


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 final

Christian DÉFARGE, Nevila JOZJA, Audrey DUFOR
(Université d'Orléans, Cellule R&D CETRAHE),
Christine DEVOUGE-BOYER, Marie HUBERT-ROUX,
Mathilde LAUZENT (Institut CARMEN, UMR 6064,
Normandie Université), **Olivier PAILLET** (Société
PAVIQUA), **Séverine REVIRON** (Société COLOREY)

Février 2026

- **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, ingénieure d'études (INSA Rouen, Normandie Université, Institut CARMEN [ex-laboratoire COBRA], UMR 6064), christine.devouge-boyer@insa-rouen.fr

Marie HUBERT-ROUX, ingénieure de recherche (Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Institut CARMEN [ex-laboratoire COBRA], UMR 6064), marie.hubert@univ-rouen.fr

Mathilde LAUZENT, ingénieure d'études (CNRS, Normandie Université, Institut CARMEN [ex-laboratoire COBRA], UMR 6064), mathilde.lauzent@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, Institut CARMEN [ex-laboratoire COBRA], UMR 6064), sarah.leprince@univ-rouen.fr

Léane YON, technicienne (INSA Rouen, Normandie Université, Institut CARMEN [ex-laboratoire COBRA], UMR 6064), leane.yon@insa-rouen.fr

Laura BOM, assistante ingénieure (INSA Rouen, Normandie Université, Institut CARMEN [ex-laboratoire COBRA], UMR 6064), laura.bom@univ-rouen.fr

Nassim BELLABAS, stagiaire de Master 2 Chimie, Analyse et Spectrochimie, Université de Rouen Normandie

Assala SOURI, stagiaire de Master 1 Chimie, Analyse et Spectrochimie, Université de Rouen Normandie

Sara ALASSAF, stagiaire de Master 1 Chimie, Analyse et Spectrochimie, Université de Rouen Normandie

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



• RESUME

Une première étude financée par l'OFB de la qualité, pour les applications en traçage hydrogéologique, des produits fluorescents disponibles chez les fournisseurs professionnels, pour six traceurs couramment utilisés (Défarge *et al.* 2020), avait notamment montré que seule une faible proportion des poudres vendues présentait une teneur en traceur proche de 100 %, seules celles d'acide amino G (AAG) et d'uranine étant dans ce cas, mais pas de manière constante, certaines uranines pouvant ne pas dépasser 48 %, comme certaines éosines, ou des sulforhodamines B (< 49 %) ; les impuretés des sulforhodamines G (SG) étaient composées d'une part insoluble. Les teneurs effectives en traceur des produits se sont de plus avérées incontrôlables de manière courante, leurs fiches techniques étant entachées d'erreurs. Seule la relation de proportionnalité entre pureté des produits et intensité de fluorescence en solution, mise en évidence par l'étude, pouvait laisser espérer l'établissement d'abaques permettant un contrôle qualité. Une dégradation brutale, pouvant aller jusqu'à la disparition de la fluorescence, était par ailleurs observée pour certains produits en solution à l'abri de la lumière, qui pouvait être attribuée à une biodégradation faisant suite à une contamination microbienne liée à l'humidification de la poudre ou à son caractère hygroscopique (cas du naphthionate de sodium [NS]).

Un second projet a donc été mené par les partenaires français du projet (Cellule R&D CETRAHE de l'Université d'Orléans et Institut CARMen de l'Université de Rouen Normandie), accompagnés des deux fournisseurs français spécialisés dans ces produits (sociétés COLOREY et PAVIQUA), afin de contribuer à l'amélioration de la qualité des produits utilisés en traçage, et de la pratique de celui-ci, en complétant leur connaissance sur les points suivants : nature des impuretés de l'éosine et des sulforhodamines ; biodégradabilité des traceurs (en comparant l'évolution de solutions dans l'eau ultrapure, et dans une eau naturelle contenant des bactéries) ; consolidation des abaques reliant pureté des produits et intensité de fluorescence en solution ; élargissement de l'étude à des traceurs moins utilisés (PTSA, pyranine, tinopal CBS-X) et à un produit fluorescent alternatif proposé par COLOREY (riboflavine) ; et, à la demande de l'OFB, prolongation au-delà de la simple obtention de résultats scientifiques, de l'information sur les bonnes pratiques du traçage auprès du plus grand nombre de ses acteurs, afin d'aboutir à un engagement de leur part à respecter ces bonnes pratiques.

Les impuretés solubles des éosines et sulforhodamines s'avèrent des composés chimiquement proches, qui doivent donc participer à la fluorescence aux longueurs d'onde (λ) caractéristiques des traceurs. Na, Cl, P, Al et Cr ont été détectés dans les sulforhodamines B (SB), confirmant l'ajout de sels. Cl et Cr sont également anormalement présents dans les impuretés solubles des SG, ainsi que du Pb, Cr et Pb étant aussi retrouvés dans les insolubles de ce traceur. Les teneurs en Cr ou en Pb des sulforhodamines ne sont toutefois pas susceptibles d'altérer l'état écologique ou la qualité sanitaire des eaux à la suite d'un traçage. Une biodégradation par les bactéries présentes dans l'eau naturelle semble affecter la SB (la différence d'intensité de fluorescence avec l'eau ultrapure atteignant 15-20 % dès les 3 premiers jours), le NS (10-15 % entre 2 et 15 jours) et la SG (4-17 % entre 3 et 15 jours). Les abaques reliant teneur en traceur et intensité de fluorescence sont confirmés comme moyen de contrôle de la masse de produit fluorescent effectivement injectée lors d'un traçage pour la SB ($R^2 = 0,9259-0,9280$ en ajoutant les impuretés fluoresçant aux mêmes λ) et l'uranine ($R^2 = 0,8010-0,8652$), qui sont les deux traceurs les plus utilisés, ou au moins de détecter les poudres de pureté insuffisante et d'estimer celle-ci dans le cas de l'éosine, la SG et l'AAG. Parmi les nouveaux produits étudiés, le tinopal confirme être un traceur à reconsidérer pour des utilisations alternatives au NS ou à l'AAG, notamment en raison de sa forte puissance de fluorescence. La pyranine est à déconseiller en raison de son caractère photoacide, cohérent avec les résultats obtenus, ses λ variables avec le pH rendant sa maîtrise analytique difficile ; le PTSA semble logiquement partager cette dépendance au pH, tous deux étant dérivés du pyrène. La riboflavine ne peut être une alternative aux traceurs traditionnels, principalement en raison de sa très faible puissance de fluorescence et sa très forte photodégradabilité.

Les pistes d'amélioration collectives des pratiques du traçage dégagées par les discussions élargies à de nombreux acteurs du domaine autour de ces résultats, incluent la rédaction d'un guide méthodologique français à jour, l'amélioration de la grille d'évaluation des traçages intégrée à la *Base de Données Traçages*, la création d'un modèle type de cahier des charges pour la réalisation de ceux-ci, l'obligation légale de déclarer les opérations effectuées, ou de faire estimer la teneur effective en traceur des produits avant utilisation.

• MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)

Traçage hydrogéologique artificiel, traceurs fluorescents, qualité, gestion de l'eau

- **STUDY ON IMPROVING THE QUALITY OF FLUORESCENT PRODUCTS INJECTED IN AQUATIC ENVIRONMENTS DURING TRACING TESTS**

- **ABSTRACT**

An initial study funded by the OFB on the quality of fluorescent products available from professional suppliers for hydrogeological tracing applications, focusing on six commonly used tracers (Défarage et al. 2020), showed that only a small proportion of the powders had a tracer content close to 100%. Only those of amino G acid (AGA) and uranine are in this case, but not consistently, as some uranines may not exceed 48%, as well as certain eosins, or sulforhodamines B (< 49%); the impurities in sulforhodamines G (SG) were composed of an insoluble part. Furthermore, the actual tracer content of the products also proved to be uncontrollable on a routine basis, as their technical data sheets are frequently flawed. Only the proportional relationship between product purity and fluorescence intensity in solution, highlighted by the study, offered hope for the establishment of charts enabling quality control. A sudden degradation, leading to the disappearance of fluorescence, was also observed for certain products in solution protected from light, which could be attributed to biodegradation following microbial contamination linked to the humidification of the powder or its hygroscopic nature (as in the case of sodium-naphthionate [SN]).

A second project was therefore carried out by the French partners from the previous project (CETRAHE R&D Unit at the University of Orléans and CARMen Institute at the University of Rouen Normandie), accompanied by the two French suppliers specializing in dye-tracers (COLOREY and PAVIQUA), to help improve the quality of the products used in tracing, and the practice of tracing itself, by supplementing their knowledge on the following points: the nature of the impurities of eosin and sulforhodamines powders; tracer biodegradability (by comparing the evolution of solutions in ultrapure water and in natural water containing bacteria); consolidation of charts linking product purity and fluorescence intensity in solution; expansion of the study to less commonly used tracers (PTSA, pyranine, tinopal CBS-X) and to an alternative fluorescent product proposed by COLOREY (riboflavin); and, at the request of the OFB, extending the scope beyond the mere collection of scientific results, to disseminate information on best practices in tracing to as many of its stakeholders as possible, with the aim of securing their commitment to comply with these best practices.

The soluble impurities in eosin and sulforhodamines are found to be chemically similar compounds to the tracers, which must therefore contribute to the fluorescence at their characteristic wavelengths (λ). Na, Cl, P, Al, and Cr were detected in sulforhodamine B (SB), confirming the addition of salts. Cl, Cr and Pb are also abnormally present in the soluble impurities of SG; Cr and Pb are also found in the insoluble impurities of this tracer. However, the Cr or Pb content of sulforhodamines is not likely to alter the ecological status or sanitary quality of water during tracer tests. Biodegradation by bacteria present in natural water appears to affect SB (the difference in fluorescence intensity with ultrapure water reaching 15-20% as early as the first 3 days), SN (10-15% between 2 and 15 days) and SG (4-17% between 3 and 15 days). The charts relating tracer content to fluorescence intensity are confirmed as a means of controlling the mass of fluorescent product actually injected during a tracer experiment for SB ($R^2 = 0.9259-0.9280$ when adding impurities that fluoresce at the same λ) and uranine ($R^2 = 0.8010-0.8652$), which are the two most commonly used tracers, or at least to detect powders of insufficient purity and to estimate it in the case of eosin, SG, and AGA. Among the new products studied, tinopal has been confirmed as a tracer to be reconsidered for alternative uses to SN or AGA, particularly due to its high fluorescence intensity. Pyranine is not recommended due to its photoacidic nature, consistent with the results obtained, as its λ values vary with pH, making analytical control difficult; PTSA logically shares this pH dependence, as both are derived from pyrene. Riboflavin cannot serve as an alternative to traditional tracers, primarily due to its low fluorescence intensity and very high photodegradability.

The avenues for improving tracer practices identified through broader discussions involving numerous stakeholders in the field regarding these results, include drafting an updated French methodological guide, improving the tracer tests evaluation grid integrated into the French tracer tests database (*BD Traçages*), creating a standard template for specifications governing their implementation, and a legal requirement to report such operations or to have the actual tracer content of products estimated prior to use.

- **KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)**

Hydrogeological tracing technique, artificial fluorescent dyes, product quality, water management

| | | |
|---|---|---|
|  | <p style="text-align: center;">Etude de l'amélioration de la qualité des produits fluorescents injectés dans les milieux aquatiques lors des opérations de traçage Rapport final Défarge, Jozja, Dufour, Devouge-Boyer, Hubert-Roux, Lauzent, Paillet, Reviron</p> |  |
|---|---|---|

- **SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE**

Contexte du projet

Une première étude d'évaluation de la qualité des produits fluorescents actuellement commercialisés en France pour les applications en traçage hydrogéologique, financée par l'Office Français de la Biodiversité (OFB), avait permis de vérifier la présence systématique dans ces produits du composé fluorescent annoncé avec les caractéristiques spectroscopiques connues (couples de longueurs d'onde d'excitation λ_{Ex} et d'émission λ_{Em}) permettant leur détection, l'absence d'autres composants fluorescents, ou parasites pour la mesure spectrofluorimétrique, la proportionnalité de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des traceurs en solution (permettant les analyses quantitatives), et pour la plupart d'entre eux, la conservation de leur intensité de fluorescence jusqu'à 6 mois en l'absence de lumière, dans toute la gamme des températures rencontrées dans les eaux naturelles (4-40 °C : Défarge *et al.* 2020). Les seules exceptions concernaient certaines solutions en faible concentration de naphthionate de sodium, d'acide amino G, ou d'uranine, qui subissaient une dégradation précoce et brutale, pouvant aller jusqu'à la disparition totale de la fluorescence, qu'on pouvait supposer être une biodégradation faisant suite à une contamination microbienne liée à l'humidification des poudres, ainsi que toutes les autres solutions d'acide amino G, qui pouvaient subir une baisse de leur intensité de fluorescence jusqu'à 25 % au bout de 6 mois, même dans les conditions les plus conservatives testées (obscurité et froid).

L'étude avait toutefois également mis en évidence d'autres caractéristiques de certains de ces produits, qui étaient beaucoup plus problématiques pour leur utilisation dans les opérations de traçage hydrogéologique et la fiabilité de leurs résultats (Défarge *et al.* 2020) :

- ▶ leur teneur en traceur était très variable, y compris au sein des lots, leur composition étant par ailleurs incontrôlable en raison à la fois des pratiques 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, ou s'approvisionner ponctuellement chez des fournisseurs différents) ;

- ▶ les fiches techniques des produits contenaient de ce fait fréquemment des informations inexactes sur leurs teneurs en traceur, mais également en 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, et manipulation des produits, ou en insolubles (dans le cas de la sulforhodamine G), quand ces fiches sont disponibles (certains revendeurs ayant décidé de ne pas en fournir, en raison de l'impossibilité d'en assurer ou d'en contrôler la fiabilité) ;

- ▶ seules les poudres d'uranine et d'acide amino G avaient des teneurs en traceur proches de 100 %, sur lesquelles sont basées les estimations de masse à injecter lors des opérations de traçage et l'exploitation de leurs résultats, mais pas de manière systématique, celles de certaines uranines pouvant ne pas dépasser 50 % ; les teneurs en traceur des produits vendus comme naphthionate de sodium ne dépassaient pas 89 % (en raison d'une forte teneur en eau), celles de l'éosine 87 %, celles des sulforhodamines G et B, 81 et 59 %, respectivement, certaines éosines ou sulforhodamines B pouvant ne pas atteindre 50 % de pureté ;

- ▶ les composants inconnus solubles et insolubles des traceurs les moins purs (éosine et sulforhodamines) n'avaient pu être identifiés par les méthodes employées, et restaient donc une part indéterminée, de devenir inconnu, relâchée dans les eaux lors des traçages réalisés avec ces produits.

La mise en évidence d'une relation de proportionnalité entre intensité de fluorescence en solution et teneur en traceur des poudres laissait cependant espérer que cette dernière pourrait être vérifiée à l'avenir par une simple mesure de la première, dans des conditions contrôlées, à partir des abaques ainsi bâtis, à condition de les consolider sur une plus grande gamme de produits (Défarge *et al.* 2020).

Un second projet a donc été imaginé, et financé avec l'aide de l'OFB, pour améliorer la connaissance de ces produits traceurs, leur qualité, et par conséquent celle des pratiques du traçage

hydrogéologique appliqué à la gestion et la préservation de la ressource en eau, sur les points suivants :

- ▶ l'identification, grâce à des méthodes analytiques nouvelles ou plus poussées, des impuretés solubles présentes dans les poudres d'éosine et de sulforhodamines, et insolubles dans le cas de la sulforhodamine G ;
- ▶ l'explication de la baisse particulière et progressive avec le temps de l'intensité de fluorescence de l'acide amino G en solution, même dans les conditions les plus conservatives, qui pouvait être due à sa dégradation en sous-produits, et/ou à l'évolution du pH, l'intensité de fluorescence de ce traceur chutant rapidement au-dessous de pH 6,5 d'après Smart & Laidlaw (1977) ;
- ▶ l'évaluation de la biodégradabilité des traceurs fluorescents en solution, par comparaison du comportement de solutions fabriquées à partir d'eau naturelle (une eau de source karstique influencée par des eaux superficielles chargées en bactéries), avec celles préparées avec de l'eau ultrapure, la seule à avoir été utilisée au cours du premier projet (Défarge *et al.* 2020) ;
- ▶ la consolidation des abaques reliant intensité de fluorescence des traceurs en solution, à leur teneur dans les poudres utilisées, pour qu'ils puissent être utilisés à l'avenir pour estimer cette teneur dans les produits utilisés ;
- ▶ l'élargissement de l'étude à des traceurs moins, ou devenus moins utilisés, et à des produits fluorescents biosourcés et environnementalo-compatibles, que les fournisseurs devenus partenaires de ce second projet (COLOREY, PAVIQUA) proposaient de tester comme alternatives aux traceurs conventionnels ;
- ▶ et, à la demande de l'OFB, la prolongation cette fois-ci au-delà de la simple obtention de résultats scientifiques, de l'information sur les bonnes pratiques du traçage hydrogéologique que ces résultats permettraient de préciser, auprès du plus grand nombre de ses acteurs, des donneurs d'ordre aux valideurs, en passant par le maximum de praticiens, afin d'aboutir à une prise de conscience générale des enjeux de cette méthode pour la gestion de l'eau, voire à une forme d'engagement à respecter ces bonnes pratiques, pouvant aller jusqu'à un début de structuration de filière.

Le rapport Défarge *et al.* (2026) rend compte des résultats obtenus au cours de ce second projet.

Matériels et méthodes

Outre les six traceurs étudiés au cours du précédent projet (uranine, éosine, sulforhodamines B et G, naphthionate de sodium, acide amino G : Défarge *et al.* 2020), on a choisi pour cette étude complémentaire la pyranine (CAS 6358-69-6), le tinopal CBS-X (CAS 38775-22-3) et le PTSA (sel tétrasodique d'acide 1,3,6,8-pyrenététrasilfonique, CAS 59572-10-0), ainsi que le sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate (CAS 130-40-5), qui est le colorant alimentaire E101(ii). Trente-quatre lots de produits ont été analysés en tout, dont cinq nouveaux lots de sulforhodamine B sélectionnés par les deux fournisseurs, trois nouveaux lots de sulforhodamine G, quatre d'éosine en plus d'un produit datant du précédent projet, quatre d'uranine, de naphthionate de sodium, et d'acide amino G, et un de pyranine, de tinopal, de PTSA et de riboflavine ; certaines sulforhodamines B (3 lots) et G (1 lot) du précédent projet n'ont été réanalysées que du point de vue de leur composition.

Les analyses réalisées à CETRAHE ont inclus les caractérisations suivantes : analyse qualitative (aspect, couleur, odeur et traces d'humidité éventuelle dans les poudres), propriétés chimiques en solution à 0,1 g/L [conductivité électrique, pH], caractérisation spectrale (longueurs d'onde d'excitation et d'émission, forme des pics), intensité de fluorescence, stabilité et dégradabilité à l'obscurité à la température du laboratoire en solution dans l'eau ultrapure et dans l'eau naturelle (pour tous les produits), à la lumière à la température du laboratoire et à l'obscurité à 4 °C et 40 °C (pour les quatre nouveaux produits), jusqu'à 6 mois, à deux concentrations (10 et 25 µg/L ; sauf pour l'uranine : 10 et 15 µg/L ; et la riboflavine : 25 µg/L et 1 mg/L). La détermination de la composition des poudres a été menée par COBRA par pesées avant et après chauffage (teneur en matière sèche et en eau) et après centrifugation (teneur en insolubles des sulforhodamines G), LC-UV (chromatographie liquide couplée à un détecteur ultraviolet : teneur en traceur), LC-MS (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse : identification des impuretés solubles des sulforhodamines, des éosines et de la riboflavine), ICP-AES (spectrométrie par émission atomique à plasma à couplage inductif) et ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif : composition des impuretés solubles des sulforhodamines), MEB-EDX (émission dispersive des rayons X en microscopie électronique à balayage : composition des impuretés solubles des sulforhodamines, et insolubles des sulforhodamines G), et spectrométrie de masse sous ionisation laser (LDI-TOF/MS) et chromatographie anionique (identification des insolubles des sulforhodamines G).

Principaux résultats

L'étude a permis de confirmer les résultats positifs du précédent projet (Défarge *et al.* 2020) concernant la présence systématique dans les produits du composé fluorescent annoncé avec les caractéristiques spectroscopiques permettant leur détection, et la proportionnalité de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des traceurs en solution, autorisant les analyses quantitatives. En ce qui concerne la pyranine, nos résultats semblent par ailleurs cohérents avec son caractère décrit comme photoacide par Nandi & Amdursky (2022), ses couples $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$, principal comme secondaires, variant en fonction du pH, avec 5 domaines distincts (Käss 1998). Les résultats obtenus pour le PTSA sembleraient indiquer qu'il aurait lui aussi des caractéristiques de photoacide, ce qui est logique du fait de la structure chimique proche des deux traceurs (la pyranine est un sel trisodique d'acide 8-hydroxy-1,3,6- pyrenétrisulfonique). Aucune caractérisation spectrale à laquelle comparer la nôtre n'est disponible dans la littérature pour le sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate ; nous retrouvons bien un pic à 370/525 nm caractéristique de la riboflavine (Yang *et al.* 2016), mais il n'est pas le pic principal du produit analysé, lequel est accompagné par un 3^{ème} pic, ces deux derniers devant donc être dus aux autres constituants de la poudre.

Cette dernière ne contient en effet que moins de 17 % de riboflavine, ses composants complémentaires étant essentiellement de la riboflavine-5'-phosphate et ses dérivés, ainsi que des dérivés de la riboflavine. Les nouvelles poudres de sulforhodamine G s'avèrent encore moins pures que celles analysées au cours du précédent projet (ne contenant que 28,8 à 48,8 % en masse de traceur, contre 63,8 à 80,3 % précédemment) ; ces faibles valeurs s'expliquent pour partie par la présence de composants insolubles, dont l'éventail des teneurs dans l'ensemble des produits analysés est extrêmement large (15 à 46 %). En revanche, 4 des 5 sulforhodamines B sélectionnées cette fois-ci par les fournisseurs atteignent des puretés (86,4 à 96,2 %) aussi bonnes que les meilleures poudres d'acide amino G (toujours comprises dans la fourchette 86-98 %) ou d'uranine (78-96 % chez les fournisseurs partenaires de ce projet), contre 48,8 à 59,0 % seulement précédemment, et 52,3 % pour la 5^{ème} poudre sélectionnée. Les poudres de pyranine, PTSA et tinopal se situent également à cet excellent niveau de pureté, le tinopal contenant toutefois 4 % d'impuretés non déterminées. La pureté des éosines sélectionnées est également meilleure que lors du précédent projet (83,9-89,2 %, contre 47,9-86,5 % : Défarge *et al.* 2020).

Ces données de pureté permettent d'établir une comparaison des puissances de fluorescence des traceurs, à travers l'intensité de leur fluorescence en solution aux deux concentrations analysées, rapportée à la masse de traceur effectivement présente dans les produits. Les résultats confirment ceux du précédent projet en ce qui concerne les six traceurs déjà étudiés au cours de celui-ci, notamment les données inédites sur la puissance de fluorescence de l'acide amino G, qui est du même ordre de grandeur que celle du naphthionate de sodium (dans un rapport de 18 à 100 à l'uranine, traceur le plus puissant parmi ceux étudiés), et celle, supérieure encore aux valeurs les plus élevées données dans la littérature, de la sulforhodamine G, qui en font le 2^{ème} traceur le plus puissant des 6, après l'uranine (38, contre 32 à 100 pour Leibundgut *et al.* 2009). Les analyses du tinopal et de la pyranine confirment également les données disponibles dans la littérature, faisant du premier le 2^{ème} traceur le plus puissant des 9 étudiés (avec toutefois un rapport d'intensité à l'uranine significativement plus bas : 46, contre 60 à 100 pour Benischke *et al.* 2007), et du second un traceur intermédiaire entre naphthionate de sodium et éosine (16, 19, et 14 à 100, respectivement, contre 18, 18, et 11 pour Leibundgut *et al.* 2009). Nos résultats apportent des données inédites à notre connaissance sur le PTSA, qui s'avère du même ordre de puissance que le tinopal (48, contre 46 à 100), et sur la riboflavine, deux fois moins puissante que la sulforhodamine B, qui est le traceur le moins puissant parmi ceux étudiés (10 à 100, selon nos données, qui confirment celles de Leibundgut *et al.* 2009).

Les impuretés solubles présentes dans les poudres de sulforhodamines et d'éosine s'avèrent être, comme dans le cas de la riboflavine-5'-phosphate, des composés chimiquement proches de ces traceurs, qui doivent donc participer à la fluorescence des produits en solution aux longueurs d'onde caractéristiques des traceurs, puisque celle-ci est généralement due aux noyaux aromatiques. Sodium (à hauteur de 16 %), chlore, phosphore, aluminium et chrome ont été également détectés dans les sulforhodamines B, alors qu'ils ne sont pas présents dans la formule moléculaire théorique, confirmant ainsi que le traceur est additionné de sels. Chlore et chrome sont également anormalement présents dans les impuretés solubles des sulforhodamines G, ainsi que du plomb, chrome et plomb étant aussi retrouvés dans les insolubles de ces produits. Les teneurs en Cr et/ou en Pb des sulforhodamines ne semblent toutefois pas susceptibles d'altérer l'état écologique ou la qualité sanitaire des eaux dans les conditions dans lesquelles sont réalisées les opérations de traçage. Une attention pourrait toutefois devoir être portée au devenir du Cr contenu dans la part insoluble des poudres de sulforhodamine G.

Les résultats obtenus au cours de ce second projet élargissent encore les gammes de teneur en traceur des poudres qu'on peut trouver dans le commerce dans le cas de l'éosine (47-90 %), des

sulforhodamines B (48-97 %) et G (28-81 %), et du naphthionate de sodium (67-89 %), les nouvelles uranine et acide amino G se situant dans la fourchette de celles analysées lors du précédent projet (47-96, et 86-98 %, respectivement : Défarge *et al.* 2020). Les fiches techniques des fabricants ne permettent pas de connaître les puretés effectives des produits utilisés, puisqu'elles restent fréquemment fausses (inchangées depuis le précédent projet pour les traceurs cités ci-dessus) ou ne sont pas données par les fournisseurs pour cette raison, eux-mêmes n'ayant pas la possibilité de les contrôler ; c'est également le cas pour les poudres de PTSA et surtout de riboflavine (< 17 % au lieu de 73-79 %) analysées cette fois-ci. Aux surestimations des puretés et sous-estimations des teneurs en insolubles (pour la sulforhodamine G) et en eau mises en évidence précédemment (Défarge *et al.* 2020), s'ajoutent cette fois-ci la sous-estimation de la teneur en Pb d'une des sulforhodamines G sélectionnée par COLOREY (1,5 % au lieu de < 0,0005 %) et l'absence d'indication de sa présence dans celles sélectionnées par PAVIQUA, et de celle de Cr dans toutes les sulforhodamines analysées.

Les abaques reliant teneur en traceur et composants dérivés fluoresçant aux mêmes $\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$, et intensité de fluorescence en solution, consolidées au cours de ce second projet, apparaissent comme un moyen simple de contrôler la pureté des poudres, et donc la masse exacte de produit fluorescent effectivement injectée lors des opérations de traçage, dans le cas de la sulforhodamine B (avec des R^2 de 0,9259 à 0,9280 en ajoutant les impuretés) et l'uranine ($R^2 = 0,8010$ à $0,8652$), les deux traceurs les plus utilisés en France, ou au moins de détecter les poudres de pureté insuffisante et d'estimer approximativement celle-ci dans le cas de la sulforhodamine G ($R^2 = 0,6763$ à $0,7885$ en ajoutant les impuretés solubles), de l'acide amino G ($R^2 = 0,6007$ à $0,7387$) ou de l'éosine ($R^2 = 0,5768$ à $0,5910$ en ajoutant les impuretés). Dans le cas du naphthionate de sodium, pour lequel la corrélation est très médiocre ($R^2 = 0,0167$ à $0,0190$), probablement à la fois en raison de la faible dispersion des puretés, des fortes teneurs en eau (toujours > 20 %) associées à un caractère très hygroscopique (les prises d'essai devant contenir des proportions de masse sèche très variables en fonction du taux d'humidité du laboratoire), l'intensité de fluorescence en solution devrait tout de même permettre de détecter une poudre sortant de la fourchette 67-89 %.

La comparaison de l'évolution avec le temps de solutions de traceurs fabriquées avec de l'eau naturelle et ultrapure a permis de mettre en évidence des phénomènes probables de biodégradation par les bactéries présentes dans la première, dans le cas des sulforhodamines B (la différence d'intensité de fluorescence entre les deux types de solution atteignant 15-20 % dès les 3 premiers jours) et G (4-8 % à 25 $\mu\text{g/L}$ et 10-17 % à 10 $\mu\text{g/L}$ entre 3 jours et 2 semaines), et du naphthionate de sodium (10-15 % entre 2 jours et 2 semaines), de la pyranine (à partir de 2 mois seulement, durée rarement atteinte par les opérations de traçage courantes), de l'acide amino G (notable à partir de 4,5 mois seulement), et possiblement du tinopal. Pour ce dernier traceur, le comportement des solutions dans l'eau ultrapure pourrait également témoigner d'une biodégradation due à des bactéries présentes dans la poudre et libérées en solution, comme cela avait été suggéré pour le naphthionate de sodium et l'acide amino G au cours du précédent projet ; le fait que la poudre de tinopal utilisée soit hygroscopique comme celles de ces autres poudres renforce cette hypothèse, la présence d'eau favorisant la contamination microbienne. Ce type de biodégradation pourrait également intervenir cette fois-ci dans le cas de la riboflavine, en plus du naphthionate de sodium. La baisse d'intensité de fluorescence avec le temps de l'acide amino G dans toutes les conditions n'a pas été retrouvée, et aurait donc pu également être due à ce type de biodégradation – hypothèse renforcée par le fait que les poudres d'acide amino G ne sont pas hygroscopiques cette fois-ci. Le suivi de ce traceur permet de plus d'écarter le pH comme facteur explicatif, et démontre l'absence d'influence de celui-ci sur sa fluorescence entre 3,4 et 7,9, remettant en question la chute observée par Smart & Laidlaw (1977) au-dessous de pH 6,5 – mais confirme l'expérience de laboratoire de CETRAHE avec ce traceur.

Les résultats des autres expériences de suivi avec le temps des quatre nouveaux produits étudiés au cours de ce second projet confirment les données de photosensibilité disponibles dans la littérature : la riboflavine, connue pour être hautement photosensible en solution, montre une chute très rapide de son intensité de fluorescence en 24 h, passant de 100 à 43 % à 1 mg/L , et 31 % à 25 $\mu\text{g/L}$; le tinopal est le 3^{ème} traceur le plus sensible à la lumière parmi ceux étudiés de ce point de vue, après l'éosine, le traceur le plus sensible parmi ceux que nous avons étudiés, et l'uranine, Käss (1998) lui attribuant un coefficient de photolyse de 350, rapporté à 1 000 pour la 1^{ère}, la seconde étant à 350 ; la pyranine y est relativement sensible, mais dans une moindre mesure que le tinopal (son coefficient de photolyse serait de 130 d'après Käss 1998). Nous apportons par ailleurs des données, inédites à notre connaissance, sur la sensibilité à la lumière du PTSA, qui s'avère être un traceur encore plus photosensible que le tinopal, le pourcentage de fluorescence résiduelle des solutions exposées à la lumière n'étant plus au bout de 3 jours que de 60 à 62 % pour les solutions à 25 $\mu\text{g/L}$, 79 à 84 % pour celles à 10 $\mu\text{g/L}$, 39 à 49 %, et 58 à 76 %, respectivement, à 1 semaine, 11 à 12 %, et 19 à 25 %, à 2 semaines, pour tomber à quelques % au bout d'un mois, plus aucune trace de produit n'étant détectée à 2 mois.

Nos résultats semblent en revanche plutôt contredire ceux disponibles dans la littérature sur la dépendance des traceurs à la température, puisqu'aucun effet de celle-ci n'a été constatée pour le tinopal, censé y être le plus sensible parmi ceux étudiés (Käss 1998) ; la température de 40 °C pourrait toutefois avoir un effet stimulant sur la biodégradation de ce traceur en solution. La sensibilité à la température de la pyranine, censée être équivalente à celle de l'acide amino G selon Käss (1998), n'est pas non plus mise en évidence par nos résultats (voir Défarge *et al.* 2020 pour ce qui concerne l'acide amino G). Dans tous les cas étudiés depuis le premier projet, les effets observés de la température sur l'intensité de fluorescence (généralement inverses) sont de toute façon réversibles.

Ces résultats ont été progressivement présentés, tout au long du projet, dans un but de diffusion de l'information sur l'amélioration de la pratique du traçage hydrogéologique (nécessité d'évaluer la teneur effective en produit fluorescent des produits, bonne conservation des poudres utilisées, notamment vis-à-vis de l'humidité, attention particulière devant être portée à celle des échantillons d'eaux susceptibles d'être contaminées par des bactéries, à conserver au froid, en plus de l'obscurité, jusqu'à leur analyse, laquelle doit intervenir le plus rapidement après les prélèvements), au public le plus large : élèves-ingénieurs susceptibles de devenir des praticiens ou de commander des traçages, participants aux formations continues organisées par l'Université d'Orléans, spéléologues, bureaux d'étude faisant appel à CETRAHE en expertise conseil et analytique, et pour finir acteurs institutionnels, autorités réglementaires, donneurs d'ordre, gestionnaires de bases de données concernés par le traçage hydrogéologique en France, lors d'un COPIL final élargi du projet. Les retours obtenus ont permis de confirmer, préciser ou dégager de nouvelles pistes d'amélioration de la diffusion de ces résultats et donc d'amélioration des pratiques de cette méthode, dont les principales sont résumées plus bas.

Conclusions et perspectives

Parmi les produits étudiés spécifiquement au cours de ce second projet, la riboflavine, même si celui sélectionné en contenait moins de 17 %, ne peut pas constituer une alternative aux traceurs traditionnels en raison de sa faible solubilité dans l'eau, sa trop forte photosensibilité, et son caractère non conservatif en solution dans toutes les conditions. Pyranine et PTSA seraient à déconseiller pour ces applications du fait de leur caractère photoacide, puisque la moindre différence ou évolution du pH entre solutions ou échantillons rend leur comparaison en termes d'intensité de fluorescence impossible. Le tinopal est en revanche un traceur à reconsidérer pour des utilisations alternatives au naphthionate de sodium ou à l'acide amino G, dans le domaine de fluorescence distinct de ceux de l'uranine et des sulforhodamines, en raison principalement de sa forte puissance de fluorescence ; il resterait donc à confirmer la reproductibilité de l'excellente pureté de ses poudres, identifier la nature des composants complémentaires (en représentant 4 % dans celle étudiée ici), et vérifier la possibilité d'estimer la première par simple mesure de l'intensité de fluorescence en solution.

Cette dernière estimation doit être réalisée systématiquement sur les produits utilisés lors des opérations de traçage, grâce aux abaques progressivement bâtis au cours des deux projets financés par l'OFB (Défarge *et al.* 2020, 2026), ou restant à mettre au point dans le cas du tinopal.

La rédaction d'un guide méthodologique complet et à jour en français sur la pratique du traçage hydrogéologique artificiel apparaît maintenant indispensable. Il devra évidemment inclure les avancées permises par ces deux projets, notamment les recommandations aux praticiens dégagées dans leurs deux rapports, mais également les développements dans le domaine du traçage hydrogéologique artificiel qui ont eu lieu depuis la parution des guides antérieurs (Schudel *et al.* 2002 ; Dörfliger *et al.* 2010, qui inclut un chapitre consacré au traçage parmi les outils de l'hydrogéologie karstique ; Pascoletti & Chapuis 2022, pour un très court chapitre dans un guide méthodologique consacré à la connaissance et la quantification des échanges karst/rivière), en particulier le logiciel de dimensionnement et d'interprétation des traçages TRAC (Gutierrez *et al.* 2013) et la BD Traçages (Base de Données des traçages hydrogéologiques : <https://bdtracages.brgm.fr/>), au développement desquels CETRAHE a été associée.

La grille d'évaluation des opérations de traçage proposée par Jozja *et al.* (2011b, pour sa version la plus récente), qui est intégrée à la BD Traçages, pourrait être améliorée. En plus de son intégration à cette base de données, cette grille d'évaluation devra évidemment être incluse dans le guide méthodologique pratique envisagé.

Il apparaît également nécessaire de créer un modèle type de cahier des charges pour la réalisation des opérations de traçage en France, prêt à l'emploi pour les collectivités et les donneurs d'ordre de manière générale, qui devra aussi trouver place, une fois validé, à la fois au sein de la BD Traçages et dans le guide méthodologique. La base de travail pourrait en être le module de formation qui est intégré aux sessions de formation continue en traçage mentionnées plus haut, enseigné depuis le début par

des ingénieurs en bureaux d'études qui ont à répondre à des appels d'offre, du point de vue à la fois des donneurs d'ordre et des bureaux d'études qui y répondent.

Des évolutions réglementaires seraient également nécessaires en matière de traçage artificiel, à commencer par une obligation de déclarer préalablement les opérations à réaliser, pratique non contraignante à l'heure actuelle en France. Dans ce cas, le modèle qui pourrait servir de base devra être la Fiche de déclaration préalable d'un traçage en Région Normandie établie par le BRGM (https://www.siges.fr/sites/default/files/documents/2024-12/fiche_de_declaration_tracagev6_2020.pdf).

Ces différentes pistes d'amélioration des pratiques du traçage hydrogéologique en France nécessitent toutes un travail collectif, qui pourrait prendre la forme de webinaires élargis au maximum de ses acteurs, d'ateliers techniques, de réunions de discussion autour des différents axes (guide méthodologique, grille d'évaluation, cahier des charges, déclaration d'opération de traçage, autres évolutions réglementaires comme l'obligation de contrôle de qualité des produits utilisés...), le cas échéant de conférences annuelles, ainsi que de la communication la plus large sur leurs avancées. Il semblerait nécessaire de l'encadrer et de le favoriser dans le cadre d'un nouveau projet, prenant la suite des deux précédents, qui pourrait être également financé par l'OFB.

Références

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.

Défarge C. Jozja N. Dufour A. Meus P. Devouge-Boyer C. Hubert M. Marcotte S. 2020. Etude de la qualité des produits fluorescents utilisés en traçage hydrogéologique. OFB, 190 p.

Défarge C. Jozja N. Dufour A. Devouge-Boyer C. Hubert-Roux M. Lauzent M. Paillet O. Reviron S. 2026. Etude de l'amélioration de la qualité des produits fluorescents injectés dans les milieux aquatiques lors des opérations de traçage. OFB, 179 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.

Gutierrez A. Klinka T. Thiéry D. Buscarlet E. Binet S. Jozja N. Défarge C. Leclerc B. Fécamp C. Ahumada Y. Elsass J. 2013. TRAC, a collaborative computer tool for tracer-test interpretation. Proceedings "TRACER 6", Sixth International Conference on Tracers and Tracing Methods, Oslo, 6-8 June 2011. *European Physical Journal Web of Conferences* 50, 03002, 8 p.

Jozja N. Mondain P.H. Muet P. 2011. 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.

Leibundgut C. Maloszewski P. Külls C. 2009. *Tracers in Hydrology*. Wiley-Blackwell, 415 p.

Nandi R. Amdursky N. 2022. The dual use of the pyranine (HPTS) fluorescent probe: A ground-state pH indicator and an excited-state proton transfer probe. *Accounts of Chemical Research* 55, p. 2728-2739.

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.

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.

Yang H. Xiao X. Zhao X.S. Hu L. Xue X.F. Ye J.S. 2016. Study on fluorescence spectra of thiamine and riboflavin. *MATEC Web of Conferences* 63, 03013, doi : 10.1051/matecconf/20166303013.

Auteurs : Christian DÉFARGE (christian.defarge@univ-orleans.fr), Nevila JOZJA, Audrey DUFOUR : Université d'Orléans, Cellule R&D CETRAHE : <https://www.univ-orleans.fr/fr/cetrahe> ; Christine DEVOUGE-BOYER, Marie HUBERT-ROUX, Mathilde LAUZENT : Institut CARMEN, Normandie Université, Rouen ; Olivier PAILLET : Société PAVIQUA ; Séverine REVIRON : Société COLOREY.

- **SOMMAIRE**

| | |
|--|-----------|
| 1. Introduction | 14 |
| 2. Matériels et méthodes..... | 21 |
| 2.1. Produits sélectionnés par Art E'Color et Fluotechnik..... | 21 |
| 2.2. Analyses des produits traceurs réalisées à CETRAHE..... | 24 |
| 2.2.1. Analyse qualitative..... | 25 |
| 2.2.2. Caractérisation spectrale..... | 26 |
| 2.2.3. Intensité de fluorescence..... | 26 |
| 2.2.4. Comportement des traceurs en solution..... | 27 |
| 2.2.4.1. Stabilité et dégradabilité de l'acide amino G | 27 |
| 2.2.4.2. Stabilité des autres traceurs analysés lors du premier projet..... | 27 |
| 2.2.4.3. Comportement comparé dans une eau naturelle et dans l'eau ultrapure | 27 |
| 2.2.4.4. Stabilité des traceurs non analysés lors du 1 ^{er} projet..... | 28 |
| 2.3. Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA..... | 29 |
| 2.3.1. Teneur en eau | 29 |
| 2.3.2. Développement de méthodes HPLC/DAD..... | 29 |
| 2.3.3. Détermination de la teneur en matière sèche..... | 32 |
| 2.3.4. Identification des impuretés des sulforhodamines B et G..... | 32 |
| 2.3.5. Analyses complémentaires des sulforhodamines B et G..... | 33 |
| 2.3.6. Analyses complémentaires de la riboflavine et de l'éosine..... | 33 |
| 2.4. Analyses des produits anti-mousse | 33 |
| 3. Résultats | 34 |
| 3.1. Caractérisations des produits traceurs réalisées à CETRAHE..... | 34 |
| 3.1.1. Analyses qualitatives, CE et pH | 34 |
| 3.1.2. Caractérisation spectrale..... | 37 |
| 3.1.3. Intensité de fluorescence | 39 |
| 3.1.3.1. Uranine..... | 39 |
| 3.1.3.2. Eosine | 40 |
| 3.1.3.3. Sulforhodamine B..... | 41 |
| 3.1.3.4. Sulforhodamine G | 42 |
| 3.1.3.5. Naphtionate de sodium | 44 |
| 3.1.3.6. Acide amino G..... | 44 |
| 3.1.3.7. Pyranine | 45 |
| 3.1.3.8. Tinopal | 46 |
| 3.1.3.9. PTSA..... | 46 |
| 3.1.3.10. Riboflavine | 47 |
| 3.1.3.11. Bilan des analyses d'intensité de fluorescence | 47 |
| 3.1.4. Stabilité dans le temps et dégradabilité..... | 50 |
| 3.1.4.1. Uranine..... | 50 |
| 3.1.4.2. Eosine | 53 |
| 3.1.4.3. Sulforhodamine B..... | 53 |
| 3.1.4.4. Sulforhodamine G | 56 |
| 3.1.4.5. Naphtionate de sodium | 57 |
| 3.1.4.6. Acide amino G..... | 59 |
| 3.1.4.7. Pyranine | 63 |
| 3.1.4.8. Tinopal | 67 |
| 3.1.4.9. PTSA..... | 70 |
| 3.1.4.10. Riboflavine | 74 |
| 3.1.4.11. Bilan des suivis de stabilité et dégradabilité des traceurs analysés | 76 |
| 3.2. Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA..... | 81 |
| 3.2.1. Pureté et teneur en eau..... | 81 |
| 3.2.1.1. Etalons de référence | 81 |
| 3.2.1.2. Pureté déterminée par HPLC et teneur en eau | 82 |
| 3.2.1.3. Identification des impuretés des sulforhodamines B | 84 |
| 3.2.1.4. Identification des impuretés des sulforhodamines G..... | 86 |
| 3.2.1.5. Identification des composants de l'éosine en LC-MS..... | 92 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.1.6. Identification des impuretés de la riboflavine en LC-MS..... | 92 |
| 3.2.2. Bilan des analyses de composition des produits..... | 93 |
| 3.3. Relation entre intensité de fluorescence et pureté des produits..... | 98 |
| 3.3.1. Uranine..... | 98 |
| 3.3.2. Eosine..... | 99 |
| 3.3.3. Sulforhodamine B..... | 100 |
| 3.3.4. Sulforhodamine G..... | 101 |
| 3.3.5. Naphtionate de sodium..... | 102 |
| 3.3.6. Acide amino G..... | 102 |
| 3.3.7. Bilan des comparaisons entre intensité de fluorescence et pureté..... | 104 |
| 3.4. Analyses des produits anti-mousse..... | 106 |
| 3.4.1. Analyse de fluorescence..... | 106 |
| 3.4.2. Formation de mousse dans les uranines et éosines en solution..... | 106 |
| 3.5. Action n°3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage..... | 107 |
| 4. Conclusions et perspectives..... | 112 |
| 4.1. Action n° 1 : Nature, composition, impacts possibles sur la qualité des eaux | 116 |
| 4.2. Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits..... | 127 |
| 4.3. Action n° 3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage..... | 130 |
| 5. Glossaire..... | 133 |
| 6. Sigles & Abréviations..... | 134 |
| 7. Bibliographie..... | 136 |
| 8. Table des illustrations..... | 139 |
| 9. Annexe 1 : Résultats de la caractérisation spectrale des produits traceurs et des MO dissoutes fluorescentes présentes dans l'eau naturelle utilisée..... | 142 |
| 10. Annexe 2 : Procédure d'analyse HPLC de l'uranine et de l'éosine..... | 146 |
| 11. Annexe 3 : Procédure d'analyse HPLC des sulforhodamines B et G..... | 148 |
| 12. Annexe 4 : Procédure d'analyse HPLC du naphthionate de sodium et de l'acide amino G..... | 150 |
| 13. Annexe 5 : Procédure d'analyse HPLC de la pyranine..... | 152 |
| 14. Annexe 6 : Procédure d'analyse HPLC du tinopal..... | 154 |
| 15. Annexe 7 : Procédure d'analyse HPLC du PTSA..... | 156 |
| 16. Annexe 8 : Procédure d'analyse HPLC de la riboflavine et de la riboflavine phosphate..... | 158 |
| 17. Annexe 9 : Identification des impuretés des sulforhodamines B et G par LC/MS – Appareillages et conditions opératoires..... | 160 |
| 18. Annexe 10 : Identification des impuretés difficilement solubles de SGf2, de la riboflavine et de l'éosine par LC/MS – Appareillages et conditions opératoires..... | 161 |
| 19. Annexe 11 : Identification des métaux par ICP-MS et ICP-AES – Appareillages et conditions opératoires..... | 162 |
| 20. Annexe 12 : Recherche des sulfates par chromatographie ionique – Appareillages et conditions opératoires..... | 163 |
| 21. Annexe 13 : Procédure d'analyse en LDI des insolubles de SGf1 et SGa1..... | 164 |
| 22. Annexe 14 : Autres mesures d'intensité de fluorescence des solutions préparées à partir des traceurs étudiés, en fonction de leur concentration... .. | 165 |
| 23. Annexe 15 : Stabilité des traceurs en solution dans les premières heures à semaines suivant leur préparation..... | 168 |
| 24. Annexe 16 : Chromatogrammes UV et spectres de masse des sulforhodamines B et G (SB et SG)..... | 172 |
| 25. Annexe 17 : Spectres de MEB-EDX des sulforhodamines G..... | 175 |

| | |
|--|------------|
| 26. Annexe 18 : 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) | 178 |
| 27. Remerciements | 179 |

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 comme le tinopal (CAS 38775-22-3) ;
- ▶ les autres traceurs fluorescents comme le naphthionate de sodium (CAS 130-13-2), l'acide amino G (CAS 86-65-7) ou la pyranine (CAS 6358-69-6).

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 utilisés en Europe occidentale (ceux cités ci-dessus, sauf la pyranine et le tinopal, qui le sont moins), 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, ou s'approvisionner ponctuellement chez des fournisseurs différents) ;
- ▶ les **fiches techniques des produits** contiennent de ce fait fréquemment des informations inexactes 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 atteindre 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, pour partie **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 peut voir 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), était expliquée 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 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 avait également pour but d'élargir la première 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 proposait 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 se proposait d'étudier 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 concernerait également 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 auraient 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 visait 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, constitue 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 visait à aller plus loin encore dans la structuration de cette filière, en prévoyant de présenter cette fois-ci, comme cela avait 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. Le but de ces échanges est 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 trois années d'étude, qui prévoyaient :

- ▶ l'analyse de la **composition complète de deux lots de sulforhodamines B et G**, sélectionnés sur deux ans par les 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 consolidation 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 Art E'Color.

- ▶ **l'élargissement** des études réalisées dans le cadre du premier projet (Défarge *et al.* 2020) à **des traceurs moins, ou devenus moins, utilisés (pyranine, tinopal CBS-X, PTSA)**, et de

nouveaux traceurs potentiels proposés par les fournisseurs partenaires (comme la **riboflavine**) en étudiant leur qualité comme traceurs hydrogéologiques, leur pureté, et la nature des impuretés éventuelles qu'ils pourraient contenir.

2. Matériels et méthodes

2.1. Produits sélectionnés par Art E'Color et Fluotechnik

Six lots de poudres des traceurs fluorescents précédemment étudiés (**uranine**, **éosine**, **sulforhodamine B**, **sulforhodamine G**, **naphtionate de sodium** et **acide amino G**) devaient être sélectionnés chacune des deux premières années du projet, 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 (**SBf2** et **SBf2bis**, voir ci-dessous).

Pour la 3^{ème} série d'analyses (3^{ème} année du projet), 4 nouveaux produits ont été fournis par Art E'Color : **pyranine** (ou jaune pyracide G, sel trisodique d'acide 8-hydroxy-1,3,6-pyrenétrisulfonique), **tinopal CBS-X** (4,4'-Bis(2-sulfostyryl)-1,1'-biphényl), **PTSA** (sel tétrasodique d'acide 1,3,6,8-pyrenététrasulfonique, CAS 59572-10-0) et **riboflavine-5'-phosphate E101(ii)** (sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate, CAS 130-40-5, qui est un additif alimentaire utilisé comme colorant jaune ; la riboflavine ou lactoflavine, 7,8-diméthyl-10-((2R,3R,4S)-2,3,4,5-tétrahydroxypentyl)benzo[g]ptéridine-2,4-(3H,10H)-dione, CAS 83-88-5, est le colorant E101(i), et également la vitamine B2).

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** : naphtionate de sodium ; **AG** : acide amino G ; **P** : pyranine ; **T** : tinopal ; **PT** : PTSA ; **R** : riboflavine), 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.

D'autres produits issus du premier projet ont été partiellement 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** : naphtionate de sodium ; **AG** : acide amino G), poudre, Série N°1, pour les produits achetés pour le premier projet.

TCUp1 = Traceur CETRAHE, Uranine (**N** : naphtionate 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** : naphtionate 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.

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 | | Ea2 |
| | | | SP14005283 | 23/04/2019 | 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 |
| | Sulforhodamine B | Acid Red 52 | SI/075/08/22 | | SBf2 |
| | | | 845/22-23 | 24/04/2023 | SBf2bis |
| | Sulforhodamine G | Acide Red 50 | 32/01 | 16/03/2022 | SGf1 |
| | | | 15/01 | 02/11/2022 | SGf2 |
| | Naphtionate de sodium | | 403 | 03/02/2023 | NSf2 |
| Acide amino G | | 0023392120 | AGf2 | | |
| 3^{ème} série | | | | | |
| Art E'Color | Pyranine | Pyracide Jaune G | FG/21-22/1189 | | Pa1 |
| | Tinopal | Azurant optique CBS-X | 1012577703 | | Ta1 |
| | PTSA | | FG/21-22/1822 | 30/03/2022 | PTa1 |
| | Riboflavine-5'-phosphate E101 (ii) 75% | | 020121Z | 07/03/2022 | Ra1 |

Les **agents antimousse** qu'Art E'Color se proposait 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 | - |
| | Pyranine | Pa1 | Teneur en Solvent Green 7 ≥ 77 % w/w Teneur en eau / humidité ≤ 7 % w/w Teneur en NaCl ≤ 14 % w/w Teneur en Na ₂ SO ₄ ≤ 2 % w/w Teneur en aluminium ≤ 100 mg/kg Teneur en antimoine ≤ 10 mg/kg Teneur en arsenic ≤ 1 mg/kg Teneur en baryum ≤ 25 mg/kg Teneur en bore ≤ 25 mg/kg Teneur en cadmium ≤ 1 mg/kg Teneur en chrome III ≤ 25 mg/kg Teneur en cobalt ≤ 2,6 mg/kg Teneur en cuivre ≤ 10 mg/kg Teneur en plomb ≤ 2 mg/kg Teneur en manganèse ≤ 25 mg/kg Teneur en zinc ≤ 50 mg/kg Teneur en nickel ≤ 10 mg/kg Teneur en sélénium ≤ 10 mg/kg Teneur en strontium ≤ 100 mg/kg Teneur en étain ≤ 10 mg/kg Solubilité dans l'eau : 26 % | 5-7 (solution à 1%) |
| Tinopal | Ta1 | Densité (vrac, à 20°C) ≈ 550-670 g/L Taux d'humidité ≤ 2 % Matières non volatiles ≥ 99,5 % Solubilité dans l'eau ≈ 25 g/L à 30°C | Environ 7-9 à 20°C en solution aqueuse à 1 g/L | |
| PTSA | PTa1 | Teneur ≥ 85,00 % w/w Matières volatiles à 135°C, et chlorures & sulfates de sodium (en sels) ≤ 15,00 % w/w dont matières volatiles à 135°C : 5-9 % Densité apparente : 0,65-0,75 Arsenic ≤ 3 mg/kg Cadmium ≤ 1 mg/kg Plomb ≤ 10 mg/kg Mercure ≤ 1 mg/kg | - | |

| Suite du 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 | Riboflavine-5'-phosphate | Ra1 | Teneur en riboflavine : 73-79 % Teneur en riboflavine 5'-phosphate : ≥ 95 % Taux d'humidité : 5,80 % Phosphate inorganique ≤ 1 % Cendres sulfatées ≤ 25 % Colorants subsidiaires ≤ 6 % Teneur en arsenic < 3 mg/kg Teneur en plomb < 2 mg/kg Teneur en mercure < 1 mg/kg Teneur en cadmium < 1 mg/kg | 5-6,5 (solution à 2%) |
| 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-naphtylamine : 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'urarine, l'acide amino G et le tinopal, 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), celle-ci a été réalisée par ajustement préalable de l'eau ultrapure à pH ≥ 8 à l'aide d'un tampon Tris-HCl (Chlorhydrate de Tris 1 M, pH 8,0 de Fisher Bioreagents ; voir Smart & Laidlaw 1977 pour l'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du pH de l'urarine et de l'acide amino G, Käss 1998 pour celle de l'urarine et du tinopal, Leibundgut *et al.* 2009 pour celle de l'urarine, et les trois mêmes références ainsi que Drössler *et al.* 2002, et Wang *et al.* 2021, pour l'absence de variation significative de l'intensité de fluorescence de tous les autres traceurs étudiés dans la gamme de pH allant de celui de l'eau ultrapure à celui de l'eau naturelle utilisées). Dans le cas de la pyranine, dont le comportement est plus complexe en fonction du pH (Käss 1998, Nandi & Amdursky 2022), et est discuté plus loin dans le texte, la mise en solution a été réalisée avec de l'eau ultrapure ajustée à pH 9 à l'aide d'un tampon Tris(hydroxyméthyl)aminométhane 1M, pH 9,0, de Thermo Fisher Scientific.

L'eau naturelle utilisée pour les expériences de suivi du comportement des traceurs en présence d'une charge bactérienne 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 l'ordre de 100 h ; 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 O₂ dissous des eaux émergeant au Bouillon (Albéric & Lepiller 1998 ; en l'absence d'activité biologique, teneur en O₂ 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 R² 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 O₂ 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 O₂ de l'eau naturelle utilisée pour nos expériences doivent donc témoigner qu'elle contenait une charge bactérienne également proche des maximums annuels, bien que probablement légèrement inférieure, la teneur en O₂ 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 t₀, 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.

La 3^{ème} année du projet (2024), l'eau de la source du Bouillon a été prélevée le 8 juillet, et ses teneur en O₂ dissous (9,0 %) et température (16,7 °C) étaient également proches des valeurs mesurées par Livrozet (1984) pendant la période de plus forte charge bactérienne de son étude.

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, de l'acide amino G, de la pyranine et du tinopal, 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 1), 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, qui présente 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 308 nm, d'intensité plus forte que celui à 355 nm, a été retenu pour ce projet (Annexe 1).

Les analyses ont été réalisées grâce à 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), 10 et 25 µg/L (pour les autres traceurs sauf la

riboflavine), et 25 et 1 000 µg/L pour la riboflavine (la très faible puissance de fluorescence de ce traceur ayant rendu impossible son étude dans les mêmes conditions que les autres, voir 3.1.3.10), et 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 prend 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, l'acide amino G, la pyranine et le tinopal, de l'eau à pH ajusté à 8 ou 9 par les tampons Tris (voir plus haut), 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 analysés lors du premier projet

À la suite des mesures d'intensité de fluorescence à t_0 effectuées pour ces autres traceurs (uranine, éosine, sulforhodamines B et G, naphthionate de sodium ; 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 (pour les traceurs étudiés au cours du 1^{er} projet : Défarge *et al.* 2020), 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, enfin 6 mois, selon les traceurs. 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.

2.2.4.4. Stabilité des traceurs non analysés lors du 1^{er} projet

Au cours de la troisième année de l'étude, les quatre traceurs concernés (pyranine, tinopal, PTSA et riboflavine) ont été suivis pendant 6 mois pour évaluer à la fois leur comportement à la lumière et en fonction de la température (tests comparables à ceux réalisés sur les 6 autres traceurs lors du 1^{er} projet : Défarge *et al.* 2020), et en présence d'eau naturelle (tests réalisés sur les 6 autres traceurs au cours de la 2^{ème} année du présent projet : voir 2.2.4.3).

Cinq solutions de chacune des deux concentrations de 10 et 25 µg/L (pour les trois premiers traceurs), ou 25 et 1 000 µg/L (pour la riboflavine ; voir 2.2.3), ont été préparés pour chaque traceur, quatre avec de l'eau ultrapure (à pH ajusté à l'aide de tampons Tris-HCl dans le cas de la pyranine et du tinopal, voir plus haut), un avec l'eau naturelle de la source du Bouillon. Après mesure de l'intensité de fluorescence à t_0 (voir 2.2.3 ci-dessus), les solutions préparées avec l'eau ultrapure ont été divisées en 4 aliquotes qui ont été placées dans les 4 conditions différentes décrites ci-dessous (voir également Figure 1 dans Défarge *et al.* 2020), et les solutions préparées avec l'eau naturelle ont été placées à l'obscurité, à la température du laboratoire, aux côtés des solutions préparées dans l'eau ultrapure conservées dans ces conditions, sauf dans le cas de la riboflavine, pour laquelle un second aliquote a été également exposé à la lumière (en raison de premiers tests réalisés sur ce produit à la demande de Fluotechnik, qui avaient semblé démontrer une amplification de la photodégradation dans l'eau naturelle par rapport à l'eau ultrapure) :

- ▶ une 1^{ère} série d'aliquotes a été exposée, dans des fioles en verre blanc bouchées, à la lumière du jour au laboratoire pendant la journée et à la température du laboratoire jour et nuit ;
- ▶ la 2^{ème} a été placée à l'obscurité, à la température du laboratoire, dans une armoire thermostatée à l'arrêt ;
- ▶ la 3^{ème} au réfrigérateur ;
- ▶ la dernière à l'étuve à 40 °C.

Les aliquotes à l'obscurité, au réfrigérateur et à l'étuve ont été conservés dans des flacons en verre brun bouchés, tous ces échantillons étant évidemment protégés de la lumière dans toutes les conditions.

Des mesures d'intensité de fluorescence ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les solutions à t_0 , au bout d'1 ou 2 h, puis de 24 h, 3 ou 4 jours, 1 semaine, 2 mois, 4 mois et 6 mois, entre juillet 2024 et janvier 2025 (mai et décembre 2025 pour la seconde série que nous avons dû faire pour le PTSA, voir plus loin).

Pour un même traceur, toutes les mesures de fluorescence de tous les produits, pour toutes les concentrations et toutes les expositions, ont été réalisées à la suite dans les mêmes conditions instrumentales, dans un laps de temps maximum de 2 h. Sauf pour les mesures au bout d'1 ou 2 h, les solutions au réfrigérateur et à l'étuve ont été laissées à température ambiante une demi-heure avant de réaliser les analyses. Au bout de 6 mois, les analyses ont été refaites après retour complet de ces solutions à température ambiante. Ces solutions ont été conservées continuellement à l'obscurité, comme les aliquotes 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. 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 2.1.3), ainsi qu'un blanc sur de l'eau ultrapure fraîche. Des échantillons d'eau ultrapure et d'eau naturelle conservés avec les solutions de traceurs ont été analysés en parallèle, de façon à surveiller l'éventuelle évolution de l'intensité de fluorescence de ces eaux elles-mêmes avec le temps, jusqu'à 6 mois. Les mesures sur chaque échantillon ont été répétées 3 fois.

Au bout des 6 mois d'expériences, une nouvelle caractérisation spectrale des produits dans les mêmes conditions qu'au départ (voir 2.2.2) a été réalisée sur les aliquotes à 10 µg/L conservés à la lumière (pour ceux dont les traceurs n'avaient pas été entièrement détruits par celle-ci) et à l'obscurité, grâce au spectrofluorimètre Hitachi F2500, de façon à détecter une éventuelle évolution qualitative des traceurs 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, puis, à partir de 2023, par chauffage à 105 °C pendant 24 h en étuve Memmert.

2.3.2. Développement de méthodes HPLC/DAD

Sept méthodes ont dû être développées : la première pour l'uranine et l'éosine ; la seconde pour les sulforhodamines B et G ; la troisième pour l'acide amino G et le naphthionate de sodium ; les quatre autres pour chacun des traceurs analysés la 3^{ème} année du projet (pyranine, tinopal, PTSA, riboflavine). Les procédures d'analyse par HPLC sont détaillées en Annexes 2 à 8 (voir 6. Sigles & Abréviations pour celles incluses dans cette section).

Les chromatogrammes des solutions étalons sont donnés dans les Figures 1 à 11 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. Le pic de pyranine est présent à 2,3 min (Figure 7). Le tinopal est présent à 8,3 min (Figure 8). Le PTSA est présent à 1,5 min (Figure 9). La riboflavine et la riboflavine phosphate peuvent être analysées simultanément, leurs pics étant présents à 23,5 min, et 17 min (pic majoritaire), respectivement (Figures 10 et 11).

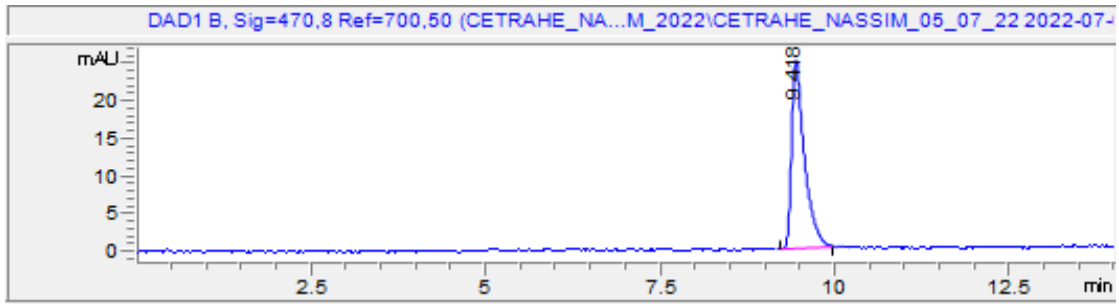


Figure 1 : Chromatogramme de l'uranine à 470 nm.

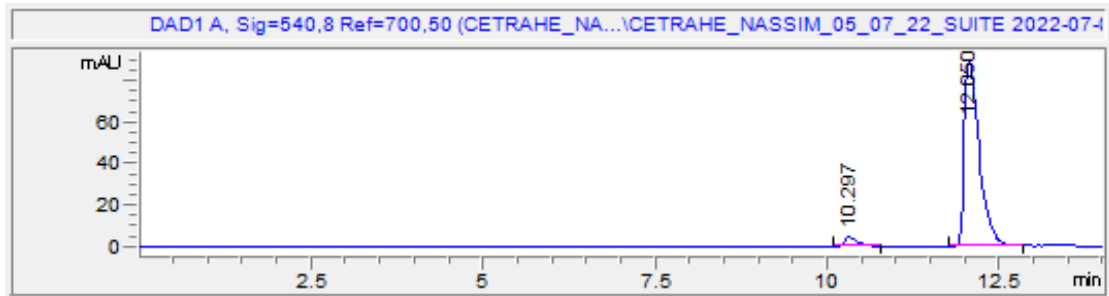


Figure 2 : Chromatogramme de l'éosine à 540 nm.

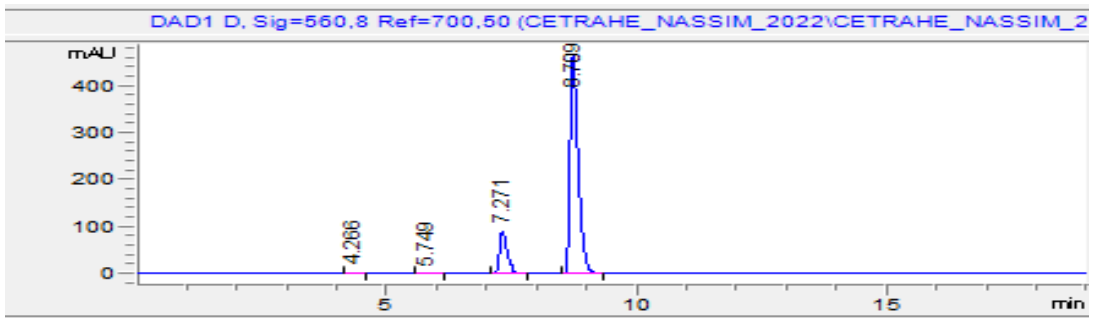


Figure 3 : Chromatogramme de la sulforhodamine B à 560 nm.

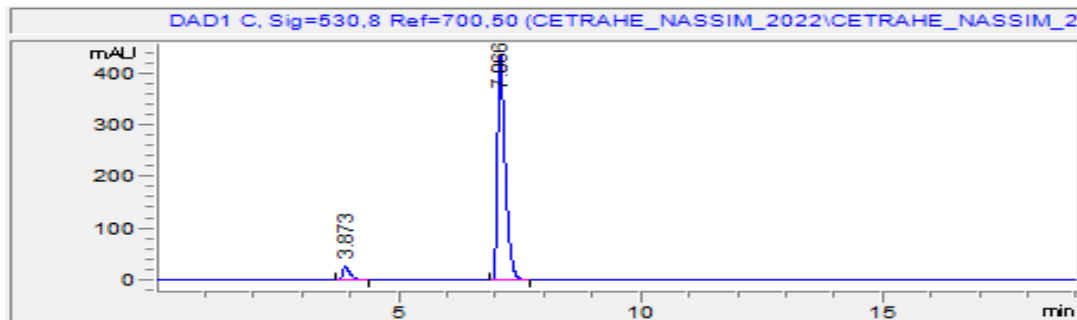


Figure 4 : Chromatogramme de la sulforhodamine G à 530 nm.

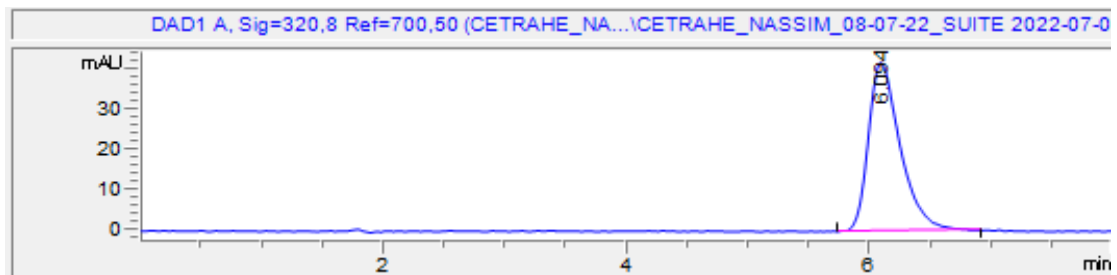


Figure 5 : Chromatogramme du naphionate de sodium à 320 nm.

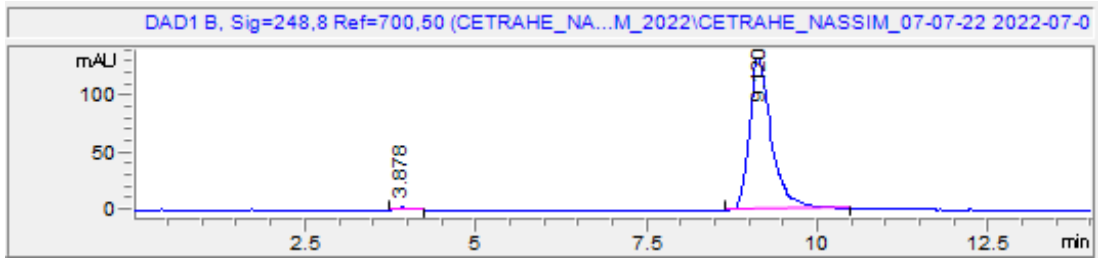


Figure 6 : Chromatogramme de l'acide amino G à 248 nm.

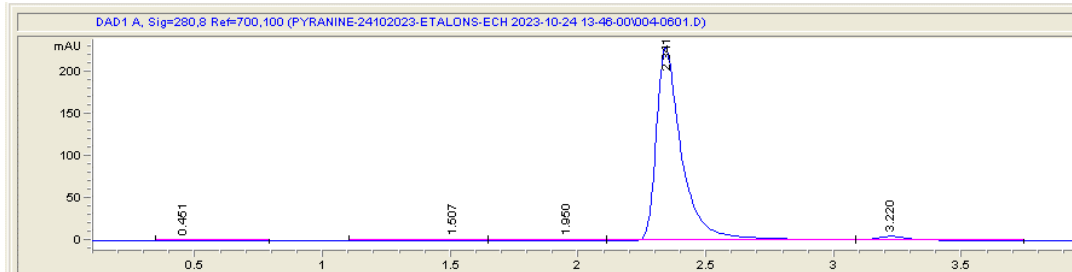


Figure 7 : Chromatogramme de la pyranine à 280 nm.

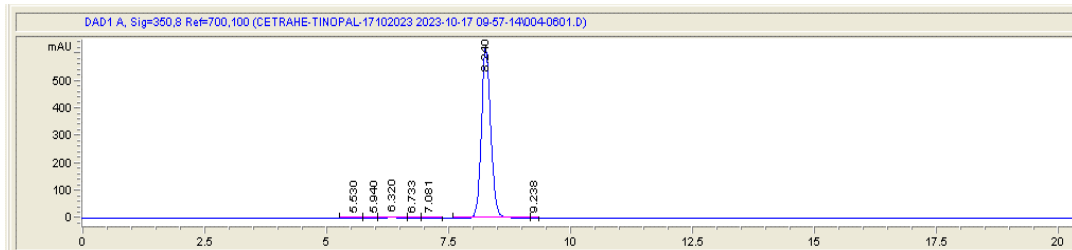


Figure 8 : Chromatogramme du tinopal à 350 nm.

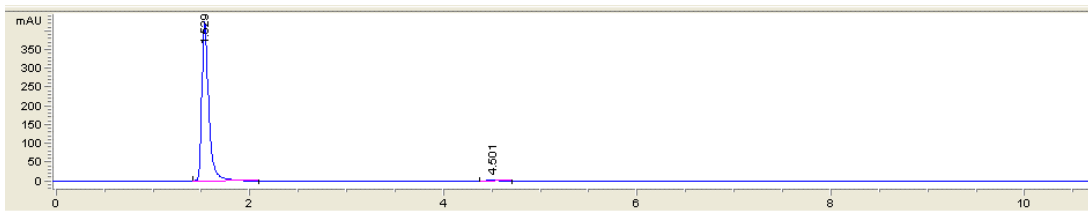


Figure 9 : Chromatogramme du PTSA à 280 nm.

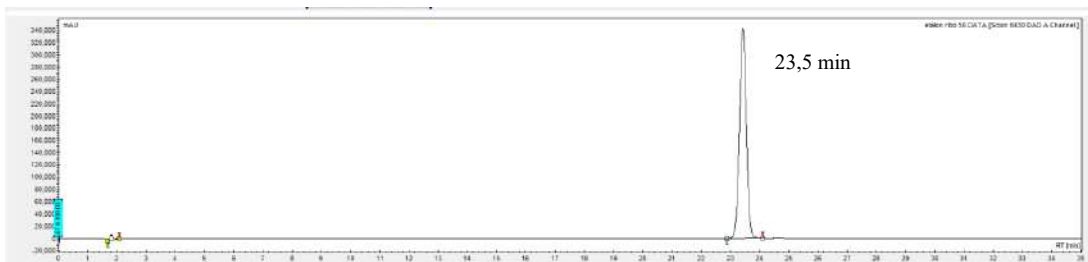


Figure 10 : Chromatogramme de la riboflavine à 270 nm.

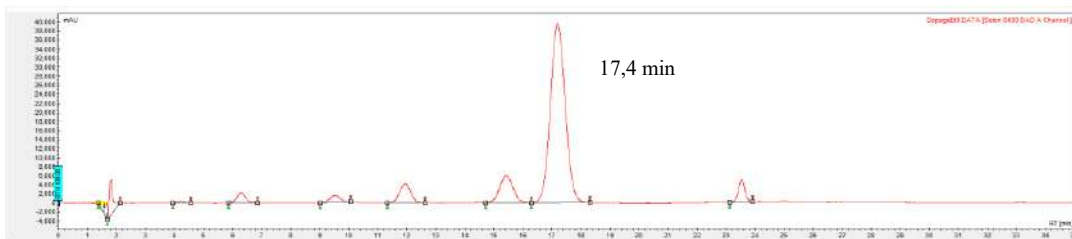


Figure 11 : Chromatogramme de la riboflavine phosphate à 270 nm.

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.

| | 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 % |
| <i>Données obtenues au cours du présent projet</i> | | PYRANINE | TINOPAL | PTSA | RIBOFLAVINE | RIBOFLAVINE PHOSPHATE |
| Linéarité (R ²) | | 0,9991 | > 0,9992 | 0,9998 | > 0,999 | > 0,999 |
| Répétabilité analyse étalon CV (%) | | < 0,5 % | < 0,5 % | < 0,5 % | < 1 % | < 1 % |
| Justesse (écart relatif %) | | < 4,4 % | < 2,1 % | < 4,1 % | < 5 % | < 5 % |

Les données pour les 6 premiers traceurs sont tirées de Défarge et al. (2020).

