

Philippe GOMBERT<sup>1</sup>  
et Jean CARRÉ<sup>2</sup>

(1) INERIS,  
Parc technologique Alata,  
60550 Verneuil-en-Halatte,  
France,  
philippe.gombert@ineris.fr

(2) EHESP, Département  
Santé-Environnement Travail,  
avenue du Pr. Léon Bernard,  
35043 Rennes cedex, France  
Jean.Carre@ehesp.fr

# Toxicité et écotoxicité des principaux traceurs fluorescents employés en hydrogéologie et de leurs produits de dégradation

**RÉSUMÉ:** Il est fréquent que les produits utilisés pour les traçages dans le karst ne sortent pas aux points d'émergence surveillés. Ainsi, dans la craie normande karstifiée, la restitution à un point de suivi (source ou forage) ne concerne que la moitié des traçages réalisés: les traceurs concernés parviennent alors dans le réseau d'eau potable et sont soumis au même traitement que l'eau, c'est-à-dire généralement à une désinfection au chlore. L'autre moitié des traceurs injectés reste absorbée dans le milieu souterrain ou ressort en d'autres points, notamment des sources non captées et des émergences diffuses. Les traceurs rejoignent alors les cours d'eau superficiels où ils peuvent être dégradés par la lumière (photolyse) ou par l'action de l'oxygène de l'air. Cet article présente tout d'abord la dégradation en laboratoire de trois traceurs fluorescents très utilisés soumis à une chloration, afin de simuler leur passage dans le système de traitement de l'eau destinée à la consommation humaine. Un autre lot de ces mêmes traceurs a ensuite été soumis à des agents de dégradation représentatifs du milieu naturel: illumination aux ultraviolets et à la lumière solaire avec barbotage d'air. Du fait de leur structure moléculaire, on constate que les traceurs fluorescents subissent une évolution importante et se dégradent en métabolites. Les essais de toxicité réalisés à partir des produits de dégradation montrent toutefois une absence de toxicité aiguë et une écotoxicité modérée, exceptée pour le naphthionate de sodium lorsqu'il est utilisé à forte dose. Il résulte de ce travail que les traceurs fluorescents étudiés ne présentent pas de toxicité significative pour l'homme et pour l'environnement

aquatique, aux doses où ils sont généralement observés aux points de restitution, tant en ce qui concerne les produits traceurs eux-mêmes que leurs principaux métabolites.

**MOTS-CLÉS:** traceur, dégradation, métabolite, toxicité, écotoxicité

**ABSTRACT:** TOXICITY AND ECOTOXICITY OF MAIN HYDROGEOLOGICAL FLUORESCENT TRACERS AND THEIR DEGRADATION PRODUCTS.

Chemicals used for tracing water in karst aquifers often don't resurface at the monitored water points (springs, wells, boreholes). For example, in the karstified chalk, which is the main French aquifer (70,000 km<sup>2</sup> of outcrop), only half of the tracing tests had a successful breakthrough: the tracers reached the drinking water supply. They were then submitted to the water treatment, generally a chlorine disinfection. The other part of the injected tracers was probably adsorbed in the subsurface (on clays) or came out at unmonitored points, including springs or diffuse emergences. In this cave, the tracers join the rivers where they can be degraded by light (photolysis) or by the action of atmospheric oxygen. This paper presents the laboratory-scale degradation of three widely used fluorescent tracers in Norman chalk (and more generally in French karst), i.e. uranine, tinopal and sodium naphthionate.

These tracers have been diluted in water to obtain an initial tracer solution concentrated at 1 g/l: this concentration is intermediate between the concentrations poured in injection points (>100 g/l) and found at breakthrough points (< 1 mg/l). First, each tracer solution has been submitted to strong and fast laboratory breakdown by

contact with gaseous chlorine: this is to simulate the tracer transit through the drinking water supply. Another set of the same tracers is then submitted to natural degradation substances, with UV and sunlight irradiations as well as a mixing with air. Because of their molecular structure (long carbon chains or aromatic cycles), the fluorescent tracers undergo significant changes and keep on degrading into sub-products (metabolites). These degradations have been highlighted by HPLC and the metabolites obtained have been analyzed by LC-MS: unfortunately, they were not able to be identified except one for tinopal.

