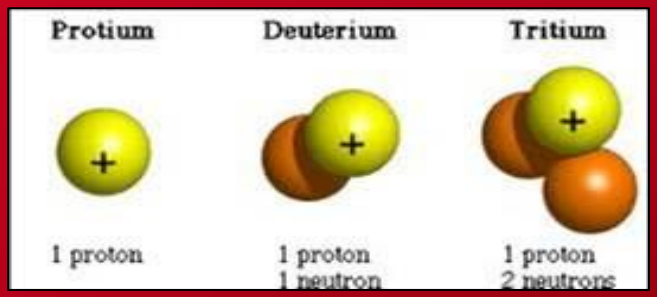
DE LA RECHERCHE À L'INDUSTRIE

Tritium Organiquement Lié (TOL) et molécules organiques tritiées (MOT), deux entités différentes, indispensables à la compréhension du devenir du tritium dans l'environnement et chez l'Homme.



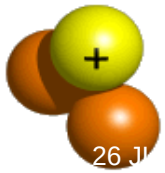
Baglan Nicolas
CEA/DAM/DIF
F-91297 Arpajon, France

SFRP
Société Française de Radioprotection

www.cea.fr

Sommaire

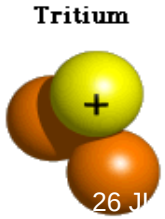
1. Généralités
   - Données physico-chimiques
   - Origine
   - Comportement
   - Différentes formes de tritium dans les échantillons de l'environnement
2. L'analyse du tritium dans les échantillons de l'environnement
3. La formation du tritium organiquement lié
4. Tritium organiquement lié et molécules organiques tritiées
5. Conclusions



Le tritium - Généralités

➔ Données physico-chimiques :

- Période : $T_{1/2}$ = 12,312 ± 0,025 a (*)
- $E_\beta$max = 18,564 ± 0,003 keV et $E_\beta$moy = 5,68 ± 0,01 keV (*)
- A_{sp} = 3,58 10^{14} Bq.g^{-1} ou 358 TBq.g^{-1}
- Equation de désintégration $^{3}\mathrm{H} \longrightarrow {}^{3}\mathrm{He} + e^{-} + \bar{\nu}$
- Distribution dans l'environnement et chez l'homme ubiquiste car comme isotope de l'hydrogène il peut intégrer toutes les molécules contenant de l'hydrogène dont celles du vivant
- T_{eff} CIPR 71 (1995) : 10 jours , 40 jours, avec proportions variables si HTO (97 % - 3 %) ou TOL (50% - 50 %) ingérés. Une fraction de stockage dans le tissus adipeux est aussi évoquée dans le cas de l'ingestion de TOL avec une, T_{eff} de 450 jours pour à peine 1 % de la quantité initiale.



1 proton
2 neutrons

(*) LNHB/CEA – Table de radionucléides

Le tritium - Origines

➔ Naturelles :

- Production atmosphérique (≈ 200 $g.a^{-1}$)

  ↳essentiellement produit dans la haute atmosphère d'après :

  $$^{14}N + n \Rightarrow {}^{12}C + {}^{3}H$$

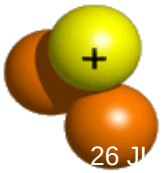
- Production terrestre (<< production atmosphérique, < à 1 atome de tritium/cm^2/s)

  ↳réaction des neutrons issus de la fission spontanée de l'uranium, sur les traces de ^{6}Li présent dans les roches

➔ Anthropiques :

- Essais nucléaires atmosphérique
- Réacteurs nucléaires
- Usines de retraitement
- Autres (production tritium, détritiation, applications industrielles, centres de recherche…)
- Réacteurs du futurs