2.3.3. Détermination de la teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche des poudres a d'abord été déterminée à l'aide d'une thermobalance de marque Mettler Toledo. La pesée était de 0,2 g puis l'échantillon était porté à 150 °C pendant 30 min, à la suite de quoi on procédait à une nouvelle pesée. À partir de 2023, le séchage a été réalisé dans une capsule en aluminium contenant 0,2 g d'échantillon chauffée en étuve pendant 24 h à 105 °C. La masse d'eau évaporée est évaluée par pesée. La thermobalance est plus indiquée lorsque les teneurs en eau sont importantes (10 % et plus). La technique par chauffage en étuve est plus précise, quelle que soit la teneur en eau à analyser.

2.3.4. 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 ; voir 6. Sigles & Abréviations pour celles incluses dans cette section) 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. Les méthodes d'analyse sont détaillées en Annexe 9.

2.3.5. 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 traceurs et 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 (voir 6. Sigles & Abréviations pour celles incluses dans cette section) 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 9. Des particules difficilement solubles de sulforhodamine G ont été analysées par LC-MS sur un appareil haute résolution de type Orbitrap (voir méthode détaillée en Annexe 10).

► Identification des métaux par ICP-AES et ICP-MS. Afin de préciser la composition des sulforhodamines B et G, des métaux ont été recherchés par ICP-MS, puis quantifiés. La présence de certains métaux semblant anormale, un autre type de détecteur (ICP-AES, détecteur optique) a été utilisé. Ainsi, la présence de ces métaux dans la sulforhodamine G a été confirmée. La méthodologie est décrite en Annexe 11.

► Recherche d'ions chlorure et sulfate par chromatographie anionique. Pour aller plus loin dans la détermination de la composition des sulforhodamines G, les ions chlorures et sulfates ont été recherchés. La méthode est détaillée en Annexe 12.

► Analyse par spectrométrie de masse sous ionisation laser (LDI) sur un appareil de type TIMS-TOF pour l'identification des particules insolubles de SGf1 (voir méthode détaillée en Annexe 13).

2.3.6. Analyses complémentaires de la riboflavine et de l'éosine

La riboflavine phosphate et l'éosine ne sont pas des produits purs et comportent plusieurs composés ; ceux-ci ont été identifiés en LC-MS (les méthodes d'analyse sont détaillées en Annexe 10).

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 une fois mis 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, ainsi que la pyranine sélectionnée par Art E'Color (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). La poudre de tinopal s'est également avérée être hygroscopique (Tableau 4).

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. La 3^{ème} année, où l'on ne disposait que d'un seul produit par traceur, les composants des poudres influencent également significativement la CE des solutions préparées avec l'eau ultrapure, ainsi que de celles préparées avec l'eau naturelle dans le cas de la pyranine et du PTSA, tandis que les eaux naturelle et tamponnées imposent globalement leurs CE et pH à toutes les solutions (Tableau 4).

En ce qui concerne le pH des solutions préparées avec les différents types d'eau les deux dernières années, 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, de la pyranine et de la riboflavine conduit à une baisse

du pH à la fois par rapport à l'eau naturelle et à l'eau ultrapure (Tableau 4), ces traceurs ayant un pH acide à neutre en solution (Tableau 2) ; l'acide amino G conduit également à une baisse du pH par rapport aux eaux naturelle et ultrapure, qui est empêchée par l'effet du tampon (Tableau 4) ; la mise en solution du PTSA se traduit par une augmentation du pH, légère dans le cas de l'eau naturelle, plus marquée dans le cas de l'eau ultrapure (de 5,82 à 6,34 ; Tableau 4), aucune donnée de pH n'étant incluse dans les fiches des fournisseurs dans son cas (Tableau 2) ; la mise en solution du tinopal (de pH neutre : Tableau 2) a peu d'effet sur le pH des solutions (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 utilisée | pH | pH eau ultrapure utilisée | Observations particulières | |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------|---------------------------|---|--|
| 1^{ère} série | | | | | | |
| Ua1 | 2 130 | 2080 | 7,92 | 7,96 | Eau ultrapure tamponnée | |
| 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 Poudre très noire | |
| SBf1 | 57 | | 5,78 | | | |
| SGa1 | 17 | 1 | 5,35 | 5,54 | Léger dépôt sur les bords du bécher, solution trouble Léger dépôt sur le fond au départ, solution moins trouble que SGa1 | |
| SGf1 | 96 | | 5,40 | | | |
| 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. Eau ultrapure tamponnée Eau ultrapure tamponnée | |
| 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 | |

Suite du Tableau 4 (Bilan des analyses qualitatives, et de CE et pH à 0,1 g/L pour les produits traceurs) : 2^{ème} série

| REFERENCE PRODUIT | Type d'eau | CE à 25 °C µS/cm | CE eau | pH | pH eau | Observations particulières |
|-------------------|--------------------------|------------------|--------|------|--------|----------------------------------|
| 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 | * CE très peu stable (1870-1910) |
| AGf2 | | 1892* | | 7,87 | | |

3^{ème} série

| REFERENCE PRODUIT | Type d'eau | CE à 25 °C µS/cm | CE eau | pH | pH eau | Observations particulières |
|-------------------|-------------------------|------------------|--------|------|--------|--|
| Pa1 | Eau naturelle | 385 | 339 | 7,48 | 7,52 | Quelques grumeaux dans la poudre |
| | Eau ultrapure | 74 | 3 | 5,49 | 5,95 | |
| | Eau ultrapure tamponnée | 1991 | 1910 | 8,86 | 8,86 | |
| Ta1 | Eau naturelle | 330 | 327 | 7,74 | 7,71 | Poudre hygroscopique Mousse et films blanchâtres avec eau naturelle Couleur bleutée (eau tamponnée), verte (eau naturelle) et vert plus clair (eau ultrapure) |
| | Eau ultrapure | 37 | 12 | 5,79 | 5,82 | |
| | Eau ultrapure tamponnée | 5230 | 5210 | 8,03 | 7,99 | |
| PTa1 | Eau naturelle | 368 | 327 | 7,73 | 7,71 | - |
| | Eau ultrapure | 78 | 12 | 6,34 | 5,82 | |
| Ra1 | Eau naturelle | 338 | 339 | 7,46 | 7,52 | - |
| | Eau ultrapure | 21 | 3 | 5,73 | 5,95 | |

On a porté en face de chaque produit la CE et le pH de l'eau (ultrapure pour les 3 séries, naturelle pour les deux dernières séries uniquement) ayant servi aux mises en solution. Pour l'uranine, l'acide amino G, la pyranine et le tinopal, on a également utilisé une eau à pH ajusté par des tampons (voir 2.2).

Pour les solutions préparées à partir d'eau ultrapure non tamponnée, on peut faire les observations complémentaires 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 µS/cm : Tableau 4), celles du produit **F1Ep3** étant par ailleurs conformes à la valeur obtenue lors du premier projet (38 µS/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 µS/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 µS/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).

► Tinopal. Ce traceur (ou au moins, le produit sélectionné) a un effet, unique parmi tous ceux étudiés, sur la couleur des solutions préparées, qui est différente selon le type d'eau utilisée, ainsi que sur la formation de mousse et de films blanchâtres dans l'eau naturelle (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 1. Ils sont conformes à ceux obtenus lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), pour les points suivants :

- **Aucun autre composé fluorescent que le traceur vendu n'a été, dans chaque cas, identifié dans les produits analysés (à la possible exception de la riboflavine, voir ci-dessous).**
- **L'analyse de la forme des pics n'a par ailleurs montré aucune anomalie particulière qui pourrait traduire la présence de sous-produits parasites.**

Les maximums d'excitation et d'émission sont également conformes aux données de la littérature pour les 6 traceurs analysés lors du premier projet, ainsi que pour le tinopal (Annexe 1).

Le cas de la **pyranine** est un peu à part, en raison des variations de ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission, maximums comme secondaires, en fonction du pH, avec 5 domaines distincts (Käss 1998, voir Annexe 1). Considérant le pH de la solution à 0,1 g/L de ce traceur (5,49 : Tableau 4), et celui de l'eau ultrapure utilisée pour la fabriquer et la diluer à 10 µg/L, concentration à laquelle la caractérisation spectrale a été réalisée (5,95 : Tableau 4), on peut supposer que cette dernière solution avait un pH compris entre 5,5 et 6, et donc que les maximums d'excitation et d'émission du produit analysé sont bien conformes à la littérature dans ce domaine de pH (405, et 512 nm, respectivement : Annexe 1).

Les caractéristiques spectrales que nous avons mises en évidence pour le **PTSA** ont été obtenues lors de deux séries de mesures, le premier suivi de l'évolution de l'intensité de fluorescence avec le temps du pic choisi pour le réaliser ayant donné des résultats étonnants (voir section 3.1.4.9). L'obtention d'un spectre par double balayage en excitation entre 250 et 620 nm, et émission entre 300 et 650 nm (voir section 2.2.2), s'étant avéré impossible (le nombre de points générés par la matrice Ex/Em pour une plage de longueurs d'onde aussi étendue dépasse le seuil autorisé par le logiciel), on a dans un premier temps réduit les fourchettes entre 320 et 620 nm, et 350 et 650 nm, respectivement, en nous basant sur les données disponibles dans la littérature (assez disparates, voir plus bas). On a alors mis en évidence une série de pics proches assez forts mais mal définis car situés dans le domaine du pic Rayleigh de l'eau (350/403, 370/403, et 355/385 nm, respectivement), avec un pic secondaire à 515/537 nm (Annexe 1), lequel a été d'abord choisi pour réaliser toutes les mesures d'intensité de fluorescence. Aucun pic n'étant présent dans le domaine des plus fortes longueurs d'onde, on a procédé, au bout des 6 mois de suivi, et sur une solution fraîche à 10 µg/L, à l'acquisition d'un nouveau spectre en déplaçant les fourchettes vers les faibles longueurs d'onde (entre 250 et 560 nm en excitation, et 300 et 580 nm en émission). On a alors retrouvé, dans le domaine du pic Rayleigh de l'eau, deux des trois pics identifiés dans le premier spectre (370/404, et 350/385 nm, respectivement), et deux pics supplémentaires (280/385, et 280/403 nm, respectivement) ; le pic secondaire distinct du pic Rayleigh de l'eau était cette fois-ci à 525/552 nm, contre 515/537 nm (Annexe 1).

Par comparaison avec la littérature consacrée au PTSA, laquelle concerne plutôt des applications de ce produit dans le domaine biologique ou des matériaux, et peu dans celui du traçage (seule l'étude de Wang *et al.* 2021 se rapporte à l'hydrogéochimie), nos résultats sont les seuls à avoir été obtenus par double balayage, sans choix a priori des longueurs d'onde d'excitation et/ou d'émission comme c'est le cas pour les autres études, qui diffèrent par ailleurs sensiblement entre elles : Chen *et al.* (2019) trouvent, pour un PTSA de synthèse, des maximums d'émission à 396 et 404 nm pour une excitation à 284 nm ; Jiao *et al.* (2020), de 388 et 407,5 nm, mais pour une excitation à 376 nm ; de Carvalho Bertozo *et al.* (2019), au cours d'expériences visant à étudier les interactions du PTSA et de l'albumine, ont utilisé pour caractériser le premier produit, une excitation à 360 nm et une émission entre 370 et 460 nm, ou à une valeur fixe de 385 nm ; Wang *et al.* (2021), dont le but était de mettre au point une méthode rapide de mesure de la concentration en ions ferriques en solution, basée sur leur capacité à modifier la fluorescence du PTSA, ont utilisé pour mesurer celle-ci une excitation à 350 nm, provoquant une émission à 385 nm. Nos analyses permettent de retrouver la plupart de ces pics, à l'exception des pics éloignés du domaine du pic Rayleigh de l'eau, et diffèrent pour partie entre le premier et le second spectre (Annexe 1). Étant donné, d'une part, que les pH des solutions à 0,1 g/L étaient distincts d'une série à l'autre (pH 6,34 pour la première, pour une eau ultrapure à 5,82, contre 5,71, et 5,40, respectivement, pour la seconde : Tableau 4), et d'autre part, que les formules chimiques du PTSA et de la pyranine, deux dérivés du pyrène, sont proches (Tableau 10), la diversité des pics observés entre auteurs et entre nos deux séries d'analyses pourrait être expliquée par le même type de variations des longueurs d'onde d'excitation et d'émission en fonction du pH (voir ci-dessus).

Le pic secondaire identifié dans le premier spectre avait les mêmes longueurs d'onde d'excitation et d'émission que l'éosine (voir Annexe 1). L'absence de composé complémentaire du PTSA dans la poudre (voir 3.2.1.2) et les vérifications faites au moment du suivi (voir 3.1.4.9) permettent d'écarter l'hypothèse de la présence de ce second traceur dans la poudre étudiée.

En ce qui concerne la **riboflavine**, le produit fourni par Art E'Color est le sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate (Tableau 1), pour lequel nous n'avons pu trouver de publication

scientifique donnant ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission dans l'eau, contrairement à la riboflavine, pour laquelle elles sont très abondantes. L'article le plus récent et complet de ce point de vue est Yang *et al.* (2016), dont l'analyse par double balayage en excitation-émission révèle trois pics à 270/525, 370/525 et 450/525 nm, avec des rapports d'intensité de 1, 0,41, et 0,25, respectivement. Dans le produit fourni par Art E'Color, nous retrouvons bien le pic à 370/525 nm, et deux autres pics, dont l'un correspond à la longueur d'onde d'excitation du pic principal de Yang *et al.* (2016 ; 273 nm au lieu de 270 nm), mais dont la longueur d'onde d'émission est très différente (329 au lieu de 525 nm : Annexe 1), et l'autre ne correspond en rien au 3^{ème} pic de Yang *et al.* (2016 : 524/546 au lieu de 450/525 nm, voir Annexe 1) ; ces deux derniers pics pourraient donc être dus aux autres constituants de la poudre fournie.

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, y compris la poudre de riboflavine fournie, à condition de choisir le bon couple de longueurs d'onde pour les analyses.

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, de l'acide amino G, de la pyranine et du tinopal, d'eau ultrapure à pH ajusté par tampon (voir 2.2). Les mesures d'intensité réalisées les 2^{ème} et 3^{ème} années de l'étude sur les solutions fabriquées à partir d'eau naturelle et, dans le cas de l'uranine, de l'acide amino G et du tinopal, d'eau ultrapure non tamponnée, sont présentées dans la section suivante (3.1.4), ainsi que dans l'Annexe 14.

Les mesures d'intensité de fluorescence réalisées sur des solutions de deux concentrations différentes de chaque produit traceur sont présentées dans les Figures 12 à 21 ci-dessous. Les résultats sont 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 12 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 12) 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.**

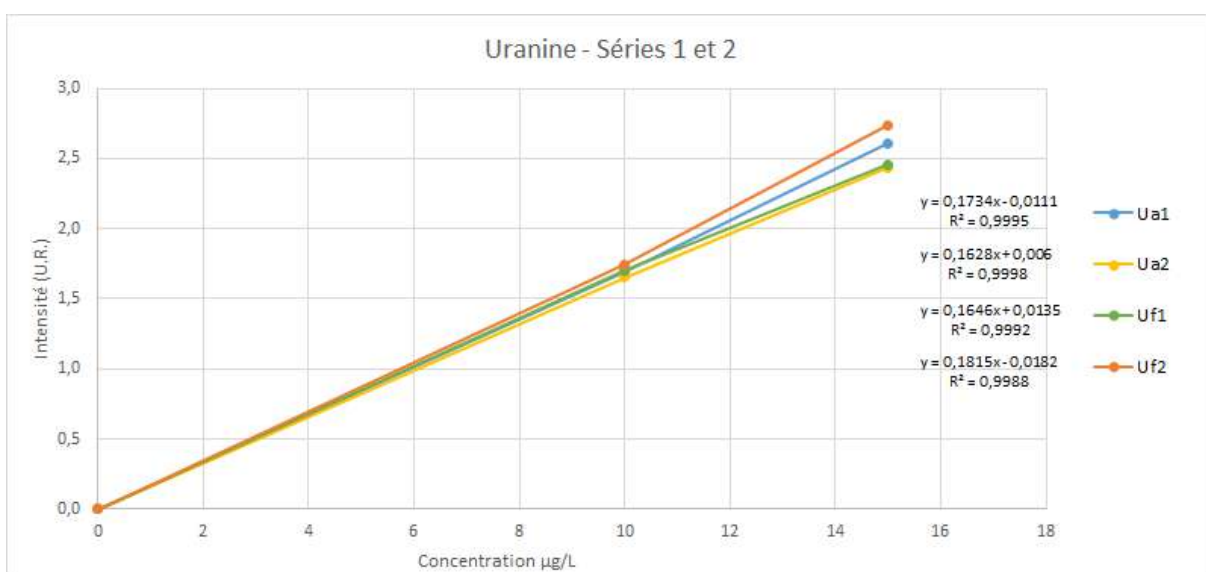
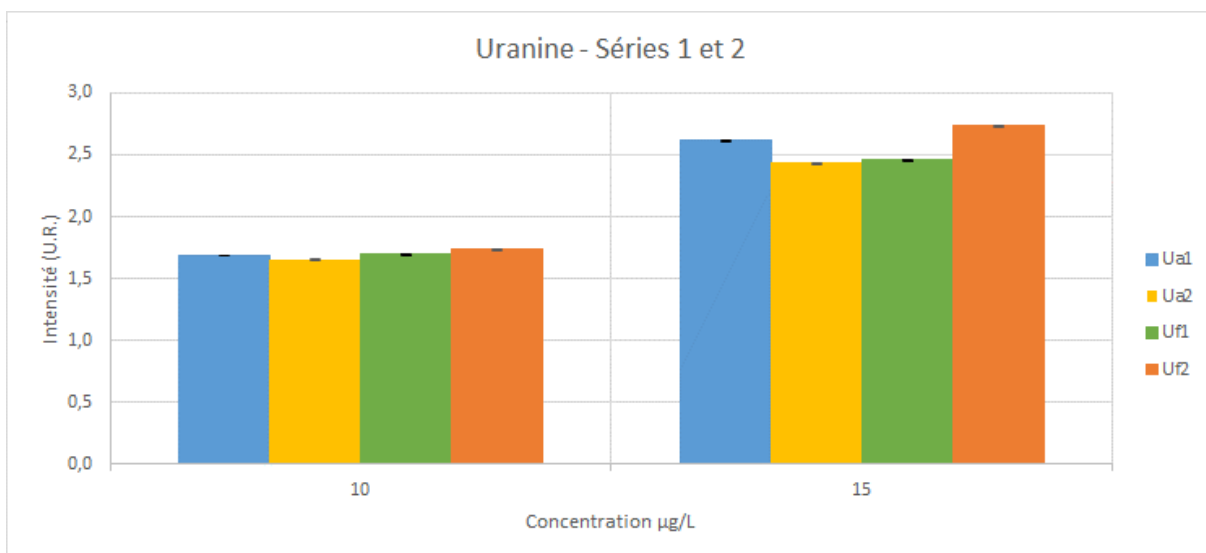


Figure 12 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'uranine étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque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

3.1.3.2. Eosine

Les résultats obtenus pour les éosines sont présentés dans la Figure 13 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).

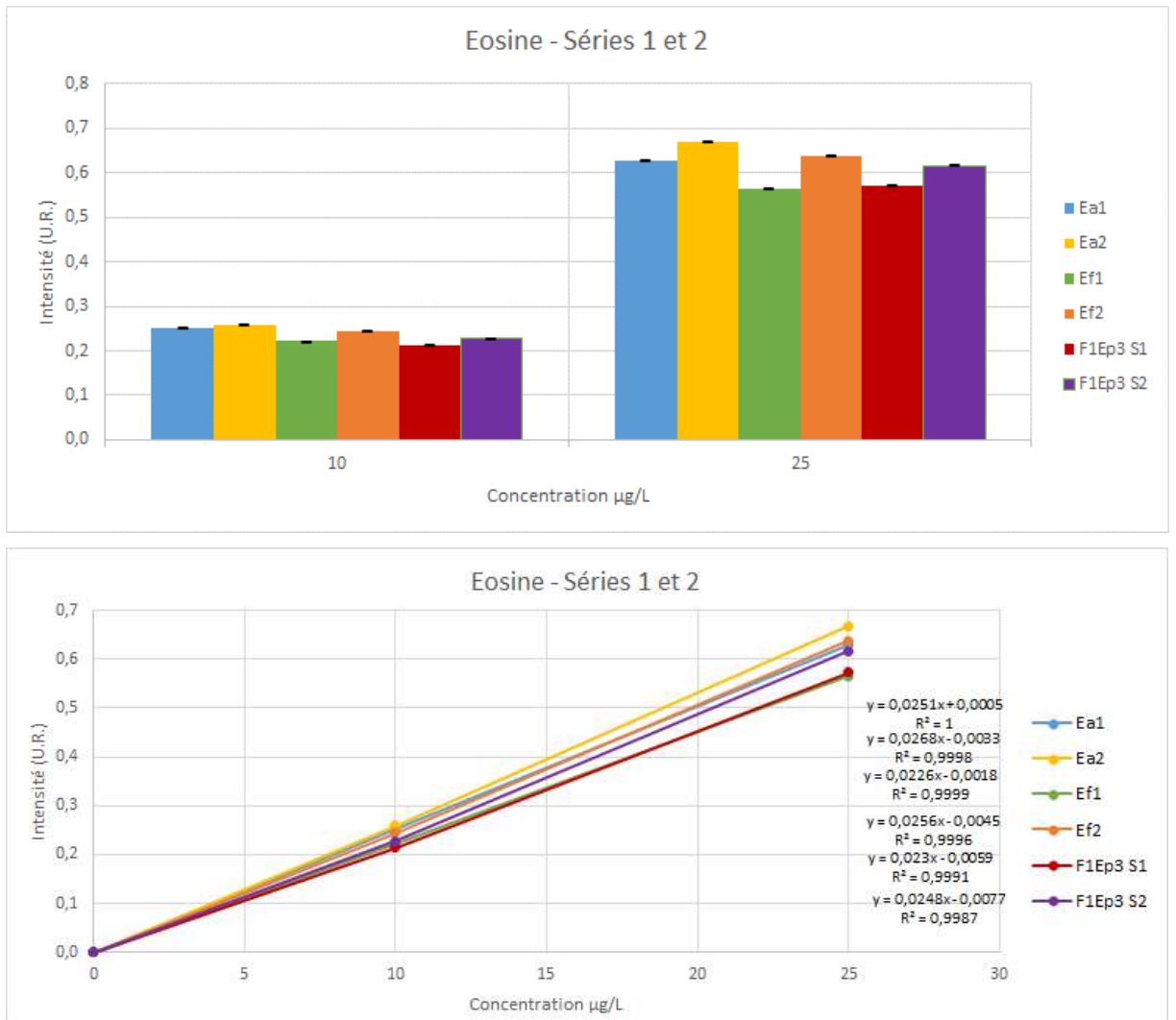


Figure 13 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'éosine étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque 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 13 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 14 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 R² 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 R² pour les deux produits (de 0,9970 à 0,9971 pour **SBa1** ; de 0,9831 à 0,9996 pour **SBf1**).

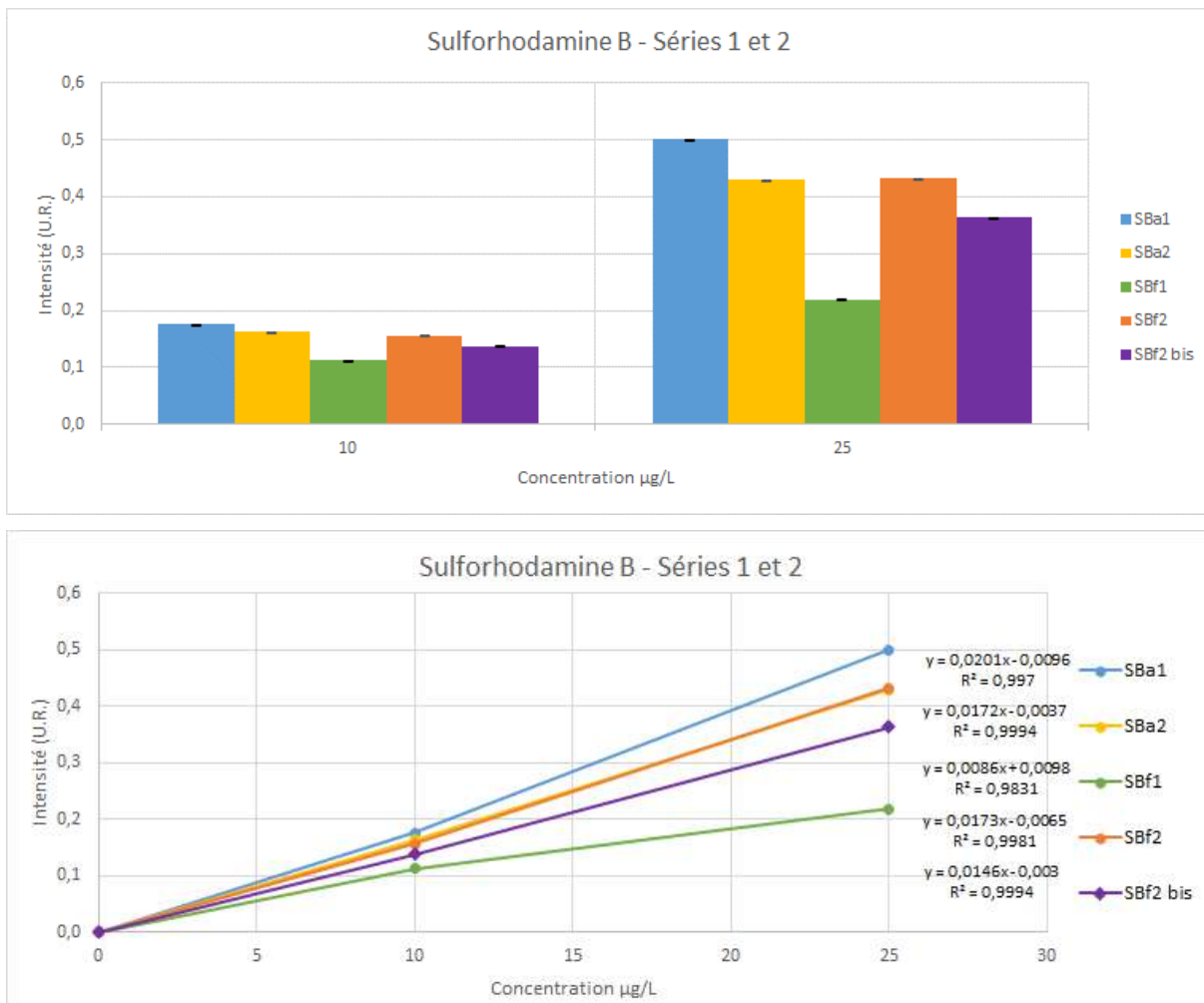


Figure 14 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine B étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; au centre et en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

L'ordre des intensités de fluorescence aux deux concentrations (10 et 25 µg/L : Figure 14) 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.

3.1.3.4. Sulforhodamine G

Les résultats obtenus pour les sulforhodamines G sont présentés dans la Figure 15 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 15). 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 15), comme c'était également le cas de leurs CE et pH en solution (Tableau 4).

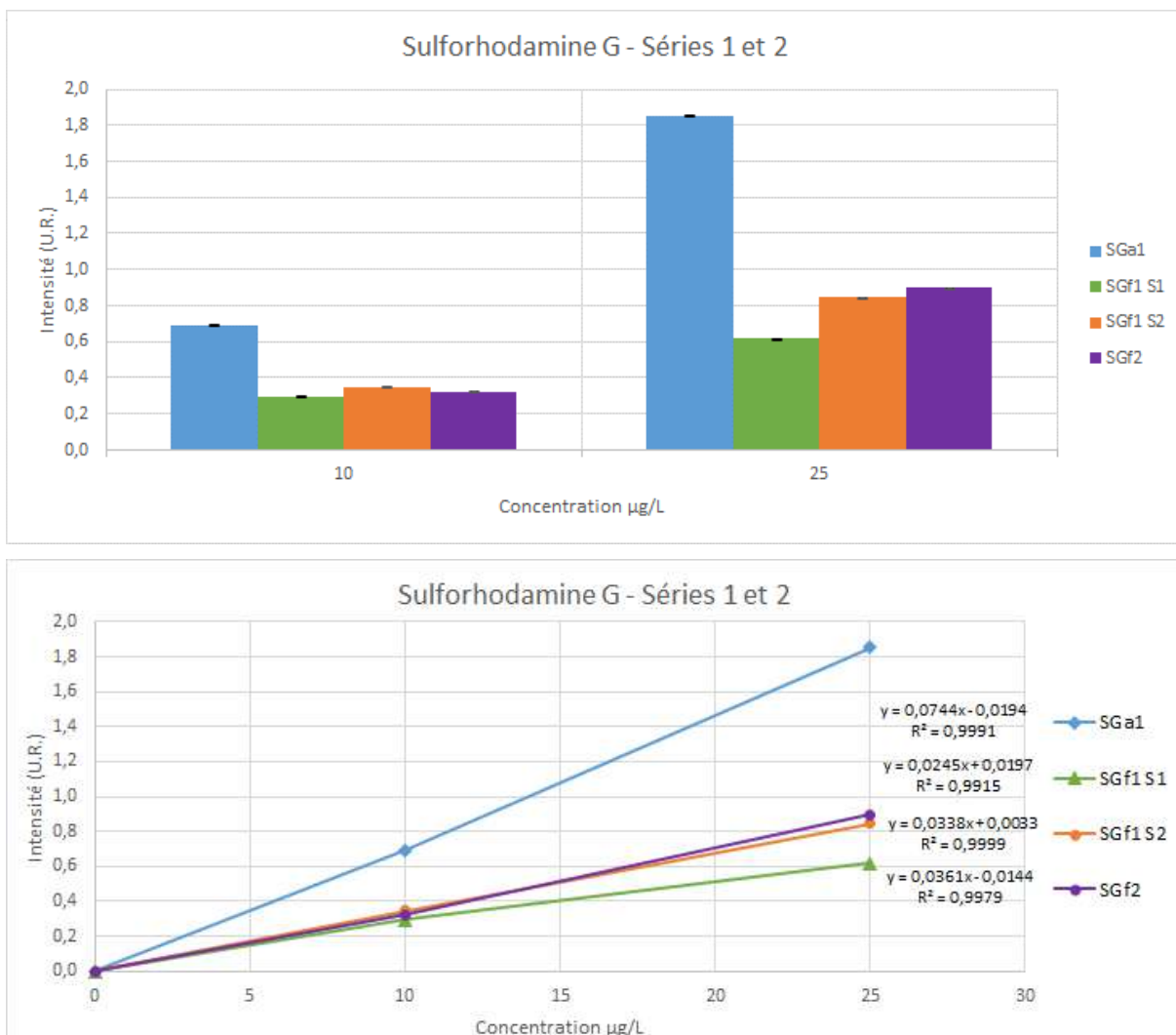


Figure 15 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine G étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; au centre et en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

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 15), 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 Fluotechnik (96 à 105 vs. 17 $\mu\text{S}/\text{cm}$: Tableau 4) seraient alors dues dans ce cas à la présence dans la poudre d'autres composants que le traceur.

Les intensités de fluorescence des produits Fluotechnik 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 15), 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 15), 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. Naphthionate de sodium

Les résultats obtenus pour les poudres de naphthionate de sodium sont présentés dans la Figure 16 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 16) ; c'était déjà le cas pour les produits analysés lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020).

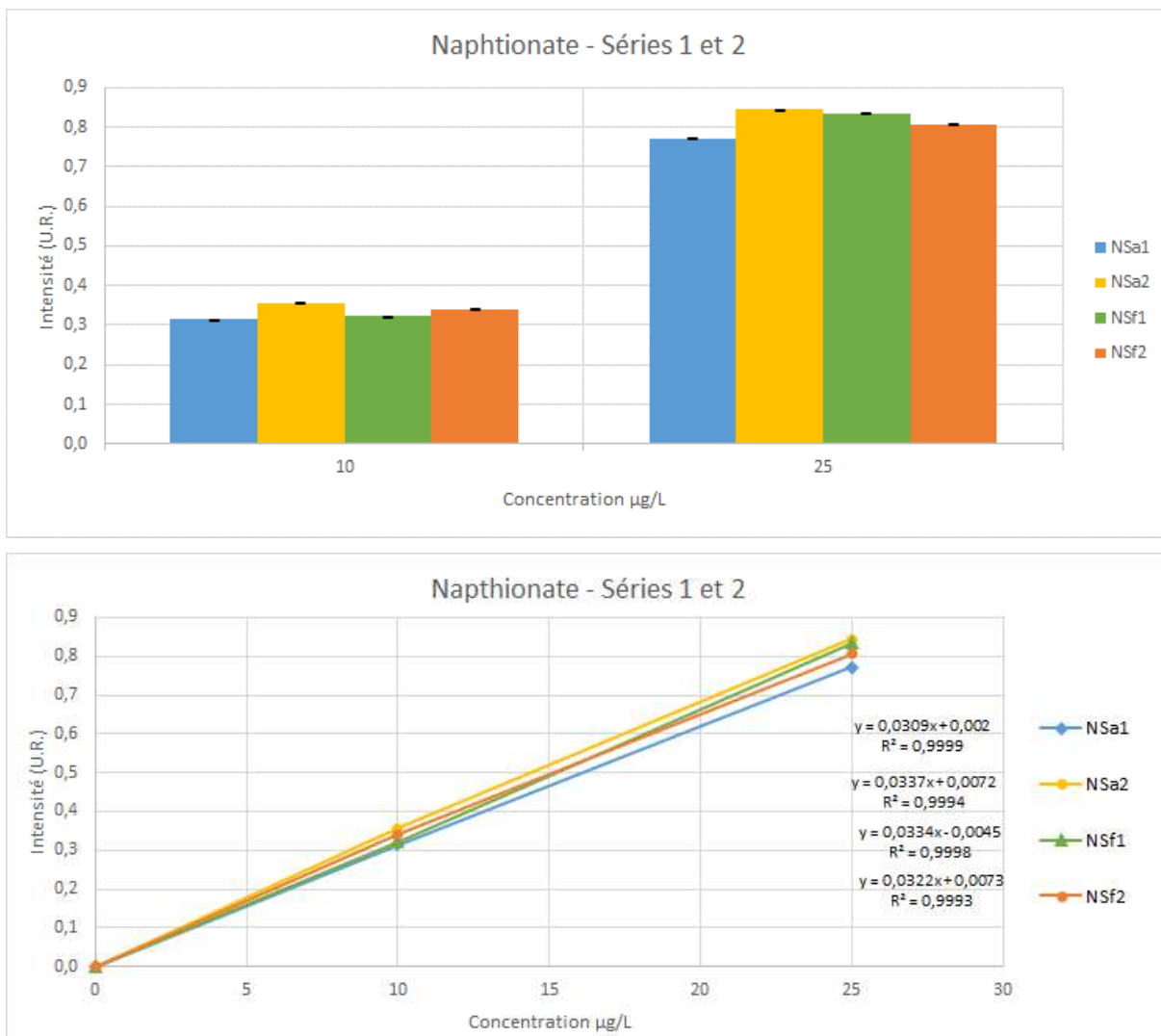


Figure 16 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de naphthionate de sodium étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration 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 17 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 17), 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 17), ce qui est cohérent avec leurs CE et pH en solution également très proches (voir Tableau 4).

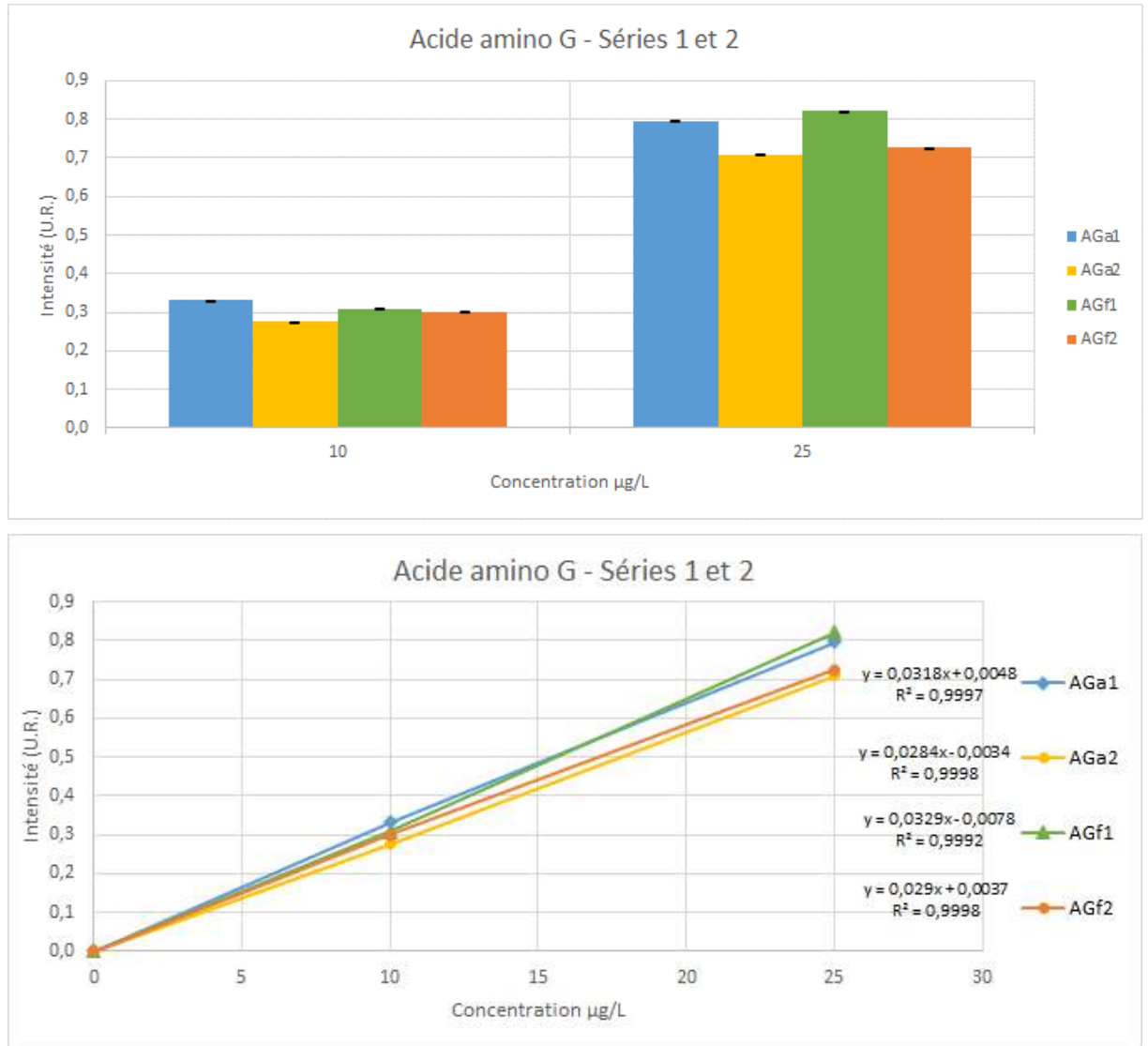


Figure 17 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'acide amino G étudiées. En haut intensités de fluorescence par produit et par concentration en solution ; en bas, évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration pour chaque produit.

3.1.3.7. Pyranine

Les résultats obtenus pour la pyranine **Pa1** sont présentés dans la Figure 18 ci-dessous. On constate une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution dans l'eau ultrapure. C'est également le cas pour les solutions préparées à partir d'eau naturelle (Annexe 14).

L'intensité de la solution dans l'eau ultrapure à pH ajusté s'étant avérée très inférieure (d'un facteur 2,7) à celle dans l'eau ultrapure aux longueurs d'onde déterminées par caractérisation spectrale (en raison du caractère photoacide de ce traceur : voir sections 3.1.2, et plus loin 3.1.4.7), on n'en présente pas les résultats dans ce rapport.

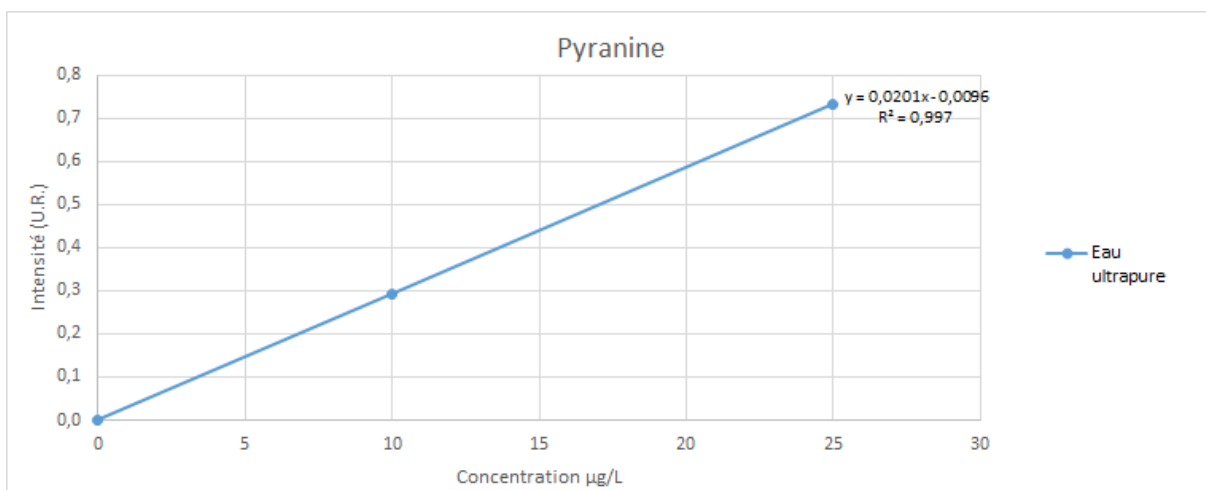


Figure 18 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à pH ajusté à 9 à partir de la poudre de pyranine étudiée (Pa1).

3.1.3.8. Tinopal

Les résultats obtenus pour le tinopal **Ta1** sont présentés dans la Figure 19 ci-dessous. On constate une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution dans l'eau ultrapure à pH ajusté à 9 par tampon Tris-HCl.

C'est également le cas pour les solutions préparées à partir d'eau ultrapure et d'eau naturelle (Annexe 14).

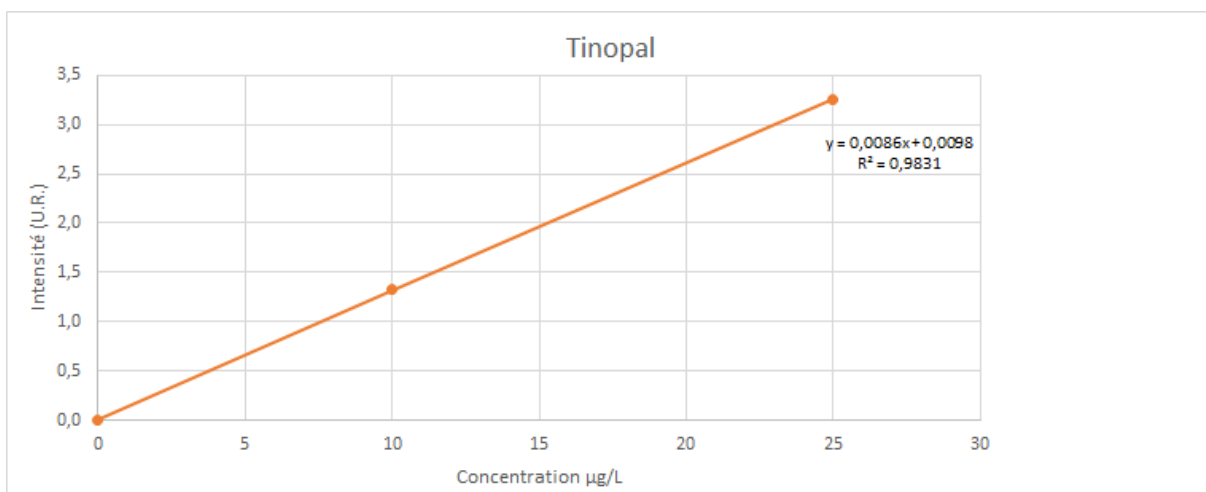


Figure 19 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à pH ajusté à 9 à partir de la poudre de tinopal étudiée (Ta1).

3.1.3.9. PTSA

Les résultats obtenus pour le PTSA **PTa1** sont présentés dans la Figure 20 ci-dessous. On constate une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution dans l'eau ultrapure.

C'est également le cas pour les solutions préparées à partir d'eau naturelle (Annexe 14), ainsi que des solutions préparées à partir d'eau ultrapure du second suivi qui a été réalisé pour ce produit, à des longueurs d'onde différentes (voir section 3.1.4.9), dont le R² est encore plus proche de 1 (Annexe 14).

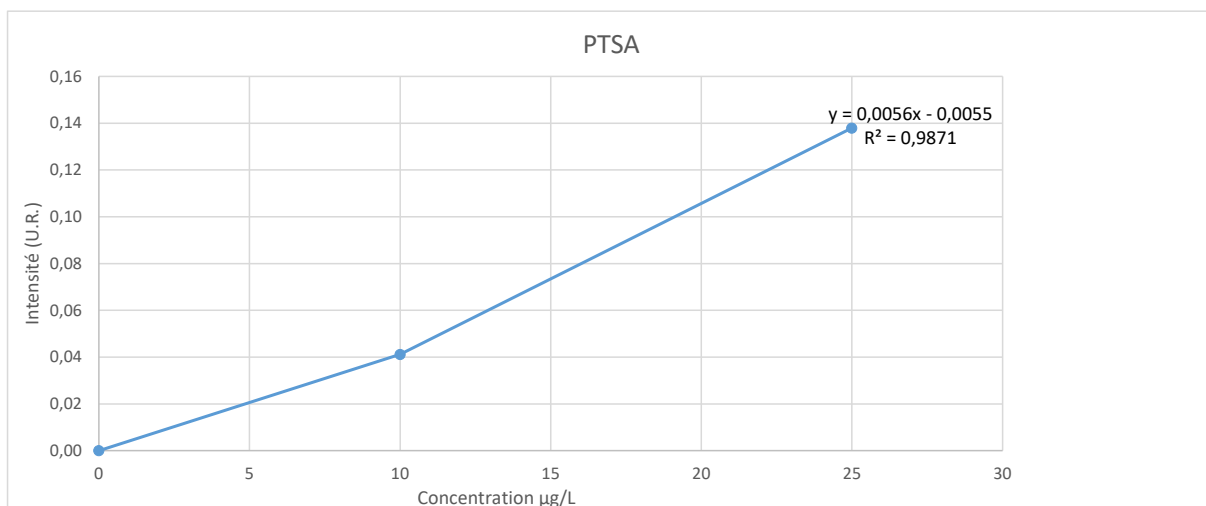


Figure 20 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à partir de la poudre de PTSA étudiée (PTa1).

3.1.3.10. Riboflavine

Les résultats obtenus pour la riboflavine **Ra1** sont présentés dans la Figure 21 ci-dessous. On constate une excellente linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution dans l'eau ultrapure. C'est également le cas pour les solutions préparées à partir d'eau naturelle (Annexe 14).

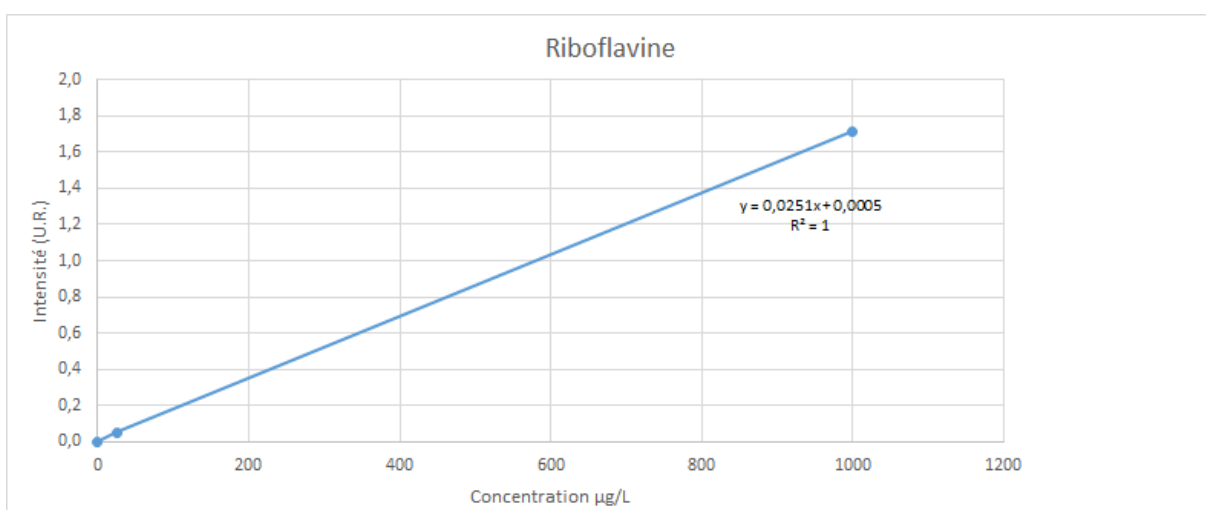


Figure 21 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à partir de la poudre de riboflavine étudiée (Ra1).

3.1.3.11. Bilan des analyses d'intensité de fluorescence

La linéarité de la relation entre intensité de fluorescence et concentration en solution dans l'eau ultrapure, ou l'eau ultrapure à pH ajusté (pour l'uranine, l'acide amino G et le tinopal) est respectée pour tous les traceurs étudiés (voir sections 3.1.3.1 à 3.1.3.10), comme cela avait déjà été montré pour les 6 premiers d'entre eux lors du précédent projet (Défarge et al. 2020). C'est également le cas pour les solutions préparées à partir d'eau naturelle, ou d'eau ultrapure sans ajustement de pH pour les 4 traceurs susmentionnés (voir Annexe 14 pour la pyranine, le tinopal, le PTSA et la riboflavine ; les résultats équivalents pour les 6 autres traceurs ne sont pas illustrés dans ce rapport en raison du manque de lisibilité des graphes, dû au grand nombre de produits testés, mais les corrélations sont excellentes dans tous les cas, avec des R² jamais inférieurs à 0,91, sauf pour l'uranine dans l'eau ultrapure [0,67-0,70], pour laquelle sa chute rapide de fluorescence aux pH acides doit jouer).

Ces résultats permettent de compléter les données, obtenues au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020, Figure 30), sur les fluorescences respectives des principaux traceurs, sur lesquelles la littérature ne propose que des informations généralement globales, obtenues dans des conditions non précisées, et parfois contradictoires (voir Défarge *et al.*, 2020, Tableau 1). Nos résultats, obtenus dans des conditions contrôlées (même laboratoire, même spectrofluorimètre, mêmes protocoles de mise en solution des poudres, même temps d'analyse après la mise en solution, mêmes concentrations, même correction par l'aire du pic Raman de l'eau), sont présentés ci-dessous (Figure 22) sous une forme comparable aux données les plus complètes fournies par Benischke *et al.* (2007) et Leibundgut *et al.* (2009).

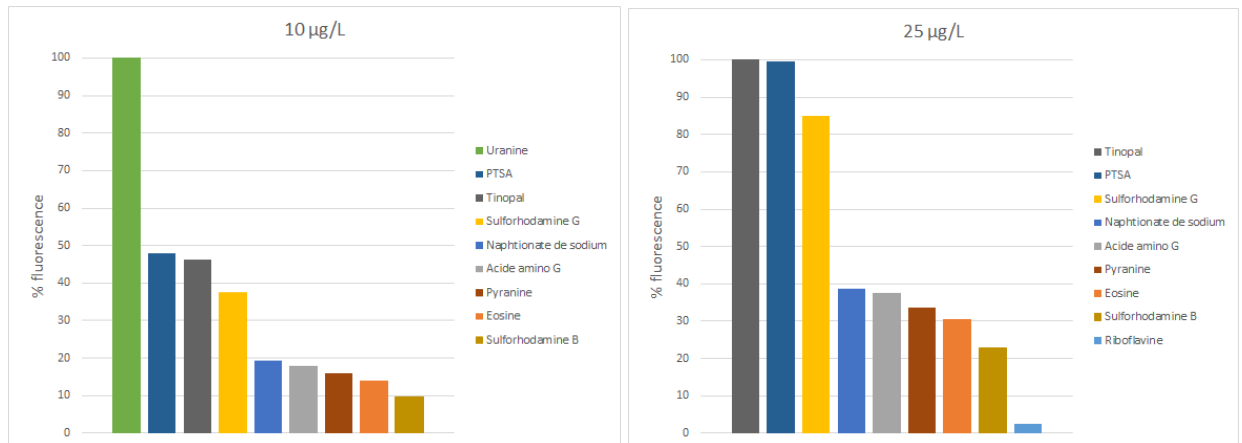


Figure 22 : Comparaison des intensités de fluorescence en solution des 10 traceurs en poudre étudiés. Les données sélectionnées sont les meilleures intensités de fluorescence obtenues entre la 3^{ème} série d'analyses du 1^{er} projet (la seule pour laquelle ont été effectuées à la fois une correction par l'aire du pic Raman de l'eau, permettant une certaine normalisation des mesures entre traceurs analysés à quelques jours de distance, et une correction du pH de l'uranine par tampon Tris-HCl, permettant de stabiliser le pH de ce traceur ; voir Défarge *et al.* 2020), et les trois séries du présent projet, aux concentrations de 10 µg/L (commune à tous les traceurs, hormis la riboflavine ; graphe de gauche), et 25 µg/L (commune à tous les traceurs, hormis l'uranine ; graphe de droite) ; les intensités de chaque traceur en Unités Raman ont été ensuite rapportées à celle du traceur présentant l'intensité de fluorescence la plus forte (uranine à 10 µg/L ; tinopal à 25 µg/L) fixée arbitrairement à 100.

Les résultats confirment globalement ceux obtenus au cours du 1^{er} projet pour l'**uranine**, l'**éosine**, la **sulforhodamine G**, le **naphtionate de sodium** et l'**acide amino G** (Défarge *et al.* 2020) :

- ▶ en rejoignant les données de Leibundgut *et al.* (2009 ; plutôt que celles de Benischke *et al.* 2007, voir Tableau 5 ci-dessous) en ce qui concerne l'ordre de puissance de fluorescence des traceurs et le rapport d'intensité du **naphtionate de sodium** à l'uranine (18-19 à 100 : Tableau 5) ;
- ▶ en révélant que la **sulforhodamine G** est un traceur plus puissant que ce qu'indique généralement la littérature, avec un rapport d'intensité de fluorescence à celle de l'uranine de 37,6 à 100, plus proche toutefois là encore, de Leibundgut *et al.* (2009 ; 32), que de Benischke *et al.* (2007 : 14 ; voir Tableau 5) ;
- ▶ en montrant que l'**éosine** a un rapport d'intensité à l'uranine intermédiaire entre les valeurs données jusque-là par la littérature, mais toutefois pas si éloigné (14 à 100, contre 11,4 pour Leibundgut *et al.* 2009, et 18 pour Benischke *et al.* 2007 : Tableau 5) ;
- ▶ en donnant pour la 1^{ère} fois à notre connaissance le rapport d'intensité de fluorescence de l'**acide amino G** à l'uranine (18 à 100, soit l'ordre de grandeur de celui du naphtionate de sodium : Tableau 5).

La **sulforhodamine B** reste le traceur le moins puissant parmi ceux que nous avons analysés au cours du 1^{er} projet, en cohérence avec Leibundgut *et al.* (2009), et contrairement à ce qu'avançaient Benischke *et al.* (2007 ; voir Tableau 5), en revanche son rapport d'intensité de fluorescence à l'uranine s'avère avoir doublé par rapport à nos données du 1^{er} projet (de 4-6, à 9,5 à 100 : Tableau 5 et Défarge *et al.* 2020). Le 1^{er} projet ayant montré que l'intensité de fluorescence des traceurs en solution était globalement proportionnelle à la teneur en composant fluorescent (Défarge *et al.* 2020), ceci confirmerait que les nouveaux produits sélectionnés par les partenaires fournisseurs seraient effectivement de meilleure qualité (voir section 2.1).

Les résultats obtenus sur les traceurs nouvellement analysés au cours du présent projet sur lesquelles des données conséquentes d'intensité de fluorescence pouvaient être trouvées dans la littérature, car suffisamment utilisés (**pyranine**, principalement, et **tinopal**), confirment, pour le 1^{er}, son ordre dans le classement établi par Leibundgut *et al.* (2009), qui est également cohérent avec le nôtre de ce point de vue, et l'ordre de grandeur de son rapport d'intensité à l'uranine donné par ces auteurs : 18 à 100, contre 15,9 selon nos données (Tableau 5).

Nos résultats confirment également ceux de Benischke *et al.* (2007), montrant que le **tinopal** est le 2^{ème} traceur après l'uranine en termes de puissance de fluorescence (parmi ceux cités par ces auteurs), mais avec un rapport d'intensité à celle-ci significativement plus bas (46,2 à 100, contre 60 : Tableau 5).

En ce qui concerne les deux derniers traceurs, pour lesquels aucune donnée sur leur puissance de fluorescence n'a pu être trouvée dans la littérature, le PTSA s'avère avoir une puissance de fluorescence équivalente à celle du tinopal (Figure 22 et Tableau 5), tandis que celle de la riboflavine est considérablement plus faible que les traceurs couramment utilisés (Figure 22 et Tableau 5), ce qui rendrait son utilisation en traçage hydrogéologique peu utile ne serait-ce que de ce point de vue ; le produit fourni n'est toutefois qu'un sel de phosphate de la riboflavine (voir section 2.1), laquelle pourrait donc être réétudiée seule pour s'en faire une opinion définitive de ce point de vue.

Tableau 5 : Comparaison des principales données disponibles à ce jour sur l'intensité de fluorescence des traceurs étudiés.

| | Intensité relative de fluorescence | | |
|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| | <i>Benischke et al. (2007)</i> | <i>Leibundgut et al. (2009)</i> | <i>Défarge et al. (2020, 2026)</i> |
| Uranine | 100 | 100 | 100 |
| PTSA | - | - | 47,9 |
| Tinopal | 60 | - | 46,2 |
| Sulforhodamine G | 14 | 32 | 37,6 |
| Naphtionate de sodium | 8 | 18 | 19,3 |
| Acide amino G | - | - | 18 |
| Pyranine | 6 (à pH acide) | 18 | 15,9 |
| Eosine | 18 | 11,4 | 14 |
| Sulforhodamine B | 30 | 7 | 9,5 |

N.B. Les intensités de fluorescence sont données relativement à celle de l'uranine arbitrairement fixée à 100 ; nos valeurs sont basées sur les mesures effectuées sur les solutions à 10 µg/L (voir Figure 22). - : absence de données ; gras : données cohérentes entre auteurs, ou apportées par nos études (acide amino G, PTSA).

Ces données révisées, qu'on peut considérer comme globalement cohérentes avec la littérature, mais plus précises et plus fiables en raison des conditions contrôlées dans lesquelles elles ont été obtenues, devraient amener à reconsidérer certaines estimations des quantités de traceurs à injecter dans les opérations de traçage, qui sont notamment basées, en référence à l'uranine, sur ces rapports d'intensité de fluorescence (Käss 1998, Benischke *et al.* 2007, Leibundgut *et al.* 2009, Dörfliger *et al.* 2010).

Il est à noter toutefois que toutes ces données, les nôtres ou celles trouvées dans la littérature, sont basées sur l'analyse de produits disponibles dans le commerce, et donc limitées par la méconnaissance de leur teneur effective en traceur, qui peut être inconnue, ou erronée (voir Défarge et al. 2020, et section 3.1.1 du présent rapport). On aura accès aux puissances de fluorescence réelles des molécules par comparaison avec les résultats des analyses de pureté des produits (voir plus loin section 3.3).

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, ou 25 et 1 000 µg/L : voir 2.2.4), préparées avec de l'eau ultrapure, de l'eau ultrapure à pH ajusté par tampon Tris-HCl (pour l'uranine, l'acide amino G et le tinopal : voir 2.2.4), et/ou de l'eau naturelle (de la source karstique du Bouillon : voir 2.2), sont présentées ci-dessous (Figures 23 à 34) et dans l'Annexe 15 (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 les 2^{ème} et 3^{ème} années 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, l'acide amino G et le tinopal) ou pas (tous les traceurs), sont précédées d'un graphe présentant les intensités de fluorescence des solutions concernées à t_0 .

L'intensité de fluorescence est exprimée en % d'intensité résiduelle par rapport à l'intensité mesurée à t_0 , 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 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), pour les 1^{ère} et 2^{ème} années de l'étude, et celle du laboratoire CETRAHE au moment des mesures pour la 3^{ème} année.

3.1.4.1. Uranine

Les résultats obtenus pour l'uranine sont présentés dans la Figure 23 ci-dessous et dans l'Annexe 15. 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 23). 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, pourrait être attribuée à la contribution de la fluorescence de matières organiques (MO) présentes dans l'eau naturelle, et distinctes de celles formant ses deux composants principaux identifiés par caractérisation spectrale, dont le domaine d'excitation/émission ne recoupe pas celui de l'uranine (voir Annexe 1).

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, l'intensité des solutions à 10 µg/L étant beaucoup plus faible mais augmentant 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 (valeurs brutes non montrées dans la Figure 23, 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 µg/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 µg/L ; les résultats obtenus sont portés dans la Figure 23 (graphe du bas : **Uf2 - 2**) et le Tableau 6 ci-dessous. Les intensités habituelles ont été retrouvées à t_0 , celle de la solution à 10 µg/L évoluant peu jusqu'à 12 jours, celle de la solution à 15 µg/L augmentant de 25 % ; ensuite, les intensités des deux solutions augmentent parallèlement jusqu'à 6 mois (Figure 23).

L'uranine étant très sensible aux variations de pH (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), le pH moins acide de l'eau ultrapure lors de la 1^{ère} expérience de suivi (5,52 contre 4,22 lors de la seconde expérience, se traduisant par un pH de la solution à 0,1 g/L de 8,06 contre 7,22 : comparer Tableaux 4 et 6) pourrait expliquer pour partie les intensités de fluorescence inhabituellement élevées lors du 1^{er} suivi, à t_0 pour la solution à 15 µg/L, et à partir de 12 jours à 3 semaines pour celle à 10 µg/L (Figure 23). Toutefois, cela n'explique pas l'intensité particulièrement faible de la solution à 10 µg/L à t_0 , qui pourrait par ailleurs être l'explication de la forte remontée relative de l'intensité de cette solution par la suite. Par ailleurs, le pH de la solution à 10 µg/L du 2^{ème} suivi évolue également d'une unité (Tableau 6), sans que son intensité de fluorescence change ; et celui de la solution à 15 µg/L fluctue entre 4,76 et 5,17 (Tableau 6) alors que sa fluorescence augmente dans le même temps.

L'augmentation de la CE des solutions à partir de 4 à 12 jours (Tableau 6), correspondant aux temps de montée jusqu'au plateau de la fluorescence de la solution à 10 µg/L dans l'eau ultrapure lors de la 1^{ère} expérience de suivi (Figure 23), traduisant la possible libération progressive d'uranine dissoute dans la solution, pourrait être une piste d'explication.

La cinétique de dissolution des poudres avait déjà été mise en évidence comme facteur explicatif de certains phénomènes observés au cours du 1^{er} projet (Défarge et al. 2020). Le fait que leur dissolution complète peut demander plus de 12 jours (Figure 23) en l'absence d'agitation supérieure à une demi-heure au départ, est une observation à prendre en compte pour les futures analyses au laboratoire.

Tableau 6 : 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.

| | pH à 0,1 g/L | pH eau ultrapure | CE à 25 °C à 0,1 g/L (µs/cm) | CE eau ultrapure | | pH à 10 µg/L | CE à 25 °C à 10 µg/L (µs/cm) | pH à 15 µg/L | CE à 25 °C à 15 µg/L (µs/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 |
| 22 j. | - | - | - | - | | 5,26 | 18 | 5,14 | 14 |
| 41 j. | - | - | - | - | | 5,11 | 16 | 5,17 | 15 |

En dehors du cas des solutions à 10 µg/L, les 5 autres solutions d'uranine ont un comportement similaire avec le temps jusqu'à 6 mois (Figure 23). 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 partir de 4,4 mois, apparaissent majoritairement liées aux fluctuations de température (Figure 23 ; voir également Annexe 15 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) ; ceci expliquerait également l'augmentation continue de l'intensité de fluorescence des solutions du produit Uf2 à partir de 12 jours, lors du second suivi (Figure 23).

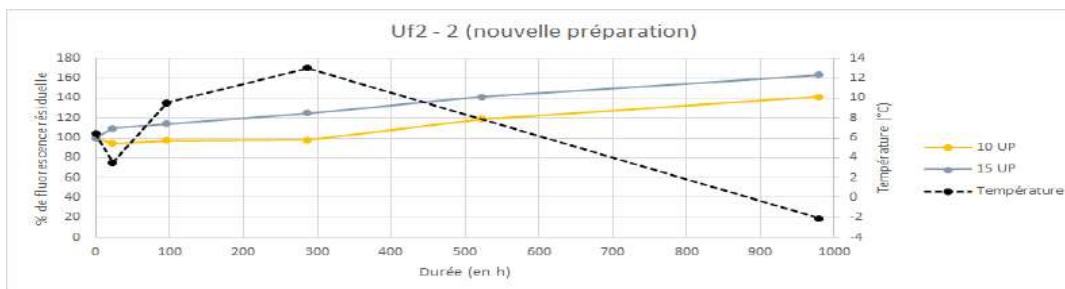
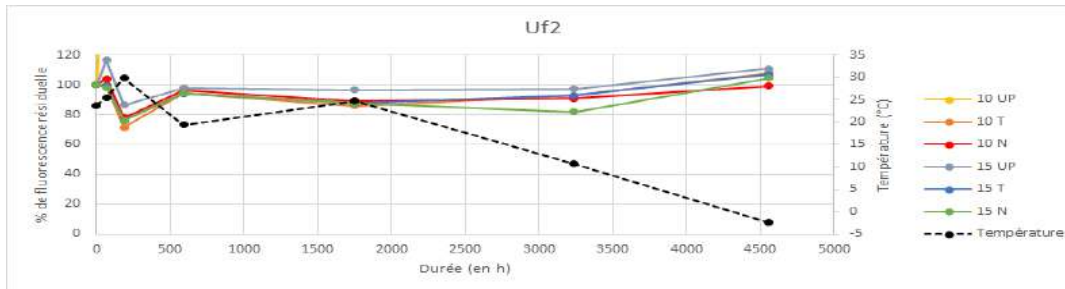
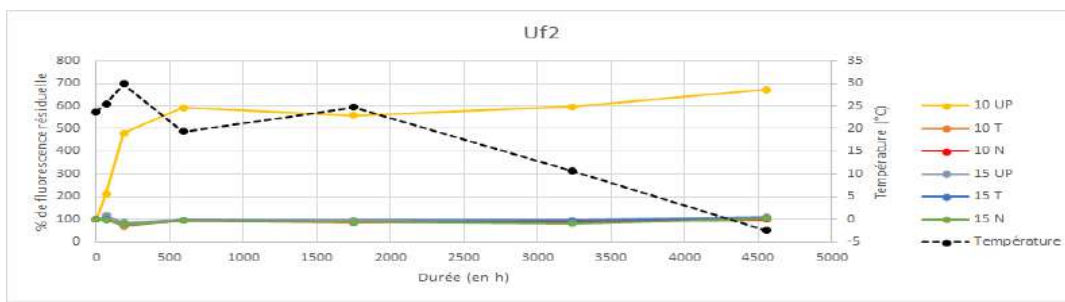
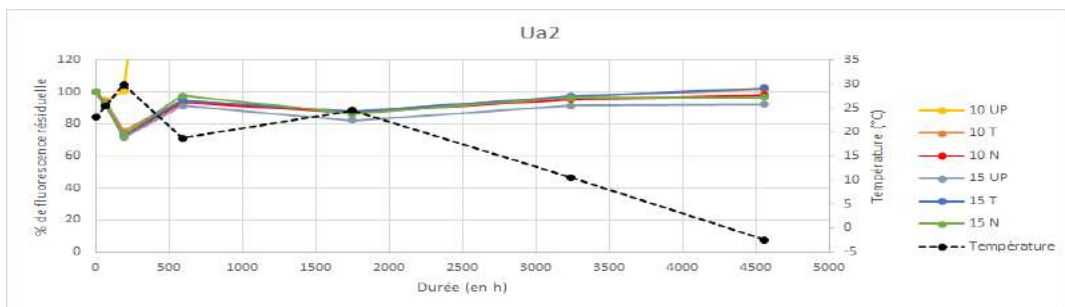
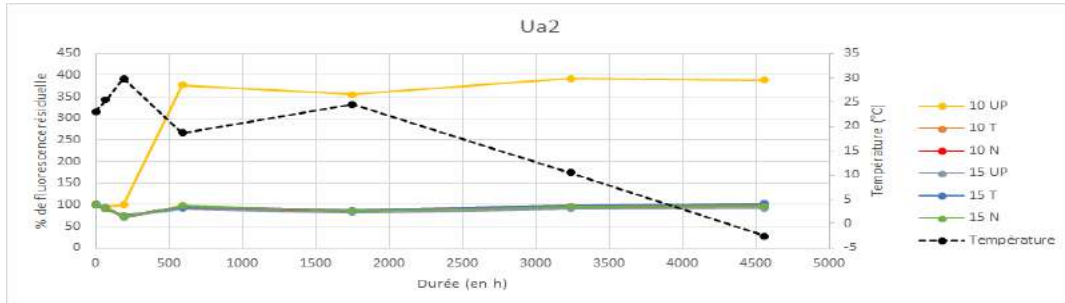
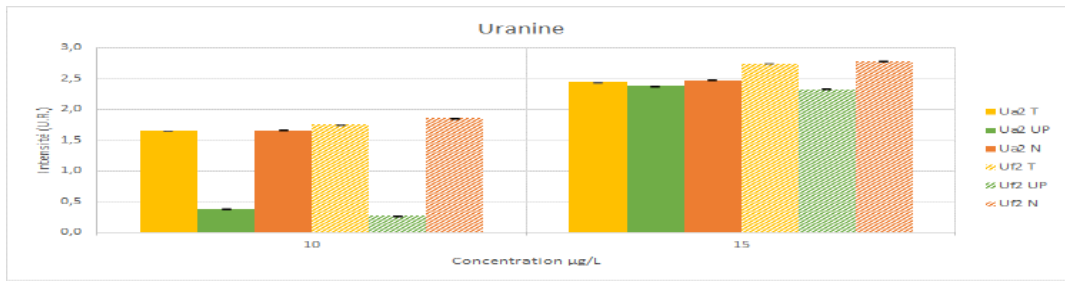


Figure 23 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'uranine de concentration 10 et 15 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N), d'eau ultrapure (U) et d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (T). En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par produit ; deux graphes sont portés pour chacun des deux produits, celui du dessous correspondant à chaque fois à un extrait de celui du dessus, avec une échelle d'intensité résiduelle ramenée à 100 %, ne tenant pas compte des intensités exceptionnelles des solutions dans l'eau ultrapure (voir texte) ; le graphe du bas correspond à la nouvelle préparation du produit Uf2, suivi jusqu'à 41 jours pour tenter d'expliquer les résultats des tests précédents en fonction du pH et de la CE (portés dans le Tableau 5, voir texte).

3.1.4.2. Eosine

Les résultats obtenus pour les poudres d'éosine sont présentés dans la Figure 24 ci-dessous et dans l'Annexe 15. 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 24). 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 6 mois (Figure 24), 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 23 et 24), cohérents avec la moindre dépendance de la fluorescence de l'éosine à la température connue dans la littérature (voir Tableau 9 ci-dessous, et également Annexe 15 pour les résultats de la 1^{ère} année).

3.1.4.3. Sulforhodamine B

Les résultats obtenus pour les poudres de sulforhodamine B sont présentés dans la Figure 25 ci-dessous et dans l'Annexe 15. 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 25). 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, et distinctes de celles formant ses deux composants principaux identifiés par caractérisation spectrale, dont le domaine d'excitation/émission ne recoupe pas celui de ce traceur (voir Annexe 1).

Comme dans le cas de la plupart des solutions d'uranine (Figure 23) et de l'éosine (Figure 24), les solutions de sulforhodamine B montrent des fluctuations d'intensité résiduelle de fluorescence parallèles, toutefois différentes de celles des deux premiers traceurs, avec notamment un seul minimum, à 2,5 mois (comparer Figures 25 et 23-24). De plus, leur amplitude est distinctement supérieure à celles des deux premiers traceurs (Figures 25 et 23-24), 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 pour lesquels on dispose de données dans la littérature (voir Tableau 9).

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 25).

Dans les premiers jours suivant la mise en solution des produits, on constate des baisses de l'intensité de fluorescence résiduelle des solutions préparées avec l'eau naturelle (**SBa2** 25N, **SBf2** 10N et 25N, **SBf2bis** 10N et 25N : Figure 25 ; voir également Annexe 15 pour les résultats de la 1^{ère} année) : les intensités résiduelles de fluorescence sont notamment significativement inférieures à celles des solutions préparées avec l'eau ultrapure à partir de 3 jours aux deux concentrations pour les trois produits (Figure 25). Cette différence d'intensité de fluorescence résiduelle évolue peu en moyenne par la suite pour trois des solutions (**SBf2** 10 µg/L, **SBf2bis** aux deux concentrations : Figure 25), mais augmente légèrement avec le temps entre 1 semaine et 1 mois dans le cas de **SBa2** 10 µg/L, entre 1 semaine et 4,5 mois dans le cas de **SBf2** 25 µg/L, entre 2,5 et 4,5 mois dans le cas de **SBa2** 25 µg/L, et entre 4,5 et 6 mois dans le cas de **SBa2** 10 µg/L, **SBf2** 10 µg/L, et **SBf2bis** aux deux concentrations (Figure 25). Elle se situe dans une fourchette de 8 à 24 % pour l'ensemble des solutions au bout des 6 mois (Figure 25).

Ces évolutions distinctes de solutions préparées dans l'eau naturelle pourraient donc traduire l'intervention de phénomènes de biodégradation de la sulforhodamine B par les bactéries présentes dans l'eau de la source du Bouillon.

