut également être déduite de la différence d'intensité de fluorescence résiduelle entre solutions d'eau naturelle et d'eau ultrapure, dans le cas de la sulforhodamine B, à partir de 3 jours aux deux concentrations pour les trois produits (Figure 15). À la différence du naphthionate de sodium, l'écart entre les deux types de solutions évolue peu en moyenne par la suite (voir 3.1.4.3), pour atteindre une fourchette de 15 à 19 % pour toutes les solutions au bout de 4,5 mois (Figure 15).

Cette fourchette relativement étroite peut donc permettre d'estimer à 15-20 % de la masse d'origine, la destruction de la sulforhodamine B en solution par biodégradation au bout de 4,5 mois, ce taux étant généralement atteint dès les 3 premiers jours (Figure 15), et pouvant donc concerner la plupart des opérations de traçage courantes.

Ce phénomène de baisse de fluorescence de la sulforhodamine B en solution n'avait pas été observé lors du 1^{er} projet où les solutions avaient été fabriquées exclusivement avec de l'eau ultrapure (Défarge *et al.* 2020), et ne semble jamais avoir été reporté dans la littérature ; Smart & Laidlaw (1977) font toutefois état d'expériences montrant une biodégradation de la rhodamine WT, traceur fluorescent de composition chimique proche.

La sulforhodamine G fait également partie des traceurs dont une sensibilité à la biodégradation n'avait jamais été mentionnée, et pour lequel aucun phénomène de baisse de fluorescence en solution n'a été observé lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), mais elle est évidemment proche à la fois de la sulforhodamine B et de la rhodamine WT.

Cette proximité chimique est un argument en faveur de l'intervention effective de processus de biodégradation, dans l'évolution différentielle avec le temps de l'intensité de fluorescence des solutions de ce traceur fabriquées avec l'eau naturelle et l'eau ultrapure lors de nos expériences (Figure 16). Ce phénomène ne toucherait toutefois de manière certaine que l'un des deux produits analysés aux deux concentrations (**SGf1**), et possiblement le second (**SGf2**) seulement à la concentration la plus faible de 10 µg/L, et de manière nettement moins marquée que le premier

produit à la même concentration ; les évolutions de la baisse de fluorescence des solutions du 1^{er} produit aux deux concentrations sont également distinctes (voir 3.1.4.4).

En se basant sur les écarts d'intensité de fluorescence résiduelle entre solutions dans l'eau naturelle et dans l'eau ultrapure du premier produit, on peut estimer que les taux de destruction de la sulforhodamine G en solution par biodégradation pourraient atteindre une moyenne de 40 % au bout de 5 mois, et entre 5 % à 25 µg/L et 10-20 % à 10 µg/L entre 3 jours et 2 semaines (Figure 16), correspondant aux durées de suivi de la plupart des opérations de traçage courantes.

L'autre produit ne subirait au bout de 5 mois qu'une biodégradation de l'ordre de 15 % maximum, ne produisant des effets détectables qu'à partir de 2 semaines de suivi, et à la concentration la plus faible (10 µg/L) seulement (Figure 16).

Les différences de comportement face à la biodégradation des deux poudres de sulforhodamine G pourraient être dues à la différence de qualité entre les produits, qui expliquerait également pourquoi des poudres d'acide amino G et une poudre d'urarine analysées lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020) avaient montré une baisse de leur intensité résiduelle de fluorescence à l'obscurité en solutions de concentration 1 µg/L (et 10 µg/L pour une seule poudre d'acide amino G), pouvant aller jusqu'à la disparition complète, processus similaire à ceux explicables par l'impact des micro-organismes présents dans l'eau du Bouillon au cours du présent projet pour le naphthionate de sodium et les sulforhodamines seulement (voir ci-dessus), et pas l'acide amino G et l'urarine cette fois-ci (et alors que la sensibilité à la biodégradation de cette dernière est bien documentée dans la littérature : Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009).

Le premier projet avait en effet estimé que l'humidification des produits pourrait être à l'origine d'un développement bactérien entraînant une biodégradation se mettant en place une fois les poudres mises en solution ; cette humidification serait elle-même favorisée par les fortes teneurs en eau du naphthionate de sodium (voir 3.1.1 et Tableau 7 pour les poudres analysées au cours du présent projet), le caractère hygroscopique également observé à l'époque pour beaucoup de poudres d'acide amino G (cas de **AGa1** cette fois-ci : Tableau 4), et la mauvaise conservation ou le vieillissement des produits (les trois produits anciens stockés à CETRAHE, une urarine, un naphthionate de sodium et un acide amino G, avaient vu leur fluorescence en solution à 1 µg/L disparaître à l'obscurité, et dans toutes les conditions de température pour les deux derniers : Défarge *et al.* 2020).

La biodégradation des traceurs fluorescents les plus utilisés en Europe occidentale, qui sont étudiés ici, déjà mentionnée dans la littérature pour l'urarine (principalement) et le naphthionate de sodium (ainsi que pour la rhodamine WT : e. g. Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009), confirmée par les deux projets pilotés par CETRAHE et financés par l'OFB, pour le naphthionate de sodium (principalement) et l'urarine (Défarge *et al.* 2020), et démontrée, pour la première fois à notre connaissance, pour les sulforhodamines B et G, avec des indications de taux de destruction (voir plus haut), est donc un phénomène avéré impliquant plusieurs facteurs :

► le degré de sensibilité à la biodégradation des différents traceurs en solution, le naphthionate de sodium semblant le plus sensible, et l'éosine le moins, puisqu'aucune expérience de suivi menée n'a pu mettre en évidence de biodégradation dans son cas ;

► la qualité des produits en poudre, ainsi que de leur conservation, notamment leur caractère hygroscopique ou leur degré d'humidification, cette dernière favorisant le développement de bactéries pouvant réaliser une biodégradation des traceurs une fois ceux-ci mis en solution ;

► la charge microbienne, l'eau naturelle utilisée lors du présent projet, évidemment beaucoup plus riche en micro-organismes que des poudres contaminées, ayant conduit à la destruction de la fluorescence de solutions plus concentrées, jusqu'à 25 µg/L, contre 1 µg/L (et 10 µg/L dans un seul cas) pour les solutions fabriquées avec de l'eau ultrapure au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020).

La composition microbienne fait également partie des facteurs qui doivent intervenir, mais à laquelle le périmètre de ce projet ne nous permettait pas d'avoir accès, alors que la variété des bactéries arrivant à la source du Bouillon est considérable, et fluctuante au cours du temps, en fonction notamment de la saison et des cycles nyctéméraux (Livrozet 1984). Une expertise menée par CETRAHE sur un système traçage bien connu, a montré que l'uranine restituée, et détectée sans ambiguïté par un fluorimètre de terrain, dans une eau de source contaminée par des eaux usées en provenance d'une exploitation agricole, avait été entièrement détruite dans les échantillons prélevés, au cours des deux à trois semaines séparant leur prélèvement des analyses au laboratoire, sans que leur mode de conservation soit en cause (ils avaient notamment été constamment protégés de la lumière).

Bien que dans ce dernier cas, la charge microbienne puisse également être un facteur explicatif de la forte biodégradation constatée, une faible contribution d'eaux usées à la source du Bouillon pourrait être responsable de l'absence de destruction de l'uranine dans nos expériences (voir 3.1.4.1). Traitant le cas des tests de traçages à l'uranine, connus à l'époque pour avoir été influencés par de la biodégradation, Käss (1998) en avait déduit comme critère pour la mise en place d'une destruction de ce traceur par ce biais, la nécessité que de tels tests aient déjà été réalisés précédemment (avec l'idée probable, car non explicitée, qu'ils auraient permis la prolifération de bactéries capables d'utiliser ensuite l'uranine pour se développer). La source du Bouillon, qui est très régulièrement tracée à l'uranine, répond à ce critère, ce qui confirmerait qu'une faible contamination par des eaux usées serait un facteur explicatif plausible pour l'absence de biodégradation de l'uranine constatée. Les bactéries qui y sont présentes sont celles qui participent au fonctionnement du « réacteur biologique » que constituent les processus de biodégradation des MO naturelles, composés humiques issus des sols, débris végétaux en automne, biofilms photosynthétiques au printemps et en été, entre les pertes d'eaux de la Loire, et leur résurgence au Bouillon (Albéric & Lepiller 1998). L'étude de Livrozet en 1984 faisait état de la présence à la source du Bouillon, de bactéries indicatrices de contamination fécale déjà présentes dans les eaux de la Loire, dans une proportion environ 30 fois inférieure à leur concentration en Loire en raison de la létalité de certaines espèces au cours du trajet souterrain, mais gardant malgré tout des teneurs supérieures aux critères de potabilité ; on peut supposer que l'amélioration de la qualité des eaux de la Loire de ce point de vue, depuis les années 1980, devrait avoir permis d'y diminuer le nombre de bactéries type *E. coli* et streptocoques fécaux.

Nos résultats remettent de toute façon en cause le critère dégagé par Käss (1998) d'une nécessité d'opérations de traçage préalables pour le développement ultérieur d'une biodégradation des traceurs, puisqu'à notre connaissance, aucune restitution de naphtionate de sodium, ni de sulforhodamine B ou G, n'a jamais été observée au Bouillon, alors que nos expériences montrent une biodégradation de ces traceurs au contact d'échantillons d'eau de cette source.

Au contraire, parmi les traçages ayant donné lieu à une restitution à la source du Bouillon, ou effectués à partir de celle-ci, recensés par la *BD Traçages* (<https://bdtracages.brgm.fr/>, consultée le 27 décembre 2023), 17 ont employé l'uranine, 3 l'éosine, et 2 l'acide amino G, les trois traceurs qui n'ont montré aucun signe de biodégradation au cours de nos expériences de cette année (ainsi que les rhodamines WT : 5 opérations ; et B : 1 opération) ; renverser complètement le critère de Käss (1998), en avançant que la biodégradation d'un traceur ne pourrait avoir lieu que dans des systèmes jamais tracés avec lui, semblerait toutefois difficile à justifier à ce stade, car non fondé scientifiquement, contrairement à l'hypothèse originelle de Käss (1998).

Sur l'ensemble des deux projets consacrés à la qualité des produits traceurs fluorescents, nos résultats remettent également en cause un 2^{ème} critère avancé par Käss (1998) pour discriminer les cas où une biodégradation de l'uranine peut avoir lieu ou pas, puisqu'il faisait l'hypothèse que celle-ci ne pouvait se mettre en place avant 11 jours et après 60 jours (voir Défarge et al. 2020 ; critère également non valable pour le naphtionate de sodium, l'acide amino G et les sulforhodamines B et G, selon nos résultats).

L'expérience de CETRAHE sur la source contaminée avec des eaux usées d'origine agricole, remettent aussi en cause un 3^{ème} critère mis en avant par Käss (1998) pour discriminer les sites où une biodégradation des traceurs fluorescents peut avoir lieu ou pas, puisqu'il avançait qu'elle était impossible en cas de forte contamination organique (les bactéries étant alors supposées s'attaquer à ces MO plutôt qu'à l'uranine).

Nos résultats sur l'ensemble des deux projets, ne contredisent pas, en revanche, l'hypothèse de Käss (1998) selon laquelle la biodégradation ne concernerait que des solutions de concentrations comprises entre 0,5 µg/L et 5 mg/L (voir Défarge *et al.* 2020 pour l'uranine, ainsi que l'acide amino G, les résultats des deux rapports pour le naphthionate de sodium, et du présent rapport pour les sulforhodamines B et G).

Il est à noter que parmi les processus pouvant être impliqués dans la diminution de la fluorescence des traceurs en solution dans l'eau naturelle (passés en revue notamment par Käss 1998, et Leibundgut *et al.* 2009), on ne peut exclure l'intervention, en plus de la biodégradation mise en évidence ci-dessus, d'une part de chimiodégradation ou chimiosuppression (« *quenching* ») par les MO naturelles ; seule la photodégradation, traitée au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020) est exclue cette fois-ci.

Du point de vue de la pratique du traçage, et notamment des précautions à prendre dans la mise en œuvre et les interprétations, les résultats des expériences de biodégradation au contact d'une eau naturelle, que nous avons menées, confirment et complètent ceux obtenus, indirectement, au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020) :

► la plus grande attention doit être portée à la qualité des produits en poudre, ainsi qu'à leur conservation, en particulier ceux qui sont hygroscopiques (comme le naphthionate de sodium ou l'acide amino G), leur humidification pouvant favoriser le développement de bactéries susceptibles de dégrader les traceurs une fois mis en solution ;

► des précautions supplémentaires de conservation des échantillons une fois prélevés dans le milieu naturel, et jusqu'à leur analyse au laboratoire, doivent être prises, en plus de leur protection systématique de la lumière (Défarge *et al.* 2020), lorsqu'ils sont susceptibles d'être impactés par des eaux chargées en micro-organismes, comme des eaux usées par exemple : un conditionnement au froid peut s'avérer nécessaire, et l'analyse doit en être faite le plus rapidement ;

► tous les traceurs étudiés au cours de ce projet, sauf l'éosine, ont montré, dans une condition ou une autre, une sensibilité à la biodégradation, qui doit être prise en compte dans la compréhension du déroulement des opérations de traçage, et leur interprétation. Des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer, dans un plus grand nombre de conditions naturelles, les taux de biodégradation qu'on a pu dégager, dans un système traçage donné, à un moment de l'année et du cycle nyctéméral, sur une durée de quelques jours à semaines correspondant à la plupart des opérations courantes : 10-15 % pour le naphthionate de sodium, 15-20 % pour la sulforhodamine B, et 5-20 % pour la sulforhodamine G, tous les produits n'étant pas sensibles au même degré pour ce dernier traceur.

La formation de mousse lors de la mise en solution des poudres d'uranine et d'éosine qui en avaient provoqué lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), ne s'est pas reproduite, même à des concentrations nettement supérieures (jusqu'à 30 à 79 g/L, contre 100 à 500 mg/L : Défarge *et al.* 2020), et bien que le protocole soit resté inchangé (voir 3.4). L'expérience d'Art E'Color indiquerait que la formation obligée de mousse (rapportée dans le premier rapport : Défarge *et al.* 2020) ne s'observe qu'en production, à grande échelle (container de 1000 L), et à des concentrations très élevées (de l'ordre de 300 g/L pour l'uranine par exemple).

L'utilisation de produits anti-mousse ne semble donc pas justifiée, et les praticiens du traçage sont plutôt encouragés à utiliser pour les injections des produits vendus sous forme liquide pour éviter tout défaut de mise en solution des poudres sur le terrain, en plus de la formation éventuelle de mousse signalée par certains d'entre eux.