A bibliographic synthesis has then been realized to summarize the human and environmental impact of all tracers. Toxicity and ecotoxicity of degradation products of each tracer have been tested. Toxicity tests have been conducted by oral path on rats, and ecotoxicity tests by two complementary methods: one method with a small aquatic crustacean (*Daphnia magna*) to test their impact on aquatic fauna, the other method on micro-algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*) to test their impact on aquatic flora. These laboratory tests show that at high concentration (10<sup>5</sup> higher than in breakthrough curve peaks), the degraded tracers have none acute toxicity and only a moderate ecotoxicity, except for sodium naphthionate. In conclusion, the fluorescent tracers studied do not exhibit significant toxicity to humans and aquatic environment, at levels generally observed at breakthrough points, both as tracers as their major metabolites.

**KEYWORDS:** tracer, degradation, metabolite, toxicity, ecotoxicity

## Introduction

### A. Généralités sur les traceurs

Un traceur est un produit utilisé pour démontrer l'existence d'une relation entre deux points d'eau [Meus et Bakalowicz, 1997]. Il doit s'agir d'un produit inexistant ou peu abondant dans l'eau, conservatif, ni toxique ni écotoxique, d'un coût économique raisonnable et détectable à faible concentration. A l'heure actuelle, le traceur idéal n'existe pas : certains produits employés sont (légèrement) toxiques ou écotoxiques alors que d'autres s'adsorbent sur les roches (notamment argileuses) ou peuvent se dégrader et donner des métabolites.

Ainsi, dans la craie du nord-ouest du Bassin parisien, principalement en Haute-Normandie, moins de la moitié des traceurs injectés au cours des 300 traçages étudiés [Gombert, 2009a] est ressortie à l'un des points de suivi. Or, sur la période 1970-2007, la masse totale de traceur injecté dans cette région a été de l'ordre de 6 tonnes (dont 76 % de fluorescéine).

Le devenir des traceurs injectés est le suivant :

- soit ils apparaissent au niveau d'un captage AEP<sup>1</sup> et subissent donc le même traitement que l'eau (au minimum, et

le plus généralement une désinfection par du chlore gazeux ou un composé chloré, de l'ozone ou des UV) avant de circuler dans le réseau de distribution et de se retrouver au final au robinet du consommateur ; les désinfectants sont des oxydants forts qui peuvent dégrader les traceurs donnant des métabolites dont on connaît mal la nature et la toxicité sur l'homme ;

- soit ils ressortent dans le milieu superficiel par le biais de sources non captées où ils vont pouvoir réagir avec la lumière et l'air en formant éventuellement des métabolites dont on connaît mal la nature ainsi que la toxicité sur l'environnement (écotoxicité) ;
- soit ils restent adsorbés dans le milieu souterrain, généralement sur les matériaux argileux ou riches en matière organique, et leur devenir reste inconnu (dégradation lente, restitution lente, immobilisation définitive).

L'INERIS a réalisé en 2010 une étude sur le devenir des principaux traceurs fluorescents injectés dans la craie karstique normande ; l'objectif était de connaître les risques que font peser ces traceurs sur la santé des consommateurs d'eau, ainsi que leurs métabolites naturels ou artificiels, sur la santé humaine et sur l'environnement. Le présent article reprend les principaux résultats de ce

travail ainsi que ceux de l'EHESP concernant la toxicité des traceurs.

### B. Généralités sur les traçages

Un traçage consiste à injecter un traceur en un point et à surveiller, pendant un temps donné, sa restitution en un autre point situé à une certaine distance. Dans le but d'optimiser le coût d'un traçage ou de favoriser sa réussite, il est possible d'injecter simultanément plusieurs traceurs distincts dans plusieurs points d'injection : on parle alors de multi-traçage. Enfin, pour accroître la probabilité de récupérer le traceur injecté, il est fréquent de surveiller simultanément plusieurs points de restitution potentielle, éventuellement avec des méthodes de suivi différentes et sur des laps de temps différents.

