

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.

sodium (eau de Javel) ou l'ozone. Une seule donnée bibliographique sur la sensibilité des traceurs aux procédés de purification de l'eau est cependant disponible [Käss 1998] : elle mentionne qu'une solution à 10 µg/l de fluorescéine est décolorée en moins de 2 minutes par une solution à 1 mg/l de Cl<sub>2</sub> et en 22 minutes par une solution de ClO<sub>2</sub> à la même concentration. Cet auteur signale également que la rhodamine B est incompatible avec les bases fortes et les oxydants forts, sans toutefois en préciser la raison. Il n'a pas été trouvé de données sur les autres traceurs fluorescents susceptibles d'être employés.

## 2. Dégradation par l'air et la lumière

La sensibilité des traceurs à la lumière dépend de leur nature. Käss [1998] mentionne que le naphthionate, les rhodamines (B, Wt, 6G) ou la sulforhodamine B ne sont pas sensibles à la lumière tandis que la sulforhodamine G l'est un peu. Par contre, il signale que la fluorescence d'une solution de fluorescéine à 1 µg/l est détruite en moins d'une semaine d'exposition à la lumière.

En ce qui concerne spécifiquement le tinopal, utilisé par l'industrie comme agent de blanchiment fluorescent, c'est un produit réputé stable à la lumière par Käss [1998] alors que Richner & Kaschig [1999] montrent qu'il a justement été conçu pour pouvoir se dégrader naturellement. En effet, la photo-dégradation du tinopal fait exception au sein de la famille chimique des dérivés du 4,4'-distyrylbiphényl (DSBP) à laquelle il appartient. Soumis au rayonnement solaire, le tinopal donne en quelques minutes (figure 1) :

- tout d'abord deux sous-produits intermédiaires, nommés 1a et 1b ;
- ensuite les sous-produits finaux 1a et 1c, obtenus par photo-dégradation du sous-produit 1b.

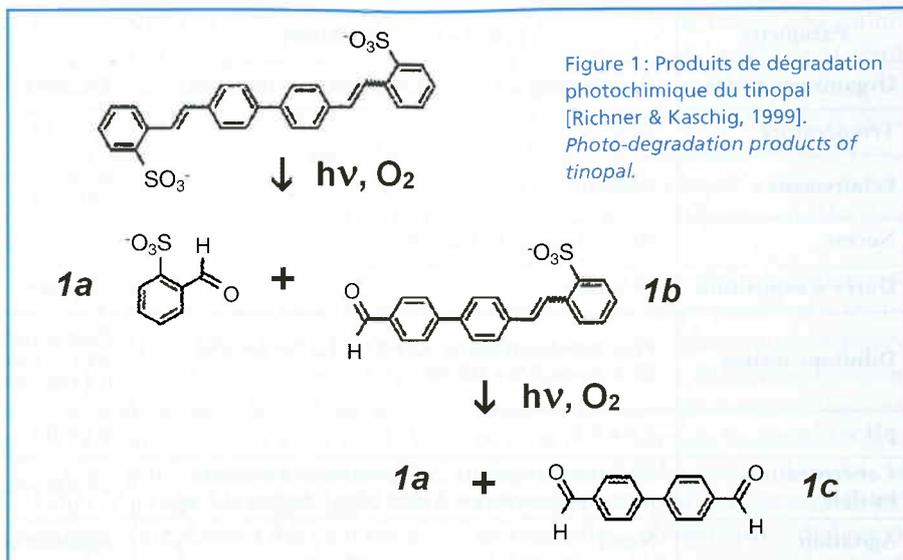


Figure 1: Produits de dégradation photochimique du tinopal [Richner & Kaschig, 1999].  
Photo-degradation products of tinopal.

Au final, on obtient un mélange de sous-produits 1a et 1c qui pourront être détruits par biodégradation naturelle : sur la base de tests respirométriques normalisés, cette biodégradabilité est supérieure à 80 % en 10 jours et supérieure à 90 % en 28 jours.

## B. Résultats expérimentaux de dégradation de traceurs

### 1) Effet sur la coloration des solutions de traceurs

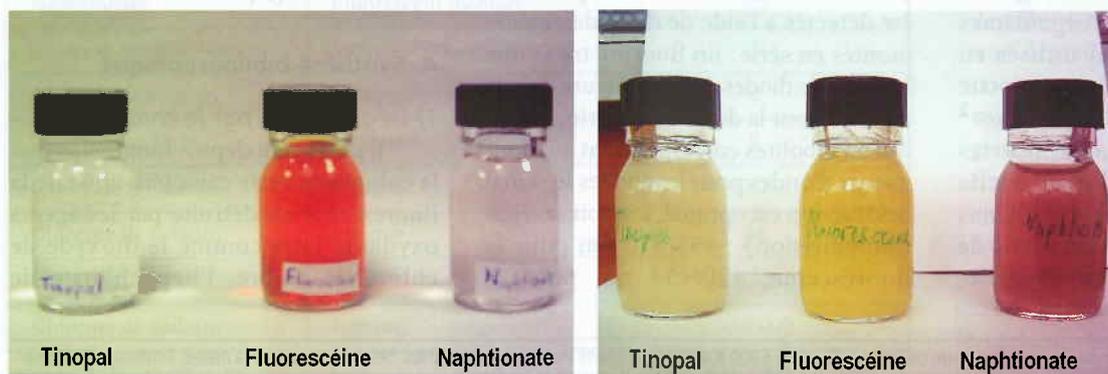
L'expérience de chloration des traceurs s'est tout d'abord soldée par un effet sur la coloration des solutions de traceurs fluorescents (photo 2) :

- la solution de fluorescéine, initialement limpide et orangée (du fait de sa forte concentration), est devenue jaunâtre ;
- la solution de tinopal, initialement incolore et limpide, est devenue turbide et blanc jaunâtre ;
- la solution de naphthionate, limpide mais très légèrement rosée, est devenue légèrement turbide mais fortement rosée.

### 2) Analyse par HPLC des solutions de traceurs dégradés

En détection HPLC, la fluorescéine possède un temps de rétention de 13,5 minutes (figure 2). Alors qu'aucune différence significative ne se marque avec la solution dégradée à l'air et à la lumière, ce traceur disparaît complètement en détection fluorimétrique dans la solution dégradée au chlore : il apparaît à la place une dizaine de composés fluorescents dont le plus important possède un temps de rétention d'environ 7 minutes. Trois fractions d'éluat contenant les principaux pics majoritaires détectés en fluorescence ont été collectées et analysées en LC-MS afin d'essayer d'identifier les composés générés par la dégradation au chlore mais il n'a pas été possible d'isoler leur spectre de masse, probablement du fait d'une trop faible concentration.