4.2. Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits

Les résultats obtenus sur les produits sélectionnés pour la première année d'étude ont confirmé que la qualité des produits traceurs fluorescents disponibles dans le commerce, en termes de composition, est actuellement très variable, invérifiable par les fournisseurs spécialisés, et incontrôlable ou non contrôlée par les fabricants (Défarge *et al.* 2020).

En conséquence, la teneur en traceur fluorescent d'une poudre n'est jamais garantie, les indications de sa fiche technique, quand elle est fournie, pouvant être inexactes (voir ci-dessus), et seules les poudres d'uranine, d'acide amino G et de sulforhodamine B (moins fréquemment) peuvent avoir des puretés approchant les 100 % (sur lesquelles se basent les praticiens pour estimer les masses de traceur à injecter : Défarge *et al.* 2020), celles du naphthionate de sodium se situant toujours entre 77 et 87 % en raison du caractère hygroscopique de ces poudres (Tableau 7 et Défarge *et al.* 2020).

Même les poudres des traceurs dont la pureté est la plus fréquemment proche de 100 % peuvent parfois avoir des puretés très inférieures, et les gammes de teneurs observées jusque-là sur l'ensemble des deux projets sont très larges (Tableau 7 et Défarge *et al.* 2020, en ne prenant en compte que les produits sélectionnés par les deux fournisseurs spécialisés partenaires de ce projet ; pour le naphthionate de sodium, dont la gamme est la plus resserrée, voir ci-dessus) :

- ▶ entre 86 et 98 % pour l'acide amino G ;
- ▶ entre 78 et 96 % pour l'uranine ;
- ▶ entre 38 et 97 % pour la sulforhodamine B ;
- ▶ entre 47 et 90 % pour l'éosine ;
- ▶ entre 34 et 81 % pour la sulforhodamine G.

Cette très grande variabilité a plusieurs origines (Défarge *et al.* 2020) :

- ▶ les fabricants peuvent changer la composition de leurs produits, par ajouts d'additifs, afin d'en abaisser le prix ;
- ▶ les fournisseurs peuvent avoir plusieurs partenaires différents parmi ces fabricants pour un même traceur, être amenés à s'approvisionner chez des fabricants différents de leurs partenaires habituels, ou à s'approvisionner chez des confrères dont ils ne maîtrisent pas la qualité des produits, ou encore procèdent parfois eux-mêmes à des mélanges de produits de différentes provenances, afin de disposer de stocks permanents de traceurs ;
- ▶ les teneurs en eau des poudres au moment de leur analyse ou de leur utilisation ne peuvent être contrôlées par les fabricants, car elles dépendent des conditions de conservation et ambiantes au moment des manipulations.

Cette variabilité indétectable de la teneur en traceur fluorescents des produits disponibles dans le commerce influence à plusieurs titres la qualité des opérations de traçage (Défarge *et al.* 2020) :

- ▶ elle ne permet pas de contrôler la masse exacte de traceur effectivement utilisée pour les injections ;
- ▶ de plus, pour les autres traceurs que l'uranine, l'estimation des quantités à injecter prenant en compte un facteur correctif basé sur le rapport d'intensité de fluorescence en solution du traceur à celle de celle-ci, mais pour des poudres évidemment supposées composées à 100 % des traceurs considérés, une erreur supplémentaire peut être introduite ;
- ▶ elle a enfin également une incidence sur la précision des analyses, puisque l'intensité de fluorescence en solution des traceurs est proportionnelle à leur concentration (voir 3.1.3), et donc essentiellement liée à leur teneur dans la poudre pour l'uranine, la sulforhodamine B et l'acide amino G (voir 3.3.1, 3.3.3 et 3.3.6), des facteurs supplémentaires comme la teneur en eau ou des composants complémentaires pouvant également intervenir pour l'éosine, la sulforhodamine G et le naphthionate de sodium (voir 3.3.2, 3.3.4 et 3.3.5).

Une vérification de la teneur en traceur des poudres commercialisées s'avère donc nécessaire pour assurer la qualité des traçages fluorescents, qui pourrait être effectuée par la simple mesure d'intensité de fluorescence des produits en solution dans des conditions contrôlées, notamment par harmonisation des mesures sur un même appareil grâce à une correction par l'aire du pic Raman de l'eau obtenue dans les mêmes conditions, qui donnerait accès à une estimation de la pureté des produits (voir Défarge *et al.* 2020, et 1. Introduction ci-dessus). Les résultats obtenus lors de ce second projet confirment que la correction par l'aire du pic Raman de l'eau permet d'obtenir une harmonisation des mesures entre séries d'analyses pour le même appareil d'un même laboratoire, qui soit suffisante pour qu'une relation de proportionnalité entre intensité de fluorescence en solution et teneur en traceur dans les poudres soit vérifiée sur cet appareil d'une série à l'autre dans la très grande majorité des cas (voir 3.1.3.2).

Les abaques obtenus jusque-là en portant les résultats intensité de fluorescence en solution corrigée par l'intensité du pic Raman de l'eau, en fonction de la teneur en traceur des poudres, donnent des résultats probants pour trois des traceurs analysés :

- ▶ **l'uranine**, avec des R^2 de 0,8835 à 0,9203 (Figure 23) ;
- ▶ **la sulforhodamine B**, avec des R^2 de 0,8807 à 0,9303, voire de 0,9022 en ajoutant les impuretés de composition proche (Figure 25) ;
- ▶ **l'acide amino G**, avec des R^2 de 0,8193 à 0,8698 (Figure 28).

Ces résultats confirment les indications tirées du premier projet, qui étaient limitées par un trop faible nombre de sulforhodamines B analysées, ou la non-utilisation d'une correction de pH par le tampon Tris-HCl pour une série d'uranines (Défarge *et al.* 2020).

Les résultats des trois autres traceurs paraissent inexploitable à ce stade, avec des R^2 de 0,5800 à 0,6475 pour l'éosine (Figure 24), de 0,3372 à 0,4479 pour la sulforhodamine G (0,5247 à 0,6310 en ajoutant les impuretés de composition proche : Figure 26), et surtout de 0,0723 à 0,2359 pour le naphtionate de sodium (Figure 27). Les indications du premier projet ne sont donc pas confirmées dans le cas de l'éosine ou de la sulforhodamine G (elles étaient de toute façon limitées par le très faible nombre de poudres analysées dans le cas de ce dernier traceur : Défarge *et al.* 2020).

Dans le cas du naphtionate de sodium, la cause en est probablement le caractère très hygroscopique du produit en poudre, qui se traduit par une teneur en eau toujours > 20 % (Tableau 7 et Défarge *et al.* 2020), qui fait que les prises d'essai pour les analyses doivent contenir une proportion de masse sèche très variable d'une série à l'autre, en fonction du taux d'humidité du laboratoire.

En ce qui concerne l'éosine et la sulforhodamine G, leurs teneurs en eau sont aussi sensiblement distinctes de celles des trois autres traceurs (respectivement, de 6,34 à 13,4 %, et de 5,56 à 12,5 %, contre 6,57 à 7,76 % pour l'uranine, 4,0 à 8,03 % pour la sulforhodamine B, et 2,20 à 2,56 % pour l'acide amino G : Tableau 7), ce qui pourrait également jouer un rôle dans la variabilité des prises d'essai. Mais par ailleurs, ces deux traceurs se différencient également des quatre autres, naphtionate de sodium inclus, par la présence d'une proportion non négligeable d'autres composés détectés en solution (respectivement, de 3,7 à 5,82 %, et de 7,1 à 18,1 %, contre < 2 à 4,1 % pour la seule sulforhodamine B : Tableau 7). Dans le cas de la sulforhodamine G, ces composants complémentaires sembleraient pouvoir jouer un rôle dans l'expression de la fluorescence des produits ; ce pourrait être également le cas pour l'éosine, dont la pureté serait alors surestimée en comparaison de la teneur en éosine pure (voir ci-dessus).

Ces composants complémentaires, si leur participation à la fluorescence de l'éosine et de la sulforhodamine G en solution se trouve confirmée, seraient alors à ajouter aux proportions de traceur dans les poudres pour obtenir des abaques exploitables. Seule la pureté du naphtionate de sodium ne pourrait être évaluée par son intensité de fluorescence en solution en raison du caractère hygroscopique de ses poudres, mais il semblerait être le traceur dont la composition est la plus constante (voir ci-dessus).

4.3. Perspectives

Les perspectives concernent les actions qui seront menées durant la dernière année du projet, qui sont présentées ici selon les trois volets d'action déterminés au départ (voir 1. Introduction).

4.3.1. Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux

Comme prévu dans le projet soumis à l'OFB (voir 1. Introduction), les principales analyses et exploitations de données suivantes seront réalisées lors de la dernière année d'étude :

► La composition des poudres de sulforhodamines B et G, ainsi que de celles d'éosine, qui seront déterminées à COBRA sur la seconde série de deux produits de chaque traceur, sélectionnés par les deux partenaires fournisseurs, sera comparée aux résultats obtenus sur elles à CETRAHE durant la 2^{ème} année du projet qui sont présentés dans le présent rapport. On poursuivra notamment la discussion sur l'identification des impuretés insolubles des sulforhodamines, notamment celles, non analysables par HPLC, qui peuvent représenter jusqu'à 35 à 40 % de leur masse (voir 3.2.2). On cherchera également à identifier les insolubles des poudres de sulforhodamine G, et notamment l'origine du Cr qu'ils contiennent (voir 3.2.1.2). Les mêmes investigations seront menées sur les impuretés solubles des éosines.

► L'étude sera élargie à des traceurs moins, ou devenus moins, utilisés (pyranine [JAUNE PYRACIDE G], tinopal CBS-X) et à d'autres produits fluorescents proposés par les fournisseurs (parmi lesquels on trouve des produits alimentaires comme les E101 [riboflavine et composés], biosourcés et environnementalo-compatibles), du point de vue de leur qualité comme traceurs hydrogéologiques, de leur pureté, et de la détermination des impuretés éventuelles qu'ils pourraient contenir.

► On mènera notamment sur ces traceurs une étude comparée de l'évolution de leur fluorescence avec le temps, jusqu'à 6 mois, analogue à celles déjà réalisées sur les 6 traceurs les plus courants lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), et lors de la 2^{ème} année du présent projet (voir 3.1.4), dans 5 conditions distinctes : lumière naturelle, obscurité à la température du laboratoire, froid (4 °C), et à la température de 40 °C pour des solutions fabriquées avec de l'eau ultrapure, et obscurité à la température du laboratoire pour des solutions fabriquées avec l'eau naturelle de la source du Bouillon.

4.3.2. Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits

Comme prévu dans le projet soumis à l'OFB (voir 1. Introduction), la seconde série de deux produits de chaque traceur sélectionnés par les deux partenaires fournisseurs (voir ci-dessus 4.3.1) sera intégrée aux graphes intensité en solution corrigée de l'intensité du pic Raman de l'eau en fonction de la pureté des produits établis jusque-là sur l'ensemble des deux projets, afin de vérifier les corrélations qu'on a pu mettre en évidence pour l'uranine, la sulforhodamine B et l'acide amino G (voir ci-dessus 4.2), dans le but de consolider les abaques pouvant permettre d'estimer la pureté des lots de traceurs par simple mesure d'intensité de fluorescence, et donc de pouvoir ainsi mettre en place une forme de contrôle qualité de ces produits par un laboratoire d'analyses indépendant.

En ce qui concerne les trois autres traceurs, pour lesquels les corrélations entre intensité de fluorescence en solution et pureté des produits apparaissent moyennes à très faibles, on cherchera à vérifier les hypothèses explicatives émises suite aux résultats de la première année du projet, et à établir des abaques améliorés, surtout pour l'éosine et la sulforhodamine G (voir ci-

dessus 4.2), le cas du naphthionate de sodium semblant être majoritairement lié à son caractère hygroscopique (voir ci-dessus 4.2), qui n'offre aucune possibilité d'amélioration.

Dans le cas de l'éosine, si les résultats des analyses des impuretés contenues dans ses poudres réalisées sur les produits sélectionnés pour la deuxième année de projet (voir 4.3.1) confirment l'hypothèse de leur participation à leur fluorescence en solution, aux mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission que ce traceur, on pourra notamment lui appliquer les corrections réalisées cette année sur les sulforhodamines B et G (voir 3.3.3 et 3.3.4), pour obtenir des abaques de meilleure qualité.

4.3.3. Action n°3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage

Au cours de la dernière année de projet, une première diffusion des résultats obtenus pourra déjà être faite, par plusieurs voies :

► De manière informelle, en direction des praticiens du traçage artificiel, aussi bien par CETRAHE à travers ses activités d'expertise-conseil régulières auprès d'un réseau français d'une cinquantaine de bureaux d'études et d'ingénierie et d'entreprises et de plusieurs dizaines de collectivités (voir Annexe 8), que par Art E'Color et Fluotechnik auprès de leurs clients, qui sont pour la plus grande partie d'entre eux les mêmes que ceux que CETRAHE appuie lors des opérations de traçage en France.

► De manière plus formelle, ces résultats seront intégrés aux formations continues en traçage artificiel, uniques en Europe francophone, destinées aussi bien aux praticiens du traçage qu'aux donneurs d'ordre, qu'organise CETRAHE à l'Université d'Orléans (<https://www.univ-orleans.fr/fr/cetrahe/formation/formation-continue-en-tracage-hydrogeologique>), ou de manière délocalisée depuis 2022 (à Paris, en collaboration avec la Société Géologique de France, à destination des hydrogéologues agréés de la région Île-de-France, ou à Cahors, en collaboration avec le Conseil départemental du Lot, à destination des donneurs d'ordre du Sud-Ouest de la France), si l'occasion s'en présente de nouveau en 2024.

► Enfin, les résultats obtenus jusque-là au cours des deux projets financés par l'OFB devraient être présentés, comme cela était prévu dans les objectifs du second projet (voir Introduction, Action n°3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage), à l'occasion de webinaires consacrés à la qualité des produits traceurs fluorescents et aux bonnes pratiques en matière de traçage artificiel, pour lesquels CETRAHE a été sollicité : le premier, à l'invitation de la Commission Scientifique de la Fédération Française de Spéléologie, est programmé le 4 avril 2024 à 20 h 30, et sera ensuite disponible sur la chaîne YouTube de la FFS ; le second, à l'invitation du bureau d'études TRAQUA (Namur, Belgique), prévu initialement le 13 septembre dernier, a été repoussé en 2024 pour pouvoir intégrer l'ensemble des résultats de la 2^{ème} année de ce second projet (en anglais, il est destiné à un public international de scientifiques praticiens du traçage, et sera également visible ensuite sur YouTube).