De nombreux traçages sont réalisés en France, dans divers contextes géologiques, par des bureaux d'études, par des équipes universitaires et/ou par des spéléologues. Les objectifs visés peuvent être divers :

- délimitation du bassin d'alimentation de points d'eau souterraine (sources, puits, forages) généralement dans le but de tracer des périmètres de protection de captage d'alimentation en eau potable ;

#### Encadré 1 : Porosité et perméabilité. *Porosity and permeability.*

Le domaine des traçages est limité par la durée de suivi nécessaire lorsque la distance à tracer augmente ou lorsque la perméabilité du milieu diminue (voir tableau 1). La perméabilité est la vitesse théorique avec laquelle l'eau circule à travers un milieu soumis à un gradient hydraulique unitaire. Cependant, les matériaux constitutifs des roches sont imperméables et l'eau ne peut circuler que dans les vides existants qui sont de trois types :

- **la porosité primaire ou matricielle**, qui résulte de la répartition des vides lors de la formation de la roche ou à la suite de son métamorphisme ; elle est négligeable pour le granit, le basalte, le gneiss, le schiste et varie de quelques % pour les calcaires à 20 % pour les alluvions et jusqu'à 50 % pour la craie ;
- **la porosité secondaire ou de fissures**, créée ultérieurement par fracturation tectonique ou fissuration géomorphologique (décompression) de la roche ; cette porosité, de l'ordre de

quelques %, est pratiquement la seule qui existe dans les milieux fissurés non karstifiables ;

- **la porosité tertiaire ou de chenaux**, qui résulte de l'agrandissement de la porosité primaire ou (le plus souvent) secondaire par dissolution de la roche à la suite de la circulation de l'eau ; c'est la porosité caractéristique du karst qui concerne les roches solubles à l'échelle géologique (calcaire, craie, gypse, sel, grès à ciment calcaire).

Pour schématiser, la porosité correspond à la quantité de vides existants dans un milieu donné alors que la perméabilité traduit leur degré de connexion, ce qui permet à l'eau de circuler à travers le dit milieu.

La formule de Darcy stipule  $v = K i$  où  $v$  est la vitesse d'écoulement de l'eau à travers un milieu donné,  $K$  la perméabilité de ce milieu et  $i$  le moteur de l'écoulement appelé « gradient hydraulique ». Ce gradient correspond à la « pente » de la surface d'eau

en mouvement à travers le milieu :  $i = H / l$  où  $H$  est la hauteur d'eau et  $l$  la longueur du trajet. La perméabilité est donc la vitesse théorique à laquelle l'eau traverserait un milieu sous un gradient hydraulique unitaire. Lorsque le milieu est très homogène et qu'il ne possède pas de porosité secondaire ni tertiaire, par exemple dans le cas d'un sable ou d'un sol, la perméabilité se mesure en laboratoire sur une colonne de matériau ; dans le cas contraire, il faut de préférence la mesurer *in situ* afin d'englober un volume de terrain plus représentatif : test de perméabilité type Lefranc (échelle métrique), pompage d'essai (échelle décimétrique à hectométrique), traçage (échelle kilométrique à pluri-kilométrique). A titre d'information, le gradient hydraulique est généralement de l'ordre de quelques ‰ à quelques %, ce qui signifie que la vitesse d'écoulement réelle de l'eau *in situ* est 10 à 1 000 fois plus faible que la perméabilité du milieu.

1. Signification des sigles dans le glossaire en page 52.

K	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	<10 <sup>-9</sup>
D	~10 km	~1 km	~1 hm	~1 dam	~1 m	~1 dm	~1 cm	~1 mm	~0,1 mm	~10 µm	< 10 µm
V	360	36	3,6	(0,36)	(0,04)	(0,004)	-	-	-	-	-
1)	Karst, alluvions grossières (galets, graviers)		Alluvions sableuses, milieu fissuré		Alluvions fines, sables fins ou argileux, limons, milieu peu fissuré (dont la craie matricielle, hors secteur karstifié ou fissuré)					Argiles, argilites	
2)	Excellente		Bonne		Mauvaise					Nulle	
3)	Milieu perméable				Milieu semi-perméable						Imperm.