En ce qui concerne le naphthionate (temps de rétention de 5 minutes), on observe une diminution de l'ordre de 20 % de la concentration initiale avec apparition d'un composé de dégradation dont le temps de rétention est de



Photos 2 : Echantillons de traceurs fluorescents avant et après dégradation au chlore. Clichés P. Gombert.  
Samples of fluorescent tracers before and after chlorine degradation

a) Traceurs non dégradés

b) Traceurs dégradés

13 minutes (figure 3). Ce composé apparaît à la fois dans l'expérience de dégradation au chlore et dans celle de dégradation à l'air et à la lumière. La fraction d'éluat correspondant à ce dernier pic a été collectée et analysée en LC-MS mais il n'a pas été possible d'isoler le spectre de masse de ce composé, probablement du fait d'une trop faible concentration.

Le tinopal possède un temps de rétention d'environ 7,5 minutes (figure 4). Dans les solutions résultant des expériences de dégradation, on constate sa disparition complète avec l'apparition de plusieurs produits de dégradation dont les temps de rétention sont compris entre 6,5 et 7 minutes. La fraction d'éluat contenant ces pics a été collectée et analysée en LC-MS afin d'essayer d'identifier les composés de dégradation générés: il a été détecté un ion de masse molaire 185 g correspondant à celle du sel d'acide de benzaldéhyde-2-sulpho mentionné par Richner & Kaschig [1999] comme produit de dégradation du tinopal.

#### IV. Toxicité et écotoxicité des traceurs

##### A. Toxicité

La connaissance des effets sur la santé humaine des traceurs fluorescents utilisés en hydrologie est très limitée. Peu de travaux toxicologiques ont porté sur ces produits. Aucun problème de santé chez l'Homme lié à leur utilisation comme traceur n'est par ailleurs rapporté dans la littérature.

Il n'existe aucune information concernant ces molécules dans les bases de données toxicologiques internationales (ATSDR, EPA, RIVM, Health Canada, NSF Intl, TERA). Sur le site de l'IARC des informations ne sont disponibles que pour la rhodamine B et l'éosine.

Des informations toxicologiques figurent par contre dans certaines publications et dans les bases concernant la santé au travail ainsi que dans certaines fiches accompagnant les produits industriels.

Les informations disponibles sont présentées ci-après.

##### 1) Fluorescéine

La fluorescéine est le traceur le plus étudié. Yankell et Loux [1977] ont montré qu'après une administration par voie orale de 3 000 et 4 200 mg/kg de fluorescéine à des souris, elles ne présentaient pas d'effets observables liés au produit. Les animaux montraient en revanche une décroissance de l'activité motrice spontanée et une ataxie à partir d'une concentration de 5 880 mg/kg.

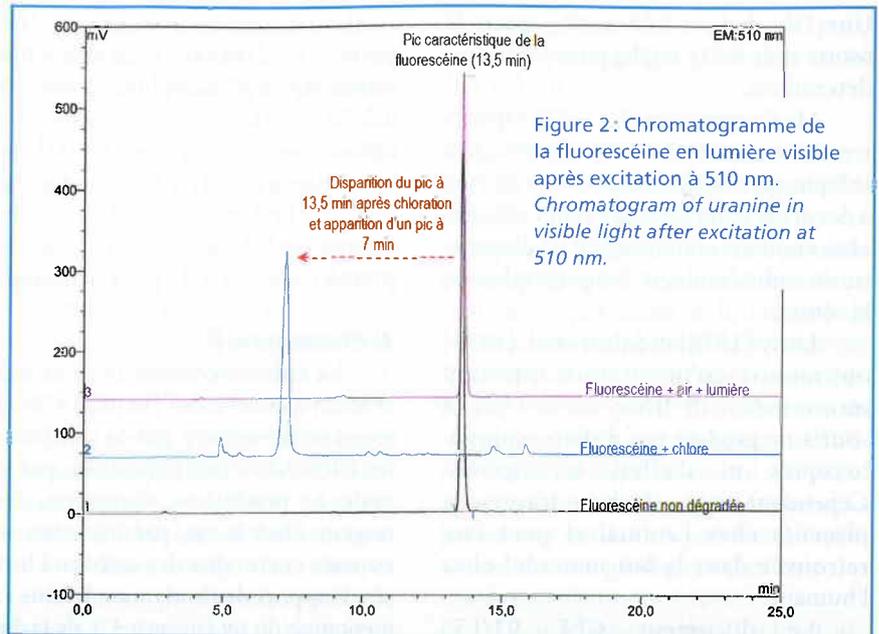


Figure 2: Chromatogramme de la fluorescéine en lumière visible après excitation à 510 nm.  
Chromatogram of uranine in visible light after excitation at 510 nm.

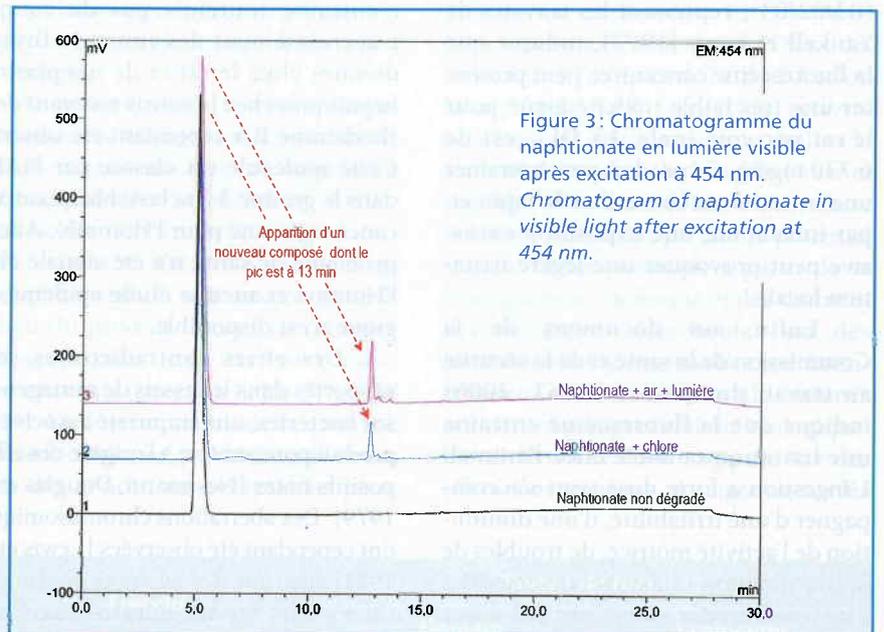


Figure 3: Chromatogramme du naphthionate en lumière visible après excitation à 454 nm.  
Chromatogram of naphthionate in visible light after excitation at 454 nm.