Tritium

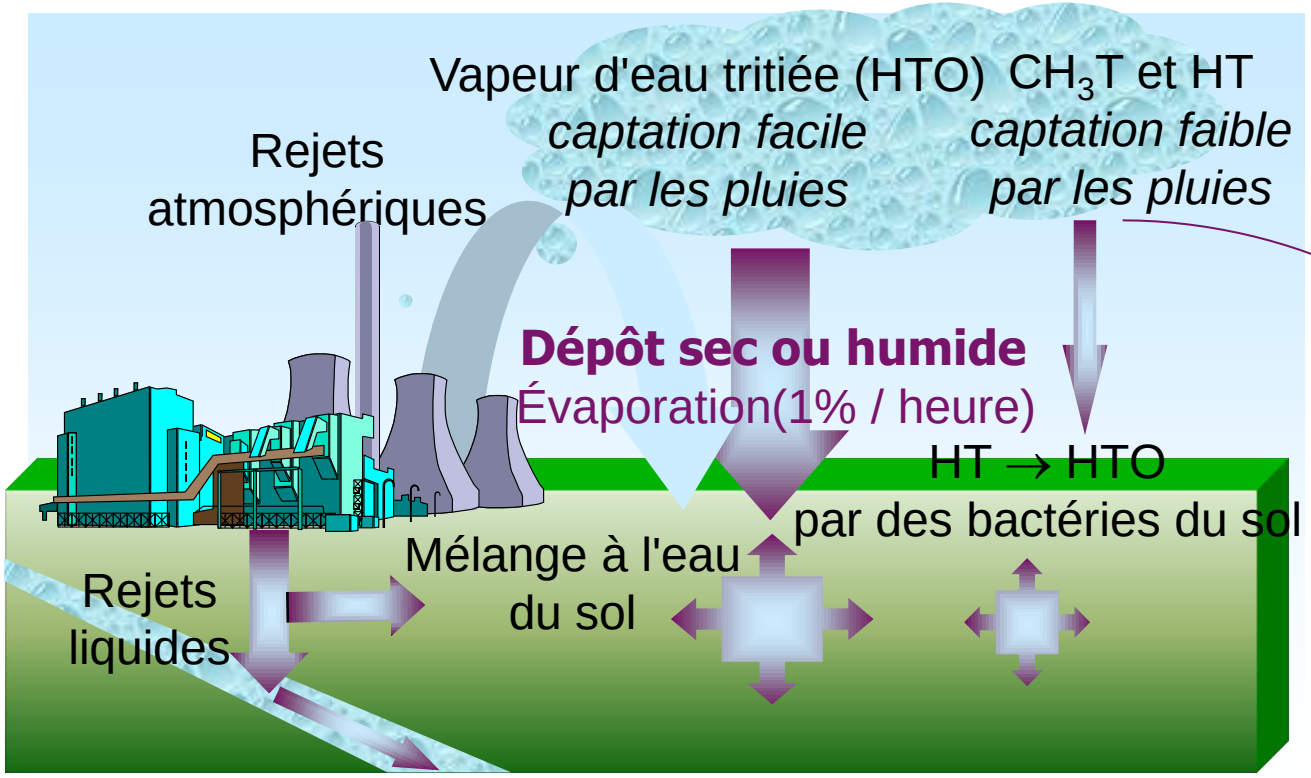


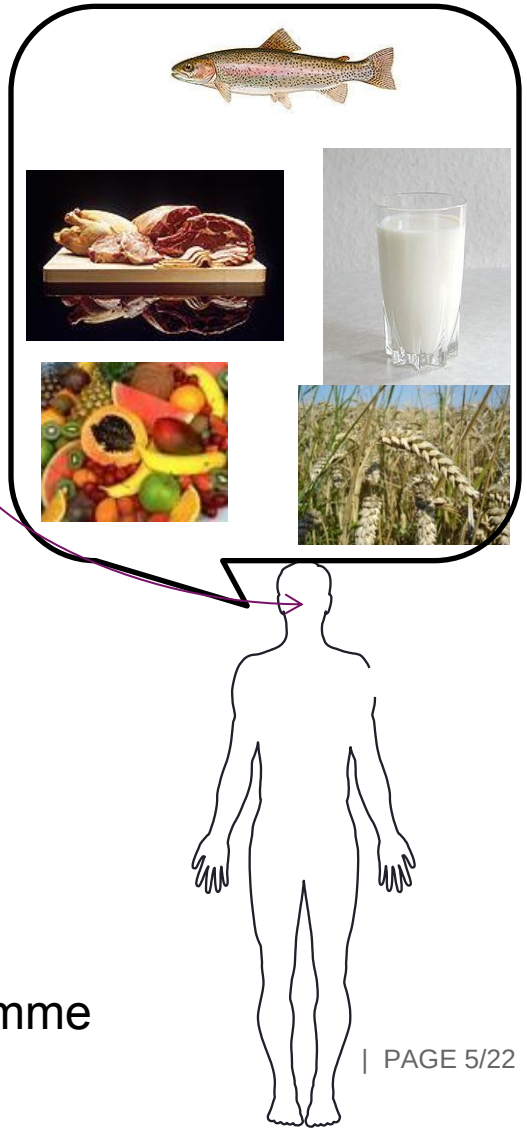
1 proton
2 neutrons

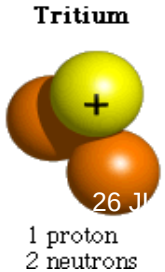
Présent dans l'environnement en faibles concentrations (~ niveau pré nucléaire hors influence d'une installation)

Le tritium - Comportement

^3H : Du terme source vers l'environnement et l'homme







Analyse et spéciation dans l'environnement

Transferts et modélisation dans l'environnement et vers l'Homme

Le tritium – Formes dans l'environnement

^{3}H : Différentes « formes » de tritium dans l'environnement

➔ Formes physicochimiques variées

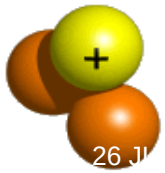
- Gaz : HT, HTO, CH_3T
- Liquide (eau) : pure ou non (distillation)
- Environnement : Tritium de l'Eau de Déshydratation (TED), Tritium Organiquement Lié (TOL)
  - Règne végétal
  - Règne animal

➔ TED (TFWT) : tritium présent dans l'eau issue de la déshydratation de l'échantillon frais.

➔ TOL (OBT) : tritium lié à la matière organique présent sous deux formes le TOL échangeable et le TOL non échangeable.

❶ Définition de TED et TOL consensuelles.
❷ Bon accord sur l'existence des fractions échangeables et non échangeables mais de nombreuses définitions dans la littérature.

Tritium



1 proton
2 neutrons

Impact en termes d'analyse et de spéciation

Le tritium – Formation TOL

OBT definition : OBT is formed in living systems through natural or biological processes from HTO. OBT is the sum of the exchangeable and nonexchangeable forms.

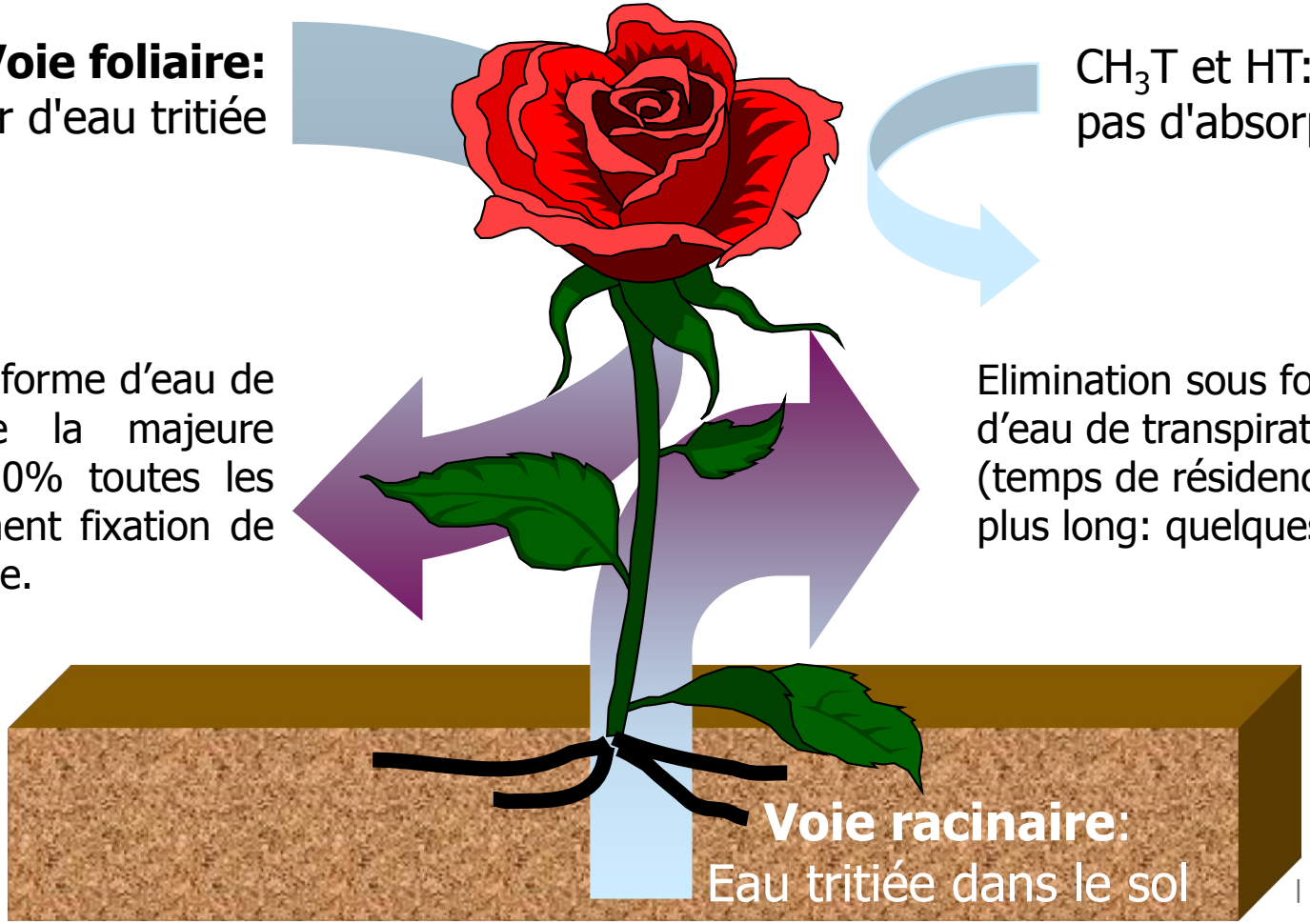
(✎) Kim S. B., Baglan N, and Davis P. A.; J. of Envt. 126 (2013) 83.