► L'ensemble des rapports à l'OFB consacrés à ce second projet, ainsi que les vidéos des webinaires, seront également rendus disponibles sur le site Internet de CETRAHE, et annoncés par le biais de son site LinkedIn, comme cela a été fait, avec l'autorisation de l'OFB, pour le rapport à 1 an.

Par ailleurs, les fournisseurs partenaires de ce projet devraient amplifier le travail de sensibilisation des fabricants à la qualité des fiches techniques de leurs produits, qui contiennent trop fréquemment des manques (teneurs en traceur, indications des teneurs en eau comme valables uniquement en sortie d'usine) ou des erreurs (sur les indications de pureté ou le taux d'insolubles) dommageables pour la qualité des opérations de traçage menées avec les produits considérés (voir plus haut). Ces constatations avaient déjà été faites lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), elles sont confirmées par les résultats de la première année d'étude du présent projet, et ces fiches techniques doivent donc être corrigées de ce point de vue, ce qui n'a pas été le cas entre la diffusion des résultats du premier projet et l'acquisition des produits utilisés jusqu'ici dans ce second projet.

En ce qui concerne la **qualité des produits eux-mêmes**, en termes de quantité de composant fluorescent effectivement présent, elle reste globalement **insuffisante** pour un certain nombre de traceurs courants comme les sulforhodamines, en particulier la sulforhodamine G, qui peut ne représenter que la moitié et jusqu'au tiers seulement en masse des poudres (voir ci-dessus 4.2). Le travail de sensibilisation des fabricants à la qualité de leurs produits fluorescents est dans ce cas plus délicat, la part de leur production destinée aux applications en traçage hydrogéologique étant généralement infime. Seule la recherche de fabricants plus fiables, comme cela a été fait par Art E'Color pour ce second projet en ce qui concerne la sulforhodamine B, dont la teneur en traceur est du même ordre de grandeur que celles des meilleures poudres d'uranine ou d'acide amino G, et sans commune mesure avec celles des autres sulforhodamines analysées jusqu'ici dans le cadre des deux projets (96,2 %, contre 38,5 à 59,0 % : Tableau 7 et Défarge *et al.* 2020), pourrait permettre d'améliorer la qualité des produits fluorescents utilisables pour les applications hydrogéologiques.

5. Glossaire

Coefficient de photolyse (Käss 1998) : Facteur spécifique à chaque traceur permettant d'exprimer sa décroissance exponentielle sous l'effet de la lumière par la formule

$$F = F_0 e^{-I t}$$

avec

I : coefficient de photolyse spécifique

t : durée d'exposition à la lumière

I : intensité de la lumière

F : fluorescence à l'instant t

F_0 : fluorescence à t_0 .

Coefficient de température (Käss 1998) : Facteur spécifique à chaque traceur permettant d'exprimer la loi gouvernant la variation inverse de l'intensité de fluorescence avec la température dans la formule

$$F = F_0 e^{-n (t - t_0)}$$

avec

n : coefficient de température spécifique

t_0 : température de référence

t : température au moment de la mesure

I : intensité de la lumière

F_0 : fluorescence à la température t_0

F : fluorescence à la température t .

Fluorescence : Processus d'émission de lumière par une substance à une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière qu'elle a absorbée.

Photométrie : Dans le cadre des analyses par spectrofluorimètre, mesure de l'intensité de la lumière émise à longueurs d'ondes fixes d'excitation et d'émission.

Raman (diffusion) : Diffusion inélastique de la lumière dans l'eau, due à la perte d'énergie des photons incidents par vibration dans les molécules d'eau, et se traduisant par l'émission de lumière à une longueur d'onde supérieure à la lumière incidente.

Rendement de fluorescence : Proportion des photons émis par fluorescence par rapport aux photons absorbés par un composé fluorescent.

Temps de demi-vie (Leibundgut *et al.* 2009) : En référence à la dégradation à la lumière des traceurs fluorescents, temps au bout duquel l'intensité de la fluorescence atteint 50 % de la fluorescence initiale.

Traçage hydrogéologique artificiel : Technique de suivi de la circulation des eaux à l'aide de produits traceurs ajoutés à ces eaux.

6. Sigles & Abréviations

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

CE : Conductivité électrique

CETRAHE : CELLule R&D d'Expertise et de TRAnsfert en TRAçages Appliqués à l'Hydrogéologie et à l'Environnement

CI : Colour Index

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

COBRA : Chimie Organique Bioorganique Réactivité et Analyse

COV : Composés Organiques Volatils

DMSO-d6 : diméthylsulfoxyde deutéré

EPNAC : Groupe de travail national sur l'Evaluation des Procédés Nouveaux d'Assainissement des petites et moyennes Collectivités

EWTS : European Water Tracing Services

HPLC : High Precision Liquid Chromatography (chromatographie liquide haute précision)

INSU : Institut National des Sciences de l'Univers

INSA : Institut National des Sciences Appliquées

PS : polystyrène

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

7. Bibliographie

- Albéric P. Lepiller M. 1998.** Oxydation de la matière organique dans un système hydrologique karstique alimenté par des pertes fluviales (Loiret, France). *Water Research* 32, p. 2051-2064.
- André J.C. Molinari J. 1976.** Mises au point sur les différents facteurs physico-chimiques influant sur la mesure de concentration de traceurs fluorescents et leurs conséquences pratiques en hydrologie. *Journal of Hydrology* 3, p. 257-285.
- Behrens H. Beims U. Dieter H. Dietze G. Eikmann T. Grummt T. Hanisch H. Henseling H. Käß W. Kerndorff H. Leibundgut C. Müller-Wegener U. Rönnefahrt I. Scharenberg B. Schleyer R. Schloz W. Tilkes F. 2001.** Toxicological and ecotoxicological assessment of water tracers. *Hydrogeology Journal* 9, p. 321-325.
- Benischke R. 2021.** Review: Advances in the methodology and application of tracing in karst aquifers. *Hydrogeology Journal* 29, p. 67-88.
- Benischke R. Goldscheider N. Smart C. 2007.** Tracer techniques. In Goldscheider N. Drew D. (eds.), *Methods in Karst Hydrogeology*, International Contributions to Hydrogeology 26, International Association of Hydrogeologists. Taylor & Francis, p. 147-170.
- Binet S. Auterives C. Charlier J.B. 2012.** *Projet ICERE - Impact des Changements Environnementaux sur la Ressource en Eau - Construction d'un modèle hydrogéologique d'étiage sur le Val d'Orléans*. Rapport final, Conseil Général du Loiret, 47 p.
- Binet S. Joigneaux E. Pauwels H. Albéric P. Fléhoc C. Bruand A. 2017.** Water exchange, mixing and transient storage between a saturated karstic conduit and the surrounding aquifer: Groundwater flow modeling and inputs from stable water isotopes. *Journal of Hydrology* 544, p. 278-289.
- Buzády A. Erostyák J. Paál G. 2006.** Determination of uranine tracer dye from underground water of Mecsek Hill, Hungary. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 69, p. 207-214.
- Cai S.S. Starck J.D. 1997.** Evaluation of five fluorescent dyes and triethyl phosphate as atmospheric tracers of agricultural sprays. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 32, p. 969-983.
- Carré J. Joyeux M. Montiel A. 2007.** Risques sanitaires associés aux traceurs fluorescents utilisés en hydrologie. *Environnement, Risques & Santé* 6, p. 443-452.
- Chen C. Zhao W. Li J. Zhao J. Hidaka H. Serpone N. 2002.** Formation and identification of intermediates in the visible-light-assisted photodegradation of sulforhodamine-B dye in aqueous TiO₂ dispersion. *Environmental Science and Technology* 36, p. 3604-3611, doi : 10.1021/es0205434.
- Coble P.G. Spencer R.G.M. Baker A. Reynolds D.M. 2014.** Aquatic organic matter fluorescence. In Coble P.G. Lead J. Baker A. Reynolds D.M. Spencer R.G.M. (eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence*. Cambridge University Press, p. 75-122.
- Davis S.N. Campbell D.J. Bentley H.W. Flynn T.J. 1985.** *An Introduction to Ground-Water Tracers*. EPA Report N° EPA/600/2-85/022, March 1985, 201 p.
- Défarge C. Jozja N. Dufour A. Meus P. Devouge-Boyer C. Hubert-Roux M. Marcotte S. 2020.** *Etude de la qualité des produits fluorescents utilisés en traçage hydrogéologique*. Office Français de la Biodiversité, 192 p.
- Dörfliger N. Crochet P. Guérin R. Jozja N. Marsaud B. Mondain P.H. Muet P. Plagnes V. 2010.** *Guide méthodologique : Les outils de l'hydrogéologie karstique pour la caractérisation de la structure et du fonctionnement des systèmes karstiques et l'évaluation de leur ressource*. BRGM-ONEMA, 246 p.
- EPNAC 2013.** *Contenu des études préalables à la réalisation d'une Zone de Rejet Végétalisée*. IRSTEA, mars 2013, 16 p.
- Fellman J.B. Hood E. Spencer R.G.M. 2010.** Fluorescence spectroscopy opens new windows into dissolved organic matter dynamics in freshwater ecosystems: A review. *Limnology and Oceanography* 55, p. 2452-2462.
- Feuerstein D.L. Selleck D.E. 2005.** Fluorescent tracers for dispersion measurements. *Journal of the Sanitary Engineering Division of the American Society of Civil Engineers* 89, p. 1-21.
- Field M.S. 2005.** Assessing aquatic ecotoxicological risks associated with fluorescent dyes used for water-tracing studies. *Environmental & Engineering Geoscience* XI, p. 295-308.
- Field M.S. Wilhelm R.G. Quinlan J.F. Aley T.J. 1995.** An assessment of the potential adverse properties of fluorescent tracer dyes used for groundwater tracing. *Environmental Monitoring and Assessment* 38, p. 75-96.
- Gabor R.S. Baker A. McKnight D.M. Miller M.P. 2014.** Fluorescence indices and their interpretation. In Coble P.G. Lead J. Baker A. Reynolds D.M. Spencer R.G.M. (eds.), *Aquatic Organic Matter Fluorescence*. Cambridge University Press, p. 303-338.
- Ghanem A. Soerens T.S. Adel M.M. Thoma G.J. 2003.** Investigation of fluorescent dyes as partitioning tracers for subsurface nonaqueous phase liquid (NAPL) characterization. *Journal of Environmental Engineering* 129, p. 740-744.

- Goldscheider N. Hötzl H. Kottke K. 2001.** Microbiological decay of Naphthionate in water samples as a source of misinterpretation of tracer tests. In Seiler K.P. Wohlich S. (eds.), *New Approaches Characterizing Groundwater Flow*, Proceedings of the 31st International Association of Hydrogeologists Congress, Munich, 10-14 septembre 2001. Balkema, p. 77-81.
- Gombert P. Biaudet H. de Seze R. Pandard P. Carré J. 2017.** Toxicity of fluorescent tracers and their degradation byproducts. *International Journal of Speleology* 46, p. 23-31.
- Gombert P. Carré J. 2011.** Toxicité et écotoxicité des principaux traceurs fluorescents employés en hydrogéologie et de leurs produits de dégradation. *Karstologia* 58, p. 41-53.
- Gosetti F. Bolfi B. Marengo E. 2015.** Identification of sulforhodamine B photodegradation products present in nonpermanent tattoos by micro liquid chromatography coupled with tandem high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407, p. 4649–4659, doi : 10.1007/s00216-015-8667-5.
- Green F.J. 1990.** *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*. Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, 1000 p.
- Jozja N. 2008.** Importance de la composante analytique dans la fiabilité de l'interprétation d'un traçage. *Actes du colloque "Hydrogéologie et karst au travers des travaux de Michel Lepiller"*, Journée technique du Comité français de l'Association Internationale des Hydrogéologues, Orléans, 16-17 mai 2008, p. 207-218.
- Jozja N. Défarge C. Dufour A. 2011a.** Etude expérimentale de la dégradation des traceurs fluorescents sous l'influence des variations de paramètres environnementaux. *Actes du 9^{ème} Colloque d'hydrogéologie en pays calcaire*, H2KARST, Besançon, 1-3 septembre 2011, p. 253-255.
- Jozja N. Mondain P.H. Muet P. 2011b.** Réflexion sur la fiabilité des traçages au regard des difficultés analytiques. *Actes du 9^{ème} Colloque d'hydrogéologie en pays calcaire*, H2KARST, Besançon, 1-3 septembre 2011, p. 249-252.
- Käss W. 1998.** *Tracing Technique in Geohydrology*. Balkema, 581 p.
- Lafortune S. Gombert P. Pokryszka Z. Lacroix E. Donato P. Jozja N. 2020** Monitoring scheme for the detection of hydrogen leakage from a deep underground storage. Part 1: On-site validation of an experimental protocol via the combined injection of helium and tracers into an aquifer. *Applied Sciences* 10, 6058, <https://doi.org/10.3390/app10176058>.
- Lakowicz J.R. 2006.** *Principles of Fluorescence*, Third Edition. Springer, 954 p.
- Larmagnat S. Neuweiler F. 2011.** Exploring a link between Atlantic coral mounds and Phanerozoic carbonate mudmounds: Insights from pore water fluorescent dissolved organic matter (FDOM), Pen Duick mounds, offshore Morocco. *Marine Geology* 282, p. 149-159.
- Lawaetz A.J. Stedmon C.A. 2009.** Fluorescence intensity calibration using the Raman scatter peak of water. *Applied Spectroscopy* 63, p. 936-940.
- Leibundgut C. Maloszewski P. Külls C. 2009.** *Tracers in Hydrology*. Wiley-Blackwell, 415 p.
- Liu W. Zhang L. Liu P. Qin X. Shan X. Yao X. 2018.** FDOM Conversion in Karst Watersheds Expressed by Three-Dimensional Fluorescence Spectroscopy. *Water* 10, 1427, <http://dx.doi.org/10.3390/w10101427>.
- Livrozet E. 1984.** *Influence des apports de la Loire sur la qualité bactériologique et chimique de l'aquifère karstique du Val d'Orléans*. Mémoire de doctorat de 3^{ème} cycle, Université d'Orléans, 191 p.
- McEwen C.N. McKay R.G. Larsen B.S. 2005.** Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Analytical Chemistry* 77, p. 7826-7831.
- Maillard J. Carrasco N. Schmitz-Afonso I. Gautier T. Afonso C. 2018.** Comparison of soluble and insoluble organic matter in analogues of Titan's aerosols. *Earth and Planetary Science Letters* 495, p. 185-191.
- Meus P. Schnegg P.A. Fripiat C. Monfort J. 2014.** Promises and limitations in the use of sulfonates colourless tracers in hydrogeology. *Geologica Belgica* 17, p. 90-95.
- Pascoletti Y. Chapuis H. 2022.** *Connaître et quantifier les échanges hydrauliques karst / rivière. Recommandations méthodologiques – Retour d'expérience d'études menées sur les Gorges de la Cèze (30)*. Agence de l'eau Rhône - Méditerranée-Corse, 132 p.
- Rodier J. Legube B. Merlet N. 2009.** *L'Analyse de l'eau*, 9^{ème} édition. Dunod, 1526 p.
- Schudel B. Biaggi D. Dervev T. Kozel R. Müller I. Ross JH Schindler U. 2002.** *Utilisation des traceurs artificiels en hydrogéologie. Guide pratique*. Rapport OFEG, Sér. Géol. 3, 77 p.
- Smart P.L. Laidlaw I.M.S. 1977.** An evaluation of some fluorescent dyes for water tracing. *Water Resources Research* 13, p. 15-33.
- Waduge A. Cohen E. Divine C. 2013.** Tracer testing strategies for effective design and implementation of in situ groundwater remediation. *Journal of Environmental Science and Engineering A* 2, p. 759-769.
- Zhu H. Derksen R. Krause C. Fox R. Brazee R. Ozkan H. 2005.** Fluorescent intensity of dye solutions under different pH conditions. *Journal of ASTM International* 2, p. 1-7.