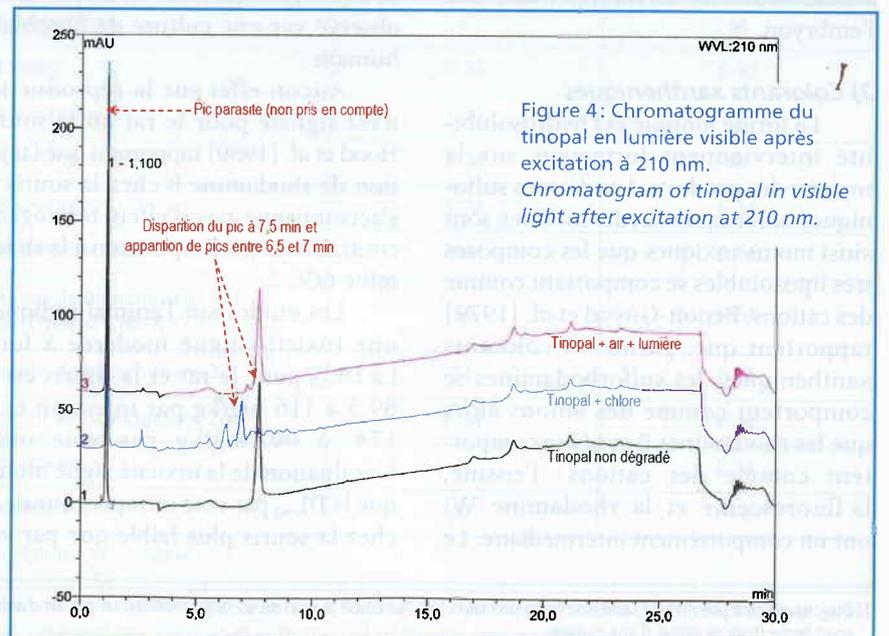


Figure 4: Chromatogramme du tinopal en lumière visible après excitation à 210 nm.  
Chromatogram of tinopal in visible light after excitation at 210 nm.

Une DL<sub>50</sub><sup>1</sup> de 4 738 mg/kg pour la souris et de 6 721 mg/kg pour le rat a été déterminée.

Mc Eneyrney et al. [1977] rapportent l'absence d'effets tératogènes chez le lapin après l'injection de fluorescéine à des doses comparables à celles utilisées chez l'homme comme agent de diagnostic en ophtalmologie (angiographie de la rétine).

Lutty [1978] et Salem et al. [1979] ont montré qu'une unique injection intraveineuse de fluorescéine chez la souris ne produit pas d'effets embryotoxiques ni d'effets tératogènes. Cependant cette substance traverse le placenta chez l'animal et peut être retrouvée dans le lait maternel chez l'humain.

Le document CEE 91/155 (03/02/03), reprenant les travaux de Yankell et Loux [1977], indique que la fluorescéine concentrée peut présenter une très faible toxicité aiguë pour le rat par voie orale. La DL<sub>50</sub> est de 6 720 mg/kg. Ce produit peut entraîner une irritation oculaire chez le lapin et, par inhalation, une exposition excessive peut provoquer une légère irritation locale.

Enfin, un document de la Commission de la santé et de la sécurité au travail du Québec [CSST, 2006] indique que la fluorescéine entraîne une irritation cutanée chez l'animal. L'ingestion à forte dose peut s'accompagner d'une irritabilité, d'une diminution de l'activité motrice, de troubles de la coordination (ataxie) et de diarrhée. Plusieurs études suggèrent l'absence d'effet sur le développement de l'embryon.

## 2) Colorants xanthéniques

La forme ionique et l'hydrosolubilité interviennent fortement sur la toxicité des produits. Les dérivés sulfoniques anioniques, hydrosolubles sont ainsi moins toxiques que les composés très liposolubles se comportant comme des cations. Benoit-Guyod et al. [1979] rapportent que, parmi les colorants xanthéniques, les sulforhodamines se comportent comme des anions alors que les rhodamines B et 6G se comportent comme des cations: l'éosine, la fluorescéine et la rhodamine Wt ont un comportement intermédiaire. Le

coefficient de partage octanol-eau (Kow) permet de distinguer les sulforhodamines très hydrosolubles (Kow 9,5 et 6,2 10<sup>-3</sup>), des rhodamines 6G et B très liposolubles (Kow 5,1 et 1,9 10<sup>-2</sup>) et des molécules à caractère intermédiaire que sont la rhodamine Wt, l'éosine et la fluorescéine (Kow 4,7 10<sup>-2</sup> pour les deux premières et 4,1 10<sup>-2</sup> pour la dernière).

## 3) Rhodamine B

La cancérogénicité chez la souris et le rat a été étudiée [IARC 1978]. Les essais ne permettent pas de conclure sur les effets liés à une exposition par voie orale. Le produit est néanmoins carcinogène chez le rat, par injection sous cutanée et entraîne des sarcomes localisés. L'apport de rhodamine B dans l'alimentation du rat (jusqu'à 4 % de la diète) n'entraîne toutefois pas de cancer. L'accroissement des tumeurs thyroïdiennes chez le rat et de néoplasmes hépatiques chez la souris recevant de la rhodamine B a cependant été observé. Cette molécule est classée par l'IARC dans le groupe 3 (inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'Homme). Aucun problème de santé n'a été signalé chez l'Homme et aucune étude épidémiologique n'est disponible.

Des effets contradictoires sont rapportés dans les essais de mutagenèse sur bactéries, une impureté associée au produit pouvant être à l'origine des effets positifs notés [Nestmann, Douglas et al. 1979]. Des aberrations chromosomiques ont cependant été observées [Lewis et al. 1981] ainsi que des échanges de chromatides sœurs sur des cultures de cellules de hamster. Aucun effet n'est par contre observé sur une culture de fibroblaste humain.

Aucun effet sur la reproduction n'est signalé pour le rat ou la souris. Hood et al. [1989] rapportent que l'injection de rhodamine B chez la souris ne s'accompagne pas d'effets tératogènes contrairement à l'exposition à la rhodamine 6G.

Les études sur l'animal indiquent une toxicité aiguë modérée à forte. La DL<sub>50</sub> pour le rat et la souris est de 89,5 à 116 mg/kg par injection et de 174 à 997 mg/kg par voie orale. L'évaluation de la toxicité aiguë montre que la DL<sub>50</sub> par voie intrapéritonéale est chez la souris plus faible que par voie

orale mais légèrement supérieure chez le rat.

Par contre, en présence de nitrites, la rhodamine B peut donner des composés N-nitrosés comme la diéthyl-nitrosamine (DNA) extrêmement cancérigène [Abidi, 1982]. La formation de ce composé n'est toutefois possible que dans les eaux superficielles car les nitrites, forme instable de l'azote, ne sont présents dans les nappes que dans des conditions particulières et seulement à de très faibles teneurs.

## 4) Rhodamine Wt

Nestmann et Kowbel [1979] rapportent que la rhodamine Wt produit des mutations pour le test d'Ames avec ou sans activité métabolique, ce qui est confirmé par d'autres auteurs. Aucune atteinte chromosomique ou spermatique n'est observée chez la souris par injection intrapéritonéale. La rhodamine Wt est un irritant de la peau et de l'œil.

Jensen et Kristensen [1989] signalent l'absence d'effet de la rhodamine Wt jusqu'à 100 mg/l sur la charge en E Coli. Cependant Foxworthy et Kneeling, cités par ces auteurs, avaient montré l'absence d'effets de la Rhodamine B seulement pour des teneurs inférieures à 4 mg/l.