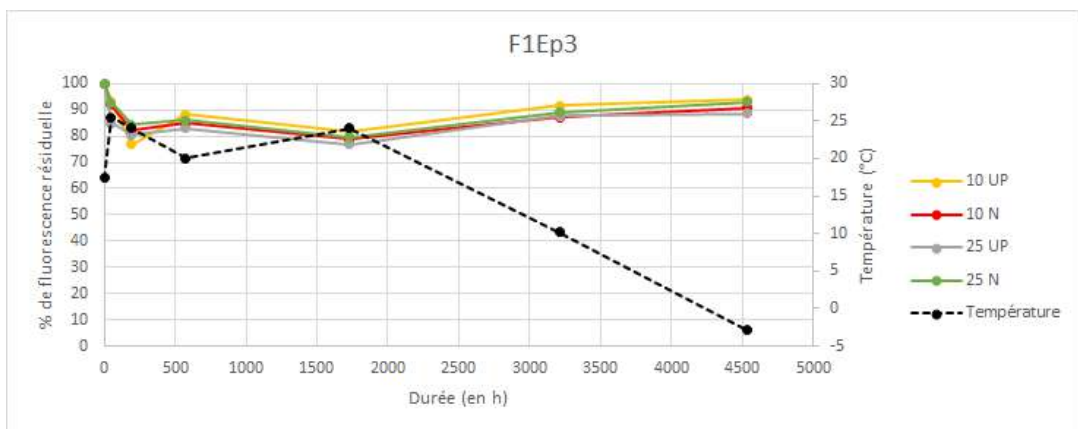
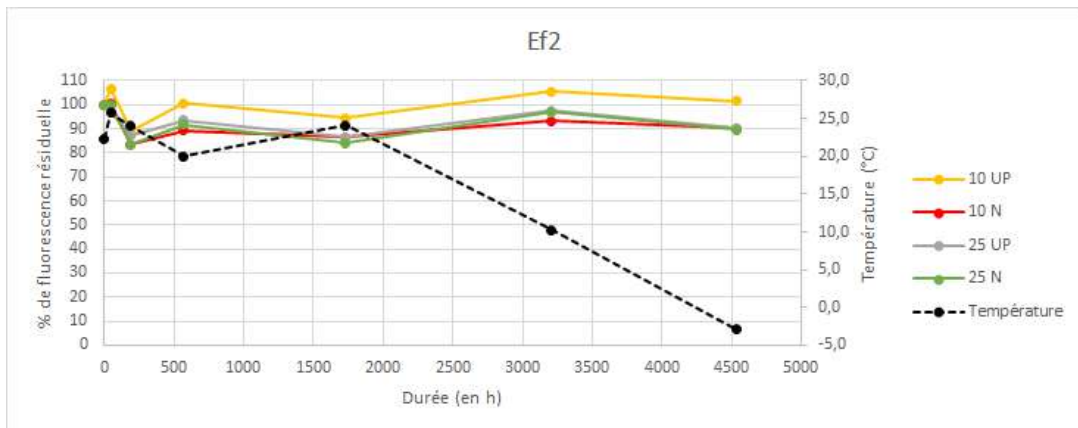
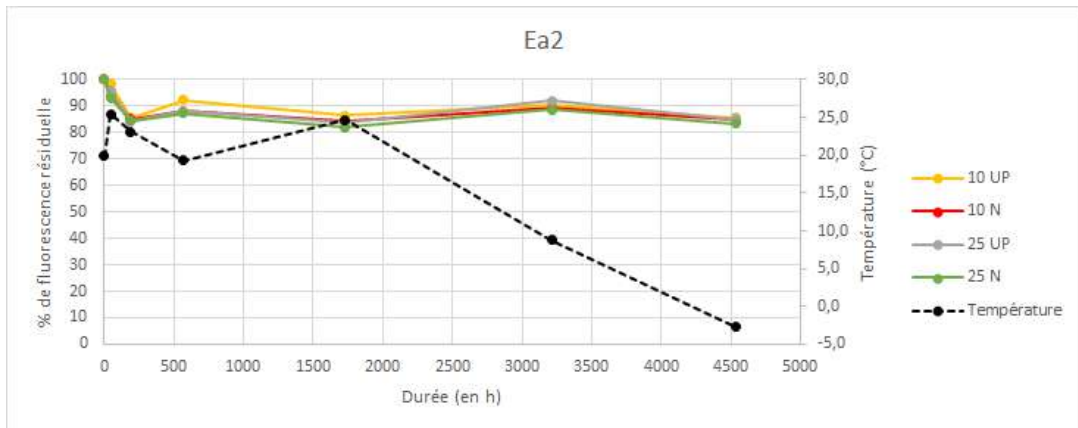
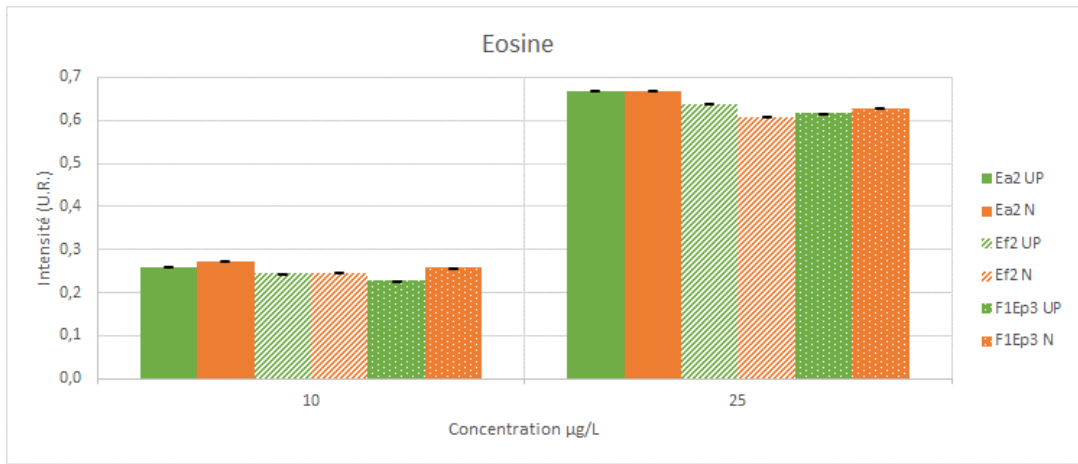


Figure 24 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'éosine de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par produit.

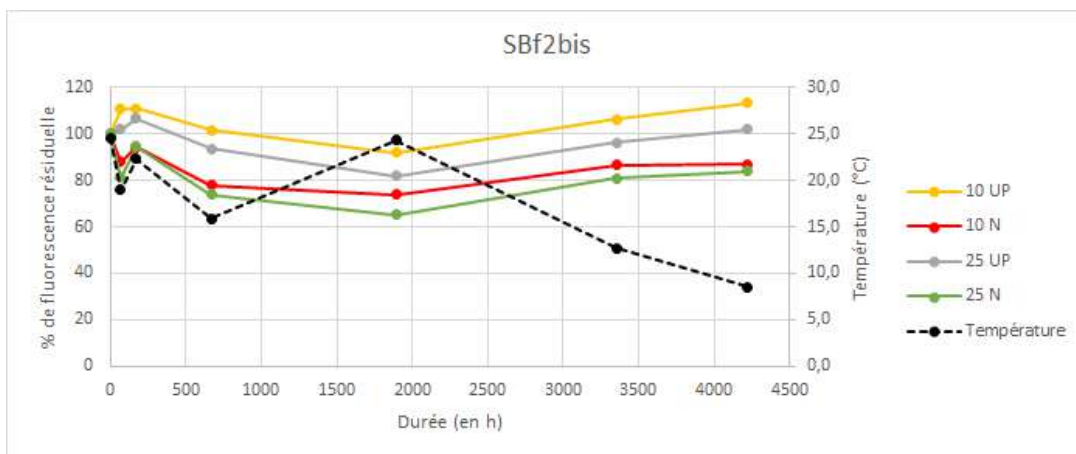
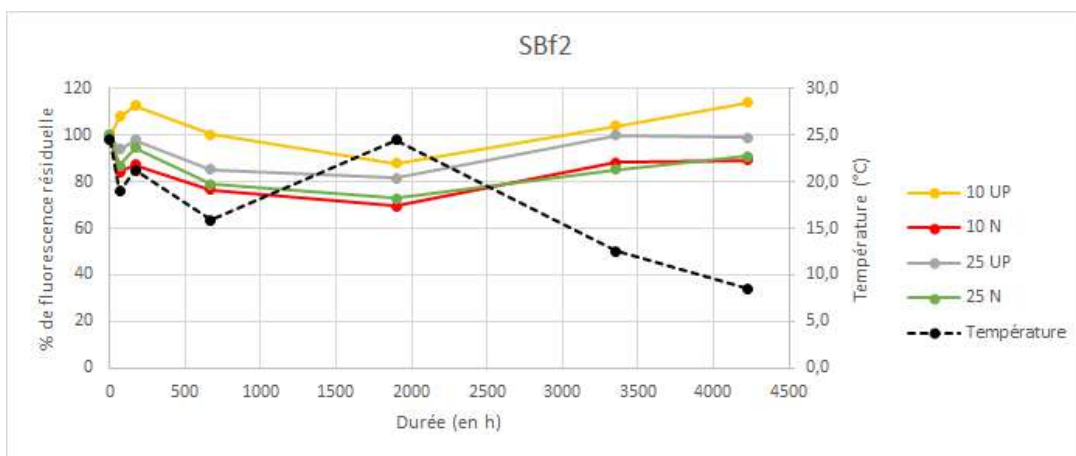
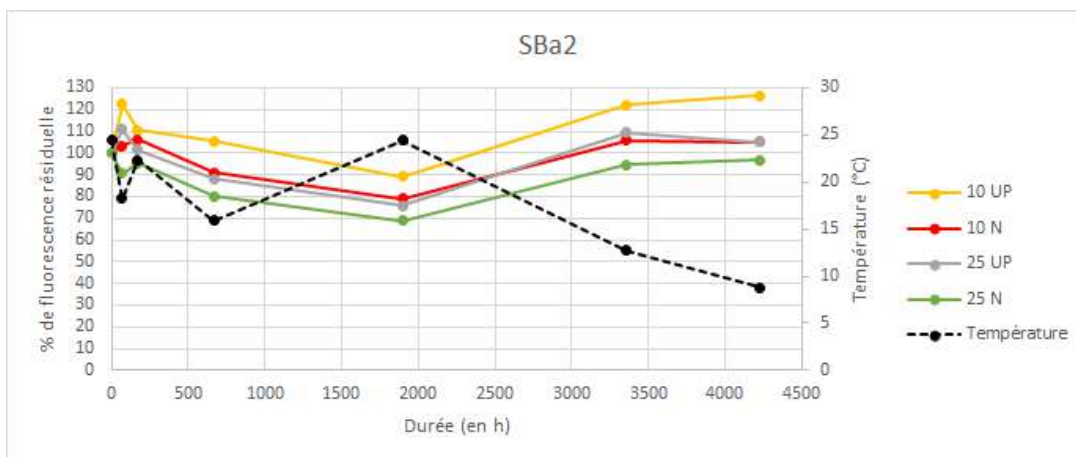
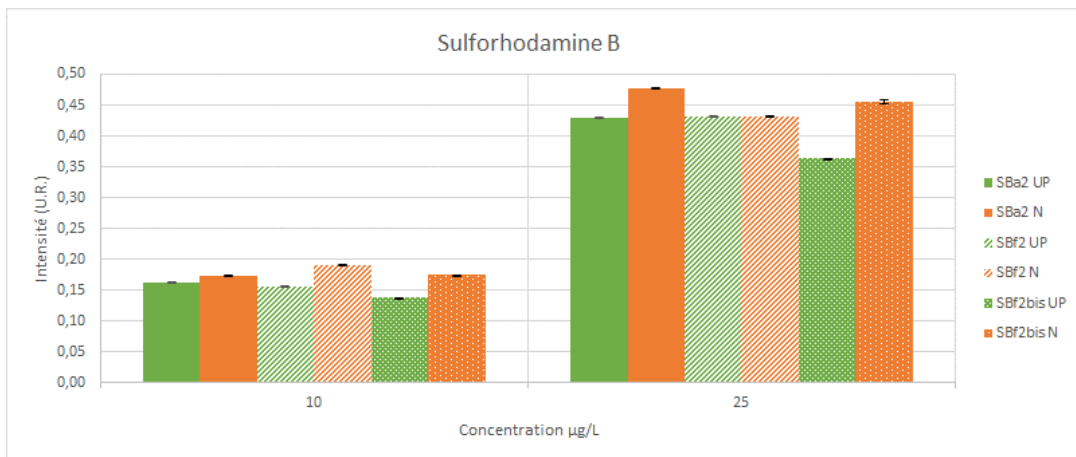


Figure 25 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de sulforhodamine B de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par produit.

3.1.4.4. Sulforhodamine G

Les résultats obtenus pour les poudres de sulforhodamine G sont présentés dans la Figure 26 ci-dessous et dans l'Annexe 15. 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 26).

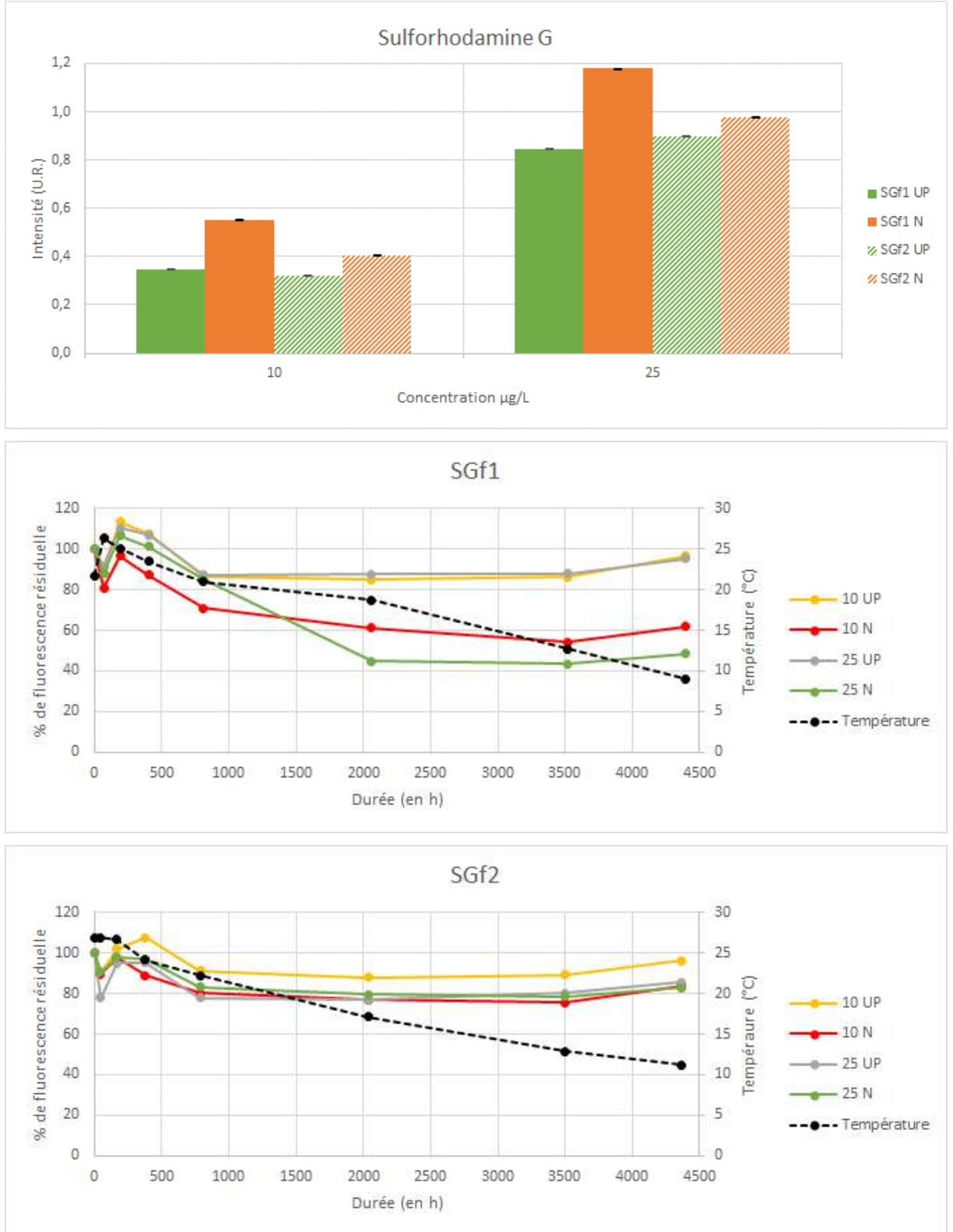


Figure 26 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de sulforhodamine G de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par produit.

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 26). 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 donc probablement dû à la contribution de la fluorescence de MO présentes dans l'eau naturelle, et distinctes de celles formant ses deux composants principaux identifiés par caractérisation spectrale (voir ci-dessus 3.1.4.3).

Le décalage entre les deux produits les premiers jours de suivi (Figure 26) permet de vérifier que, comme dans le cas de la sulforhodamine B, 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 ce facteur (Tableau 9). 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 26 ; voir également Annexe 15 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 de la 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 26). 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 26).

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 en revanche 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 pas (Figure 26). 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 26), une interrogation persiste sur la réalité de sa baisse de fluorescence dans l'eau naturelle par rapport à l'eau ultrapure.

Comme dans le cas de la sulforhodamine B, des phénomènes de biodégradation de la sulforhodamine G par les bactéries présentes dans l'eau de la source du Bouillon semblent toutefois pouvoir être impliquées.

Entre 5 et 6 mois, on peut observer une remontée parallèle des intensités résiduelles de toutes les solutions, quelles que soient leur concentration ou l'eau qui a servi à les préparer (Figure 26). Ce phénomène, qui ne peut être dû à l'évolution de la température, est donc probablement dû à des fluctuations des conditions analytiques non corrigées par la correction du pic Raman de l'eau.

3.1.4.5. Naphtionate de sodium

Les résultats obtenus pour les poudres de naphtionate de sodium sont présentés dans la Figure 27 ci-dessous et dans l'Annexe 15. Les intensités de fluorescence à t_0 des produits dans l'eau ultrapure sont inférieures à ce qu'elles sont dans l'eau naturelle (Figure 27). 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 naphtionate 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 (voir Annexe 1).

Le comportement des solutions de naphtionate de sodium est très différent, selon qu'elles ont été préparées avec l'eau ultrapure ou naturelle (Figure 27). 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, sauf entre 5 et 6 mois, où les deux courbes s'écartent, l'intensité résiduelle à 25 µg/L augmentant, tandis que celle à 10

$\mu\text{g/L}$ baisse légèrement (Figure 27). Un effet de la température sur ces fluctuations ne peut être impliqué que jusqu'à 2 semaines de suivi (Figure 27) ; 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 15).

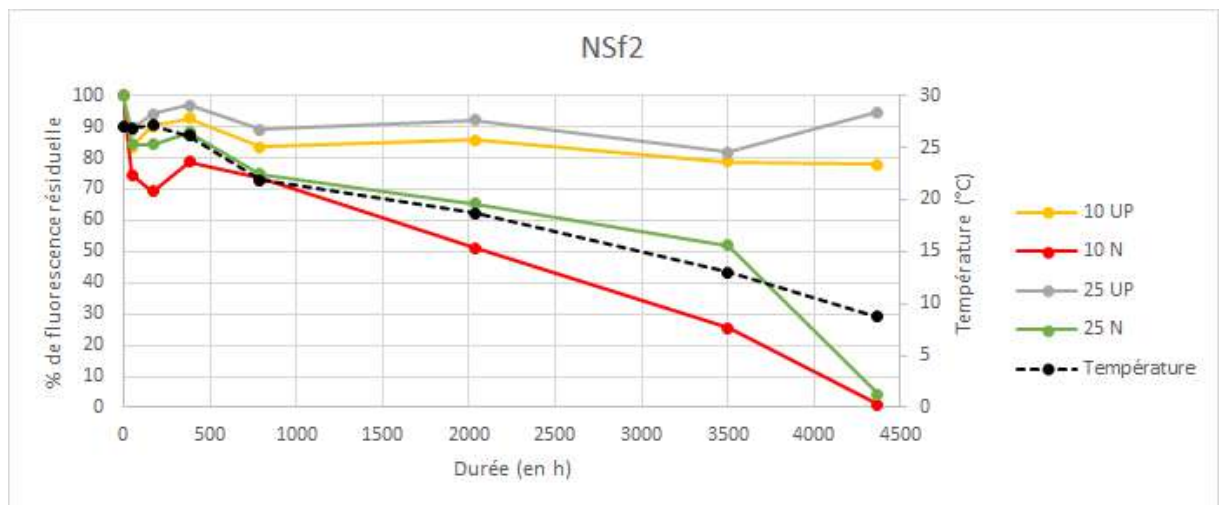
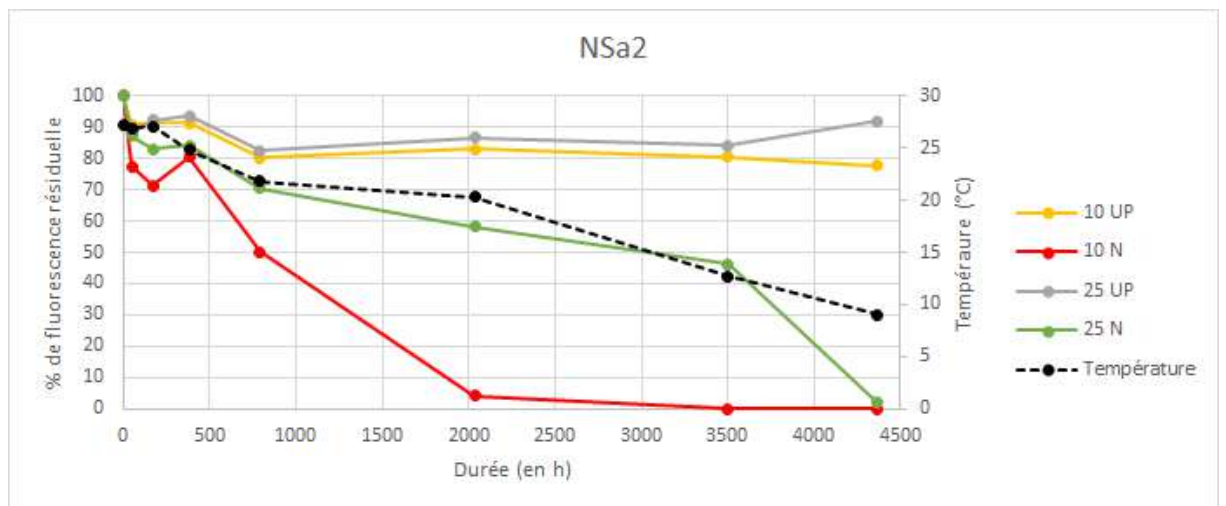
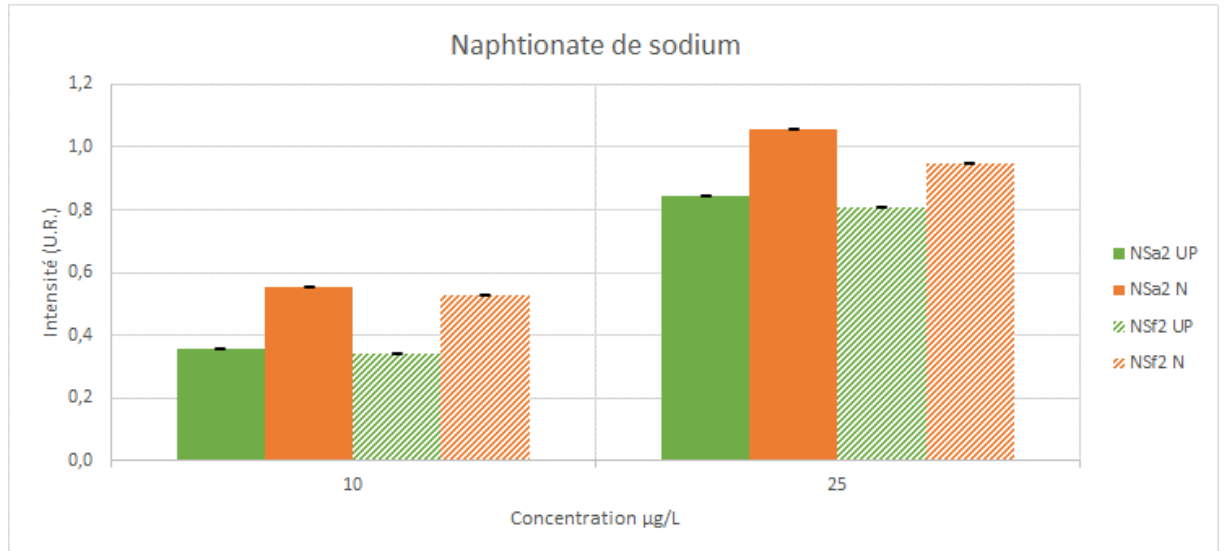


Figure 27 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de naphthionate de sodium de concentration 10 et 25 $\mu\text{g/L}$ fabriquées à partir d'eau naturelle (N) et d'eau ultrapure (U).
En haut intensités à t_0 ; au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par produit.

Au bout de 6 mois, l'intensité résiduelle des solutions de naphthionate de sodium à 10 µg/L préparées avec l'eau ultrapure n'atteint plus que 78 % environ (Figure 27), soit une baisse non constatée pour les 4 autres traceurs analysés jusque-là (voir Figures 23 à 26), mais qui peut être rapprochée de celles constatées pour les solutions d'acide amino G au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020). Les évolutions de pH et de température ne pouvant être en cause, on pourrait rapprocher ces résultats des baisses d'intensité de fluorescence également constatées au cours du 1^{er} projet pour certaines solutions de naphthionate de sodium, à l'obscurité et dans l'eau ultrapure, qui avaient été attribuées à une biodégradation progressive par des bactéries, présentes dans les poudres, toujours très hygroscopiques, de ce traceur, qui seraient libérées lors de leur dissolution (Défarge *et al.* 2020).

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 27). 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 27).

Les solutions à 25 µg/L dans l'eau naturelle des deux produits ont ensuite un comportement similaire, avec une intensité de fluorescence résiduelle autour de 60 % à 3 mois, 60 % à 5 mois, puis une chute à 2 à 4 % à 6 mois (Figure 27). 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 n'atteignant plus, pour **NSf2**, que 50 % à 3 mois, 25 % à 5 mois, puis 1 % à 6 mois, et pour **NSa1** n'étant déjà plus que de 4 % à 2 mois (Figure 27), aucune fluorescence de cette solution n'étant plus détectée par analyse spectrale à partir de 5 mois (résultats bruts non inclus, faute de place, dans ce rapport), l'intensité résiduelle devenant inférieure à celle de l'eau naturelle, qui en est retranchée (voir 2.2.4.3).

Ces résultats semblent donc mettre en évidence une consommation progressive du naphthionate de sodium par les bactéries présentes dans l'eau naturelle de la source du Bouillon, sa disparition totale ou quasi-totale étant d'autant plus rapide que la quantité de traceur présente au départ est plus faible. A cela s'ajoute l'action probable de bactéries présentes dans les poudres elles-mêmes, comme le montre la baisse d'intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L dans l'eau ultrapure.

3.1.4.6. Acide amino G

Les résultats obtenus pour les poudres d'acide amino G sont présentés dans les Figures 28 (obtenue la 1^{ère} année de l'étude avec de l'eau ultrapure à pH ajusté à 8) et 29 (comparaison eau naturelle et eau ultrapure, à pH ajusté ou pas, réalisée la 2^{ème} année) ci-dessous.

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 29). 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 29), 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 (voir Annexe 1). 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 29), 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).

Les fluctuations parallèles d'intensité résiduelle de fluorescence de la plupart des solutions au cours des suivis avec le temps effectués lors des deux années de l'étude (Figures 28 et 29) peuvent être pour partie 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 (Tableau 9 ; à partir de 4 mois la 1^{ère} année, Figure 28, à 4,5 mois la 2^{ème} année, Figure 29, 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 solutions préparées avec l'eau naturelle montrent toutefois, comme les sulforhodamines et le naphthionate de sodium (voir sections 3.1.4.3 à 3.1.4.5 ci-dessus), des baisses d'intensité de fluorescence (à partir de 3 mois pour le produit **AGa2**, de 4,5 mois pour le produit **AGf2** : Figure 29) qui doivent plutôt être expliquées par l'activité biodégradatrice des bactéries présentes à la source du Bouillon ; l'intensité résiduelle à 6 mois n'est plus que de 25 à 40 % pour les solutions à 10 µg/L, autour de 70 % pour les solutions à 25 µg/L (Figure 29).

Des baisses progressives d'intensité de fluorescence affectent également, comme dans le cas du naphthionate de sodium (voir section 3.1.4.5), trois des quatre solutions préparées avec de l'eau ultrapure : celle à la concentration de 25 µg/L du produit **AGf2** à partir de 3 mois, et celles à 10 µg/L des deux produits à partir de 4,5 mois, celle du produit **AGa2** à 25 µg/L étant la seule à ne pas s'écarter des solutions préparées avec l'eau ultrapure tamponnée ; l'intensité résiduelle à 6 mois des trois premières solutions n'est plus que de 80 à 90 % (Figure 29).

Le phénomène de décroissance avec le temps de l'intensité de fluorescence de l'acide amino G en solution n'est en revanche pas observé jusqu'à 6 mois pour les solutions préparées avec l'eau ultrapure à pH ajusté à 8, que ce soit la 1^{ère} ou la 2^{ème} année de l'étude (Figures 28 et 29).

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, toutes les solutions ayant été préparées avec de l'eau ultrapure non tamponnée), 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 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 (même si celui des solutions mères à 0,1 g/L avait peu varié en 15 mois : Défarge *et al.* 2020), mais les pH mesurés sur les solutions à 0,1 g/L montrent de nouveau cette fois-ci très peu d'évolution avec le temps jusqu'à 6 mois, quelles que soient leur concentration et le type d'eau avec laquelle elles ont été préparées, et donc notamment aucune baisse pour celles préparées à partir d'eau ultrapure qui pourrait expliquer celle de l'intensité de fluorescence (Figures 28 et 29). La limite de ces résultats est toutefois qu'on n'a pas pu les vérifier sur les solutions à 10 et 25 µg/L sur lesquelles les mesures de fluorescence ont été effectuées, pour des raisons pratiques de volume d'échantillon disponible et de limitation des manipulations risquant de dégrader artificiellement leur composition ; le volume d'échantillon restant au bout des 6 mois d'expérimentation était insuffisant pour faire une mesure de pH finale.

La CE des solutions à 0,1 g/L subit une très légère augmentation avec le temps lors de la 1^{ère} année de l'étude (Figure 28), et aucune lors de la 2^{ème} (Figure 29), notamment pour celles préparées à partir d'eau ultrapure, qui restent dans une fourchette de 112 à 117 µS/cm (résultats bruts non inclus dans ce rapport). L'hypothèse d'une dégradation de l'acide amino G en sous-produits, pouvant expliquer la baisse de fluorescence des solutions avec le temps, qui avait été évoquée à la suite du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), ne semble donc pas pouvoir être retenue non plus (avec les mêmes limites que dans le cas d'une évolution du pH toutefois).

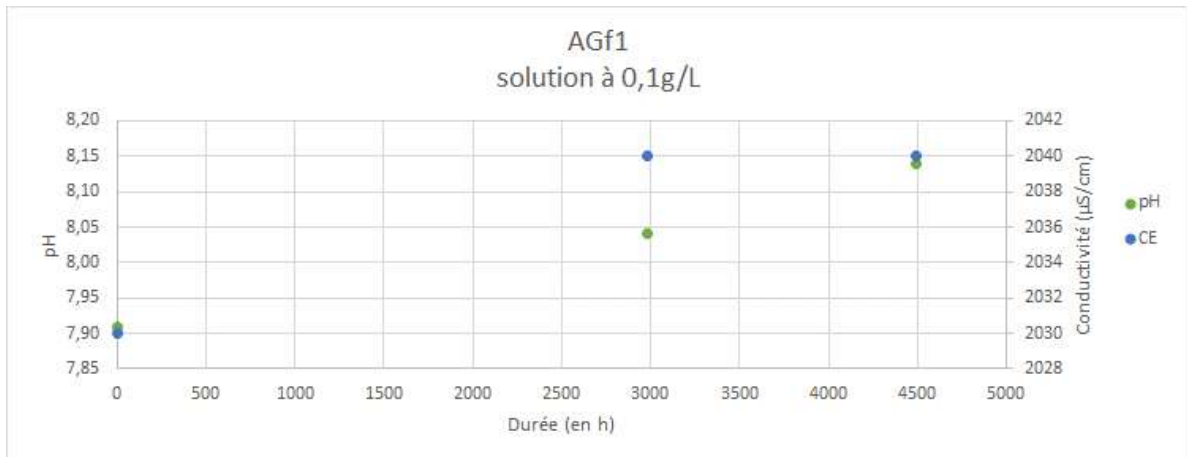
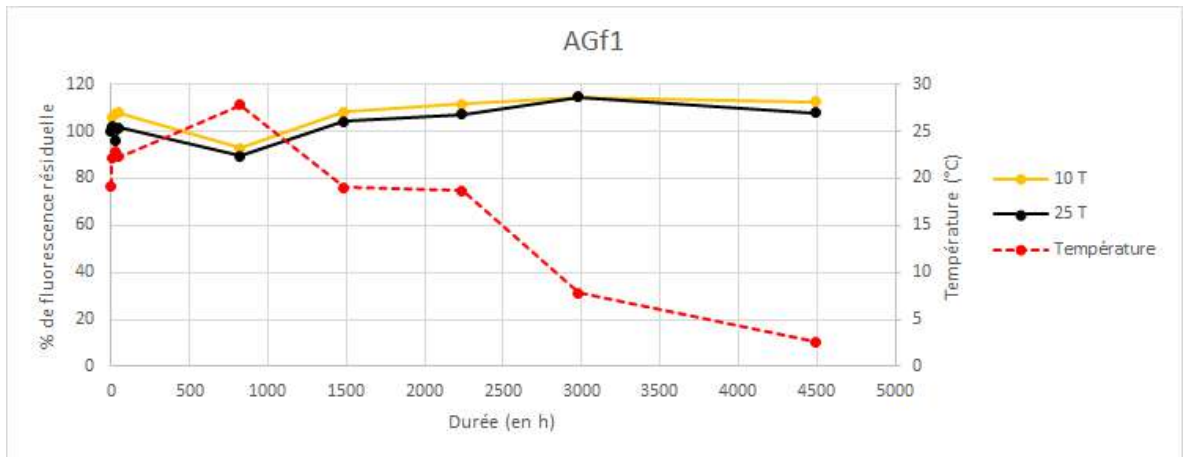
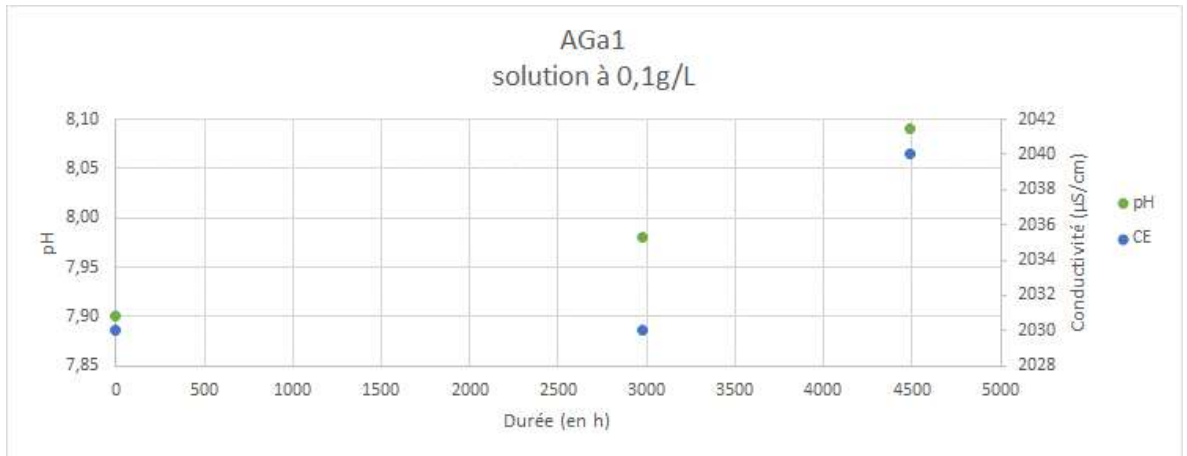
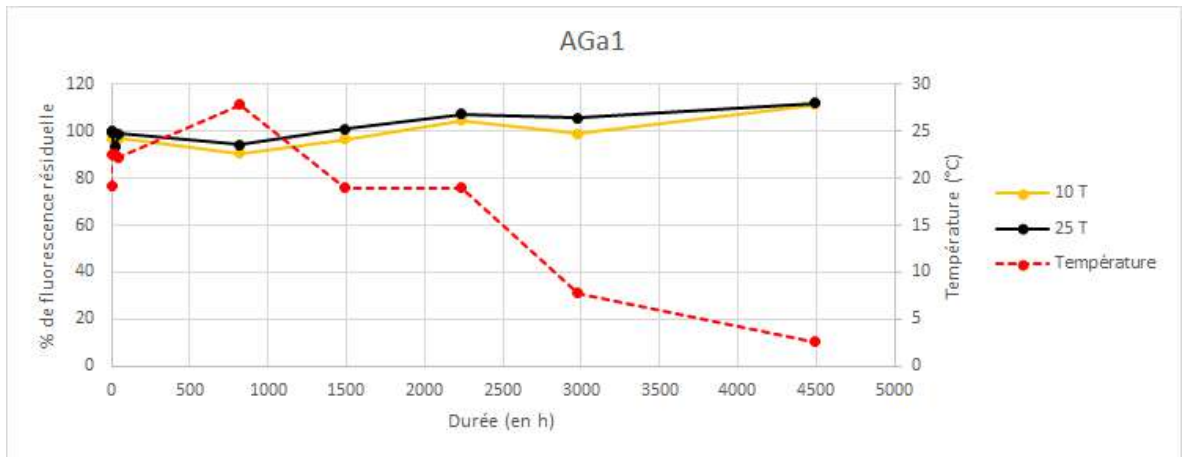


Figure 28 : Evolution avec le temps de l'intensité de fluorescence des solutions d'acide amino G à 10 et 25 µg/L fabriquées à partir des poudres des deux fournisseurs, et du pH et de la CE de la solution mère à 0,1 g/L. La fluorescence est portée en % d'intensité résiduelle par rapport à la mesure effectuée à t₀, fixée arbitrairement à 100 %.

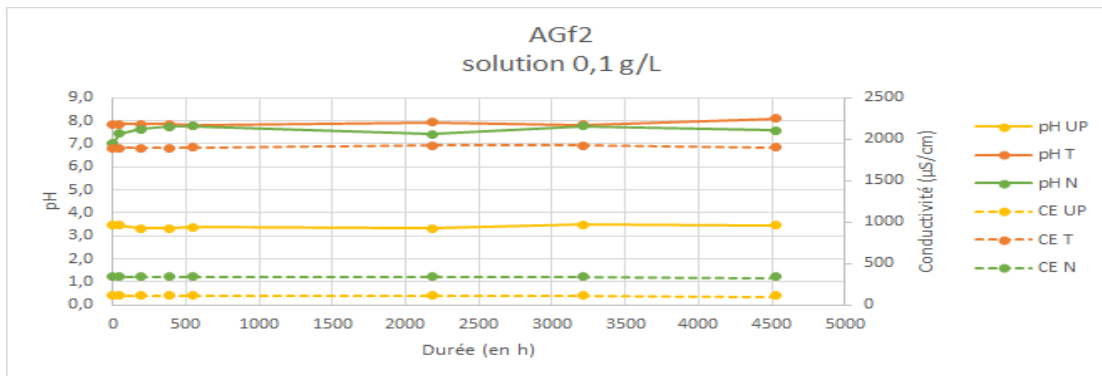
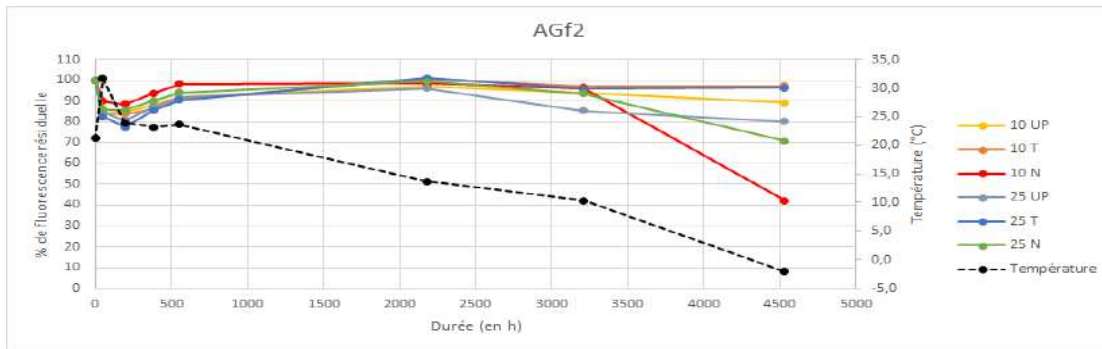
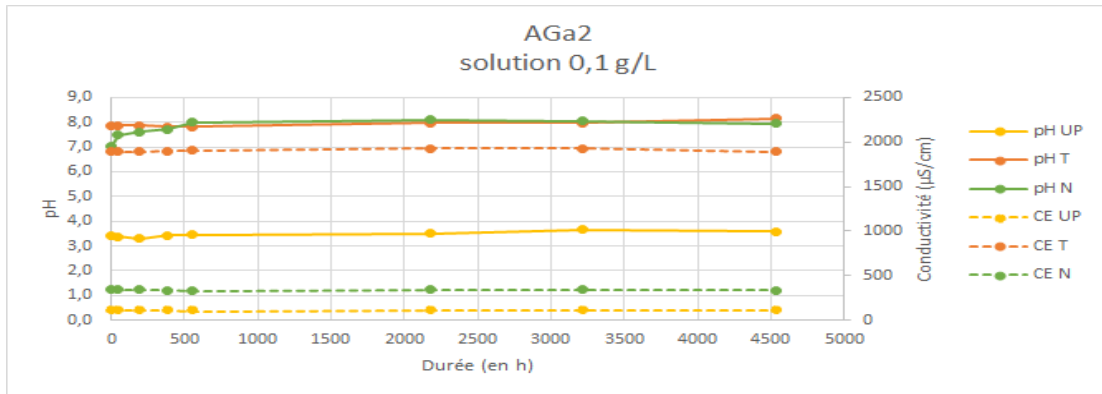
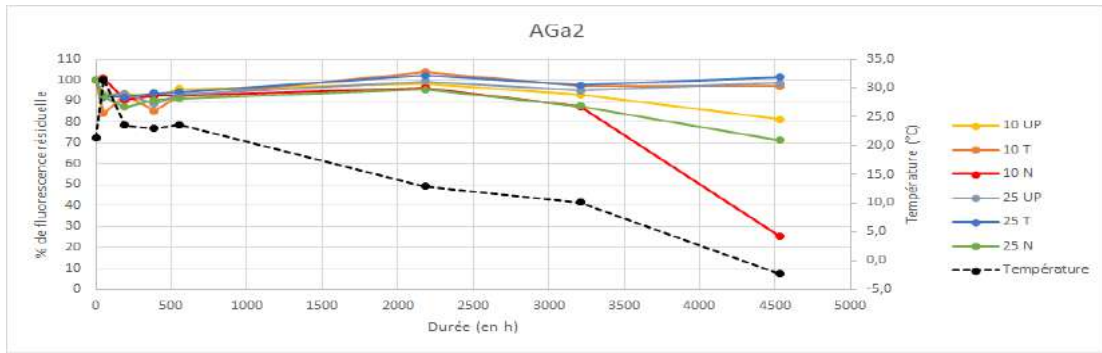
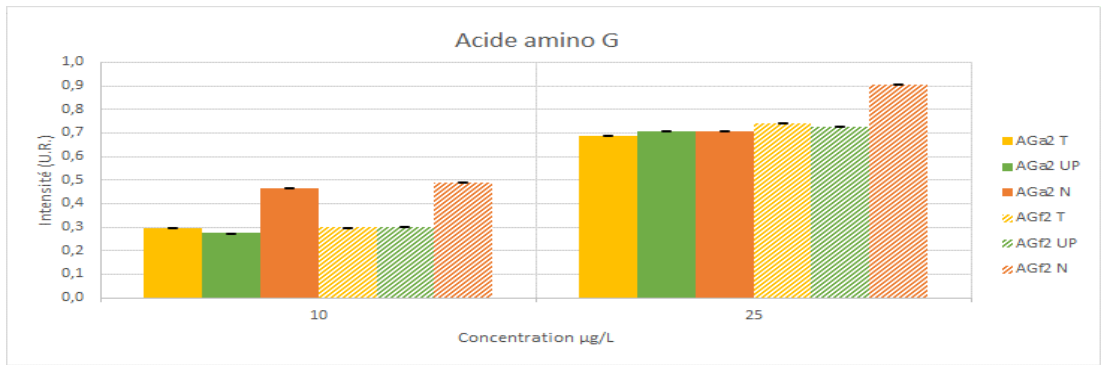


Figure 29 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions d'acide amino G de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle (N), d'eau ultrapure (U) et d'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl (T), et de leurs pH et CE à 0,1 g/L. En haut intensités à t₀ ; au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par produit.

Par analogie avec le naphthionate de sodium, avec qui l'acide amino G partage le caractère hygroscopique, fréquemment humide, de ses poudres (Tableau 4, Défarge *et al.* 2020), et des décroissances brutales de l'intensité de fluorescence de certaines de ses solutions préparées avec de l'eau ultrapure au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), la baisse de l'intensité de fluorescence observée cette fois-ci pour les solutions dans l'eau ultrapure pourrait donc être également attribuée à une biodégradation du traceur par des bactéries présentes dans les poudres et libérées lors de leur dissolution. Leur moindre concentration par rapport à celle de l'eau naturelle expliquerait la moindre baisse de la fluorescence avec le temps (Figure 29). Le tampon Tris-HCl empêcherait que le même phénomène ait lieu dans les solutions à pH ajusté (Figure 29).

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 29 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 29), 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.

3.1.4.7. Pyranine

Les résultats obtenus pour la pyranine sont présentés dans la Figure 30 ci-dessous. Les intensités de fluorescence à t_0 du produit sont significativement supérieures, aux deux concentrations, dans l'eau ultrapure par rapport à l'eau naturelle. On peut y voir un effet du pH, ce traceur en étant, comme déjà signalé, particulièrement dépendant (voir section 3.1.2), non seulement du point de vue de son intensité de fluorescence (comme l'uranine, par exemple : Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009), mais également en termes de caractéristiques spectrométriques (Käss 1998, Nandi & Amdursky 2022), ce qui se traduit par 5 domaines de pH possédant des maximums d'excitation et d'émission, principaux ou secondaires, distincts (voir Annexe 1). La cause en est le radical hydroxyle de la molécule (voir Tableau 10 ci-dessous), qui peut être protoné (ROH) ou déprotoné (RO⁻), avec des maximums d'excitation et d'émission différents : 400/445 nm pour l'état ROH ; 460/510 nm pour RO⁻ (Nandi & Amdursky 2022, qui décrivent la pyranine comme un **photoacide** en raison de ces caractéristiques) ; Käss (1998) indique 405/445 nm et 455/512 nm pour les deux formes anioniques de la pyranine. Ces auteurs montrent des courbes d'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction du pH inversées selon l'état de la pyranine, celle-ci étant maximale aux pH acides pour les longueurs d'onde d'excitation les plus basses, puis chutant rapidement au-dessus de pH 6 (Nandi & Amdursky 2022 ; il est à noter que c'est pour le couple 400/510 nm, et non l'un des deux

associés pour ces auteurs aux formes protonée ou déprotonée) à 6,8 (Käss 1998, Figure 21, pour le couple 405/445 nm), et maximales aux pH basiques pour les longueurs d'onde d'excitation supérieures, puis chutant rapidement au-dessous de pH 8,5 (Nandi & Amdursky 2022, pour un couple 450/510 nm) à 9,2 (Käss 1998, Figure 21, pour le couple 455/512 nm).

Il est à noter que Käss (1998), dans sa Figure 24 montrant l'évolution de l'intensité de fluorescence des principaux traceurs en fonction du pH, ne reprend que la seconde courbe de la pyranine, suivant en cela Smart & Laidlaw (1977), ces auteurs étant suivis également par Leibundgut *et al.* (2009), tous indiquant une chute rapide de la fluorescence de la pyranine en solution au-dessous de pH 9 à 9,5 ; ces choix s'expliquent probablement par les caractéristiques spectrales de la pyranine au-dessus de pH 7,7, avec un maximum d'excitation/émission de 455/512 nm (voir Annexe 1), correspondant aux pH courants dans les eaux naturelles (habituellement compris entre 7,2 et 7,6, et rarement inférieurs à 6 : Rodier *et al.* 2009).

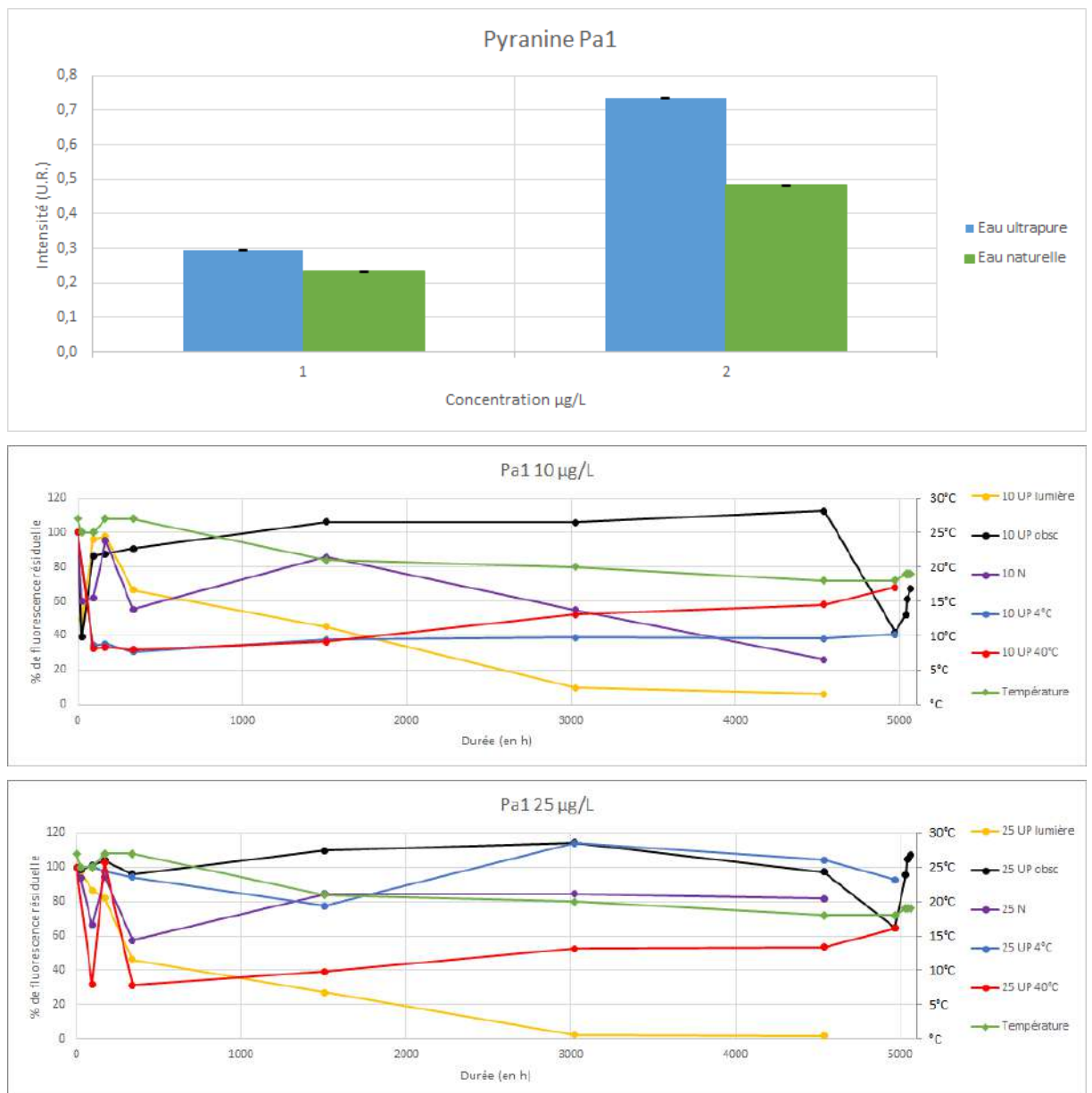


Figure 30 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de pyranine Pa1 de concentrations 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à la température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) placées dans les 4 conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. En haut intensités à t₀. Au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par concentration ; en vert : température du laboratoire au moment des analyses.

Nos résultats (Figure 30) montrant une intensité de fluorescence distinctement supérieure pour les solutions préparées à partir d'eau ultrapure (dont le pH à 0,1 g/L est à 5,49, pour une eau ultrapure à pH 5,95 : Tableau 4), par rapport aux solutions dans l'eau naturelle (dont le pH à 0,1 g/L est à 7,48, pour une eau naturelle à pH 7,52 : Tableau 4), sont donc conformes aux données de la littérature pour ce traceur au comportement particulier et complexe.

L'évolution des solutions de pyranine avec le temps se caractérise tout d'abord par de fortes fluctuations de leur intensité de fluorescence, quelle que soit leur concentration (10 ou 25 µg/L) et l'eau avec laquelle elles ont été préparées (eau ultrapure ou eau naturelle de la source du Bouillon), dans la plupart des conditions expérimentales (lumière, obscurité à la température du laboratoire, au froid ou à 40 °C), dans les premiers jours à semaines suivant le début du suivi avec le temps (Figure 30). Ces fluctuations, fréquemment observées pour d'autres traceurs, peuvent résulter de la cinétique de dissolution (voir section 3.1.4.1 pour le cas de l'uranine), de l'influence de la température (même si la pyranine n'y est pas particulièrement sensible : Tableau 9), ou de variations des conditions analytiques que la correction par l'intensité du pic Raman de l'eau ne parvient pas à compenser (voir éléments ailleurs dans le présent rapport, et discussion déjà menée dans Défarge *et al.* 2020).

Dans le cas des solutions exposées à 4 ou 40 °C (et donc également à l'obscurité, au réfrigérateur ou à l'étuve, respectivement ; voir section 2.2.4.4), ce phénomène imprime sa marque au comportement des solutions avec le temps, mais se superpose à un effondrement en quelques jours de l'intensité de fluorescence des solutions placées à l'étuve pour les deux concentrations, et également de la solution placée au froid pour la solution à 10 µg/L (Figure 30). Etant donné la sensibilité particulière au pH de ce traceur, on a procédé à des mesures de ce paramètre dans les solutions, une fois les expérimentations à 6 mois terminées (le faire pendant les expérimentations était impossible pratiquement, en raison du volume qui aurait été nécessaire à prélever pour cela, ou du risque de perturbation des solutions si l'on avait procédé à la mesure directement dans les flacons exposés dans les différentes conditions d'expérience). Les résultats sont donnés dans le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Valeurs du pH des solutions de pyranine préparées avec de l'eau ultrapure et conservées à l'obscurité au terme des expérimentations de 6 mois.

| | Solution à 0,1 g/L | Solution à 10 µg/L | Solution à 25 µg/L | Eau ultrapure |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------|
| t_0 | 5,49 | - | - | 5,95 |
| 6 mois à t ambiante | - | 7,60 | 6,67 | 7,10 |
| 6 mois à 4 °C | - | 8,57 | 7,05 | - |
| 6 mois à 40 °C | - | 7,49 | 7,83 | - |

On constate une forte augmentation du pH dans tous les cas, par rapport à des solutions dont le pH maximum à t_0 ne pouvait dépasser celui de l'eau ultrapure (5,95 : Tableau 7). Une part de cette augmentation peut provenir de l'évolution de l'eau ultrapure elle-même, qui voit son pH augmenter d'une unité au bout des 6 mois (à 7,1 : Tableau 7), mais 4 des solutions de pyranine voient leur pH augmenter encore plus, entre 7,60 et 8,57 (Tableau 7), sans qu'on puisse trouver de facteur logique (température ou concentration) qui pourrait être à l'origine de ces évolutions. Trois d'entre elles sont cependant celles dont l'intensité de fluorescence s'effondre dès les premiers jours de suivi (la solution à 10 µg/L placée au froid et les solutions exposées à 40°C : comparer Figure 30 et Tableau 7). Leur augmentation de pH, si elle s'est produite dès les premiers jours d'exposition, pourrait donc être à l'origine de leur chute d'intensité de fluorescence, puisque, comme on l'a vu ci-dessus, celle-ci la subit au-dessus de pH 6.

Les solutions placées à l'étuve, qu'elles aient été préparées avec de l'eau ultrapure tamponnée ou pas, voient par la suite leur intensité résiduelle de fluorescence augmenter régulièrement avec le temps. Lors du 1^{er} projet, ce phénomène avait été constaté à EWTS pour des flacons insuffisamment étanches, conduisant à une évaporation progressive de l'eau et donc la concentration en traceur des solutions (Défarge *et al.* 2020). Ce facteur ne peut pas être en cause cette fois-ci, en raison de la qualité des flacons utilisés à CETRAHE (les mêmes pour tous les traceurs, alors que ce phénomène n'est constaté que

pour la pyranine : voir Défarge *et al.* 2020 pour les 6 premiers traceurs et sections 3.1.4.8 à 3.1.4.10 ci-dessous pour les 3 autres), et des précautions particulières prises au moment du rebouchage pour éviter ces artéfacts.

Les mesures effectuées après qu'on a attendu que les solutions placées à l'étuve et au réfrigérateur reviennent complètement à la température du laboratoire à la fin des 6 mois de suivi, comparées à l'eau restée continuellement à l'obscurité, montrent une évolution conforme à la littérature : les solutions qui se réchauffent (passant du réfrigérateur à la température ambiante) voient leur intensité baisser, et celles qui se refroidissent (sorties de l'étuve) leur intensité augmenter (Figure 30). Toutefois, elles sont loin de se rejoindre avec celles conservées à la température du laboratoire, ou quand c'est le cas, c'est par évolution de l'intensité résiduelle de ces dernières, qui voient leur intensité résiduelle s'effondrer (Figure 30) ; elles remontent toutefois 3 jours plus tard, à un niveau proche pour celle à la concentration de 25 µg/L. Des mesures prises ensuite 3 jours de suite montrent que les intensités résiduelles des deux solutions remontent dans les mêmes proportions, sans que cela soit lié à une baisse de la température ambiante (Figure 30). Ce comportement des solutions de pyranine est inédit quand on le compare à celui des traceurs étudiés au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), y compris celui de la sulforhodamine B, qui est le plus sensible à la température (Tableau 9).

Le comportement des solutions exposées à la lumière semble plus facile à expliquer, avec une tendance à la baisse de l'intensité de fluorescence avec le temps, à la seule exception de la solution à 10 µg/L entre 4 et 8 jours, qui voit une remontée de cette intensité à 96-98 %, après une baisse à 50 % au bout de 24 h (Figure 30). La baisse reprend toutefois ensuite, une intensité résiduelle à environ 70 % environ étant atteinte pour cette dernière au bout de 2 semaines, tandis que la solution à 25 µg/L est à 82 % d'intensité résiduelle au bout d'une semaine, et 46 % au bout de 15 jours (Figure 30). Les solutions n'ont plus ensuite qu'une intensité résiduelle de 45 et 27 % à 2 mois, 10 et 2,5 % à 4 mois, et 6 et 1,7 % à 6 mois (Figure 30).

Globalement, le temps de demi-vie de la pyranine en solution exposée à la lumière se situe dans une tranche de 1 semaine à 2 mois, ce qui est beaucoup plus élevé que ce qu'indique la littérature (47 h pour Leibundgut *et al.* 2009 : Tableau 9). Toutefois, lors du 1^{er} projet à CETRAHE, le naphthionate de sodium, dont le temps de demi-vie est du même ordre de grandeur pour Leibundgut *et al.* (2009 : 41 h, voir Tableau 9), avait un comportement similaire (Défarge *et al.* 2020).

Par ailleurs, le 1^{er} projet avait également montré les grandes différences de comportement à la lumière des traceurs en fonction des conditions d'exposition, distinctes dans les deux laboratoires (CETRAHE et EWTS : Défarge *et al.* 2020). Présenter la sensibilité à la lumière des traceurs en termes de demi-vie n'a donc pas de sens pratique, le coefficient de photolyse semblant plus adapté pour comparer les traceurs entre eux (Leibundgut *et al.* 2009 soulignaient déjà que ces taux devaient être considérés comme un minimum, la photolyse pouvant être supérieure dans le milieu naturel par rapport aux conditions du laboratoire).

Nos résultats sont de ce point de vue conformes aux données de Käss (1998, voir Tableau 9), indiquant que la pyranine a une sensibilité à la lumière du même ordre de grandeur que celle du naphthionate de sodium, c'est-à-dire relativement sensible, mais dans une moindre mesure que l'éosine, le traceur le plus sensible parmi ceux que nous avons étudiés, ou que l'uranine (130 à 1000, et 550, respectivement : Tableau 9).

Une dernière observation est que la photolyse de la pyranine est supérieure dans le cas des solutions à 25 µg/L par rapport à celles à 10 µg/L (Figure 30), ce qui est contraire aux indications de Leibundgut *et al.* (2009) pour qui la destruction du traceur est inversement proportionnelle à sa concentration en solution, en expliquant ce phénomène par l'effet protecteur exercé par les molécules exposées les premières, pour celles se trouvant plus au cœur des solutions. Dans le même paragraphe, ces auteurs notent toutefois que Feuerstein & Selleck (1963 ; article non accessible) avançaient quant à eux que la photolyse est indépendante de la concentration dans la gamme 1-100 µg/L, ce que le projet et d'autres de nos travaux précédents avaient plutôt confirmé pour la gamme 1-25 µg/L (Jozja *et al.* 2011a, Défarge *et al.* 2020).

Les solutions conservées à l'obscurité à la température du laboratoire (courbes noires et violette dans la Figure 30) ont globalement une évolution parallèle, quelles que soient l'eau avec laquelle elles ont été préparées (ultrapure ou naturelle) et leur concentration, jusqu'à 2 mois, avec des fluctuations qui pourraient être attribuées pour partie à celles de la température du laboratoire (Figure 30), même si ce traceur n'est pas censé faire partie des plus sensibles à la température (Tableau 9). A partir de 2 mois, l'intensité de fluorescence de la solution à 10 µg/L dans l'eau naturelle baisse progressivement, atteignant une différence de l'ordre de 60 % à 4 mois, et 90 % à 6 mois, par rapport aux solutions dans l'eau ultrapure (Figure 30), qui pourrait donc être attribuée à une biodégradation par les bactéries présentes à la source du Bouillon.

Globalement, ces résultats mettent surtout en évidence que la pyranine est un traceur très instable en solution, difficile à maîtriser analytiquement, et qui de ce point de vue ne serait pas à recommander pour les applications en traçage hydrogéologique.

3.1.4.8. Tinopal

Les résultats obtenus pour le tinopal sont présentés dans la Figure 31 ci-dessous. Les intensités de fluorescence à t_0 du produit dans les trois types d'eau sont, comme dans le cas des autres traceurs étudiés jusque-là (voir sections 3.1.4.1 à 3.1.4.7), plutôt conformes à la littérature, Käss (1998) indiquant en effet une chute rapide de la fluorescence du tinopal en solution au-dessous de pH 7 : l'intensité mesurée est la plus forte pour les solutions préparées avec l'eau ultrapure à pH ajusté par le tampon Tris-HCl à 25 µg/L (pH 7,99 à 0,1 g/L : Tableau 4), suivie par l'eau naturelle (pH 7,71, dont l'intensité est inférieure à celle de la solution tamponnée à 25 µg/L, mais légèrement supérieure à 10 µg/L, voir Figure 31 et Tableau 4), l'intensité la plus faible se rencontrant pour l'eau ultrapure non tamponnée (pH 5,82 ; Figure 31 et Tableau 4).

L'évolution avec le temps des intensités de fluorescence qui est ensuite la plus étonnante est le fait que celles-ci chutent brutalement et rapidement pour toutes celles préparées avec l'eau ultrapure à pH ajusté (courbes en pointillés dans la Figure 31), ainsi que celles préparées avec l'eau naturelle (courbes violettes ; Figure 31), alors que celles préparées avec l'eau ultrapure (autres courbes en traits pleins ; Figure 31) restent relativement stables (à l'exception de celles exposées à la lumière, voir plus loin), et cela quelles que soient leurs concentrations et leurs conditions de conservation (comparer les courbes de la même couleur dans la Figure 31). De plus, la chute est du même ordre dans tous les cas (entre 70,5 et 78 % d'intensité résiduelle ; Figure 31), et les intensités évoluent peu ensuite, l'écart restant globalement le même jusqu'à 6 mois entre les solutions dans l'eau ultrapure et les autres (à l'exception là encore des solutions exposées à la lumière, ainsi que, dans ce cas, celles préparées avec l'eau naturelle : Figure 31).

En raison de la dépendance de l'intensité de fluorescence de ce traceur au pH (voir ci-dessus), on pouvait soupçonner une évolution de celui-ci, mais les mesures réalisées sur toutes les solutions préparées avec l'eau ultrapure tamponnée au terme des 6 mois de suivi ont montré qu'il était resté remarquablement stable, entre 8,10 et 8,19 ; il aurait été de toute façon étonnant que le même phénomène ait affecté dans les mêmes proportions les solutions dans l'eau ultrapure tamponnée et celles dans l'eau naturelle.

L'examen des résultats bruts des mesures de fluorescence (non présentés ici) nous a alors permis de trouver une explication. Les valeurs brutes d'intensité des solutions équivalentes préparées dans l'eau ultrapure, d'un côté, et l'eau ultrapure tamponnée et l'eau naturelle, de l'autre, ne sont pas très éloignées, c'est la correction par l'intensité du pic Raman de l'eau à t_0 qui crée la différence observée. En effet, dans le cas du tinopal, pour des raisons pratiques, les mesures d'intensité de fluorescence à t_0 ont dû être faites en deux séries séparées d'une heure environ, avant lesquelles une mesure d'intensité du pic Raman de l'eau a été faite comme à chaque début de série. Or, au début de la seconde série, qui a inclus justement les solutions dans l'eau ultrapure tamponnée et l'eau naturelle, l'intensité du pic Raman mesurée a été anormalement basse (1300, contre 1679 à 2000 habituellement), tandis qu'elle était de 1600 au début des mesures à t_0 des solutions dans l'eau ultrapure (1^{ère} série), puis de 1460 à 1900 lors des mesures réalisées ensuite jusqu'à 6 mois pour toutes les solutions ; le rapport d'intensité entre les deux (1300 par rapport à 1600) explique alors que les valeurs d'intensité des solutions dans l'eau ultrapure

tamponnée et l'eau naturelle soient ensuite d'environ 75 % inférieures à celles des solutions dans l'eau ultrapure.

Il est à noter que la faible valeur anormale de l'intensité de fluorescence du pic Raman de l'eau au début de la 2^{ème} série de mesures à t₀, traduisant une baisse de l'intensité de la lampe du spectrofluorimètre, celle-ci a dû se produire au moment de ces seules mesures (les triplicats effectués sur l'eau ultrapure) et ne s'est pas prolongée durant les mesures sur les solutions de traceur, sinon la correction Raman aurait été plus juste et n'aurait pas produit les différences artificielles entre les deux séries que met en évidence la Figure 31.

Ces fluctuations ponctuelles de l'intensité de la lampe du fluorimètre, qui peuvent se produire à n'importe quel moment pendant les mesures, et qui du coup ne peuvent être corrigées par l'intensité du pic Raman de l'eau mesurée au début de chaque série, peuvent expliquer les fluctuations ponctuelles inexplicables de l'intensité de fluorescence de certaines solutions, qu'on observe de temps à autre (voir par exemple les évolutions en dents de scie pour certaines solutions de pyranine, Figure 30, et également d'autres courbes dans ce rapport ou celui du 1^{er} projet : Défarge *et al.* 2020).

Parmi ces solutions conservées à l'obscurité, celles dans l'eau naturelle et celles dans l'eau ultrapure tamponnée conservées à 40 °C voient par ailleurs leur intensité de fluorescence baisser progressivement à partir de 2 mois et jusqu'à 6 mois, de 15 à 25 % supplémentaires pour les premières (à 25 et 10 µg/L, respectivement : Figure 31), et 15 % environ pour les secondes (Figures 31). Dans l'eau naturelle, cette baisse pourrait être due à une biodégradation par les bactéries présentes à la source du Bouillon, l'effet étant d'autant plus important que la quantité de tinopal présente au départ est faible, comme cela a déjà été observé pour d'autres traceurs (dans ce rapport et dans Défarge *et al.* 2020).

Dans le cas des solutions dans l'eau ultrapure tamponnée conservées à 40 °C, étant donné que le même effet n'est pas observé pour les solutions dans l'eau ultrapure conservées dans les mêmes conditions (voir Figure 31), la température ne peut pas en être la cause. Le fait que les deux solutions dans l'eau ultrapure tamponnée (à 10 et 25 µg/L) aient été préparées à partir de la même solution mère, pourrait laisser penser à un effet de biodégradation dû à des bactéries présentes dans la poudre au départ et libérées en solution, comme cela a déjà été suggéré dans le cas de solutions de naphthionate de sodium et d'acide amino G (Défarge *et al.* 2020) ; le fait que la poudre de tinopal utilisée soit hygroscopique (Tableau 4) comme celles de ces deux autres traceurs, renforce cette hypothèse, la présence d'eau favorisant la contamination microbienne.

L'absence du même phénomène dans les solutions dans l'eau ultrapure conservées à 40 °C serait alors dû, soit à un effet du pH (les pH plus acides étant moins favorables à l'activité bactérienne que les pH neutres à légèrement basiques : Hasley & Leclerc 1993), soit aux prises d'essai (les bactéries pouvant n'être pas réparties de manière homogène dans la poudre). L'absence du même phénomène pour les solutions dans l'eau ultrapure tamponnée conservées à l'obscurité dans les autres conditions (température du laboratoire et 4 °C ; Figure 31), et donc issues de la même prise d'essai et solution mère de départ, témoignerait alors que la température de 40 °C pourrait avoir tout de même un effet stimulant sur la biodégradation.

Mis à part cette stimulation potentielle de la biodégradation en solution, la température n'apparaît pas comme un facteur majeur dans l'expression de la fluorescence du tinopal, le comportement des solutions conservées à l'obscurité aux 3 températures ambiante, du réfrigérateur et de l'étuve étant similaire (Figure 31).

Nos résultats infirment donc les données répertoriées par Käss (1998), selon lesquelles le tinopal serait le traceur le plus sensible à la température, plus encore que la sulforhodamine B (voir Tableau 9 ci-dessous), alors que la relation inverse entre intensité de fluorescence et température avait bien été mise en évidence lors du 1^{er} projet dans le cas de ce second traceur (voir Défarge *et al.* 2020 ; dans le cas du tinopal, le coefficient de dépendance à la température négatif indiqué correspondrait à une corrélation positive entre intensité de fluorescence et température : Tableau 9).

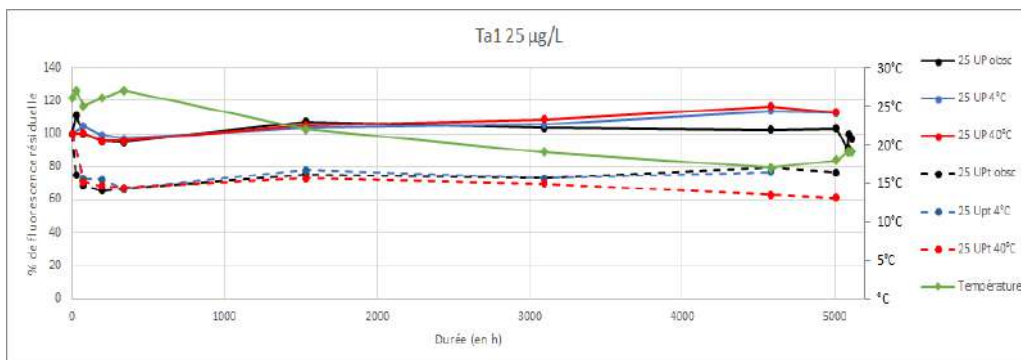
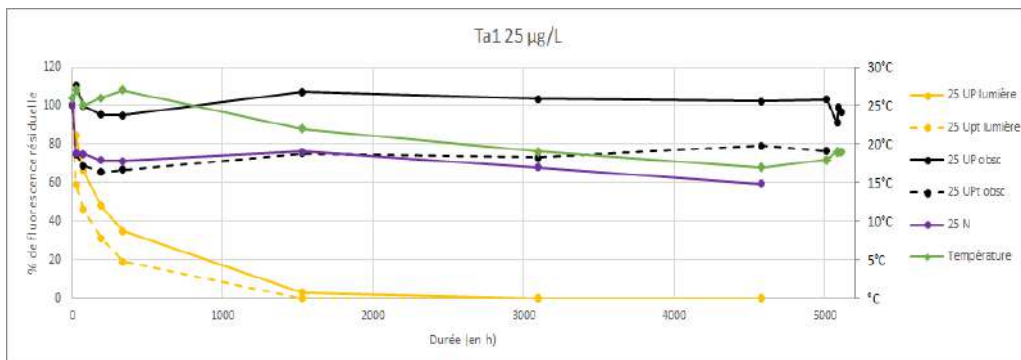
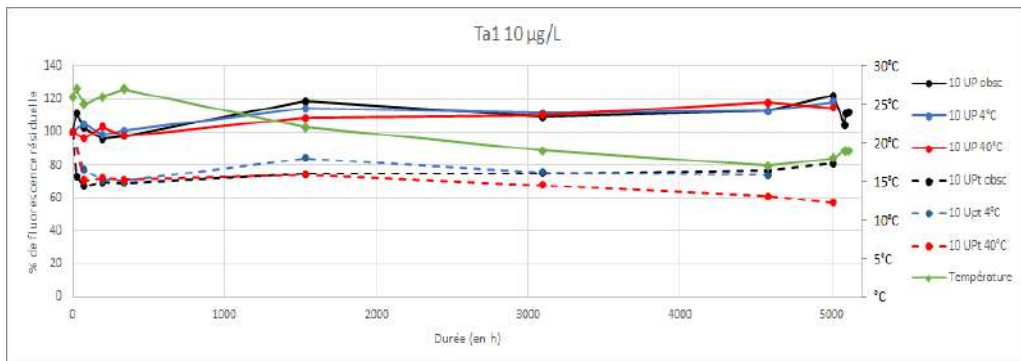
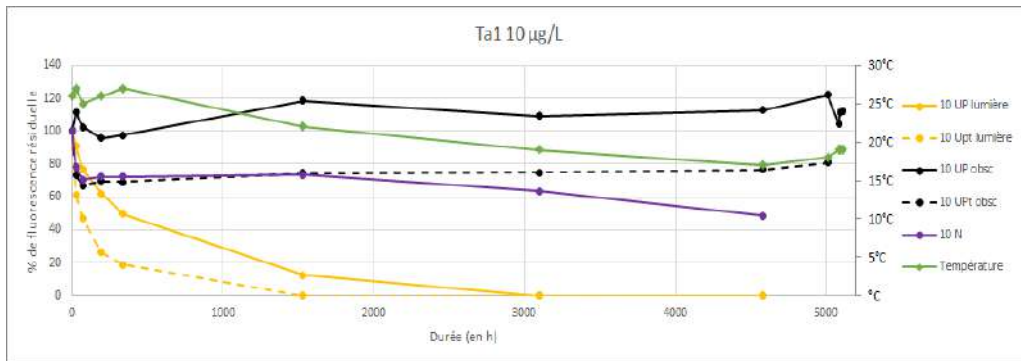
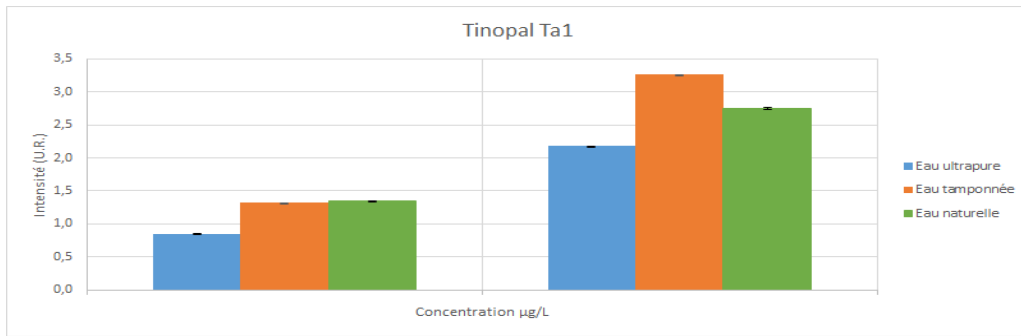


Figure 31 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de tinopal Ta1 de concentrations 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) et d'eau ultrapure à pH ajusté à 9 (Upt), placées dans les 4 conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. En haut intensités à t₀. Au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par concentration, les résultats étant divisés en deux graphes superposés à chaque fois, pour faciliter la lecture ; en vert : température du laboratoire au moment des analyses. Cette dernière courbe et celles des solutions placées à l'obscurité et à la température du laboratoire sont reportées dans tous les graphes, pour faciliter les comparaisons.