Voie foliaire:
vapeur d'eau tritiée

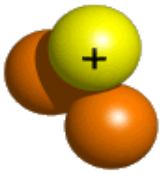
CH_3T et HT:
pas d'absorption

Elimination sous forme d'eau de transpiration de la majeure partie (99%) (50% toutes les 30 min). Seulement fixation de 1% dans la plante.

Elimination sous forme d'eau de transpiration (temps de résidence plus long: quelques jours)

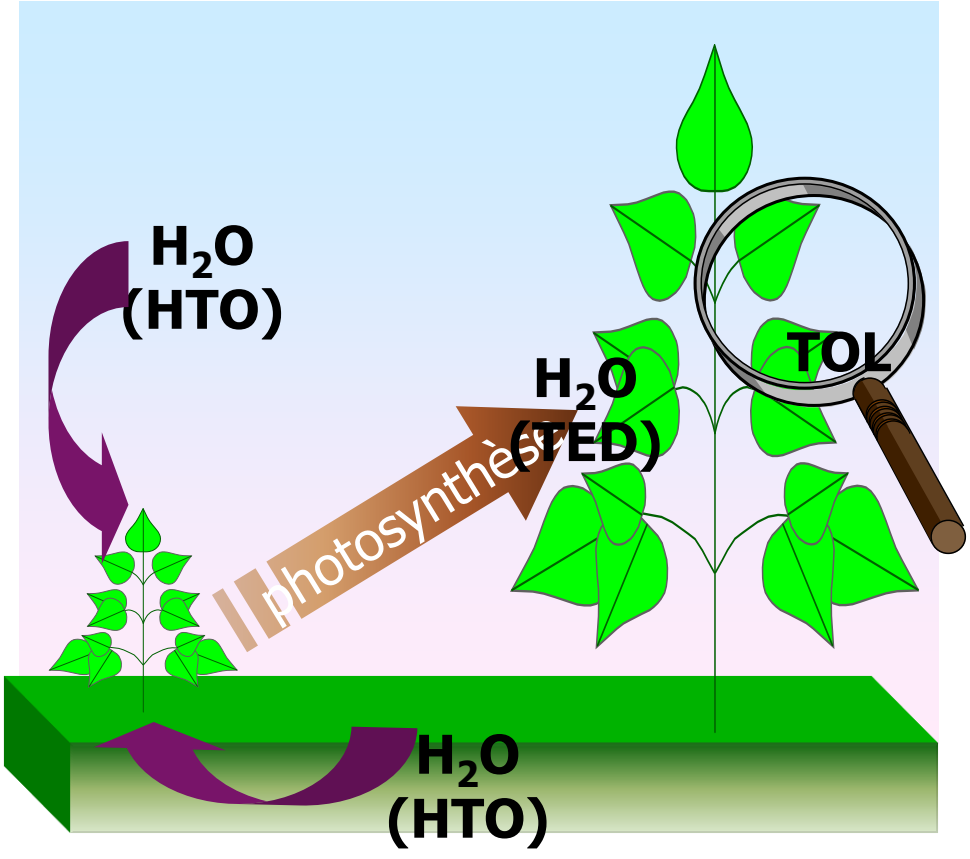


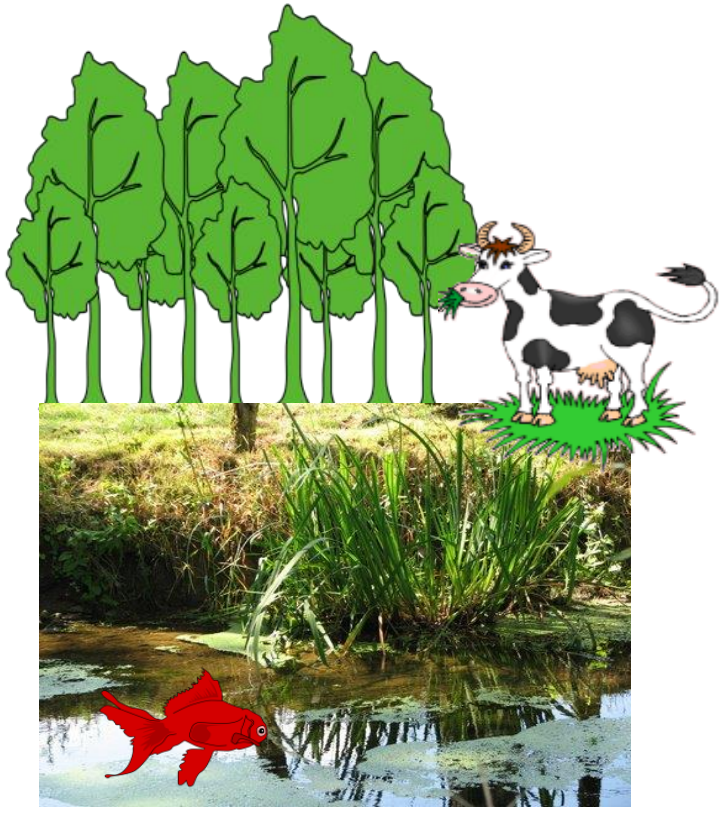
Voie racinaire:
Eau tritiée dans le sol



1 proton
2 neutrons

Le tritium – Formation TOL (2)