Les tests de mutagenèse effectués sur des cellules d'ovaire de hamster chinois (cellule CHO) montrent un échange de chromatides sœurs à des concentrations de 6 mmol/l et des dommages à l'ADN à 80 mmol/l.

Pour la rhodamine Wt, le CDC/NIOSH [2006] signale une très faible toxicité aiguë chez la souris avec une DL<sub>50</sub> de 462 mg/kg par voie intrapéritonéale et de 430 mg/kg par voie intraveineuse.

Comme la rhodamine B, la rhodamine WT peut donner des composés N-nitrosés tels que la diéthyl-nitrosamine (DNA). A conditions égales, le rendement dans la production de DNA avec la rhodamine Wt est deux fois supérieur à celui obtenu avec la rhodamine B [Abidi, 1982].

Une unique donnée écotoxicologique [Benoit-Guyod et al., 1979] signale que pour les daphnies et les guppies, la rhodamine Wt apparaît moins toxique que la rhodamine B mais aussi que l'éosine et la fluorescéine.

1. DL<sub>50</sub>: quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % (la moitié) d'un groupe d'animaux d'essai. La DL<sub>50</sub> est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière.

## 5) Sulforhodamines

La faible toxicité par intraveineuse des sulforhodamines a été démontrée par Luty [1978]. La DL<sub>50</sub> par voie orale pour le rat de la sulforhodamine B est supérieure à 1000 mg/kg [Smart, 1984].

## 6) Stilbènes (Tinopal)

Des études portant sur le Tinopal RBS, AMS, 5BM et CBS ont été conduites par Keplinger et al. [1974]. Au regard de la toxicité aiguë ou subchronique par voie orale, de l'irritation oculaire, de l'inhalation de poussières, de la toxicité aiguë pour le poisson (tableau 2), de la mutagénicité et de tests par patch sur l'homme, ces produits apparaissent peu toxiques, non mutagènes et non tératogènes.

## 7) Éosine

Aucun cas d'intoxication humaine n'a été documentée et aucune donnée épidémiologique n'est disponible. Ce produit est classé dans le groupe 3 de l'IARC [1977] correspondant aux produits inclassables quant à leur cancérogénicité pour l'homme. L'éosine a été testée seulement chez le rat par voie orale ou par injection sous cutanée. Les résultats ne permettent pas une évaluation de la cancérogénicité de ce produit.

Brown et al. [1979] n'ont pas signalé d'effet mutagène pour cette substance avec le test d'Ames.

L'ingestion d'une solution aqueuse d'éosine par des enfants ou par des personnes démentes est fréquente et sans risque. Il suffit de rincer la bouche et de donner un peu d'eau à boire. Une éventuelle coloration rouge des urines peut se produire [CAP, 2012].

## 8) Phloxine B

Une très faible toxicité aiguë par voie orale pour le rat est rapportée dans la fiche de sécurité de la phloxine B (MSDS P3885 08/10/04, J.T. Baker) avec une DL<sub>50</sub> de 8 400 mg/kg. Par ingestion, ce produit pourrait causer des irritations du système gastro-intestinal se manifestant par des nausées, des vomissements et des diarrhées.

Brown et al. [1979] n'ont pas signalé d'effet mutagène pour cette substance avec le test d'Ames. La cancérogénicité de la phloxine n'est pas connue, le produit n'est pas classé par l'IARC.

## B. Caractérisation des risques

La toxicité d'un produit n'est pas le seul critère à considérer pour quantifier un risque pour la santé humaine. En effet le risque est également lié aux conditions d'exposition des personnes au produit.

### 1) Exposition

L'exposition à ces traceurs concerne tout d'abord les manipulateurs. Des précautions de mise en œuvre accompagnent ces produits pulvérulents dont l'exposition se fait essentiellement par voie cutanée (irritation oculaire) et par inhalation : pour cette raison, on privilégiera les traceurs commercialisés sous forme liquide ou l'usage d'un masque de protection anti-poussières et de lunettes de sécurité. En ce qui concerne la population générale, seule l'exposition par voie orale mérite d'être prise en compte.

La mise en œuvre, le suivi et l'interprétation des traçages artificiels dans le milieu souterrain ont été largement décrits [Lepiller et Mondain, 1986 ; Dzikowski, 1995 ; Dzikowski et al., 1995 ; US-EPA 2003]. Le succès d'un traçage dépend de la libération dans le milieu du produit traçant en quantité suffisante mais non excessive pour permettre une détection fiable [US-EPA 1989]. La détermination de la quantité optimale à injecter, permettant de rester dans des conditions acceptables pour

l'environnement et réduisant l'exposition des populations, peut être toute-fois délicate.

### 2) Caractérisation du risque

La quantification du risque n'est possible que lorsque des valeurs toxicologiques de référence sont disponibles pour les agents dangereux. Cependant, il n'existe pas dans la littérature de relations dose-réponse pour les traceurs fluorescents au moins pour une exposition par voie orale. En l'absence de valeurs toxicologiques de référence, l'US-EPA et un groupe de travail allemand ont développé deux approches pour se prononcer sur les risques liés à l'utilisation de ces produits et définir des conditions de mise en œuvre.

L'étude américaine [Field et al., 1995] s'est intéressée à 13 colorants. Leur toxicité a été évaluée par l'Office des Substances Toxiques de l'US-EPA selon la méthode SAR (structure activity relationship) développée pour évaluer la toxicité de produits industriels [Auer et Gould, 1987 ; Auer et al., 1990]. Cette méthode permet de prédire le potentiel toxique d'une molécule à partir de sa configuration chimique et des données toxicologiques disponibles sur des produits analogues, testés expérimentalement, en utilisant des algorithmes prenant en compte l'activité biologique. L'évaluation réalisée s'appuie sur des effets cancérogènes, mutagènes, sur les

Traceur	Niveau de risque *	
	Humain	Ecologique
Fluorescéine	F	M
Eosine	F-M	F-M
Rhodamine B	F-M	M
Rhodamine Wt	F-M	M
Rhodamine G	F-M	F-M
Sulforhodamine B	F-M	F-M
Agent de blanchiment 351 ou Tinopal CBS-X	M	F-M
Agent de blanchiment 22	M	F-M
Agent de blanchiment 28	F-M	F-M
Pyranine	F	F-M
Amino G	M	F-M

\* F : faible ; M : modéré

Tableau 4: Niveaux de risque associés à l'utilisation des traceurs fluorescents [d'après Field et al., 1995]. Levels of risk associated with the use of fluorescent tracers.

données de toxicité aiguë, chronique et de neurotoxicité, sur les altérations du développement et de la reproduction ainsi que sur des effets écotoxiques. Un niveau de risque est attribué à chacun des produits en fonction de la gravité possible des effets. Les résultats de l'étude sont présentés dans le tableau 4.