- connaissance du trajet des eaux souterraines à partir d'un point donné (aven, bétoire, perte, siphon, stockage de déchets, rejet d'effluent, bassin de rétention...), représentant le plus souvent un point de pollution potentielle;
- calage d'un modèle mathématique de transfert (de pollution, par exemple) ;
- preuve de jonction entre réseaux karstiques ou simple curiosité spéléologique !

Gombert [2009] a étudié le devenir des traceurs injectés dans la craie qui forme le plus grand ensemble aquifère karstique de France avec 70 000 km<sup>2</sup> d'affleurement. Cette roche présente toutefois un comportement à part puisqu'elle est très poreuse (30 à 50 %) mais peu perméable hors secteurs fracturés ou karstifiés (10<sup>-5</sup> à 10<sup>-7</sup> m/s) et généralement recouverte de plusieurs mètres de formations superficielles fines (argiles résiduelles à silex, loess éoliens). Par contre, elle devient fortement perméable dans les zones fracturées où elle peut donner lieu à une karstification comparable à celle des calcaires (pertes appelées « bétoires », chenaux pénétrables sur plusieurs km, sources karstiques...). Dans la seule région de Haute-Normandie, sur la période 1970-2007, plus d'un millier de traçages a été recensé dans la base de données du BRGM et étudié par de Béchillon [2009].

En règle générale, les traçages sont réalisés dans les milieux perméables à très

perméables (voir encadré 1 et tableau 1) : il s'agit le plus souvent du karst (calcaire, craie, gypse...), du milieu fissuré (granite, grès, schistes...) et plus rarement – ou sur de plus courtes distances – du milieu poreux (alluvions, sables...).

## I. Principaux traceurs employés

### A. Nature des traceurs

Les traceurs les plus fréquemment employés dans le karst sont de type fluorescent ou ionique [Gombert, 2007 et 2009]. Il existe également d'autres types de traceurs (particulaires, bactériens viraux, radioactifs, activables...) mais ils ne seront pas traités ici car leur emploi est restreint ou interdit en France.

Les traceurs fluorescents sont les plus utilisés du fait de leur coût modéré, d'un seuil de détection bas (< 0,1 µg/l) et de leur facilité de détection en continu dans l'eau. Les plus connus sont la fluorescéine<sup>1</sup>, le naphthionate, les rhodamines, les sulforhodamines, le tinopal<sup>2</sup>, l'éosine... Sur le plan chimique, ce sont des molécules formées de longues chaînes carbonées ou d'assemblages de cycles aromatiques renfermant 10 à 30 atomes de carbone. Le phénomène de fluorescence résulte de cette structure moléculaire particulière, ce qui autorise leur détection par un processus optique simple<sup>3</sup>. Cependant, il induit

Tableau 1: Echelle de perméabilités et de vitesses de transfert selon les roches.

*Permeability and transport speed depending on rock type.*

**K** = perméabilité (voir encart) mesurée en m/s / permeability (see box) in m/s.

**D** = distance théorique parcourue en 1 jour sous un gradient hydraulique de 10 % (voir encadré 1) / theoretical distance of transport in 1 day under a 10 % hydraulic gradient (see box 1).

**V** = vitesse théorique de transfert (m/h) / theoretical transport speed (m/h).

**1)** = exemple de roches correspondantes / example of corresponding rocks.

**2)** = classe de perméabilité [Castany, 2002] / class of permeability.

**3)** = domaines conventionnels de perméabilité [Castany, 2002] / conventional domains of permeability.

Photos 1: Injections de traceur fluorescent dans le karst de la craie normande. Clichés P. Gombert. Injection of fluorescent tracers in the chalky karst of Normandy.