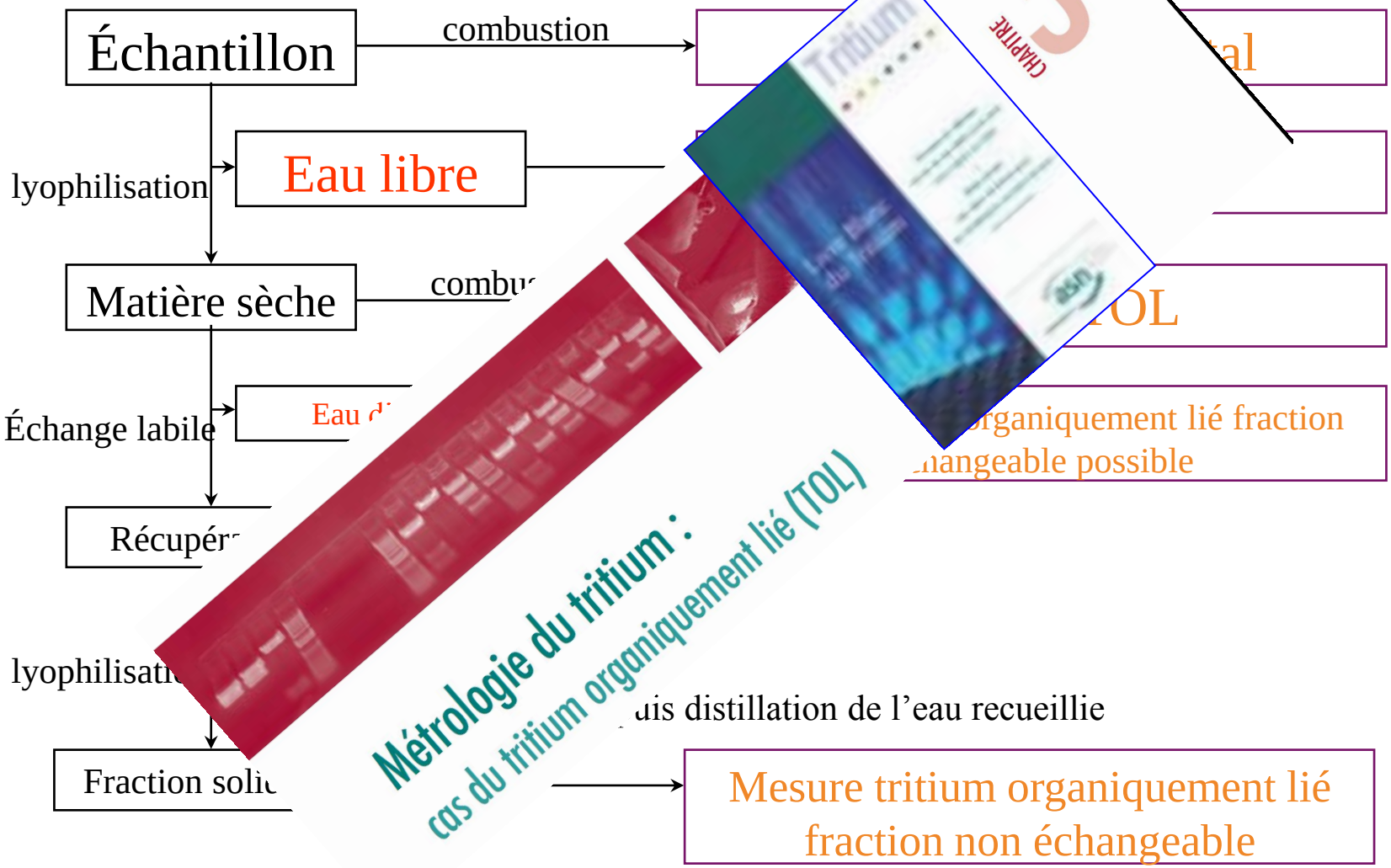


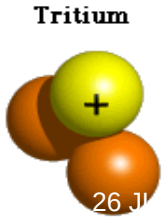


Lors de ces processus naturels de formation de TOL, le tritium intègre différentes molécules constitutives de l'organisme vivant

Le tritium – Analyse (1)

^{3}H : Analyse tritium dans des échantillons de [illegible]nement (2010)





1 proton
2 neutrons

Le tritium – Analyse (2)

^{3}H : Evaluation et validation procédure analytique (2010-2016)

Fresh sample dehydration.

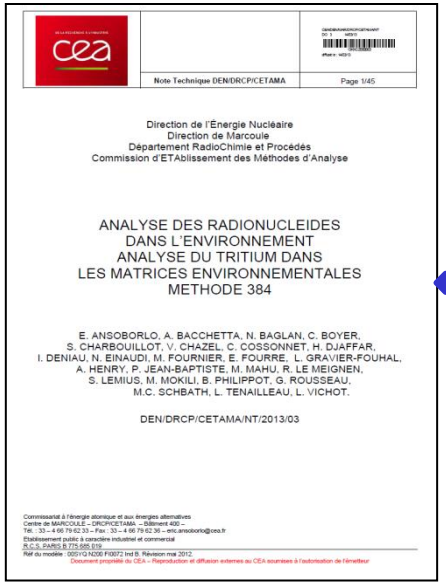
Dehydrated water

TFWT activity concentration

%H determination

Dehydrated sample

OBT **activity** concentration



Note Technique DEN/DRCP/CETAMA — Page 1/45

Direction de l'Energie Nucléaire
Direction de Marcoule
Département RadioChimie et Procédés
Commission d'ETAblissement des Méthodes d'Analyse

ANALYSE DES RADIONUCLEIDES
DANS L'ENVIRONNEMENT
ANALYSE DU TRITIUM DANS
LES MATRICES ENVIRONNEMENTALES
METHODE 384

E. ANSOBORLO, A. BACCHETTA, N. BAGLAN, C. BOYER,
S. CHARBOUILLOT, V. CHAZEL, C. COSSONNET, H. DJAFFAR,
I. DENIAU, N. EINAUDI, M. FOURNIER, E. FOURRE, L. GRAVIER-FOUHAL,
A. HENRY, P. JEAN-BAPTISTE, M. MAHU, R. LE MEIGNEN,
S. LEMIUS, M. MOKILI, B. PHILIPPOT, G. ROUSSEAU,
M.C. SCHBATH, L. TENAILLEAU, L. VICHOT.

DEN/DRCP/CETAMA/NT/2013/03

TED (TFWT) and TOL (OBT) determination are validated.

normalisation française

XP M 60-824
13 Juillet 2016

ICS : 13.280 ; 17.240 ; 27.120.01

Énergie nucléaire — Mesure de la radioactivité dans l'environnement — Méthode d'essai pour l'analyse du titrium de l'eau libre et du titrium organiquement lié dans les matrices environnementales

Norme expérimentale

Correspondance

Résumé

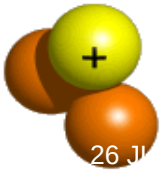
Descripteurs

Modifications

Corrections

© AFNOR — Tous droits réservés

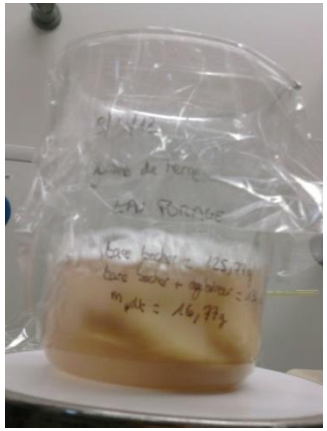
Tritium



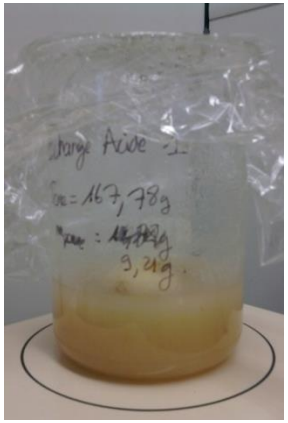
1 proton
2 neutrons

Le tritium – Molécules constitutives de l ’échantillon

Experimental pathway

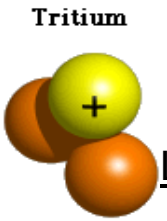


Potatoes labile exchange



Apple labile exchange

Filtration unit **Oak**



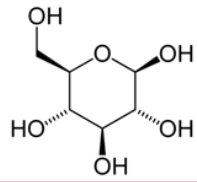
<u>Left to right</u>: Potatoes, Carots, Apple, Leek (white), Leek (green), grass, Oak leaves, Cedar, Oak.