L'évaluation réalisée par l'US-EPA montre par ailleurs qu'aucun des traceurs fluorescents ne peut présenter de risque significatif pour la santé ou l'environnement si sa concentration est maintenue en dessous du niveau de coloration visible à l'œil nu, soit de 1 à 2 mg/l durant 24 h au point de captage. Toutefois, certains produits colorants

ne présentent pas de risques de toxicité même pour des concentrations plus élevées pour lesquelles la coloration est visible.

Partant des travaux de Smart [1977 et 1984], un groupe de travail initié par l'Agence fédérale pour l'environnement allemande [Arbeitskreis, 1997], dont les résultats sont synthétisés dans Behrens et al. [2001], s'est intéressé à 17 traceurs dont 11 colorants à savoir : la fluorescéine, l'éosine, la sulforhodamine B, l' amino G, la rhodamine Wt, la rhodamine B, la rhodamine 6G, le naphthionate de sodium, la pyranine, le tinopal CBS-X et le tinopal ABP. Ces produits ont fait l'objet d'essai de génotoxicité

(mutations sur Salmonella et analyses des aberrations chromosomiques) et d'écotoxicité (test poisson et test daphnies). Les résultats figurent dans le tableau 5.

Au regard de leurs effets génotoxiques et écotoxiques, l'usage des colorants a été discuté. Les recommandations faites par le groupe pour l'utilisation de ces traceurs sont présentées dans le tableau 6.

## V. Toxicité et écotoxicité des produits de dégradation des traceurs

### A. Toxicité

Aucune des solutions de traceurs dégradés au chlore n'a mis en évidence de toxicité chez le rat. Il n'a été constaté ni décès ni souffrance clinique à partir de solutions concentrées de 0,33 à 1 g/l, administrées à la dose de 10 mg/kg. A l'autopsie, l'examen direct n'a pas montré d'anomalie macroscopique visible sur le tube digestif.

Pour améliorer la sensibilité du test, celui-ci a été réalisé en 2 phases successives renfermant chacune 12 rats divisés en 4 lots : groupe témoin (lot 1), fluorescéine (lot 2), tinopal (lot 3), naphthionate (lot 4). Les courbes moyennes de poids des animaux dans les différents lots sont présentées en figure 5. Le lot 3 de la phase 1 présente un poids moyen légèrement inférieur aux autres groupes et le lot 4 légèrement supérieur : ceci apparaît dès le début de l'étude mais les courbes de poids des groupes traités restent parfaitement parallèles à celles du groupe témoin pour les 2 phases, ne laissant pas préjuger d'effet nocif de l'ingestion des traceurs.

### B. Ecotoxicité

#### 1) Synthèse bibliographique

Sur le plan bibliographique, on ne dispose d'informations que pour le tinopal, étudié par Richner & Kaschig [1999]. On rappelle que ce traceur se dégrade naturellement à la lumière en deux sous-produits, dénommés 1a et 1c (figure 1). Les auteurs mentionnent que le sous-produit 1c est toxique dans le milieu aquatique mais qu'il a une solubilité dans l'eau de quelques mg/l, c'est-à-dire 1 000 à 10 000 fois plus faible que celle du tinopal. D'autre part, il est instable et s'oxyde en moins de 24 h en « 1c-oxyde » appelé acide diphényl-4,4'-

	Génotoxicité		Ecotoxicité	
	Test d'Ames	Analyse cytogénétique	Test poisson	Test Daphnies
Fluorescéine	-	-	-	ne
Eosine	-	-	-	-
Sulforhodamine B	ne	ne	ne	ne
Amino G	-	-	-	-
Rhodamine Wt	-	-	-	-
Rhodamine B	+	+	+	+
Rhodamine 6G	-	+	-	+
Naphtionate de sodium	+	+	+	+
Pyranine	-	-	-	-
Tinopal CBS-X	-	-	-	-
Tinopal ABP	-	-	-	-

ne : non étudié ; + : mise en évidence d'un effet ; - : absence d'effet

Tableau 5 : Effets génotoxiques et écotoxiques des traceurs fluorescents [d'après Arbeitskreis, 1997].  
Genotoxic and ecotoxic effects of fluorescent tracers.

Traceur	Utilisation/évaluation toxicologique	Fondements de l'évaluation*
Fluorescéine	sans limite	T, B
Eosine	sans limite	B, Ex
Sulforhodamine B	douteuse/écotoxicologie	T
Amino G	sans limite	T
Rhodamine Wt	non conseillée	T
Rhodamine B	non conseillée	T, B
Rhodamine 6G	non conseillée	T, B
Naphthionate de sodium	sans limite	T
Pyranine	sans limite	T
Tinopal CBS-X	sans limite	T
Tinopal ABP	sans limite	T

\* T : tests toxicologiques ; B : données bibliographiques ; Ex : avis des experts

Tableau 6 : Préconisations pour l'utilisation des traceurs fluorescents [d'après Arbeitskreis, 1997].  
Recommendations for the use of fluorescent tracers.

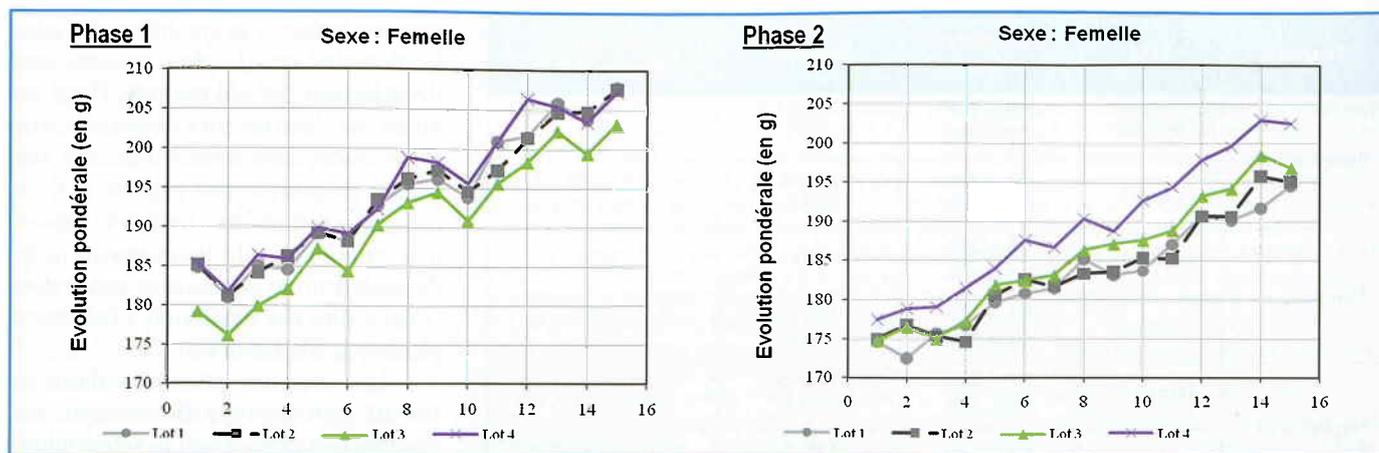


Figure 5: Courbes moyennes de poids des rats testés [Gombert et al., 2010]. Average weight of tested rats. Lot 1 = groupe témoin, lot 2 = fluorescéine, lot 3 = tinopal, lot 4 = naphthionate ; abscisses = temps (jours). Lot 1 = control subjects, lot 2 = fluoresceine, lot 3 = tinopal, lot 4 = naphthionate ; on the abscissa = time (days).

dicarboxylique, métabolite peu toxique et très soluble. Le tableau 7 compare l'écotoxicité du produit de départ (tinopal ou DSPB) et de ses sous-produits finaux.

