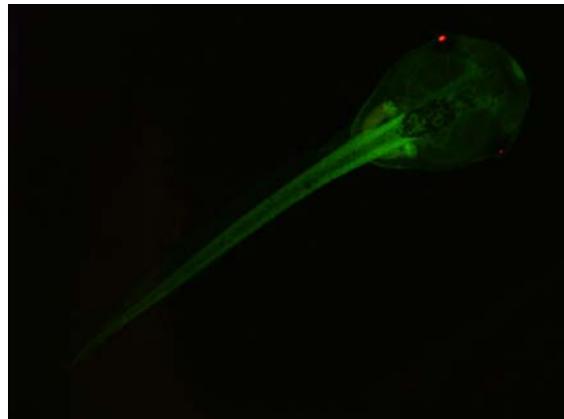


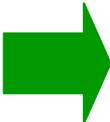
# Le développement d'un modèle biologique de détection de l'uranium en temps réel dans l'environnement

Catherine MERCAT (AREVA) & Gregory LEMKINE (WATCHFROG)



# Contexte industriel du site AREVA du Tricastin

- ▶ 5 Installations nucléaires de base + 1 installation nucléaire de base secrète + de multiples installations classées pour la protection de l'environnement, dédiées à la chimie de l'uranium et du fluor
- ▶ Des limites de rejets dont le cumul autorise des effluents liquides pouvant contenir jusqu'à environ 10 GBq pour les isotopes de l'uranium (~200 kg d'uranium)
- ▶ Des rejets liquides réels issus des procédés de 115 kg d'uranium en 2010

 Besoin d'outils fins pour le suivi de l'uranium dans l'environnement

# Contexte environnemental du site

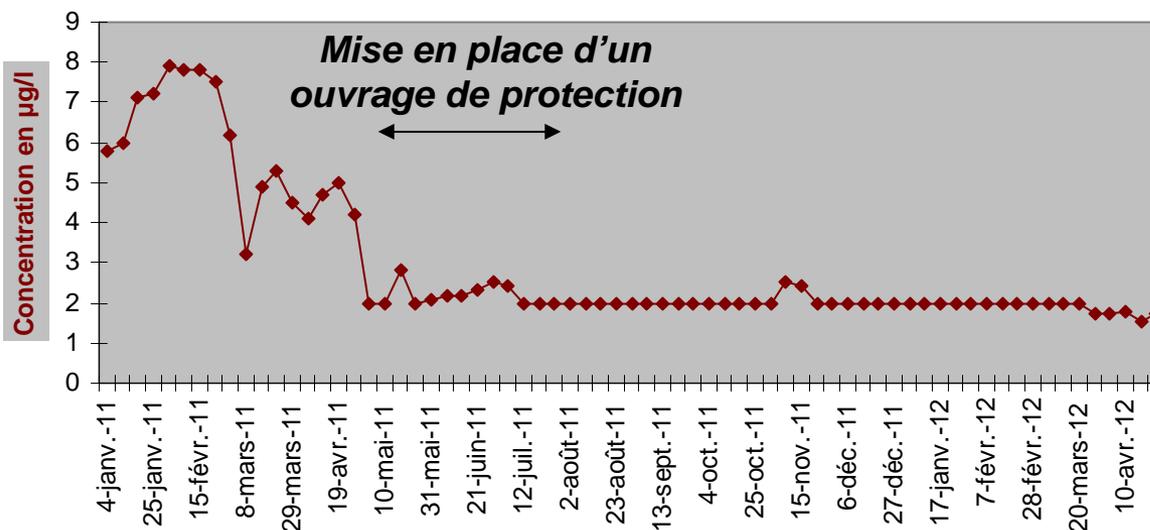
- ▶ La gestion des effluents liquides et des eaux pluviales est complexe sur le site AREVA du Tricastin, du fait de ses évolutions industrielles et du renforcement des contraintes réglementaires sur un foncier très contraint.