a) Fluorescéine



b) Sulforhodamine



c) Tinopal



d) Naphthionate

1. Ce traceur n'est appelé ainsi qu'en France, probablement par exception culturelle ! Il s'agit en réalité de l'uranine (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na<sub>2</sub>) qui est un sel disodique de fluorescéine (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) ; cette dernière, utilisée au tout début de la spéléologie, a finalement été abandonnée au profit de son sel disodique, plus soluble mais son appellation est restée ; c'est donc bien de l'uranine qui est employée sous le vocable erroné de fluorescéine.
2. Le tinopal pur est appelé « Tinopal CBS-X » ; c'est une poudre très peu soluble dans l'eau qui est généralement commercialisée sous forme aqueuse, stabilisée par de l'éthylène-glycol et appelée « Tinopal CBS-CL » ; du fait de la toxicité de cet adjuvant, nous avons testé ici la forme CBS-X (CAS 27344-41-8).
3. Lorsqu'elles sont excitées par une lumière de longueur d'onde donnée, ces molécules émettent dans une longueur d'onde différente ; le couple de longueurs d'onde d'excitation/émission est une caractéristique de chaque traceur fluorescent ; ainsi, excitée par une lumière bleue, la fluorescéine émet une fluorescence verte alors que le tinopal et le naphthionate émettent une fluorescence bleu-violet sous un rayonnement ultraviolet.

Le dosage d'un traceur doit tenir compte à la fois des caractéristiques du traçage (type de roche, distance à tracer, gradient hydraulique, débit à l'exutoire...) et du traceur (nature, taux d'adsorption ou de dégradation, méthode et seuil de détection...). Parmi les 33 équations recensées par Field [2003] pour estimer la masse de traceur à injecter, la plus simple est celle de Siline-Bektchourine, mentionnée par Parriaux et al. [1988]. Elle s'écrit :

$$M = L \times Tc$$

où M est la masse de traceur (kg), L la distance à tracer (km) et Tc un coefficient dépendant du traceur et du type d'aquifère, appelé coefficient de Siline-Bektchourine. Afin de calculer ce coefficient pour différents traceurs, Gombert [2009 a et b] a comparé leurs performances en fonction de la pureté du « produit-traceur » acheté, du seuil de détection de la « molécule-traceur » recherchée et de son taux connu d'adsorption ou de dégradation. Il a proposé de standardiser leur dosage en calculant la masse de produit-traceur nécessaire pour obtenir 1 kg de traceur pur, non adsorbé et facilement détectable. Cette valeur a ensuite été convertie en un coefficient de Siline-Bektchourine spécifique à chaque traceur, qu'il suffit de multiplier par la distance à tracer pour avoir une estimation de la masse de traceur à employer (voir tableau 2).

Encadré 2: Quelle quantité de traceur employer ? *How much tracer to use?*

également une certaine sensibilité à l'adsorption et à la dégradation. En outre, ces traceurs sont souvent des colorants puissants, à l'exception notable du tinopal et du naphthionate (photo 1).

On doit également noter l'existence de traceurs ioniques qui sont soit des ions simples (halogénures, lithium) soit, plus rarement, des ions chélatés (ex : Ni<sup>2+</sup>EDTA). Comme il s'agit parfois d'éléments naturellement présents dans l'eau à l'état de traces (voire en tant qu'ions majeurs pour les chlorures) et qu'ils possèdent en outre un seuil de détection plus élevé que celui des traceurs fluorescents (>1 µg/l), ils doivent être employés à des concentrations plus fortes (tableau 2). D'autre part, leur détection nécessite généralement un prélèvement d'eau et une analyse chimique, ce qui permet rarement un suivi en continu. L'emploi de traceurs ioniques est donc plus coûteux que celui des traceurs fluorescents mais cela est à mettre en balance avec d'autres qualités : les traceurs ioniques sont en effet incolores, facilement solubles et, pour les halogénures, figurent parmi les traceurs les plus conservatifs (pas d'adsorption sur les argiles).

## B. Concentration à l'injection et à la restitution

Le dosage d'un traceur doit tenir compte à la fois des caractéristiques :  
- du traçage (type de roche, système-traçage, distance à tracer, gradient hydraulique, débit à l'exutoire...) ;

- du traceur (nature, taux d'adsorption ou de dégradation, méthode et seuil de détection).

Une méthode de calcul de la dose à injecter basée sur la nature du traceur et sur la distance à tracer a été proposée Gombert et al. [2010] (voir encadré 2 et tableau 2).