## 2) Toxicité sur les daphnies

Les tests réalisés avec la fluorescéine et le tinopal, n'ont pas permis de déterminer les  $CE_{50}$  à 24 h et 48 h car le pourcentage d'inhibition n'a pas excédé 40 % à la plus forte concentration testée. Par contre, ces concentrations ont pu être calculées pour le naphthionate par régression logistique. Toutefois, ne connaissant pas la nature du (ou des) sous-produit(s) de dégradation ni sa (leur) concentration, on ne peut pas proposer de  $CE_{50}$  en termes de concentration. Les valeurs ont donc été exprimées en taux de dilution de la solution initiale dégradée (tableau 8) : la  $CE_{50}$  24h se produit ainsi à 79,0 % de dilution et la  $CE_{50}$ -48h à 56,4 %.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude mettent donc en évidence une toxicité modérée de la fluorescéine et du tinopal et une toxicité plus forte du naphthionate mais à chaque fois à des concentrations initiales très élevées, de l'ordre de 600 à 800 mg/l de traceur non dégradé. Ces résultats doivent également être pris avec précaution du fait des incertitudes analytiques : la dégradation des solutions de traceurs a en effet induit une turbidité qui a nécessité, pour le tinopal, une phase de décantation préalablement à l'essai daphnies, ce qui conduit à des concentrations d'exposition inférieures aux concentrations nominales.

Cependant, les résultats obtenus pour les trois traceurs testés peuvent

Produit (les valeurs sont données en mg/l)	Tinopal	1a	1c	1c-oxyde
Toxicité aiguë sur les poissons ( $CL_{50}$ )	76	>100	~1	>100
Toxicité aiguë sur les daphnies ( $CE_{50}$ )	>1000	>100	1-10	>100
Toxicité aiguë sur les algues ( $CE_{50}$ )	8,0	>100	>100	>100
Toxicité prolongée sur les poissons (NOEC)	1,0	-	-	-
Toxicité chronique sur les daphnies (NOEC)	7,5	-	-	-
Toxicité chronique sur les algues (NOEC)	3,1	100	-	-
Toxicité des boues ( $IC_0$ )	>300	>100	-	>100
Facteur d'évaluation (FA)	50	10000	100	1000
Predicted No Effect Concentration (PNEC)	0,06	>100	0,01	>100

Tableau 7: Ecotoxicologie du tinopal et de ses sous-produits finaux de photo-dégradation [d'après Richner & Kaschig, 1999]. Ecotoxicology of tinopal (DSPB) and of 1a and 1c final photo-degradations subproducts.

être considérés comme valides du fait que les conditions suivantes ont été simultanément satisfaites :

- les teneurs en oxygène dissous mesurées à la fin des essais, après 48 h, sont supérieures à 2 mg/l pour les substances testées ;
- le pourcentage de daphnies immobilisées, en 48 h, dans les tubes témoins est nul et donc < 10% ;
- les  $CE_{50}$ -24h du dichromate de potassium sont de 1,09 et 1,24 mg/l et sont donc comprises dans l'intervalle préconisé par la norme (0,6 – 2,1 mg/l).

## 3) Toxicité sur les algues

Les résultats obtenus mettent en évidence une toxicité modérée de la fluorescéine et du tinopal alors que des effets inhibiteurs importants ont été

observés pour le naphthionate (tableau 8) :  $CE_{10}$  de 1,1 % et  $CE_{50}$  de 4,0 %, correspondant à des doses élevées, de l'ordre de 11 à 40 mg/l de traceur (avant dégradation). Ces résultats doivent toutefois être pris avec précaution du fait, d'une part des incertitudes en termes analytiques et, d'autre part, de l'absence de vérification d'un effet couleur sur la croissance des algues dans le cas du naphthionate. Comme précédemment, la solution dégradée de tinopal a dû être décantée pour des problèmes de turbidité, ce qui a conduit à des concentrations d'exposition inférieures aux concentrations nominales.

Par ailleurs, les résultats obtenus pour les trois traceurs testés peuvent être considérés comme valides car les

Traceur	Test	Paramètre mesuré	Résultat	Intervalle de confiance à 95 %
Fluorescéine	Daphnies	CE <sub>50</sub> .24h CE <sub>50</sub> .48h	ND	ND
	Algues	CE <sub>10</sub> .72h CE <sub>50</sub> .72h	21,5 % 77,8 %	14,6 % – 29,5 % 67,9 % – 90,2 %
Tinopal	Daphnies	CE <sub>50</sub> .24h CE <sub>50</sub> .48h	ND	ND
	Algues	CE <sub>10</sub> .72h CE <sub>50</sub> .72h	70,9 % ND	53,4 % – 88,5 % ND
Naphthionate	Daphnies	CE <sub>50</sub> .24h CE <sub>50</sub> .48h	79,0 % 56,4 %	72,3 % – 84,3 % 52,1 % – 60,3 %
	Algues	CE <sub>10</sub> .72h CE <sub>50</sub> .72h	1,06 % 4,04 %	0,87 % – 1,26 % 3,76 % – 4,34 %

ND = Non déterminable (CE > 100 % c'est-à-dire >1 g/l de solution initiale dégradée)

Tableau 8 : Résultat des tests d'écotoxicité réalisés sur les traceurs dégradés à l'air et à la lumière (exprimés en pourcentage de dilution de la solution initiale dégradée de traceur à 1 g/l) [Gombert et al. 2010]. Results of ecotoxicity tests realized on tracers solutions degraded by air and light (expressed in percent of dilution of the initial degraded tracer solution at 1 g/l).

conditions suivantes sont simultanément satisfaites :

- le taux de croissance moyen des cultures témoins est compris entre 1,647 et 1,721 et est donc supérieur à 1,4/jour ;
- le coefficient de variation du taux de croissance des cultures témoins est compris entre 2,5<sup>e</sup> et 3,9 % et n'a donc pas dépassé 5 % ;
- le pH des solutions témoins n'a pas augmenté de plus de 1,5 unité pendant l'essai par rapport au pH du milieu de croissance.

Dans le tableau 8, les CE sont exprimées en pourcentage de la solution d'essai. On constate que le tinopal et la fluorescéine ne présentent pas d'écotoxicité – ou alors à de très fortes concentrations – alors qu'il suffit de quelques % de la solution de naphthionate pour observer un impact.