TRICASTIN

# Contexte environnemental du site AREVA du Tricastin

Suivi de l'uranium dans la Gaffière à l'intérieur du site du Tricastin



➔ **Besoin d'un outil de détection rapide de teneurs en uranium dans l'environnement légèrement supérieures au bruit de fond.**

# La surveillance actuelle des exutoires vers les cours d'eau

- ▶ Les rejets liquides autorisés sont dispersés dans le canal de Donzère Mondragon après vérification des concentrations en uranium (+ autres paramètres)
- ▶ Les autres écoulements sont contrôlés via le réseau de surveillance des EP

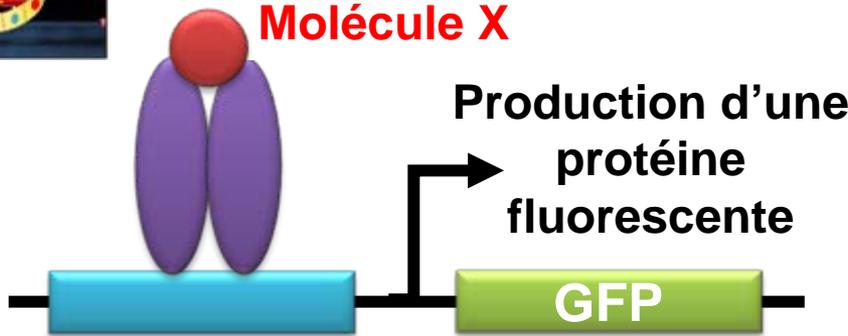
Analyses en différé (quotidiennes, hebdomadaires ou mensuelles) par les laboratoires du site : uranium mesuré par ICPMS ou ICPAES avec des limites de détection de 0,1 à 2 µg/L.

- ▶ Sur le marché, il n'existe actuellement pas d'appareil de mesure radiologique ou chimique permettant de détecter immédiatement *in situ* une concentration en uranium de l'ordre de quelques dizaines de µg/L

# Le principe de la détection biologique



**Molécule X**



Détection génétique des effets

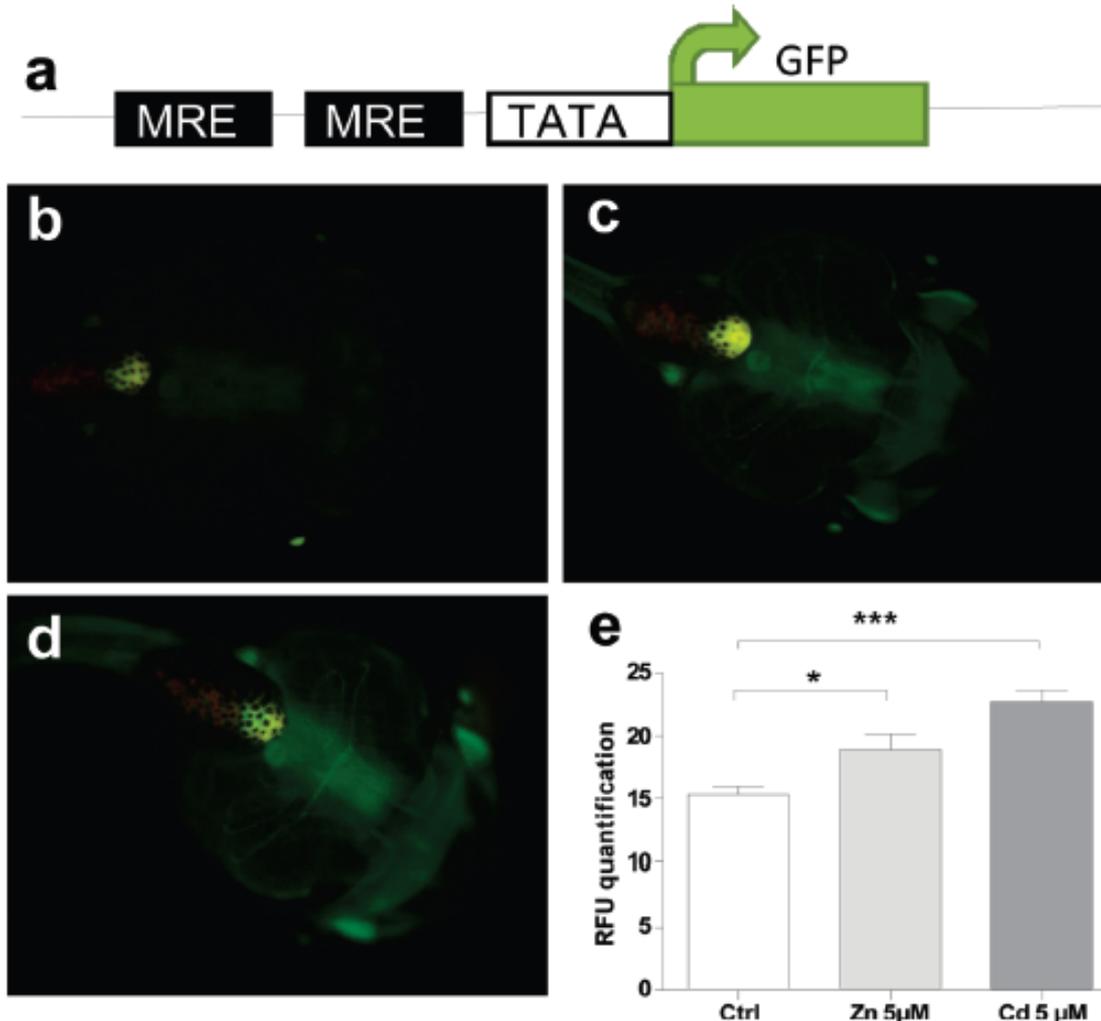
Thyroïdien, œstrogénique,  
androgénique  
Métaux lourds