Nos résultats (Figure 31) confirment en revanche les données de la littérature (Käss 1998), qui indiquent que le tinopal est le 3^{ème} traceur le plus sensible à la lumière, après l'éosine et l'uranine (avec un coefficient de photolyse de 350, à 1000 et 550 pour les deux derniers, respectivement : Tableau 9). En ne prenant en compte que les solutions dans l'eau ultrapure, puisque celles dans l'eau ultrapure tamponnée ont une fluorescence artificiellement abaissée par la correction Raman, comme argumenté plus haut, leur intensité résiduelle n'est plus que de 84 à 91 % au bout de 24 h, 66 à 77 % au bout de 3 jours, 44 à 62 % au bout d'une semaine, 35 à 50 % au bout de deux, 3 à 13 % au bout de 2 mois, plus aucune trace de tinopal n'étant détectée au bout de 4 mois (Figure 31). Pour les solutions dans l'eau à pH ajusté, le tinopal disparaît au bout de 2 mois (ceci ayant été vérifié en spectrométrie, et n'étant pas dû à la minoration de l'intensité de fluorescence dû à la correction Raman) ; dans ce cas, la différence de photosensibilité entre solutions tamponnées ou pas, pourrait être liée à leurs pH différents, ce facteur ayant un effet sur la photosensibilité d'autres traceurs, comme l'uranine, l'éosine et la pyranine (Käss 1998).

A titre de comparaison, lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), l'éosine exposée à la lumière dans des conditions similaires (mais pas forcément équivalentes, l'intensité de la lumière naturelle n'étant évidemment pas contrôlable) avait perdu la moitié de son intensité de fluorescence au bout de 3 à 15 h d'exposition (selon les séries), et disparaissait entre 1 et 2 semaines, les valeurs pour l'uranine étant de 1 à 3 jours, et 2 mois, respectivement.

Comme dans le cas de la pyranine (voir section 3.1.4.7), la photodégradation du tinopal est supérieure aux plus fortes concentrations dans l'eau ultrapure (25 µg/L, par rapport à 10 µg/L : Figure 31), ce qui infirme une nouvelle fois les assertions de Leibundgut *et al.* (2009).

3.1.4.9. PTSA

Les résultats obtenus pour le PTSA sont présentés dans les Figures 32 et 33 ci-dessous. Les intensités de fluorescence à t_0 du produit dans l'eau ultrapure sont très supérieures à ce qu'elles sont dans l'eau naturelle (même si elles sont plutôt faibles dans les deux cas), ce qui ne semble pouvoir être dû qu'à l'effet du pH, contredisant ainsi les rares données qu'on peut trouver à ce sujet dans la littérature (Wang *et al.* 2021), qui indiquaient que l'intensité de fluorescence de ce traceur était indépendante du pH entre 5,8 (valeur minimale du pH des solutions dans l'eau ultrapure : Tableau 4) et 7,7 (pH dans l'eau naturelle : Tableau 4). Toutefois, nos mesures ayant été faites à 515/537 nm, contre 350/385 nm pour Wang *et al.* (2021), et l'étude des caractéristiques spectrales de ce traceur ayant montré qu'il pourrait avoir un comportement proche de celui de la pyranine (voir section 3.1.2), il pourrait également partager avec ce dernier traceur une dépendance au pH différente selon ses domaines de maximums d'excitation et d'émission distincts (voir 3.1.4.7).

Ces caractéristiques pourraient également être à l'origine du comportement très particulier de ce traceur avec le temps (Figure 32), mais pour partie seulement puisque celui-ci est distinct de celui de la pyranine (comparer Figures 30 et 32), et unique parmi tous les traceurs que nous avons étudiés (voir sections 3.1.4.7 à 3.1.4.10 pour les traceurs étudiés pour la première fois au cours du présent projet, et Défarge *et al.* 2020 pour les six étudiés dès le premier projet). L'intensité des solutions exposées à la lumière est en effet distinctement supérieure à celle des solutions mises à l'obscurité préparées avec la même eau ultrapure, et ce dès 24 h à 3 jours de suivi, d'une part car elle augmente à la lumière par rapport à t_0 (à 134-139 % à 24 h selon la concentration, en se maintenant ensuite jusqu'à 6 mois entre 110 et 140 % pour la solution à 10 µg/L, 133 et 165 % pour celle à 25 µg/L jusqu'à 2 mois, pour baisser ensuite jusqu'à 88 % d'intensité résiduelle à 6 mois : Figure 32), et d'autre part en raison de la chute rapide d'intensité des solutions dans l'eau ultrapure à l'obscurité, quelle que soit la température d'exposition, en particulier à la concentration de 10 µg/L (l'intensité résiduelle de fluorescence n'est plus que de 32 % au bout de 24 h pour la solution conservée à la température du laboratoire, celles à 4 et 40 °C n'ayant pas été analysées dès 24 h en raison du temps d'équilibrage de la température ; au bout de 3 jours, les 3 solutions à 10 µg/L dans l'eau ultrapure à l'obscurité sont à 32 à 45 % d'intensité résiduelle ; la solution à 25 µg/L conservée à l'obscurité à la température du laboratoire est à 73 % d'intensité résiduelle au bout de 24 h, les 3 conservées à l'obscurité à 70 à 89 % au bout de 3 jours : Figure 32) ; l'intensité résiduelle des solutions conservées dans les trois conditions d'obscurité (laboratoire, 4 et 40 °C) évolue peu ensuite jusqu'à 6 mois, quelle que soit la concentration (Figure 32).

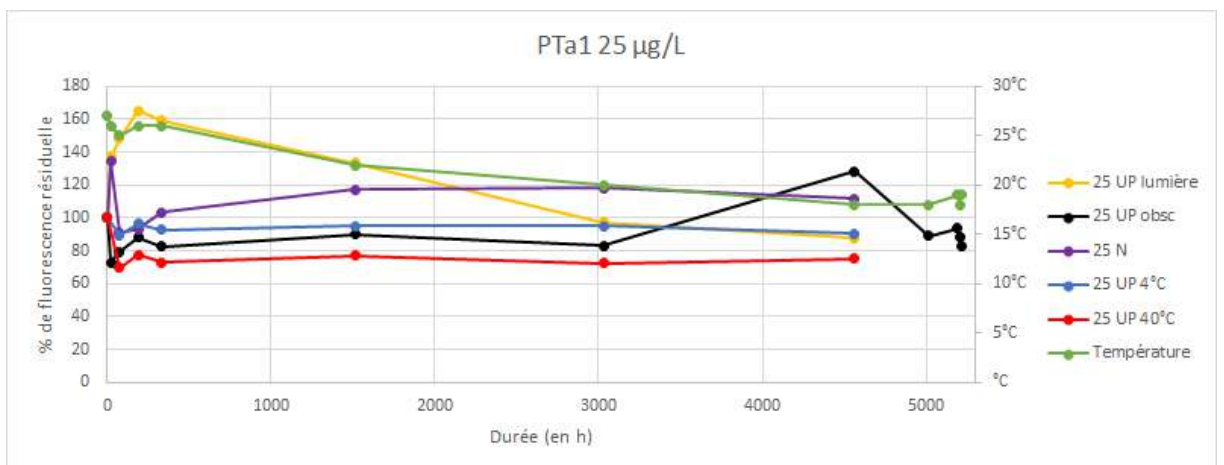
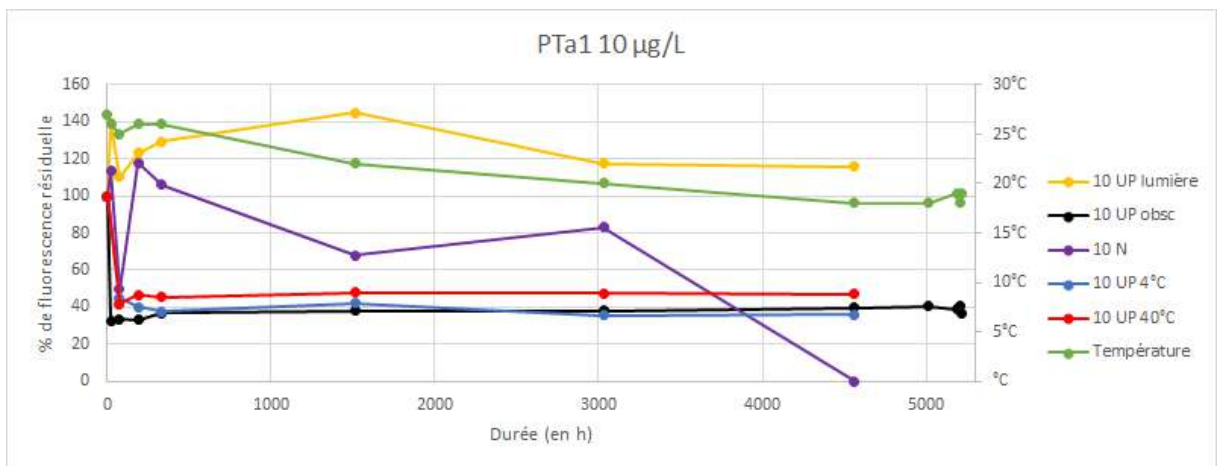
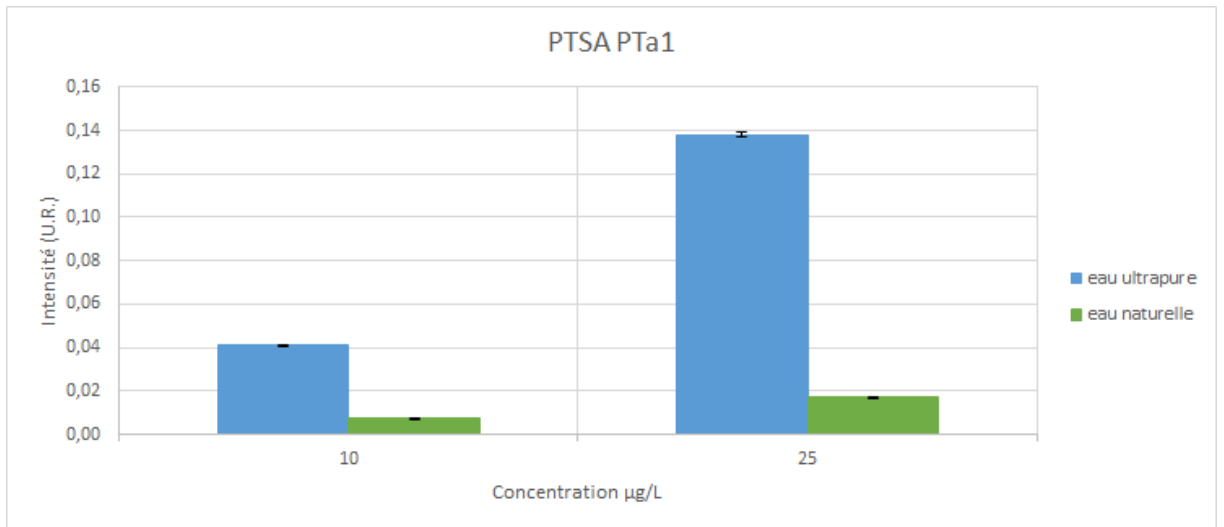


Figure 32 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de PTSA PTa1 de concentrations 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à la température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) placées dans les 4 conditions d'expérience : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. En haut intensités à t₀. Au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par concentration ; en vert : température du laboratoire au moment des analyses.

Par comparaison avec celles préparées avec l'eau ultrapure, les solutions à l'obscurité dans l'eau naturelle ne montrent pas de chute rapide d'intensité de fluorescence (sauf ponctuellement, au bout de 3 jours, pour celle à 10 µg/L, ce phénomène pouvant être dû à une fluctuation ponctuelle de l'intensité de la lampe du spectrofluorimètre non compensable par la correction Raman, voir ci-dessus section 3.1.4.8), leurs intensités résiduelles restant supérieures à celles des solutions dans l'eau ultrapure jusqu'à 6 mois à 25 µg/L, jusqu'à 4 mois à 10 µg/L, plus aucune trace de traceur n'étant ensuite retrouvée au bout de 6 mois dans la solution dans l'eau naturelle de cette dernière concentration (Figure 32) ; ce phénomène pourrait alors être dû à la dégradation du traceur par les bactéries présentes dans cette eau. Il faut toutefois noter que les intensités brutes à t₀ des solutions dans l'eau

naturelle sont très nettement inférieures à celles des solutions dans l'eau ultrapure (72 contre 3,5 pour la concentration à 10 µg/L, 250 contre 21 à 25 µg/L ; résultats bruts non inclus dans ce rapport), en cohérence avec les résultats obtenus pour les solutions à 0,1 g/L (voir Figure 32, haut).

Etant donné la sensibilité particulière au pH de ce traceur, qui pourrait se rapprocher du comportement photoacide de la pyranine (voir ci-dessus et section 3.1.4.7), on a procédé aux mêmes mesures de ce paramètre dans les solutions que dans le cas de ce dernier traceur, une fois les expérimentations à 6 mois terminées (voir Tableau 7). Les résultats sont donnés dans le Tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8 : Valeurs du pH des solutions de PTSA au terme des expérimentations de 6 mois.

| | Solution à 10 µg/L | Solution à 25 µg/L |
|---|--------------------|--------------------|
| Solution dans l'eau UP lumière t laboratoire | 5,75 | 5,86 |
| Solution dans l'eau UP obscurité t laboratoire | - | 6,57 |
| Solution dans l'eau UP à 4 °C | 5,75 | 6,43 |
| Solution dans l'eau UP à 40 °C | 6,72 | 6,64 |
| Solution dans l'eau naturelle obscurité t laboratoire | 7,68 | 7,67 |

N.B. À t₀ le pH de la solution à 0,1 g/L dans l'eau ultrapure était de 6,34 pour une eau ultrapure à 5,82, contre 7,73, et 7,71, respectivement, pour l'eau naturelle (Tableau 4) ; au terme des 6 mois, l'eau ultrapure conservée à l'obscurité à la température du laboratoire était à 6,38, 5,54 pour un aliquote exposé à la lumière, tandis que l'eau naturelle conservée à l'obscurité à la température du laboratoire est à 7,87. Le volume restant de la solution à 10 µg/L dans l'eau ultrapure conservée à l'obscurité à la température du laboratoire était insuffisant pour réaliser une mesure fiable de pH.

Quand on considère leur pH (Tableau 8), on retrouve globalement les trois catégories de solutions se différenciant par l'évolution de leur intensité de fluorescence avec le temps (voir ci-dessus) : les solutions exposées à la lumière ont les pH les plus acides (5,75-5,86), restés proches de celui de l'eau ultrapure qui a servi à les fabriquer (5,82), cette eau ultrapure après exposition à la lumière voyant par ailleurs son pH baisser avec le temps (jusqu'à 5,54) ; les solutions dans l'eau naturelle ont les pH les plus élevés (7,67-7,68), restés également proches de celui de l'eau ayant servi à les fabriquer (7,71), cette eau voyant son pH légèrement augmenter avec le temps (jusqu'à 7,87) ; à l'exception de la solution conservée à 4 °C, les solutions dans l'eau ultrapure conservées à l'obscurité ont des pH intermédiaires (6,43-6,72), et notamment supérieurs de 0,6-0,8 (pour les solutions à 25 µg/L) à 1 unité pH (pour la solution à 10 µg/L conservées à 40 °C) à ceux des solutions équivalentes exposées à la lumière, ainsi qu'à l'eau ayant servi à les fabriquer (5,82 à t₀, 5,54 au terme des 6 mois ; Tableau 8).

L'intensité de fluorescence du PTSA, aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées pour réaliser les mesures, chutant quand le pH de la solution augmente (entre 6,34 et 7,73 à 0,1 g/L : Figure 32, haut, et Tableau 8), les différences de pH mises en évidence au bout de 6 mois peuvent donc globalement expliquer les différences de comportement des solutions avec le temps, puisqu'une relation inverse entre pH et intensité de fluorescence des solutions existe bien pour celles étudiées, celle-ci étant la plus forte à 1-3 jours d'exposition à la lumière (intensité brute de 72, à 10 µg/L, et 250, à 25 µg/L, pour des pH restés dans la gamme la plus acide de 5,75-5,86 ; Tableau 8), la plus faible dans l'eau naturelle (intensité brute de 3,5, à 10 µg/L, et 21,4, à 25 µg/L, pour des pH restés dans la gamme la plus basique de 7,68-7,87 ; Tableau 8), et intermédiaire pour les solutions à l'obscurité dans l'eau ultrapure (intensités brutes de 22 à 30, selon les températures, à 10 µg/L, et 161 à 206, à 25 µg/L, pour des pH intermédiaires de 6,43-6,72, exception faite de la solution à 10 µg/L à 4 °C ; Tableau 8).

Il reste toutefois à expliquer pourquoi le phénomène d'augmentation de pH de 0,6 à 1 unité se traduisant par une chute de l'intensité de fluorescence dans les solutions dans l'eau ultrapure à l'obscurité par rapport aux aliquotes exposés à la lumière, de manière plus accentuée à 10 µg/L qu'à 25 µg/L, se produirait dès 24 h à 3 jours d'expérimentation (voir ci-dessus, Figure 32 et Tableau 8). La mise en solution du PTSA se traduisant par une augmentation du pH de l'eau utilisée pour la préparer (de 5,82 pour l'eau ultrapure, à 6,34 pour la solution à 0,1 g/L, soit 0,5 unité pH : Tableau 4), la cinétique de dissolution de cette poudre peut être invoquée pour les solutions à l'obscurité, phénomène qui serait contrebalancé à la lumière par l'effet acidifiant de celle-ci sur l'eau ultrapure (passée en 6 mois d'un pH de 5,82, à 5,54 à la lumière, et 6,38 à l'obscurité : Tableau 8 ; effet acidifiant dont on n'a pas trouvé d'explication toutefois). Une dissolution incomplète de la poudre de

PTSA au terme des 30 min d'agitation par ultrasons (voir section 2.2), qui se poursuivrait durant les 1 à 3 jours suivants, pourrait alors également expliquer le comportement distinct de certains aliquotes, les particules résiduelles pouvant être inégalement réparties entre eux malgré l'homogénéisation préalable à leur séparation.

Cette hypothèse n'étant toutefois pas parfaitement robuste en raison de phénomènes demeurant inexplicables, il nous restait une dernière vérification à effectuer : l'attribution du pic secondaire identifié par balayage en excitation-émission, au PTSA, jamais cité par aucun autre auteur (voir section 3.1.2). Nous avons donc repris un suivi de 4 nouvelles solutions de PTSA, à 10 et 25 µg/L, exposées à la lumière ou conservées à l'obscurité à la température ambiante, basé sur la mesure de leurs intensités de fluorescence aux longueurs d'onde de deux autres pics identifiés lors de l'obtention d'un second spectre par double balayage, 370/404 nm et 280/385 nm (voir section 3.1.2 et Annexe 1). La comparaison des résultats de ces suivis est donnée dans la Figure 33 ci-dessous.

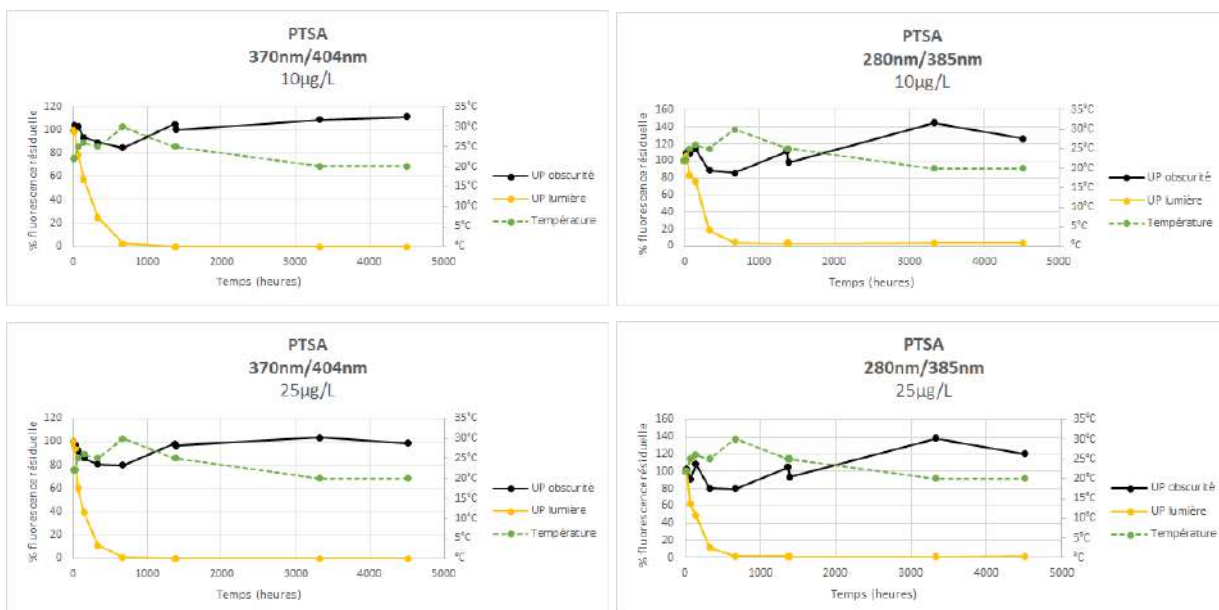


Figure 33 : Evolutions comparées des intensités de fluorescence de solutions de PTSA PTa1 de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau ultrapure, exposées à la lumière ou placées à l'obscurité à température ambiante, pour deux couples de longueurs d'onde d'excitation/émission des pics principaux déterminés par une seconde caractérisation spectrale (370/404 nm et 280/385 nm : Annexe 1).

Les résultats apparaissent cette fois-ci beaucoup plus cohérents, les solutions placées à l'obscurité voyant leur intensité de fluorescence conservée tout au long des 6 mois d'expérimentation, avec des variations pouvant être expliquées par celles de la température, puisque évoluant en sens inverse (Figure 33), et une chute rapide de celle des solutions exposées à la lumière, le pourcentage de fluorescence résiduelle n'étant plus au bout de 3 jours que de 60 à 62 % pour les solutions à 25 µg/L, 79 à 84 % pour celles à 10 µg/L, 39 à 49 %, et 58 à 76 %, respectivement, à 1 semaine, 11 à 12 %, et 19 à 25 %, respectivement, à 2 semaines, pour tomber à quelques % au bout d'un mois (le pic à 370/404 nm n'étant même plus détecté au bout de 2 mois ; Figure 33).

Le pH de toutes les solutions (0,1 g/L, 10 et 25 µg/L, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité) restent tout au long des 6 mois dans une fourchette basse (5,42 à 5,88, pour une eau ultrapure variant de 5,40 à t_0 à 5,50 à la lumière et 5,65 à l'obscurité à 6 mois) correspondant aux conditions de mise en évidence des pics d'excitation et d'émission identifiés lors de cette seconde série (voir section 3.1.2 et Annexe 1), et donc sans passer, comme les solutions de la 1^{ère} série voyant leur intensité de fluorescence chuter brutalement (Figure 32), de conditions de pH plus basiques (> 6,34) mettant en évidence un pic de fluorescence à 515/537 nm, à des conditions où celui-ci disparaît (section 3.1.2 et Annexe 1). **Ces résultats confirmeraient donc le caractère photoacide du PTSA.**

Comme dans le cas de la pyranine et du tinopal (voir sections 3.1.4.7 et 3.1.4.8), la photodégradation du PTSA est supérieure aux plus fortes concentrations dans l'eau ultrapure (25 µg/L, par rapport à 10 µg/L : Figure 33), ce qui infirme une nouvelle fois les assertions de Leibundgut et al. (2009).

3.1.4.10. Riboflavine

Les résultats obtenus pour la poudre Ra1 sont présentés dans la Figure 34. Les intensités de fluorescence à t_0 des solutions préparées avec l'eau ultrapure et l'eau naturelle sont très proches, légèrement supérieures pour les dernières. Ce résultat est cohérent avec ceux de Drössler *et al.* (2002), indiquant que l'intensité de fluorescence de la riboflavine est constante dans la gamme de pH de ces solutions, qui va de 5,73 (eau ultrapure) à 7,52 (pH maximum atteint pour la solution à 0,1 g/L dans l'eau naturelle : Tableau 4). Les intensités légèrement plus fortes dans l'eau naturelle pourraient être dues à la contribution de la fluorescence de MO présentes dans celle-ci, et distinctes de celles formant ses deux composants principaux identifiés par caractérisation spectrale, dont le domaine d'excitation/émission ne recoupe pas celui de ce traceur (voir Annexe 1).

La chute de fluorescence des solutions exposées à la lumière est ensuite très rapide, tombant dès 24 h, pour les solutions à 1 mg/L, à 42,7 % dans l'eau ultrapure, 26,6 % dans l'eau naturelle, et 30,9 % pour la solution à 25 µg/L dans l'eau ultrapure (Figure 34) ; la valeur de 2,2 % pour la solution à 25 µg/L dans l'eau naturelle, remontant ensuite à 20,7 % au bout de 4 jours, puis 37,8 % à 1 semaine, avant de retomber à 6,4 % à 2 semaines (Figure 34), pourrait confirmer l'influence sur ces résultats des composants organiques présents dans l'eau naturelle, dont la part prise à la fluorescence des solutions est plus importante, par rapport à celle du traceur, à la plus faible concentration de 25 µg/L, qu'à 1 mg/L (ce résultat conforte donc notre choix d'avoir choisi, pour tous les autres traceurs, de n'exposer à la lumière que des solutions préparées avec de l'eau ultrapure, pour pouvoir distinguer les effets de la lumière de ceux dus à l'eau naturelle, que ce soit via ses composants organiques fluorescents ou ceux des micro-organismes qu'elle contient).

L'évolution de la fluorescence des trois autres solutions est plus cohérente, avec une chute progressive avec le temps, plus aucune trace de riboflavine n'étant retrouvée dans les solutions à 1 mg/L au bout de 2 mois (les intensités résiduelles de fluorescence à 2 semaines n'étant plus que de 17,9 % dans l'eau naturelle, 10,3 % dans l'eau ultrapure), tandis qu'il en reste toujours la même (très faible : 2,3 %) quantité jusqu'à 6 mois dans la solution à 25 µg/L dans l'eau ultrapure ; plus aucune trace de riboflavine n'est détectée dans la solution à 25 µg/L dans l'eau naturelle au bout de 2 mois (Figure 34).

Comme dans le cas de la pyranine, du tinopal et du PTSA (voir sections 3.1.4.7 à 3.1.4.9), la photodégradation de la riboflavine n'est donc pas moindre à la concentration la plus forte, la différence étant de plus nettement supérieure dans ce dernier cas (1 mg/L par rapport à 25 µg/L, contre 25 à 10 µg/L dans les deux premiers cas), en contradiction avec les assertions de Leibundgut *et al.* (2009), selon lesquelles la photodégradation des traceurs est inversement proportionnelle à leur concentration en solution, en raison d'un effet protecteur exercé par les molécules exposées les premières, pour celles se trouvant plus au cœur des solutions.

Nos résultats sont en revanche tout à fait conformes aux données de la littérature, qui présentent la riboflavine comme un produit hautement photosensible en solution (voir par exemple Huang *et al.* [2004], montrant une photodégradation de 40 % au bout de 24 h d'exposition à la lumière, et 98 % au bout de 96 h, pour une solution de riboflavine à 18,82 mg/L dans l'eau ; Wishner [1964] indique comme donnée généralement admise à l'époque une perte de 30 % de riboflavine dans le lait sous l'effet de la lumière naturelle). Sheraz *et al.* (2014) signalent également que le taux de photolyse de la riboflavine est fortement dépendant du pH, le minimum de photodégradation se situant vers pH 5-6 et croissant ensuite fortement avec le pH jusqu'à pH 10 ; ce phénomène ne semble pas pouvoir être évoqué dans notre cas, puisque les courbes d'évolution à la lumière des solutions de riboflavine dans l'eau ultrapure (dont le pH doit être proche du minimum indiqué par Sheraz *et al.* 2014) et dans l'eau naturelle (dont le pH doit être distinctement supérieur, voir ci-dessus) ne se distinguent guère, sauf par une photodégradation légèrement plus rapide aux pH les plus acides pour la solution à 1 mg/L (voir Figure 34). Sheraz *et al.* (2014) indiquent également que la photodégradation de la riboflavine serait plus importante en conditions anaérobies qu'en conditions oxygénées, ce que nos résultats ne confirment pas non plus (voir Figure 34), puisqu'on peut supposer que les solutions préparées avec une eau naturelle dont la teneur en O₂ dissous était de 9 % (voir section 2.2) pourraient rester proches de cet état de désoxygénation initial, ou en tout cas en être plus proches que les solutions dans l'eau ultrapure.

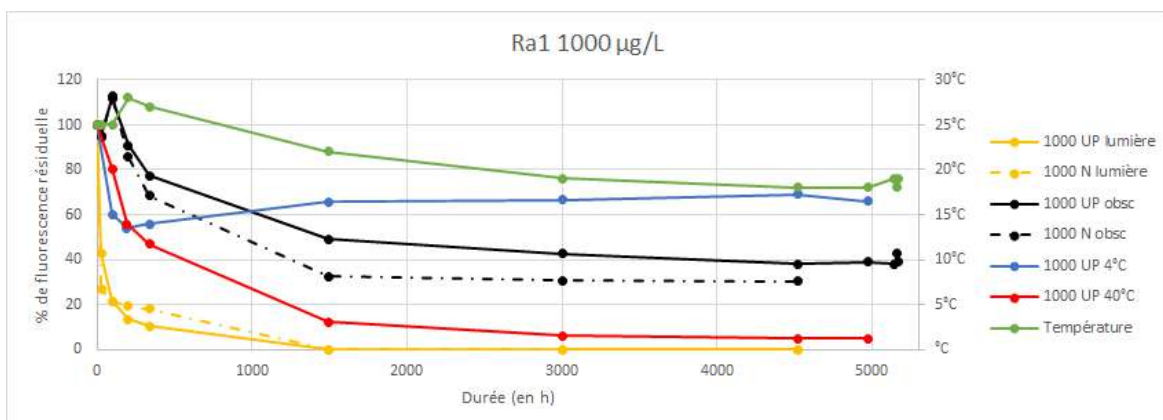
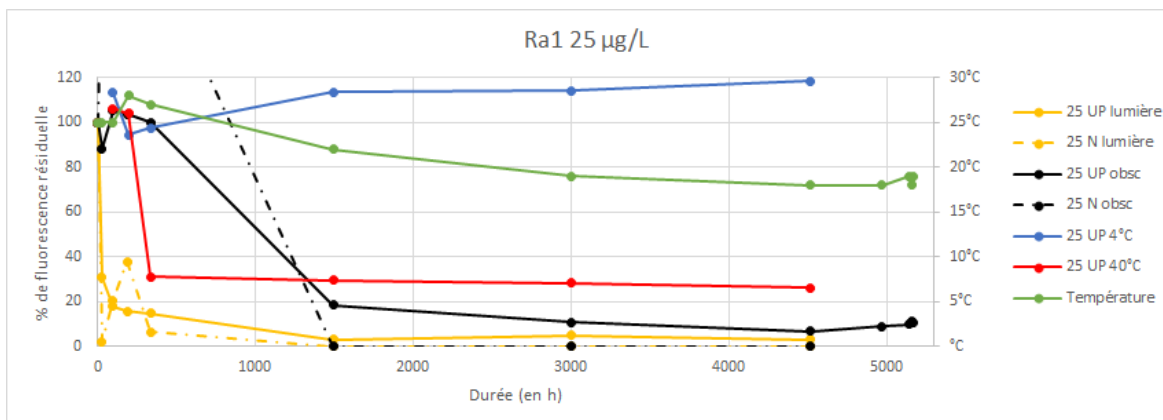
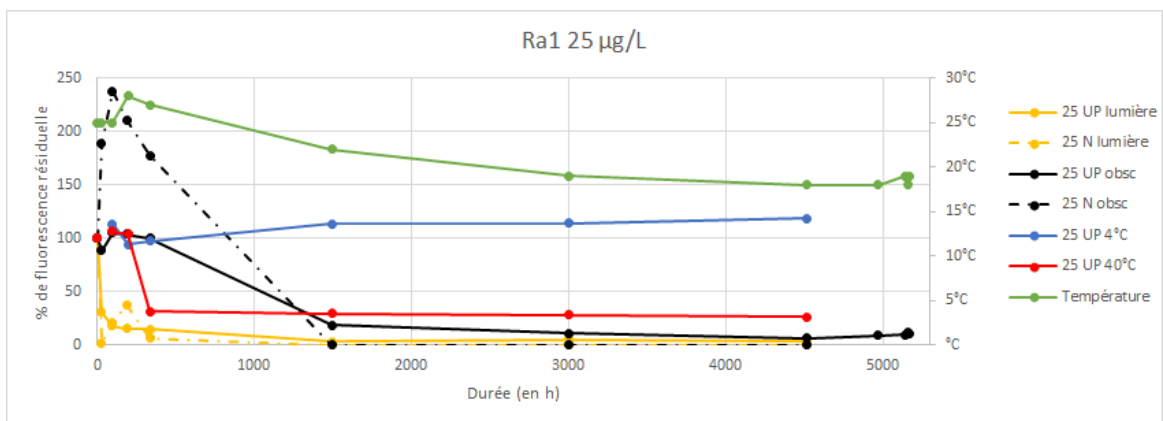
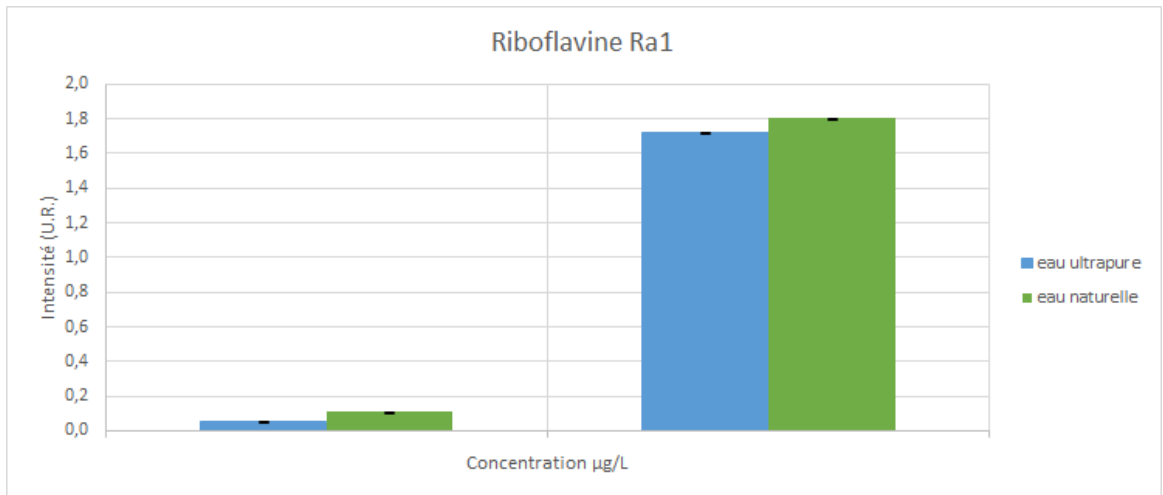


Figure 34 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de riboflavine Ra1 de concentrations 25 et 1 000 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) placées dans les 4 conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C.
 En haut intensités à t₀. Au-dessous évolution jusqu'à 6 mois par concentration ; deux graphes sont portés pour la concentration de 25 µg/L, celui du dessous correspondant à un extrait de celui du dessus, avec une échelle d'intensité résiduelle ramenée à 100 %, ne tenant pas compte des intensités exceptionnelles de la solution dans l'eau naturelle à l'obscurité ; en vert : température du laboratoire au moment des analyses. Cette dernière courbe et celles des solutions placées à l'obscurité et à la température du laboratoire sont reportées dans tous les graphes, pour faciliter les comparaisons.

Le phénomène de chute de l'intensité de fluorescence avec le temps n'est toutefois pas dû qu'à la lumière, puisqu'il affecte toutes les solutions, quelles que soient leurs conditions de conservation (lumière, eau naturelle à l'obscurité, eau ultrapure à obscurité aux trois températures de 4 à 40 °C : Figure 34). La plupart des solutions de riboflavine préparées avec de l'eau ultrapure et conservées à l'obscurité voient leur intensité de fluorescence chuter quasiment de moitié entre 4 et 15 jours de suivi, seule la solution à 1 mg/L à la température du laboratoire n'atteignant ce taux de dégradation qu'au bout de 2 mois (Figure 34). A l'exception de cette dernière solution, et de toutes celles conservées à 4 °C, dont l'intensité résiduelle de fluorescence reste stable après cette première phase de destruction de la fluorescence, les trois autres solutions voient leur intensité résiduelle baisser encore fortement jusqu'à 9 à 16 % entre 2 semaines et 2 mois, pour ne plus baisser que de quelques % jusqu'à 6 mois de suivi (leurs intensités résiduelles de fluorescence terminales se situent entre 4 et 12 % : Figure 34).

Ces résultats ne peuvent se comparer aux données de la littérature que jusqu'à la deuxième mesure d'intensité de fluorescence des solutions conservées à l'obscurité, soit 4 jours, qui est le maximum de suivi de la littérature citée ci-dessus (dans Huang *et al.* 2004). Dans ce laps de temps, ils y sont conformes, l'intensité de fluorescence de ces solutions restant stable jusqu'à 4 jours, sauf dans le cas des solutions à 1 mg/L conservées à 4 et 40 °C, où elle n'est plus que de 60 et 80 %, respectivement. Huang *et al.* (2006) montrent en effet une stabilité de la riboflavine en solution à 18,82 mg/L dans l'eau à l'obscurité et à 30 °C jusqu'à 72 h, alors qu'elle est rapidement dégradée à la lumière dans le même laps de temps ; Huang *et al.* (2004), une dégradation de 3,6 % seulement pour une solution dans l'eau de concentration deux fois inférieure maintenue à l'obscurité à 30 °C pendant 96 h, tandis que sa dégradation atteignait 98 % à la lumière dans le même temps, et 40 % au bout de 24 h d'exposition ; Sheraz *et al.* (2014) indiquent par ailleurs que la riboflavine est thermostable en solution, une dégradation plus importante n'ayant lieu qu'à des températures nettement supérieures à celles que nous avons utilisées comme représentatives du milieu naturel.

Nos résultats à l'obscurité au-delà de 4 jours, inédits dans la littérature consacrée à ce produit, semblent ne pouvoir être interprétés que par la conjugaison de plusieurs facteurs. L'évolution des solutions conservées à 4 °C (stabilité, voire légère augmentation avec le temps, à l'exception de la période de chute de l'intensité de fluorescence à 60 % à 4 jours de la solution à 1 mg/L : Figure 34) pourrait être expliquée à la fois par :

- ▶ l'effet inverse déjà signalé de la température sur l'intensité de fluorescence (celle des solutions à 4 °C variant en sens inverse : Figure 34) ;
- ▶ une inhibition des activités microbiennes (l'intensité de fluorescence des solutions conservées dans l'eau naturelle étant plus faible, sauf pendant les 2 premières semaines pour les solutions à 25 µg/L, que celle des solutions dans l'eau ultrapure : Figure 34 ; des bactéries pourraient donc être présentes dans la poudre et mises en solution même dans l'eau ultrapure, comme cela a déjà été suggéré plus haut pour d'autres traceurs) ;
- ▶ un effet de photolyse pouvant se manifester dans le court laps de temps où toutes les solutions doivent être exposées à la lumière au moment de l'analyse (ce phénomène expliquerait la chute à 60 % de l'intensité de fluorescence à 4 jours de la solution à 1 mg/L : Figure 34 ; il pourrait du coup être aussi impliqué dans les baisses d'intensité des autres solutions conservées à l'obscurité).

Il s'agirait bien d'une conjugaison de facteurs, car l'effet de la température sur les solutions conservées à la température du laboratoire et à 40 °C apparaît moins net (Figure 34) ; il pourrait être masqué dans leur cas par la biodégradation et la photolyse. La forte augmentation, durant les 2 premières semaines, de l'intensité de fluorescence de la solution à 25 µg/L dans l'eau naturelle conservée à la température ambiante, avant sa chute brutale ensuite (Figure 34), pourrait quant à elle provenir d'une production de MO par les microorganismes présents dans ces eaux (voir plus haut), effet qui expliquerait également la remontée ponctuelle de l'intensité de fluorescence de la solution à 25 µg/L dans l'eau naturelle durant sa 1^{ère} semaine d'exposition à la lumière (Figure 34).

3.1.4.11. Bilan des suivis de stabilité et dégradabilité des traceurs analysés

Ces suivis apportent tout d'abord des informations nouvelles, ou complémentaires, par rapport au 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), sur la composante analytique du traçage hydrogéologique à l'aide de traceurs fluorescents. La cinétique de dissolution des poudres

avait été mise en évidence comme facteur explicatif de certains phénomènes observés au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), et peut également être évoquée pour expliquer certains de ceux rapportés ici, dans le cas de l'uranine, de la sulforhodamine G, de la pyranine et du PTSA (voir sections 3.1.4.1, 3.1.4.4, 3.1.4.7 et 3.1.4.9).

Les résultats concernant l'uranine (section 3.1.4.1) pourraient indiquer que sa dissolution complète à partir de la poudre peut demander plus de 12 jours, même après agitation par ultrasons d'une demi-heure au départ, ce qui est une observation à prendre en compte pour les futures analyses au laboratoire.

La confirmation, par les résultats de ce second projet (voir section 3.1.3) que la méthode de correction de l'intensité de fluorescence par l'aire du pic Raman de l'eau préconisée par Lawaetz & Stedmon (2009) ne permet pas d'obtenir des mesures normalisées totalement indépendantes des conditions analytiques (Défarge *et al.* 2020), pourrait trouver une piste d'explication grâce aux conditions particulières dans lesquelles ont dû être réalisés les suivis du tinopal, avec des mesures d'intensité de fluorescence à t_0 en deux séries séparées d'une heure environ, révélant que l'intensité du pic Raman pouvait passer de 1 600 à 1 200 dans ce court laps de temps (voir section 3.1.4.8).

Cette observation montre que des fluctuations ponctuelles de l'intensité de la lampe du fluorimètre peuvent se produire à n'importe quel moment pendant les mesures, qui ne peuvent en conséquence être entièrement corrigées par l'intensité du pic Raman de l'eau mesurée au début de chaque série ; ce phénomène peut expliquer les fluctuations ponctuelles inexpliquées de l'intensité de fluorescence de certaines solutions au cours des suivis, fréquemment notées au cours des deux projets.

L'étude complémentaire menée sur l'acide amino G pour tenter d'expliquer la baisse d'intensité de fluorescence avec le temps de ce traceur dans toutes les conditions d'exposition lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), permet d'écarter le pH comme facteur explicatif, au profit d'une plus probable biodégradation par des bactéries présentes dans les poudres et libérées lors de leur mise en solution (voir section 3.1.4.6), phénomène qui interviendrait également dans le cas du naphthionate de sodium (section 3.1.4.5 et Défarge *et al.* 2020), avec qui l'acide amino G partage un caractère hygroscopique (moins marqué toutefois).

L'absence d'influence du pH sur l'intensité de fluorescence de l'acide amino G entre 3,4 et 7,9 (couvrant nos expériences : section 3.1.4.6) remet par ailleurs en question les résultats 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.

Les résultats obtenus pour la pyranine vis-à-vis du pH semblent cohérents avec son comportement de photoacide décrit par la littérature (voir section 3.1.4.7).

Le PTSA pourrait avoir un comportement proche du point de vue de la dépendance au pH, qui déterminerait des domaines de maximums d'excitation et d'émission distincts selon celui-ci (section 3.1.4.9).

Le comportement du tinopal en fonction du pH semble conforme à la littérature (voir section 3.1.4.8), c-à-d caractérisé par une chute rapide de la fluorescence en solution au-dessous de pH 7 (Käss 1998).

Même si, dans le cas des six traceurs étudiés au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), la température n'était pas cette fois-ci un facteur suivi, les simples variations de celle du laboratoire ont permis de vérifier dans la plupart des cas les résultats obtenus lors du 1^{er} projet et les données de la littérature indiquant que l'intensité de fluorescence varie généralement en sens inverse (à l'exception de l'éosine : Smart & Laidlaw 1977, Käss 1998, Leibundgut *et al.* 2009), avec des coefficients différents selon les molécules considérées (voir Tableau 9 et 5.Glossaire) : la sulforhodamine B y est la plus sensible (voir section 3.1.4.3), l'uranine (section 3.1.4.1) et l'acide amino G (3.1.4.6) dans une moindre mesure, l'éosine (3.1.4.2) très peu ; en ce qui concerne la sulforhodamine G, dont le coefficient de

température serait du même ordre de grandeur que celui de l'uranine (Tableau 9), ou le **naphthionate de sodium**, qui est censé être celui de ces traceurs le plus thermosensible après la sulforhodamine B (Tableau 9), les résultats sont cette fois-ci plus contrastés entre les différentes solutions (voir sections 3.1.4.4 et 3.1.4.5).

Parmi les quatre traceurs véritablement étudiés de ce point de vue au cours du présent projet, la sensibilité à la température de la pyranine, censée être équivalente à celle de l'acide amino G selon la littérature (Tableau 9), n'est pas vraiment mise en évidence par nos résultats (voir section 3.1.4.7).

Quant au tinopal, nos résultats infirment les données de Käss (1998), selon lesquelles il serait le traceur le plus sensible à la température, plus encore que la sulforhodamine B (Tableau 9), puisqu'aucun effet particulier de ce facteur sur l'intensité de fluorescence des solutions n'est constaté (voir section 3.1.4.8) ; son coefficient de dépendance à la température négatif correspondrait dans son cas à une corrélation positive entre intensité de fluorescence et température : Tableau 9).

PTSA et riboflavine, pour lesquelles aucune donnée de thermosensibilité n'est, à notre connaissance, disponible dans la littérature, semblent suivre la loi plus générale d'une relation inverse entre intensité de fluorescence et température (voir sections 3.1.4.9, notamment Figure 33, et 3.1.4.10).

Tableau 9 : Synthèse des principales données disponibles à ce jour sur la sensibilité à la lumière et la dépendance à la température des traceurs fluorescents analysés depuis Défarge et al. (2020).

| | Sensibilité à la lumière | | Coefficient de dépendance à la température | |
|------------------------------|--------------------------------------|---|--|--------------------------|
| | Coefficient de photolyse (Käss 1998) | Temps de demi-vie en h (Leibundgut et al. 2009) | (Käss 1998) | (Leibundgut et al. 2009) |
| Uranine | 550 | 11 | 0,0036-0,0041 | - 0,0041 |
| Eosine | 1000 | 6 | - 0,00036 | 0,00036 |
| Sulforhodamine B | 7,3 | 820 | 0,028-0,029 | - |
| Sulforhodamine G | 8 | 550 | 0,0035 | - 0,0041 |
| Naphtionate de sodium | 150 | 41 | - | - 0,0056 |
| Acide amino G | 80 | - | 0,0019 | - |
| Pyranine | 130 | 47 | 0,0019 | - 0,0019 |
| Tinopal | 350 | - | - 0,0365 | - |

N.B. Les coefficients de photolyse (Käss 1998) sont donnés relativement à celui de l'éosine arbitrairement fixé à 1000. - : absence de données. Coefficient de photolyse, temps de demi-vie, coefficient de dépendance à la température : voir Glossaire. Le temps de demi-vie est donné ici pour servir de comparaison entre les traceurs, mais n'a pas de valeur absolue puisqu'il dépend des conditions de luminosité auxquelles les solutions sont exposées : voir Défarge et al. (2020) et section 3.1.4.7 ci-dessus. Les coefficients de température de Käss (1998) et Leibundgut et al. (2009) ne diffèrent qu'en raison de l'inversion de la formule de calcul utilisée.

Du point de vue de la **photosensibilité**, nos résultats confirment les données disponibles dans la littérature (Tableau 9) :

► le **tinopal** est le 3^{ème} traceur le plus sensible à la lumière (voir section 3.1.4.8, notamment Figure 31), après l'éosine, le traceur le plus sensible parmi ceux que nous avons étudiés, et l'uranine (avec un coefficient de photolyse de 350, à 1000 et 550 pour les deux derniers, respectivement : Tableau 9) ;

► la **pyranine** a une sensibilité à la lumière du même ordre de grandeur que celle du naphthionate de sodium, c'est-à-dire relativement sensible, mais dans une moindre mesure que l'éosine, l'uranine, ou le tinopal (130 à 1000, 550, et 350, respectivement : Tableau 9).

C'est également le cas de la **riboflavine**, même si celle-ci, jamais utilisée comme traceur hydrogéologique jusque-là à notre connaissance, n'a pas fait l'objet d'une détermination de coefficient de photosensibilité similaire à ceux des traceurs fluorescents courants (Tableau 9) : elle est connue pour être un produit hautement photosensible en solution (voir section 3.1.4.10), nos résultats montrant une chute très rapide de l'intensité de fluorescence des solutions dans l'eau ultrapure exposées à la lumière en 24 h, de 100 à 43 % pour la solution à 1 mg/L, et 31 % pour la solution à 25 µg/L (Figure 34).

Le PTSA, qui est en revanche un produit parfois utilisé en traçage, mais qui n'a fait à notre connaissance l'objet d'aucune étude de photosensibilité, s'avère être également relativement photosensible, le pourcentage de fluorescence résiduelle des solutions dans l'eau ultrapure exposées à la lumière n'étant plus au bout de 3 jours que de 60 à 62 % pour les solutions à 25 µg/L, 79 à 84 % pour celles à 10 µg/L, 39 à 49 %, et 58 à 76 %, respectivement, à 1 semaine, 11 à 12 %, et 19 à 25 %, respectivement, à 2 semaines, pour tomber à quelques % au bout d'un mois, plus aucune trace de produit n'étant détectée à 2 mois (Figure 33).

Le PTSA apparaît donc comme un traceur encore plus sensible à la lumière que le tinopal, 3^{ème} traceur le plus photosensible parmi tous ceux étudiés, en ne considérant pas la riboflavine (voir plus haut), surtout au-delà d'1 semaine d'exposition, les résultats de photosensibilité jusqu'à 1 semaine étant du même ordre de grandeur (comparer les résultats ci-dessus avec ceux donnés dans la section 3.1.4.8).

Comme cela avait déjà été mis en évidence par le 1^{er} projet pour les six premiers traceurs étudiés (Défarge *et al.* 2020), la photolyse des quatre autres produits fluorescents étudiés de ce point de vue au cours de ce second projet est supérieure dans le cas des solutions les plus concentrées (25 µg/L par rapport aux solutions à 10 µg/L pour **pyranine**, **tinopal** et **PTSA**, 1 mg/L par rapport à 25 µg/L pour la **riboflavine**), ce qui contredit les assertions de Leibundgut *et al.* (2009) pour qui la destruction du traceur est inversement proportionnelle à sa concentration en solution, en expliquant ce phénomène par l'effet protecteur exercé par les molécules exposées les premières, pour celles se trouvant plus au cœur des solutions.

Dans le cas de la **riboflavine** toutefois, pour laquelle le rapport entre les deux concentrations est nettement plus élevé que dans le cas des neuf traceurs hydrogéologiques, la solution à 1 mg/L dans l'eau ultrapure résiste mieux dans les 24 h (43 % de fluorescence résiduelle, contre 31 % pour la solution à 25 µg/L), et ne subit de photolyse plus importante que la solution moins concentrée qu'à partir d'1 semaine d'exposition (voir section 3.1.4.10, notamment Figure 34). Leibundgut *et al.* (2009) notaient également que Feuerstein & Selleck (1963 ; article non accessible) avançaient quant à eux que la photolyse est indépendante de la concentration dans la gamme 1-100 µg/L, ce que le projet et d'autres de nos travaux précédents avaient plutôt confirmé pour la gamme 1-25 µg/L (Jozja *et al.* 2011a, Défarge *et al.* 2020).

Nos résultats, menés sur une durée et une gamme de concentrations plus étendues que ces autres travaux, apportent donc de la nuance dans les assertions antérieures : au-delà d'une certaine concentration et pendant un certain laps de temps, les molécules fluorescentes photosensibles seraient mieux protégées de la photolyse, comme l'avançent Leibundgut *et al.* (2009) ; la photolyse pourrait être indépendante de la concentration dans une certaine gamme de celle-ci, comme l'avançaient Feuerstein & Selleck en 1963 et le confirment certains de nos résultats antérieurs (Jozja *et al.* 2011a, Défarge *et al.* 2020) ; à partir d'un certain temps d'exposition, la concentration pourrait ne plus avoir d'effet protecteur.

Une contribution de **MO naturelles** présentes dans l'eau de la source du Bouillon à la fluorescence des solutions préparées peut être déduite de nos résultats dans le cas de l'**uranine** (voir section 3.1.4.1), des **sulforhodamines** (3.1.4.3 et 3.1.4.4), du **naphthionate de sodium** (3.1.4.5), de l'**acide amino G** (3.1.4.6) et de la **riboflavine** (3.1.4.10). Dans le cas du naphthionate de sodium, ce peuvent être les MO humiques de type M identifiées au Bouillon, qui fluorescent dans le même domaine (Annexe 1). Les autres MO identifiées au Bouillon sont des composés humiques de type C, repérés par leur pic Ac (ces MO se caractérisent par l'existence de deux pics d'excitation pour la même émission, dont l'un

dans le domaine de l'ultraviolet C : 100-289 nm : Coble *et al.* 2014). Ce pic Ac est dominant, et pourrait donc être accompagné par un pic de type C moins visible, mais qui serait à l'origine de l'augmentation de la fluorescence dans le domaine de l'acide amino G (Annexe 1). Ce dernier phénomène pourrait également concerner le **tinopal** (Annexe 1), sans qu'on puisse le prouver pour ce traceur puisque les différences d'intensité de fluorescence entre les solutions étudiées peuvent aussi bien s'expliquer par leurs différences de pH (voir section 3.1.4.8).

Pour les 4 autres produits, il ne peut s'agir que de **production microbienne**, mais distincte des composés bactériens protéiniques de type T ou B, qui ne fluorescent pas dans les mêmes domaines (voir Annexe 1). On peut donc penser à des pigments, l'eau du Bouillon exposée à la lumière au laboratoire voyant se développer rapidement à l'œil nu un biofilm vert. Si le pic maximal de fluorescence des chlorophylles est généralement donné à des longueurs d'onde d'émission supérieures à 620 nm (McManus & Dawson 1994, Dandonneau & Niang 2007), et ne peut donc interférer avec ceux des produits analysés, les premiers auteurs signalent des émissions supplémentaires du plancton marin à 515-630 nm (sans distinguer ce qui relèverait des chlorophylles et des caroténoïdes), pour une excitation à 488 nm, qui recourent le domaine de l'uranine (voir Annexe 1). Les seconds auteurs montrent que la phycoérythrine, pigment également produit par des algues et des cyanobactéries, possède deux fluorophores, la phycoérythroblinane, et la phycourobiline, dont les domaines de fluorescence sont 540/580 nm, et 490/565 nm, respectivement, et sont donc très proches, pour le premier, du domaine de fluorescence de la sulforhodamine B, et proche, pour le second, de celui de la sulforhodamine G (voir Annexe 1).

Dans le cas de la **riboflavine**, nous n'avons trouvé dans la littérature aucun composé d'origine microbienne qui pourrait fluorescer dans le même domaine d'excitation et d'émission. Le biofilm qui s'est formé à la lumière dans la solution à 1 mg/L préparée avec l'eau du Bouillon est de couleur rouge, et non pas verte.

Des phénomènes de baisse sensible de l'intensité de fluorescence des solutions préparées avec l'eau de la source du Bouillon, par rapport aux solutions des mêmes traceurs dans l'eau ultrapure, semblent pouvoir être expliquées par l'intervention d'une biodégradation par les microorganismes présents dans cette eau naturelle, dans le cas des sulforhodamines (voir sections 3.1.4.3, Figure 25, et 3.1.4.4, Figure 26), du naphthionate de sodium (3.1.4.5, Figure 27), de l'acide amino G (3.1.4.6 et Figure 29), de la pyranine (3.1.4.7) et possiblement du tinopal (3.1.4.8). La différence d'intensité de fluorescence atteint 15-20 % dès les 3 premiers jours d'exposition à l'eau naturelle pour la sulforhodamine B (Figure 25), 10-15 % entre 2 jours et 2 semaines pour le naphthionate de sodium (Figure 27), et 4-8 % à 25 µg/L et 10-17 % à 10 µg/L entre 3 jours et 2 semaines pour la sulforhodamine G (Figure 26).

Pour l'acide amino G, la différence d'intensité n'est notable qu'à partir de 4,5 à 6 mois (Figure 29), durée rarement atteinte par les opérations de traçage courantes. En ce qui concerne la pyranine, une baisse d'intensité comparable n'a lieu que dans le cas de la solution à 10 µg/L, et à partir de 2 mois seulement, la différence d'intensité de fluorescence avec la solution dans l'eau ultrapure étant de l'ordre de 60 % à 4 mois, et 90 % à 6 mois ; la baisse est moins marquée pour la solution à 25 µg/L, même si l'intensité de fluorescence de la solution préparée avec l'eau naturelle est également distinctement inférieure à celle de la solution dans l'eau ultrapure (voir Figure 30).

Le comportement des solutions de **tinopal** est moins évident à interpréter (voir section 3.1.4.8, Figure 31), puisque, si celles conservées dans l'eau naturelle voient leur intensité de fluorescence baisser progressivement à partir de 2 mois et jusqu'à 6 mois, de 15 à 25 %, à 25 et 10 µg/L, respectivement (Figure 31), une baisse de 15 % environ est également observée sur le même laps de temps pour les solutions dans l'eau ultrapure tamponnée conservées à 40 °C (Figure 31), pour lesquelles une biodégradation par les bactéries présentes à la source du Bouillon ne peut évidemment pas être en cause. Les comparaisons avec les autres solutions de tinopal dans l'eau ultrapure conservées à l'obscurité pourrait laisser penser à un effet de **biodégradation dû à des bactéries présentes dans la poudre au départ et libérées en solution** (voir section 3.1.4.8), comme cela a déjà été suggéré dans le cas de solutions de naphthionate de sodium et d'acide amino G au cours du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020) ; le fait que la poudre de tinopal utilisée soit hygroscopique (Tableau 4) comme celles de ces deux autres traceurs au moment de leur analyse pendant le 1^{er} projet, renforce cette hypothèse, la présence d'eau favorisant la

contamination microbienne ; la température de 40 °C pourrait par ailleurs avoir un effet stimulant sur cette biodégradation (voir section 3.1.4.8).

Une consommation des traceurs en solution par des bactéries présentes dans les poudres elles-mêmes pourrait également être évoquée cette fois-ci dans le cas du **naphthionate de sodium** (section 3.1.4.5) et de la **riboflavine** (3.1.4.10). L'absence de caractère hygroscopique des poudres d'acide amino G analysées au cours du présent projet (Tableau 4) expliquerait qu'aucun phénomène de ce type n'a été observé cette fois-ci pour ce traceur.

3.2. Analyses des produits traceurs réalisées à COBRA

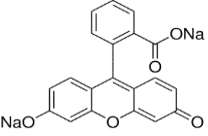
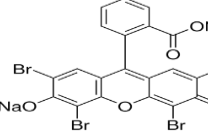
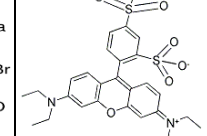
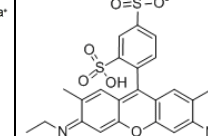
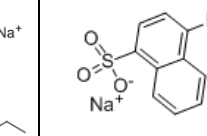
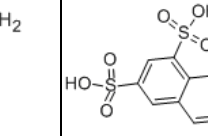
Dans cette partie seront présentés les résultats des analyses de composition des produits traceurs réalisées à COBRA sur les 3 années du projet.

3.2.1. Pureté et teneur en eau

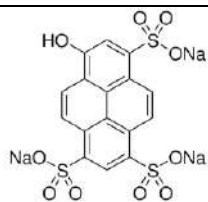
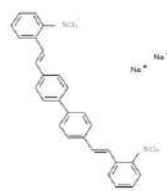
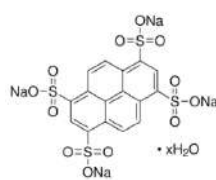
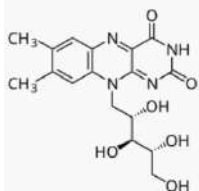
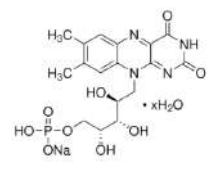
3.2.1.1. Etalons de référence

Des produits de référence de pureté certifiée ont été utilisés pour mener les étalonnages. Les caractéristiques des produits de référence sont données dans le tableau récapitulatif suivant (Tableau 10).

Tableau 10 : 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% |

Suite du Tableau 10 : Caractéristiques des étalons de référence utilisés.

| | PYRANINE | TINOPAL | PTSA | RIBOFLAVINE | RIBOFLAVINE-5'-PHOSPHATE |
|-----------------------|---|---|--|---|---|
| CAS | 6358-69-6 | 27344-41-8 | 59572-10-0 | 83-88-5 | 130-40-5 |
| Formule |  |  |  |  |  |
| Formule moléculaire | $C_{16}H_7Na_3O_{10}S_3$ | $C_{28}H_{20}Na_2O_6S_2$ | $C_{16}H_6Na_4O_{12}S_4 \cdot xH_2O$ | $C_{17}H_{20}N_4O_6$ | $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P \cdot xH_2O$ |
| Masse molaire (g/mol) | 524,39 | 562,56 | 610,43 | 376,36 | 478,33 |
| Solubilité dans l'eau | 271,25 g/L (2) | / | 494 g/L (3) | 100 mg/L (4) | 50 g/L |
| λ utilisées | 280 nm | 350 nm | 470 nm | 270 nm | 270 nm |
| Fournisseur | Sigma Aldrich | TRC | Sigma Aldrich | Sigma Aldrich | Sigma Aldrich |
| Référence fournisseur | H 1529 (2) | TRC-B535200 | 82658-1g | R4500 | F6750 |
| N° lot | BCCG5682 (2) | 1-ZNL-104-1 | BCCJ7891 | WXBD4613V | MKCN2137 |
| Pureté certifiée | 96,5 % | 95 % | 98,5 % | 98 % | 77,8 % |

Les données sur les 6 premiers traceurs ont été obtenues au cours du précédent projet (Défarge et al. 2020).

Source des autres données : (1) <http://www.chemicalbook.com> ; (2) Sigma Aldrich ; (3) https://www.chemos.de/import/data/msds/FR_fr/59572-10-0-A0036058-FR-fr.pdf, consulté le 12 mars 2024 ; (4) Wikipedia, consulté le 6 mai 2022. 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 11 ci-dessous. Toutes les analyses ont été tripliquées.

Tableau 11 : 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 | 6,6 ± 0,3 | - | - | 101,7 |
| | Uf1 | 90,5 ± 0,1 | 7,8 ± 0,2 | - | - | 98,2 |
| | Ua2 | 84,6 ± 6,5 | 6,4 ± 0,3 | - | - | 91,0 |
| | Uf2 | 86,7 ± 0,7 | 6,7 ± 0,2 | - | - | 93,4 |
| Eosine | Ea1 | 87,9 ± 0,8 | 10,7 ± 0,3 | 5,0 ± 0,1 | - | 103,6 |
| | Ef1 | 89,2 ± 0,5 | 6,3 ± 0,2 | 5,8 ± 0,1 | - | 101,4 |
| | F1Ep3 2022 | 79,4 ± 0,2 | 13,4* | 3,7 ± 0,1 | - | 96,4 |
| | F1Ep3 2019 | 75,7 ± 2,2 | 6,1 ± 0,8 | - | - | 81,8 |
| | Ea2 | 88,1 ± 1,5 | 0,2 ± 0,1 | 2,6 ± 0,2 | - | 90,9 |
| | Ef2 | 83,9 ± 0,7 | 5,7 ± 0,5 | 1,6 ± 0,1 | - | 91,2 |
| Sulforhodamine B | SBa1 | 96,2 ± 4,4 | 8,0 ± 0,3 | < 2 | - | 104,2 |
| | SBf1 | 52,3 ± 0,2 | 6,2 ± 0,2 | 2,2 ± 0,1 | - | 60,7 |
| | F1SBp1 2022 | 50,2 ± 0,5 | 4,9** | < 2 | - | 55,1 |
| | F1SBp1 2017 | 59,0 ± 2,5 | 4,9 ± 0,5 | - | - | 63,9 |
| | F2SBp1 2022 | 50,7 ± 0,9 | 4,9** | < 2 | - | 54,7 |
| | F2SBp1 2017 | 58,9 ± 2,0 | 4,9 ± 0,1 | - | - | 63,8 |
| | F2SBp3 2022 | 38,5 ± 0,9 | 4,0** | 4,1 ± 0,2 | - | 46,6 |
| | F2SBp3 2019 | 49,5 ± 1,0 | 4,0 ± 0,2 | - | - | 53,5 |
| | SBa2 | 94,5 ± 2,3 | 4,5 ± 0,2 | - | - | 99,0 |
| | SBf2 | 90,7 ± 1,1 | 7,0 ± 0,4 | 4,4 ± 0,1 | - | 102,0 |
| SBf2bis | 86,4 ± 3,3 | 1,6 ± 0,5 | - | - | 88,0 | |
| Sulforhodamine G | SGa1 | 48,8 ± 1,9 | 11,5 ± 0,8 | 18,1 ± 0,9 | 45,9 ± 1,7 | 124,4 |
| | SGf1 | 34,7 ± 4,5 | 5,6 ± 0,2 | 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 ± 8,2 | 12,5 ± 0,3 | Non réalisé | | 81,4 |
| | SGf2 | 28,8 ± 1,9 | 1,4 ± 0,3 | 2,9 ± 0,3 | 15,0 ± 2,9 | 33,1 |
| Naphthionate de sodium | NSa1 | 80,6 ± 1,2 | 20,3 ± 0,1 | - | - | 100,9 |
| | NSf1 | 83,3 ± 1,2 | 20,5 ± 0,1 | - | - | 103,8 |
| | NSa2 | 78,2 ± 4,9 | 20,7 ± 0,4 | - | - | 99,0 |
| | NSf2 | 67,8 ± 3,0 | 21,3 ± 0,5 | - | - | 89,2 |
| Acide amino G | AGa1 | 95,3 ± 1,5 | 2,6 ± 0,1 | - | - | 97,9 |
| | AGf1 | 93,0 ± 0,7 | 2,2 ± 0,1 | - | - | 95,2 |
| | AGa2 | 96,7 ± 5,6 | 3,1 ± 0,1 | - | - | 99,8 |
| | AGf2 | 96,5 ± 5,7 | 3,0 ± 0,2 | - | - | 99,5 |
| Pyranine | Pa1 | 91,0 ± 1,0 | 7,5 ± 1,0 | - | - | 98,5 |
| Tinopal | Ta1 | 85,3 ± 1,6 | 2,1 ± 0,1 | 4 ± 0,3 | - | 91,4 |
| PTSA | PTa1 | 83,9 ± 0,4 | 10,6 ± 0,9 | - | - | 94,5 |
| Riboflavine | Ra1 | 16,6 ± 0,5 | 10,7 ± 2,0 | 61,6 ± 2,0 | - | 88,9 |

Trois sulforhodamines B et une sulforhodamine G du premier projet ont été réanalysées avec les produits de la 1^{ère} année du présent projet (2022) ; leurs teneurs en traceur mesurées lors du premier projet (2017-19) sont alors portées dans une ligne au-dessous des teneurs obtenues en 2022.

* Une seule analyse réalisée par manque d'échantillon restant.

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

- : Non détecté.

Les **acides amino G** et **uranines** analysées lors du présent projet (Tableau 11) ont des puretés équivalentes aux meilleurs produits du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020). **Pyranine**, **tinopal** et **PTSA**, analysés pour la 1^{ère} fois, sont de qualité équivalente (Tableau 11).

Les sulforhodamines B sélectionnées par les fournisseurs partenaires pour le présent projet atteignent la même qualité, très supérieure à celle des produits du 1^{er} projet (Tableau 11).

L'échantillon **Ra1** est en fait composé en majorité de **riboflavine-5'-phosphate** et de ses dérivés (représentant 61,6 %) et de **riboflavine** à hauteur de 16,6 % seulement (Tableau 11).

Pour les **sulforhodamines G**, les puretés ne sont pas satisfaisantes, sauf dans le cas de **F1SGp1** (109 % : Tableau 11) : elle est de 124 % pour **SGa1** et de 65 et 33 % pour **SGf1** et **SGf2**, respectivement. La surévaluation de la pureté pour **SGa1** est certainement due à la composition de l'échantillon, et non à un artefact d'analyse. Une sous-évaluation est observée pour **SGf1** et **SGf2**, une partie de la composition de l'échantillon restant donc inexplicée.

Les sulforhodamines G présentent une part d'insolubles non négligeable pour une préparation de l'échantillon de l'ordre de 1g/L d'eau. Des tests de solubilisation montrent que ces particules sont plus solubles dans l'eau à pH basique mais insolubles en milieu organique ; elles semblent se solubiliser pour une concentration maximale de l'ordre de 250 mg/L à température ambiante (la solution reste opaque mais aucun résidu n'est observé après filtration). 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). Cette part d'insolubles entraîne une erreur certaine quant à la détermination de la pureté.

3.2.1.3. Identification des impuretés des sulforhodamines B

► Par MEB-EDX

Une analyse MEB-EDX a été menée sur **SBf1** (Figure 35, Tableau 12). Celle-ci met en évidence la présence de **phosphore** et de **chlore**. Le **sodium** est à 5,5 %, soit une teneur légèrement supérieure à la formule théorique (4 %, selon la composition de la sulforhodamine B : $C_{27}H_{29}N_2O_7S_2Na$). **Des sels de sodium ont probablement été ajoutés.**

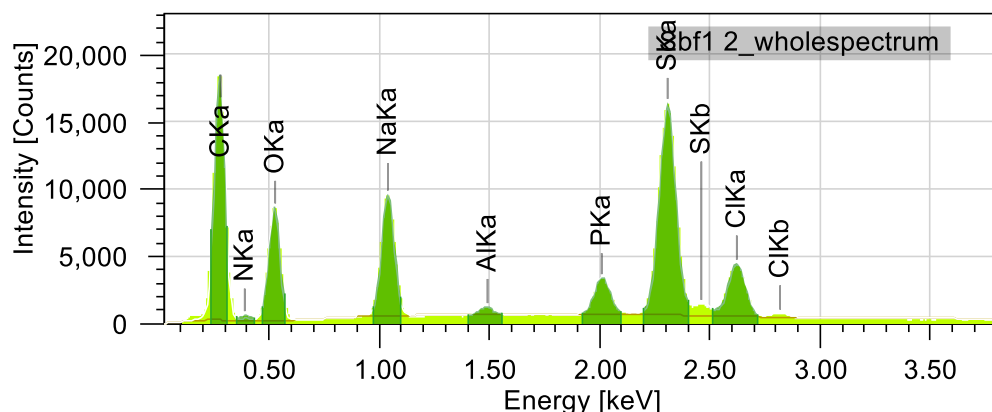


Figure 35 : Spectre MEB-EDX de SBf1

Tableau 12 : Pourcentage massique des éléments présents dans SBf1

| Élément | Pourcentage massique SBf1 | Pourcentage massique théorique |
|---------|---------------------------|--------------------------------|
| C | 54,59 ± 0,24 | 55,8 |
| N | 2,33 ± 0,17 | 4,8 |
| O | 23,91 ± 0,26 | 19,3 |
| Na | 5,48 ± 0,07 | 4,0 |
| Al | 0,27 ± 0,01 | |
| P | 1,57 ± 0,03 | |
| S | 9,07 ± 0,07 | 11,0 |
| Cl | 2,78 ± 0,04 | |
| Total | 100,00 | |

► Par ICP-MS

Une analyse en ICP-MS a été menée sur les sulforhodamines B afin de vérifier les données conclues par MEB-EDX et d'identifier et quantifier les éléments en présence après minéralisation acide. Les teneurs des composés majoritaires sont détaillées en pourcentage massique dans le Tableau 13 ci-dessous.