## Conclusion

Un traçage consiste à introduire dans le milieu souterrain un produit qui ne s'y trouvait préalablement pas, ou alors à une concentration faible, afin de mettre en évidence des liaisons hydrauliques entre une zone d'infiltration des eaux et une zone de restitution (généralement une source ou un forage). Les traceurs ainsi injectés n'ont pas toujours un comportement prévisible : tantôt ils sortent rapidement et massivement à certains points d'eau (parfois captés pour l'AEP), tantôt ils ne réapparaissent pas aux points de restitution attendus au

cours de la durée du suivi et à des concentrations mesurables.

Ces traceurs peuvent présenter une toxicité pour le consommateur d'eau ou pour l'environnement (écotoxicité). Dans le premier cas, la voie d'exposition est l'ingestion de traceur ou de produit de dégradation issu de son

passage à travers le système de potabilisation de l'eau (le plus souvent, une désinfection par chloration). Dans un autre cas, les traceurs peuvent sortir directement dans le milieu naturel, par le biais de sources non captées, et il est intéressant d'étudier leur écotoxicité directe ou celle de leurs produits de dégradation en conditions naturelles (c'est-à-dire par oxydation à l'air et/ou photolyse à la lumière).

Les traceurs présentés dans ce travail sont de type fluorescent, les traceurs ioniques n'ayant pas été étudiés. L'innocuité de trois des traceurs les plus utilisés (fluorescéine, naphthionate et tinopal) et de leurs produits de dégradation naturelle et artificielle a été vérifiée. Les conditions de dégradation artificielle (par le chlore) et naturelle (par le rayonnement solaire et l'air) ont été reproduites au laboratoire.

La chloration est un processus brutal violent qui détruit des traceurs comme la fluorescéine ou le tinopal, créant des sous-produits de dégradation repérables en chromatographie liquide. Ces sous-produits apparaissent également avec le naphthionate bien que ce traceur n'ait pas été significativement

## Glossaire

<b>AEP</b>	Alimentation en Eau Potable
<b>ATSDR</b>	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
<b>BRGM</b>	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentration d'Essai entraînant un effet sur 50 % de la population testée
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentration Létale pour 50 % de la population testée
<b>DENA</b>	Diéthylnitrosamine
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Létale pour 50 % de la population testée
<b>ESEHP</b>	Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique
<b>Health Canada</b>	Santé Canada
<b>NSF</b>	National sanitation Foundation
<b>ITER, TERA</b>	International Toxicity Estimates for Risk Database Base de données internationale pour l'estimation des risques
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide haute performance)
<b>IARC/CIRC</b>	International Agency for Research on Cancer/centre international de recherche sur le cancer
<b>LC-MS</b>	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
<b>IC<sub>0</sub></b>	Concentration sans effet inhibiteur
<b>INERIS</b>	Institut National de l'Environnement technologique et des RISques
<b>ITER, TERA</b>	International Toxicity Estimates for Risk Database
<b>NOEC</b>	No Observed Effect Concentration (Concentration sans effet observé)
<b>NSF</b>	National sanitation Foundation
<b>PNEC</b>	Predictive No Effect Concentration (Concentration sans effet prévisible)
<b>RIVM</b>	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
<b>US EPA,</b>	United States Environmental Protection Agency
<b>UV</b>	Ultra-Violet

dégradé par le chlore. Du fait de la forte dilution inhérente à la technique de détection, il n'a malheureusement pas été possible de caractériser les produits de dégradation obtenus sauf pour le tinopal : dans ce cas, il est intéressant de noter que l'un des produits de dégradation naturelle obtenus par Richner et Kaschig [1999] est probablement le même que celui que nous avons mis en évidence par LC-MS suite à la dégradation par le chlore. Il en va apparemment de même pour le naphthionate dont le chromatogramme met en évidence des métabolites de même temps de rétention – qui sont donc probablement les mêmes – lors de la dégradation par le chlore ou par l'air et la lumière. Cela signifie que, pour les longues molécules carbonées que sont les traceurs fluorescents, les liaisons chimiques sensibles à la dégradation pourraient être les mêmes quel que soit l'agent impliqué (oxydant puissant ou conditions naturelles), ce qui conduirait à la production des mêmes métabolites.

La toxicité et l'écotoxicité de ces produits de dégradation ont ensuite été testées sur la base de solutions de traceurs préparées à 1 g/l, c'est-à-dire à une concentration intermédiaire entre celles utilisées lors de l'injection et celles observées lors de la restitution. Aucun signe de toxicité n'a été mis en évidence sur le rat et seul le naphthionate présente une certaine écotoxicité mais à une concentration supérieure de deux ordres de grandeur au maximum observé lors des restitutions de traçage.

En conclusion, les trois traceurs fluorescents testés paraissent sans effets pour l'Homme et l'environnement aux concentrations mesurées lors des restitutions de traçage.

### Remerciements

Nous remercions la DREAL (Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement) de Haute-Normandie pour le financement de l'étude sur la dégradation des principaux traceurs fluorescents employés dans le karst de la craie dont cet article présente les principaux résultats.