Petit Organisme Modèle : xénope à de très jeunes stades



TRICASTIN

# De bons résultats publiés sur les métaux lourds



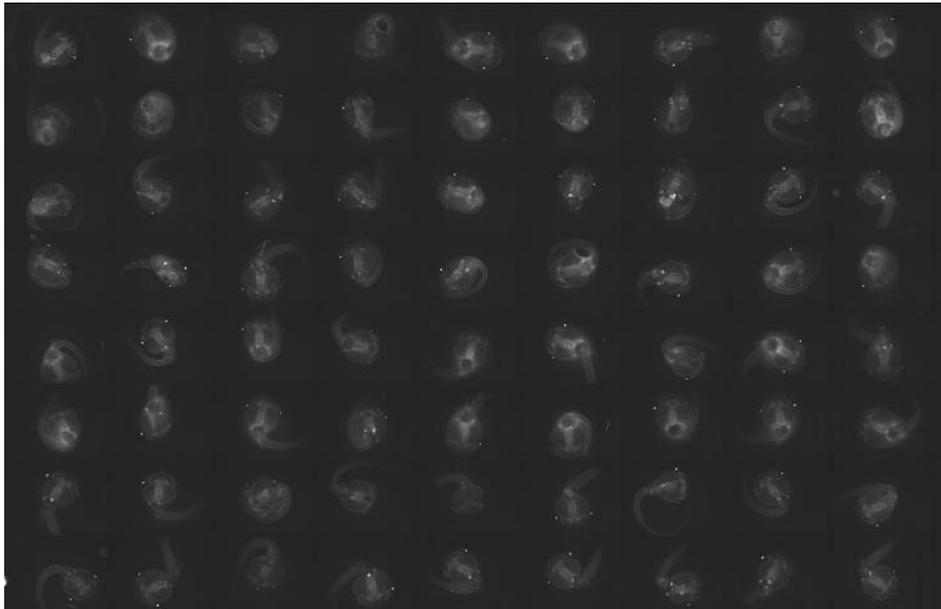
Fini *et al.* 2009  
in *Env. Sci. Technol.*

# 1<sup>ère</sup> collaboration AREVA-WATCHFROG

- ▶ **Novembre 2009** : Engagement d'une collaboration AREVA-WATCHFROG pour tester les capacités de détection de l'uranium par les larves de xénopes (*Xenopus laevis*) en vue de développer une lignée spécifique Uranium.
- ▶ **Hiver 2009/10** : élaboration du protocole expérimental
- ▶ **Printemps 2010** : réalisation des tests par WatchFrog, appui d'AREVA NC pour réaliser le dopage en uranium des solutions tests. 3 lignées de larves ont été testées (6 mâles différents correspondant à des modèles métaux lourds).

# Le protocole expérimental

- ▶ 3 Modèles « 2MRE », « 3MRE » et « Métallothionéine » Métaux lourds testés , 2 vagues de tests
- ▶ Tests de létalité à 1 µg/L d'Uranium puis exposition à 1, 5, 40, 100 et 1000 µg/L. Lecture après 72 h ou 96 h de traitement.