Tableau 13 : Teneur en sodium et chrome dans les sulforhodamines B

| | Na % massique | Cr % massique |
|-------------|------------------|------------------|
| Standard SB | 1,69 | 0,01 |
| SBf1 | 15,16 | 0,12 |
| F1SBp1 | 15,85 | 0,12 |
| F2SBp1 | 15,63 | 0,13 |
| F2SBp3 | 16,30 | 0,32 |
| Théorie | 3,96 | absence |

Une teneur importante de **sodium** est quantifiée à environ 15 % dans les sulforhodamines, bien supérieure à celle du standard de sulforhodamine B 1,7 %. Du **chrome** a aussi été quantifié dans les sulforhodamines B à environ 0,1 % et 0,3 % dans **F2SBp3**.

► Par LC-MS

Huit impuretés majoritaires ont été mises en évidence dans les sulforhodamines B. 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 14 et Figure 36 ci-dessous. Quelques exemples de chromatogrammes et spectres de masse sont présentés en Annexe 16.

Tableau 14 : 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 connues | 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 - $(C_2H_4)_3$ |

tr : temps de rétention ; m/z : rapport masse sur charge ; DBE : « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques).

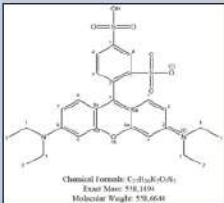
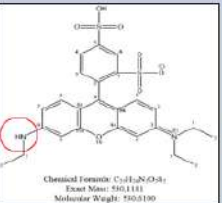
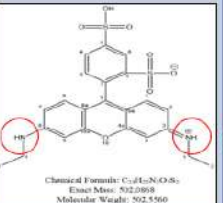
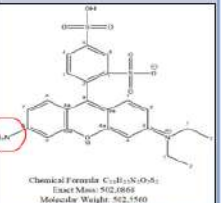
| Molécule | Sulforhodamine B (<i>m/z</i> 559, tr 8,6 min) | Impureté 1 (<i>m/z</i> 531, tr 7,4 min) | Impureté 2 (isomère 1) (<i>m/z</i> 503, tr 6,1 min) | Impureté 2 (isomère 2) (<i>m/z</i> 503, tr 4,8 min) |
|--------------------------|---|---|---|---|
| Structure de la molécule |  |  |  |  |

Figure 36 : 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 15 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 15 : 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 inconnues | 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 |

tr : temps de rétention ; *m/z* : rapport masse sur charge ; DBE : « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques).

Ces impuretés visibles en LC-MS et LC-UV sont des composés dérivés de la sulforhodamine B. La présence de sodium, phosphore et chlore identifiés par MEB-EDX (Figure 35, Tableau 12) et de chrome quantifié par ICP-MS (Tableau 13) mettent en évidence la présence de sels mélangés à ce traceur.

Des analyses complémentaires en chromatographie ionique seraient nécessaires pour les identifier et les quantifier plus précisément afin de déterminer un pourcentage de pureté proche de 100%.

3.2.1.4. Identification des impuretés des sulforhodamines G

► Par MEB-EDX

Une analyse en MEB-EDX a pu mettre en évidence 3,2 %, et 4 %, de **chrome** dans les insolubles de **SGa1**, et **SGf1**, respectivement (Figures 37 et 38 ci-dessous), alors que la composition chimique de la sulforhodamine G (C₂₅H₂₅N₂NaO₇S₂) ne montre pas la présence d'atome de chrome.

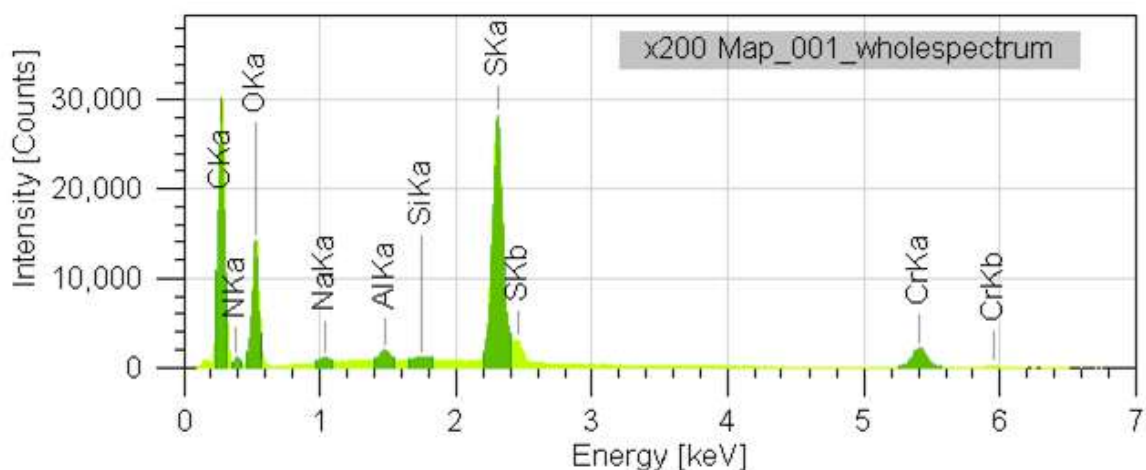


Figure 37 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGa1.

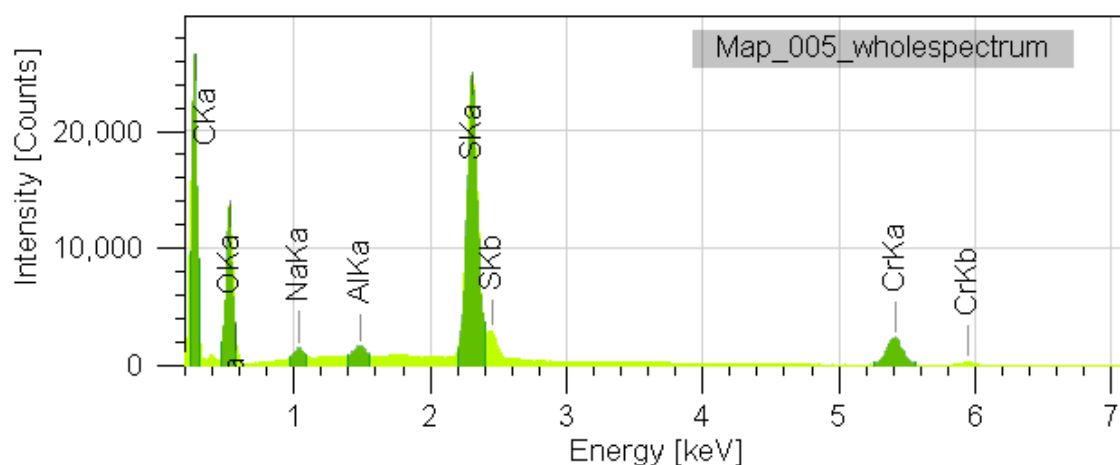


Figure 38 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGf1.

Des études plus approfondies ont été menées en MEB-EDX la 2^{ème} année du projet sur tous les échantillons de sulforhodamine G, dont les spectres sont présentés en Annexe 17. La composition élémentaire de ces échantillons, déduite des analyses MEB-EDX, est présentée Tableau 16. Elle est comparée à la composition théorique de la sulforhodamine G, considérant la formule chimique $C_{25}H_{25}N_2NaO_7S_2$.

Le **chrome** a été mis en évidence dans toutes les sulforhodamines G. Des pourcentages massiques en MEB-EDX inférieurs à 1 % sont caractéristiques mais manquent de précision. Les pourcentages massiques du **soufre** et de l'**oxygène** ne sont pas comparables à la théorie, mais l'oxygène est interféré par le chrome et le soufre par le plomb. Pour le **sodium**, la valeur mesurée est variable, mais l'incertitude sur la mesure est de 1 %.

Tableau 16 : Composition générale des sulforhodamines G en % massique.

| Elément | Standard commercial | F1SG p1 | SG a1 | SG f1 | SG f2 | Théorie |
|---------|---------------------|---------|-------|-------|-------|---------|
| C % | 51,4 | 53,4 | 51,6 | 48,8 | 53,5 | 54,3 |
| N % | 6,8 | 8,2 | 8,2 | 7,4 | 6,9 | 5,1 |
| O % | 28,5 | 26,7 | 25,5 | 27,8 | 28,4 | 20,3 |
| Na % | 3,4 | 2,3 | 3,8 | 4,4 | 3,6 | 4,2 |
| Al % | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,2 | 0,2 | 0 |
| S % | 6,5 | 6,7 | 6,7 | 8,4 | 5,9 | 11,6 |
| Cl % | 0,3 | 0,6 | 2,4 | 0,8 | 0,4 | 0 |
| Cr % | | 1,8 | 1,6 | 1,8 | 1,1 | 0 |
| Fe % | 2,47 | | | | | 0 |

Les valeurs en rouge sont celles qui diffèrent fortement de la composition théorique.

► Par ICP-MS et ICP-AES

La présence d'éléments métalliques a été vérifiée en ICP-MS et ICP-AES. Les teneurs en **calcium**, **sodium**, **chrome** et **plomb** mesurées en ICP-MS sont reportées en pourcentage massique dans le Tableau 17. Les analyses ont été confirmées en ICP-AES (Tableau 18).

Tableau 17 : Teneur en éléments métalliques dans les sulforhodamines G en ICP-MS.

| | Cr % | Na % | Pb % |
|---------|---------|------|---------|
| SGf1 | 0,7 | 16,9 | 0,6 |
| SGf2 | 0,7 | 18,3 | 0,6 |
| SGa1 | 1,7 | 4,1 | 1,5 |
| F1SGp1 | 1,7 | 3,5 | 1,5 |
| Théorie | Absence | 4,2 | Absence |

Tableau 18 : Teneur en éléments métalliques dans les sulforhodamines G en ICP-AES.

| | Cr % | Na % | Pb % |
|---------------------|---------|------|---------|
| SGf1 | 0,7 | 21,5 | 0,6 |
| SGf2 | 0,7 | 22,8 | 0,6 |
| SGa1 | 1,8 | 6,4 | 1,5 |
| F1SGp1 | 1,8 | 5,0 | 1,5 |
| Standard commercial | Absence | 7,4 | Absence |

Par cette technique, il a été mis en évidence précisément les teneurs en chrome et plomb, qui sont bien supérieures aux 5 ppm (mg/kg), soit 0,0005 %, indiqués sur les FDS des traceurs analysés (voir Tableau 2) : **SGf1** et **SGf2** sont composés de 0,7 et 0,6% de chrome et de plomb, respectivement ; **SGa1** et **F1SGp1** en contiennent 1,7 %, et 1,5 %.

► Par chromatographie ionique

La teneur en **sodium** dans les **SGf1** et **SGf2** est bien supérieure à la valeur théorique (17 à 23 %, contre 4 % : Tableaux 17 et 18), ce qui met en évidence l'ajout de cet élément au traceur, probablement sous forme de **sel de sodium**. Les analyses en chromatographie ionique ont été réalisées pour vérifier cette hypothèse, aboutissant aux teneurs en ions **chlorures** et **sulfates** portées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Pureté, teneur inconnue et teneur en ions déterminés par chromatographie ionique (CI).

| | Pureté quantifiée en LC/UV (g/100 g) | TENEUR inconnue (g/100 g) | TENEUR en chlorures en CI (g/100g) | TENEUR en sulfates en CI (g/100g) |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| SGf1 | 65,1 | 34,9 | 1,0 | 33,2 |
| SGf2 | 33,1 | 66,9 | 0,8 | 38,7 |
| SGa1 | 124,4 | 0 | 1,9 | 0,5 |
| F1SGp1 | 109,3 | 0 | x | x |
| Standard commercial | 100,4 | 0 | 0,4 | 0,8 |

x : Non détecté.

La quantification en LC/UV effectuée au cours du précédent projet (Défarge *et al.* 2020) avait montré que la teneur totale était loin des 100 % pour **SGf1** et **SGf2** (65 et 33 %, respectivement : Tableau 19). Des **sels de sulfates** sont bien présents dans **SGf1** et **SGf2** (Tableau 19), confirmant la présence de **sulfate de sodium** dans ces produits. Si ces ions sulfates complètent la composition de **SGf1** (33 % s'ajoutant aux 65 % ; Tableau 19), en ce qui concerne **SGf2**, 28 % des composants du produit restent non identifiés. La teneur inconnue étant très élevée, il est possible que la récupération des sulfates sur la cartouche SPE n'ait pas été totale.

► Par LC-MS

Onze impuretés majoritaires ont été mises en évidence (Tableau 20 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 plus haut Figure 36) et 8 impuretés inconnues (Tableau 21 ci-dessous, exemple pour **SGf1**).

La part des particules difficilement solubles des sulforhodamines G a été analysée en LC-MS sur un Orbitrap. Trente pics ont été détectés, avec la présence de 6 isomères (matérialisés avec des couleurs dans le Tableau 22). **Les formules moléculaires proposées des différentes impuretés sont majoritairement de même nature.** Certaines molécules ont déjà été observées dans la partie soluble des SG (Tableaux 20 et 21). Il est important de noter que les analyses réalisées sur les insolubles de **SGf2** ont été réalisées sur un appareil plus sensible, par conséquent, il est probable que certaines impuretés décrites ici soient également présentes dans les solubles des produits SGf.

Tableau 20 : Impuretés connues des sulforhodamines G (SGf1 et SGa1).

| Produit | tR (min) | m/z expérimentale | m/z théorique | Erreur (ppm) | Formule brute proposée | DBE | Forme | Espèce |
|-------------|----------|-------------------|---------------|--|--|--------------------|--------------------|-------------|
| SGf1 | 7,6 | 531,1270 | 531,1260 | 1,9 | C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | SG |
| | | 529,1112 | 529,1103 | 1,7 | C ₂₅ H ₂₅ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 8,7 | 559,1582 | 559,1573 | 1,6 | C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | Impureté SB |
| | | 557,1412 | 557,1416 | -0,7 | C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 4,9 | 503,0934 | 503,0947 | -2,6 | C ₂₃ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | Impureté 2 |
| | | 501,0786 | 501,0790 | -0,8 | C ₂₃ H ₂₁ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| 6,3 | 503,0951 | 503,0947 | 0,8 | C ₂₃ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | Impureté 2 | |
| | 501,0808 | 501,0790 | 3,6 | C ₂₃ H ₂₁ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | | |
| SGa1 | 7,6 | 531,1266 | 531,1260 | 1,1 | C ₂₅ H ₂₇ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | SG |
| | | 529,1111 | 529,1103 | 1,5 | C ₂₅ H ₂₅ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 4,9 | 503,0962 | 503,0947 | 3,0 | C ₂₃ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | Impureté 2 |
| | | 501,0790 | 501,0790 | 0,0 | C ₂₃ H ₂₁ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 8,7 | 559,1563 | 559,1573 | -1,8 | C ₂₇ H ₃₁ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | Impureté SB |
| | | 557,1403 | 557,1416 | -2,3 | C ₂₇ H ₂₉ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| 6,3 | 503,0949 | 503,0947 | 0,4 | C ₂₃ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | Impureté 2 | |
| | 501,0763 | 501,0790 | -5,4 | C ₂₃ H ₂₁ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | | |

tR : temps de rétention ; m/z : rapport masse sur charge ; DBE : « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques). Pour chaque tR, la 1^{ère} ligne correspond à la détection en mode positif ESI(+), la seconde au mode négatif ESI(-).

Tableau 21 : Impuretés inconnues des sulforhodamines G (exemple de SGf1).

| Produit | tR (min) | m/z expérimentale | m/z théorique | Erreur (ppm) | Formule brute proposée | DBE | Forme | |
|---------|----------|-------------------|---------------|--------------|--|------|--------------------|---|
| SGf1 | 7,8 | 685,1345 | 685,1348 | -0,4 | C ₃₂ H ₃₃ N ₂ O ₉ S ₃ | 17,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | 683,1202 | 683,1192 | 1,5 | C ₃₂ H ₃₁ N ₂ O ₉ S ₃ | 18,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 10,1 | 685,1348 | 685,1348 | 0,0 | C ₃₂ H ₃₃ N ₂ O ₉ S ₃ | 17,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | 683,1167 | 683,1192 | -3,7 | C ₃₂ H ₃₁ N ₂ O ₉ S ₃ | 18,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 10,4 | 685,1340 | 685,1348 | -1,2 | C ₃₂ H ₃₃ N ₂ O ₉ S ₃ | 17,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | 683,1207 | 683,1192 | 2,0 | C ₃₂ H ₃₁ N ₂ O ₉ S ₃ | 18,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 7,1 | 517,1146 | 517,1103 | 8,3 | C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | 515,0932 | 515,0947 | -2,9 | C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 6,5 | - | - | - | - | - | - | - |
| | | 515,0934 | 515,0947 | -2,5 | C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 6,1 | 517,1087 | 517,1103 | -3,1 | C ₂₄ H ₂₅ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | 515,0944 | 515,0947 | -0,6 | C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₇ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |
| | 7,9 | 545,1411 | 545,1416 | -0,9 | C ₂₈ H ₂₉ N ₂ O ₇ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | - | - | - | - | - | - | - |
| | 6,7 | 545,1068 | 545,1052 | -2,9 | C ₂₅ H ₂₅ N ₂ O ₈ S ₂ | 13,5 | [M+H] ⁺ | |
| | | 543,0898 | 543,0896 | 0,4 | C ₂₅ H ₂₃ N ₂ O ₈ S ₂ | 14,5 | [M-H] ⁻ | |

- : non détecté ; tR : temps de rétention ; m/z : rapport masse sur charge ; DBE : « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques). Pour chaque tR, la 1^{ère} ligne correspond à la détection en mode positif ESI(+), la seconde au mode négatif ESI(-).

Tableau 22 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans les particules difficilement solubles de la SGf2, ESI+.

| tr (min) | m/z expérimentale | m/z théorique | Erreur (ppm) | DBE | Formule moléculaire | Forme | Molécules supposées |
|----------|-------------------|-----------------|--------------|--------------|--|---------------------|---|
| 2,4 | 185,1648 | 185,1648 | -0,47 | 1,5 | C ₁₀ H ₂₁ ON ₂ | | |
| | 171,1491 | 171,1492 | -0,36 | 1,5 | C ₉ H ₁₉ ON ₂ | | |
| 2,5 | 475,0630 | 475,0628 | 0,36 | 13,50 | C₂₄H₁₉O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | |
| 2,8 | 504,0786 | 504,0781 | 0,91 | 13,50 | C₂₃H₂₂O₈NS₂ | [M+H] ⁺ | |
| 3,0 | 156,1383 | 156,1383 | -0,13 | 1,5 | C ₉ H ₁₈ ON | | |
| 3,1 | 227,1754 | 227,1754 | -0,08 | 2,5 | C ₁₂ H ₂₃ O ₂ N ₂ | | |
| | 272,2333 | 272,2333 | 0,14 | 1,5 | C ₁₄ H ₃₀ O ₂ N ₃ | | |
| 3,5 | 227,1754 | 227,1754 | -0,07 | 2,5 | C ₁₂ H ₂₃ O ₂ N ₂ | | |
| 4,2 | 503,0943 | 503,0941 | 0,46 | 13,5 | C₂₃H₂₃O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | # Impureté 2 |
| 5,2 | 257,1860 | 257,1860 | -0,07 | 2,5 | C ₁₃ H ₂₅ O ₃ N ₂ | | |
| 5,3 | 517,1101 | 517,1098 | 0,72 | 13,5 | C₂₄H₂₅O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | # |
| 5,4 | 559,0663 | 559,0662 | 0,2 | 15,5 | C ₂₅ H ₂₃ O ₇ N ₂ S ₃ | | Plusieurs formules moléculaires proposées |
| | 311,1391 | 311,1390 | 0,18 | 10,5 | C ₁₈ H ₁₉ O ₃ N ₂ | | |
| 5,7 | 547,1208 | 547,1203 | 0,77 | 13,5 | C₂₅H₂₇O₈N₂S₂ | [M+H] ⁺ | |
| 5,8 | 517,1100 | 517,1098 | 0,54 | 13,5 | C₂₄H₂₅O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | # |
| 5,9 | 545,1052 | 545,1047 | 0,86 | 14,5 | C₂₅H₂₅O₈N₂S₂ | [M+H] ⁺ | Plusieurs formules moléculaires proposées |
| | 567,0868 | 567,0866 | 0,38 | 14,5 | C₂₅H₂₄O₈N₂NaS₂ | [M+Na] ⁺ | |
| | 590,1629 | 590,1625 | 0,56 | 13,5 | C ₂₇ H ₃₂ O ₈ N ₃ S ₂ | | Plusieurs formules moléculaires proposées |
| 6,2 | 517,1099 | 517,1098 | 0,34 | 13,5 | C₂₄H₂₅O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | # |
| 6,8 | 531,1259 | 531,1254 | 0,82 | 13,5 | C₂₅H₂₇O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | SG |
| 7,0 | 685,1347 | 685,1343 | 0,56 | 17,5 | C₃₂H₃₃O₉N₂S₃ | [M+H] ⁺ | # |
| 7,6 | 545,1415 | 545,1411 | 0,86 | 13,5 | C ₂₆ H ₂₉ O ₇ N ₂ S ₂ | | # |
| 7,9 | 559,1569 | 559,1567 | 0,32 | 13,5 | C₂₇H₃₁O₇N₂S₂ | [M+H] ⁺ | # SB |
| 9,0 | 685,1347 | 685,1343 | 0,56 | 17,5 | C₃₂H₃₃O₉N₂S₃ | [M+H] ⁺ | # |
| 11,3 | 389,1530 | 389,1530 | 0,24 | 9,5 | C₂₀H₂₅O₄N₂S | [M+H] ⁺ | Plusieurs formules moléculaires proposées |
| 11,5 | 237,1386 | 237,1386 | -0,18 | 9,5 | C ₁₆ H ₁₇ N ₂ | | |
| 12,0 | 451,1687 | 451,1686 | 0,2 | 13,5 | C₂₅H₂₇O₄N₂S | [M+H] ⁺ | |
| | 473,1504 | 473,1506 | -0,23 | 13,5 | C₂₅H₂₆O₄N₂NaS | [M+Na] ⁺ | |
| 13,5 | 237,1386 | 237,1386 | -0,23 | 9,5 | C ₁₆ H ₁₇ N ₂ | | |
| 13,6 | 451,1687 | 451,1686 | 0,28 | 13,5 | C₂₅H₂₇O₄N₂S | [M+H] ⁺ | |
| | 473,1506 | 473,1506 | 0,01 | 13,5 | C₂₅H₂₆O₄N₂NaS | [M+Na] ⁺ | |
| | 283,1441 | 283,1441 | 0,02 | 9,5 | C ₁₇ H ₁₉ O ₂ N ₂ | | |
| 14,5 | 265,1699 | 265,1699 | -0,03 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₁ N ₂ | | |
| 15,0 | 311,1754 | 311,1754 | -0,01 | 9,5 | C ₁₉ H ₂₃ O ₂ N ₂ | | |
| 15,2 | 267,1492 | 267,1492 | 0,01 | 9,5 | C ₁₇ H ₁₉ ON ₂ | | |
| 18,7 | 311,1754 | 311,1754 | 0,14 | 9,5 | C ₁₉ H ₂₃ O ₂ N ₂ | | |
| 19,6 | 295,1805 | 295,1805 | 0,08 | 9,5 | C ₁₉ H ₂₃ ON ₂ | | |
| 21,1 | 309,1962 | 309,1961 | 0,24 | 9,5 | C ₂₀ H ₂₅ ON ₂ | | |

Les espèces écrites en gras ont été détectées en mode positif et en mode négatif. Les différentes couleurs représentent les isomères observés. # : impuretés mises en évidence dans la partie soluble des SG ; tr : temps de rétention ; m/z : rapport masse sur charge ; DBE : « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques).

► Par LDI-MS

Les analyses des insolubles présents dans **SGf1**, **SGa1** et le standard de la sulforhodamine G ont été réalisées avec la source MALDI sur un TIMS-TOF.

Plusieurs ions sont présents dans **SGf1** et **SGa1** mais absents du standard de la sulforhodamine G : m/z 737,08, 1111,15, 1133,14, 1681,17 et 1709,20 (Tableau 23).

Des spectres MS/MS des ions m/z 1111,15 et 1133,13 ont été réalisés. Pour chacun de ces spectres MS/MS, l'ion fragment m/z 531,12 est observé majoritairement. Ces ions sont donc fortement liés à la sulforhodamine G. Les spectres MS/MS des ions m/z 737,08, 1681,17 et 1709,20 n'ont pas pu être réalisés en raison d'une trop faible intensité des ions précurseurs.

Pour les ions présents dans les insolubles de **SGf1** et **SGa1** mais absents du standard de la sulforhodamine G, des propositions de formules ont été faites. Pour chacune de ces propositions les profils isotopiques expérimental et théorique ont été comparés et correspondent aux propositions de formules résumées dans le Tableau 23. Ainsi la sulforhodamine G est retrouvée en LDI-MS sous la forme de dimère et trimère avec la présence de **plomb** et de **chrome**. Ce sont des agrégats non covalents de la sulforhodamine G en présence de plomb et de chrome, qui sont générés dans la source LDI en raison d'une forte concentration en sulforhodamine G d'une part et en plomb et chrome d'autre part

Tableau 23 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans les insolubles SGf1 et SGa1 mais absentes du standard, en LDI-MS

| m/z expérimentale | Formule moléculaire | Forme | Molécules supposées |
|---------------------|----------------------------------|-------------|---------------------|
| 737,0856 | $C_{25}H_{25}N_2O_7S_2Pb$ | $[M+H]^+$ | SG -2H + Pb |
| 759,0685 | $C_{25}H_{24}N_2O_7S_2PbNa$ | $(M+Na)^+$ | |
| 1111,1588 | $C_{50}H_{51}N_4O_{14}S_4Cr$ | $[2M+H]^+$ | 2SG -2H + Cr |
| 1133,1415 | $C_{50}H_{50}N_4O_{14}S_4CrNa$ | $(2M+Na)^+$ | |
| 1709,2014 | $C_{75}H_{76}N_6O_{21}S_6CrNa_3$ | $[3M+H]^+$ | 3SG -3H+ 3Na +Pb |

m/z : rapport masse sur charge.

Les impuretés des sulforhodamines G visibles en LC-UV et LC-MS sont des composés dérivés des sulforhodamines G et B.

Le **chrome** et le **plomb** ont été quantifiés en ICP-MS à des teneurs proches ou supérieures à 1 % dans les sulforhodamines G ; ces teneurs sont bien supérieures à celles indiquées sur les FDS.

Sulfate et chlorure de sodium sont présents dans ces traceurs.

En conclusion des analyses des produits vendus comme sulforhodamines, SBa1 a une pureté proche de 100 %, mais SBf1 et les sulforhodamines F1SBp1, F2SBp1 et F2SBp3 du précédent projet ont une pureté bien inférieure en raison de la présence de sels de sodium. Les impuretés identifiées en LC-MS sont des dérivés de la sulforhodamine B, donc des molécules probablement fluorescentes également. Par ailleurs, environ 0,1% de chrome a été mesuré dans les sulforhodamines B.

Les sulforhodamines G contiennent des teneurs importantes en chrome et en plomb. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs techniques analytiques (MEB-EDX, ICP-AES, ICP-MS et spectrométrie de masse).

Les puretés des sulforhodamines sont très variables, comprises entre 33 et 124 %. Du sulfate de sodium a été identifié dans SGf1 et SGf2, permettant de compléter la composition de SGf1, mais, concernant SGf2, 28 % des composants du produit restent non identifiés.

3.2.1.5. Identification des composants de l'éosine en LC-MS

L'échantillon d'éosine **F1Ep3** a été analysé en LC-MS sur un Orbitrap. Les analyses ont été réalisées en modes d'ionisation positif et négatif, mais seul le mode positif est présenté ici.

En plus de l'éosine présente à 9,8 min, 13 impuretés ont été détectées avec 11 composés différents. **Les formules moléculaires proposées des différentes impuretés sont majoritairement de même nature, proches de celle de l'éosine** (Tableau 24). L'impureté présente à 8,4 min (m/z 333,0760), dont la formule moléculaire ne contient pas de brome, pourrait correspondre à de la **fluorescéine**.

La fluorescéine fluoresce entre 490-492 nm pour l'excitation et 512-520 nm pour l'émission alors que l'éosine fluoresce entre 512-516 nm pour l'excitation et 535-540 nm pour l'émission (voir Annexe 1). Il est tout à fait possible que la fluorescence mesurée résulte des 2 composés en présence.

Tableau 24 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans l'échantillon d'éosine F1Ep3, ESI+.

| tr (min) | m/z expérimentale | m/z théorique | Erreur (ppm) | DBE | Formule moléculaire | Forme | Molécules supposées |
|----------|-------------------|---------------|--------------|------|--|---------------------|---------------------|
| 7,3 | 488,8973 | 488,8968 | 0,98 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₁ O ₅ ⁷⁹ Br ₂ | [M+H] ⁺ | |
| | 510,8790 | 510,8787 | 0,55 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₀ O ₅ ⁷⁹ Br ₂ ²³ Na | [M+Na] ⁺ | |
| 8,4 | 566,8079 | 566,8073 | 1,12 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₀ O ₅ ⁷⁹ Br ₃ | [M+H] ⁺ | |
| | 588,7899 | 588,7892 | 1,13 | 14,5 | C ₂₀ H ₉ O ₅ ⁷⁹ Br ₃ ²³ Na | [M+Na] ⁺ | |
| | 333,0760 | 333,0757 | 0,61 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₃ O ₅ | [M+H] ⁺ | Fluorescéine |
| 9,3 | 580,8234 | 580,8229 | 0,75 | 14,5 | C ₂₁ H ₁₂ O ₅ ⁷⁹ Br ₃ | [M+H] ⁺ | |
| 9,9 | 644,7186 | 644,7178 | 0,83 | 14,5 | C ₂₀ H ₉ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | Eosine |
| | 666,6997 | 666,6997 | -0,04 | 14,5 | C ₂₀ H ₈ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ ²³ Na | [M+Na] ⁺ | |
| 11,0 | 516,9283 | 516,9281 | 0,51 | 14,5 | C ₂₂ H ₁₅ O ₅ ⁷⁹ Br ₂ | [M+H] ⁺ | |
| 12,2 | 580,8234 | 580,8229 | 0,85 | 14,5 | C ₂₁ H ₁₂ O ₅ ⁷⁹ Br ₃ | [M+H] ⁺ | |
| 12,3 | 665,7166 | 665,7157 | 1,25 | 14,5 | C ₂₀ H ₉ O ₄ N ⁷⁹ Br ₄ ²³ Na | [M+Na] ⁺ | |
| | 643,7344 | 643,7338 | 0,99 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₀ O ₄ N ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |
| 12,7 | 594,8392 | 594,8386 | 1,07 | 14,5 | C ₂₂ H ₁₄ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |
| 13,7 | 658,7340 | 658,7335 | 0,78 | 14,5 | C ₂₁ H ₁₁ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |
| 14,3 | 672,7500 | 672,7491 | 1,37 | 14,5 | C ₂₂ H ₁₃ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |
| 14,4 | 643,7344 | 643,7338 | 0,99 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₀ O ₄ N ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |
| 15,0 | 644,7186 | 644,7178 | 0,83 | 14,5 | C ₂₀ H ₉ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |
| | 666,7003 | 666,6998 | 0,56 | 14,5 | C ₂₀ H ₈ O ₅ ⁷⁹ Br ₄ ²³ Na | [M+Na] ⁺ | |
| 15,5 | 643,7344 | 643,7338 | 0,99 | 14,5 | C ₂₀ H ₁₀ O ₄ N ⁷⁹ Br ₄ | [M+H] ⁺ | |

Les différentes couleurs représentent les isomères observés. tr: temps de rétention ; m/z: rapport masse sur charge ; DBE: « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques).

3.2.1.6. Identification des impuretés de la riboflavine en LC-MS

L'échantillon **Ra1** a été analysé en LC-MS sur un Orbitrap. Les analyses ont été réalisées en modes d'ionisation positif et négatif, mais seul le mode positif est présenté ici.

En plus de la riboflavine et la riboflavine-5'-phosphate, 12 impuretés ont été détectées, avec 7 composés différents (Tableau 25). Au regard des formules moléculaires proposées, **toutes les impuretés présentes dans l'échantillon Ra1 sont de même nature, c'est-à-dire proches de la riboflavine et la riboflavine-5'-phosphate.**

Tableau 25 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans l'échantillon Ra₁, ESI+.

| tr (min) | m/z expérimentale | m/z théorique | Erreur (ppm) | DBE | Formule moléculaire | Forme | Molécules supposées |
|----------|-------------------|---------------|--------------|------|---|--------------------|---|
| 3,5 | 519,0680 | 519,0676 | 0,65 | 10,5 | C ₁₇ H ₂₁ O ₁₁ N ₄ P ₂ | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + groupement phosphate (PO ₃ H) + H ₂ O |
| 3,8 | 537,0786 | 537,0782 | 0,62 | 9,5 | C ₁₇ H ₂₃ O ₁₂ N ₄ P ₂ | [M+H] ⁺ | Riboflavine +2PO ₃ H |
| 4,9 | 551,0944 | 551,0938 | 0,89 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₅ O ₁₂ N ₄ P ₂ | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + PO ₃ H +CH ₂ |
| 6,4 | 537,0787 | 537,0782 | 0,84 | 9,5 | C ₁₇ H ₂₃ O ₁₂ N ₄ P ₂ | [M+H] ⁺ | Riboflavine +2PO ₃ H |
| 7,5 | 551,0944 | 551,0938 | 0,89 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₅ O ₁₂ N ₄ P ₂ | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + PO ₃ H +CH ₂ |
| 8,2 | 457,1121 | 457,1118 | 0,50 | 9,5 | C ₁₇ H ₂₂ O ₉ N ₄ P | [M+H] ⁺ | Isomère de la riboflavine-5'- phosphate |
| 8,8 | 551,0944 | 551,0938 | 0,89 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₅ O ₁₂ N ₄ P ₂ | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + PO ₃ H +CH ₂ |
| 12,4 | 457,1120 | 457,1118 | 0,30 | 9,5 | C ₁₇ H ₂₂ O ₉ N ₄ P | [M+H] ⁺ | Isomère de la riboflavine-5'- phosphate |
| 14,7 | 457,1121 | 457,1118 | 0,37 | 9,5 | C ₁₇ H ₂₂ O ₉ N ₄ P | [M+H] ⁺ | Riboflavine-5'-phosphate |
| 20,7 | 471,1276 | 471,1275 | 0,18 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₄ O ₉ N ₄ P | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + CH ₂ |
| 23,0 | 471,1276 | 471,1275 | 0,05 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₄ O ₉ N ₄ P | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + CH ₂ |
| 23,9 | 471,1277 | 471,1275 | 0,37 | 9,5 | C ₁₈ H ₂₄ O ₉ N ₄ P | [M+H] ⁺ | Riboflavine-phosphate + CH ₂ |
| 26,8 | 377,1456 | 377,1455 | 0,02 | 9,5 | C ₁₇ H ₂₁ O ₆ N ₄ | [M+H] ⁺ | Riboflavine |
| 28,4 | 359,1351 | 359,1350 | 0,21 | 10,5 | C ₁₇ H ₁₉ O ₅ N ₄ | [M+H] ⁺ | Riboflavine - H ₂ O |

Les différentes couleurs représentent les isomères observés. tr : temps de rétention ; m/z : rapport masse sur charge ; DBE : « Double Bond Equivalent » = nombre d'insaturation (doubles liaisons et cycles aromatiques).

3.2.2. Bilan des analyses de composition des produits

Les conclusions suivantes peuvent être tirées des analyses des produits traceurs sélectionnés pour ce projet :

► **Uranine.** Les produits sélectionnés par Art E'Color et Fluotechnik sont de très bonne pureté (85 à 95 %), avec une teneur en eau de 6 à 8 % (Tableau 11).

Le produit Art E'Color de la 2^{ème} série (**Ua2**) n'est toutefois pas conforme à la fiche technique du fabricant, puisque sa teneur en traceur est < 90 %, et le produit Fluotechnik de la 1^{ère} série (**Uf1**) a une teneur en eau supérieure (6,7 %) aux « ~ 5 % » indiqués (comparer Tableaux 2 et 11). Toutefois, 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 ont des puretés de 84 à 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 11). D'autres composés ont été détectés et quantifiés à hauteur de 1,6 à 5,8 % (Tableau 11). Les analyses en LC-MS de **F1Ep3** ont montré que les impuretés étaient majoritairement de même nature que l'éosine, une impureté qui ne contient pas de brome pouvant correspondre à de la fluorescéine (Tableau 24).

Les teneurs en eau des produits sont très variables : 0,2 à 10,7 % (Tableau 11).

Parmi le faible nombre d'indications contenues dans les fiches techniques (« pureté minimale : 85 % » pour **Ef1** ; « pureté : 90 % » pour **Ef2** ; « taux d'humidité < 10 % » pour **F1Ep3** : Tableau 2), seule la première est 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).

Si les intensités de fluorescence des produits de la 2^{ème} série sont classées dans le même ordre que les puretés (**Ea2** > **Ef2** > **F1Ep3** : comparer Figure 13 et Tableau 11), ce n'est pas le cas pour ceux de la 1^{ère} série, où, conformément à ce qui avait été observé lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), **F1Ep3** a une intensité de fluorescence intermédiaire entre celles des deux autres produits, qui sont pourtant beaucoup plus riches en éosine (75-79 %, contre 88 et 89 % : Figure 13 et Tableau 11) ; intensité de fluorescence et pureté sont également déconnectées dans le cas de ces deux nouveaux produits, puisque, à teneurs en éosine équivalentes (87,9 et 89,2 % : Tableau 11), le produit **Ea1** montre une intensité de fluorescence distinctement supérieure à celle de **Ef1** (Figure 13), alors que sa teneur en eau est également distinctement supérieure (10,7 contre 6,3 % : Tableau 11).

Ces nouveaux résultats appuient donc l'une des hypothèses émises au terme 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 1,6 à 5,8 % (Tableau 11). Ces composants sont proches chimiquement de l'éosine (voir section 3.2.1.5), et ne s'en distingueraient donc pas par analyse spectrofluorimétrique.

► **Sulforhodamine B.** Quatre des cinq produits sélectionnés ont une pureté équivalente aux meilleures poudres d'uranine et d'acide amino G, tandis que le 5^{ème} (**SBf1**) est dans la gamme de ceux analysés au cours du premier projet (52,3 % : Tableau 11 ; et Défarge *et al.* 2020). Une interrogation persiste sur la présence dans ce produit de composés solubles en phase aqueuse qui ne seraient pas analysables par HPLC, et qui représenteraient 40 % environ de la masse du produit (Tableau 11). Ils pourraient être responsables de sa CE en solution beaucoup plus élevée (57, contre 16 à 24 µS/cm pour les 4 autres : Tableau 4). On peut penser aux sels, métaux et autres minéraux, qui ont été mis en évidence par MEB-EDX (Figure 35 et Tableau 12) et par ICP-MS (Tableau 13) : **sodium, phosphore, chlore et chrome.**

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 11). 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 11), incite à la prudence. La différence pourrait être également due à la dégradation des étalons utilisés pour la détermination de la pureté.

Huit impuretés majoritaires (et/ou produits de dégradation) ont été mises en évidence dans les produits (voir 3.2.1.3). Les impuretés majoritaires, observées en UV et en MS, correspondent à des composés de structure proche de la sulforhodamine B, avec des groupements -C₂H₄- en moins par exemple.

Si les taux de pureté sont conformes à la fiche technique des produits sélectionnés par Art E'Color (Tableau 2), elle ne l'est pas pour le seul produit sélectionné par Fluotechnik à posséder une fiche technique avec une indication de pureté (**SBf2bis** : 86,4 % au lieu de « pureté (HPLC) : 95,5 % » : comparer Tableaux 2 et 11). Du point de vue de la teneur en eau, seul le produit Art E'Color de la 2^{ème} série est conforme (4,5 %, contre ≤ 7 % sur la fiche technique : Tableaux 2 et 11), celui de la 1^{ère} série étant à 8 % ; aucune indication de teneur en eau n'est donnée dans les fiches techniques des produits sélectionnés par Fluotechnik (Tableau 2). **La présence de chrome n'est indiquée nulle part.**

Les teneurs en **chrome** doivent pourtant faire l'objet d'une attention particulière car cet élément est potentiellement toxique pour les organismes vivants présents dans les eaux et pour la consommation humaine : elles peuvent atteindre 0,32 % (Tableau 13), soit un maximum de 3,2 g/kg de poudre utilisée. Ces valeurs sont à comparer à celles données pour le chrome dissous dans deux types de législations, celles régissant l'état écologique, l'état chimique et le potentiel écologique des eaux de surface continentales (visant à préserver la biodiversité aquatique), et celles concernant la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Pour les premières, le Cr apparaît dans l'Arrêté du 27 juillet 2015 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface (JORF 2015, version en vigueur consultée le 15 janvier 2026) comme polluant spécifique de l'état écologique avec une norme de qualité environnementale (NQE) annuelle pour les eaux douces de surface fixée à 3,4 µg/L ; pour les secondes, dans l'Arrêté du 30 décembre 2022 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine (JORF 2022, version en vigueur consultée le 15 janvier 2026) dans les limites de qualité des eaux brutes de toutes origines utilisées pour la production

d'eau destinée à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux de source conditionnées, à une teneur de 50 µg/L.

Pour chaque kg de poudre de sulforhodamine B injectée dans les eaux naturelles, apportant au maximum 3,2 g de Cr au milieu, il suffit donc d'une dilution par 1 000 pour respecter la NQE annuelle garantissant le bon état écologique du milieu (3,4 µg/L), et par 64 pour respecter la limite de qualité des eaux brutes destinées à la consommation humaine (50 µg/L). Les traceurs étant généralement injectés dans les eaux sous forme de solution liquide, le volume de celle-ci pour 1 kg de traceur est déterminé en fonction de la solubilité de la sulforhodamine B dans l'eau, dont la valeur est variable selon les sources : 10 g/L (à 20 °C : Käss 1998) à 50 g/L (Dörfliger *et al.* 2010) pour les ouvrages de référence sur le traçage, 15 à 95,3 g/L dans les FDS transmises par les fournisseurs. Si l'on prend la valeur la moins favorable, 10 g/L, il faudrait donc diluer chaque kg de ce traceur dans 100 L d'eau. Après injection de ce volume de solution, une dilution par 1 000 (voir ci-dessus) est atteinte par diffusion dans 100 m³ d'eau du milieu d'injection, par 64 dans 6,4 m³. En période favorable à un traçage, le débit minimum d'un cours d'eau en France est de l'ordre de quelques m³/s, les niveaux fixés pour le Cr par les différentes réglementations sont donc respectés en quelques secondes à 2 min après l'injection par kg de traceur.

Les teneurs en Cr des poudres de sulforhodamine B ne posent donc pas de problème pour la vie aquatique ou la consommation d'eau des milieux superficiels où ont lieu les injections.

► **Sulforhodamine G.** Comme cela avait été observé lors des mises en solution (voir 3.1.1, Tableau 4), et au cours du précédent projet (Défarge *et al.* 2020), la sulforhodamine G est le seul des 10 produits fluorescents étudiés à comporter une part de **composants insolubles** (ou difficilement solubles) dans toutes ses poudres, part, de plus, variable, et pouvant être non négligeable (15 à 46 % : Tableau 11). Ces particules, insolubles en milieu organique, mais solubles en phase aqueuse en faible concentration ou solubles en milieu basique, contiennent de la sulforhodamine G ainsi que du chrome et du plomb. En effet, des teneurs importantes de chrome et plomb ont été détectées dans les sulforhodamines **SGf1** et **SGa1**. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs techniques analytiques : MEB-EDX (Figures 37, 38 et Tableau 16), ICP-MS (Tableau 17), ICP-AES (Tableau 18) et spectrométrie de masse (Tableau 20).

Les fiches techniques des produits sont de plus très éloignées de la réalité (comparer Tableaux 2 et 11) : le taux d'insolubles du produit sélectionné par Art E'Color est à 46 % au lieu de « < 0,2 % », et les produits sélectionnés par Fluotechnik ne contiennent quant à eux aucune indication de la présence d'insolubles ; leurs puretés respectives sont de 49 %, contrairement à l'indication « pureté [HPLC] : 87 à 91 % », et 29 et 35 % au lieu de « pureté : 89-90 % (min 85 %) ».

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 11).

Onze impuretés (et/ou produits de dégradation) ont pu être mises en évidence (Tableau 20). De même que pour la sulforhodamine B, 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 -C₂H₄- en moins par exemple (Impureté 2 du Tableau 20). Comme dans le cas d'une des sulforhodamines B sélectionnées par Fluotechnik (voir ci-dessus), une interrogation persiste sur la présence de composés solubles en phase aqueuse qui ne seraient pas analysables par HPLC, qui représenteraient 35 % et 67 % environ de la masse des sulforhodamines sélectionnées par ce fournisseur (Tableau 11), et qui expliqueraient la grosse différence de CE observée entre ces produits en solution (environ 100 µS/cm), et celle du produit Art E'Color (17 µS/cm : Tableau 4). Ces espèces sont très certainement les métaux, minéraux ou sels, qui ont été mis en évidence par ICP-MS et MEB-EDX : **chrome, plomb mais aussi sulfates et chlorures de sodium.**

Les teneurs en **chrome** (voir ci-dessus en ce qui concerne la sulforhodamine B), mais également en **plomb**, doivent faire l'objet d'une attention particulière car ces éléments sont potentiellement toxiques pour les organismes vivants présents dans les eaux et pour la consommation humaine : elles sont de 0,7 à 1,8 %, et 0,6 à 1,5 %, respectivement, dans les sulforhodamines G (Tableau 17), soit au maximum 18, et 15 g/kg de poudre utilisée, respectivement. Comme dans le cas du Cr dissous, les valeurs en Pb sont à comparer à celles données dans les législations régissant l'état écologique, l'état chimique et le potentiel

écologique des eaux de surface continentales, et celles concernant la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Pour les premières, le Pb apparaît dans l'Arrêté du 27 juillet 2015 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface (JORF 2015, version en vigueur consultée le 15 janvier 2026) comme polluant concerné pour l'évaluation de l'état chimique avec une NQE pour les eaux de surface correspondant à une concentration maximale admissible (CMA) de 14 µg/L, et dans la Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau (JOUE 2008, version en vigueur consultée le 15 janvier 2026) avec une NQE pour les eaux de surface exprimée en moyenne annuelle de 7,2 µg/L ; pour les secondes, dans l'Arrêté du 30 décembre 2022 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine (JORF 2022, version en vigueur consultée le 15 janvier 2026) dans les limites de qualité des eaux brutes de toutes origines utilisées pour la production d'eau destinée à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux de source conditionnées, à une teneur de 50 µg/L, comme le Cr.

Pour chaque kg de poudre de sulforhodamine G injectée dans les eaux naturelles, apportant au maximum 18 g de Cr et 15 g de Pb au milieu, il suffit donc d'une dilution par 5 300 pour respecter la NQE annuelle garantissant le bon état écologique du milieu (3,4 µg/L de Cr), par 1 100 pour respecter la CMA garantissant le bon état chimique (14 µg/L pour le Pb), par 2 100 pour respecter la NQE en moyenne annuelle (7,2 µg/L pour le Pb), et par 360 pour respecter la limite de qualité des eaux brutes destinées à la consommation humaine (50 µg/L pour le Cr comme pour le Pb). La solubilité de la sulforhodamine G dans l'eau étant de 5 g/L (Dörfliger *et al.* 2010 ; valeur reprise par les FDS transmises par les fournisseurs), il faudrait donc diluer chaque kg de ce traceur dans 200 L d'eau. Après injection de ce volume de solution, une dilution par 5 300 est atteinte par diffusion dans 1 060 m³ d'eau du milieu d'injection, par 360 dans 72 m³. Pour un débit de cours d'eau de quelques m³/s, les niveaux fixés pour le Cr et le Pb par les différentes réglementations sont donc respectés en 1 à 18 min après l'injection par kg de traceur.

Les teneurs en Cr et en Pb des poudres de sulforhodamine G ne posent donc pas de problème, s'ils sont sous forme dissoute, pour la vie aquatique ou la consommation d'eau des milieux superficiels où ont lieu les injections. Il reste qu'une part au moins de ces métaux se trouve dans la fraction difficilement soluble de ces poudres (voir 3.2.1.4), et pourrait donc rejoindre les sédiments de fond de ces masses d'eaux, ou être ingérée directement par un organisme aquatique juste après l'injection. En l'absence de réglementation sur ces aspects, le risque ne peut être estimé, mais semble minime, étant donné les faibles quantités généralement injectées et le caractère ponctuel des opérations.

► **Naphtionate de sodium**. Les puretés des produits sont comprises entre 68 et 83 % (Tableau 11), valeurs globalement semblables à celles de toutes les poudres analysées depuis le premier projet (voir Défarge *et al.* 2020) ; leurs teneurs en eau sont également très proches, de l'ordre de 20 à 21 % (Tableau 11), ce qui en fait le traceur fluorescent à la qualité la plus constante parmi ceux étudiés.

Ces valeurs de pureté sont conformes aux indications des fiches techniques, sauf dans le cas du second produit sélectionné par Fluotechnik, qui est à moins de 68 % contre « 75,0 % » dans la fiche (comparer Tableaux 2 et 11). Les fiches dont dispose ce fournisseur portent par ailleurs des indications de la présence d'insolubles à ~ 0,12 %, qui n'ont pas été détectés par nos analyses (voir Tableau 2).

► **Acide amino G**. Les poudres analysées ont des puretés extrêmement proches (93 à 97 % : Tableau 11), équivalentes à celles des meilleurs produits du premier projet (96-98 % : Défarge *et al.* 2020). Leurs teneurs en eau sont également très proches : 2,2 à 3,1 % (Tableau 11).

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

► **Pyranine**

La pureté du produit **Pa1** sélectionné par Art E'Color est de 91 % avec une teneur en eau de 7,5 % (Tableau 11). Il ne présente pas d'impureté visible en LC-UV. La FDS mentionne une pureté de 77 % (Tableau 2), qui est donc largement sous-estimée.

► **Tinopal**

La pureté du produit **Ta1** sélectionné par Art E'Color est de 85,3 % (affiché environ à 85 % dans la FDS ; Tableau 2) avec une teneur en eau de 2,1 % et une teneur en impuretés non identifiées de 4 % (Tableau 11).

► **PTSA**

La pureté du produit **PTa1** sélectionné par Art E'Color est de 83,9 % (Tableau 11, comme affiché à 85 % dans la FDS : Tableau 2) avec une teneur en eau de 10,6 % (Tableau 11, contre 13 % dans la FDS : Tableau 2). Il ne présente pas d'impureté visible en LC-UV.

► **Riboflavine**

La pureté du produit **Ra1** sélectionné par Art E'Color est de 16,6 % avec une teneur en eau de 10,7 %, et une teneur en riboflavine phosphate et dérivés de 61,6 % (ce qui en fait le composé majoritaire : Tableau 11). Ceci n'est pas clairement affiché sur la FDS (pureté riboflavine ~ 73-79 % ; riboflavine- 5'-phosphate > 95 % ; Tableau 2). Cette composition pourrait être expliquée par le fait que la riboflavine est très peu soluble dans l'eau (0,01 g /100 mL) à 25°C (Wikipedia consulté le 27 janvier 2025), contrairement à la riboflavine phosphate (environ 100 g/L à 20°C (www.sigmaaldrich.com/FR/fr/sds/usp/1535700), consulté le 27 janvier 2025).

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 39 à 44 ci-dessous, qui incluent ceux obtenus sur les produits de ce second projet, 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 un ajustement du pH par tampon Tris-HCl (voir 2.2 et Défarge *et al.* 2020), les produits du premier projet ont été réanalysés en photométrie dans les mêmes conditions que les produits récents.

Les puretés prises en compte dans les Figures 39 à 44 sont celles rapportées à la masse sèche soluble de poudre (eau pour tous les produits + insolubles dans le cas de la sulforhodamine G, non inclus), qui représentent le % de composant fluorescent responsable de la fluorescence des solutions (et donc la masse de ce composant effectivement injectée dans les eaux au cours des opérations de traçage).

3.3.1. Uranine

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 39 ci-dessous. Les résultats obtenus confirment ceux du premier projet (sur une seule série d'analyses à l'époque : Défarge *et al.* 2020), avec de bonnes corrélations entre les deux paramètres ($R^2 = 0,8010$ à $0,8652$: Figure 39 ; 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.

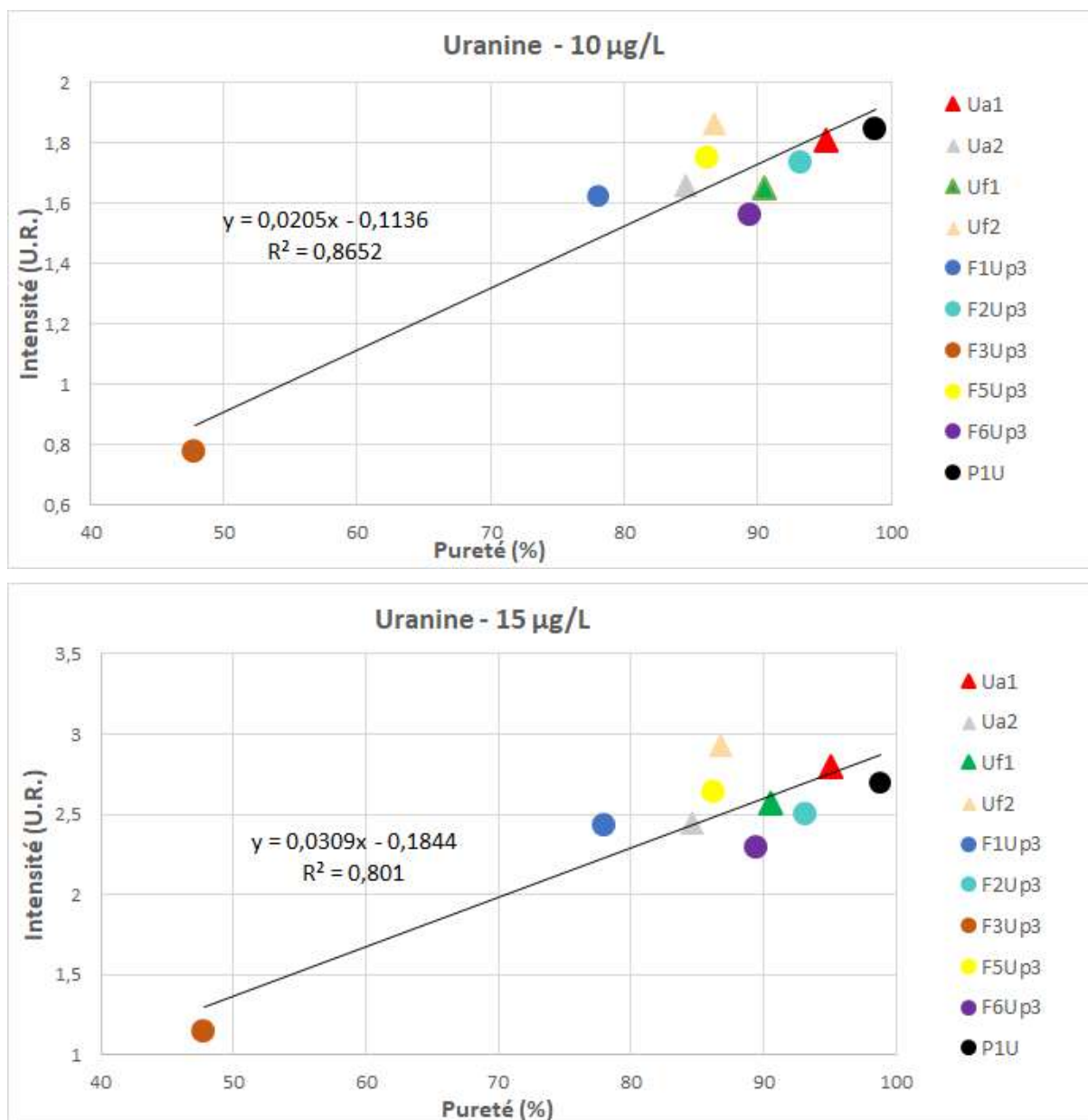


Figure 39 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 15 µg/L (en bas), et teneur en uranine des poudres ayant servi à les fabriquer.

3.3.2. Eosine

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 40 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 0,5602 et 0,5719, 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 0,7375 et 0,7740, et sont donc encore loin de celles qu'on peut observer pour l'uranine (voir 3.3.1 ci-dessus).

Le phénomène est moins net cette fois-ci, puisque le produit **F1Ep3**, dont la pureté a été estimée à 79,4 % (Tableau 11) montre dans la plupart des cas une intensité de fluorescence intermédiaire entre les autres produits analysés dans la même série (**Ea1** et **Ef1**, et **Ea2** et **Ef2**, respectivement, pour **F1Ep3S1**, et **F1Ep3S2** : Figure 13), dont les puretés sont supérieures (84 à 89 % : Tableau 11).

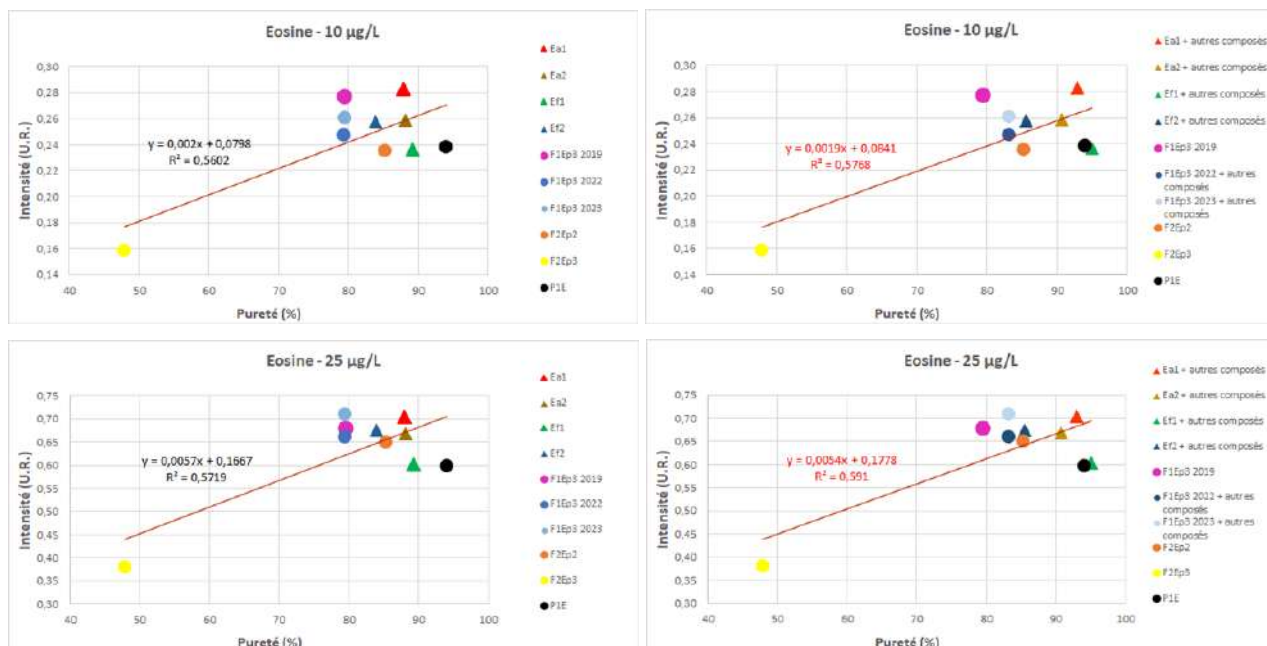


Figure 40 : Relation entre intensité de fluorescence solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en éosine pure (à gauche) et éosine + sous-produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.

Comme cela avait déjà été souligné lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020) et comme cela a été rappelé plus haut (section 3.2.2), un élément d'explication des corrélations très moyennes pour l'éosine entre intensité de fluorescence et teneur en traceur (Figure 40) pourrait venir des composants complémentaires, qui ont été estimés à 1,6 à 5,8 % du total cette fois-ci, et notamment 3,7 % pour **F1Ep3** (Tableau 11), contre 13 % en 2019 (Défarge *et al.* 2020). Ces composants, de nature proche de l'éosine, ou de l'uranine (voir section 3.2.1.5), pourraient participer à la fluorescence, sans être décomptés dans la pureté. Toutefois, en ajoutant les % de composants complémentaires dans les poudres aux teneurs en éosine, les R^2 ne sont que faiblement améliorés (0,5758 à 0,5910 : Figure 40, droite).

La grande variabilité des teneurs en eau des poudres, allant de 0,2 à 15,5 %, celle du produit F1Ep3 ayant doublé entre 2019, où elle était proche de 6 %, et 2022 (Défarge *et al.* 2020 et Tableau 11), pourrait alors être un facteur explicatif plus influent de la corrélation moyenne entre intensité de fluorescence et pureté dans le cas de l'éosine, les prises d'essai pour la fabrication des solutions pouvant donc fortement varier en fonction de l'homogénéité des poudres.

3.3.3. Sulforhodamine B

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 41 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 nouveaux produits, les résultats complets des deux projets montrent d'excellentes corrélations entre intensité de fluorescence des traceurs en solution et pureté des poudres ayant servi à les fabriquer : $R^2 = 0,8787$ à $0,9240$ (Figure 41).

Les impuretés mises en évidence dans les poudres de sulforhodamine B étant des molécules de structure très proche (voir 3.2.1.3), donc probablement également 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 est encore amélioré, avec des R^2 proches pour les deux concentrations de solutions (0,9259 à 0,9280 : Figure 41).

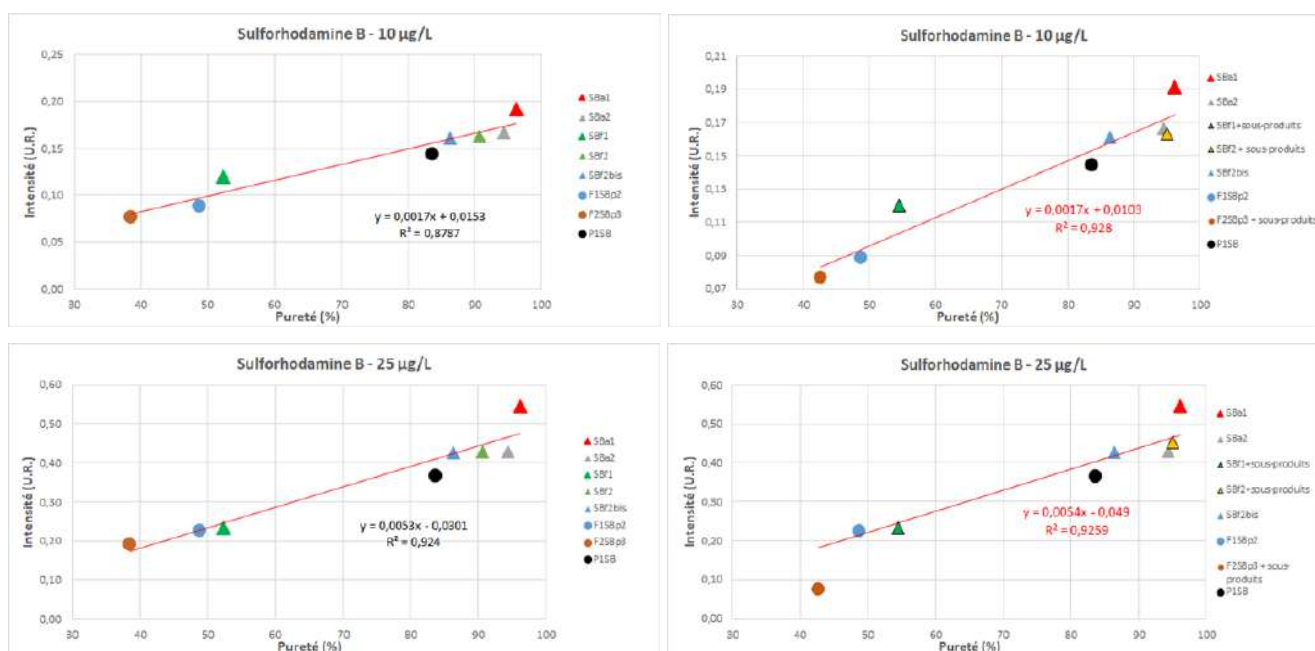


Figure 41 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en sulforhodamine B pure (à gauche) et sulforhodamine B + sous-produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.

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 *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.

3.3.4. Sulforhodamine G

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 42 ci-dessous. Les corrélations entre les deux paramètres sont du même ordre de grandeur que dans le cas de l'éosine (voir 3.3.2), avec des R² de 0,5339 à 0,6456 (Figure 42) ; 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).

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. 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 l'éosine, les corrélations sont significativement améliorées, avec des R² passant à 0,6763-0,7885 (Figure 42).

Les composés difficilement solubles dans l'eau, identifiés comme des agrégats non covalents de sulforhodamine G complexés au chrome et plomb (Tableau 23), sont des molécules qui n'ont pas été quantifiées comme traceurs, pourtant il est probable qu'elles aient la capacité de fluorescer puisque leur formule chimique est proche de celle de la sulforhodamine G. Cette propriété expliquerait alors que les corrélations entre intensité de fluorescence et teneur en traceur + impuretés solubles des poudres de sulforhodamine G restent moyennes, comparées à celles de la sulforhodamine B (section 3.3.3) ou de l'uranine (3.3.1), la part solubilisable de ces composés pouvant fortement varier d'un produit à l'autre et selon des conditions de mise en solution.

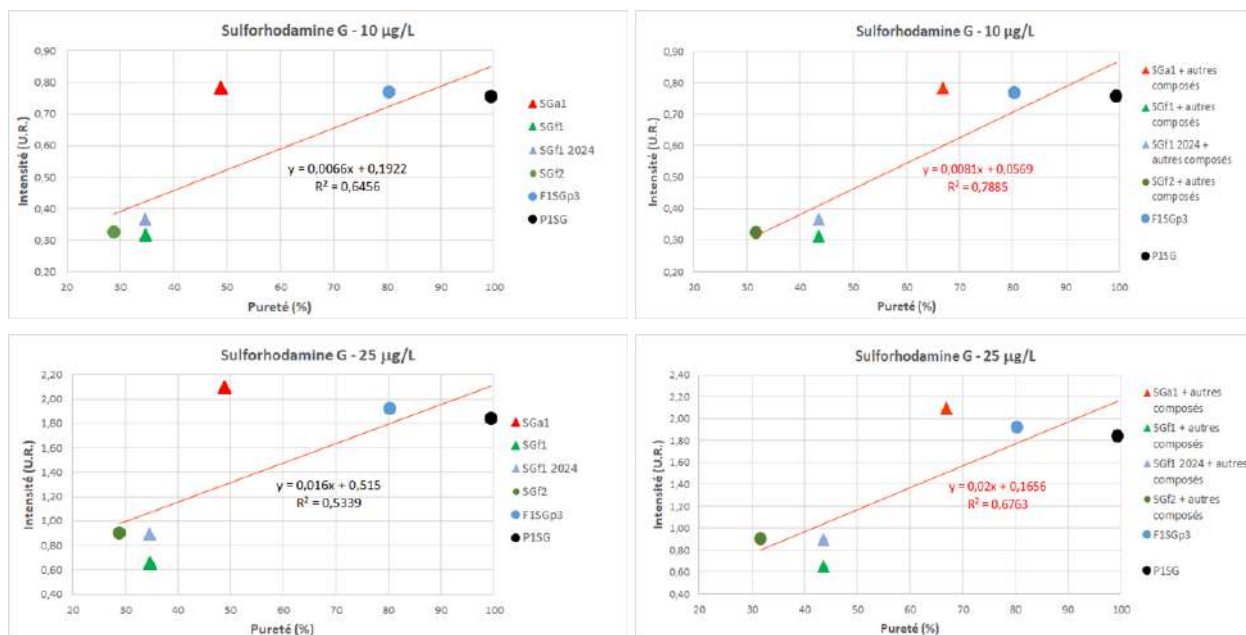


Figure 42 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en sulforhodamine G pure (à gauche) et sulforhodamine G + sous-produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer.

3.3.5. Naphtionate de sodium

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 43 ci-dessous.

Les corrélations entre les deux paramètres sont les plus faibles observées parmi les six traceurs étudiés, avec des R² de 0,0167 et 0,0190 (Figure 43), comparables à ceux mesurés lors du premier projet (R² = 0,0076 à 0,4031 : Défarge *et al.* 2020).

Dans ce cas, il semble que ce phénomène puisse être principalement 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 11 et Défarge *et al.* 2020). La teneur en traceur des prises d'essai pour la fabrication des solutions peut donc fortement varier en fonction des conditions ambiantes ou de l'homogénéité des poudres.

Toutefois, la faible dispersion des valeurs de pureté pour ce traceur (entre 77 et 84 % en ne prenant en compte que la masse sèche : Figure 43), dont la qualité est la plus constante parmi les six étudiés au cours des deux projets : voir ci-dessus 3.2.2), pourrait également entrer en ligne de compte.

3.3.6. Acide amino G

La relation intensité de fluorescence en fonction de la pureté des produits traceurs est portée dans la Figure 44 ci-dessous.

Les résultats obtenus sont intermédiaires entre ceux des deux laboratoires (CETRAHE et EWTS) lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), 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 1) ayant permis d'obtenir cette fois-ci à CETRAHE, aux deux concentrations de 10 et 25 µg/L (Figure 44), des corrélations entre les deux paramètres comprises entre celles observées pour les solutions à 25 µg/L à EWTS et dans les deux laboratoires à 10 µg/L lors du premier projet (R² de 0,8138 à 0,9728 ; Défarge *et al.* 2020), et celles observées à l'époque pour les solutions à 25 µg/L à CETRAHE (R² = 0,2132 ; Défarge *et al.* 2020) : les R² sont de 0,6007 et 0,7387 (Figure 44), donc du même ordre de grandeur que pour la sulforhodamine G (section 3.3.4).

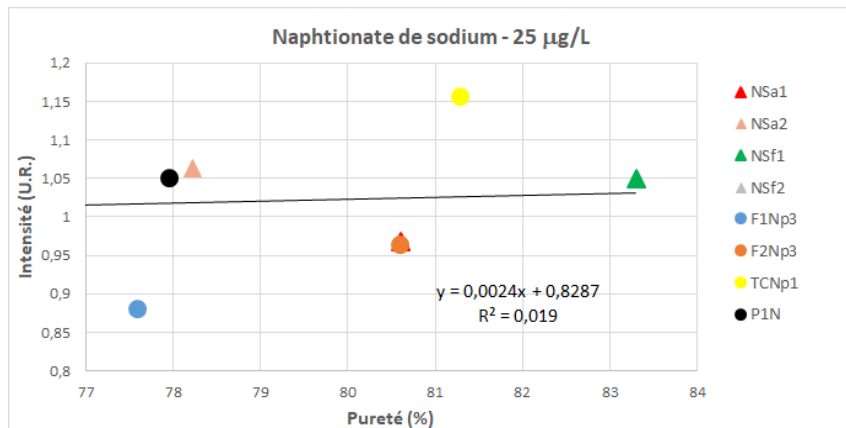
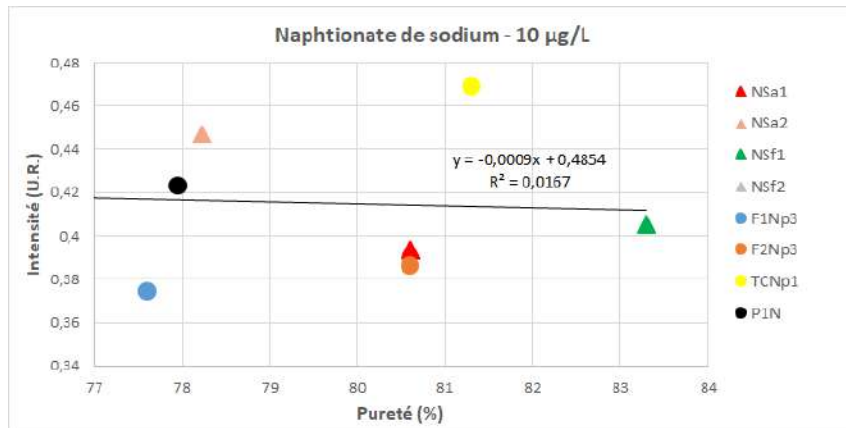


Figure 43 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en naphthionate de sodium des poudres ayant servi à les fabriquer.

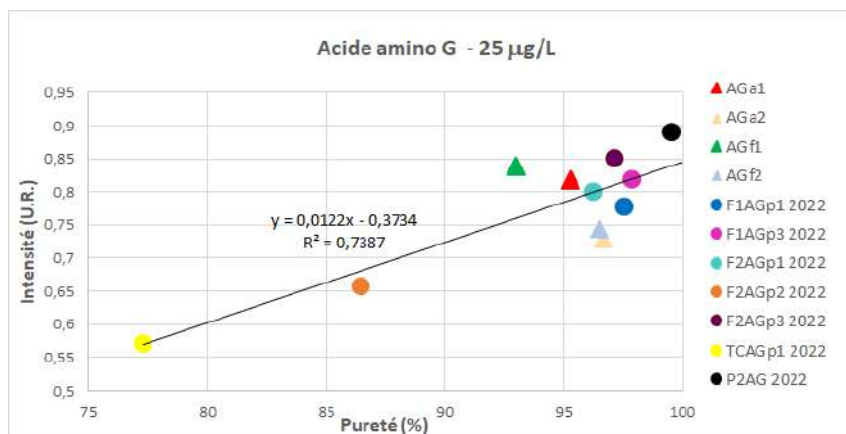
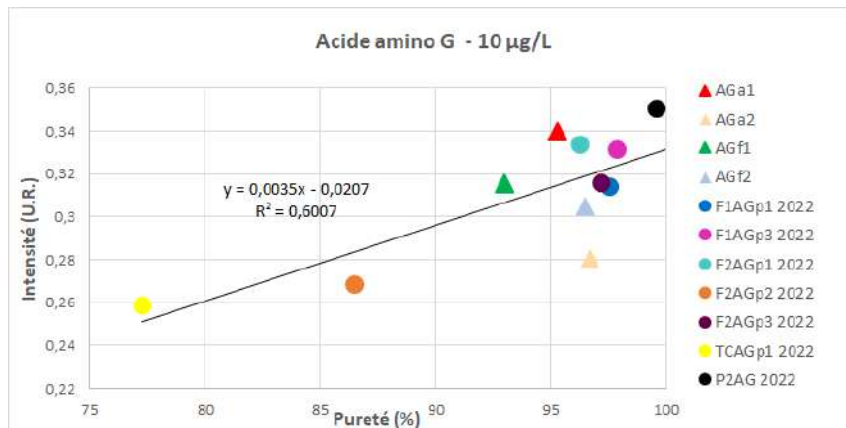


Figure 44 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en acide amino G des poudres ayant servi à les fabriquer.

Comme dans le cas de l'éosine (voir section 3.3.2), ces R² moyens pourraient être pour partie dus à la variabilité de la proportion d'eau dans les poudres, celles analysées au cours du 1^{er} projet ayant montré un caractère hygroscopique (Défarge *et al.* 2020). La faible dispersion des valeurs de pureté (77 à 100 % : Figure 44), déjà évoquée pour le naphthionate de sodium (voir ci-dessus), pourrait également être un facteur explicatif supplémentaire.