8. Table des illustrations

Figure 1 : Chromatogramme pour l'analyse de l'uranine à 470 nm.	18
Figure 2 : Chromatogramme pour l'analyse de l'éosine à 540 nm.	18
Figure 3 : Chromatogramme pour l'analyse de la sulforhodamine B à 560 nm.	18
Figure 4 : Chromatogramme pour l'analyse de la sulforhodamine G à 530 nm.	18
Figure 5 : Chromatogramme pour l'analyse du naptionate de sodium à 320 nm.	19
Figure 6 : Chromatogramme pour l'analyse de l'acide amino G à 248 nm.	19
Figure 7 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'uranine étudiées.	25
Figure 8 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'éosine étudiées.	26
Figure 9 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine B étudiées.	27
Figure 10 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine G étudiées.	28
Figure 11 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de naptionate de sodium étudiées.	29
Figure 12 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'acide amino G étudiées.	30
Figure 13 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'uranine de concentration 10 et 15 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N), d'eau ultrapure (U) et d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (T).	32
Figure 14 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'éosine de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).	34
Figure 15 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de sulforhodamine B de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).	35
Figure 16 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de sulforhodamine G de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).	37
Figure 17 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de naptionate de sodium de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).	38
Figure 18 : Evolution avec le temps de l'intensité de fluorescence des solutions d'acide amino G à 10 et 25 µg/L fabriquées à partir des poudres des deux fournisseurs, et du pH et de la CE de la solution mère à 0,1 g/L.	40
Figure 19 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'acide amino G de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N), d'eau ultrapure (U) et d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (T), et de leurs pH et CE à 0,1 g/L.	42
Figure 20 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGa1.	44
Figure 21 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGf1.	45
Figure 22 : Structures des impuretés connues des sulforhodamines B (d'après Chen et al. 2002, Gosetti et al. 2015).	46
Figure 23 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 15 µg/L (en bas), et teneur en uranine des poudres ayant servi à les fabriquer.	52
Figure 24 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en éosine des poudres ayant servi à les fabriquer.	53
Figure 25 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en sulforhodamine B pure (à gauche) et sulforhodamine B + sous- produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.	54
Figure 26 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en sulforhodamine G pure (à gauche) et sulforhodamine G + sous- produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.	55
Figure 27 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en naptionate de sodium des poudres ayant servi à les fabriquer.	56
Figure 28 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en acide amino G des poudres ayant servi à les fabriquer.	57
Figure 29 : Spectres en double balayage excitation – émission des produits FLUXAIR 85 S GR Nymco (gauche) et LUCRAFOAM E 100 CONC (droite).	58

<i>Tableau 1 : Références des produits analysés.</i>	11
<i>Tableau 2 : Indications de composition, pureté et solubilité des produits, ainsi que de pH, incluses dans les fiches techniques des fabricants.</i>	13
<i>Tableau 3 : Critères de validation des méthodes (Défarge et al. 2020).</i>	19
<i>Tableau 4 : Bilan des analyses qualitatives, et de CE et pH à 0,1 g/L pour les produits traceurs.</i>	22
<i>Tableau 5 : Evolution avec le temps du pH et de la CE des solutions d'uranine Uf2 à 10 et 15 µg/L fabriquées à partir d'eau ultrapure.</i>	31
<i>Tableau 6 : Caractéristiques des étalons de référence utilisés.</i>	43
<i>Tableau 7 : Bilan de composition des produits traceurs</i>	44
<i>Tableau 8 : Impuretés connues des sulforhodamines B (d'après Chen et al. 2002, Gosetti et al. 2015).</i>	45
<i>Tableau 9 : Impuretés inconnues des sulforhodamines B.</i>	46
<i>Tableau 10 : Impuretés connues des sulforhodamines G (SGf1 et SGa1).</i>	47
<i>Tableau 11 : Impuretés inconnues des sulforhodamines G (exemple de SGf1).</i>	47

9. Annexe 1 : Procédure d'analyse HPLC de l'uranine et de l'éosine

Appareillage et conditions opératoires

Instrument : Chaîne HPLC HP Série 1100 (Agilent Technologies) pilotée par le logiciel HPChemstation

Colonne : Luna 5 µm C18 150 x 4,60 mm (Phenomenex) thermostatée 25°C

Les éluants utilisés sont : A = acétate de sodium à 20 mM et à pH = 5,2 et B = méthanol

Le gradient d'élution utilisé est le suivant :

temps (min)	% MeOH
0	40
14	82

Volume d'injection : 10 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 470 nm pour l'uranine
- 540 nm pour l'éosine
- Référence 700 nm (+/-50 nm)

La méthode est suivie d'un post time de 10 minutes pour stabiliser à nouveau la colonne.

Préparation des étalons et étalonnage

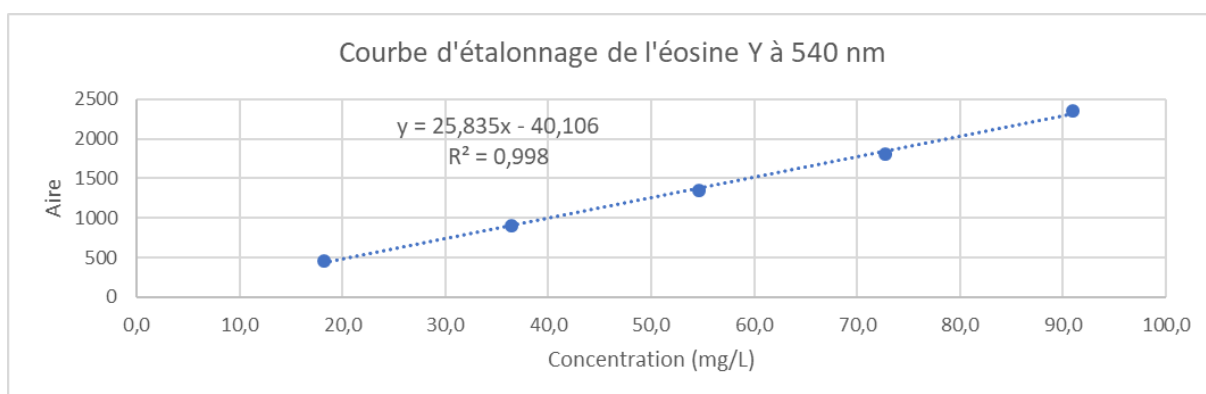
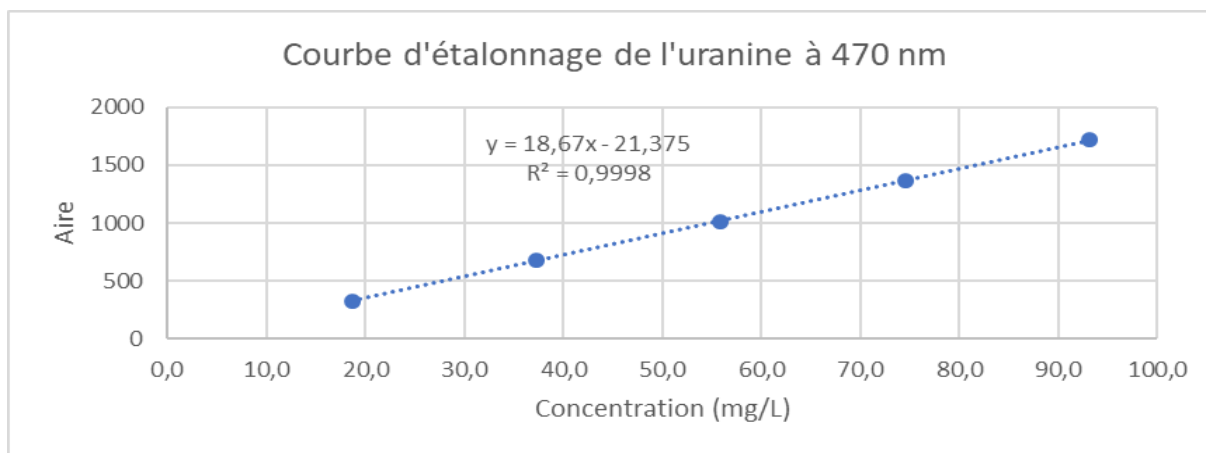
Uranine et Eosine

Des pesées de masses de l'ordre de 50 mg sont réalisées puis introduites dans une fiole de 50 mL complétée avec de l'acétate de sodium (éluant) pour préparer une solution à 100 mg/L. Ces masses sont pesées avec la balance précise à 0,01 µg près. La pureté des étalons commerciaux est prise en compte.

Etalon	Masse pesée (mg)	Pureté LC (%)	Concentration théorique (mg/L)
Uranine	51,0	90,95	927,6
Eosine	49,2	90,98	895,2

Les solutions sont alors diluées pour être passées en HPLC de façon à obtenir une gamme d'étalons de concentration comprise entre 20 et 100 mg/L.

Les droites d'étalonnage correspondantes sont alors tracées pour permettre l'étude de la pureté des échantillons :



Analyse des échantillons

Pour chaque échantillon, une masse de 50 mg est pesée à l'aide d'une balance précise à 0,1 mg près et introduite dans une fiole de 50 mL puis complétée à l'acétate de sodium 20 mM. Un volume de 1,5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 25 mL qui est complétée à l'acétate de sodium 20 mM pour obtenir une concentration de 60 mg/L.

Les solutions sont injectées et l'aire du pic est utilisée pour déterminer la concentration.

Tous les calculs suivants sont réalisés avec cette valeur de l'aire.

Les droites d'étalonnage précédentes permettent de trouver la concentration en élément étudié grâce à la formule suivante :

$$\text{concentration (mg/L)} = \frac{\text{Aire} - b}{a}$$

avec

a : la pente de la droite d'étalonnage

b : l'ordonnée à l'origine de cette droite.

La pureté est ensuite calculée par la formule suivante :

$$\text{Pureté (\%)} = \frac{\text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 25 \times 0,05}{1,5 \times \text{masse pesée (mg)}} \times 100$$

10. Annexe 2 : Procédure d'analyse HPLC des sulforhodamines B et G

Appareillage et conditions opératoires

Instrument : Chaîne HPLC HP Série 1100 (Agilent Technologies) pilotée par le logiciel HPchemstation

Colonne : Luna 5 µm C18 150 x 4,60 mm (Phenomenex) thermostatée 25°C

Les éluants utilisés sont : A = Formiate d'ammonium à 20 mM / H2O et B = Méthanol / Acétonitrile, 50/50

Le gradient d'élution utilisé est le suivant :

temps (min)	% MeOH/ ACN
0	35
12	65
14	75

Volume d'injection : 10 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 530 nm la sulforhodamine G et les impuretés
- 560 nm pour la sulforhodamine B et les impuretés
- Référence 700 nm (+/-50 nm)

La méthode est suivie d'un post time de 10 minutes pour stabiliser à nouveau la colonne.

Préparation des étalons et étalonnage

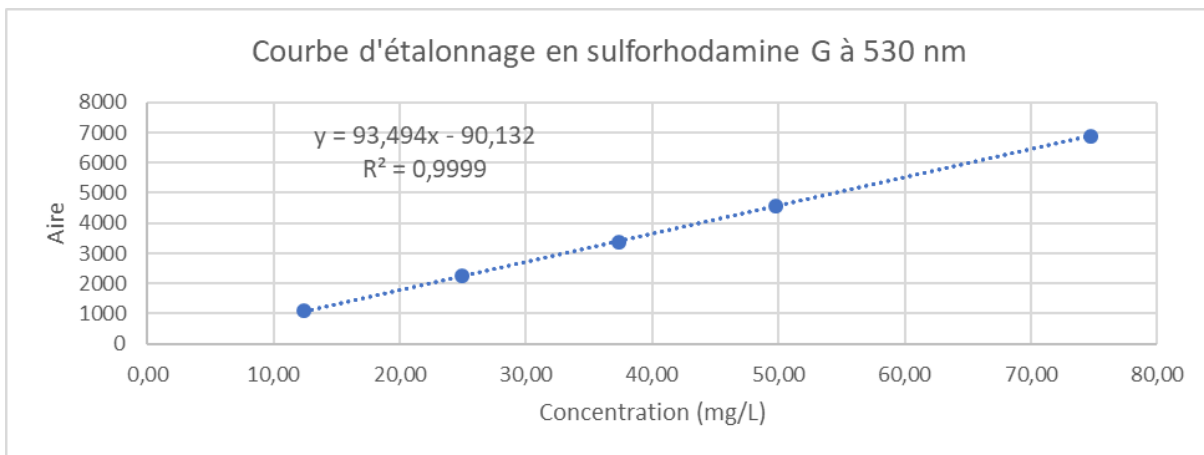
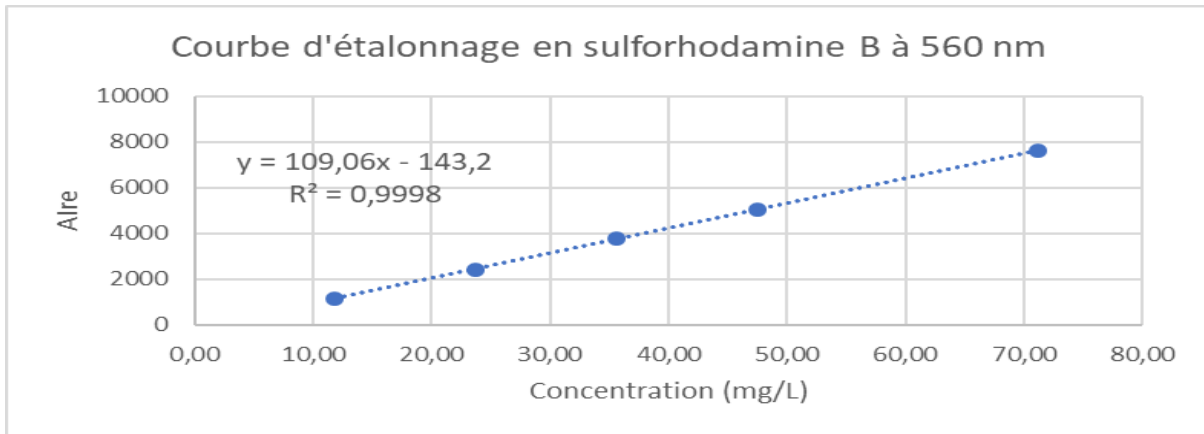
Sulforhodamine B et G

Des pesées de masses de l'ordre de 500 mg sont réalisées avec une balance précise à 0,1 mg près. Ces masses sont ensuite introduites dans une fiole de 500 mL complétée avec l'éluant A.