Les traceurs sont généralement vendus sous forme de poudre et doivent être dissous préalablement à leur injection. Compte tenu des doses d'emploi nécessaires, la solution d'injection doit être très concentrée, de l'ordre de 100 g/l.

Au niveau des points de suivi, la concentration mesurée au passage du pic de restitution, obtenue par Gombert et al. [2010] sur 210 valeurs, est de 19 µg/l en médiane et de 8 mg/l au maximum.

Compte tenu de ces éléments, les solutions de traceurs testées dans le cadre de cette étude ont été dosées à 1 g/l, concentration intermédiaire entre celle des traceurs au point d'injection et au point de restitution.

## II. Matériels et méthodes

Les traceurs étudiés ici sont la fluorescéine, le naphthionate et le tinopal qui sont parmi les plus fréquemment employés dans la craie karstique de Normandie. Chaque traceur a été dilué dans de l'eau jusqu'à obtenir 10 l de solution-mère concentrée à 1 g/l.

### A. Dégradation des traceurs

Dans cette étude, il a été considéré que la dégradation et l'altération des traceurs étaient directement liées à l'action des agents physico-chimiques naturels ou anthropiques. Les deux voies de dégradations précédemment déterminées ont été reproduites en laboratoire, à savoir :

- une dégradation rapide et intense au chlore gazeux, simulant le traitement de chloration subi par l'eau avant distribution ;
- une dégradation lente sous les effets conjugués de la lumière solaire, du rayonnement ultraviolet et de l'oxygène de l'air, afin de recréer les conditions prévalant dans un cours d'eau.

Dans le premier cas, un volume de 1 l de chaque solution de traceur à 1 g/l a été soumis à un barbotage de chlore gazeux pendant quelques minutes puis le mélange liquide-gaz a été laissé en contact pendant ½ heure à la température d'environ 20°C.

Traceur	Type	Coefficient de Siline-Bektchourine (kg/km)
Fluorescéine (uranine)	Fluorescent coloré	1
Sulforhodamine B	Fluorescent coloré	1
Tinopal	Fluorescent incolore	2
Naphthionate	Fluorescent incolore	2,5
Bromure de potassium	Ionique	5
Bromure de sodium	Ionique	6
Iodure de sodium	Ionique	9
Iodure de potassium	Ionique	10
Chlorure de lithium	Ionique	24
Chlorure de zinc	Ionique	122
Chlorure de sodium	Ionique	~30 000

Tableau 2: Proposition de dosage des traceurs selon leur nature [d'après Gombert et al., 2010].  
*Proposition of tracer dose in function of their nature.*

Paramètre	Test sur les daphnies	Test sur les algues
Organismes testés	Daphnia magna Straus 1820 (Cladocera crustacea)	Pseudokirchneriella subcapitata (ordre des Chlorococcales)
Température	18 ± 1°C	22 ± 1°C
Eclairage	Obscurité	Illumination continue (lumière blanche, intensité 5760 - 7010 lux)
Norme	NF EN ISO 6341, mai 1996	NF EN ISO 8692, mai 2005
Durée d'exposition	48 heures	72 heures
Dilutions testées	Pour tous les traceurs : 9,54 % - 15,3 % - 24,4 %   39,1 % - 62,5 % - 100 %	Pour la fluorescéine et le tinopal : 1,90 % - 4,20 % - 9,30 %   20,4 % - 44,9 % - 98,7 %. Pour le naphthionate : 0,19 %   0,43 % - 0,94 % - 2,07 % - 4,55 % - 10,0 %
pH	7,8 ± 0,2	8,1 ± 0,2
Concentration initiale	20 daphnies réparties en 4 groupes de 5 animaux pour chaque solution d'essai (soit 1 daphnie / 2 mL)	10 000 cellules / mL
Agitation	Néant	Agitation constante (125 rpm).

Tableau 3: Conditions des essais écotoxicologiques *Conditions of ecotoxicological tests.*

Dans le second cas, un volume de 2,5 l des mêmes solutions de traceur a été versé dans un bac plat, formant une lame de liquide de 3 cm environ, puis soumis pendant 24 heures (à la même température) aux agents suivants :

- une aération par agitation permanente à l'aide de quatre barreaux magnétiques tournant à petite vitesse ;
- un fort éclairage<sup>1</sup> (20 000 lux) de lumière blanche à 4 000 K au moyen d'une lampe de luminothérapie accompagnée d'une lampe UV de 400 W.