3.3.7. Bilan des comparaisons entre intensité de fluorescence et pureté

Ces résultats permettent de différencier plusieurs groupes de traceurs du point de vue de l'objectif affiché du volet d'action n° 2 du projet (Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits : voir 1. Introduction), qui était d'établir de véritables **abaques pouvant permettre d'estimer la pureté des lots 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 :

► On peut considérer cet objectif atteint dans le cas de l'**uranine** (voir section 3.3.1) et de la **sulforhodamine B** (section 3.3.3), qui montrent des corrélations fortes entre intensité de fluorescence de ces produits en solution et pureté des poudres ayant servi à les fabriquer. Dans le cas de la sulforhodamine B, la corrélation est encore améliorée quand on y ajoute les impuretés présentes dans les poudres, qui sont de structures proches et participent donc probablement à la fluorescence des solutions aux mêmes longueurs d'onde que le traceur utilisé, ce qui rend leur différenciation inutile dans le cadre des opérations de traçage. **Ce résultat est particulièrement satisfaisant, étant donné que ce sont les deux traceurs les plus couramment utilisés pour ces dernières.**

► L'objectif semble inatteignable dans le cas du **naphthionate de sodium** (section 3.3.5), pour des raisons pouvant tenir à la fois à l'hygroscopie des poudres et à leurs teneurs en eau toujours supérieures à 20 % (Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020), et à la faible dispersion des valeurs de pureté (Figure 43 et Défarge *et al.* 2020). **Cette faible dispersion, toutefois, semble rendre inutile la mise au point d'un abaque reliant pureté et intensité de fluorescence, les produits étant de qualité constante.**

► Les corrélations moyennes observées pour la **sulforhodamine G** (obtenues en y ajoutant les impuretés solubles, de structures proches, et qui doivent donc, comme dans le cas de la sulforhodamine B, participer à la fluorescence des solutions : section 3.3.4) et pour l'**acide amino G** (section 3.3.6), probablement dues, pour la première, à la présence de composants difficilement solubles en proportion et de solubilité variables (Tableau 11), et pour la seconde, comme dans le cas du naphthionate de sodium, à la fois à son caractère hygroscopique et à la faible dispersion de ses valeurs de pureté (Figure 44), ne permettent pas d'obtenir des abaques très satisfaisants en terme d'évaluation de la teneur en traceur des poudres en fonction de l'intensité de fluorescence des solutions.

C'est un inconvénient mineur pour l'utilisation de la **sulforhodamine G** dans les opérations de traçage, étant donné qu'elle est souvent indisponible à la vente, et qu'on peut lui préférer, parmi les sulforhodamines, la B, dont l'estimation de la pureté est donc plus fiable (voir ci-dessus).

Dans le cas de l'**acide amino G**, la corrélation peut être considérée comme suffisante pour détecter, grâce à l'abaque obtenu, les poudres, rares, dont la teneur n'est pas comprise dans la fourchette 93-100 %, qui en fait le traceur pouvant atteindre le plus fréquemment la meilleure pureté parmi ceux analysés au cours des deux projets (Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020). Les deux seuls produits se situant en-dehors de cette fourchette d'excellente pureté étaient à 87 et 77 % (Figure 44), tous deux analysés au cours du 1^{er} projet, le second étant un produit ancien conservé à CETRAHE et s'étant probablement dégradé avec le temps, car montrant par ailleurs une teneur en eau distinctement plus élevée que tous les autres acides amino G étudiés (7,8 %, contre 2,2 à 5,5 % pour les autres : Défarge *et al.* 2020 et Tableau 11).

► Les corrélations encore plus basses observées pour l'**éosine**, même en y ajoutant les impuretés de structures proches qui participent probablement, comme dans le cas des sulforhodamines, à la fluorescence des solutions (voir ci-dessus), et qui sont vraisemblablement dues à la grande variabilité de leur teneur en eau et son évolution au cours du temps (voir section 3.3.2), devraient tout de même également permettre, comme pour l'acide amino G, de détecter des produits dont la pureté ne se situerait pas dans la fourchette de 79 à 94 % ; ce fut le cas d'un seul produit parmi tous ceux analysés au cours des deux projets, en l'occurrence au cours du premier, dont la pureté était au-dessous de 50 % (Figure 40 et Défarge *et al.* 2020).

Ces résultats permettent également de compléter les données de fluorescences respectives des principaux traceurs, basées sur les produits disponibles dans le commerce (voir Figure 22 de la section 3.1.3.11), en les rapportant à la teneur effective en traceur des produits analysés, obtenant ainsi des indications sur les **puissances de fluorescence des molécules actives** (Figure 45 ci-dessous).

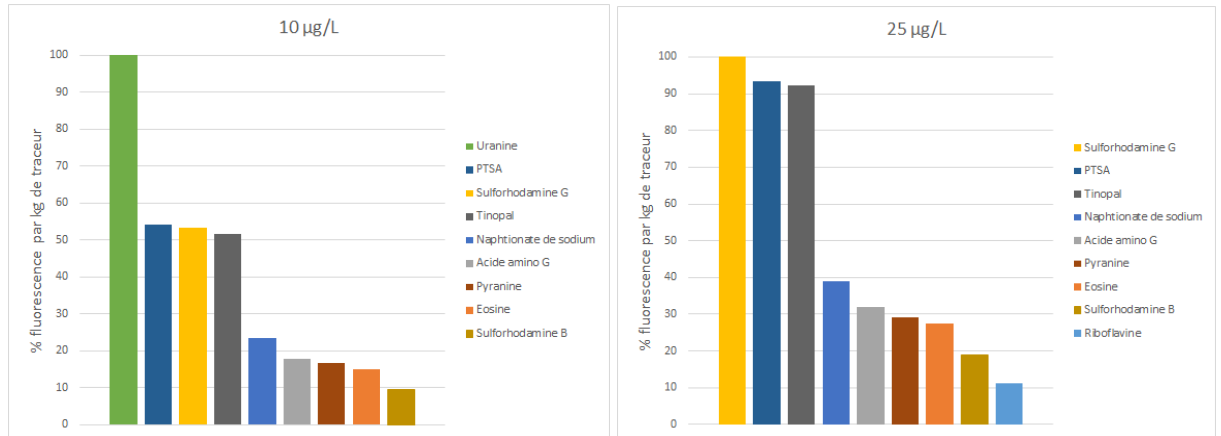


Figure 45 : Comparaison des intensités de fluorescence en solution des 10 traceurs étudiés.

Les données sélectionnées sont les meilleures intensités de fluorescence obtenues entre la 3^{ème} série d'analyses du 1^{er} projet (la seule pour laquelle ont été effectuées à la fois une correction par l'aire du pic Raman de l'eau, permettant une certaine normalisation des mesures entre traceurs analysés à quelques jours de distance, et une correction du pH de l'uranine par tampon Tris-HCl, permettant de stabiliser le pH de ce traceur ; voir Défarge et al. 2020), et les trois séries du présent projet, aux concentrations de 10 µg/L (commune à tous les traceurs, hormis la riboflavine ; graphe de gauche), et 25 µg/L (commune à tous les traceurs, hormis l'uranine ; graphe de droite) ; les intensités de chaque traceur en Unités Raman ont été ensuite rapportées à la pureté de chaque produit, puis à celle du traceur présentant l'intensité de fluorescence la plus forte (uranine à 10 µg/L ; PTSA à 25 µg/L) fixée arbitrairement à 100.

Les résultats restent assez similaires à ceux obtenus pour les produits, sans considération de leur pureté (Figure 22), sauf dans les cas de la **sulforhodamine G**, qui égale ou dépasse légèrement le PTSA et le tinopal en termes de puissance de fluorescence, en raison d'une forte proportion d'insolubles dans les poudres (15 à 46 % : Tableau 11), et de la **riboflavine**, moins éloignée de la sulforhodamine B, et dont la faible puissance de fluorescence est pour partie liée à la faible pureté du produit analysé (< 17 % : Tableau 11) ; malgré tout, ce produit, même purifié, resterait peu adapté pour le traçage hydrogéologique de ce simple point de vue.

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 46, 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 46, gauche).

Ces deux produits ne présentent donc aucune risque d'interférence avec la détection, ou l'intensité de fluorescence de ces traceurs.

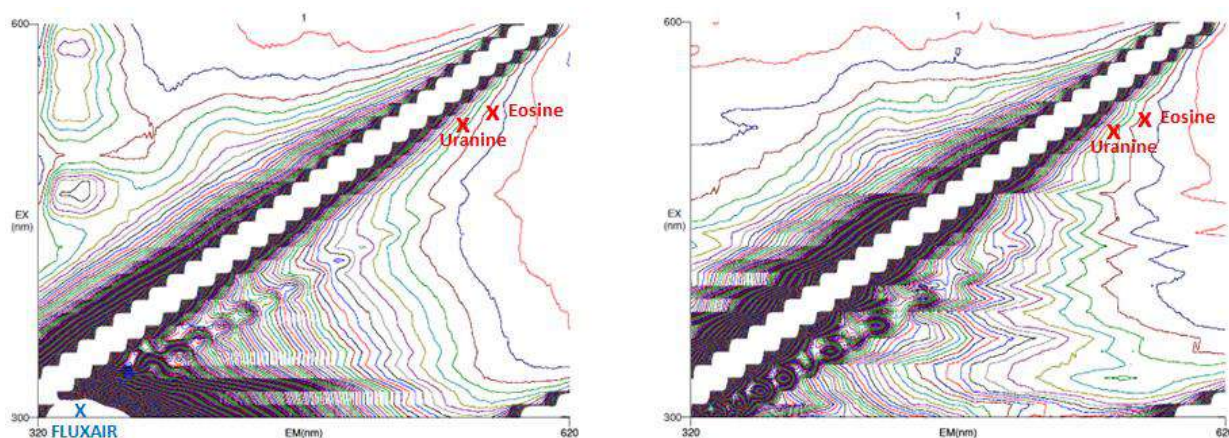


Figure 46 : Spectres en double balayage excitation – émission des produits FLUXAIR 85 S GR Nymco (gauche) et LUCRAFOAM E 100 CONC (droite). Les pics principaux de l'uranine et de l'éosine sont repérés par des croix rouges, le pic de fluorescence du produit FLUXAIR 85 S GR Nymco étant noté en bleu.

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 1 000 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).

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

Ce 3^{ème} volet du projet a été essentiellement mené au cours de sa dernière année (2025), mais sa première étape, consistant en l'élargissement de la diffusion technologique autour des bonnes pratiques du traçage sur tous les points étudiés dans les actions N° 1 et 2 (voir 1. Introduction), a été mise en œuvre dès le début du projet, de plusieurs manières :

► 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 de l'ordre de 80 bureaux d'études et d'ingénierie et d'entreprises et de plusieurs dizaines de collectivités (voir Annexe 18 ; illustration faite au moment de la soumission du projet à l'OFB en 2021, une trentaine de nouvelles structures s'y étant ajoutées depuis), que par Art E'Color et Fluotechnik auprès de leurs clients, qui sont pour la plus grande partie d'entre eux les praticiens que CETRAHE appuie lors des opérations de traçage en France.

► De manière plus formelle, ces résultats ont été 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).

Ils sont aussi inclus dans les **enseignements en traçage appliqué à l'ingénierie donnés aux élèves-ingénieurs de Polytech'Orléans, spécialité Génie civil et environnement**, depuis plusieurs dizaines d'années, à l'initiative de Michel LEPILLER, et qui ont servi à l'origine de base pour bâtir les sessions pratiques de formation continue. Ils incluent à l'heure actuelle des cours, de la pratique, depuis la conception d'une opération de traçage jusqu'à l'exploitation et l'interprétation des résultats, en passant par des injections (en cours d'eau, dans des pertes de la Loire, et directement en profondeur dans un drain karstique dans le Val d'Orléans, grâce au piézomètre d'un site instrumenté), la mise en place et la programmation de différents dispositifs de surveillance (préleveurs automatiques d'échantillons, fluorimètres de terrain, capteurs passifs au charbon actif), et les analyses au laboratoire CETRAHE, la formation au logiciel d'interprétation des traçages TRAC, ainsi que des études de cas menées par CETRAHE dans différents domaines touchant au génie civil (impact d'eaux pluviales routières sur un captage AEP, fuites sur des ouvrages tels que barrage hydroélectrique, levées de canal, chaussée de moulin sur la rivière Loiret). Ces élèves-ingénieurs peuvent intégrer des bureaux d'études mettant en œuvre des opérations de traçage, ou des entreprises du BTP pouvant avoir recours à ces bureaux d'étude aux stades de la conception ou de la maintenance des infrastructures et ouvrages de génie civil.

► Les deux **rapports intermédiaires** (à 1 an : décembre 2022 ; à 2 ans : décembre 2023) consacrés à ce second projet ont été rendus disponibles sur le site Internet de CETRAHE (voir [rapport à 2 ans](#), incluant les résultats des années 1 et 2 du projet), avec l'autorisation de l'OFB, et annoncés par le biais de son [site LinkedIn](#).

► Les résultats obtenus au cours des deux projets financés par l'OFB ont également été présentés, comme cela était prévu dans les objectifs du second projet (voir Introduction, Action n° 3), à l'occasion d'un **webinaire** consacré à la qualité des produits traceurs fluorescents et aux bonnes pratiques en matière de traçage artificiel, à l'invitation de la **Commission Scientifique de la Fédération Française de Spéléologie**, qui a eu lieu le 4 avril 2024 à 20 h 30, et est reVISIONNABLE sur la chaîne YouTube de la FFS : https://www.youtube.com/watch?v=56_x5cO7qfA (vue 360 fois depuis).

Par ailleurs, les fournisseurs partenaires de ce projet ont mené un 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 section 3.2.2). Ces constatations avaient déjà été faites lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), elles sont confirmées par les résultats du présent projet, et ces **fiches techniques resteraient donc à corriger**.

En dépit des demandes des fournisseurs partenaires, **les fabricants ne sont pas enclins à mener des analyses coûteuses supplémentaires pour le faire**, ces colorants étant considérés comme des produits « *de commodité* », et non « *haut de gamme* » (leur utilisation en traçage étant très minoritaire par rapport à la majorité des débouchés, notamment dans le domaine textile). **Les fournisseurs ne sont pas non plus en mesure de faire ces analyses à la réception des lots**, qui engendreraient leur blocage en attendant les résultats, des coûts supplémentaires, et une augmentation des prix de vente, pour une part de clients trop faible.

Ces analyses avant utilisation de ces produits ne peuvent donc être facilement réalisées que par un laboratoire indépendant, utilisant les abaques pureté = $f(\text{intensité de fluorescence en solution})$ que les deux projets financés par l'OFB nous ont permis de bâtir progressivement (voir section 3.3).

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 plus haut section 3.2.1) ; c'est également le cas de la **riboflavine** analysée au cours du présent projet (Tableau 11), mais son utilisation comme traceur hydrogéologique pose de toute façon un certain nombre d'autres problèmes (faible puissance de fluorescence, voir section 2.2.3 et Figure 22 ; présence possible d'autres composants fluorescents, voir section 3.1.2 ; très forte photosensibilité et probable forte biodégradabilité, voir section 3.1.4.10).

Le travail de sensibilisation des fabricants à la qualité de leurs produits fluorescents ayant montré ses limites (voir ci-dessus), seule la recherche de fabricants plus fiables peut permettre d'améliorer la qualité des produits fluorescents utilisables pour les applications hydrogéologiques, comme cela a été fait par Art E'Color et Fluotechnik pour ce second projet en ce qui concerne la **sulforhodamine B, dont la teneur en traceur de 4 nouveaux produits sur 5 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 (86 à 97 %, contre 38 à 59 % : Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020).**

Une fois la totalité des résultats de ce second projet acquis, validés et discutés à travers des échanges autour de premières versions du présent rapport, et des comités de pilotage réunissant ses auteurs et sa correspondante pour l'OFB, Mme Estérelle VILLEMAGNE, il a été organisé, le 17 juin 2025, sous forme de **COPIL élargi aux acteurs institutionnels, autorités réglementaires, donneurs d'ordre, gestionnaires de bases de données concernés par le traçage hydrogéologique en France**, un **webinaire de présentation des principaux résultats des deux projets financés par l'OFB autour de la qualité des produits traceurs fluorescents, des conclusions et recommandations tirées par les auteurs de ces études, et de propositions d'axes d'amélioration et de structuration d'une filière dans le domaine**, conformément à l'Action n° 3 du projet (voir Introduction, Action n° 3 : Structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage).

Une quinzaine de contacts ont pu être sélectionnés parmi les correspondants habituels de CETRAHE et de l'OFB, complétés par certains acteurs recherchés par Mme VILLEMAGNE à des niveaux administratifs supérieurs. Un sondage à leur intention a été lancé le 5 mai 2025 pour trouver la date la plus favorable pour organiser ce webinaire, et 7 ont finalement pu être présents, en plus des partenaires du projet et de Mme VILLEMAGNE (on trouvera leurs noms dans la section 27. Remerciements). Certains d'entre eux, ainsi que des personnes contactées qui n'ont finalement pas pu être présentes au webinaire, ont répondu à ce sondage en proposant des **pistes d'amélioration des pratiques du traçage hydrogéologique en France**, dont la plupart rejoignaient les idées que les auteurs du rapport souhaitaient évoquer au cours de cette réunion.

Ces dernières idées étaient principalement issues des discussions entre formateurs étant intervenus dans nos sessions de formation continue depuis 2009 (une dizaine de personnes en tout), et avec les participants à ces formations (plus de 120), lors des séances de debriefing organisées à la fin des sessions pour avoir un retour d'expérience sur celles-ci. Toutes les pistes ont été discutées au cours du webinaire.

Les principales **conclusions et propositions issues de ces discussions** sont les suivantes (elles ont été résumées par croisement des notes prises en cours de webinaire par Mme VILLEMAGNE et Audrey DUFOUR de CETRAHE) :

► En ce qui concerne l'**amélioration de la qualité/pureté des produits traceurs disponibles dans le commerce**, la société COLOREY, représentée au webinaire par MM. CHAILLON et POULAT (respectivement, ancien dirigeant de COLOREY/Art E'Color, désormais consultant pour la société, et nouveau responsable d'agence), estime qu'il est possible d'avoir des traceurs de la meilleure pureté de manière régulière pour l'**uranine**, la **pyranine** et le **PTSA**.

Toutefois, à compter du 1^{er} mars 2026, COLOREY et Art E'Color deviennent VIDARA France à la suite d'une fusion avec cette société, dont la nouvelle direction est très stricte sur la gestion des stocks ; il est peu probable qu'elle accepte à l'avenir d'en bloquer ou d'en réserver s'il n'y a pas de commande ou d'engagement ferme d'achat avec des volumes conséquents à la clé.

Pour l'ensemble des produits, et étant donné la variabilité d'un lot à l'autre, il semble donc indispensable de mettre en place une procédure qualité de vérification par un tiers indépendant.

► **Les praticiens devraient être incités à vérifier la teneur effective en traceur des produits qu'ils utilisent au cours des opérations de traçage qu'ils effectuent. Les abaques reliant, de manière simple à mettre en œuvre, cette teneur à l'intensité de fluorescence des produits en solution, tels que mis au point au cours de ce projet (voir section 3.3, notamment 3.3.7), pourraient donc être utilisés à cette fin.**

► **La rédaction d'un guide méthodologique complet et à jour en français sur la pratique du traçage hydrogéologique artificiel apparaît maintenant indispensable. Le plus récent, publié par le Groupe de travail Traçage de la Société Suisse d'Hydrogéologie (SSH : Schudel et al.), date de 2002. Un guide méthodologique plus récent existe bien, dont l'une des autrices du présent rapport (Nevila JOZJA) est co-autrice, mais ne constitue qu'un chapitre au sein d'un guide consacré à l'ensemble des outils de l'hydrogéologie karstique (Dörfli et al. 2010), et il a donc plus de 15 ans. Pour être tout à fait complet, plus récemment encore, quelques recommandations pour la mise en œuvre des traçages ont été incluses, avec renvoi à ces deux guides, ainsi qu'à certaines publications en ligne de CETRAHE ou écrites en collaboration avec le BRGM, dans un court chapitre d'un guide méthodologique consacré à la connaissance et la quantification des échanges karst/rivière (Pascoletti & Chapuis 2022).**

Ce guide devra évidemment inclure les **avancées permises par les deux projets de recherche successifs financés par l'OFB** consacrés à la qualité des produits fluorescents utilisés en traçage hydrogéologique (Défarge *et al.* 2020), et à l'amélioration de celle-ci (présentées dans le présent rapport), avec les recommandations aux praticiens qu'ils ont permis de repréciser, confirmer ou dégager, mais également les développements dans le domaine du traçage hydrogéologique artificiel qui ont eu lieu depuis la parution des guides précédents, en particulier le **logiciel de dimensionnement et d'interprétation des traçages TRAC** (<https://www.brgm.fr/fr/logiciel/trac-outil-aide-interpretation-tracages-milieus-poreux> ; consulté le 23 janvier 2026) et la **BD Traçages** (Base de Données des traçages hydrogéologiques : <https://bdtracages.brgm.fr/> ; consultée le 23 janvier 2026).

Le **logiciel TRAC** est un projet qui a été développé parallèlement à la création de la Cellule R&D CETRAHE en 2009, dans le cadre d'un projet cofinancé par la Région Centre et le BRGM, avec comme partenaires le BRGM (porteur du projet), CETRAHE, l'ISTO, le bureau d'études EDREE et l'UNICEM Centre (Gutierrez *et al.* 2013). Le **site BD Traçages**, ainsi que l'application de saisie, ont été mis en ligne en mai 2016, après deux ans d'échanges entre trois Directions Régionales du BRGM et leurs partenaires, parmi lesquels les agences de l'Eau et plusieurs

structures universitaires, dont CETRAHE. CETRAHE a notamment participé au développement et à l'inventaire et la bancarisation des données des traçages dans la région Centre-Val de Loire (CETRAHE & BRGM 2019), données dont une bonne partie avait été recensée par Michel LEPILLER au Laboratoire d'Hydrogéologie de l'Université d'Orléans, dont CETRAHE est en quelque sorte l'héritière de ce point de vue. Les représentants du BRGM au webinaire, Pierre-Yann DAVID et Thomas KLINKA, ont pu présenter les évolutions récentes et futures de ces deux projets, que porte le BRGM ; elles sont visibles et explicitées sur leurs sites respectifs.

► **La BD Traçages inclut une grille d'évaluation des opérations de traçage proposée par Jozja et al. (2011b) à la suite de premiers travaux de Michel LEPILLER dans les années 1990, repris ensuite par ses élèves Paul-Henri MONDAIN et Philippe MUET, puis Nevila JOZJA (Jozja et al. 2009). Cette grille pourrait être améliorée en fonction des retours d'expérience de ses utilisateurs. Un projet de nouvelle grille a été avancé par le BRGM Normandie, mais non publié (communication de Pierre-Yann DAVID). Il paraît évident que toute nouvelle évolution de la grille existante devra faire l'objet de réflexions et de débats impliquant le maximum d'acteurs du traçage en France.**

En plus de son intégration à la BD Traçages, cette grille d'évaluation devra évidemment trouver place dans le guide pratique méthodologique évoqué plus haut.

► La nécessité de créer un modèle de base de **cahier des charges pour la réalisation des opérations de traçage**, prêt à l'emploi pour les collectivités et les donneurs d'ordre de manière générale, a fait l'objet d'une discussion à part, même si évidemment il devrait trouver sa place, une fois validé, à la fois au sein de la BD Traçages et dans le guide méthodologique. La base de travail pourrait en être le module de formation qui est intégré à nos sessions de formation continue en traçages à l'Université d'Orléans, enseigné depuis le début par des ingénieurs en bureaux d'études qui ont à répondre à des appels d'offre, du point de vue à la fois des donneurs d'ordre (qui font partie du public de ces sessions) et des bureaux d'études qui y répondent.

Comme pour la grille d'évaluation, la conception de ce cahier des charges minimum type devra être menée et sa version finale validée, par le maximum d'acteurs du traçage artificiel en France, depuis les donneurs d'ordre jusqu'aux praticiens, en passant par les institutionnels en charge de la police de l'eau, et les formateurs.

Il devra évidemment également trouver place dans le guide pratique méthodologique évoqué plus haut.

► En raison du faible nombre d'institutionnels en charge de la police de l'eau présents à ce webinaire, les évolutions réglementaires nécessaires en matière de traçage artificiel en France n'ont pu être avancées. Il n'a été question que de la possibilité de **rendre obligatoire les déclarations d'opérations de traçage**, pratique non contraignante à l'heure actuelle, utilisée systématiquement par CETRAHE pour son propre usage, selon un modèle qui est transmis à l'occasion des sessions de formation continue, ou à tout praticien qui en fait la demande à la cellule. La question de meilleure connaissance de la liste complète des destinataires de ces déclarations est également cruciale.

Dans ce cas, le modèle qui pourrait servir de base aux discussions autour de ces déclarations devra être la Fiche de déclaration préalable d'un traçage en Région Normandie établie par le BRGM (modèle initial, Haute Normandie, dans David 2012), la seule existant à notre connaissance, qui est notamment disponible en ligne sur le SIGES Seine Normandie : https://www.sigés.fr/sites/default/files/documents/2024-12/fiche_de_declaration_traçagev6_2020.pdf (consultée le 24 janvier 2026).

► En dehors du travail de sensibilisation ou de sélection de produits pouvant être entrepris par les seuls fournisseurs en direction des fabricants de produits traceurs fluorescents, et les évolutions du logiciel TRAC et de la BD Traçages, tous deux édités, publiés et gérés par le BRGM (avec interrogations périodiques des utilisateurs dans le cas du premier, ces enquêtes et informations passant notamment par le réseau des contacts de CETRAHE), la plupart des actions dégagées ci-dessus pour améliorer la qualité des traçages hydrogéologiques en France, leur mise en œuvre et leur interprétation, et la progression vers une structuration de la filière, nécessitent donc la **consultation et l'implication du maximum d'acteurs**, des institutionnels en charge de la police

de l'eau aux praticiens, en passant par les donneurs d'ordre, hydrogéologues agréés et des collectivités, fournisseurs français de produits en contact avec les fabricants, tous basés à l'étranger, formateurs, chercheurs, experts en analyses-conseil, et valideurs. En raison de la difficulté à trouver en quelques semaines des contacts et réunir suffisamment de participants au webinaire/COPIL élargi où ces sujets ont été discutés, il a été décidé de ne pas organiser de nouveaux webinaires dans les quelques mois qui restaient avant la clôture du présent projet, et d'entreprendre ce travail dans le cadre d'un **nouveau projet qui pourrait être financé et accompagné par l'OFB**.

Ce travail prendrait la forme de webinaires élargis au maximum de ces acteurs, d'ateliers techniques, de réunions de discussion autour des différents axes du projet (**guide méthodologique, grille d'évaluation, cahier des charges, déclaration d'opération de traçage, autres évolutions réglementaires...**), le cas échéant de **conférences annuelles**, ainsi que de la **communication la plus large sur leurs avancées**. L'évolution vers une forme d'**association regroupant les acteurs du domaine**, voire d'**union professionnelle des praticiens du traçage hydrogéologique** s'engageant à mettre en œuvre et respecter les meilleures pratiques, dégagées des avancées les plus récentes de ces travaux, sur le modèle de l'**ASTEE** (*Association des professionnels de l'eau et des déchets* : <https://www.astee.org/> ; consulté le 25 janvier 2026), du **RAE** (<https://reseau-assainissement-ecologique.org/> ; consulté le 25 janvier 2026), de la **FEVE** (*Fédération professionnelle des entreprises du secteur de l'Épuration Végétalisée* : <http://www.f-e-ve.fr/> ; site toujours en maintenance au moment de la publication de ce rapport), de l'**UPGE** (<https://www.genie-ecologique.fr/> ; consulté le 25 janvier 2026) ou de l'**UPDS** (*Union des Professionnels de la Dépollution des Sites* : <https://upds.org/> ; consulté le 25 janvier 2026), seraient également des objectifs finaux à viser.

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 dans le cadre des deux projets ont montré la 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 : voir section 3.1.2, Annexe 1 et Défarge *et al.* 2020).

Une nuance doit toutefois être apportée pour la **riboflavine**, puisque le produit sélectionné par Art E'Color était le sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate, pour lequel nous n'avons pu trouver de publication scientifique donnant ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission dans l'eau ; il révélait toutefois un pic de fluorescence (à 370/525 nm : section 3.1.2), considéré comme caractéristique de la riboflavine dans la littérature.

► A cette dernière exception près, **aucun produit analysé dans le cadre des deux projets n'a révélé d'autres composants fluoresçant à des longueurs d'onde différentes** (seul le sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate possédait deux autres pics, qui seraient donc dus aux autres constituants de la poudre fournie : section 3.1.2), **ni d'anomalie particulière de la forme des pics caractéristiques, qui pourrait traduire la présence de sous-produits parasites gênants pour la mesure.**

► Dans tous les cas, on observe une **parfaite proportionnalité de l'intensité de fluorescence des traceurs en fonction de leur concentration en solution**, avec des R^2 allant de 0,9831 à 1 (voir section 3.1.3 et Défarge *et al.* 2020), autorisant, grâce à des droites d'étalonnage, les analyses quantitatives au laboratoire.

Dans le cas des **sulforhodamines**, de l'**éosine**, et également de la **riboflavine**, des composants complémentaires solubles, de structure proche (voir sections 3.2.1.3 à 3.2.1.6), 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 sur la fluorescence paraît faible dans le cas de la **sulforhodamine B**, où ils ne représentent que 4,4 % au maximum de la masse totale (Tableau 11), ou de l'**éosine** (1,6 à 5,8 % : Tableau 11), dans le cas de la **sulforhodamine G**, ils atteignent jusqu'à 18 % (Tableau 11), et 62 % pour la **riboflavine** (Tableau 11).

Pour ces 4 traceurs, les abaques que ce projet cherchait 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 aux longueurs d'onde du traceur principal, et non la pureté, des poudres, en fonction de leur intensité de fluorescence en solution.**

► Comme cela avait déjà été mis en évidence lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020), les résultats obtenus par ce second projet confirment également que **les fiches techniques des produits fournis par les fabricants, qui n'ont pas été modifiées entretemps, sont en revanche fréquemment fausses** (comparer Tableaux 2 et 11), les données n'étant par ailleurs pas toujours indiquées :

► La **pureté** du produit de la 2^{ème} série sélectionné par Art E'Color (Ua2) n'est pas conforme à la fiche technique du fabricant, puisque sa teneur en traceur est < 90 %. La **teneur en eau** du produit de la 1^{ère} série sélectionné par Fluotechnik (Uf1) est supérieure (6,7 %) aux « ~ 5 % » indiqués sur sa fiche technique.

► La **pureté** de la poudre d'**éosine** Ef2 est inférieure aux indications de la fiche technique (83,9 ± 0,7 % contre 90 %). La **teneur en eau** du produit F1Ep3 dépasse les 10 %

maximum annoncés (13,4 % ; par manque de produit, toutefois, c'est le résultat d'une seule analyse, et le taux a doublé depuis l'achat de cette poudre au cours du 1^{er} projet).

► La pureté de la sulforhodamine B SBf2bis est inférieure aux indications de la fiche technique ($86,4 \pm 3,3$ % contre 95,5 %). La teneur en eau de SBa1 dépasse les 7 % maximum indiqués ($8,0 \pm 0,3$ %). La présence de chrome (0,12 % en masse dans SBf1 : Tableau 13) n'est pas signalée.

► Les caractéristiques de toutes les sulforhodamines G sont très éloignées de celles indiquées sur leurs fiches techniques, 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 $\leq 0,2$ %, pour SGa1 ; des puretés de $34,7 \pm 4,5$ %, et $28,8 \pm 1,9$ %, respectivement, pour SGf1 et SGf2, au lieu de 89-90% (avec un minimum de 85 %). La teneur en plomb de SGa1 est très supérieure au maximum indiqué dans sa fiche technique (1,5 % au lieu de $< 0,0005$ % : comparer Tableaux 17 et 2) ; sa présence dans les sulforhodamines SGf1 et SGf2 (à une teneur de 0,6 % : Tableau 17) n'est pas signalée. La présence de chrome dans tous ces produits (à des teneurs allant de 0,7 à 1,8 % : Tableaux 16-18) n'est signalée dans aucune fiche technique.

► La pureté du naphtionate de sodium NSf2 est à moins de 68 % contre « 75,0 % » dans sa fiche technique. Les fiches dont dispose Fluotechnik portent par ailleurs des indications de la présence d'insolubles à $\sim 0,12$ %, qui n'ont pas été détectés par nos analyses.

► La pureté des poudres d'acide amino G sélectionnées par Art E'Color (AGa1 et AGa2) n'est pas ≈ 80 % comme indiqué sur la fiche technique, mais de $95,3 \pm 1,5$ %, et $96,7 \pm 5,6$ %, respectivement ; l'indication portée sur celle des produits sélectionnés par Fluotechnik (AGf1 et AGf2 : pureté minimale : 80 %) est plus juste, pour des produits dont la pureté est équivalente à celle des produits Art E'Color.

Les fiches techniques des nouveaux produits analysés au cours de ce second projet souffrent des mêmes défauts (comparer Tableaux 2 et 11) :

► Les teneurs en eau des poudres de pyranine (Pa1) et de tinopal (Ta1) sont proches du haut de la fourchette à légèrement supérieures, par rapport aux indications des fiches techniques : respectivement, $7,5 \pm 1,0$ % au lieu de ≤ 7 %, et $2,1 \pm 0,1$ % au lieu de ≤ 2 %.

► La pureté de la poudre de PTSA (PTa1 : $83,9 \pm 0,4$ %) est inférieure à l'indication de sa fiche technique (« *Teneur $\geq 85,00$ %* »).

► La pureté de la poudre de riboflavine (Ra1 : $16,6 \pm 0,5$ %) est très éloignée de l'indication de sa fiche technique (« *Teneur en riboflavine : 73-79 %* ») ; sa teneur en eau est quant à elle près de deux fois supérieure ($10,7 \pm 2,0$ % contre 5,80 %).

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.

Une recommandation aux praticiens serait de veiller à la bonne conservation des poudres, leur stockage à l'abri de l'humidité, et de ne pas utiliser de produit conservé depuis trop longtemps. Les produits anciens conservés à CETRAHE analysés au cours du premier projet avaient les teneurs en eau les plus fortes parmi les poudres du même traceur (Défarge *et al.* 2020). Si les sulforhodamines du premier projet réanalysées cette fois-ci n'ont pas subi d'augmentation de leur teneur en eau entre 2017 ou 2019 et 2022, celle de l'éosine F1Ep3 a doublé, passant de $6,1 \pm 0,8$ à 13,4 % (Tableau 11). En revanche, leurs teneurs en traceur ont systématiquement baissé, de 8 à 11 % pour les sulforhodamines B, de 24 % pour la sulforhodamine G, contrairement à l'éosine justement, où elle a augmenté de 4 % (Tableau 11), mais pour laquelle l'évolution de la teneur en eau empêche probablement d'avoir réellement accès à celle de la pureté. Même si un phénomène possible de biodégradation des traceurs en solution par des bactéries présentes dans les poudres, soupçonné dans le cas de l'urarine (Défarge *et al.* 2020), du naphtionate de sodium (voir section 3.1.4.5), de l'acide amino G (3.1.4.6), du tinopal (3.1.4.8) ou de la riboflavine (3.1.4.10), n'a pas été constaté dans le cas des sulforhodamines, une biodégradation des poudres pourrait être en cause (par des bactéries ou par des champignons) ; les sulforhodamines ont été sensibles à la biodégradation en solution dans l'eau naturelle de la source du Bouillon (voir 3.1.4.3 et 3.1.4.4).

Comme on l'avait également déjà souligné en conclusion du premier projet (Défarge *et al.* 2020), les indications fautives de pureté sont beaucoup plus problématiques que celles des teneurs en eau, notamment dans le cas de la sulforhodamine G ou de la riboflavine (si cette dernière venait à être utilisée comme traceur hydrogéologique), puisqu'elles conduisent à injecter, lors des opérations de traçage, une masse effective de traceur inférieure d'un facteur 2 à 3 à la quantité estimée pour la sulforhodamine G, la teneur réelle en composant fluorescent étant environ du tiers à la moitié moindre que la pureté indiquée, et d'un facteur 4 à 5 pour la riboflavine (voir ci-dessus). Les écarts observés pour certains autres traceurs (uranine, éosine, sulforhodamine B, naphthionate de sodium, PTSA, voir ci-dessus) sont de moindre importance, ou, pour l'acide amino G, dont la pureté peut être sous-estimée (voir ci-dessus), ne conduisent pas à injecter des quantités de traceur insuffisantes.

Il faut également noter que certaines des fiches techniques qui ne portent aucune indication de pureté, comme celle de la sulforhodamine B SBf1 (Tableau 2), peuvent avoir des teneurs en traceur très éloignées (52 % dans ce cas : Tableau 11) des 100 % sur lesquels sont basés les calculs des praticiens. Ceci avait déjà été noté pour certains produits du premier projet (voir Défarge *et al.* 2020).

Ces teneurs en traceur très éloignées des 100 %, ou des indications des fiches techniques, pourraient expliquer les résultats négatifs de traçages effectués dans des systèmes hydrogéologiques bien connus avec des quantités qui avaient préalablement donné lieu à des restitutions aux points de suivi habituels (constatations qui avaient été l'une des motivations du premier projet soumis à l'OFB : voir Introduction du présent rapport).

Elles rendent indispensables une évaluation préalable de la teneur en traceur des poudres utilisées lors des opérations de traçage, que pourraient faciliter les abaques que ce projet cherchait à mettre au point (voir Introduction, Action n° 2 : Atténuation des impacts, mise en place d'un contrôle qualité des produits, et ci-dessous 4.2).

Ceci ne doit toutefois pas empêcher d'exiger des fabricants que la qualité des fiches techniques de leurs produits traceurs commercialisés doit, de manière générale, être soigneusement améliorée.

Les poudres d'uranine et surtout d'acide amino G sélectionnées pour la présente étude sont, en revanche, de très bonne pureté (84,6 à 95,1 %, et 93,0 à 96,7 %, respectivement : Tableau 11), 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 pyranine, tinopal et PTSA sont également de qualité équivalente, avec des teneurs en traceur de 91,0 %, 85,3 %, et 83,9 %, respectivement (Tableau 11).

Les poudres d'éosine sélectionnées cette fois-ci sont au niveau de pureté des poudres de la meilleure qualité du premier projet, avec des teneurs en traceur de 83,9 à 89,2 % (Tableau 11), tandis que la fourchette allait de 47,9 à 86,5 % (Défarge *et al.* 2020). Le produit réanalysé F1Ep3 est dans une fourchette moyenne (75-80 % : Tableau 11).

La principale amélioration apportée par ce second projet est que les fournisseurs partenaires sont parvenus à sélectionner, dans 4 cas sur 5, des sulforhodamines B de qualité équivalente aux meilleures poudres d'acide amino G, uranine et éosine, avec des puretés de 86,4 à 96,2 % (Tableau 1), contre 48,8 à 59,0 % (Défarge *et al.* 2020 ; le seul nouveau produit à rester dans cette gamme cette fois-ci est à 52,3 % : Tableau 11). Ce travail de sélection doit donc être poursuivi et encouragé.

Les poudres de naphthionate de sodium ont les puretés moyennes (67,8 à 83,3 % : Tableau 11) des produits analysés lors du premier projet (77,6 à 88,5 % : Défarge *et al.* 2020), limitées par la **teneur en eau constante de ces poudres** (20,3 à 22,6 % : Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020) ; l'un de ceux sélectionnés par Fluotechnik est toutefois de pureté distinctement inférieure à la gamme relativement étroite dans laquelle se situent tous les autres (NSf2 : < 68 % contre > 78-88 % ; Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020).

Le travail de sélection effectué par les fournisseurs partenaires pour les sulforhodamines G n'a pas donné les mêmes résultats que dans le cas des sulforhodamines B, la fourchette de pureté étant même

significativement plus basse (28,8 à 48,8 % : Tableau 11) que lors du premier projet (63,8 à 80,3 % : Défarge *et al.* 2020).

La poudre de **riboflavine** est de qualité encore inférieure, avec une teneur de 16,6 % (Tableau 11).

► **Les résultats obtenus au cours de ce 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 µg/L, et 0,57-0,62 contre 0,59 à 25 µg/L : Figure 13 et Défarge *et al.* 2020), et que celles de la sulforhodamine G SGf1 analysée cette fois-ci lors des deux séries d'analyses sont globalement proches d'une série à l'autre (0,30 et 0,35 à 10 µg/L, et 0,62 et 0,85 à 25 µg/L : Figure 15).**

Cette correction ne permet toutefois pas, comme on l'avait déjà montré au cours du premier projet (Défarge *et al.* 2020), et contrairement à ce qu'avançaient Lawaetz & Stedmon (2009), de s'affranchir de toutes les fluctuations instrumentales qui peuvent advenir pendant une série d'analyses, en particulier de variations ponctuelles de l'intensité de la lampe du spectrofluorimètre, que certains résultats du présent projet semblent mettre en cause (voir sections 3.1.4.4, 3.1.4.8 et 3.1.4.9).

Les **résultats spécifiques** obtenus lors de ce second projet 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

Cette action incluait la mise en œuvre de déterminations analytiques nouvelles ou plus poussées dans le but (voir Introduction) :

- ▶ de déterminer la **nature et la variabilité éventuelle des composants formant la part complémentaire soluble du traceur et/ou insoluble dans les poudres de sulforhodamines B et G** ;
- ▶ de ceux **pouvant représenter jusqu'à 50 % de certaines poudres d'éosine**, ou qui pourraient être impliqués dans l'expression de leur fluorescence ;
- ▶ de ceux éventuellement **formés au cours du temps à partir de l'acide amino G** en solution ;
- ▶ d'évaluer l'**impact des microorganismes présents dans les eaux naturelles sur le devenir, la biodégradation ou la transformation des traceurs fluorescents** dans les milieux aquatiques ;
- ▶ d'élargir la première étude à **des traceurs moins, ou devenus moins, utilisés (pyranine, tinopal, PTSA)** et à d'autres produits fluorescents **biosourcés et environnementalo-compatibles** proposés par les fournisseurs (**riboflavine**) ;
- ▶ d'étudier la **compatibilité avec le traçage hydrogéologique d'agents anti-mousse** qu'Art E'Color se proposait d'ajouter à ses préparations de traceurs liquides, afin d'éviter la formation de celle-ci lors des injections d'**uranine** ou d'**éosine** en grandes quantités à forte concentration.

Un majorité (6 sur les 8) des poudres de sulforhodamine B analysées contiennent des impuretés solubles (huit majoritaires), de compositions proches de celle du traceur (voir 3.2.1.3), mais en proportion faible (< 2 à 4 % ; seules SBa2 et SBf2bis n'en contiennent pas : Tableau 11). En raison de leur composition proche de celle du traceur, elles doivent participer à la fluorescence du produit en solution aux longueurs d'onde de la sulforhodamine B, comme le confirme l'amélioration du R² de la relation entre intensité de fluorescence et teneur en traceur du produit, quand on ajoute à la sulforhodamine B ces impuretés solubles (Figure 41).

Dans le cas de certaines poudres (SBf1, F1SBp1, F2SBp1 et F2SBp3), elles seraient accompagnées par des composants solubles en phase aqueuse, mais non détectables en LC-UV et LC-MS, qui représenteraient 40 à 53 % environ de la masse du produit (Tableau 11, à comparer aux totaux des 4 autres nouvelles sulforhodamines B analysées au cours du présent projet). La présence de sodium, phosphore et chlore identifiés par MEB-EDX (Figure 35, Tableau 12) indiquerait l'ajout de sels à ce traceur, pratique fréquente des fabricants déjà signalée par les fournisseurs lors du premier projet (Défarge *et al.* 2020). La présence de sodium à hauteur de 15,1 à 16,3 % dans les 3 sulforhodamines B du premier projet et dans SBf1 (quantifié par ICP-MS : Tableau 13), fait également soupçonner l'ajout de sels, comme l'indiquerait également le total de la composition massique, des composants solubles complémentaires en représentant 36 à 54 % (Tableau 11).

Du chrome quantifié par ICP-MS à hauteur de 0,12 à 0,32 % dans ces 4 produits (Tableau 13) pourrait également être apporté par ces sels. Malgré la toxicité avérée de ce métal en solution, ces teneurs ne peuvent entraîner de problème pour la vie aquatique ou la consommation d'eau des milieux superficiels où ont lieu les injections, dans les conditions courantes d'utilisation de ces produits en traçage hydrogéologique (voir section 3.2.2).

Aucun de ces produits ne contient en revanche de composant insoluble, contrairement aux conclusions du premier projet, qui l'avait déduit de difficultés de mises en solution de ces poudres (Défarge *et al.* 2020).

Les sulforhodamines G analysées contiennent également des impuretés solubles (onze majoritaires), de compositions proches de celle du traceur (dont de la sulforhodamine B : voir 3.2.1.4), mais cette fois-ci en proportion pouvant être notable, et très variable d'un produit à l'autre (de 3 à 18 % : Tableau 11). Comme dans le cas des sulforhodamines B, elles doivent participer à la fluorescence du produit en solution, comme le confirme l'amélioration encore plus nette du R^2 de la relation entre intensité de fluorescence et teneur en traceur du produit, quand on les ajoute à la sulforhodamine G (Figure 42).

Dans le cas de SGf1 et SGf2, elles seraient accompagnées par des composants solubles en phase aqueuse, mais non détectables en LC-UV et LC-MS, qui représenteraient 35 %, et 67 %, respectivement, de la masse du produit (Tableau 11). La présence de sodium, quantifié par en ICP-MS et ICP-AES à hauteur de 16,9 à 22,8 % (Tableaux 17 et 18), et de sulfate, quantifié par chromatographie ionique à hauteur de 33,2 %, et 38,7 %, respectivement (Tableau 19), indique, comme pour les sulforhodamines B, l'ajout de sels, en l'occurrence majoritairement de sulfate de sodium.

A la différence des sulforhodamines B, et de tous les autres traceurs (Tableau 11), les sulforhodamines G contiennent une part de composants insolubles, ou difficilement solubles (leur meilleure solubilité étant obtenue dans l'eau à pH basique), très variable (d'où leurs comportements distincts au moment de la mise en solution : Tableau 4), et pouvant être significative (15 à 46 % de la masse sèche : Tableau 11). Ce sont, comme dans le cas des impuretés solubles, des dérivés de la sulforhodamine G, ainsi que de la sulforhodamine B (Tableaux 22 et 23).

Ces insolubles contiennent également une proportion de 3 à 4 % de chrome (déterminée en MEB-EDX dans le cas de SG1a et SGf1 : Figures 37 et 38), se traduisant par une teneur globale allant de 0,7 à 1,8 % dans tous les produits analysés (Tableaux 16-18) ; du plomb à hauteur de 0,6 à 1,5 % est également systématiquement présent (Tableaux 17 et 18).

Malgré la toxicité avérée de ces métaux en solution, ces teneurs ne peuvent entraîner de problème pour la vie aquatique ou la consommation d'eau des milieux superficiels où ont lieu les injections, dans les conditions courantes d'utilisation de ces produits en traçage hydrogéologique (voir section 3.2.2). La part associée à la fraction difficilement soluble de ces poudres pourrait toutefois rejoindre les sédiments de fond de ces masses d'eaux ; l'absence de réglementation en cette matière ne permet pas d'estimer le risque éventuel pour la vie aquatique, mais il semble minime, étant donné les faibles quantités généralement injectées et le caractère ponctuel des opérations (3.2.2).

Les éosines contiennent également une part de **composants complémentaires solubles (1,6 à 5,8 % : Tableau 11)**. Leur teneur dans le produit issu du premier projet (F1Ep3), qui a été analysé cette fois-ci du point de vue de sa composition précise, pour tâcher d'expliquer son comportement spécifique (son intensité de fluorescence était équivalente au produit standard, de pureté proche de 100 %, alors que sa propre pureté n'était que de 75 % : Défarge *et al.* 2020), est dans la moyenne (3,7 % : Tableau 11) ; **ces composants sont nombreux (douze majoritaires), et de compositions proches de celle du traceur (dont de l'uranine, identifiée par l'absence de brome dans la molécule : voir 3.2.1.5).**

Comme dans le cas des sulforhodamines, ils doivent donc **participer à la fluorescence du produit en solution**, comme le confirme l'amélioration du R^2 de la relation entre intensité de fluorescence et teneur en traceur du produit, quand on les ajoute à l'éosine (Figure 40), et pourraient alors **expliquer en partie la déconnection entre intensité de fluorescence et pureté observée dans le cas de F1Ep3**.

Parmi les nouveaux traceurs étudiés au cours de ce second projet, le tinopal et la riboflavine partagent avec les sulforhodamines et l'éosine la présence de **composés complémentaires solubles** (Tableau 11). La riboflavine Ra1 en possède la proportion la plus forte parmi tous les produits analysés (près de 62 % : Tableau 11), d'abord parce que le produit qu'a pu sélectionner Art E'Color est le sel de sodium de riboflavine 5'-monophosphate (voir section 2.1, notamment Tableau 1), ensuite probablement également car la riboflavine est très peu soluble dans l'eau, contrairement à la riboflavine phosphate (1 g/L à 25°C, contre 100 g/L à 20°C : voir section 3.2.2). Ces composés incluent **majoritairement des molécules proches de la riboflavine phosphate**, mais aussi **proches de la riboflavine** (Tableau 25).

Contrairement aux cas des sulforhodamines et de l'éosine, **rien ne prouve que ces composés complémentaires participent à la fluorescence du produit en solution**, puisque deux au moins

des trois pics que nous avons identifiés ne sont pas répertoriés comme caractéristiques de la riboflavine dans la littérature (et seraient donc dus à la riboflavine phosphate et ses molécules dérivées) ; le 3^{ème} pic, que nous avons utilisé pour nos mesures d'intensité, n'est par ailleurs considéré dans la littérature que comme un pic secondaire de la riboflavine, le pic principal n'ayant pas été identifié par nos analyses spectrofluorimétriques (voir section 3.1.2). La faible teneur de la riboflavine dans la poudre Ra1 (< 17 % Tableau 11), se traduisant par sa probablement très faible présence en solution, explique alors pourquoi c'est de tous les traceurs étudiés celui qui a de très loin **la plus faible puissance de fluorescence** (Figure 22).

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 29 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) n'a pas pu 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 **naphtionate de sodium**, l'**acide amino G** et le **tinopal** (voir Annexe 1). Les composants fluorescents naturels gênants sont principalement ceux de **type C**, correspondant à des **composés humiques de haut poids moléculaire**, et de **type M**, correspondant à des **composés humiques de faible poids moléculaire**, pouvant traduire l'influence d'une **biodégradation bactérienne des composés humiques de 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 Ac), et un de type de **type M** (Annexe 1), avec un rapport d'intensité de fluorescence de 5 à 3,5 entre les deux (résultat non montré dans le présent rapport). La présence de ces composés 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 probablement de l'**acide amino G** (3.1.4.6 ; même si le fluorophore C n'a pas été identifié par analyse spectrale, la présence du fluorophore Ac témoigne de la présence de MO de type C, et une faible part d'intensité dans le domaine du fluorophore C pourrait s'ajouter à la fluorescence de l'acide amino G).

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 sections 3.1.4.1, 3.1.4.3, 3.1.4.4, et 3.1.4.10), avec des écarts toutefois inférieurs à ceux des deux premiers traceurs, sauf dans le cas de la **sulforhodamine G** : < 0,09 pour la **sulforhodamine B** (Figure 25), 0,05-0,09 pour la **riboflavine** (Figure 34), 0,04-0,10 pour l'**uranine** (en ne prenant en compte que les solutions de pH équivalent : Figure 23), et 0,08-0,33 pour la **sulforhodamine G** (Figure 26), contre 0,14-0,22 pour le **naphthionate de sodium** (Figure 27) et 0,17-0,19 pour l'**acide amino G** (Figure 29). Les intensités brutes de fluorescence mesurées dans l'eau naturelle seule montrent également des écarts entre celles mesurées aux longueurs d'onde proches de celles des composés naturels de type M ou C (378-388 pour l'intensité brute de l'eau du Bouillon aux longueurs d'onde du naphthionate de sodium et 434-440 pour celles de l'acide amino G) et celles aux longueurs d'onde des autres traceurs (uranine : 17, sulforhodamine B : 5-6, sulforhodamine G : 5-9), à l'exception, mais dans une moindre mesure, de la riboflavine (177 : l'eau du Bouillon contiendrait donc des composants fluoresçant dans le même domaine que la riboflavine ; résultats bruts non inclus dans le présent rapport).

Il est à noter que l'intensité brute de fluorescence de l'eau du Bouillon aux longueurs d'onde du **tinopal** est encore supérieure à celle correspondant au naphthionate de sodium ou à l'acide amino G (488, conforme au recouvrement avec les MO de type C ; c'est donc bien un effet du pH qui masque ce phénomène d'augmentation de l'intensité de fluorescence des solutions dans l'eau naturelle de ce traceur : voir section 3.1.4.8), et non négligeable dans le cas de la **pyranine** (110, conforme à sa proximité avec les MO humiques à haut poids moléculaire de type C+ : voir Annexe 1).

Dans le cas des **sulforhodamines** et de l'**uranine**, ces MO naturelles dont la fluorescence s'ajoute à celles des traceurs pourraient être des **pigments produits par les microorganismes photosynthétiques présents dans l'eau du Bouillon** (voir section 3.1.4.11) : **phycoérythrobiline** pour la **sulforhodamine B**, **phycourobiline** pour la **sulforhodamine G**, **chlorophylles et/ou caroténoïdes** pour l'**uranine** ; dans le cas de la **riboflavine**, nous n'avons trouvé dans la littérature aucun composé d'origine microbienne qui pourrait fluorescer dans le même domaine d'excitation et d'émission.

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 0,33 Unités Raman : Figure 26) pose toutefois 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 (voir ci-dessus). 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 peut 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 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 difficilement solubles dans l'eau (voir plus haut), l'accroissement de leur fluorescence dans l'eau naturelle par rapport à l'eau ultrapure (Figure 26) 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.

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 avec le temps pour celles mesurées aux longueurs d'onde de l'uranine, des sulforhodamines, ou de la riboflavine, alors qu'elles ont tendance à augmenter nettement dans le cas du naphthionate de sodium (de 378-388 à t_0 , à 1238-1432 à 6 mois) 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, puis 603-625 à 6 mois (données brutes non présentées dans ce rapport) ; les fluctuations observées n'ont pas de lien direct avec les fluctuations de température. Parmi les 4 nouveaux traceurs, c'est également le cas aux longueurs d'onde du tinopal, dont l'évolution suit la même tendance que celle aux longueurs d'onde du naphthionate (de 482 à t_0 , à 970 à 6 mois), et, dans une moindre mesure, de la pyranine (de 110 à t_0 , à 176 à 6 mois).

On observerait donc globalement dans l'eau du Bouillon conservée à l'obscurité à la température du laboratoire, à une **production ou libération** avec le temps (à partir des MO présentes dans l'eau naturelle) **de composés humiques fluorescents de type M, C, et dans une moindre mesure C+**, probablement issus, pour les premiers, de la biodégradation *in vitro* des composés humiques de plus haut poids moléculaire de type C, 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).

Cette hypothèse n'est véritablement confirmée par les spectres d'excitation-émission réalisés sur les échantillons d'eau naturelle au terme des 6 mois de suivi (voir Annexe 1 : Contrôle final au 3 février 2025), que pour les **composés de type M, qui deviennent les composants dominants de la MO** (expliquant la nette augmentation de la fluorescence aux longueurs d'onde du naphthionate de sodium), les composés de type C étant remplacés par des **composés protéiniques de type T**, d'origine microbienne ou acides aminés libres ou intégrés à des protéines intactes ou faiblement dégradées, qui pourraient donc être produits directement par des bactéries ou issus de la dégradation de composés humiques ; ces derniers ne présentent d'interférence spectrofluorimétrique avec aucun des produits fluorescents que nous avons étudiés (voir Annexe 1).

Ces observations sur les MO naturelles présentes dans l'eau du Bouillon étaient importantes à vérifier et à comprendre pour interpréter les **baisse relatives des intensités résiduelles de fluorescence, pouvant aller jusqu'à sa disparition complète**, des solutions de **sulforhodamine B** (Figure 25), de **sulforhodamine G** (Figure 26), de **naphthionate de sodium** (Figure 27), d'**acide amino G** (Figure 29), de la **pyranine** (Figure 30) et possiblement du **tinopal** (Figure 31), 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 **baisse 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 $\mu\text{g/L}$, 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 25-27 et 30-31) 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'uranine (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 $\mu\text{g/L}$, et non à 10, 15 ou 25 $\mu\text{g/L}$, à la seule exception d'une solution d'acide amino G à 10 $\mu\text{g/L}$.

Le **naphthionate de sodium** est cette fois-ci aussi le traceur le plus affecté sur l'ensemble du suivi, et aux concentrations de 10 et 25 $\mu\text{g/L}$, celles à 10 $\mu\text{g/L}$ étant les plus touchées, l'une d'entre elles voyant sa fluorescence quasiment disparaître au bout de 5 mois (Figure 27). 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 77 à 90 % au bout de 6 mois (selon les produits et les concentrations : Figure 27), et à 10-15 % entre 2 jours et 2 semaines (Figure 27), ce dernier laps de temps 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 25).

À la différence du naphthionate de sodium, l'écart entre les deux types de solutions de sulforhodamine B évolue généralement peu en moyenne par la suite (voir 3.1.4.3), pour atteindre une fourchette de 8 à 26 % pour toutes les solutions au bout de 6 mois (Figure 25). La différence d'intensité de fluorescence liée à la biodégradation atteint 15-20 % dès les 3 premiers jours d'exposition à l'eau naturelle (Figure 25), et peut 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 26). 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 35 à 47 % au bout de 6 mois, et entre 3 à 6 % à 25 µg/L et 10 à 21 % à 10 µg/L entre 3 jours et 2 semaines (Figure 26), durée correspondant aux suivis de la plupart des opérations de traçage courantes.

L'autre produit ne subirait au bout de 6 mois qu'une biodégradation de l'ordre de 12 % 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 26).

Dans le cas de l'acide amino G, la différence d'intensité n'est notable qu'à partir de 4,5 à 6 mois, durée rarement atteinte par les opérations de traçage courantes (Figure 29 ; elle devient alors assez forte : jusqu'à 47 à 56 % dans 3 cas sur 4, 10 % pour la solution du produit **AGf2** à 25 µg/L).

En ce qui concerne la pyranine, une baisse d'intensité comparable n'a lieu que dans le cas de la solution à 10 µg/L, et à partir de 2 mois seulement, la différence d'intensité de fluorescence avec la solution dans l'eau ultrapure étant de l'ordre de 60 % à 4 mois, et 90 % à 6 mois ; la baisse est moins marquée pour la solution à 25 µg/L, même si l'intensité de fluorescence de la solution

préparée avec l'eau naturelle est également distinctement inférieure à celle de la solution dans l'eau ultrapure (voir Figure 30).

Le comportement des solutions de **tinopal** est moins évident à interpréter en raison de la multiplicité des facteurs semblant entrer en jeu dans l'évolution de leurs intensités respectives de fluorescence (voir section 3.1.4.8). Celles conservées dans l'eau naturelle voient leur fluorescence baisser progressivement à partir de 2 mois et jusqu'à 6 mois, de 15 à 25 %, à 25 et 10 µg/L, respectivement (Figure 31), mais une baisse de 15 % environ est également observée sur le même laps de temps pour les solutions dans l'eau ultrapure tamponnée conservées à 40 °C (Figure 31), pour lesquelles une biodégradation par les bactéries présentes à la source du Bouillon ne peut évidemment pas être en cause. Les comparaisons avec les autres solutions de tinopal dans l'eau ultrapure conservées à l'obscurité peut laisser penser dans ce cas à un effet de biodégradation dû à des bactéries présentes dans la poudre au départ et libérées en solution (voir section 3.1.4.8), comme cela a déjà été suggéré dans le cas de solutions de naphthionate de sodium et d'acide amino G au cours du 1er projet (Défarge *et al.* 2020) ; le fait que la poudre de tinopal utilisée soit hygroscopique (Tableau 4) comme celles de ces deux autres traceurs au moment de leur analyse pendant le 1er projet, renforce cette hypothèse, la présence d'eau favorisant la contamination microbienne ; la température de 40 °C pourrait par ailleurs avoir un effet stimulant sur cette biodégradation (voir section 3.1.4.8).

L'intervention de phénomènes de biodégradation des produits en solution par des bactéries présentes dans les poudres au moment de leur dissolution avait en effet déjà été évoquée lors du 1^{er} projet (Défarge *et al.* 2020), pour expliquer la baisse d'intensité résiduelle de fluorescence à l'obscurité de solutions, préparées avec de l'eau ultrapure, et donc stérile, d'urinine, de naphthionate de sodium et d'acide amino G à 1 µg/L (et 10 µg/L pour une seule poudre d'acide amino G) ; la teneur en eau, l'hygroscopie et/ou l'humidification des poudres pourrait être à l'origine d'un développement bactérien entraînant une biodégradation se mettant en place une fois les poudres mises en solution. Les poudres concernées se caractérisaient en effet par de fortes teneurs en eau (cas du naphthionate de sodium : voir Défarge *et al.* 2020 ; section 3.1.1 et Tableau 11 pour les poudres analysées au cours du présent projet), un caractère hygroscopique (observé à l'époque pour beaucoup de poudres d'acide amino G : Défarge *et al.* 2020 ; cas de AGa1 cette fois-ci, voir Tableau 4), ou la mauvaise conservation ou le vieillissement des produits (les trois produits anciens stockés à CETRAHE, une urinine, 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).

Ce serait donc également le cas cette fois-ci en ce qui concerne le tinopal (voir ci-dessus), de nouveau le naphthionate de sodium (dans des solutions à 10 µg/L : section 3.1.4.5), et l'acide amino G (à 10 et 25 µg/L : section 3.1.4.6), et possiblement pour la riboflavine (section 3.1.4.10).

La biodégradation des traceurs fluorescents les plus utilisés en Europe occidentale, qui sont étudiés ici, déjà mentionnée dans la littérature pour l'urinine (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'urinine (Défarge *et al.* 2020), et démontrée, pour la première fois à notre connaissance, pour les sulforhodamines B et G, l'acide amino G, la pyranine et probablement le tinopal, 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 naphthionate de sodium, de sulforhodamine B ou G, de pyranine ou de tinopal 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 deux premiers n'ayant montré aucun signe de biodégradation au cours de nos expériences au laboratoire.

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 naphthionate de sodium, l'acide amino G, les sulforhodamines B et G, la pyranine et le tinopal, 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 naphtionate de sodium, et du présent rapport pour les sulforhodamines B et G, la pyranine et le tinopal).

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 naphtionate de sodium, l'acide amino G ou le tinopal : Tableau 4), 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 naphtionate de sodium, 15-20 % pour la sulforhodamine B, et 4-17 % pour la sulforhodamine G, tous les produits n'étant pas sensibles au même degré pour ce dernier traceur.

Les principaux autres résultats obtenus sur les 4 nouveaux produits étudiés lors de ce second projet, concernant leur qualité comme traceurs hydrogéologiques, sont les suivants :

► Du point de vue de la puissance de fluorescence, le tinopal et le PTSA sont d'excellents traceurs, proche et équivalent, respectivement, de la sulforhodamine G (Figure 45). Ce projet a permis, pour la première fois à notre connaissance, de donner une valeur au rapport d'intensité du second à l'uranine (de l'ordre de la moitié : Tableau 5 et Figure 45) ; le rapport du premier à l'uranine serait légèrement plus bas que ce qu'on peut trouver dans la littérature (46-52 à 100, contre 60 à 100 pour Benischke *et al.* (2007 ; voir Tableau 5 et Figure 45). La pyranine se situe sur ce plan entre l'acide amino G et l'éosine, avec un rapport d'intensité à l'uranine (16 à 100) conforme à ce qu'avancent Leibundgut *et al.* (2009 ; voir Tableau 5 et Figure 45).

La **riboflavine** serait un traceur très peu puissant, moitié moins environ que la sulforhodamine B, qui est le moins puissant parmi les produits déjà utilisés en traçage hydrogéologique que nous avons étudiés (Figure 45). La faible teneur en riboflavine du produit utilisé (< 17 %) ne semble pas seule en cause, puisque celui-ci contient des impuretés de structure proche qui pourraient participer à sa fluorescence ; la **faible solubilité de la molécule dans l'eau** pourrait être une explication (voir plus haut).

► La **dépendance au pH** du **tinopal** (voir section 3.1.4.8) est conforme à la littérature, c-à-d caractérisé par une chute rapide de la fluorescence en solution au-dessous de pH 7 (Käss 1998). Les résultats obtenus pour la **pyranine** semblent cohérents avec son comportement de photoacide décrit par la littérature, avec des domaines de maximums d'excitation et d'émission distincts (voir section 3.1.4.7 et Annexe 1) ; le **PTSA**, de structure proche (Tableau 10), pourrait avoir également un comportement de photoacide (voir section 3.1.4.9). Dans la gamme de pH couverte par nos solutions (de 5,73 à 7,52 : Tableau 4), la constance de l'intensité de fluorescence de la **riboflavine** est cohérente avec la littérature (Drössler *et al.* 2002 ; voir section 3.1.1.10).

► Nos résultats confirment les données de **photosensibilité** disponibles dans la littérature : le **tinopal** est le **3^{ème} traceur le plus sensible à la lumière** (voir section 3.1.4.8, notamment Figure 31), après l'éosine, le traceur le plus sensible parmi ceux que nous avons étudiés, et l'uranine (Tableau 9) ; la **pyranine a une sensibilité à la lumière du même ordre de grandeur que celle du naphthionate de sodium**, c'est-à-dire relativement sensible, mais dans une moindre mesure que l'éosine, l'uranine, ou le tinopal (Tableau 9) ; la **riboflavine**, qui n'a pas fait l'objet d'une détermination de coefficient de photosensibilité ou de temps de demi-vie similaires à ceux des traceurs fluorescents courants (Tableau 9), car jamais utilisée en traçage jusque-là à notre connaissance, est connue pour être un **produit hautement sensible à la lumière en solution**, ce que nos résultats montrent avec une chute très rapide de l'intensité de fluorescence dans l'eau ultrapure en 24 h, de 100 à 43 % pour la solution à 1 mg/L, et 31 % pour la solution à 25 µg/L (voir section 3.1.4.10, notamment Figure 34).

Nous apportons par ailleurs des données, inédites à notre connaissance, sur la **sensibilité à la lumière du PTSA**, qui s'avère être un **traceur encore plus sensible que le tinopal**, 3^{ème} traceur le plus photosensible parmi tous ceux étudiés (Tableau 9), surtout au-delà d'1 semaine d'exposition, les résultats de photosensibilité jusqu'à 1 semaine étant du même ordre de grandeur (comparer les résultats des sections 3.1.4.8 et 3.1.4.9, notamment les Figures 31 et 32).

► Pour les deux traceurs dont la **dépendance à la température** a été étudiée et quantifiée dans la littérature (Tableau 9), nos résultats semblent remettre en cause ces données antérieures : ils **infirmement les données de Käss (1998), selon lesquelles le tinopal serait le traceur le plus sensible à la température**, plus encore que la sulforhodamine B (Tableau 9), puisqu'aucun effet particulier de ce facteur sur l'intensité de fluorescence des solutions n'est constaté (voir section 3.1.4.8 ; son coefficient de dépendance à la température négatif correspondrait à une corrélation positive entre intensité de fluorescence et température, contrairement au cas le plus général) ; la **pyranine** devrait avoir la même sensibilité à la température que l'acide amino G (Tableau 9), ce qui n'est pas vraiment mis en évidence par nos résultats (voir discussion dans la section 3.1.4.11). **La température de 40 °C pourrait toutefois avoir un effet stimulant sur la biodégradation du tinopal** (voir plus haut et section 3.1.4.8).

PTSA et **riboflavine**, pour lesquels aucune donnée de thermosensibilité n'est, à notre connaissance, disponible dans la littérature, semblent suivre la loi plus générale d'une relation inverse entre intensité de fluorescence et température, avec une sensibilité modérée (voir sections 3.1.4.9, notamment Figure 33, et 3.1.4.10).

Dans tous les cas, comme dans ceux documentés au cours du premier projet (Défarge *et al.* 2020), quand un effet de la température se fait ressentir, il est réversible, c-à-d ponctuel, et n'entraîne aucun effet de destruction des traceurs en solution.

Le bilan de cette étude de traceurs moins, ou devenus moins, utilisés (pyranine, tinopal, PTSA) et de produits fluorescents biosourcés et environnementalo-compatibles possiblement alternatifs (riboflavine) peut donc se résumer ainsi :

► Le **tinopal** est un traceur à reconsidérer pour des utilisations alternatives au naphthionate de sodium ou à l'acide amino G, dans le domaine de fluorescence distinct de ceux de l'uranine ou l'éosine, ou des sulforhodamines (voir Annexe 1), en raison principalement de sa **puissance de fluorescence** proche de celle de la sulforhodamine G, qui est le traceur le plus puissant après l'uranine parmi ceux que nous avons étudiés (Figure 45). Il semble **moins sensible à la biodégradation** que les deux premiers, les sulforhodamines, la pyranine ou l'uranine. **Aucune dépendance particulière à la température** n'a été mise en évidence par nos résultats, contrairement à ce qu'avançaient les données de la littérature jusque-là.

Sa **sensibilité à la lumière** peut se gérer comme pour la plupart des autres traceurs fluorescents étudiés (en protégeant les solutions et échantillons de celle-ci), et sa **dépendance au pH** (chute rapide de la fluorescence en solution au-dessous de pH 7) comme dans le cas de l'uranine.

Son **caractère hygroscopique** (au moins du produit étudié ici : Tableau 4) favorisant la contamination microbienne, puis sa biodégradation éventuelle une fois la poudre mise en solution, partagé avec les deux autres traceurs situés dans le même domaine de fluorescence, demande les mêmes **précautions de conservation** que ceux-ci ; dans son cas, la **température** pourrait par ailleurs avoir un effet stimulant sur cette biodégradation (voir section 3.1.4.8).

Une confirmation de la **reproductibilité de l'excellente pureté** des poudres (constatée pour celle étudiée ici : Tableau 11), la détermination de la **nature des composants complémentaires** en représentant 4 % (Tableau 11), et la possibilité de **vérifier la première par simple mesure de l'intensité de fluorescence en solution**, resteraient donc à mener dans une étude ultérieure.

► Le **caractère photoacide de la pyranine** rend difficile la maîtrise de la composante analytique des traçages qui seraient réalisés avec ce traceur, puisque la moindre différence ou évolution du pH entre solutions ou échantillons rend leur comparaison en termes d'intensité de fluorescence impossible (voir section 3.1.4.7). Il serait donc **à déconseiller** pour ces applications.

► Nos résultats montrant que le **PTSA**, de structure chimique proche de celle de la pyranine (Tableau 10), semble partager avec elle ce caractère de **photoacide**, et serait donc également **à déconseiller comme traceur hydrogéologique**, et ce malgré une puissance de fluorescence intéressante (Figure 45).

► En ce qui concerne la **riboflavine**, même si le produit étudié ici en contenait moins de 17 % car principalement composé de **riboflavine phosphate et de ses dérivés** (se traduisant par une très faible puissance de fluorescence aux longueurs d'onde caractéristiques données par la littérature et retrouvées dans nos analyses : Figure 45), sa **faible solubilité dans l'eau**, sa **très haute photosensibilité**, et son **caractère non conservatif en solution dans toutes les conditions** (section 3.1.4.10), conduisent de toute façon à **l'exclure comme traceur alternatif** aux traceurs traditionnels.

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 section 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 cette seconde 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), ainsi que la pyranine pour le seul produit étudié, 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 naphtionate de sodium se situant toujours entre 68 et 87 % en raison du caractère hygroscopique de ces poudres (Tableau 11 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 11 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 naphtionate 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 (48-93 % pour les autres fournisseurs de ce traceur) ;
- ▶ entre 38 et 97 % pour la sulforhodamine B ;
- ▶ entre 47 et 90 % pour l'éosine ;
- ▶ entre 29 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, 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, 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 section 3.1.3), et est donc essentiellement liée à leur teneur dans la poudre pour l'uranine et l'acide amino G (voir 3.3.1, 3.3.3), mais des facteurs supplémentaires comme la teneur en eau ou des

composants complémentaires solubles et insolubles peuvent également intervenir pour l'éosine, les sulforhodamines et le naphthionate de sodium (voir 3.3.2 à 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 deux des six traceurs analysés de ce point de vue :

► l'urinine, avec des R^2 de 0,8010 à 0,8652 (Figure 39) ;

► la sulforhodamine B, avec des R^2 de 0,8787 à 0,9240, et de 0,9259 à 0,9280 en ajoutant les impuretés de composition proche, qui doivent contribuer à la fluorescence des solutions aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur (Figure 41).

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'urines (Défarge *et al.* 2020).

En ce qui concerne la sulforhodamine G, les R^2 très moyens de 0,5329 à 0,6456, passent à 0,6763 à 0,7885 en ajoutant, comme pour la sulforhodamine B, les impuretés solubles de composition proche, qui doivent contribuer à la fluorescence des solutions aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur (Figure 42), soit des R^2 de même ordre que ceux de l'acide amino G (0,6007 à 0,7387 : Figure 44).

► Dans le cas de la sulforhodamine G, le fait que ces corrélations restent distinctement inférieures à celles obtenues pour la sulforhodamine B ($R^2 > 0,9$), ou même l'urinine ($R^2 > 0,8$), même en ajoutant les composants complémentaires insolubles, doit tenir principalement à la **présence d'une part difficilement soluble en proportions très variables d'une poudre à l'autre** (15 à 46 % : Tableau 11). Toutefois, même imparfaites, ces **corrélations restent suffisantes pour estimer approximativement la teneur des poudres de sulforhodamine G en composants fluoresçant aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur** (Figure 44, droite) ;

► Pour l'acide amino G, ces corrélations distinctement inférieures à celles obtenues pour la sulforhodamine B ($R^2 > 0,9$) ou l'urinine ($R^2 > 0,8$) doivent être principalement dues à la **faible dispersion des valeurs de pureté** des produits analysés depuis le début de ces projets financés par l'OFB (86-98 %, la plus faible parmi les traceurs étudiés : voir plus haut), ce qui en retour rend moins nécessaire une vérification de pureté ; elle pourrait toutefois être **utile pour détecter un produit sortant exceptionnellement de cette fourchette**, dont l'intensité de fluorescence serait alors distinctement inférieure à celles montrées par ces produits de grande pureté (Figure 44).