Étalon	Masse pesée (mg)	Pureté massique (%)	Concentration (mg/L)
Sulforhodamine B	50,2	79,13	794,4
Sulforhodamine G	49,7	82,99	824,9

Les solutions sont alors diluées pour être passées en HPLC de façon à obtenir une gamme d'étalons de concentration comprise entre 10 et 80 mg/L. Les dilutions sont réalisées dans des fioles de 10 mL selon le tableau ci-dessous. Les gammes sont préparées séparément car une coélution est observée entre ces deux composés.

De la même manière, les courbes d'étalonnage sont tracées :



Analyse des échantillons

Pour chaque échantillon, une masse de 50 mg est pesée à l'aide d'une balance précise à 0,1 mg près et introduite dans une fiole de 50 mL puis complétée avec l'éluant A. Un volume de 1,5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 25 mL qui est complétée à l'acétate de sodium 20 mM pour obtenir une concentration de 60 mg/L.

Les solutions sont injectées et l'aire du pic est utilisée pour déterminer la concentration.

Tous les calculs suivants sont réalisés avec cette valeur de l'aire.

Les droites d'étalonnage précédentes permettent de trouver la concentration en élément étudié grâce à la formule suivante :

$$\text{concentration (mg/L)} = \frac{\text{Aire} - b}{a}$$

avec

a : la pente de la droite d'étalonnage

b : l'ordonnée à l'origine de cette droite.

La pureté est ensuite calculée par la formule suivante :

$$\text{Pureté (\%)} = \frac{\text{Concentration } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times 25 \times 0,05}{1,5 \times \text{masse pesée (mg)}} \times 100$$

11. Annexe 3 : Procédure d'analyse HPLC du naphthionate de sodium et de l'acide amino G

Instrument et conditions opératoires

Instrument : Chaîne HPLC HP Série 1100 (Agilent technologie) pilotée par le logiciel HP Chemstation

Colonne : Luna 5 µm C18 150 x 4,60 mm (Phenomenex) thermostatée à 40°C

Les éluants utilisés sont : A = tétrabutylammonium hydrogénosulfate (2,5 mM, 0,85 g/L) dans l'eau à pH = 5,2 et B = tétrabutylammonium hydrogénosulfate (2,5 mM, 0,85 g/L) dans le méthanol

L'analyse de ces échantillons se fait en mode isocratique avec comme proportions 60 % en A et 40 % en B. L'analyse dure six minutes. Le temps de rétention du naphthionate de sodium est 6,1 minutes, celui de l'acide amino G de 9,1 minutes.

Volume d'injection : 10 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 320 nm pour le naphthionate de sodium (BW 8 nm)
- 248 nm pour l'acide amino G (BW 8 nm)
- Référence 700 nm (BW 50 nm)

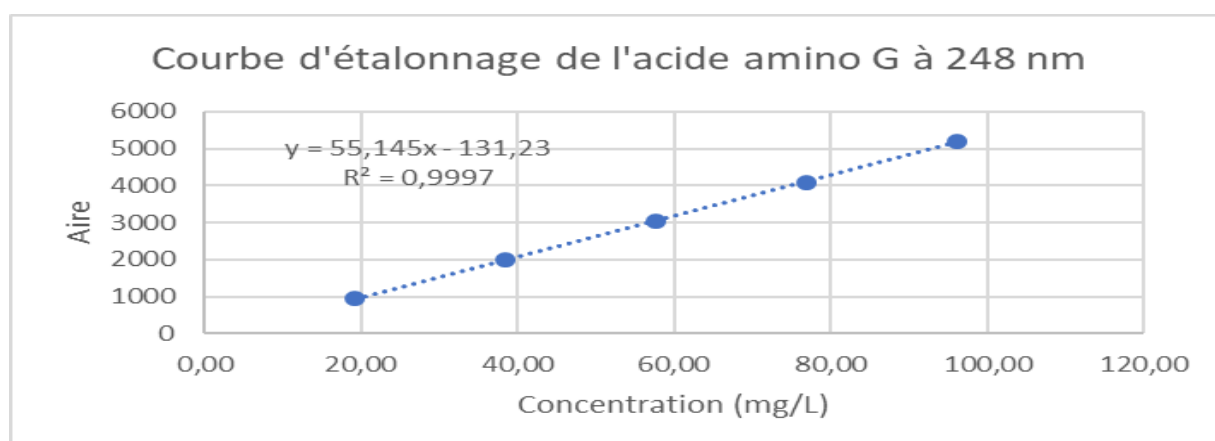
Préparation des étalons et étalonnage

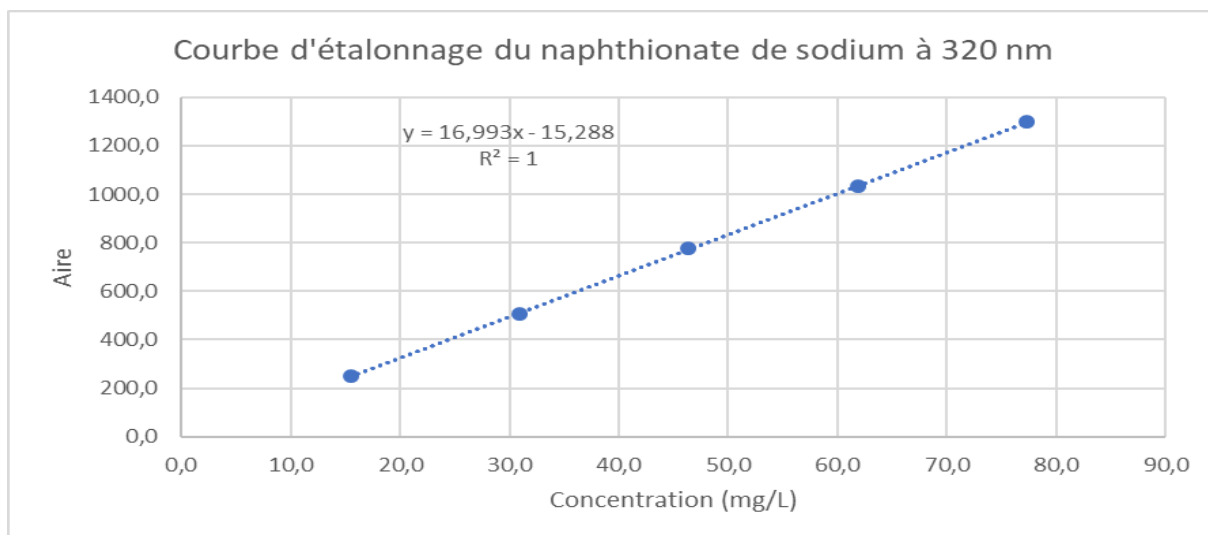
Des pesées de masses de l'ordre de 50 mg sont réalisées à l'aide d'une balance précise à 0,1 g près puis introduites dans une fiole de 50 mL complétée avec l'éluant A.

Étalon	Masse pesée (mg)	Pureté massique (%)	Concentration (mg/L)
Amino G acide	50,6	96,04	971,95
Naphtionate de sodium	49,6	77,32	767,03

Les solutions sont alors diluées pour être passées en HPLC de façon à obtenir une gamme d'étalons de concentration comprise entre 20 et 100 mg/L.

De la même manière, la courbe d'étalonnage est tracée :





Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon, une masse de 50 mg est pesée à l'aide d'une balance précise à 0,1 mg près et introduite dans une fiole de 50 mL puis complétée avec l'éluant A. Un volume de 1,5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 25 mL qui est complétée avec l'éluant A pour obtenir une concentration de 60 mg/L.

Les solutions sont injectées et l'aire du pic est utilisée pour déterminer la concentration.

Tous les calculs suivants sont réalisés avec cette valeur de l'aire.

Les droites d'étalonnage précédentes permettent de trouver la concentration en élément étudié grâce à la formule suivante :

$$\text{concentration (mg/L)} = \frac{\text{Aire} - b}{a}$$

avec

a : la pente de la droite d'étalonnage

b : l'ordonnée à l'origine de cette droite.

La pureté est ensuite calculée par la formule suivante :

$$\text{Pureté (\%)} = \frac{\text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 25 \times 0,05}{1,5 \times \text{masse pesée (mg)}} \times 100$$

12. Annexe 4 : Identification des impuretés des sulforhodamines B et G par LC/MS– Appareillages et conditions opératoires

I. Analyses LC/MS sur piège ionique

Pour réaliser cette analyse, la chaîne UHPLC *Ultimate 3000* et une colonne *Prevail Altech 3 µm C₁₈* 150 x 2,1 mm à 25°C ont été utilisées.

Les éluants utilisés sont :

Eluant A = Formiate d'ammonium à 20 mM / H₂O qualité LC-MS

Eluant B = (Acétonitrile / Méthanol) qualité LC-MS, 0,5/0,5 V/V

L'analyse des échantillons se fait en mode gradient (de 35 % à 75 % en 12 min, puis retour à 35% B en 2 min et 5 min d'équilibration à 35% B. Le débit est de 0,2 mL/min et le volume d'injection de 10 µL. La détection avec un détecteur UV-VIS est réalisée aux longueurs d'ondes 254 nm et 540 nm. La chaîne HPLC est couplée à un spectromètre de masse HCT Ultra ETD II (Bruker Daltonics) équipé d'une source d'ionisation *Electrospray* et d'un piège à ions avec les paramètres représentés dans le tableau ci-dessous :

ESI (+)	ESI (-)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Capillary and end plate voltages : -4,0 kV and -0,5 kV, respectivement. ✓ Capillaire du skimmer : 40V ✓ Sortie du capillaire : 100V ✓ Pression de gaz de nébulisation (N₂) : 30psi ✓ Débit du gaz de séchage (N₂) : 10,0 L/min ✓ Température de désolvatation : 300°C ✓ Capillaire du ion current control : 150 000 (SB), 200 000 (SG) ✓ Trap Drive : 60,0 ✓ Pression d'hélium dans le piège à ions : 10⁻⁵mbar ✓ Gamme de <i>m/z</i> : 50–1200 (SB), 50–800 (SG) ✓ Vitesse de balayage : 8100 <i>m/z</i> / s 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Capillary and end plate voltages : +4,0 kV and -0,5 kV, respectivement. ✓ Capillaire du skimmer: - 40V ✓ Sortie du capillaire : - 100V ✓ Pression de gaz de nébulisation (N₂) : 30psi ✓ Débit du gaz de séchage (N₂) : 10,0 L/min ✓ Température de désolvatation : 300°C ✓ Capillaire du ion current control : 70 000 (SB), 80 000 (SG) ✓ Trap Drive : 50,0 ✓ Pression d'hélium dans le piège à ions : 10⁻⁵ mbar ✓ Gamme de <i>m/z</i> : 50–1200 (SB), 50–800 (SG) ✓ Vitesse de balayage : 8100 <i>m/z</i> / s

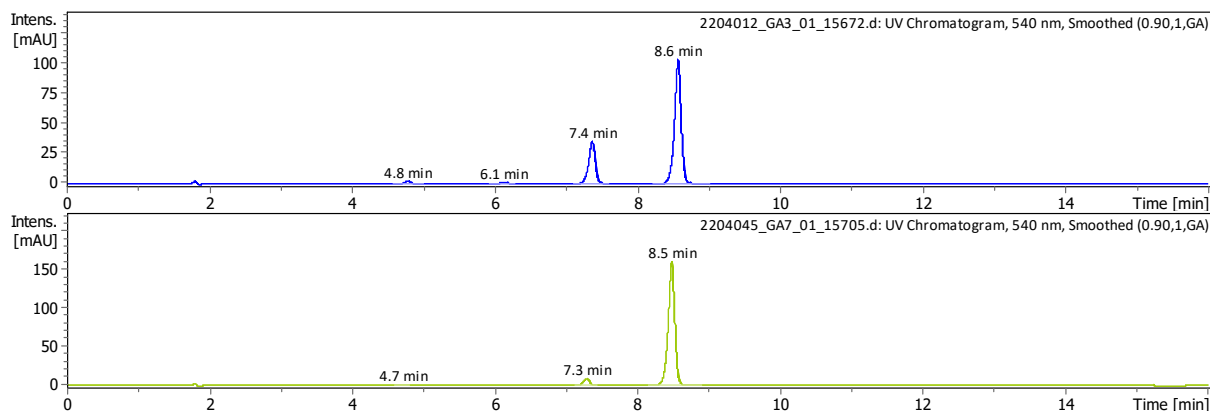
II. Analyses LC/MS « haute résolution »

Les mêmes conditions chromatographiques (colonne, éluant, gradient) que précédemment ont été utilisées. La détection avec un DAD est réalisée aux longueurs d'ondes 540 nm pour la SB et 520 nm pour la SG.