## B. Essais toxicologiques et écotoxicologiques

La toxicité aiguë des traceurs dégradés au chlore a été étudiée par administration à des rats, par voie orale, à la concentration de 10 mg/kg en une seule dose. Les animaux ont été observés pendant 14 jours au cours desquels le suivi pondéral, les signes cliniques et la mortalité ont été enregistrés quotidiennement. Ils ont ensuite été sacrifiés et une autopsie complète a été réalisée par examen macroscopique détaillé.

L'écotoxicité des traceurs dégradés a été étudiée sur deux organismes aquatiques classiquement utilisés en écotoxicologie pour évaluer la toxicité potentielle de substances : les daphnies<sup>2</sup> (*Daphnia magna*) et les algues vertes unicellulaires (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Ces organismes ont été mis en contact avec plusieurs dilutions de chaque solution de traceur dégradé,

après décantation et (pour les algues vertes) filtration : le premier essai repose sur la mesure de mobilité de daphnies alors que le second vise à déterminer l'inhibition de la croissance des algues vertes (tableau 3).

Les résultats obtenus permettent de calculer des valeurs de CE50, c'est-à-dire la concentration d'essai (exprimée en pourcentage de la solution initiale) entraînant un effet sur la moitié de la population testée.

## C. Méthodes analytiques

Les solutions de traceurs dégradés ont été analysées sur une chaîne de chromatographie liquide haute performance (HPLC) de marque DIONEX modèle U3000. La séparation des composés a été réalisée à l'aide d'une colonne C8 (longueur 250 mm, granulométrie 5 µm) avec un gradient d'élu-tion et un débit de 1 ml/min (eau + acétonitrile). Le volume d'échantillon injecté est de 20 µl. Ce qui caractérise un produit donné, par cette méthode, est son temps d'arrivée au détecteur (mesuré en minutes). Les composés ont été détectés à l'aide de deux détecteurs montés en série : un fluorimètre et une barrette de diodes. Les longueurs d'onde utilisées pour la détection fluorimétrique des métabolites correspondent aux longueurs d'ondes pour lesquelles le signal des traceurs est optimal, à savoir (excitation/émission) : 455/510 nm pour la fluorescéine, 420/454 nm pour le

naphthionate, 350/429 nm pour le tinopal. De ce fait, seuls les traceurs – ou des composés dont la formule chimique ou les propriétés d'excitation et d'émission sont proches – ont pu être détectés à ces longueurs d'onde. En ce qui concerne la détection par barrettes de diodes, les gammes de longueurs d'onde utilisées sont plus larges : 210 à 520 nm pour la fluorescéine, 215 à 330 nm pour le naphthionate et 210 à 350 nm pour le tinopal. Les échantillons dégradés par le chlore (du fait d'une dégradation supposée plus forte) ont ensuite été isolés dans l'éluat issu de la colonne de chromatographie afin de pouvoir être analysés en spectrométrie de masse (technique LC-MS), dans le but d'identifier les composés de dégradation à partir de leur masse molaire.

## III. Dégradation des traceurs

On signalera tout d'abord que très peu d'études font état de la dégradation des traceurs, de la nature des métabolites obtenus et de leurs effets toxicologiques et écotoxicologiques.

### A. Synthèse bibliographique

#### 1) Dégradation par le chlore

Il est connu depuis longtemps que la coloration verte caractéristique de la fluorescéine est détruite par les agents oxydants forts comme le dioxyde de chlore, le chlore, l'hypochlorite de

1. Le soleil au zénith émet une lumière dont la température de couleur est d'environ 5 800 K avec une intensité moyenne de 50 000 lux. Selon les saisons et la météo, l'intensité lumineuse peut varier de 10 000 à 100 000 lux. La lampe utilisée ici possède un filtre UV, d'où la nécessité d'ajouter une lampe UV.

2. Petits crustacés d'eau douce, d'une taille moyenne de 2 mm.