En ce qui concerne l'éosine, l'ajout des impuretés solubles de composition proche, qui doivent contribuer à la fluorescence des solutions aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur, ne permet pas, contrairement à ce qu'on a pu constater pour les sulforhodamines, d'améliorer significativement les **R^2 des relations entre intensité de fluorescence et composition des poudres, qui restent moyens** : 0,5768 à 0,5910, contre 0,5602 à 0,5719 pour la seule éosine (Figure 40). La particularité des poudres analysées pour ce traceur, dont les **valeurs de puretés sont relativement moins dispersées** (75 à 90 %, avec un seul produit de pureté < 50 % : Figure 40 ; à comparer aux Figures 41 et 42), pourrait en être l'explication ; la **plus forte**

dispersion de leurs teneurs en eau (de 0,2 à 15,5 %, contre 1,6 à 8 % pour la sulforhodamine B, 1,4 à 12,5 % pour la sulforhodamine G : Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020) pourrait également jouer un rôle dans la variabilité des prises d'essai. Comme dans le cas de l'acide amino G, les **abaques bâtis à partir de nos résultats restent de qualité suffisante pour détecter les produits de pureté médiocre** comme le F2Ep3 (Figure 40).

Les très faibles corrélations entre intensité de fluorescence en solution et pureté des poudres de **naphthionate de sodium** (avec des R^2 de 0,0167 à 0,0190 : Figure 43) tiennent probablement à la fois à la **faible dispersion de leurs teneurs en traceur**, comme dans le cas de l'acide amino G (68-87 % ; voir plus haut), et à leurs **fortes teneurs en eau** (toujours > 20 % : Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020) associées à un **caractère très hygroscopique**, 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.

Comme pour l'acide amino, ces teneurs en traceur et en eau relativement constantes rendent moins nécessaire une vérification de pureté ; elle reste toutefois **utile pour détecter un produit sortant exceptionnellement de cette gamme de pureté**, dont l'intensité de fluorescence devrait alors être distinctement inférieure à celles montrées par ces produits de grande pureté (Figure 43).

En conclusion, les teneurs en traceurs des poudres n'étant pas à ce jour garanties par les fabricants, ne pouvant être contrôlées par les fournisseurs (voir section 4.2), mais nécessitant d'être connues le plus précisément pour pouvoir injecter dans les systèmes traçage des masses de traceurs suffisantes pour être assuré qu'une non-restitution de ce traceur n'est pas un faux négatif, et pour effectuer une exploitation et une interprétation scientifiquement exactes des résultats obtenus en cas de restitution (voir ci-dessus), un contrôle de pureté des produits utilisés est indispensable pour la gestion de la ressource en eau.

Les **abaques** reliant intensité de fluorescence des poudres en solution et teneur en traceur ou en traceur + impuretés solubles participant à la fluorescence aux longueurs d'onde du traceur, semblent un moyen simple à mettre en œuvre, et fiable s'il est réalisé par un laboratoire spécialisé utilisant les procédures mises au point depuis nos deux études consacrées à ce sujet pour réaliser ce contrôle, permettant, pour les traceurs étudiés jusque-là de ce point de vue (voir plus haut) :

► de **déterminer avec une relativement bonne précision les teneurs des poudres en uranine et en sulforhodamine B + impuretés** contribuant à la fluorescence aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur ;

► d'**estimer approximativement les teneurs des poudres en sulforhodamine G + impuretés solubles** contribuant à la fluorescence aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur ;

► de **détecter qu'une poudre d'éosine est de qualité médiocre** (ne se situant pas dans la gamme de pureté retrouvée pour la plupart de ses produits (75-90 %) et d'**estimer approximativement sa teneur** (en éosine + impuretés contribuant à la fluorescence aux longueurs d'onde caractéristiques de ce traceur) ;

► de **détecter une poudre d'acide amino G, ou de naphthionate de sodium, qui ne se situerait pas dans la gamme de pureté habituellement retrouvée pour ces traceurs (86-98 %, et 68-87 %, respectivement).**

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

Cette partie du travail, visant à aboutir à un **engagement des principaux acteurs du traçage en France (des fournisseurs aux praticiens, en passant par les donneurs d'ordre)**, pour aboutir 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, inciter 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), dans le but d'améliorer les pratiques du traçage en renforçant la fiabilité des 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 (voir Introduction. Action N° 3), n'a pu être qu'esquissée au cours du projet, mais des **pistes d'évolution en ont été clairement dégagées** (voir section 3.5).

Si le travail de **sensibilisation des fabricants**, tous basés hors de France, et de l'Union Européenne pour la plupart d'entre eux, **à la qualité de leurs produits fluorescents et aux informations données dans leurs fiches techniques semble difficile, voire impossible** (voir section 4.1), la **recherche de fabricants plus fiables par les fournisseurs français partenaires du projet** a déjà permis d'**améliorer la qualité des traceurs mis à disposition cette fois-ci en ce qui concerne la sulforhodamine B**, dont la teneur en traceur de 4 nouveaux produits sur 5 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 B analysées jusqu'ici dans le cadre des deux projets (86,4 à 96,2 %, contre 38,5 à 59,0 % : Tableau 11 et Défarge *et al.* 2020).

Le travail de sélection des meilleurs produits, appuyé par les contrôles de pureté que permettent les abaques mis en au point au cours de nos travaux (voir section 4.2), devra être poursuivi et amplifié à l'avenir, pour améliorer globalement la qualité des traceurs utilisés et donc des traçages réalisés en France.

L'**amplification de la diffusion technologique autour des bonnes pratiques du traçage** sur tous les points étudiés dans les actions N° 1 et 2 (voir sections 4.1 et 4.2), **en intégrant les nouveaux résultats obtenus depuis le début du premier projet** (Défarge *et al.* 2020), a été poursuivi à travers :

- ▶ les **activités quotidiennes d'expertise-conseil de CETRAHE auprès d'un réseau français de bureaux d'études et d'ingénierie, d'entreprises, de collectivités, d'hydrogéologues pratiquant le traçage artificiel à l'aide de produits fluorescents**, qui s'est enrichi d'une **trentaine de nouvelles structures** depuis le début du présent projet (Annexe 18) ;
- ▶ les **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, ou de manière délocalisée depuis 2022, qui ont accueilli **25 nouveaux participants** durant la période du projet ;
- ▶ la **formation initiale en traçage artificiel des élèves-ingénieurs de Polytech'Orléans, spécialité *Génie civil et environnement***, qui se destinent à intégrer des bureaux d'études mettant en œuvre des opérations de traçage, ou des entreprises du BTP pouvant avoir recours à ces bureaux d'études aux stades de la conception ou de la maintenance des infrastructures et ouvrages de génie civil, sous la forme de **cours-TP de terrain et de laboratoire-TD d'interprétation des données**, ou de **projets** utilisant la méthode traçage sur des périodes de 3 à 10 semaines, selon les années (une **cinquantaine d'élèves-ingénieurs formés** depuis le début du présent projet) ;
- ▶ le **webinaire** consacré à la **qualité des produits traceurs fluorescents et aux bonnes pratiques en matière de traçage artificiel**, donné le 4 avril 2024 à l'invitation de la **Commission Scientifique de la Fédération Française de Spéléologie**, à destination d'un public d'utilisateurs réguliers des traceurs fluorescents dans le cadre de leurs explorations souterraines des systèmes karstiques, révisionnable

sur la chaîne YouTube de la FFS : https://www.youtube.com/watch?v=56_x5cO7qfA (366 vues depuis ; consultation du 11 février 2026) ;

► la mise à disposition sur le site Internet de CETRAHE, avec l'autorisation de l'OFB, des deux rapports intermédiaires (à 1 an, décembre 2022, puis à 2 ans, décembre 2023 : voir <https://www.univ-orleans.fr/fr/cetrahe/amelioration-de-la-qualite-des-produits-fluorescents-utilises-en-tracage-artificiel>) du présent projet, et leur annonce par le biais du site LinkedIn de la Cellule (<https://www.linkedin.com/company/cetrahe-universite-orleans/>).

L'ensemble de ces modes de diffusion autour des bonnes pratiques du traçage, depuis l'attention portée à la qualité des produits achetés, la vérification de leur pureté (pour en tenir compte dans l'évaluation des quantités de traceur à injecter), leur bonne conservation dans le temps, celle des échantillons d'eau prélevés (protection vis-à-vis de la lumière, dans certains cas complétée par une mise au froid pour éviter toute biodégradation des masses de traceur restituées aux points de suivi, rapidité du délai entre prélèvement et analyses : voir section 4.1), jusqu'à la prise en compte des quantités effectives de traceur injecté dans l'exploitation des données de l'opération), devront évidemment être également poursuivis à l'avenir.

Ils devront être complétés par la publication des résultats accumulés au cours des deux projets financés par l'OFB, notamment des avancées qu'ils ont permis dans la meilleure connaissance des traceurs, de leur comportement potentiel dans le milieu naturel, et dans la maîtrise de la chaîne analytique, dans des revues scientifiques internationales, ainsi que sous forme de notes techniques en français (voir <https://www.univ-orleans.fr/fr/cetrahe/publications/notes-techniques>) visant à les résumer à destination des praticiens des traçages hydrogéologiques à l'aide de traceurs fluorescents, afin d'améliorer la qualité de ceux-ci.

Le **COFIL de projet coorganisé avec l'OFB le 17 juin 2025**, élargi à des acteurs institutionnels, autorités réglementaires, donneurs d'ordre, gestionnaires de bases de données concernés par le traçage hydrogéologique en France, a permis de **confirmer, préciser ou dégager de nouvelles pistes d'amélioration de la diffusion de ces résultats et d'amélioration des pratiques de cette méthode**, sur la base des axes de travail prévus dès la création de CETRAHE en 2009 (voir <https://www.univ-orleans.fr/fr/cetrahe/decouvrir/raisons-detre-et-objectifs>), des discussions entre formateurs et retours des participants des sessions de formation continue réalisées depuis cette création (voir section 3.5), et des attentes de l'OFB :

► la **rédaction d'un guide méthodologique complet et à jour en français sur la pratique du traçage hydrogéologique artificiel apparaît maintenant indispensable** (voir section 3.5). Ce guide devra évidemment inclure les avancées permises par les deux projets de recherche successifs financés par l'OFB consacrés à la qualité des produits fluorescents utilisés en traçage hydrogéologique et à l'amélioration de celle-ci, avec les recommandations aux praticiens rappelées ci-dessus, mais également les développements dans le domaine du traçage hydrogéologique artificiel qui ont eu lieu depuis la parution des guides précédents, en particulier le logiciel de dimensionnement et d'interprétation des traçages TRAC et la BD Traçages (voir section 3.5) ;

► la **grille d'évaluation des opérations de traçage** proposée par Jozja *et al.* (2011b), qui est incluse dans la BD Traçages, **pourrait être améliorée en sollicitant des retours d'expérience de ses utilisateurs, et plus globalement du maximum d'acteurs du traçage en France, sous forme d'ateliers techniques en visioconférence**. En plus de son intégration à la BD Traçages, cette grille d'évaluation devra évidemment trouver place dans le guide pratique méthodologique évoqué ci-dessus ;

► il apparaît également nécessaire de **créer un modèle de base de cahier des charges pour la réalisation des opérations de traçage, prêt à l'emploi pour les collectivités et les donneurs d'ordre de manière générale**, qui devra aussi trouver place, une fois validé, à la fois au sein de la BD Traçages et dans le guide méthodologique. La **base de travail pourrait en être le module de formation qui est intégré aux sessions de formation continue en traçage** mentionnées plus haut, enseigné depuis le début par des ingénieurs en bureaux d'études qui ont à répondre à des appels d'offre, du point de vue à la fois des donneurs d'ordre (qui font partie du public de ces sessions) et des bureaux d'études qui y répondent.

Comme pour la grille d'évaluation, la **conception de ce cahier des charges minimum type devra être menée et sa version finale validée, par le maximum d'acteurs du traçage artificiel en France**, depuis les donneurs d'ordre jusqu'aux praticiens, en passant par les institutionnels en charge de la police de l'eau, et les formateurs ;

► En raison du faible nombre d'institutionnels en charge de la police de l'eau présents à ce COPIL élargi, les **évolutions réglementaires nécessaires en matière de traçage artificiel en France n'ont pu être avancés**. Il n'a été question que de la **possibilité de rendre obligatoire la déclaration des opérations de traçage**, pratique non contraignante à l'heure actuelle en France. Dans ce cas, le modèle qui pourrait servir de base aux discussions autour de ces déclarations devra être la **Fiche de déclaration préalable d'un traçage en Région Normandie établie par le BRGM** (https://www.siges.fr/sites/default/files/documents/2024-12/fiche_de_declaration_tracagev6_2020.pdf). Comme pour la grille d'évaluation et le cahier des charges, le travail sur le caractère obligatoire et un **modèle type national de déclaration d'opération de traçage** devra être mené par le **maximum d'acteurs du traçage artificiel en France**.

Les différentes **pistes nouvelles d'amélioration des pratiques du traçage hydrogéologique en France dégagées ci-dessus** nécessitent donc toutes un **travail collectif**, qui pourrait prendre la forme de **webinaires élargis au maximum de ses acteurs, d'ateliers techniques, de réunions de discussion** autour des différents axes (guide méthodologique, grille d'évaluation, cahier des charges, déclaration d'opération de traçage, autres évolutions réglementaires comme l'obligation de contrôle de qualité des produits utilisés...), le cas échéant de **conférences annuelles**, ainsi que de la **communication** la plus large sur leurs avancées. **Il semble nécessaire de de l'encadrer et de le favoriser dans le cadre d'un nouveau projet, prenant la suite des deux précédents, qui pourrait être également financé par l'OFB.**

Même si celui-ci serait principalement consacré à ce travail collectif, qui constitue une forme d'élargissement et de concrétisation de l'Action N° 3 du présent projet, il semblerait utile de réaliser également dans le même cadre des études complémentaires en prolongeant l'Action N° 2 (voir section 4.2) :

► mise au point d'un **abaque reliant intensité de fluorescence en solution et pureté des produits pour le tinopal**, le seul des 4 nouveaux traceurs étudiés au cours du présent projet qui semble présenter un réel intérêt pour améliorer les pratiques du traçage (voir section 4.1) ;

► **identification des impuretés constituant 4 % de la masse du produit Ta1 étudié** (Tableau 11 ; impuretés qui pourraient être une constante dans le cas du **tinopal**, comme pour l'éosine et les sulforhodamines) ;

► **amélioration des abaques concernant les traceurs dont la faible dispersion des puretés peut être tout ou partie à l'origine de R² insatisfaisants (éosine, acide amino G et naphthionate de sodium** ; voir section 4.2), en analysant une **plus large gamme de produits**, ou la constituant, comme les fabricants, par des mélanges avec des sels.

L'évolution vers une forme d'**association regroupant les acteurs du domaine**, voire d'**union professionnelle des praticiens du traçage hydrogéologique s'engageant à mettre en œuvre et respecter les meilleures pratiques**, dégagées des avancées le plus récentes de ces travaux, sur le modèle de celles recensées dans la section 3.5, pourrait être un débouché logique de ce travail.

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

F : fluorescence à la température t

F_0 : fluorescence à la température t_0

t : température au moment de la mesure

t_0 : température de référence.

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.

Rayleigh (diffusion dans l'eau) : Diffusion élastique de la lumière, sans variation d'énergie, se traduisant une émission à une longueur d'onde égale à la lumière incidente.

Raman (diffusion dans l'eau) : Diffusion inélastique de la lumière, 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

AEP : Alimentation en Eau Potable

ASTEE : Association des professionnels de l'eau et des déchets

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

CARMeN : Chimie Analytique et Réactivité Moléculaire en Normandie

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*

CMA : Concentration Maximale Admissible

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

COBRA : Chimie Organique Bioorganique Réactivité et Analyse

COFIL : Comité de Pilotage

COV : Composés Organiques Volatils

DMSO-d6 : diméthylsulfoxyde deutéré

DREAL : Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

EDF : Electricité de France

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

ESI : *ElectroSpray Ionization* (ionisation par électronébulisation)

EWTS : *European Water Tracing Services*

FDS : Fiche de Données de Sécurité

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquide haute performance)

ICP-AES : *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry* (spectrométrie par émission atomique à plasma à couplage inductif)

ICP-MS : *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif)

INSU : Institut National des Sciences de l'Univers

INSA : Institut National des Sciences Appliquées

ISTO : Institut des Sciences de la Terre d'Orléans

LC/MS : *Liquid Chromatography / Mass Spectrometry* (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse)

LDI : *Laser Desorption Ionization* (ionisation par désorption laser)

MA : Moyenne Annuelle

MEB-EDX : Microscope électronique à balayage avec spectromètre à énergie dispersive des rayons X

NQE : Norme de Qualité Environnementale

Q-TOF : *Quadrupole Time-Of-Flight* (analyseur à temps de vol quadripolaire)

RAE : Réseau de l'Assainissement Ecologique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TIMS : *Trapped Ion Mobility Spectrometry* (spectrométrie de mobilité des ions piégés)

UNICEM : Union Nationale des Industries de Carrières Et Matériaux de construction

UPDS : Union des Professionnels de la Dépollution des Sites

UPGE : Union Professionnelle du Génie Ecologique

UV : Ultra-Violet

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.
- 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. Auterix 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.
- Carré J. Joyeux M. Montiel A. 2007.** Risques sanitaires associés aux traceurs fluorescents utilisés en hydrologie. *Environnement, Risques & Santé* 6, p. 443-452.
- CETRAHE BRGM 2019.** *Traçages hydrogéologiques. Système d'Information pour la Gestion des Eaux Souterraines en Centre-Val de Loire*, mis en ligne en janvier 2019.
- Chen L. Hu B. Zhang Jie. Zhang Jin. Huang S. Ren P. Zou Y. Ding F. Liu X. Li H. 2019.** A facile synthesis of 1,3,6,8-pyrenesulfonic acid tetrasodium salt as a hydrosoluble fluorescent ink for anti-counterfeiting applications. *Royal Society of Chemistry Advances* 9, p. 476-481.
- 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.
- 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.
- Dandonneau Y. Niang A. 2007.** Assemblages of phytoplankton pigments along a shipping line through the North Atlantic and tropical Pacific. *Progress in Oceanography* 73, p. 127-144.
- David P.Y. 2012.** *Inventaire régional Haute-Normandie des bétoires, trajets souterrains des eaux (traçages) et des exutoires – Rapport final d'année 4 et des 4 années*. Rapport BRGM/RP-61691-FR, 68 p.
- 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.
- De Carvalho Bertozo L. Philot E.A. Lima A.N. de Resende Lara P.T. Scott A.L. Ximenes V.F. 2019.** Interaction between 1-pyrenesulfonic acid and albumin : Moving inside the protein. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 208, p. 243-254.
- 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.
- Drössler P. Holzer W. Penzkofer A. Hegemann P. 2002.** pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution. *Chemical Physics* 282, p. 429-439.
- 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.
- 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.
- Green F.J. 1990.** *The Sigma-Aldrich Handbook of Stains, Dyes and Indicators*. Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, 1000 p.
- Gutierrez A. Klinka T. Thiéry D. Buscarlet E. Binet S. Jozja N. Défarge C. Leclerc B. Fécamp C. Ahumada Y. Elsass J. 2013.** TRAC, a collaborative computer tool for tracer-test interpretation. *Proceedings "TRACER 6", Sixth International Conference on Tracers and Tracing Methods*, Oslo, 6-8 June 2011. *European Physical Journal Web of Conferences* 50, 03002, 8 p.
- Hasley C. Leclerc H. 1993.** *Microbiologie des eaux d'alimentation*. Tec & Doc Lavoisier, 495 p.
- Huang R. Choe E. Min D.B. 2004.** Kinetics for singlet oxygen formation by riboflavin Photosensitization and the reaction between riboflavin and singlet oxygen. *Journal of Food Science* 69, C726-C732.
- Huang R. Kim H.J. Min D.B. 2006.** Photosensitizing effect of riboflavin, lumiflavin, and lumichrome on the generation of volatiles in soy milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, p. 2359-2364.
- Jiao L. Zhang M. Li H. 2020.** Preparation of 1, 3, 6, 8-Pyrenesulfonic Acid Tetrasodium Salt dye-doped silica nanoparticles and their application in water-based anti-counterfeit ink. *Materials* 13, 4074.
- JORF 2015.** Arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11 et R. 212-18 du code de l'environnement. *Journal Officiel de la République Française* 0198, 28 août 2015, NOR : DEVL1513989A.
- JORF 2022.** Arrêté du 30 décembre 2022 modifiant l'arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique ; *Journal Officiel de la République Française* 0303, 31 décembre 2022, texte n° 161.
- JOUE 2008.** Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE. *Journal officiel de l'Union européenne*, 24 décembre 2008, L 348, p. 84-97.
- 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. Lepiller M. Mondain P.H. Muet P. 2009.** Fiabilité de l'interprétation des traçages utilisant des traceurs fluorescents : importance de la composante analytique et proposition d'une grille d'évaluation. *Géologues* 163, « *Eaux souterraines. Gestion et protection des captages* », p. 67-75.
- 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.
- 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.
- 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.
- McManus G.B. Dawson R. 1994.** Phytoplankton pigments in the deep chlorophyll maximum of the Caribbean Sea and the western tropical Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 113, p. 199-206.
- 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.
- Nandi R. Amdursky N. 2022.** The dual use of the pyranine (HPTS) fluorescent probe: A ground-state pH indicator and an excited-state proton transfer probe. *Accounts of Chemical Research* 55, p. 2728-2739.
- 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.
- Sheraz M.A. Kazi S.H. Ahmed S. Anwar Z. Ahmad I. 2014.** Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 10, p. 1999-2012.
- 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.
- Wang G. Liu X. Cai S. Zhang S. Cui J. Gao C. Cheng Z. 2021** A pyrene fluorescent probe for rapid detection of ferric ions. *Journal of Fluorescence* 31, p. 713–718.
- Wishner L.A. 1964.** Light-induced oxydations in milk. *Journal of Dairy Science* 47, p. 216–221.
- Yang H. Xiao X. Zhao X.S. Hu L. Xue X.F. Ye J.S. 2016.** Study on fluorescence spectra of thiamine and riboflavin. *MATEC Web of Conferences* 63, 03013.

8. Table des illustrations

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Chromatogramme de l'uranine à 470 nm. | 30 |
| Figure 2 : Chromatogramme de l'éosine à 540 nm. | 30 |
| Figure 3 : Chromatogramme de la sulforhodamine B à 560 nm. | 30 |
| Figure 4 : Chromatogramme de la sulforhodamine G à 530 nm. | 30 |
| Figure 5 : Chromatogramme du naptionate de sodium à 320 nm. | 30 |
| Figure 6 : Chromatogramme de l'acide amino G à 248 nm. | 31 |
| Figure 7 : Chromatogramme de la pyranine à 280 nm. | 31 |
| Figure 8 : Chromatogramme du tinopal à 350 nm. | 31 |
| Figure 9 : Chromatogramme du PTSA à 280 nm. | 31 |
| Figure 10 : Chromatogramme de la riboflavine à 270 nm. | 31 |
| Figure 11 : Chromatogramme de la riboflavine phosphate à 270 nm. | 31 |
| Figure 12 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'uranine étudiées. | 40 |
| Figure 13 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'éosine étudiées. | 41 |
| Figure 14 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine B étudiées. | 42 |
| Figure 15 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de sulforhodamine G étudiées. | 43 |
| Figure 16 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres de naptionate de sodium étudiées. | 44 |
| Figure 17 : Intensités de fluorescence mesurées sur des solutions de concentrations différentes des poudres d'acide amino G étudiées. | 45 |
| Figure 18 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à pH ajusté à 9 à partir de la poudre de pyranine étudiée (Pa1). | 46 |
| Figure 19 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à pH ajusté à 9 à partir de la poudre de tinopal étudiée (Ta1). | 46 |
| Figure 20 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à partir de la poudre de PTSA étudiée (PTa1). | 47 |
| Figure 21 : Intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées dans l'eau ultrapure à partir de la poudre de riboflavine étudiée (Ra1). | 47 |
| Figure 22 : Comparaison des intensités de fluorescence en solution des 10 traceurs en poudre étudiés. | 48 |
| Figure 23 : 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). | 52 |
| Figure 24 : 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). | 54 |
| Figure 25 : 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). | 55 |
| Figure 26 : 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). | 56 |
| Figure 27 : 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). | 58 |
| Figure 28 : 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. | 61 |
| Figure 29 : 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. | 62 |
| Figure 30 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de pyranine Pa1 de concentrations 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à la température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) placées dans les 4 conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. | 64 |
| Figure 31 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de tinopal Ta1 de concentrations 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) et d'eau ultrapure à pH ajusté à 9 (UPt), placées dans les 4 | |

| | |
|--|-----|
| conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. | 69 |
| Figure 32 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de PTSA PTa1 de concentrations 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à la température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) placées dans les 4 conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. | 71 |
| Figure 33 : Evolutions comparées des intensités de fluorescence de solutions de PTSA PTa1 de concentration 10 et 25 µg/L fabriquées à partir d'eau ultrapure, exposées à la lumière ou placées à l'obscurité à température ambiante, pour deux couples de longueurs d'onde d'excitation/émission des pics principaux déterminés par une seconde caractérisation spectrale (370/404 nm et 280/385 nm : Annexe 1). | 73 |
| Figure 34 : Evolution avec le temps des intensités de fluorescence des solutions de riboflavine Ra1 de concentrations 25 et 1 000 µg/L fabriquées à partir d'eau naturelle placées à l'obscurité à température du laboratoire (N), et d'eau ultrapure (UP) placées dans les 4 conditions d'expérimentation : lumière à température ambiante, obscurité à température ambiante, 4°C et 40°C. | 75 |
| Figure 35 : Spectre MEB-EDX de SBf1 | 84 |
| Figure 36 : Structures des impuretés connues des sulforhodamines B (d'après Chen et al. 2002, Gosetti et al. 2015). | 86 |
| Figure 37 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGa1. | 87 |
| Figure 38 : Analyse en MEB-EDX des insolubles de SGf1. | 87 |
| Figure 39 : 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. | 99 |
| Figure 40 : Relation entre intensité de fluorescence solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en éosine pure (à gauche) et éosine + sous- produits susceptibles de fluorescer (à droite) des poudres ayant servi à les fabriquer. | 100 |
| Figure 41 : 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. | 101 |
| Figure 42 : 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. | 102 |
| Figure 43 : Relation entre intensité de fluorescence des solutions à 10 µg/L (en haut), et 25 µg/L (en bas), et teneur en naphthionate de sodium des poudres ayant servi à les fabriquer. | 103 |
| Figure 44 : 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. | 103 |
| Figure 45 : Comparaison des intensités de fluorescence en solution des 10 traceurs étudiés. | 105 |
| Figure 46 : Spectres en double balayage excitation – émission des produits FLUXAIR 85 S GR Nymco (gauche) et LUCRAFOAM E 100 CONC (droite). | 106 |

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Références des produits analysés. | 22 |
| Tableau 2 : Indications de composition, pureté et solubilité des produits, ainsi que de pH, incluses dans les fiches techniques des fabricants. | 23 |
| Tableau 3 : Critères de validation des méthodes. | 32 |
| Tableau 4 : Bilan des analyses qualitatives, et de CE et pH à 0,1 g/L pour les produits traceurs. | 35 |
| Tableau 5 : Comparaison des principales données disponibles à ce jour sur l'intensité de fluorescence des traceurs étudiés. | 49 |
| Tableau 6 : 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. | 51 |
| Tableau 7 : Valeurs du pH des solutions de pyranine préparées avec de l'eau ultrapure et conservées à l'obscurité au terme des expérimentations de 6 mois. | 65 |
| Tableau 8 : Valeurs du pH des solutions de PTSA au terme des expérimentations de 6 mois. | 72 |
| Tableau 9 : Synthèse des principales données disponibles à ce jour sur la sensibilité à la lumière et la dépendance à la température des traceurs fluorescents analysés depuis Défarge et al. (2020). | 78 |
| Tableau 10 : Caractéristiques des étalons de référence utilisés. | 81 |
| Tableau 11 : Bilan de composition des produits traceurs | 83 |
| Tableau 12 : Pourcentage massique des éléments présents dans SBf1 | 84 |
| Tableau 13 : Teneur en sodium et chrome dans les sulforhodamines B. | 85 |
| Tableau 14 : Impuretés connues des sulforhodamines B (d'après Chen et al. 2002, Gosetti et al. 2015). | 85 |
| Tableau 15 : Impuretés inconnues des sulforhodamines B. | 86 |
| Tableau 16 : Composition générale des sulforhodamines G en % massique. | 88 |

| | |
|--|----|
| <i>Tableau 17 : Teneur en éléments métalliques dans les sulforhodamines G en ICP-MS.</i> | 88 |
| <i>Tableau 18 : Teneur en éléments métalliques dans les sulforhodamines G en ICP-AES.</i> | 88 |
| <i>Tableau 19 : Pureté, teneur inconnue et teneur en ions déterminés par chromatographie ionique (CI).</i> | 89 |
| <i>Tableau 20 : Impuretés connues des sulforhodamines G (SGf1 et SGa1).</i> | 89 |
| <i>Tableau 21 : Impuretés inconnues des sulforhodamines G (exemple de SGf1).</i> | 90 |
| <i>Tableau 22 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans les particules difficilement solubles de la SGf2, ESI+.</i> | 90 |
| <i>Tableau 23 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans les insolubles SGf1 et SGa1 mais absentes du standard, en LDI-MS.</i> | 91 |
| <i>Tableau 24 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans l'échantillon d'éosine F1Ep3, ESI+.</i> | 92 |
| <i>Tableau 25 : Formules moléculaires proposées des impuretés présentes dans l'échantillon Ra₁, ESI+.</i> | 93 |

9. Annexe 1 : 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 |
| Série 3 | | | | | |
| Pa1 | Pyranine | 290/380/ 405/455 | 445/512 | 374/399 | 511 |
| Ta1 | Tinopal | 223/346 | 435 | 240/350 | 430 |
| PTa1 | PTSA | 365-375 nm | 400-410 nm | 280** | 385** |
| | | | | 370** | 403** |
| | | | | 515* | 537* |
| | | | | 525** | 552** |

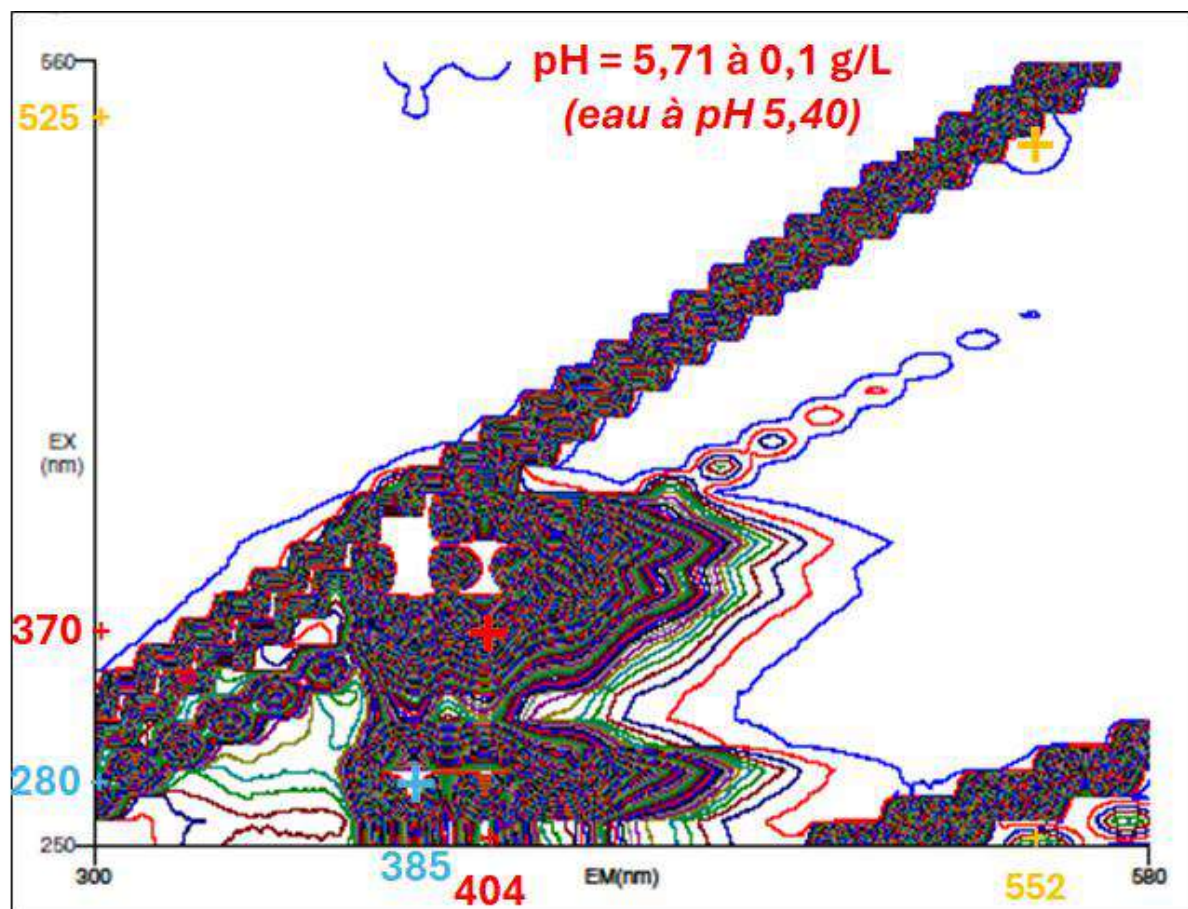
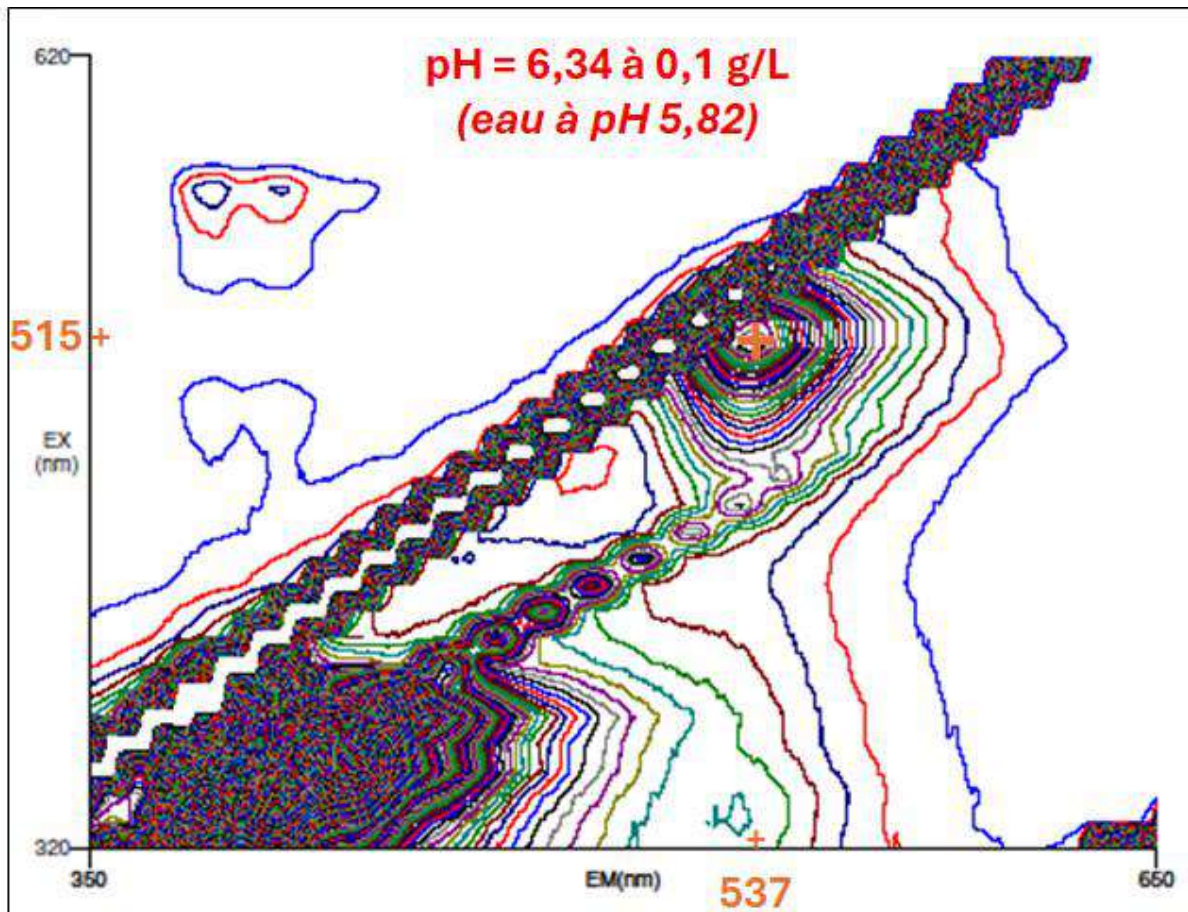
| Série 3 (suite) | | | | | |
|------------------------------|---|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PRODUIT | TRACEUR | DONNEES LITTERATURE | | HITACHI F-2500 | |
| | | λ Ex (nm) | λ Em (nm) | λ Ex (nm) | λ Em (nm) |
| Ra1 | Riboflavine-5'-phosphate | 270/370/450 | 525 | 273 | 329 |
| | | | | 370 | 525 |
| | | | | 524 | 549 |
| EAU DE LA SOURCE DU BOUILLON | COMPOSANT FLUORESCENT (FLUOROPHORE) | DONNEES LITTERATURE | | HITACHI F-2500 | |
| | | λ Ex (nm) | λ Em (nm) | λ Ex (nm) | λ Em (nm) |
| | <i>9 juin - 3 juillet 2023</i> | | | | |
| | (Proche) Ac | ≤ 260 | 448-480 | 260 | 442 |
| | M | 290-325 | 370-430 | 310 | 419 |
| | <i>9 juillet 2024</i> | | | | |
| | (Proche) Ac | ≤ 260 | 448-480 | 260 | 435 |
| | M | 290-325 | 370-430 | 310 | 416 |
| | <i>Contrôle final au 3 février 2025</i> | | | | |
| | M | 290-325 | 370-430 | 310 | 377 |
| (Proche) T | 270-280 | 330-368 | 260 | 370 | |

Longueurs d'onde d'excitation (λ Ex) et d'émission (λ Em) ; en gras : pics principaux. Pour la pyranine, il a été tenu compte du pH des solutions dans l'eau ultrapure (5,49 à 0,1 g/L pour une eau ultrapure à 5,95 : Tableau 4), en raison des particularités de ce traceur (voir texte, section 3.1.4.7, et tableau complémentaire ci-dessous). Pour l'acide amino G, la résolution du pic d'excitation principal indiqué par la littérature (à 248 nm) ayant été jugé insuffisante en raison de la fenêtre de balayage choisie pour cette étude (250-620 nm ; voir 2.2.2, on a choisi le pic d'excitation secondaire le mieux résolu montrant la plus forte intensité (à 308 nm, voir également discussion à ce sujet dans Défarge et al. 2020). Pour le PTSA, on a réalisé deux spectres aux deux pH distincts des deux séries effectuées (voir section 3.1.2 et figure ci-dessous) ; les couples de longueurs d'onde indiqués sont l'ensemble de ceux identifiés lors de la 1^{ère} (*) et 2^{ème} (**) séries. Les données de la littérature pour la riboflavine concernent ce produit, et non la riboflavine-5-phosphate utilisée pour ce projet. Les positions des pics principaux des traceurs étudiés sont représentées dans un graphe (λ Ex) / λ Em ; voir dernière figure de l'Annexe).

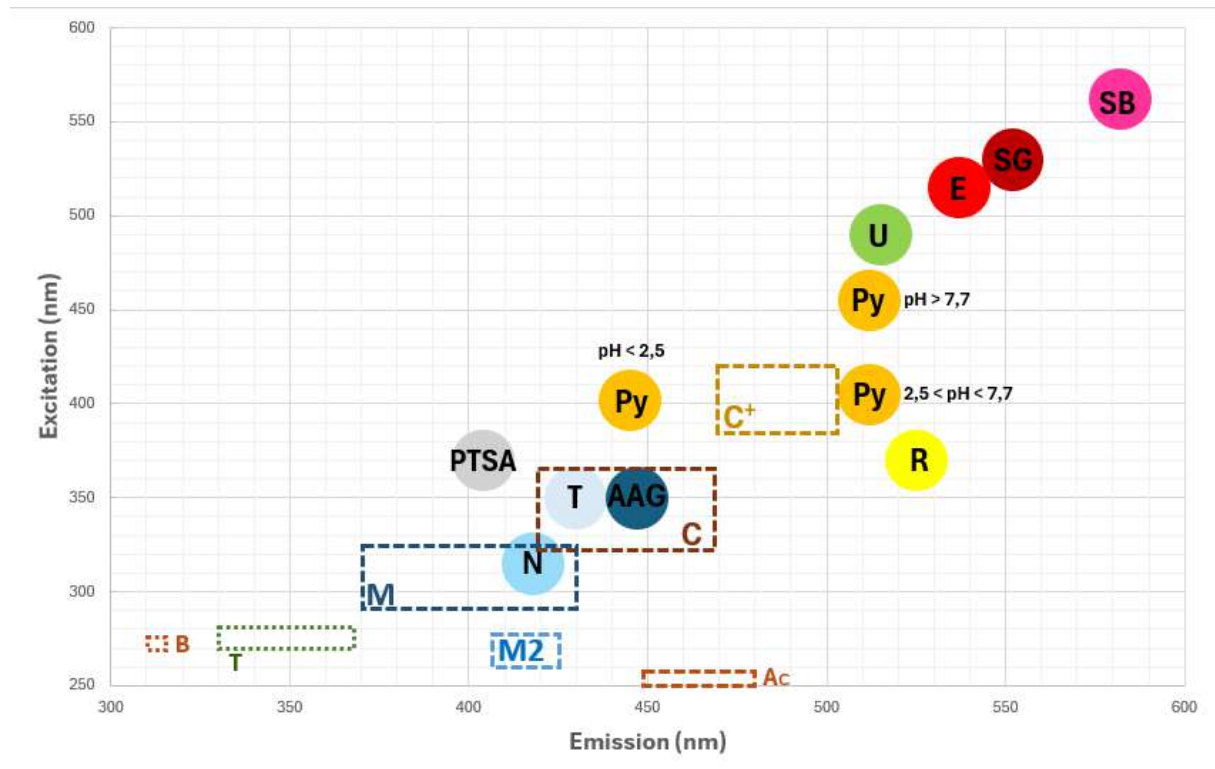
Sources des données de la littérature : Benischke et al. (2007), Coble et al. (2014), Davis et al. (1985), Ghanem et al. (2003), Green (1990), Käss (1998), Leibundgut et al. (2009), Meus et al. (2014), Smart & Laidlaw (1977), Schudel et al. (2002), Yang et al. (2016).

| Compléments pour la pyranine (d'après Käss 1998) | | | |
|--|----------------------------|------------------------------|-------------------|
| pH | λ Ex maximale (nm) | λ Ex secondaire (nm) | λ Em (nm) |
| < 2,5 | 405 | 280/290/365/380 | 445 |
| 2,5 - 6 | | | |
| 6 - 7,7 | | 280/290/365/380/455 | 512 |
| 7,7 - 8 | 455 | 280/290/365/380 | |
| > 8 | | 280/297/365 | |

Les spectres en double balayage en excitation et émission du PTSA obtenus lors des deux suivis successifs à des pH différents sont donnés ci-dessous.



Les positions des pics principaux de ces traceurs sont indiquées ci-dessous dans un graphe (λ_{Ex} / λ_{Em}) où sont également portées celles des principales matières organiques fluorescentes présentes dans les eaux naturelles : composés humiques et dérivés (par biodégradation), composés protéiniques d'origine microbienne. Les pics de type A_x sont maintenant considérés (Coble *et al.* 2014), non comme des composés organiques naturels spécifiques, mais comme des fluorophores des composés X correspondants (C ou C^+ pour A_C dans notre cas).



Positions des pics principaux des traceurs étudiés en fonction de leurs longueurs d'onde d'excitation (λ_{Ex}) et d'émission (λ_{Em}) ; AAG : acide amino G ; E : éosine ; N : naphthionate de sodium ; PTSA ; Py : pyranine ; R : riboflavine ; SB : sulforhodamine B ; SG : sulforhodamine G ; T : tinopal ; U : uranine), ainsi que des principales MO fluorescentes naturelles naturellement présentes dans les eaux (B : composés protéiniques d'origine principalement microbienne, de type tyrosine, acides aminés libres ou intégrés à des protéines ou matériel peptidique dégradés ; C- C^+ : composés humiques de haut poids moléculaire ; Ac : autres fluorophores des composés de type C- C^+ ; M- $M2$: composés d'origine humique de faible poids moléculaire principalement dérivés des premiers par biodégradation microbienne ; T : composés protéiniques d'origine principalement microbienne, de type tryptophane, acides aminés libres ou intégrés à des protéines intactes ou faiblement dégradées).

10. Annexe 2 : 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

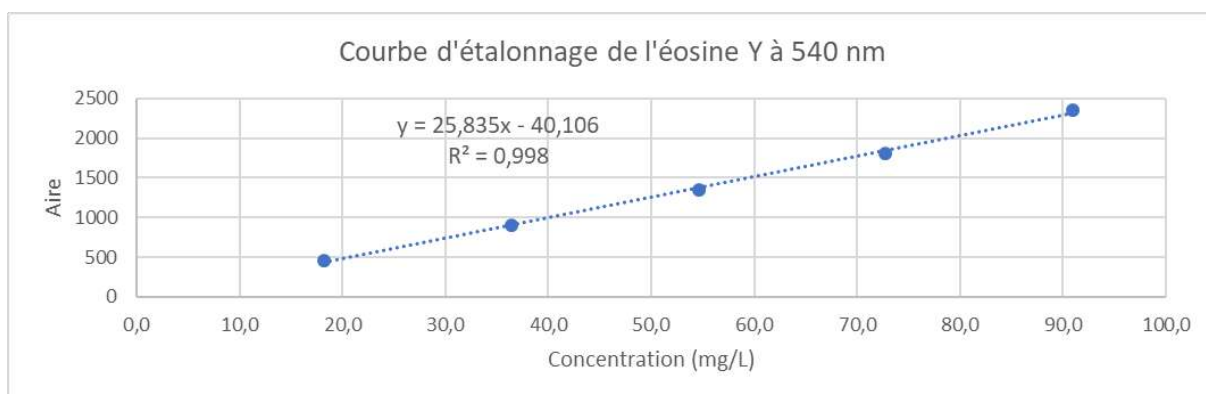
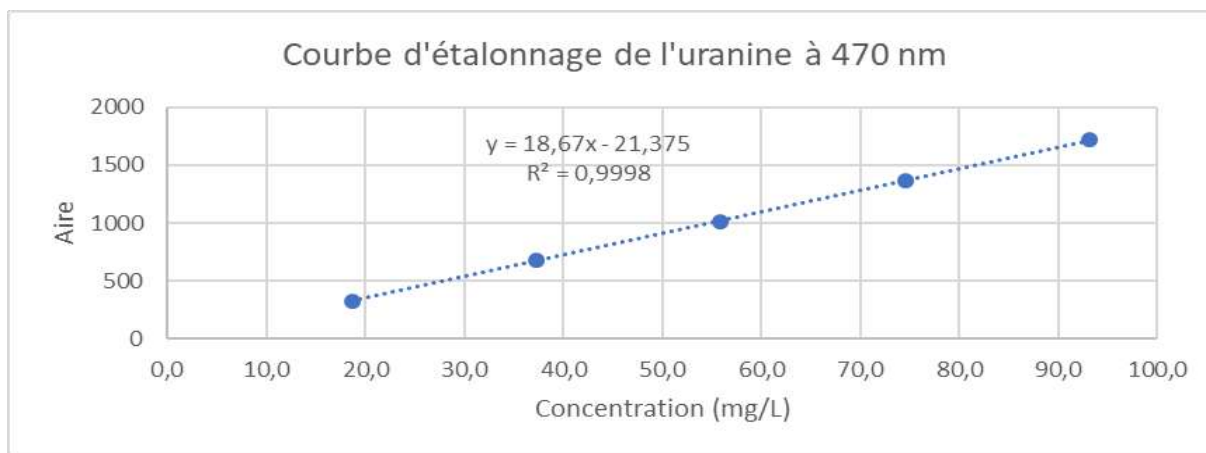
Uranine et éosine

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 :

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

11. Annexe 3 : 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

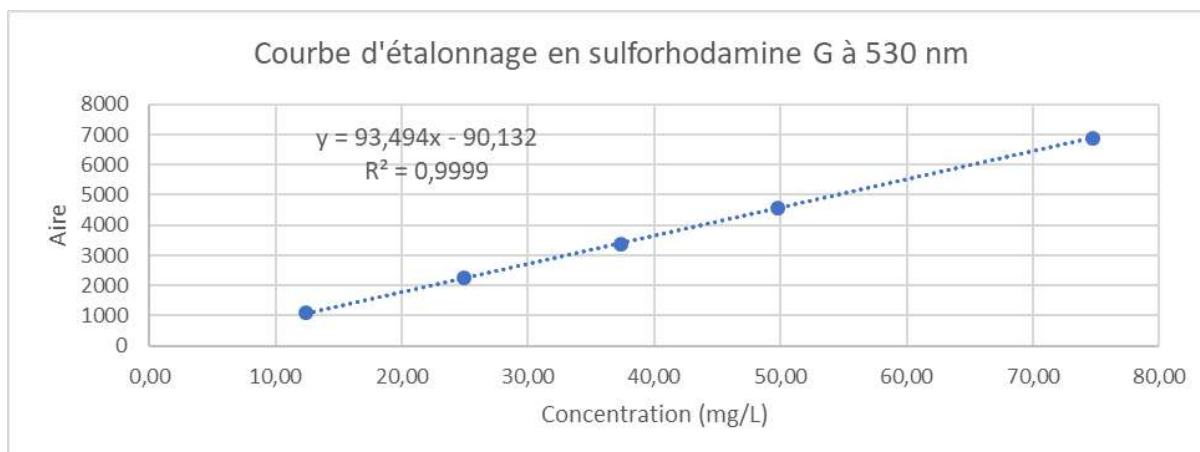
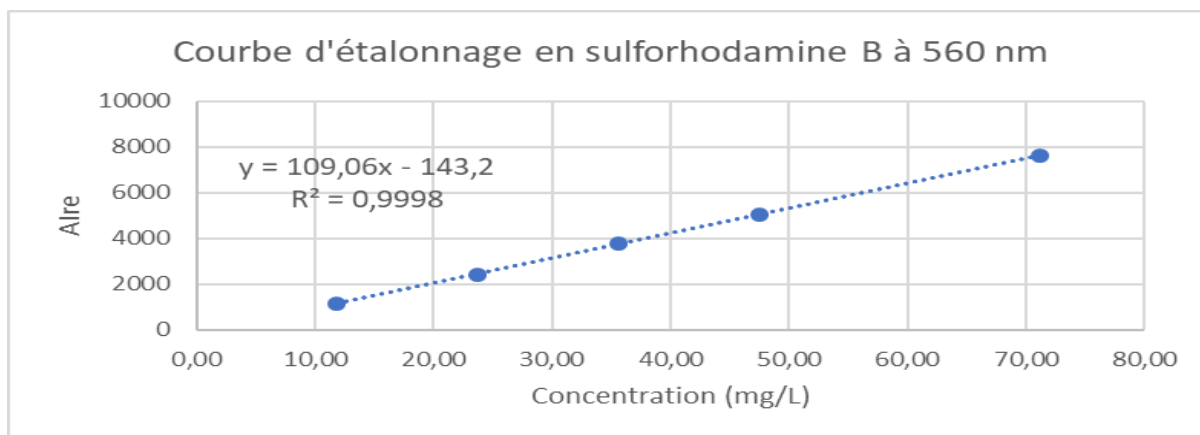
Sulforhodamine B et G

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 :

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

12. Annexe 4 : 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 hydrogénéosulfate (2,5 mM, 0,85 g/L) dans l'eau à pH = 5,2 et B = tétrabutylammonium hydrogénéosulfate (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 6 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)

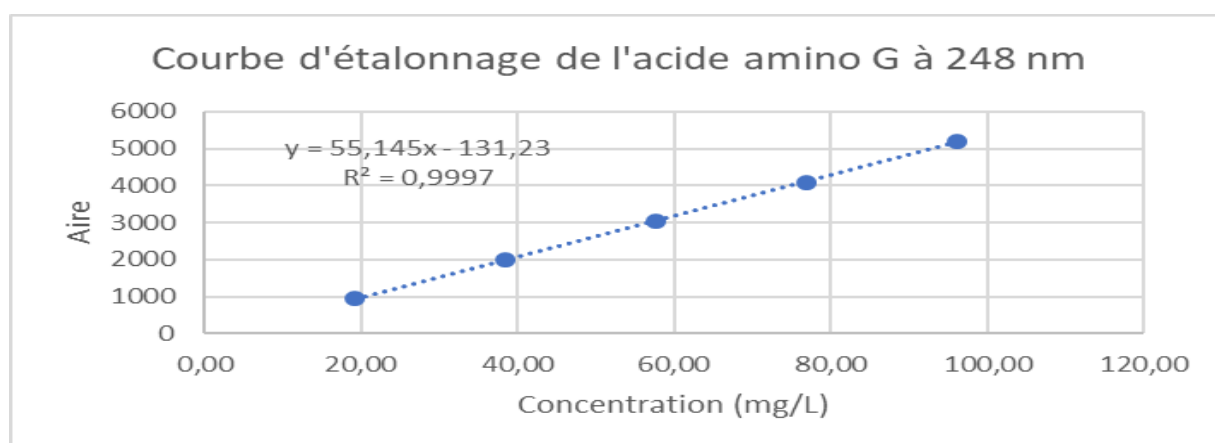
Préparation des étalons et étalonnage

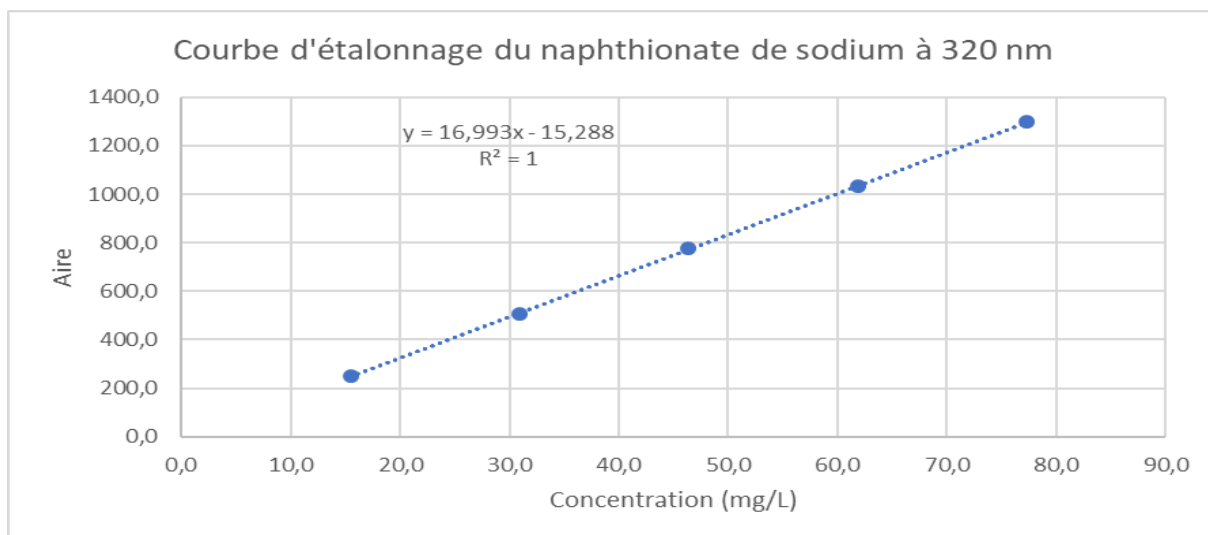
Des pesées de masses de l'ordre de 50 mg sont réalisées à l'aide d'une balance précise à 0,1 g près puis introduites dans une fiole de 50 mL complétée avec l'éluant A.

| 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 :

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

13. Annexe 5 : Procédure d'analyse HPLC de la pyranine

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 = Acétate d'ammonium 0,2 M pH=4,8 et B = méthanol

L'analyse des échantillons se fait en mode isocratique à 95 % de A et 5 % de B pendant 5 min. Le temps de rétention de la pyranine est de 2,3 minutes.

Volume d'injection : 20 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 280 nm pour la pyranine contre la référence à 700 nm (BW 8 nm)

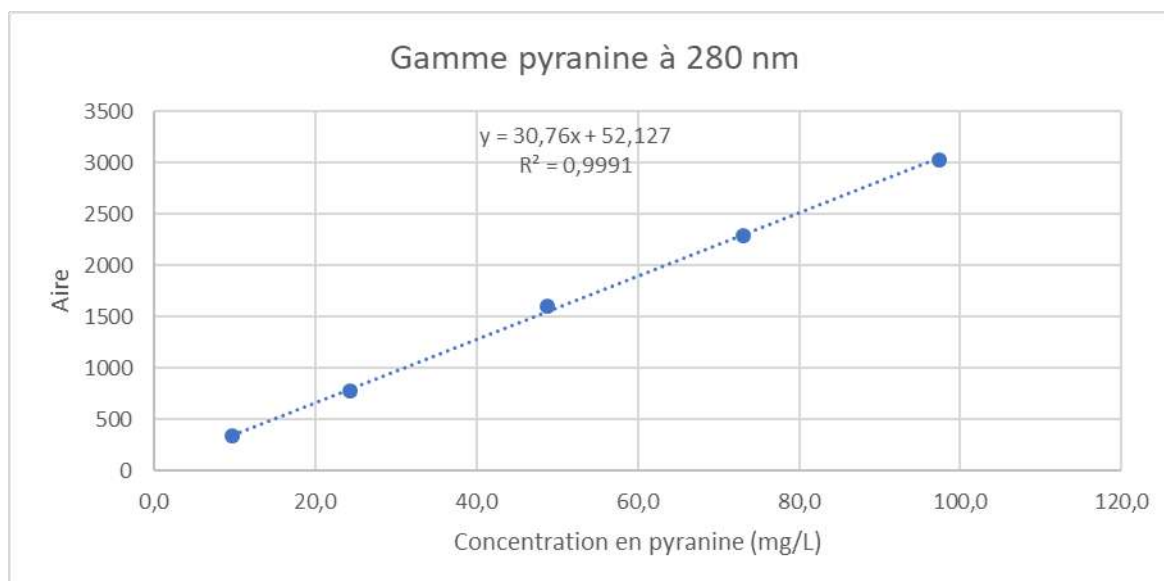
Préparation des étalons et étalonnage

Des pesées 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.

| Etalon | Masse pesée (mg) | Pureté massique (%) | Concentration (mg/L) |
|----------|------------------|---------------------|----------------------|
| Pyranine | 50,2 | 99,1 | 973,7 |

Les solutions sont alors diluées pour être injectées 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 0,5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 10 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 :

$$\text{Pureté (\%)}: \frac{\text{Concentration } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) \times 10 \times 0.05}{0.5 \times \text{masse pesée (mg)}} \times 100$$

14. Annexe 6 : Procédure d'analyse HPLC du tinopal

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 = Tetrabutylammonium hydrogensulfate 0,8% pH=8 et B = Acétonitrile

L'analyse des échantillons se fait en mode isocratique à 50 % de A et 50 % de B pendant 25 min. Le temps de rétention du tinopal est de 8,3 minutes.

Volume d'injection : 20 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 350 nm pour le tinopal contre la référence à 700 nm (BW 8 nm)

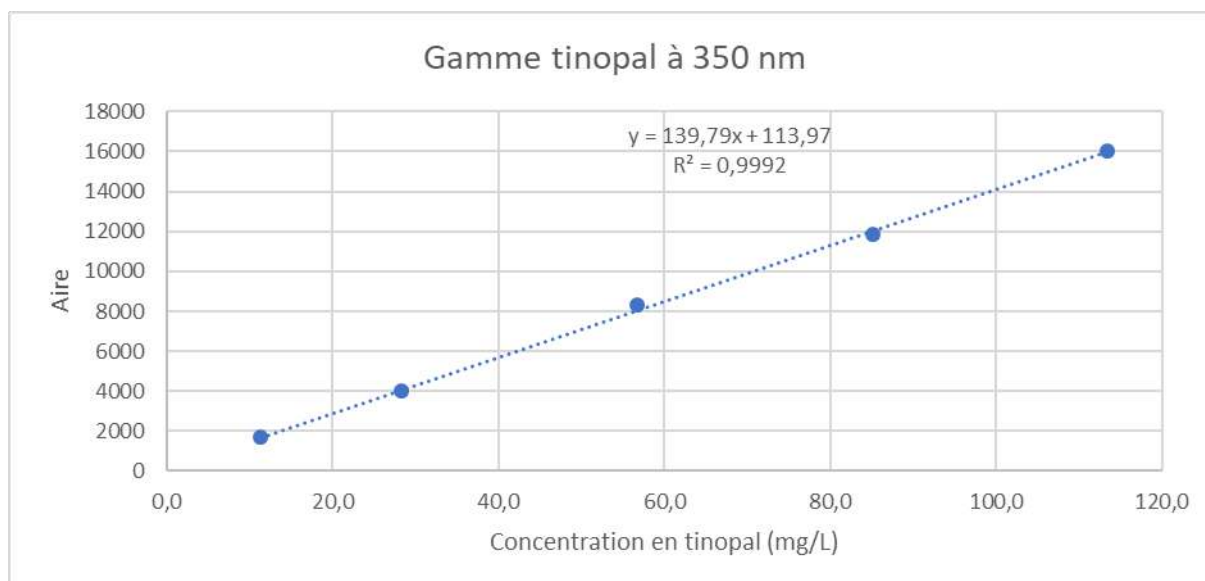
Préparation des étalons et étalonnage

Des pesées 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.

| Etalon | Masse pesée (mg) | Pureté massique (%) | Concentration (mg/L) |
|---------|------------------|---------------------|----------------------|
| Tinopal | 60,3 | 99,99 | 1134,8 |

Les solutions sont alors diluées pour être injectées en HPLC de façon à obtenir une gamme d'étalons de concentration comprise entre 20 et 110 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 0,5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 10 mL qui est complétée avec l'éluant A.

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 :

$$\text{Pureté (\%)}: \frac{\text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 10 \times 0.05}{0.5 \times \text{masse pesée (mg)}} \times 100$$

15. Annexe 7 : Procédure d'analyse HPLC du PTSA

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 = Acétate d'ammonium 0,2 M pH=4,9 et B = méthanol

L'analyse de ces échantillons se fait mode gradient (à t=0 min : 99 % de A et 1 % de B pendant 8,8 min ; de t=8,8 à 10 min : 0 % de A et 100 % de B pendant 3 min). Le temps de rétention du PTSA est de 1,5 minutes.

Volume d'injection : 20 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 280 nm pour le PTSA (BW 8 nm)

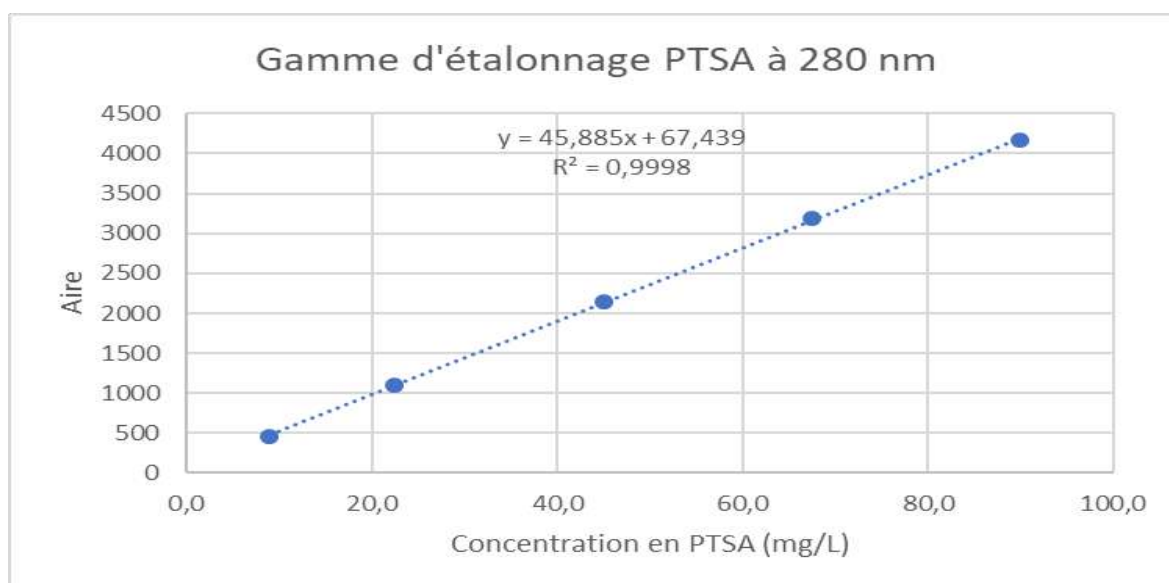
Préparation des étalons et étalonnage

Des pesées 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) |
|--------|------------------|---------------------|----------------------|
| PTSA | 48,6 | 98,5 | 899,4 |

Les solutions sont alors diluées pour être injectées 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 0,5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 10 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 :

$$\text{Pureté (\%)}: \frac{\text{Concentration} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \times 10 \times 0.05}{0.5 \times \text{masse pesée (mg)}} \times 100$$

16. Annexe 8 : Procédure d'analyse HPLC de la riboflavine et de la riboflavine phosphate

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 = KH₂PO₄ à 20 mM dans l'eau ultra pure et B = méthanol

L'analyse des échantillons se fait en mode gradient (à t=0 min : 78 % de A et 22 % de B pendant 16 min ; de t=16 à 21 min : 68 % de A et 32 % de B ; à t=21 min : 68 % de A et 32 % de B pendant 14 min). Le temps de rétention de la riboflavine est de 23,5 minutes, celui du pic majoritaire de la riboflavine phosphate est de 17 min.

Volume d'injection : 20 µL

Débit : 1 mL/min

Détection DAD (détecteur à barrette de diodes) :

- 270 nm pour la riboflavine et riboflavine phosphate (BW 8 nm)

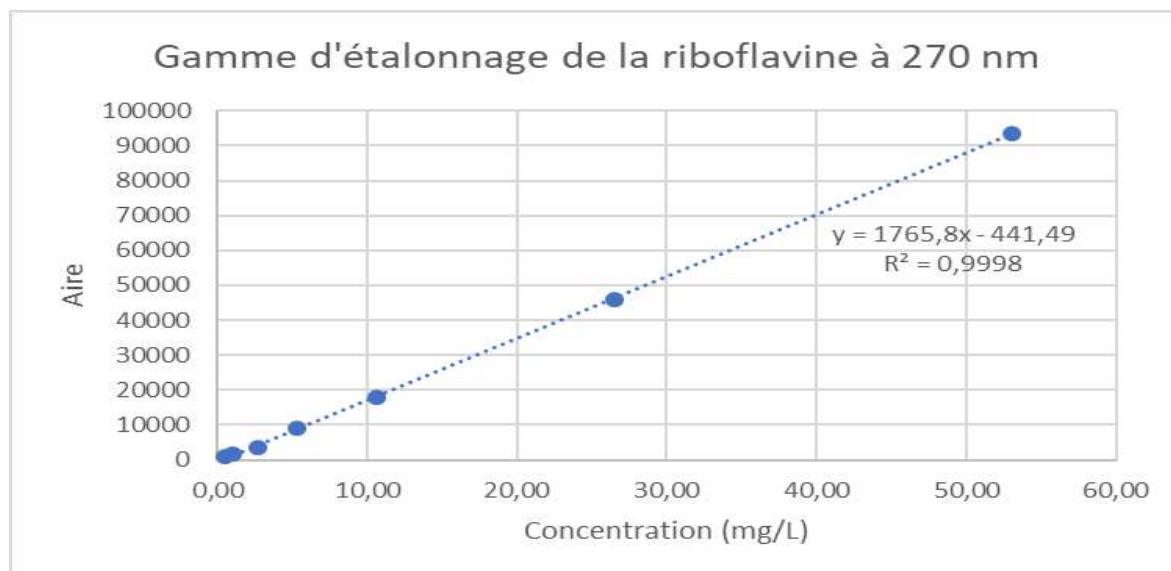
Préparation des étalons et étalonnage

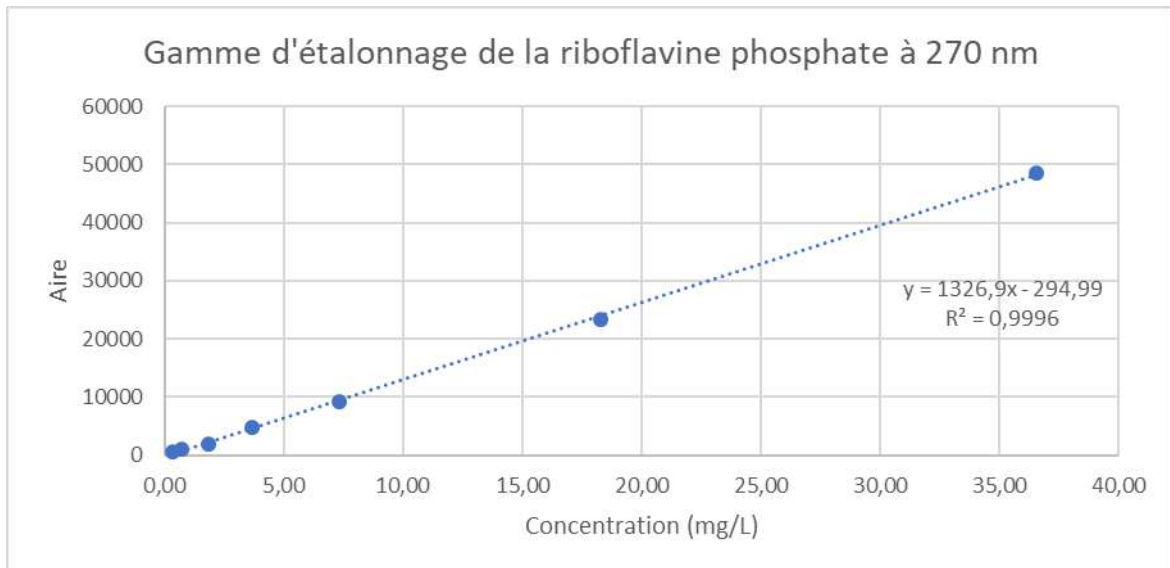
Des pesées de l'ordre de 50 mg sont réalisées à l'aide d'une balance précise à 0,1 g près puis introduites dans une fiole de 50 mL complétée avec l'éluant A. Pour la riboflavine, très peu soluble, la masse pesée est de l'ordre de 5 mg, Cette masse est introduite dans une fiole de 100 mL complétée avec l'éluant A.

| Étalon | Masse pesée (mg) | Pureté massique (%) | Concentration (mg/L) |
|-----------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| Riboflavine | 5,45 | 99,8 | 53,03 |
| Riboflavine phosphate | 53,2 | 68,7 | 730,79 |

Les solutions sont alors diluées pour être injectées en HPLC de façon à obtenir une gamme d'étalons de concentration comprise entre 0,5 et 50 mg/L pour la riboflavine phosphate et la riboflavine.

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





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 5 mL de cette solution est prélevé et introduit dans une fiole de 100 mL qui est complétée avec l'éluant A.

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 :

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

17. Annexe 9 : 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 : 40 V ✓ Sortie du capillaire : 100 V ✓ Pression de gaz de nébulisation (N₂) : 30 psi ✓ Débit du gaz de séchage (N₂) : 10,0 L/min ✓ Température de désolvatation : 300°C ✓ Capillaire de l'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 : - 40 V ✓ Sortie du capillaire : - 100 V ✓ Pression de gaz de nébulisation (N₂) : 30 psi ✓ Débit du gaz de séchage (N₂) : 10,0 L/min ✓ Température de désolvatation : 300°C ✓ Capillaire de l'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 sulforhodamine B et 520 nm pour la sulforhodamine G.

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 présentés 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 |

18. Annexe 10 : Identification des impuretés difficilement solubles de SGf2, de la riboflavine et de l'éosine par LC/MS – Appareillages et conditions opératoires

Les analyses ont été effectuées au moyen d'un système UHPLC (Vanquish, Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse à transformée de Fourier Orbitrap (Orbitrap Exploris 120, Thermo Scientific) équipé d'une source *electrospray* (ESI). Tout le système est piloté par le logiciel Excalibur. Le traitement des données a été effectué avec le logiciel FreeStyle™ 1.8 SP1.

Conditions de chromatographie liquide

Les conditions de chromatographie liquide sont détaillées ci-dessous :

- Colonne C18 Prevail Alltech – 150 mm x 2,1 mm x 3 µm,
- Température du four pour colonne : 25 °C,
- Température du passeur d'échantillons : 10 °C,
- Débit : 0,2 mL.min⁻¹
- Volume d'injection : 10 µL,

- Composition des phases mobile pour l'analyse des insolubles solubles de **SGf2**:
 - o Phase A : Formiate d'ammonium (20 mM)
 - o Phase B : Méthanol/Acétonitrile 50/50 (qualité LC-MS)

L'analyse des insolubles solubles de **SGf2** se fait selon le gradient suivant : de 35 % à 75 % de B en 12 min, de 75 % à 100 % de B en 10 min, maintien à 100 % de B pendant 5 min, puis retour à 35 % de B en 3 min et 5 min d'équilibration à 35 % de B.

- Composition des phases mobiles des impuretés de l'éosine **F1Ep3** et de la riboflavine **Ra1** :
 - o Phase A : Formiate d'ammonium (20 mM)
 - o Phase B : Méthanol (qualité LC-MS)

L'analyse de l'éosine F1Ep3 se fait en mode gradient (de 40 % à 82 % de B en 14 min, maintien à 82 % de B pendant 6 min, puis retour à 40 % de B en 5 min et 5 min d'équilibration à 40 % de B).

L'analyse de la riboflavine se fait selon le gradient suivant : 22 % de B pendant 16 min, de 22 % à 32 % de B en 5 min, maintien à 32 % de B pendant 14 min, puis retour à 22 % de B en 2 min et 5 min d'équilibration à 22 % de B.

La détection avec un détecteur UV-VIS est réalisée aux longueurs d'ondes 270 nm, 520 nm et 700 nm pour la riboflavine, les insolubles solubles de SGf2 et l'éosine respectivement.