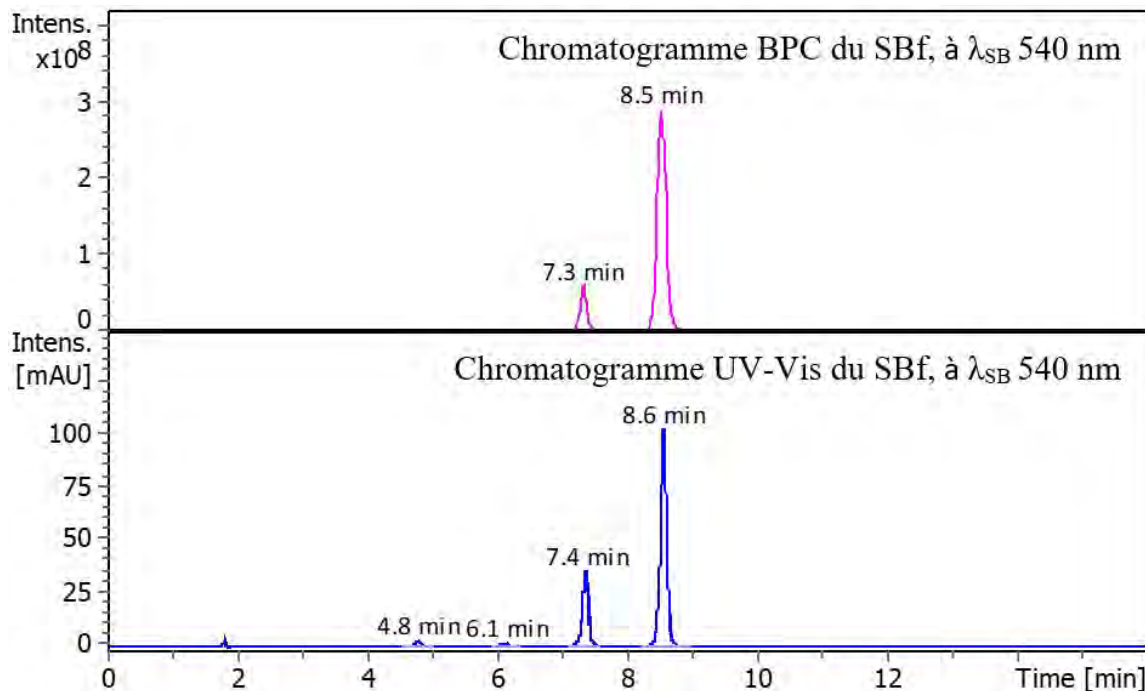
Une chaîne UHPLC Vanquish est couplée à un spectromètre de masse *SYNAPT G2 HDMS (Waters™)* équipé d'une source d'ionisation *Electrospray* et d'un quadripôle-temps de vol (Q-TOF) avec les paramètres MS représentés dans le tableau suivant :

ESI (+)	ESI (-)
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Voltage du capillaire : 2.9 kV ✓ Cône d'échantillonnage : 40 ✓ Mode de résolution V ✓ Température de désolvatation : 250°C ✓ Température de la source: 120°C ✓ Débit du gaz au cône : 30 L / Hr ✓ Débit de désolvatation du gaz : 800 L/H ✓ Extraction cône : 5 ✓ Gamme <i>m/z</i> : 50–1200 ✓ Capillaire du LockSpray 3.5 kV ✓ Temps de scan : 0,3 sec ✓ Intervalle : 10 ✓ Energie de collision du piégeage : 4.0 eV 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Voltage du capillaire : 2.2 kV ✓ Cône d'échantillonnage : 40 ✓ Mode de résolution V ✓ Température de désolvatation : 300°C ✓ Température de la source: 120°C ✓ Débit du gaz au cône : 20 L / Hr ✓ Débit de désolvatation du gaz : 800 L/H ✓ Extraction cône : 5 ✓ Gamme <i>m/z</i> : 50–1200 ✓ Capillaire du LockSpray 3.5 kV ✓ Temps de scan : 0,3 sec ✓ Intervalle : 10 ✓ Energie de collision du piégeage : 4.0 eV

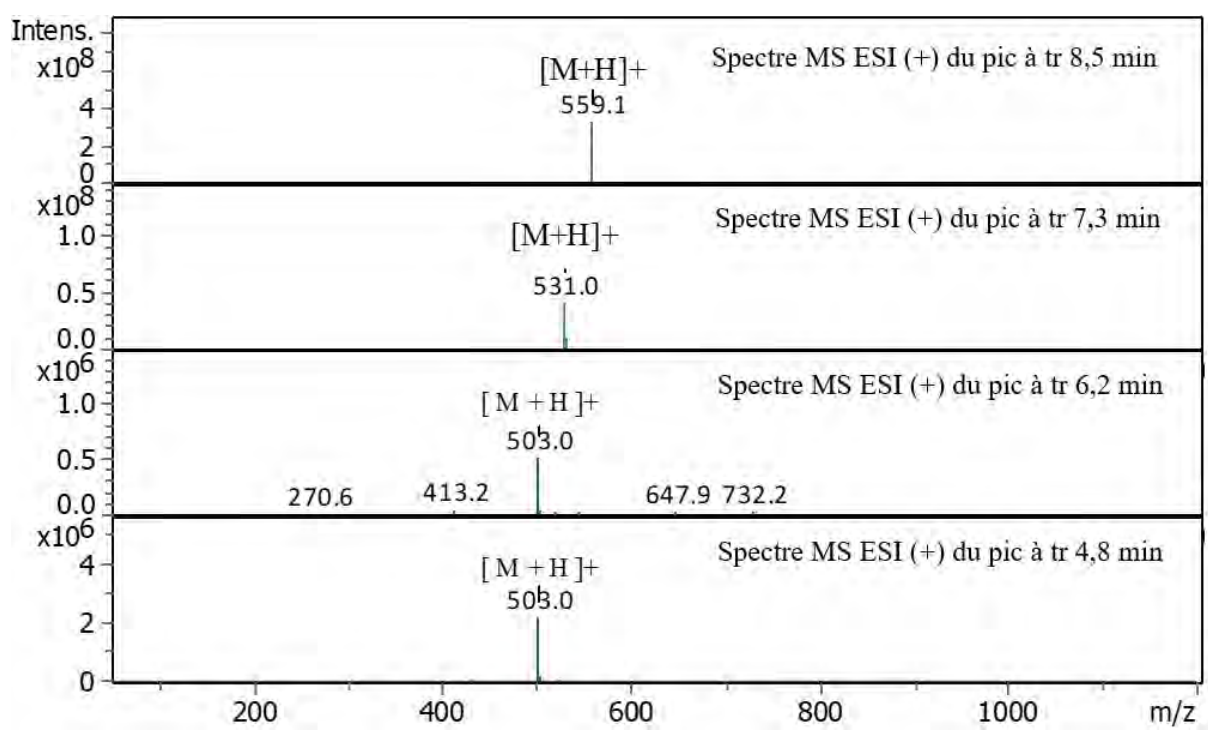
13. Annexe 5 : Chromatogrammes UV et spectres de masse des sulforhodamines B et G (SB et SG)



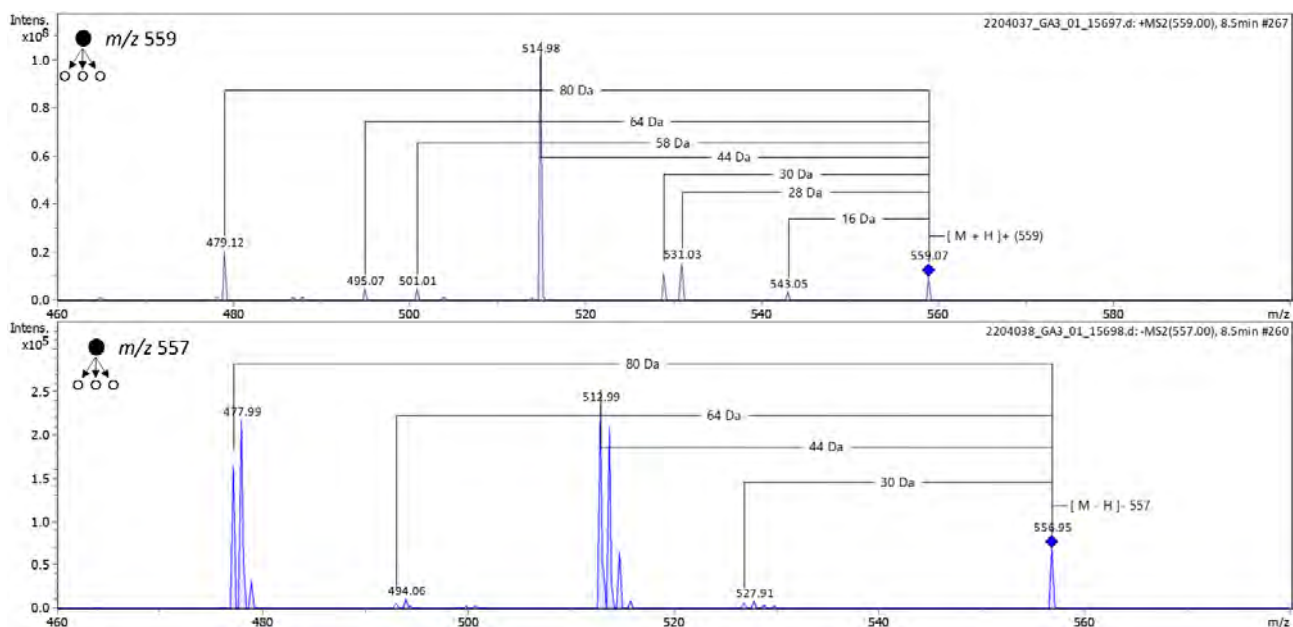
Chromatogrammes UV-VIS à 540 nm des produits **SBf1** (en haut) et **SBa1** (en bas)



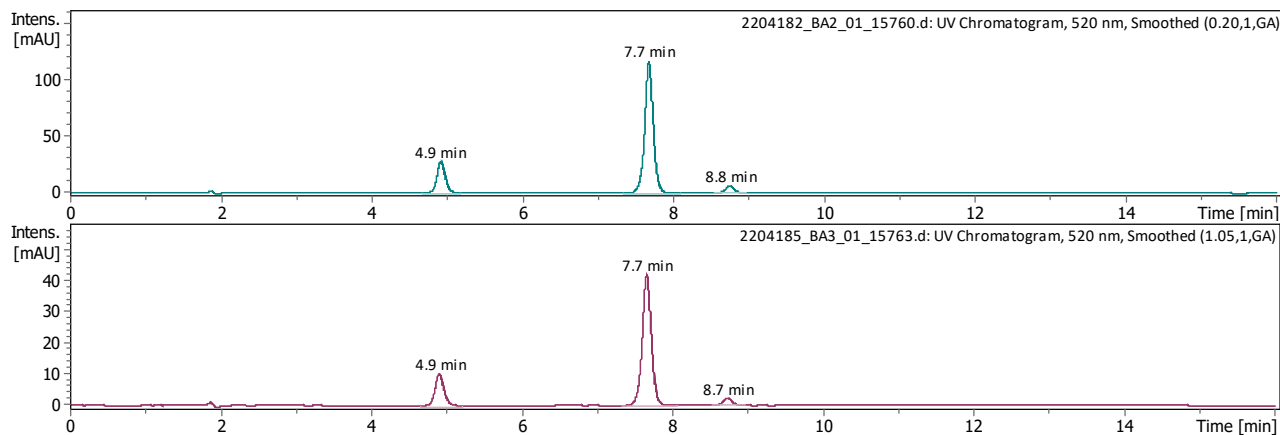
Comparaison des chromatogrammes BPC ESI+ (en haut) et UV-VIS (en bas) de l'échantillon **SBf1**



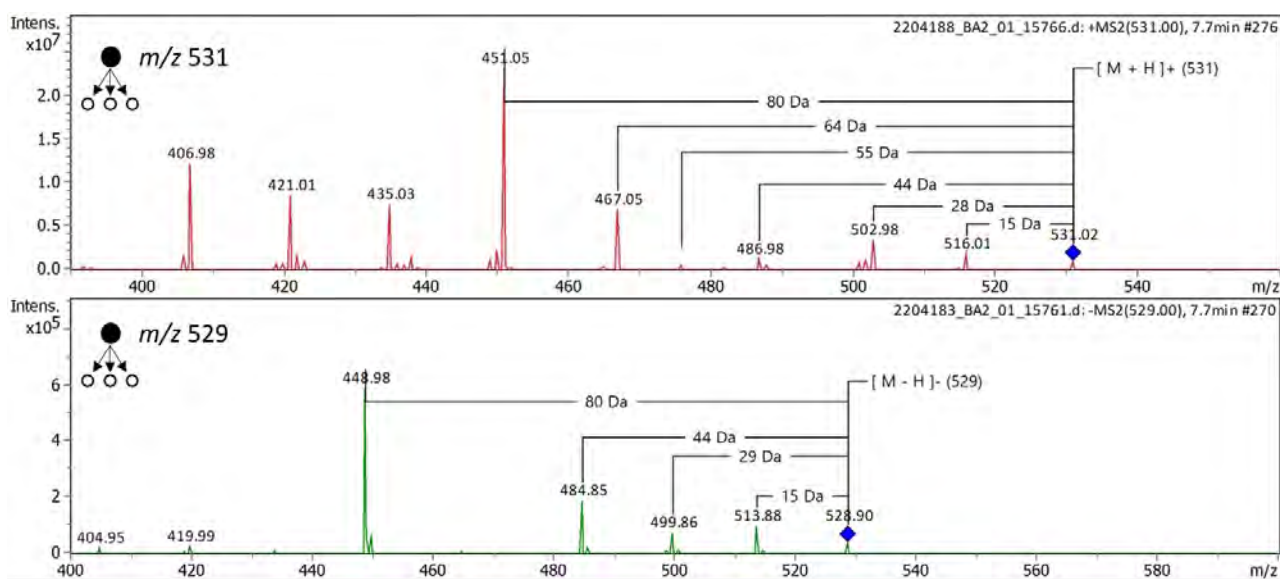
Spectres MS ESI (+) des différents pics observés en LC-MS de l'échantillon **SBf1**



Spectres MS² des ions m/z 559 [M+H]⁺ et m/z 557 [M-H]⁻ du produit **SBf1**



Chromatogrammes UV-VIS à 520 nm des produits **SGf1** (en haut) et **SGa1** (en bas)



Spectres MS² des ions m/z 531 [M+H]⁺ et m/z 529 [M-H]⁻ du produit **SGf1**

14. Annexe 6 : Résultats de la caractérisation spectrale des produits traceurs et des MO dissoutes fluorescentes présentes dans l'eau naturelle utilisée