Le tritium – Molécules constitutives de l ’échantillon (2)

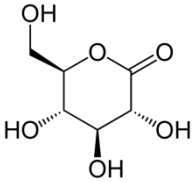
Résultats obtenus pour des échantillons ne contenant pas de tritium avec un focus sur la pomme qui fait partie du bol alimentaire.

Composés identifiés dans l’eau d’échange labile pour la pomme

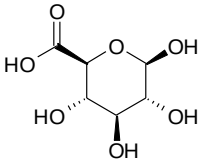
Glucides



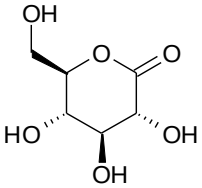
Glucose



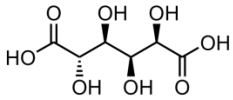
Gluconolactone



Glucuronic acid

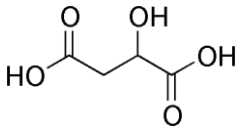


Gluconic acide

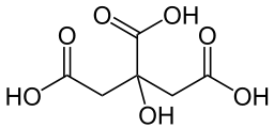


Saccharic acide

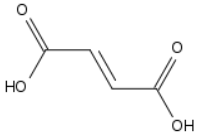
Acides organiques



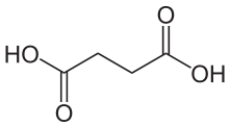
Acide malique



Acide citrique

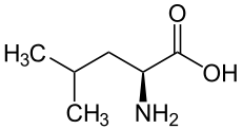


Acide fumarique

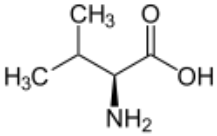


Acide succinique

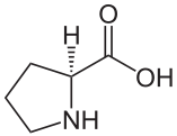
Acides aminés



Leucine



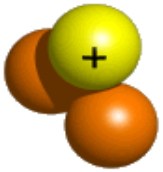
Valine



Proline

Molécules identifiées comme étant porteuses de tritium après expositions d’organismes à de l’eau tritiée (soja, algue verte unicellulaire *Chlorella*) *[Moses & Calvin, UCRL-8379 (1958); Thompson & Nelson, Canadian journal of botany 49 (1971)]*

Tritium



1 proton
2 neutrons

Molécules impliquées dans les processus biochimiques (synthèse des protéines, cycle de Krebs) *[Vander & al, Physiologie humaine (1977)]*

Le tritium – Molécules constitutives de l ’échantillon (3)

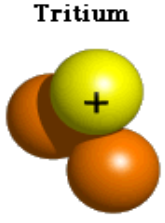
molécules du cycle du vivant solubilisées “glucides”, “acides aminés”, “acides organiques”…

Glucose ⟹ Dégradation quasi-instantanée (Energie) ⟹ Homogeneous distribution within the organism, HTO kinetic, , short residence time (~ 10 days).

Glucose ⟹ Transformation en lipides (glycogen synthesis) ⟹ Glycogen storage in muscles and liver, long residence time (40 to 450 days).

Acides aminés ⟹ Synthèse des protéines ⟹ When tritium is present in an amino acid, its distribution, residence time and metabolism depend on those from the protein in which the amino acids is included.

Acides organiques ⟹ Cycle de Krebs (Energie) ⟹ Homogeneous distribution within the organism, participation to the synthesis associated with Krebs cycle.



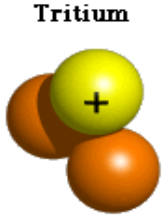
Le tritium – Molécules organiques tritiées

Connaissance de la **spéciation** indispensable car les molécules susceptibles de migrer dans l'environnement et chez l'homme = molécules solubilisées

- Molécules appartenant aux matrices constitutives des échantillons initiaux (glucides, protides…) : pour la pomme, essentiellement glucose et acides aminés (leucine, valine…)
- Dispersion dans les organismes dépend de la molécule considérée (ubiquitaire pour le glucose, moteur énergétique des cellules)

MAIS

Pourquoi différentier TOL et MOT?



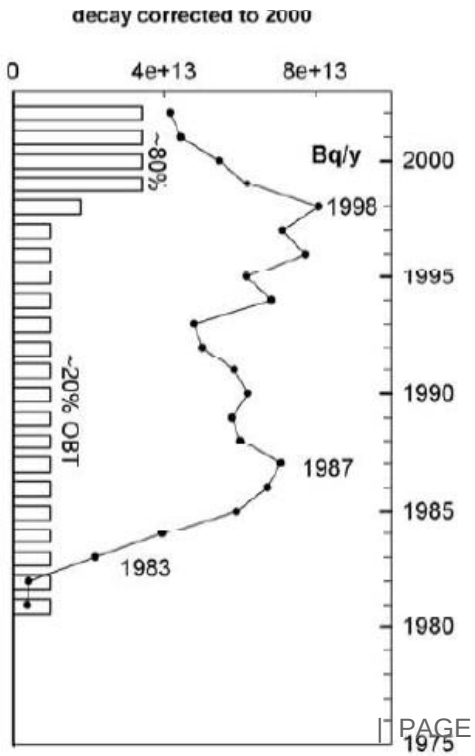
Le tritium – Molécules organiques tritiées (2)

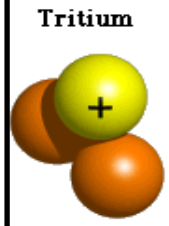
Si la connaissance du comportement des molécules constitutives d'un organisme vivant permet de mieux appréhender le devenir du TOL,
l'ingestion (ou l'intégration) de molécules organiques tritiées n'est représentative que dans des situations d'expositions particulières comme celle de la baie de Cardiff