### Bibliographie

- ABIDI SL., 1982** - Detection of diethylnitrosamine in nitrite-rich water following treatment with rhodamine flow tracers. *Wat Res* 1982; 16:199-204.
- ARBEITSKREIS 1997** - Arbeitskreis Human- und oekotoxikologische Bewertung von Markierungsmitteln in Gewässern., *Grundwasser* 1997; 2: 61-64.
- AUER CM., GOULD DH., 1987** - Carcinogenicity assessment and the role of structure activity relationship (SAR) analysis under TSCA section 5. *Envir Carcino Revs (J Envir Sci Hlth)* 1987; C5(1): 29-71.
- AUER CM., NABHOLZ JV., BAETCKE KP., 1990** - Mode of action and the assessment of chemical hazards in the presence of limited data: use of the Structure-Activity Relationships (SAR) under TSCA, section 5. *Environ Health Perspect* 1990; 87: 183-197.
- BECHILLON M. de, 2009** - Inventaire régional des bêtouilles traçages et exutoires de Haute Normandie: étude préalable à l'élaboration d'un guide de bonnes pratiques des traçages en contexte crayeux karstique haut normand. Mém. de Master 2, Univ. de Perpignan.
- BENOÎT-GUYOD JL., ROCHAT J., ALARY J., ANDRE C., TAILLANDIER G., 1979** - Corrélations entre propriétés physicochimiques et écotoxicité des traceurs fluorescents xanthéniques. *Tox Eur Res* 1979; II, 5: 241-246.
- BEHRENS H., BEIMS U., DIETER H., 2001** - Toxicological and ecotoxicological assessment of water tracers. *Hydrogeol J* 2001; 9: 321-325.
- BROWN JP., DIETRICH PS., BAKNER CM., 1979** - Mutagenicity testing of some drug and cosmetic dye lakes with the Salmonella/mammalian microsome assay. *Mutat Res/Gen Toxicol* 1979; 66, 2, 181-185.
- CARRÉ J., JOYEUX M., MONTIEL A., 2007** - Risques sanitaires associés aux traceurs fluorescents utilisés en hydrologie. *Environnement, Risques & Santé*, Volume 6, n° 6: 443-452.
- CASTANY G., 2002** - Principes et méthodes d'hydrogéologie. Ed. Dunod, Paris.
- CDC/NIOSH, 2006** - ICSC: 0325, Rhodamine WT, 2p, [www.cdc.gov/niosh/ipcsnfrn0325.html](http://www.cdc.gov/niosh/ipcsnfrn0325.html).
- SITE INTERNET CDC NIOSH** - The registry of toxic effects of chemical substances KH2737000, Rhodamine WT, 3p.
- CAP, 2012** - [http://www.poissoncentre.be/article.php?id\\_article=69](http://www.poissoncentre.be/article.php?id_article=69)
- CSST, 2006** - Fluorescéine sodique. CSST (Québec) Service du répertoire toxicologique, 2006, 3 p.
- DZIKOWSKI M., 1995** - Convolution in time-dependent system from artificial tracer tests responses in porous or karst systems; theory and modelling. *J Hydrol* 1995; 16: 287-303.
- DZIKOWSKI M., DELAY F., SAUTY JP., CRAMPON N., DE MARSILY G., 1995** - Convolution in time dependent system from artificial tracer test responses; application on a karst system (Causse de Gramat Lot, France). *J Hydrol* 1995; 16: 305-324.
- FIELD MS., WILHELM RG., QUINLAN JF., ALEY TJ., 1995** - An assessment of the potential adverse properties of fluorescent tracer dyes used for groundwater tracing. *Environ Monit and Assess* 1995; 38: 175-96.
- FIELD MS., 2003** - Tracer-test planning using the Efficient Hydrologic Tracer-Test Design (EHTD) program. National Center for Environmental Assessment, Washington, EPA/600/R-03/034: 175 p.
- GOMBERT P., 2007** - Proposition de protocole de traçage adapté au karst de la craie. *Europ. Journ. of Water Quality*, 38/1: 61-78.
- GOMBERT P., 2009a** - Synthèse des traçages réalisés dans la craie karstique de Haute-Normandie et proposition de normalisation. *Géologues*, 159: 13-30.
- GOMBERT P, 2009b** - Impact toxicologique et écotoxicologique des traceurs employés dans l'aquifère de la craie en Haute-Normandie et de leurs produits de dégradation. Rapport INERIS DRS-09-106502-14782A, 23/12/2009.
- GOMBERT P., GRANIER D., DE SEZE R., PANDARD P., GONDELLE F., CHARMOLLE A., EL KOULALY F., BENKADA F.Z., TOUSSAINT R., 2010** - Toxicity and ecotoxicity of by-products resulting from degradation of fluorescent tracers used in the karstic chalk of Normandy (France). IV International Symposium on Karst, Málaga (SP), 27-30 april 2010.
- HOOD RD., JONES CL., RANGANATHAN S., 1989** - Comparative developmental toxicity of cationic and neutral rhodamines in mice. *Teratology*. 1989; 40, 2: 143-150.
- IARC, 1977** - Eosine and eosine disodium salt. 1977, 15, p 183.
- IARC 1978** - Rhodamine B. vol 16, (1978), p 221.
- JENSEN M., KRISTENSEN KK., 1989** - Effects of rhodamine water tracer on *Escherichia coli* densities. *Wat Res* 1989; 23, 2: 257-259.
- KÄSS W., 1998** - Tracing technique in Geohydrology. Balkema, Rotterdam, NL.
- KEPLINGER ML., FANCHER OE., LYMAN FL., CALANDRA JC., 1974** - Toxicologic studies of four fluorescent whitening agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974; 27, 3: 494-506.
- LEPILLER M., MONDAIN P., 1986** - Les traçages artificiels en hydrogéologie karstique, mise en œuvre et interprétation. *Hydrogéol* 1986; 1: 33-52.
- LEWIS IL., PATTERSON RM., MCBAY HC., 1981** - The effects of rhodamine B on the chromosomes of *Muntiacus muntjak*. *Mutat Res* 1981; 88, 2: 211-216.
- LUTTY GA., 1978** - The acute intravenous toxicity of biological stains, dyes, and other fluorescent substances. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 44, Issue 2, 225-249.
- MC ENERNEY JK., WONG WP., PEYMAN GA., 1977** - Evaluation of teratogenicity of fluorescein sodium. *Am J Ophthalmol* 1977; 84: 847-850.
- MEUS P., BAKALOWICZ M., 1997** - Les traçages artificiels, outils de reconnaissance et d'étude des aquifères karstiques. *Hydrogéol* 1997; 3: 43-50.
- NESTMANN ER., DOUGLAS GR., MATULA TI., GRANT CE., KOWBEL DJ., 1979** - Mutagenic activity of rhodamine dyes and their impurities as detected by mutation induction in *Salmonella* and DNA damage in Chinese ovary cells. *Cancer Res* 1979; 39: 4412-4417.
- NESTMANN E R., KOWBEL D J., 1979** - Mutagenicity in *Salmonella* of Rhodamine WT, a dye used in Environmental water-tracing studies. *Mutat Res/Genetic Toxicology* 1979; 68, 4, 389-392.
- PARRIAUX A., LISKAY M., MÜLLER I., DELLA VALLE G., 1988** - Guide pratique pour l'usage des traceurs artificiels en hydrogéologie. Technical report GEOLEP-EFPL, Suisse: 51 p
- RICHNER P., KASCHIG J., 1999** - Degradable fluorescent whitening agents ? Scientific contribution to overcome a prejudice. Document Ciba, SETAC: 7 p.
- SALEM H., LOUX JJ., SMITH S., NICHOLS CW., 1979** - Evaluation of the toxicologic and teratogenic potentials of sodium fluorescein in the rat. *Toxicology* 1979; 12, Issue 2: 143-150.
- SMART PL., LAIDLAW IMS., 1977** - An evaluation of some fluorescent dyes for water tracing, *Wat Resour Res* 1977; 13, 1: 15-33.
- SMART PL., 1984** - A review of the toxicity of twelve fluorescent dyes used for water tracing. *NSS Bull* 1984; October: 21-33.
- US-EPA, 1989** - Ground-water monitoring in karst terranes: recommended protocols and implicit assumptions. National Park Service, Mammoth Cave, Kentucky 4225, 1989.
- US-EPA, 2003** - Tracer-test planning using the efficient hydrologic tracer-test design (EHTD) program. US Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Assessment Washington DC EPA/600/R-03/034 2003.
- YANKELL SL., LOUX JJ., 1977** - Acute toxicity testing of erythrosine and sodium fluorescein in mice and rats. *Loux JJ. J Periodontol*. 1977; 48, 4, 228-231.