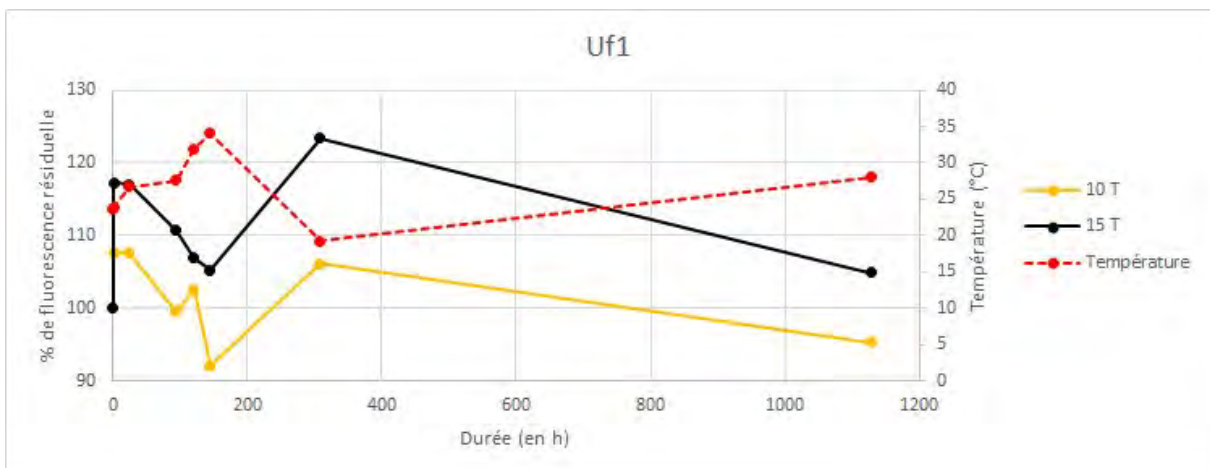
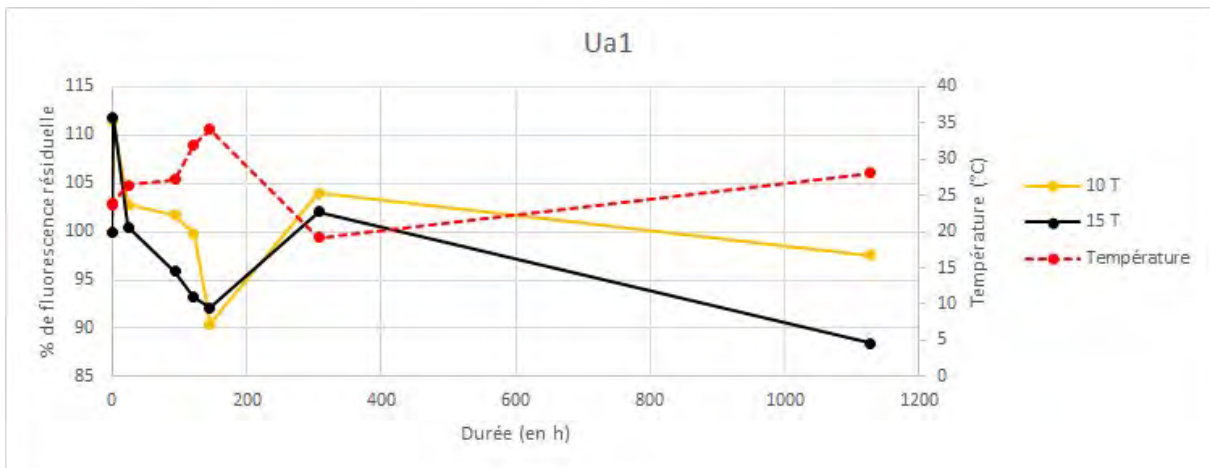
PRODUIT	TRACEUR	DONNEES LITTERATURE		HITACHI F-2500	
		λ Ex (nm)	λ Em (nm)	λ Ex (nm)	λ Em (nm)
Série 1					
Ua1	Uranine	490-492	512-520	493	514
Uf1				493	515
Ea1	Eosine	512-516	535-540	516	538
Ef1				517	538
F1Ep3				516	537
SBa1	Sulforhodamine B	560-565	583-590	566	583
SBf1				566	583
SGa1	Sulforhodamine G	524-530	551-553	532	553
SGf1				531	553
NSa1	Naphtionate de sodium	218/237/ 320-325	418-430	244/321	422
NSf1				244/320	422
AGa1	Acide amino G	218/248/ 308/ 355-359	445-450	252/305/351	448
AGf1				252/300/354	450
Série 2					
Ua2	Uranine	490-492	512-520	489	513
Uf2				491	513
Ea2	Eosine	512-516	535-540	517	537
Ef2				517	537
F1Ep3				517	537
SBa2	Sulforhodamine B	560-565	583-590	566	583
SBf2				566	583
SBf2bis				566	583
SGf1	Sulforhodamine G	524-530	551-553	532	553
SGf2				531	552
NSa2	Naphtionate de sodium	218/237/ 320-325	418-430	322	419
NSf2				320	425
AGa2	Acide amino G	218/248/ 308/ 355-359	445-450	303	450
AGf2				303	450
EAU DE LA SOURCE DU BOUILLON	PIC DE FLOURESCENCE (COMPOSANT FLUOROPHORE)	DONNEES LITTERATURE		HITACHI F-2500	
		λ Ex (nm)	λ Em (nm)	λ Ex (nm)	λ Em (nm)
	Ac (C)	260	400-460	260	442
	M	290-310	370-420	310	419

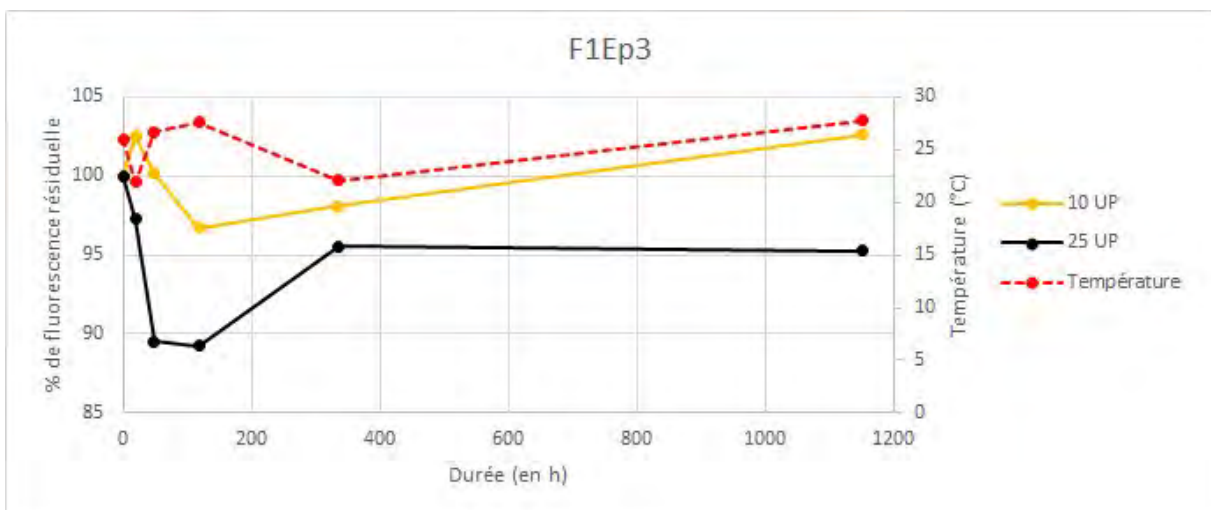
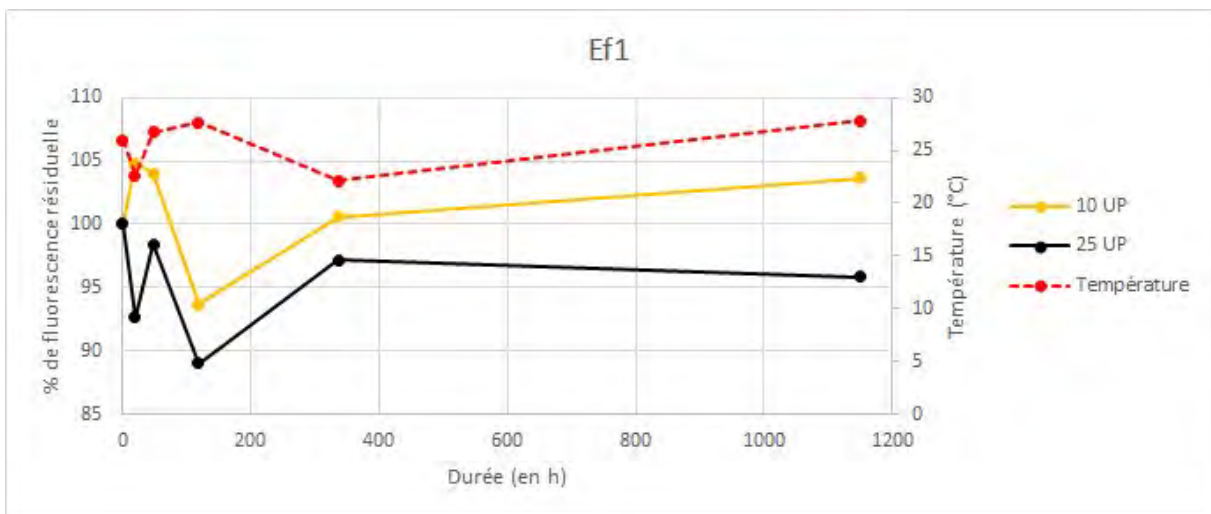
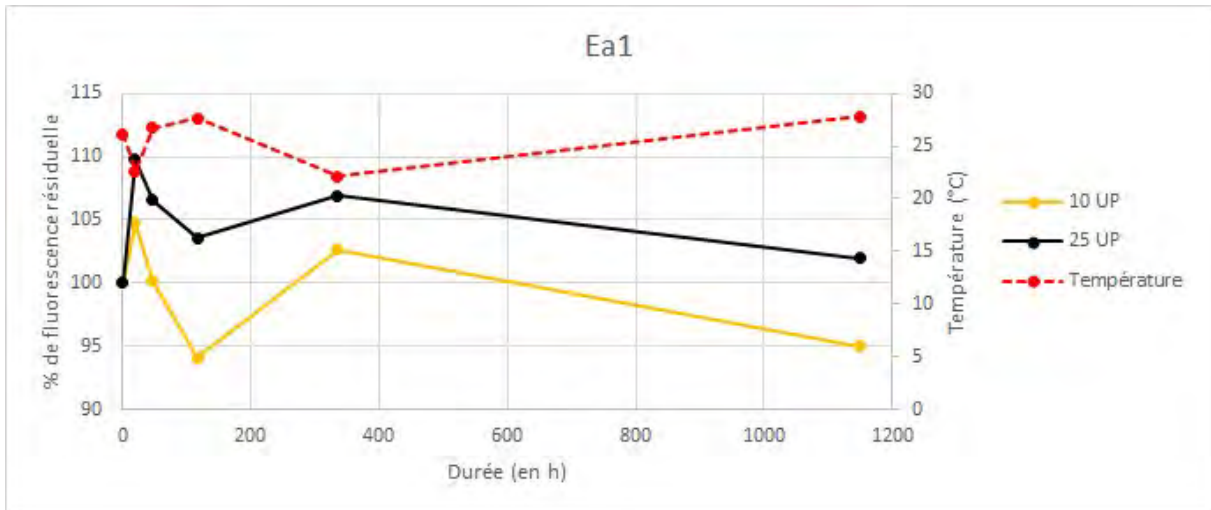
Longueurs d'onde d'excitation (λ Ex) et d'émission (λ Em) ; en gras : longueurs d'onde choisies pour cette étude.