Conditions de spectrométrie de masse

Les paramètres de source sont détaillés dans le tableau ci-dessous :

| | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Résolution de l'Orbitrap | 120 000 |
| Température du tube de transfert | 320°C |
| Température de désolvatation | 275°C |
| Tension de capillaire | 3,5 kV (Positif) ; 2,5kV (Négatif) |
| Sheath gas | 35 Arb |
| Aux gas | 7 Arb |
| Sweep gas | 0 Arb |
| RF lens | 70 % |
| Easy-IC | On |
| Gamme de masse | m/z 50-750 |

19. Annexe 11 : Identification des métaux par ICP-MS et ICP-AES – Appareillages et conditions opératoires

Des analyses qualitatives ont été réalisées en ICP-MS afin d'identifier et de quantifier très précisément les éléments chimiques présents dans les sulforhodamines G et les particules insolubles isolées.

Pour cela, les échantillons sont minéralisés en milieu acide : 50 mg d'échantillon sont pesés, 5 mL d'acide nitrique 68 % sont ajoutés dans des réacteurs placés dans un four à micro-ondes Milestone One, porté à 180°C pendant 40 min (les extraits sont ensuite repris dans une fiole de 50 mL ajustée avec de l'eau ultrapure puis dilués au dixième). L'appareil utilisé est un ICP-MS « ICAP RQ » THERMO piloté par le logiciel Qtegra. Les échantillons sont analysés en mode STD (standard). Une gamme d'étalonnage des éléments présents est préparée entre 100 et 1000 µg/L en présence d'acide nitrique à 1 %.

L'analyse a été menée sur les mêmes extraits afin de vérifier la présence en plomb et en chrome. Le détecteur sur l'ICP-AES est un détecteur optique qui mesure les photons émis par les éléments chimiques à une longueur d'onde caractéristique de l'élément. L'ICP-MS a, lui, un spectromètre de masse qui détecte les isotopes caractéristiques de l'élément chimique. Deux propriétés physiques différentes des éléments sont utilisées, cela permet de confirmer la présence de plomb et chrome. L'appareil utilisé est un ICP-AES « ICAP 6300 mode axial » THERMO piloté par le logiciel Qtegra. Une gamme d'étalonnage est préparée entre 0,05 et 2 mg/L pour le chrome, le plomb, le soufre et le sodium en présence d'acide nitrique à 1 %.

20. Annexe 12 : Recherche des sulfates par chromatographie ionique – Appareillages et conditions opératoires

La chromatographie ionique (CI) permet de déterminer les teneurs en anions comme les chlorures et les sulfates en solution dans l'eau. Les sulforhodamines G ont été mises en solution dans l'eau puis ont subi une purification sur cartouche SPE greffée C18. L'appareil utilisé est un chromatographe THERMOFISHER ICS 5000+ piloté par le logiciel Chromeleon (voir caractéristiques et conditions d'analyse dans le tableau ci-dessous).

| Système de chromatographie | ICS 5000+ THERMOFISHER |
|----------------------------|---|
| Pré colonne | AG23 : 50 x 4 mm |
| Colonne | AS23 : 250 x 4 mm |
| Suppresseur | AERS 4 mm Carbonate à 32 mA |
| Détecteur | Conductimètre |
| Volume injecté | 25 µL |
| Eluant | Mélange carbonate de sodium / bicarbonate de sodium (4,5 mM Na ₂ CO ₃ /0,8 mM NaHCO ₃) |
| Mode | Isocratique |
| Débit | 1 mL / min |
| Durée | 30 min |

20 mg d'échantillon sont dissous dans une fiole de 10 mL pendant 10 min au bain à ultrasons. Des cartouches SPE STRATA C18 (Phenomenex référence : 8B-S001-JCH) sont utilisées pour purifier l'extrait (retenir le colorant et élué les autres composés non retenus sur cette phase, soit les sels minéraux notamment et les composés polaires non ioniques). Les cartouches sont conditionnées avec 1 mL de méthanol, puis lavées avec 5 mL d'eau ultra pure (volume minimum pour un lavage optimal). Ensuite, 2 mL d'extrait sont placés sur la cartouche SPE. Le colorant est retenu sur la cartouche (voir illustration ci-dessous) et les composés non retenus sont élués dans un tube de 10 mL ; 2 mL puis 1 mL d'eau ultrapure sont ensuite ajoutés à la cartouche pour récupérer l'ensemble des composés non retenus. Le volume final est ajusté à 5 mL.



Sulforhodamine G en solution dans l'eau (gauche), rétention du traceur sur le cartouche SPE (au centre), solution éluée incolore (à droite).

Un témoin sans colorant et un ajout dosé avec une solution à 10 mg/L d'ion chlorure et 10 mg/L d'ion sulfate ont été réalisés pour vérifier l'absence de ces ions sur la cartouche SPE, et calculer le rendement d'extraction (un rendement de 100 % a été calculé pour les ions chlorures et de 110 % pour les ions sulfates). Les solutions purifiées sont analysées par le système de chromatographie ionique. La gamme d'étalonnage pour les ions se situe entre 1 mg/L et 10 mg/L.

21. Annexe 13 : Procédure d'analyse en LDI des insolubles de SGf1 et SGa1

Les analyses ont été réalisées avec la source MALDI sur un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'une cellule de mobilité ionique (TIMS-TOF, Bruker).

Les paramètres étaient :

- Mode de détection : positif
- Gamme de masse : m/z 300 – 3200,
- Puissance laser : 40 %
- Nombre de tirs : 3000

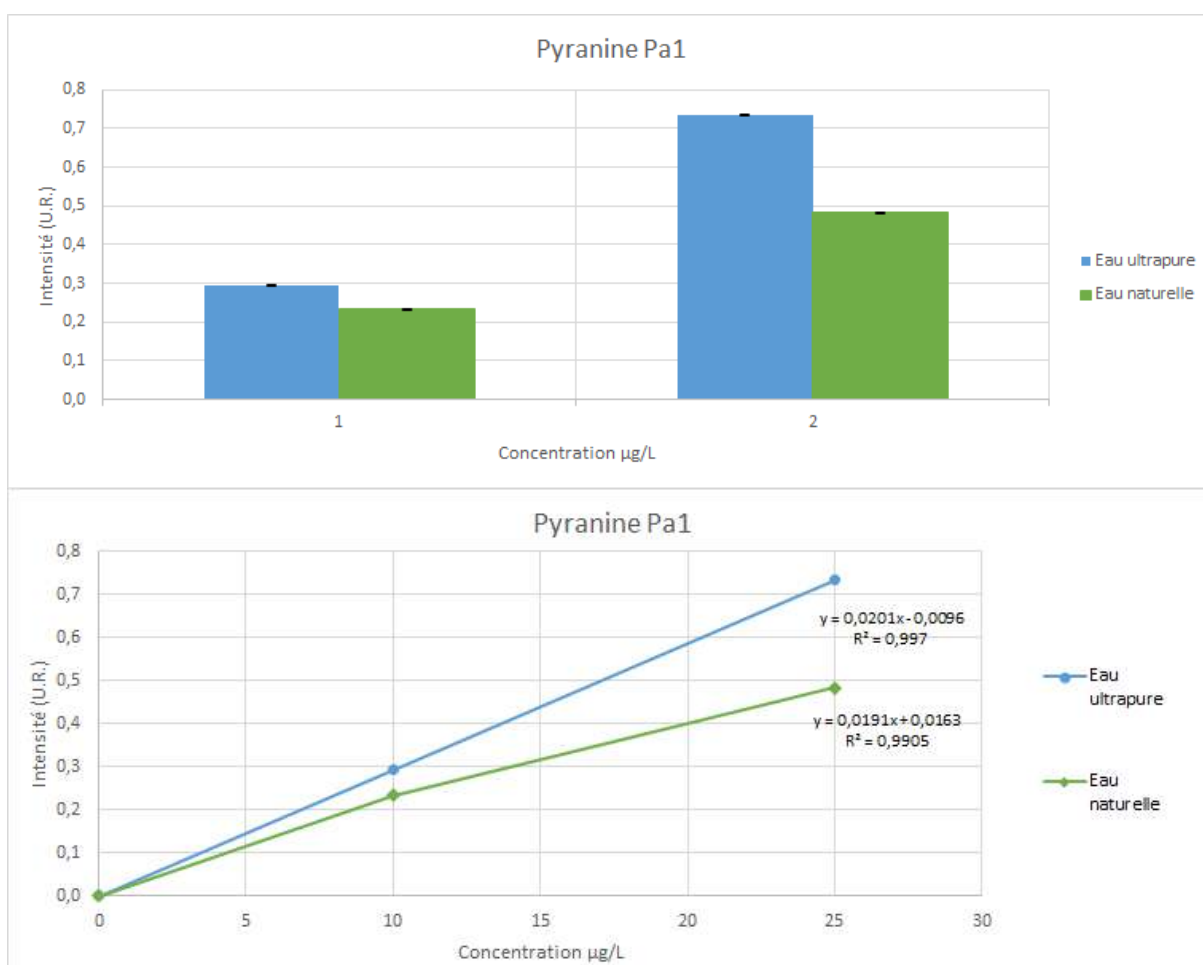
Les paramètres MS/MS étaient :

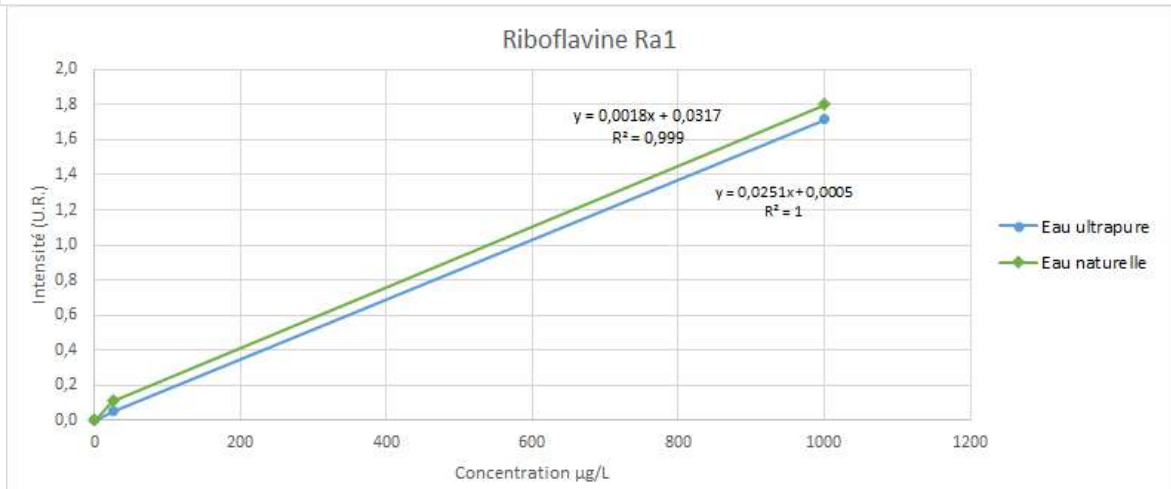
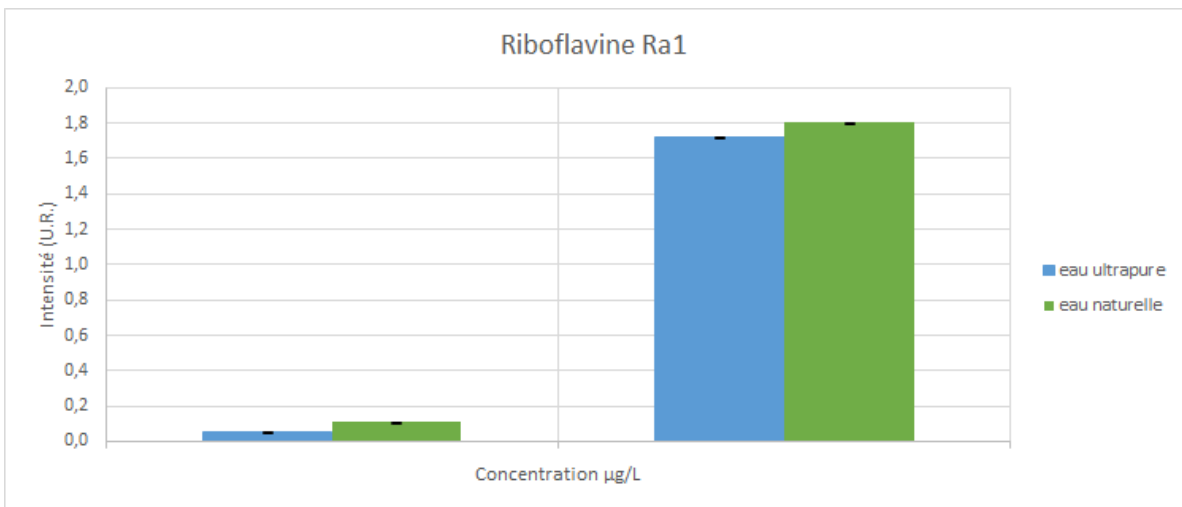
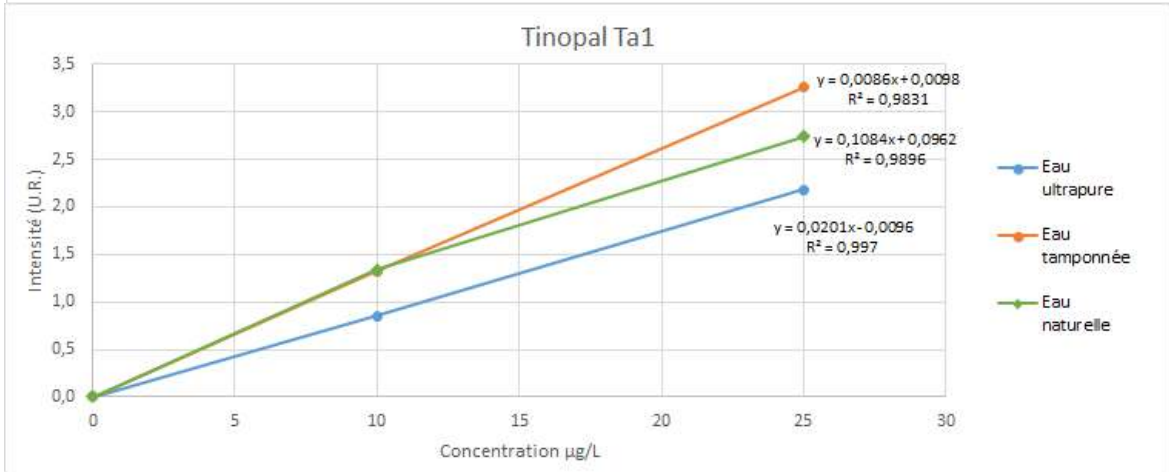
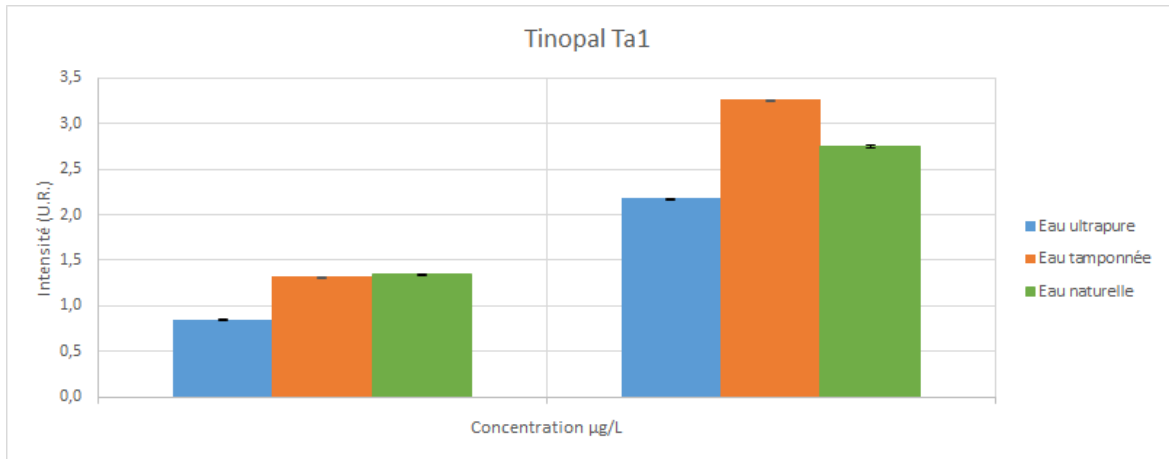
- Fenêtre d'isolation : 7 m/z
- Energie de collision : 80 eV
- Nombre de tirs : 1000

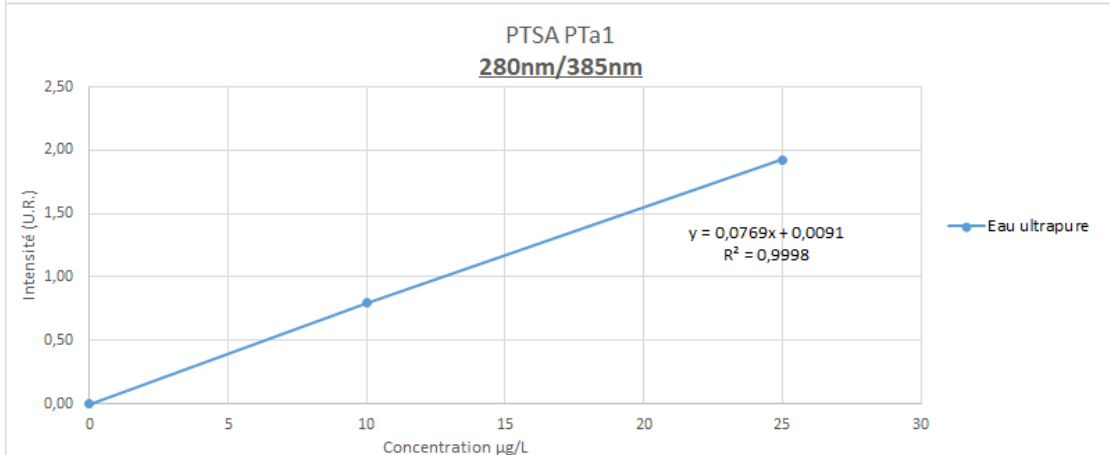
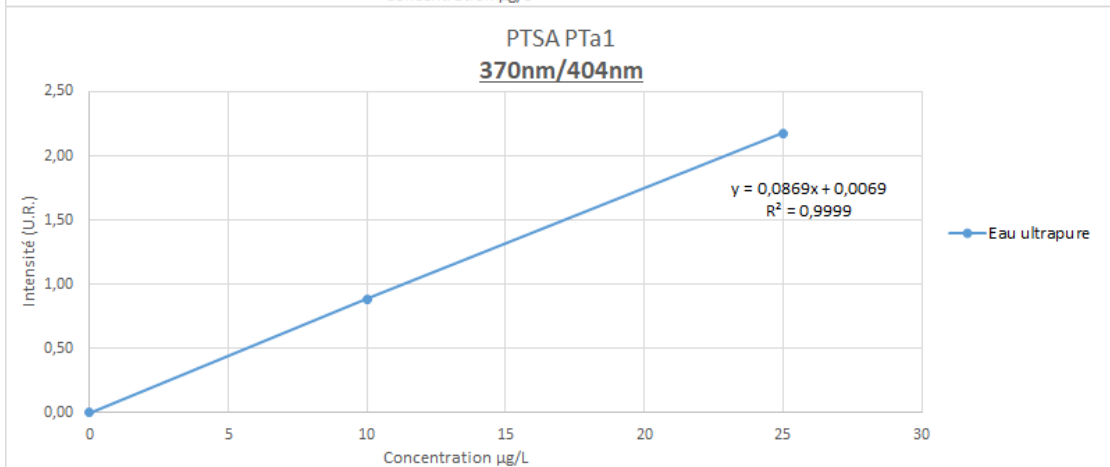
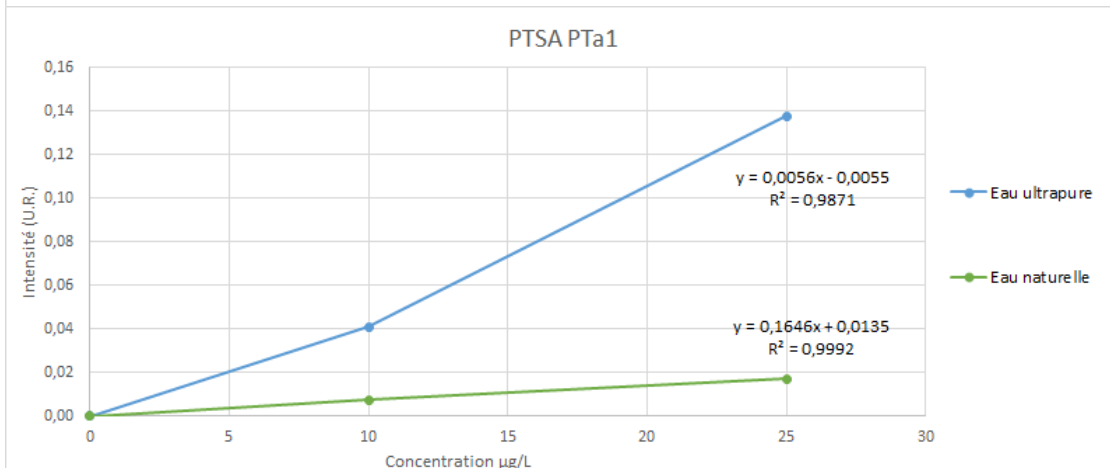
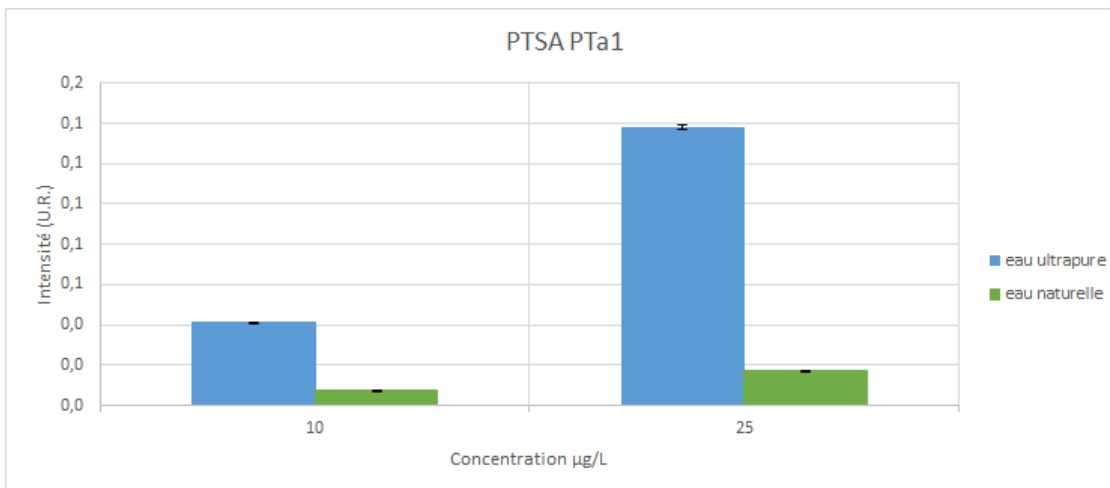
22. Annexe 14 : Autres mesures d'intensité de fluorescence des solutions préparées à partir des traceurs étudiés, en fonction de leur concentration

Dans cette annexe sont portés les graphes représentant les mesures d'intensité de fluorescence en fonction de la concentration des solutions préparées à partir des produits de la 3^{ème} série (pyranine, tinopal, PTSA, riboflavine) qui n'ont pas été inclus dans la section 3.1.3, c'est-à-dire sur les solutions fabriquées à partir d'eau naturelle et, dans le cas de la pyranine et du tinopal, d'eau ultrapure non tamponnée ; on a laissé également, à titre de comparaison, les graphes déjà présentés dans la section 3.1.3. Dans le cas du PTSA, on a ajouté les résultats obtenus lors du second suivi de ce produit, à des longueurs d'onde différentes de la première (515/537 nm : section 3.1.4.9). Les graphes équivalents pour les traceurs étudiés lors du premier projet ne sont pas donnés car difficilement lisibles en raison du trop grand nombre de données. Les représentations sous forme de graphiques en barres pour l'ensemble des traceurs sont toutefois incluses dans les Figures 12 à 21 du texte.

Les résultats représentés, comme dans la section 3.1.3 (qui inclut seulement 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), 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).

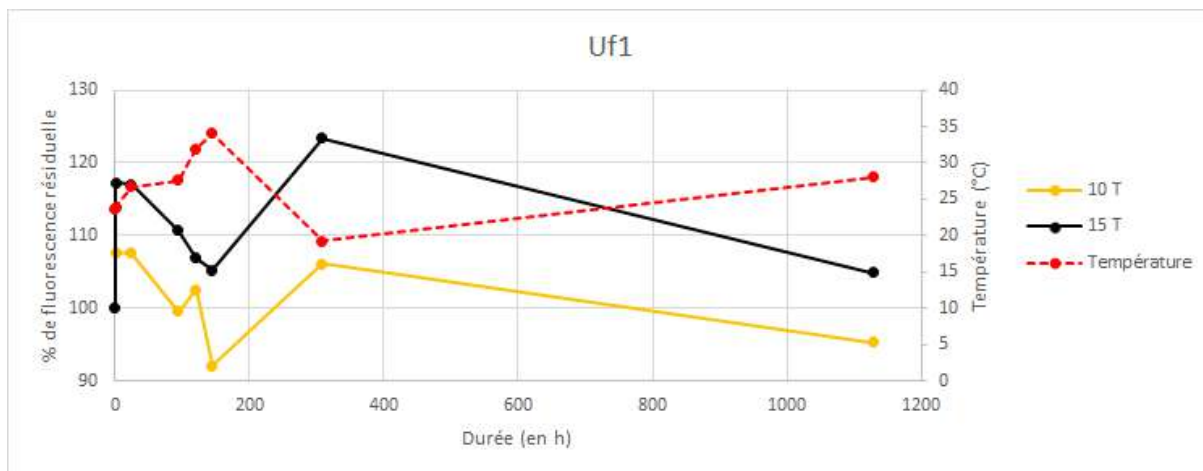
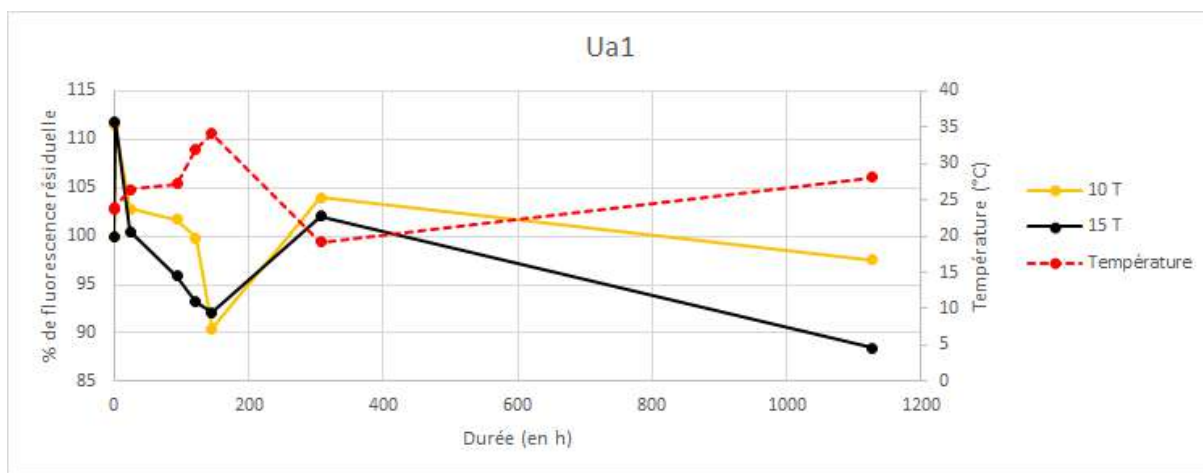


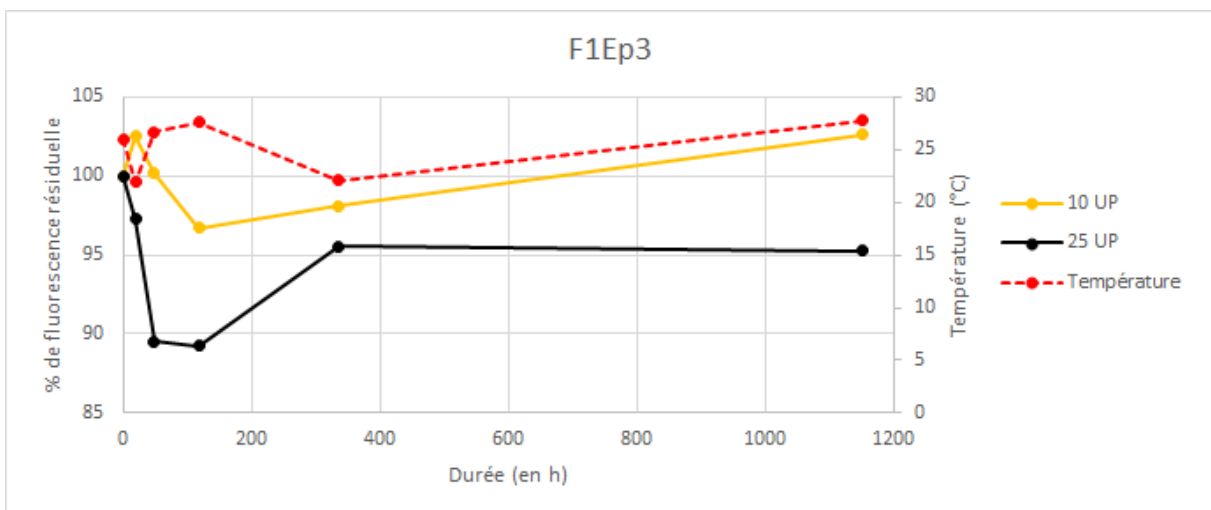
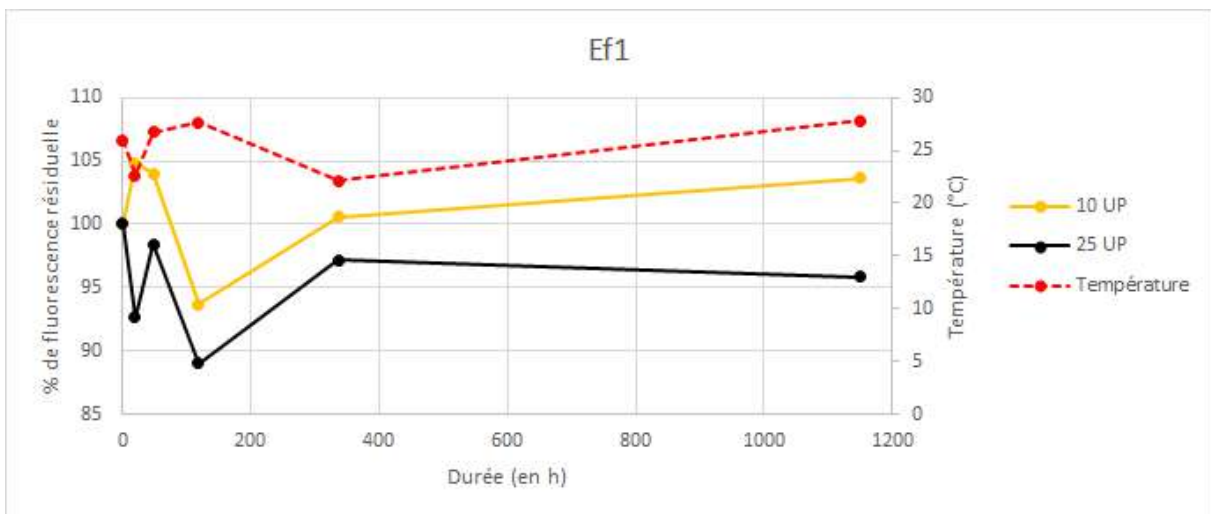
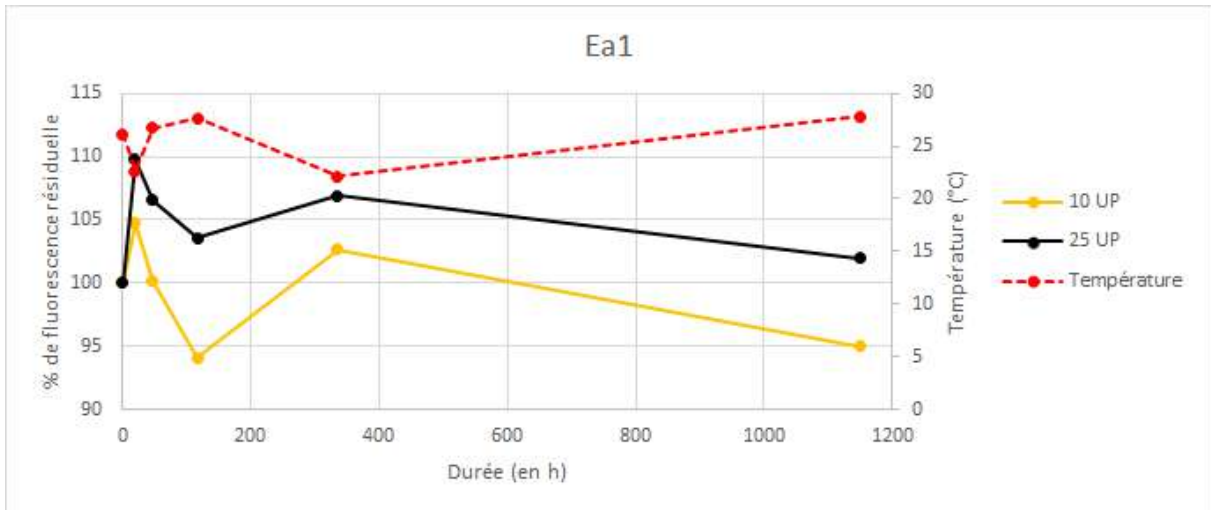


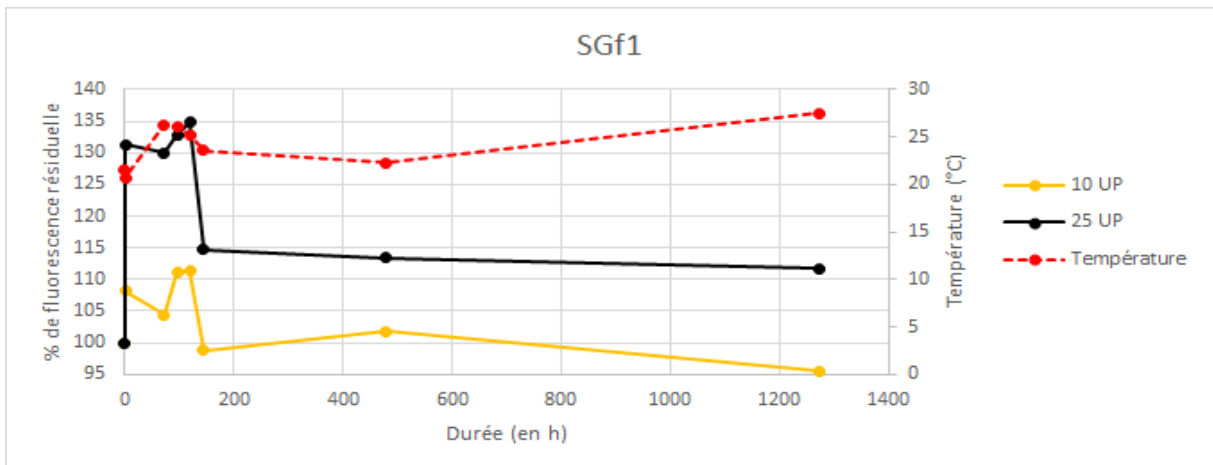
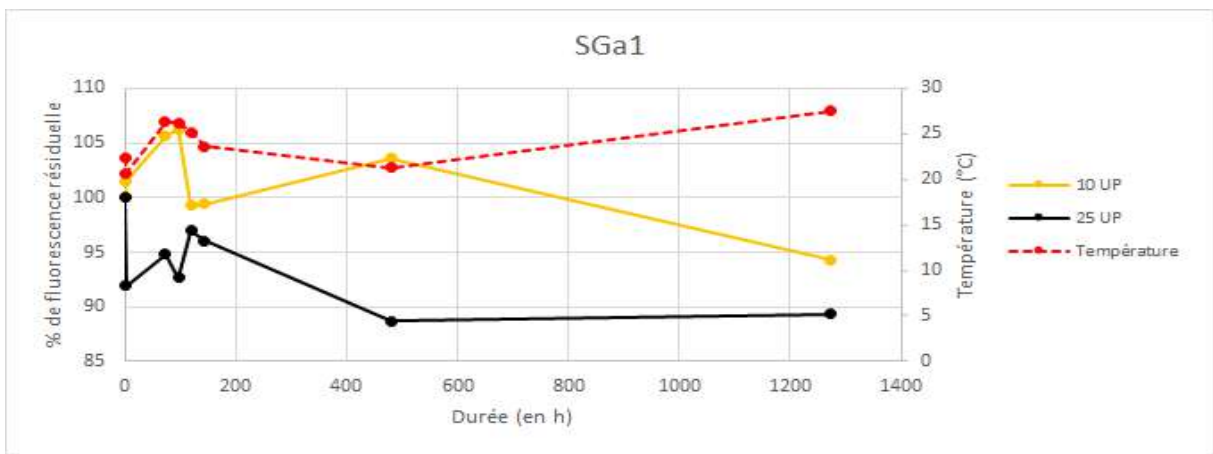
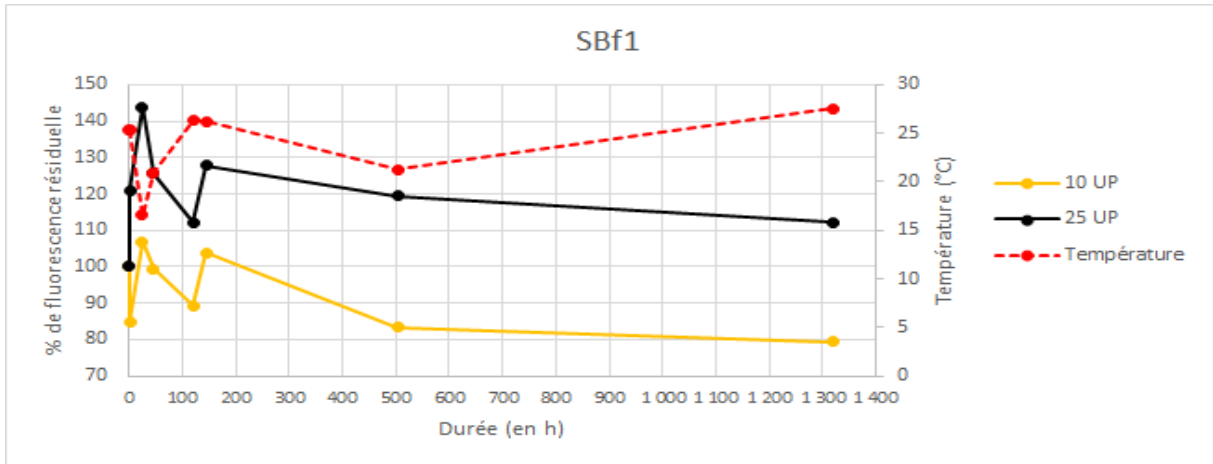
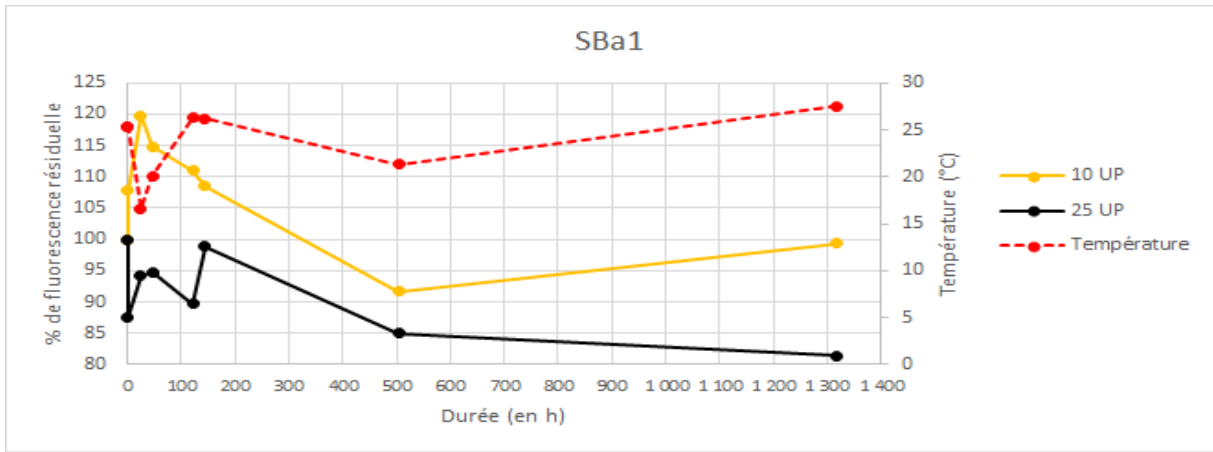


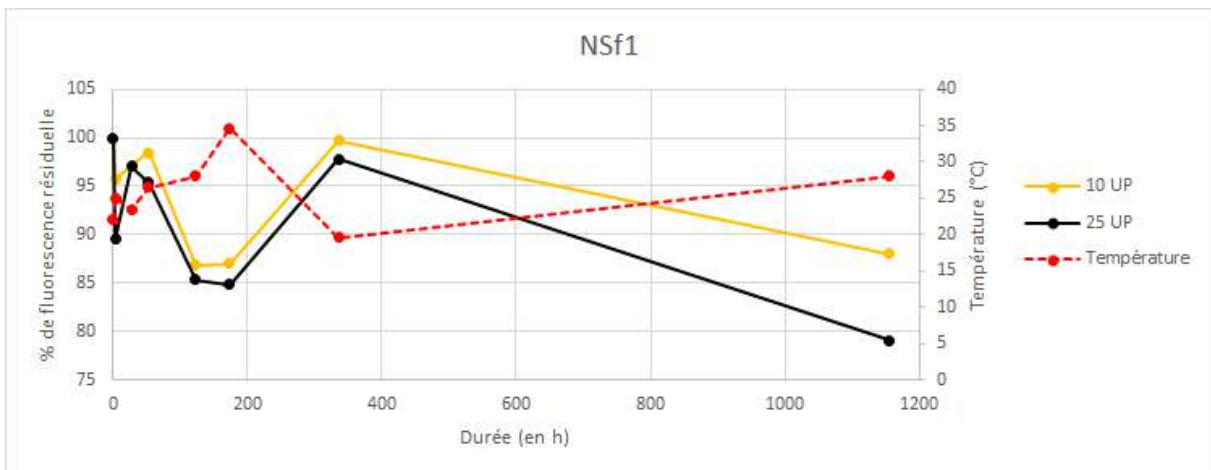
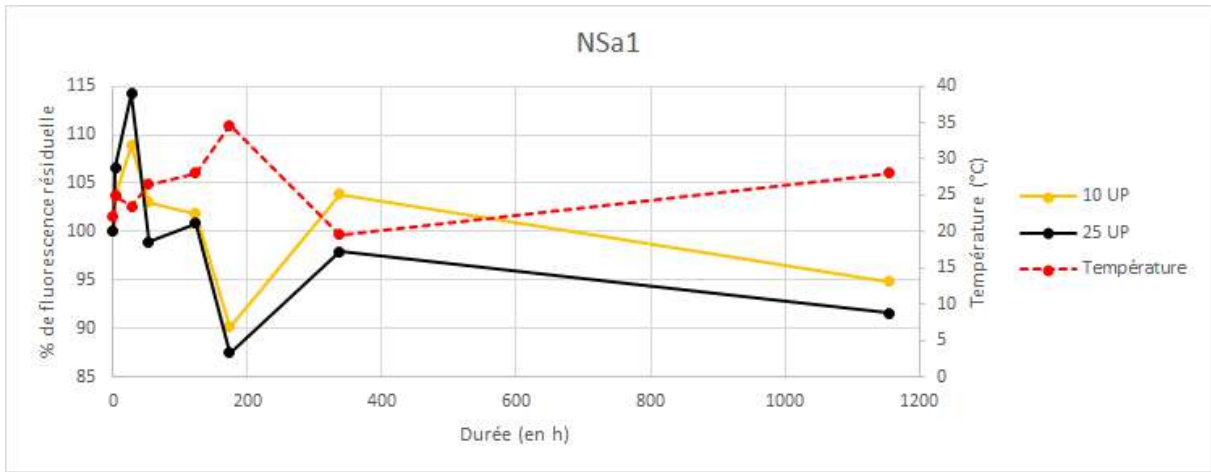
23. Annexe 15 : Stabilité des traceurs en solution dans les premières heures à semaines suivant leur préparation

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>).

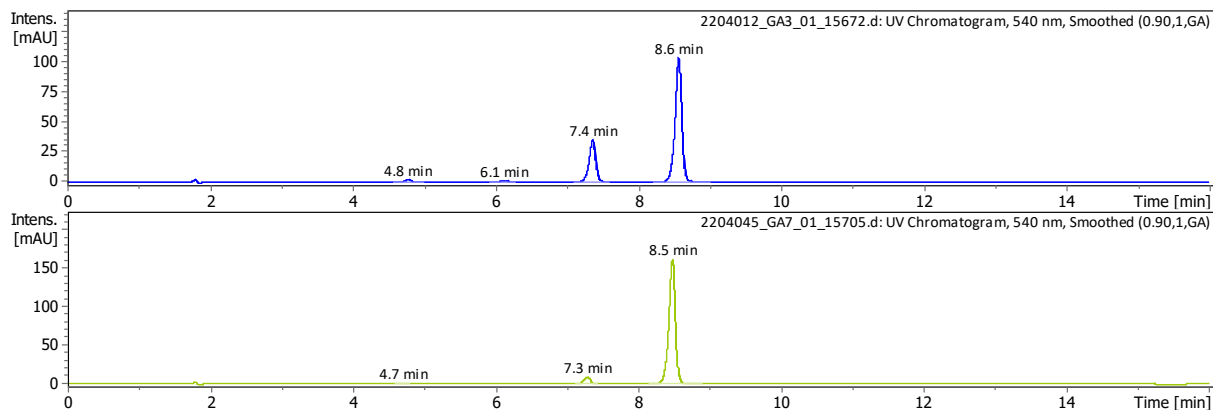




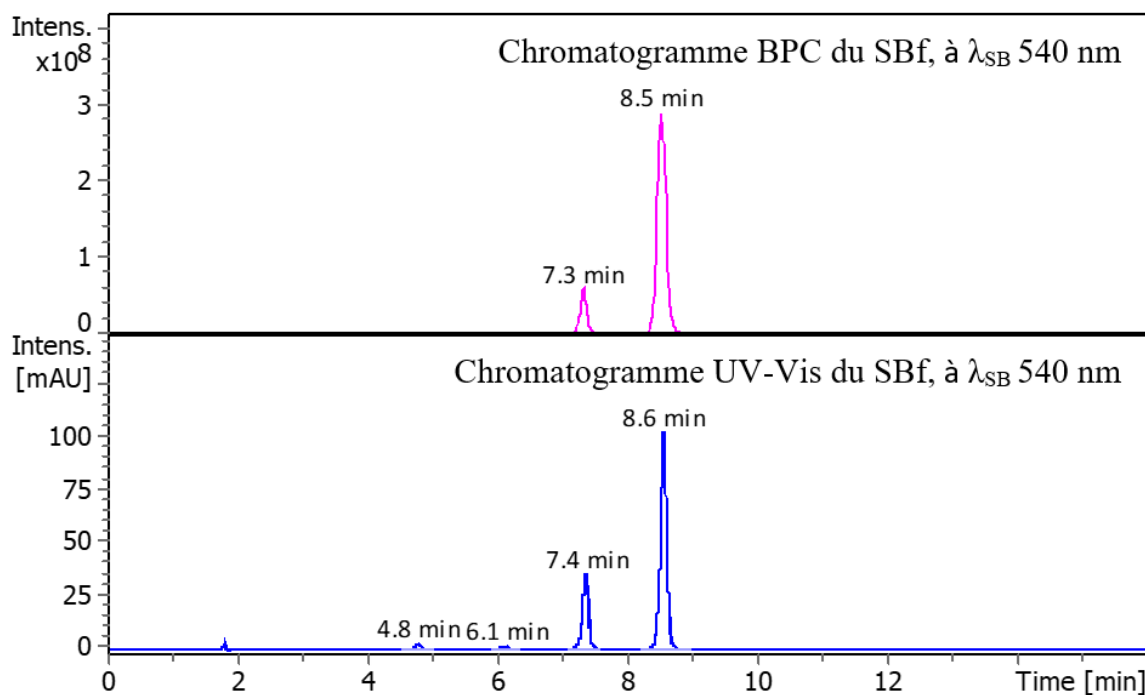




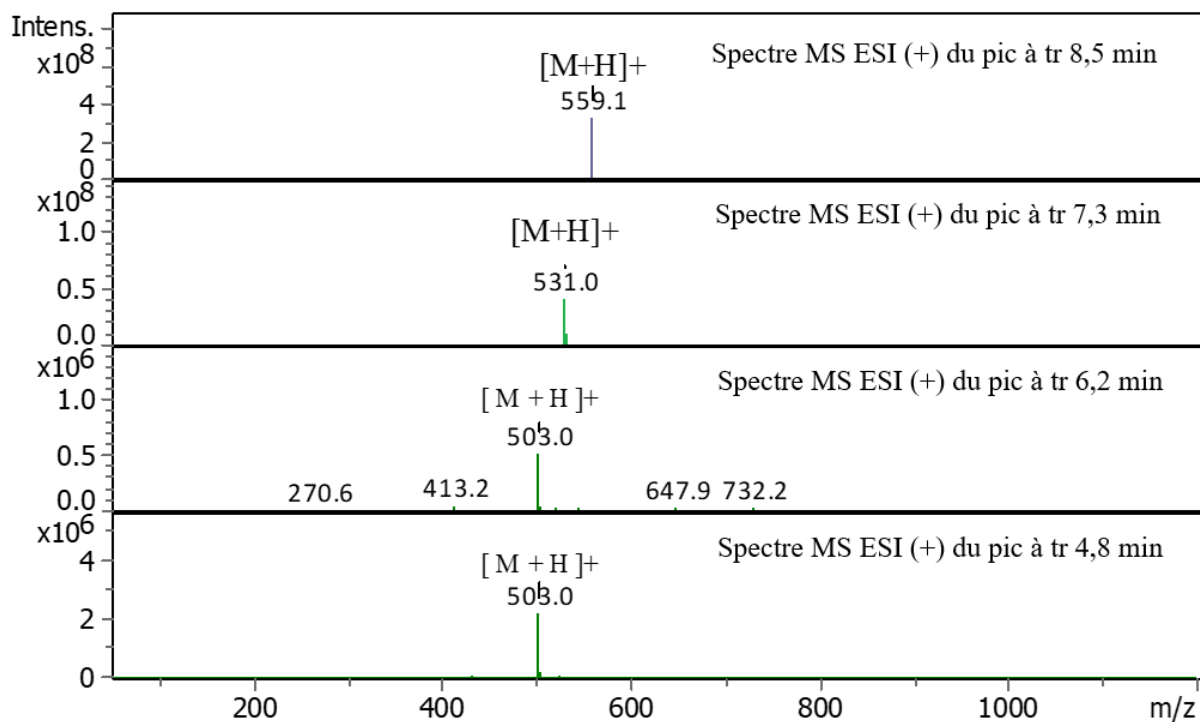
24. Annexe 16 : Chromatogrammes UV et spectres de masse des sulforhodamines B et G (SB et SG)



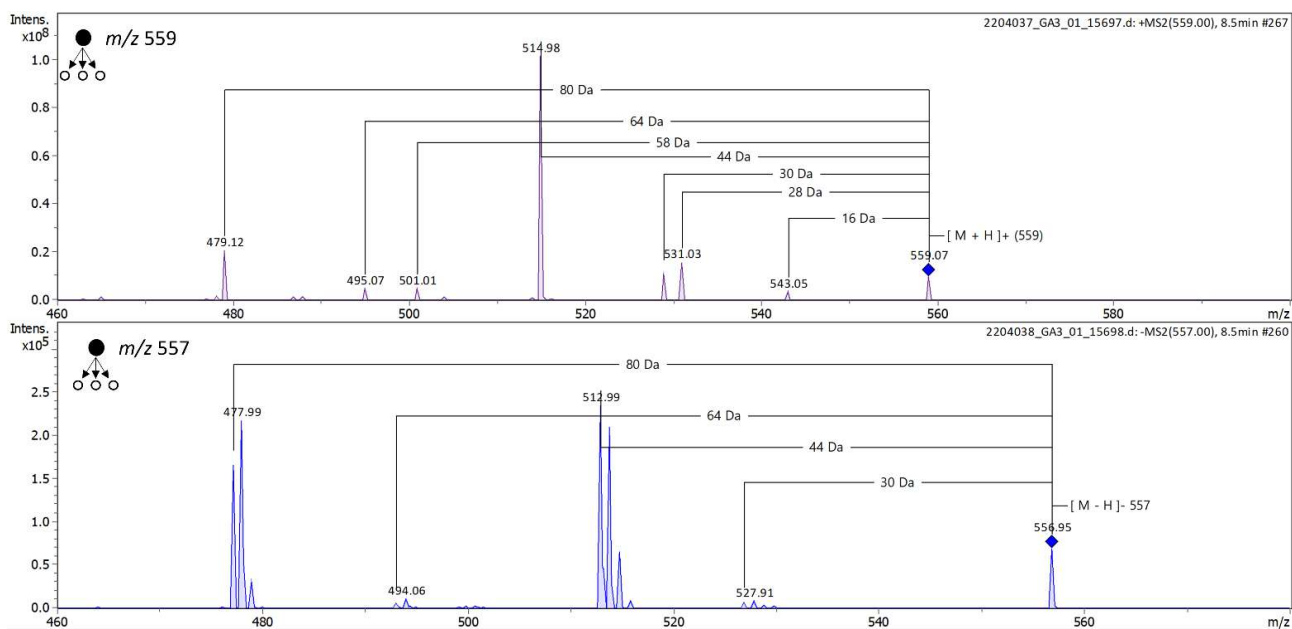
Chromatogrammes UV-VIS à 540 nm des produits **SBf1** (en haut) et **SBa1** (en bas)



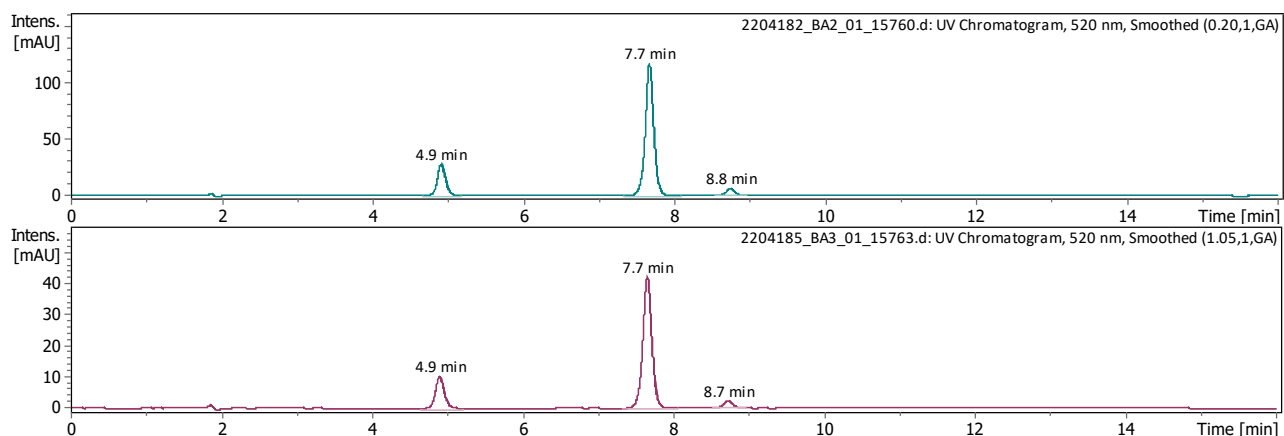
Comparaison des chromatogrammes BPC ESI+ (en haut) et UV-VIS (en bas) de l'échantillon **SBf1**



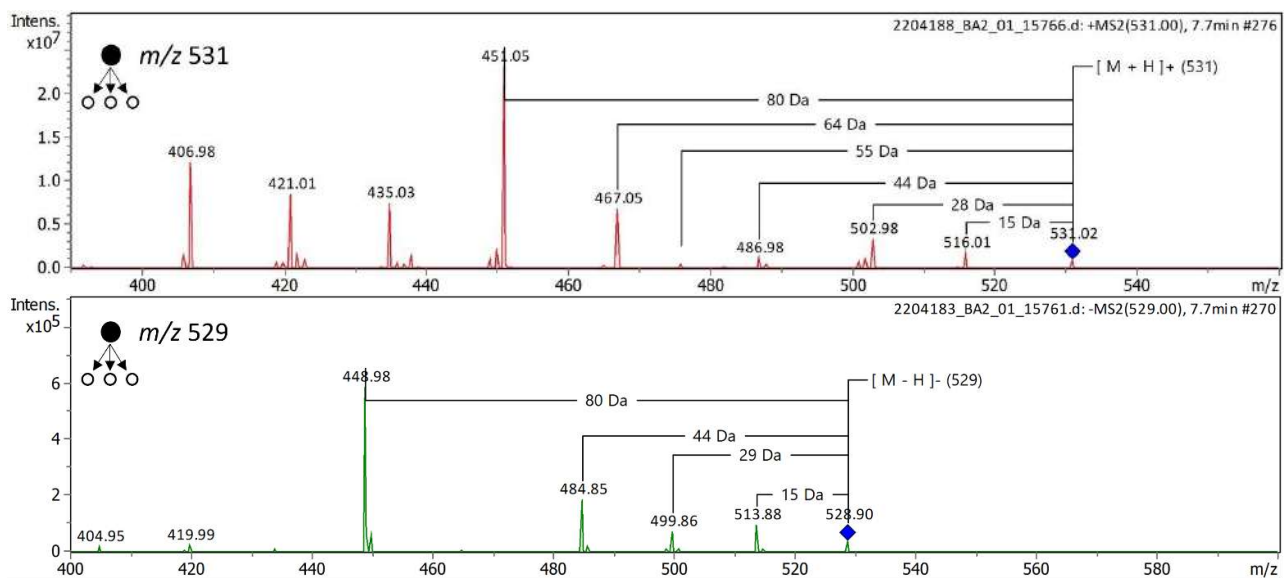
Spectres MS ESI (+) des différents pics observés en LC-MS de l'échantillon **SBf1**



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)



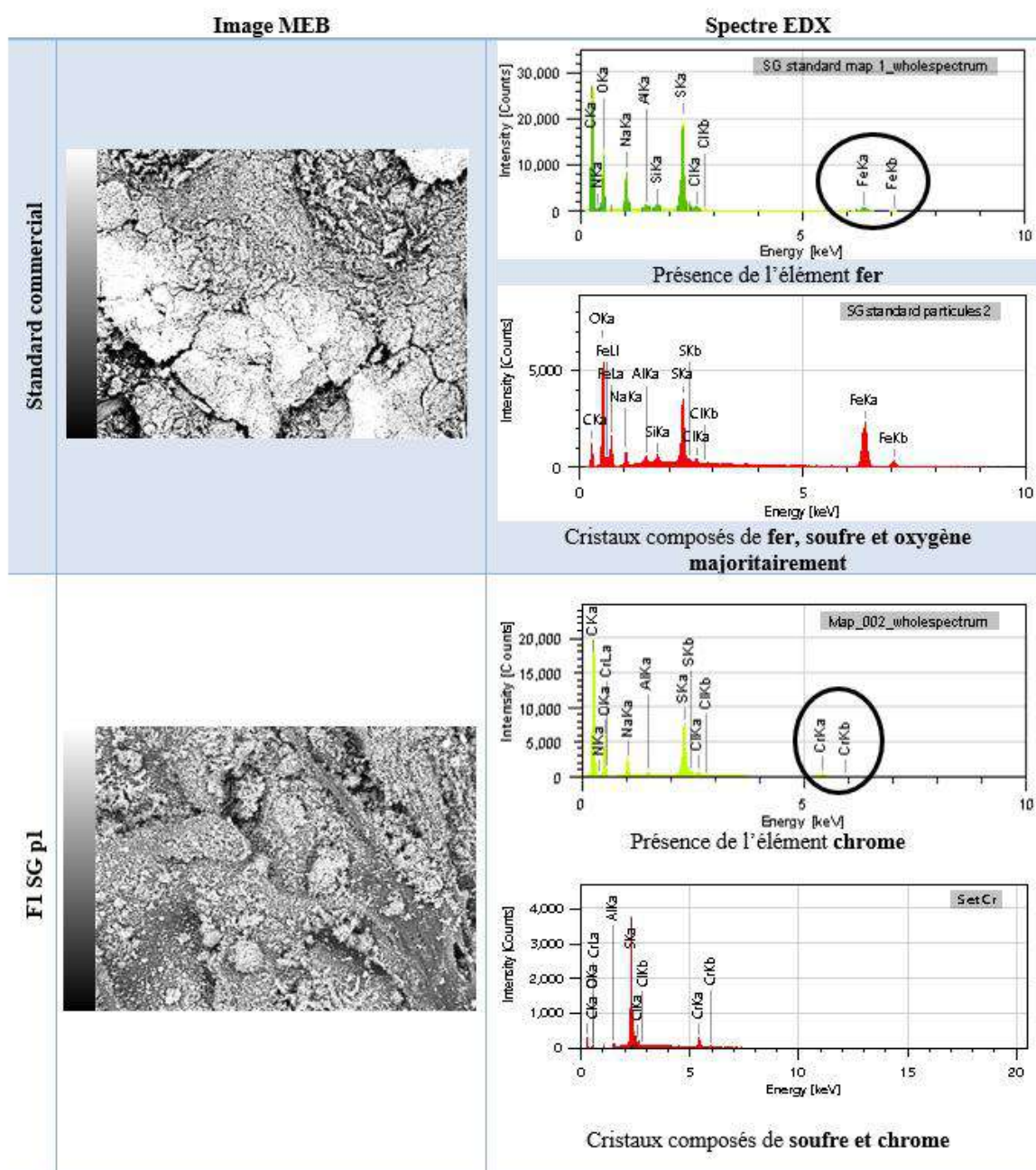
Spectres MS² des ions m/z 531 $[M+H]^+$ et m/z 529 $[M-H]^-$ du produit **SGf1**

25. Annexe 17 : Spectres de MEB-EDX des sulforhodamines G

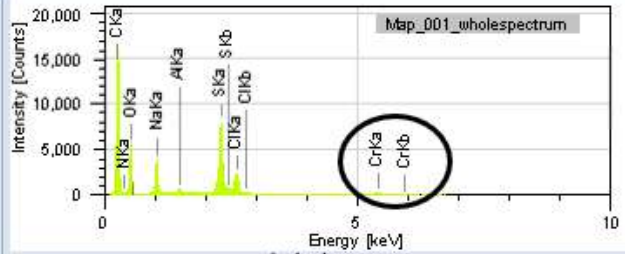
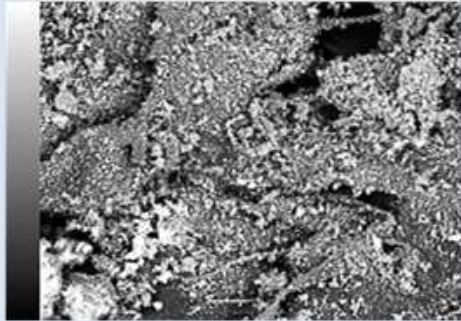
Une cartographie est réalisée selon les conditions décrites dans le tableau ci-dessous. Elle permet de photographier l'échantillon et de mettre en évidence les éléments en présence ainsi que leur pourcentage massique.

| Items | Value |
|----------------------|---------------|
| Probe current | Analyses Mode |
| Acceleration voltage | 15,00 kV |
| Magnification | x 250 |

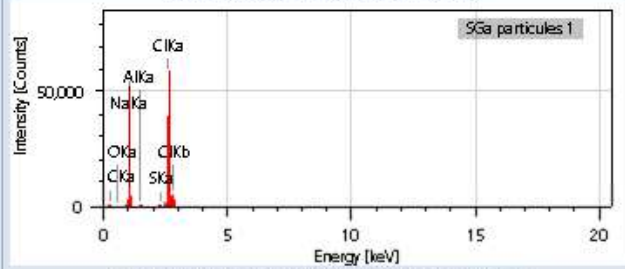
Les images obtenues sont présentées ci-dessous avec les spectres des sulforhodamines G en vert et les spectres des certains cristaux de sel présents en rouge. Des éléments ont été détectés : certains attendus, d'autres non.



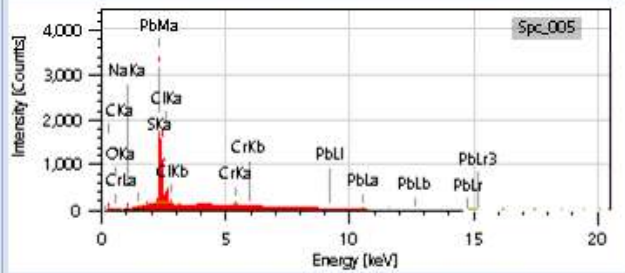
SGa1



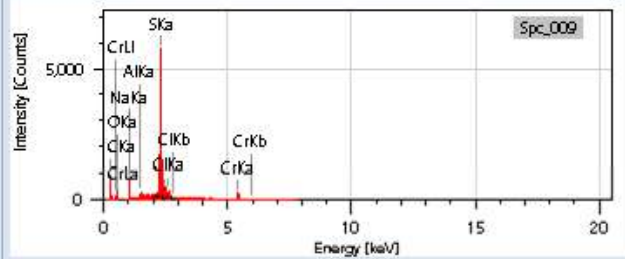
Présence de l'élément **chrome**



Cristaux composés de **chlore et sodium**

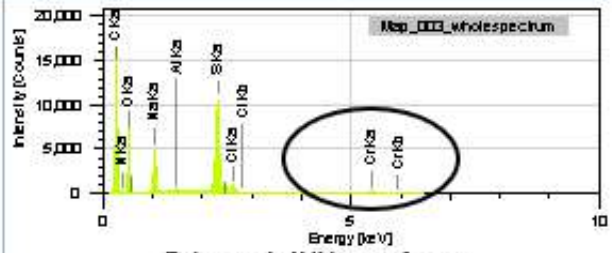
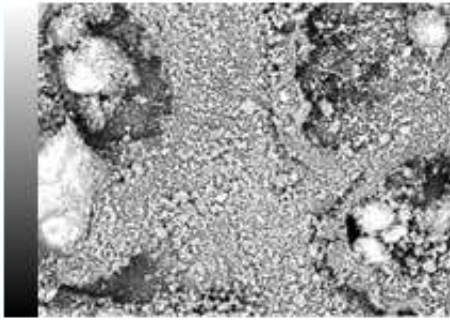


Autres cristaux composés de **plomb**

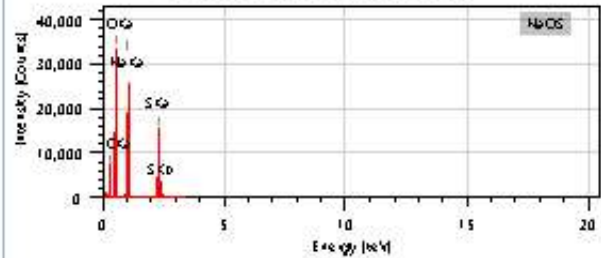


3eme type de cristaux composés de **soufre et chrome**

SGf1

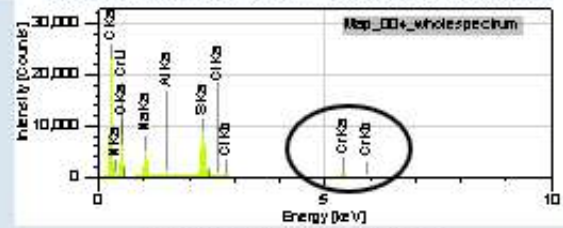
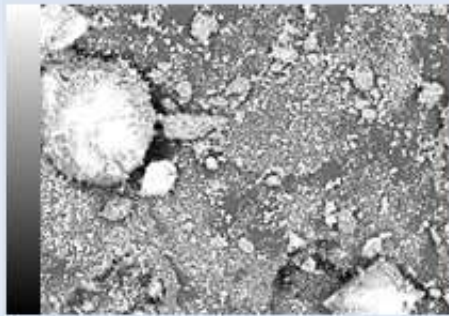


Présence de l'élément chrome

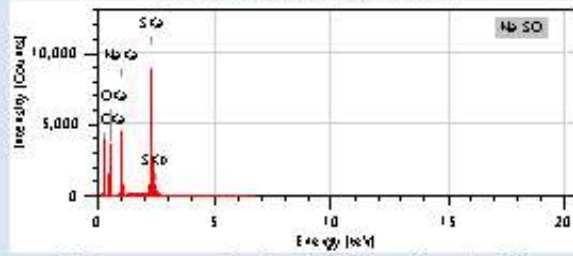


Cristaux composés de soufre, oxygène et sodium

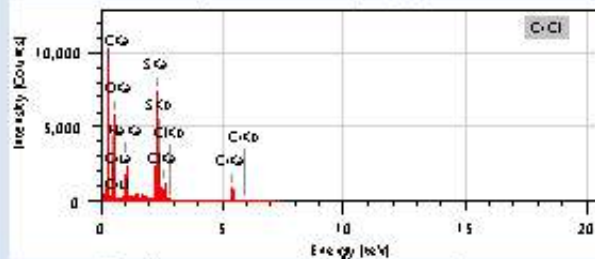
SGf2



Présence de l'élément chrome

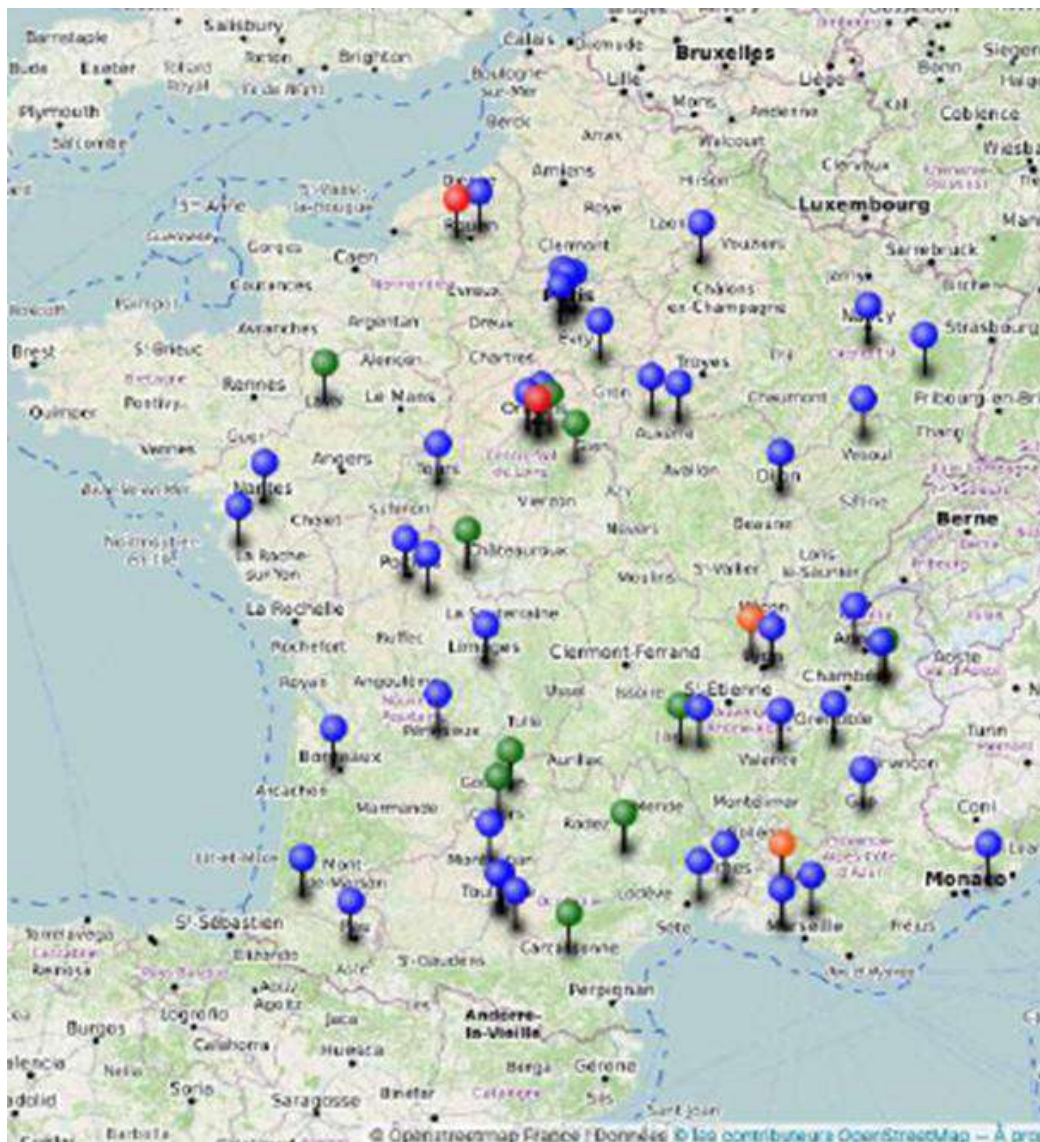


Cristaux composés de soufre, oxygène et sodium



Et cristaux composés de soufre et chrome

26. Annexe 18 : 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.

27. 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 des Affaires Financières, Université d'Orléans), Guylaine DUMONT et Marine LE MERCIER (Direction de la Recherche et de la Valorisation, Université de Rouen Normandie), pour en avoir assuré la gestion administrative et financière.

Nous remercions également les participants au webinaire/COPIL élargi du 17 juin 2025, qui a permis de recueillir de premières réactions aux résultats des deux projets financés par l'OFB, et de discuter des pistes de prolongation de cette étude vers la structuration d'une filière française autour des pratiques du traçage, qui était l'objet du Volet 3 de la présente étude, soit, en plus de Mme VILLEMAGNE et des partenaires du projet : M. David BESSON (DREAL Centre-Val de Loire), M. Laurent CADILHAC (Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse), M. Pascal CHAILLON (société COLOREY), M. Pierre-Yann DAVID (BRGM Normandie), M. Alexandre HAUET (EDF), M. Thomas KLINKA (BRGM Orléans) et M. Guillaume POULAT (société COLOREY).

Merci également à M. Philippe MEUS (*European Water Tracing Services*, Nandrin, Belgique), partenaire du précédent projet, d'avoir relu et corrigé l'*Abstract* – dont la 1^{ère} version avait été rédigée avec l'aide de DeepL.

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>