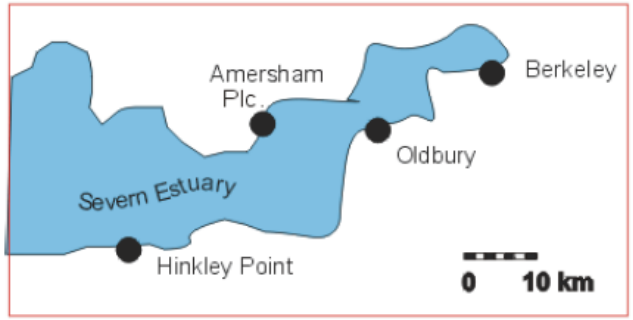
From Croudace et al

- **Cardiff case – it should be noted that the tritated waste from GE Healthcare (former Amersham) includes not only the HTO and the by-product, but also the high bio available tritiated organic molecules (*i.e.* hydrocarbons, amino acids, proteins, nucleotides, fatty acids, lipids, and purine / pyrimidines).**

Rejet MOT





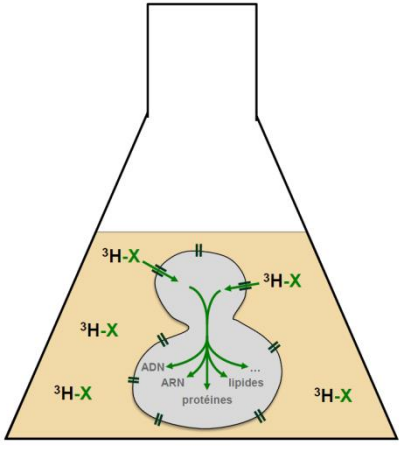


Le tritium – Molécules organiques tritiées (3)

L'objectif du projet TriMolCel est de décrire **l'ensemble des conséquences physiologiques et moléculaires** d'une contamination au tritium pour améliorer notre **compréhension fondamentale** de la toxicité de ce radionucléide.

Nous utiliserons la **levure** comme organisme modèle et des approches « **omiques** » pour définir l'ensemble des effets cellulaires et moléculaires des rayonnements β émis par le tritium.

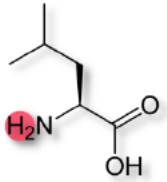
- Soumettre une levure (Saccharomyces cerevisiae) à une exposition aigue pour les diverses molécules organiques tritiées considérées
- Etudier les effets sur les cellules (ralentissement de croissance, mortalité, réparation)



S. Cheddin et al. Projet Trimolcel

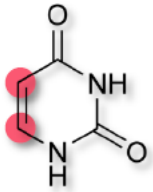
Le tritium – Molécules organiques tritiées (3)

La **leucine** tritiée (acide aminé)



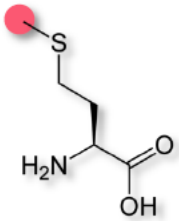
devrait principalement marquer les **protéines**.

L'**uracile** tritié (base pyrimidique)



devrait principalement marquer les **ARNs** et l'**ADN** (conversion de l'UTP en dCTP et dTTP).

Le groupement ^{3}H-méthyle de la **méthionine** tritiée est utilisé lors des réactions de méthylations. La méthionine tritiée devrait donc marquer non seulement les **protéines**, mais aussi des **ARNs**, des **lipides** et des petites molécules.



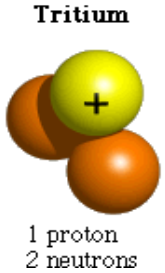
Dans ce cas, le tritium est adressé dans des macromolécules cibles dépendantes de la molécule organique tritiée.
Par exemple, afin de **caractériser et comparer** les effets des rayonnements β du tritium lorsque celui-ci est spécifiquement localisé dans **les protéines, l'ADN ou les ARNs**.

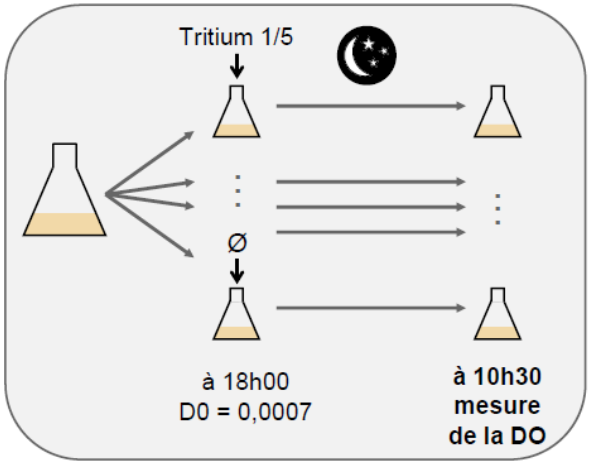
1 proton
2 neutrons

S. Cheddin et al. Projet Trimolcel

Le tritium – Molécules organiques tritiées (4)

	Facteur de dilution de la solution mère	radioactivité finale (µCi/mL)	radioactivité finale (Bq/L)
	5	200	$7{,}4.10^{9}$
	50	20	$7{,}4.10^{8}$
Effluents liquides AREVA de La Hague[1]			1.10^{8}
	500	2	$7{,}4.10^{7}$
	5000	0,2	$7{,}4.10^{6}$
Effluents des CNPE (fonctionnement normal) [1]			6.10^{5} - 4.10^{6}
	50 000	0,02	$7{,}4.10^{5}$
	500 000	0,002	$7{,}4.10^{4}$
Seuil de potabilité de l'eau – normes OMS[2]			1.10^{4}
	5 000 000	0,0002	$7{,}4.10^{3}$
Eau traitée Fukushima (réacteurs 5 et 6)			$2{,}6.10^{3}$
	50 000 000	0,00002	$7{,}4.10^{2}$
Seuil de potabilité de l'eau aux États-Unis[3]			$7{,}4.10^{2}$