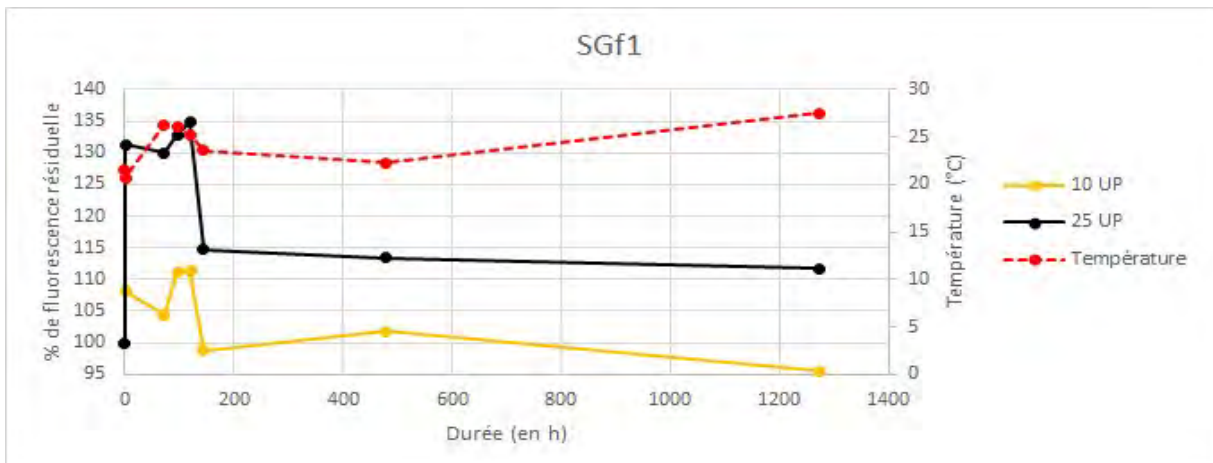
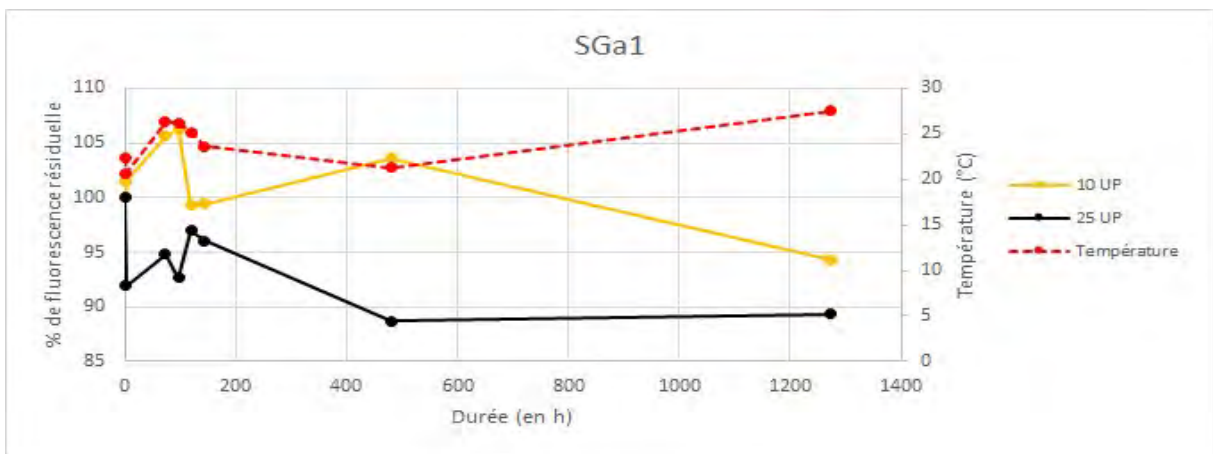
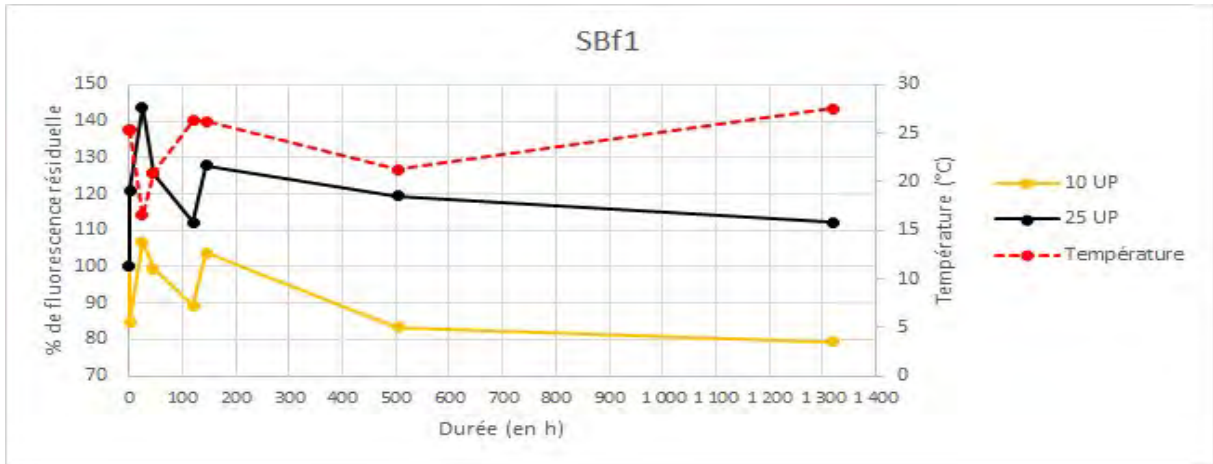
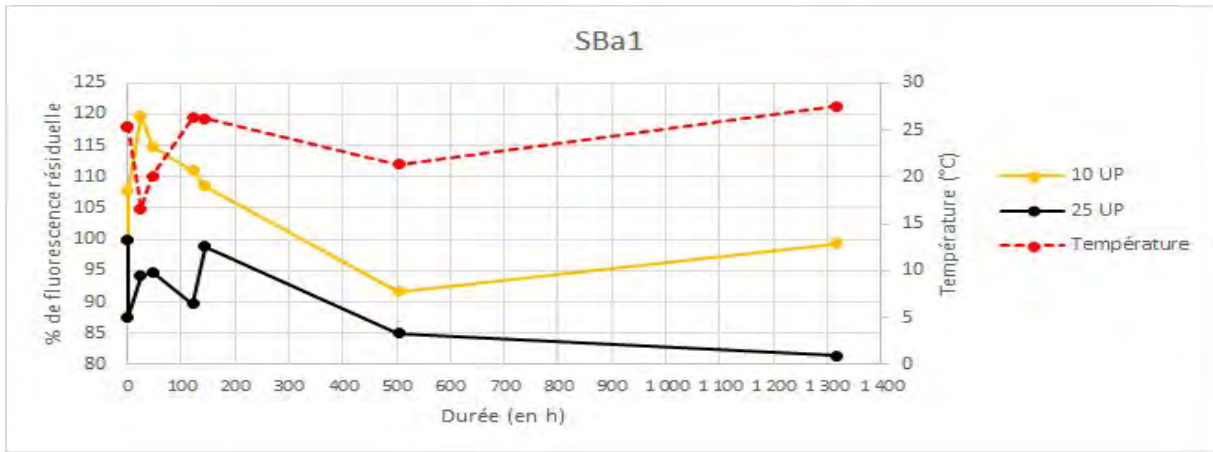
Sources des données de la littérature : Coble et al. (2014), Davis et al. (1985), Ghanem et al. (2003), Green (1990), Käss (1998), Leibundgut et al. (2009), Meus et al. (2014), Smart & Laidlaw (1977), Schudel et al. (2002).

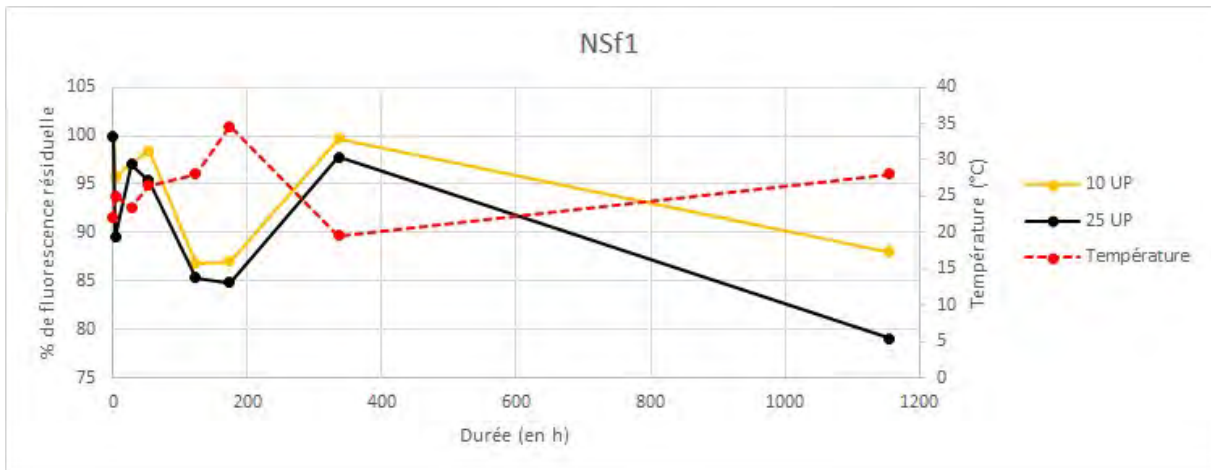
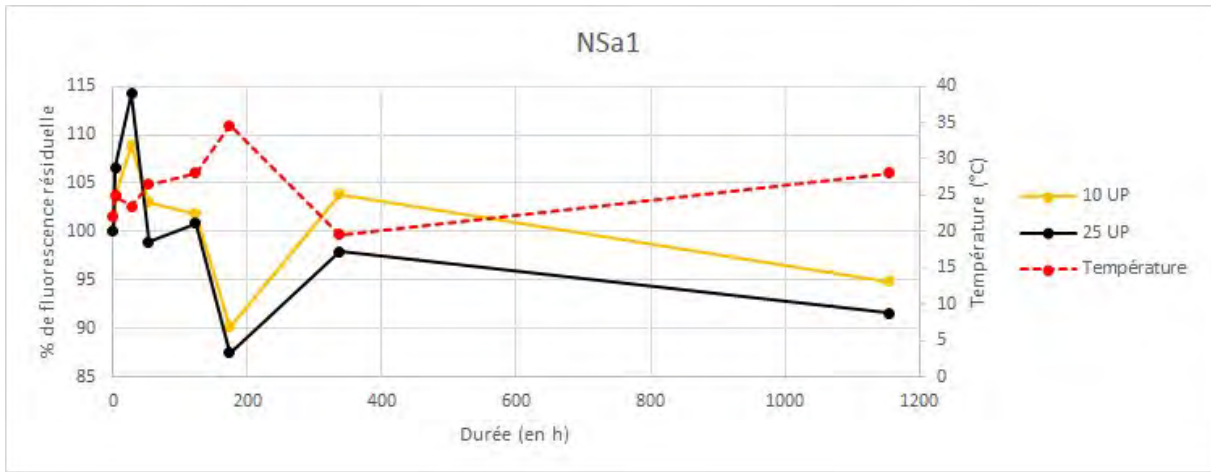
15. Annexe 7 : Stabilité des traceurs en solution dans les premières heures à semaines suivant leur préparation

Dans cette annexe sont regroupées les courbes d'évolution avec le temps, dans les premières heures à semaines après leur préparation à t_0 la première année du projet, des intensités de fluorescence des solutions des traceurs autres que l'acide amino G (dont les résultats sont présentés pour leur part dans la section 2.2.4.1). L'intensité de fluorescence est exprimée en % d'intensité résiduelle par rapport à l'intensité mesurée à t_0 . La température, envisagée *a posteriori* comme facteur pouvant expliquer certains résultats, est celle de l'air, à l'instant précis de la mesure, enregistrée à la station météorologique la plus proche du laboratoire CETRAHE (Bricy, près d'Orléans : <https://www.infoclimat.fr/observations-meteo/temps-reel/orleans-bricy/07249.html>).

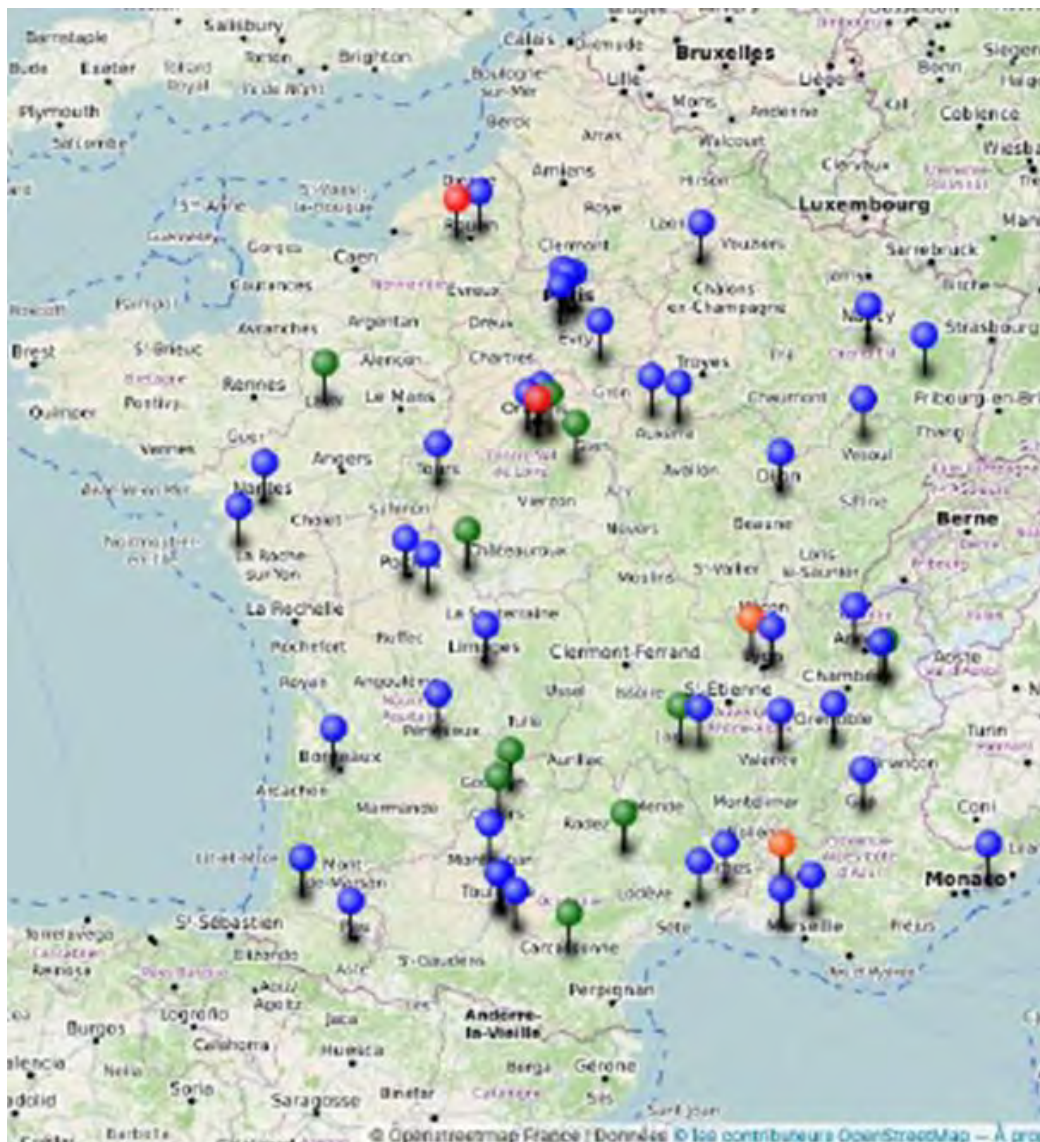








16. Annexe 8 : Cartographie sommaire des acteurs du traçage hydrogéologique artificiel à l'aide de produits fluorescents en France (hors traçages réalisés dans le cadre de projets académiques)



- o : Laboratoires académiques experts impliqués dans le projet
- o : Fournisseurs spécialisés dans les produits traceurs fluorescents et impliqués dans le projet
- o : Bureaux d'études praticiens du traçage accompagnés régulièrement par CETRAHE en expertise-conseil
- o : Collectivités donneuses d'ordre ayant sollicité directement CETRAHE pour des traçages

N.B. Les bureaux d'études sollicitant CETRAHE réalisent majoritairement ces traçages pour des collectivités, non indiquées ici pour que la carte reste lisible, mais étendant encore le réseau des acteurs français du traçage hydrogéologique artificiel.

17. Remerciements

Mme Estérelle VILLEMAGNE (OFB), pour avoir suivi l'instruction de la demande de financement de cette étude, et son bon déroulement. Mmes Laurence CHAMAILLÉ (Direction Recherche et Partenariats, Université d'Orléans) et Marine LE MERCIER (Direction de la Recherche et de la Valorisation, Pôle France Europe International, Université de Rouen Normandie), pour en assurer la gestion administrative et financière.

OFB
Hall C – Le Nadar
5, square Félix Nadar
94300 Vincennes
01 45 14 36 00
<https://ofb.gouv.fr/>

Université d'Orléans, CETRAHE
Polytech'Orléans
8, rue Léonard de Vinci
45072 Orléans cedex 2
02 38 49 24 40
<http://www.univ-orleans.fr/cetrahe>