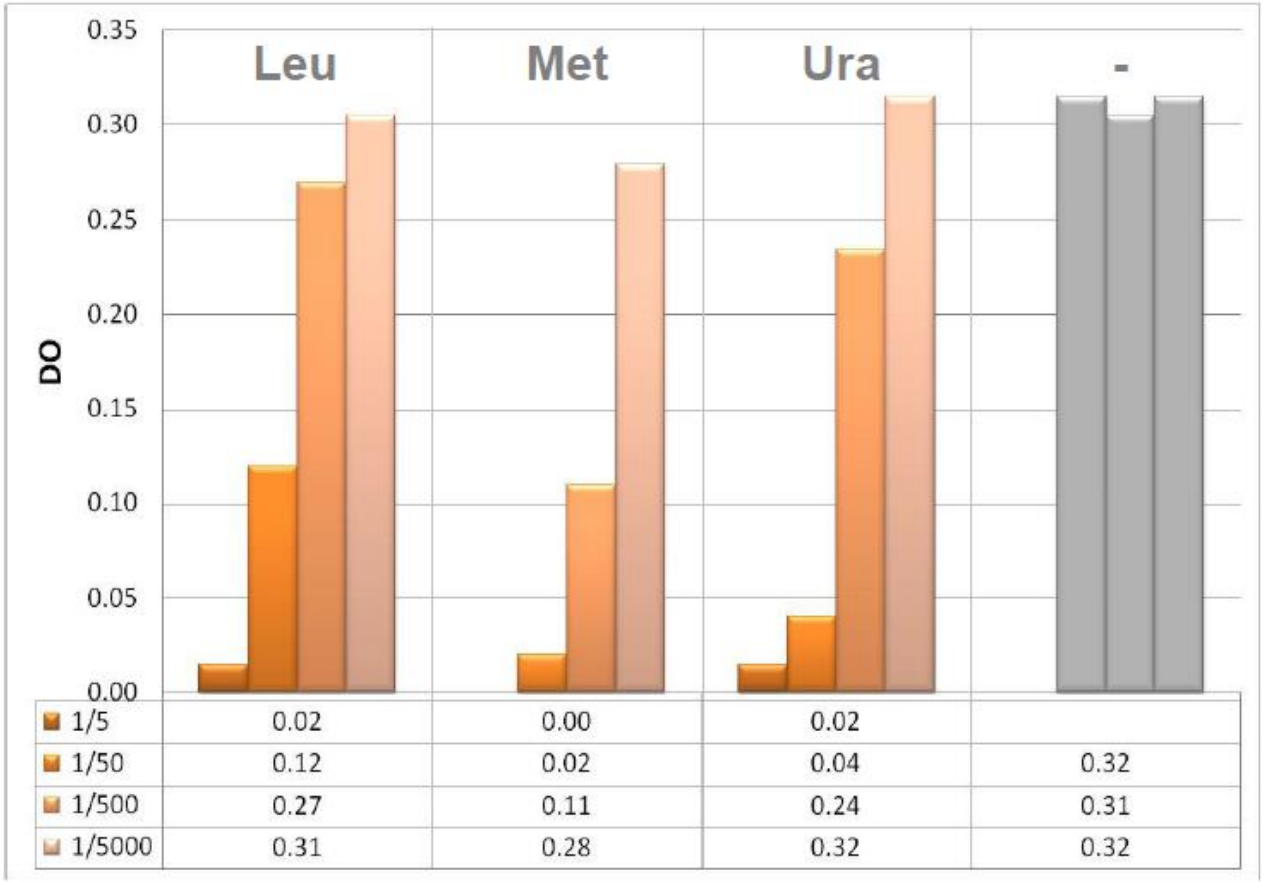


dilution source	Bq/mL	µCi/mL
5	$7{,}4.10^{6}$	200
50	$7{,}4.10^{5}$	20
500	$7{,}4.10^{4}$	2
5 000	$7{,}4.10^{3}$	0.2

S. Cheddin et al. Projet Trimolcel

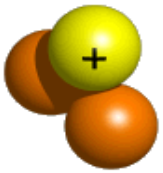
Le tritium – Molécules organiques tritiées (4)

	Facteur de dilution de la solution mère	radioactivité finale (µCi/mL)	radioactivité finale (Bq/L)
	5	200	$7{,}4.10^{9}$
	50	20	$7{,}4.10^{8}$
Effluents liquides AREVA de La Hague[1]			1.10^{8}
	500	2	$7{,}4.10^{7}$



S. Cheddin et al.
Projet Trimolcel

Tritium



1 proton
2 neutrons

Conclusions : TrimoIcel

- Quelque soit la molécule tritiée, la croissance des cellules ralentie lorsqu'elles contiennent **0.05 Bq/cellule** (dilution 1/50) et redevient normale lorsque les cellules contiennent 0.005 Bq/cellule (dilution 1/500)

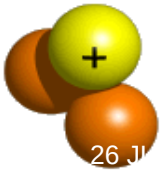
- Aucune des doses testées ne provoque de mortalité cellulaire significative.

- Le tritium se retrouve dans les fractions attendues :
  - ADN avec Uracile > Méthionine >> Leucine,
  - ARN avec Uracile > Methionine.

- Quelque soit les doses testées, **le protéome est très peu affecté** par les molécules tritiées. Une seule protéine est fortement surexprimée : Rnr4 (petite sous-unité de la Ribonucleotide-diphosphate reductase (RNR)).

- Quelque soit les doses testées, **le transcriptome est très peu affecté** par les molécules tritiées. On observe cependant :
  - l'induction systématique d'une réponse de type « dommage à l'ADN » qui peut parfaitement expliquer le retard de croissance observé pour les doses les plus fortes.
  - l'induction d'une réponse de type « Cell metabolism » et « Iron homeostasis » lorsque les cellules sont cultivées en présence de méthionine tritiée.

Tritium



1 proton
2 neutrons

Conclusions : MOT vs TOL

☛Procédure analytique validée pour la détermination des fraction TED et TOL mais pas ,des fractions échangeable et non échangeable car :

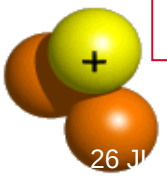
- Solubilisation des molécules constitutives de l'échantillon démontrée
- Insuffisance de la vision focalisée sur les propriétés physico-chimiques de l'hydrogène (et ses isotopes) confirmée
- Pertinence des autres définitions (XBT, CBT) pas avérée
- Importance de la nature des molécules individuelles dans la distribution du tritium

☛Identification des MO(T) solubilisée très complexe

☛Outils simples (analyseur élémentaire, COT-mètre, spectrophotomètre…) qui permettent d'avoir une information sur les familles de molécules solubilisées (protéines, glucides, acides aminés…)

☛Outil complexe (Orbitrap) qui permet l'identification des molécules (accès à la masse) mais après obtentions de spectres très riches dont l'interprétation exhaustive est réservée aux spécialistes.

Tritium



1 proton
2 neutrons

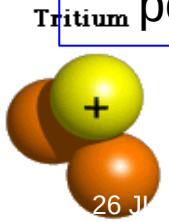
Conclusions : MOT vs TOL

Le TOL est formé dans les organismes vivants par des processus naturels (respiration, photosynthèse) en présence d'eau tritiée.

- Concept TOL important car il prend en compte l'ensemble des processus naturels et est représentatifs de la distribution du tritium dans les organismes vivants.
- En l'absence d'apport anthropique et/ou dans **un système à l'équilibre** les rapports HTO/TED et TED/TOL sont voisins de un

- La connaissance des MOT mises en jeu est indispensable à la connaissance du devenir du tritium dans l'environnement et chez l'homme
- Exposition directe à des MOT est une situation exceptionnelle
- Une exposition à des MOT conduit forcément à des rapports TOL/TED supérieurs à un, car celles-ci sont produites pour marquer des molécules spécifiques (ADN pour la thymidine, ARN pour l'uracile…)

Importance de différentier ces deux concepts



Thank you for your

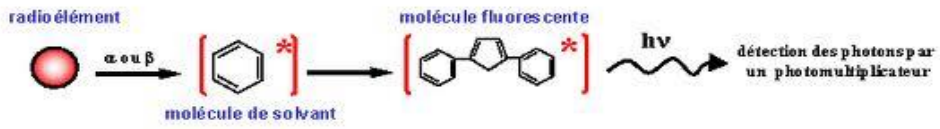
Attention

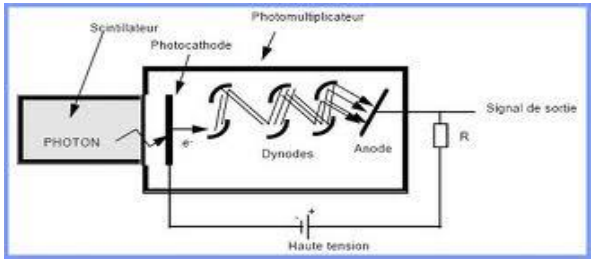
Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives
Centre de Bruyères-le-châtel | 91297 ARPAJON Cedex
T. +33 (0)1 69 26 46 50 | F. +33 (0)1 69 26 70 65

Direction des applications militaires
Département analyse, surveillance, environnement
Service radioanalyse, chimie, environnement

Etablissement public à caractère industriel et commercial | RCS Paris B 775 685 019

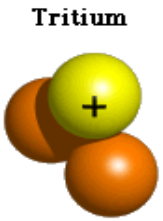
^3H Outils analytiques : Scintillation liquide





m en kilogrammes,
n and n_0 en cps (coups par seconde),
t et t_0 en secondes,
et η en %.

$$A_m = \frac{(n - n_0)}{\eta \times m}$$



Le tritium – Analyse (1)

^{3}H : Analyse du tritium dans les eaux environnementales

(Avec ou sans distillation préalable en fonction de la nature de l'eau)

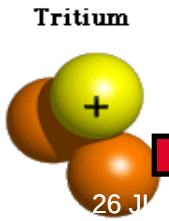
Compteur Aloka LB7(50/50)

Compteur Wallac Quantulus 1220

Compteur Packard P2900

2013

2010



0,2 Bq.kg^{-1}

1 Bq.kg^{-1}

10 Bq.kg^{-1}

100 Bq.kg^{-1}

Le tritium – Analyse (3)

^{3}H : Analyse tritium dans des échantillons de l'environnement

Depuis 1995

Oxidiser

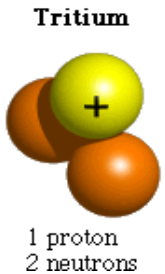
$m_s \leq 1$ g

Bombe de combustion

$1\ g \leq m_s \leq 10$ g

Four de combustion

$5 \leq m_s \leq 40$ g



100 Bq.kg^{-1} → 10 Bq.kg^{-1} → 1 Bq.kg^{-1}

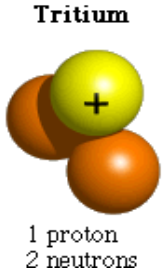
Masses d'échantillon croissantes et concentrations en activité décroissantes

^{3}H Outils analytiques : Scintillation liquide

$$A_m = \frac{(n - n_0)}{\eta \times m}$$

- Formule valable pour déterminer l'activité dans l'eau mesurée qu'elle soit issue de :
  - Mélange direct avec le cocktail scintillant
  - déshydratation (tritium de l'eau libre)
  - échange labile (TOL-E)
  - combustion (TOL et TOL-NE)

Conversion indispensable pour déterminer l'activité par kg de matière sèche puis fraiche.



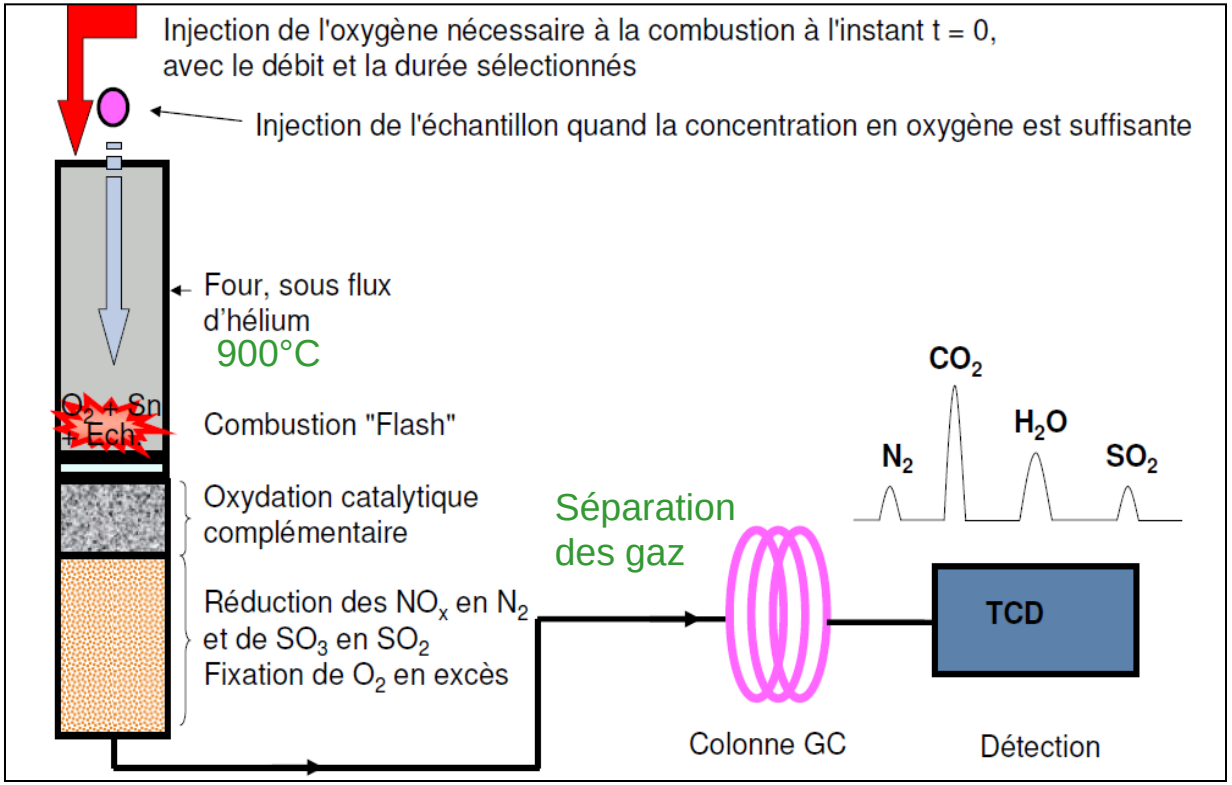
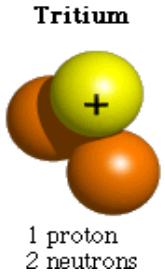
$$A_s^{TOL} = A_m^{eau_comb} \times \frac{(\%)_H^{ech}}{(\%)_H^{eau}}$$

Utilisation analyseur CHNS

^3H Outils analytiques : analyseur CHNS

Principe Analyse élémentaire CHNS :

Combustion flash de l'échantillon

Echantillon + O_2

N_2 + NO_x + CO_2 + H_2O + SO_2/SO_3