# Premiers résultats

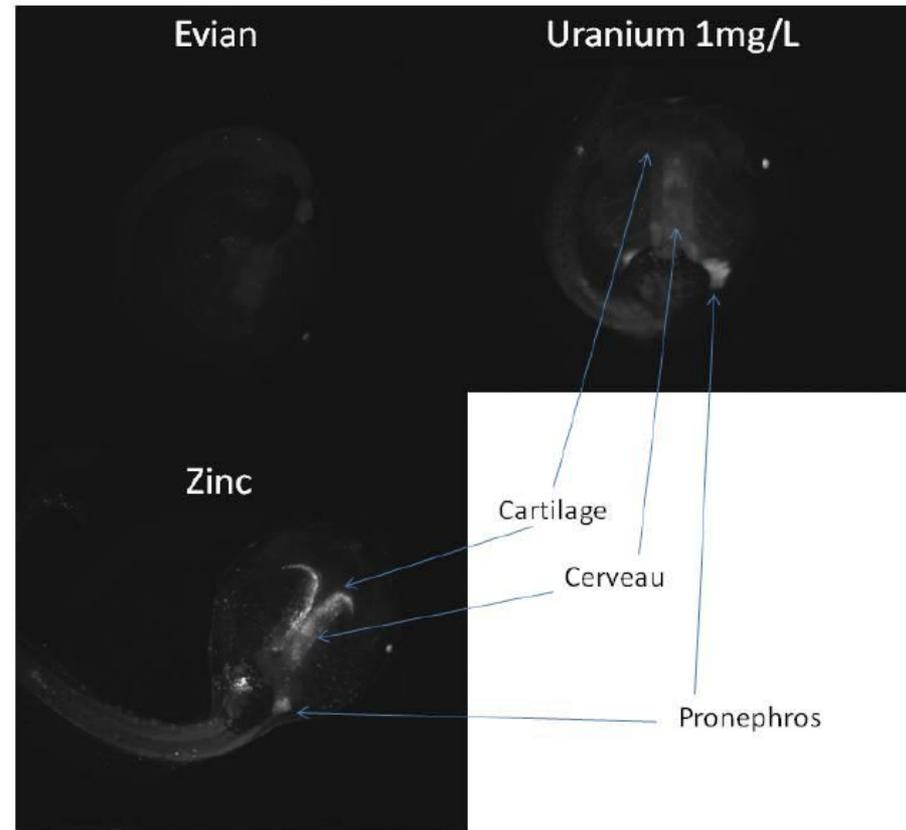
Pas de signal sur les tests opérés.



**Poursuite des essais sur les 6 fondateurs des lignées MTZF en élargissant la gamme d'exposition jusqu'à 7,5 mg/L.**

**Un faible signal sur la lignée MTZF E30 36228, dite « mâle 4 ».**

**La limite de sensibilité pour cette lignée a été estimée entre 0,5 et 1 mg/L.**



TRICASTIN

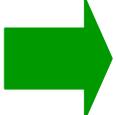
## 2<sup>ème</sup> collaboration AREVA-WATCHFROG

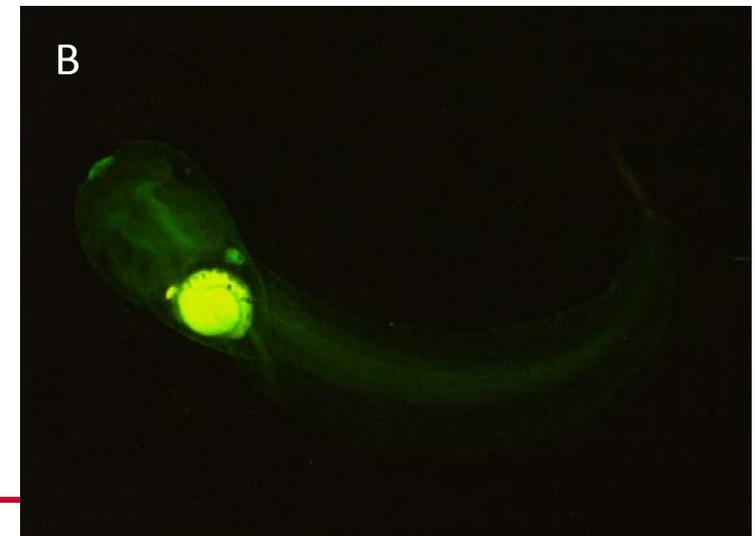
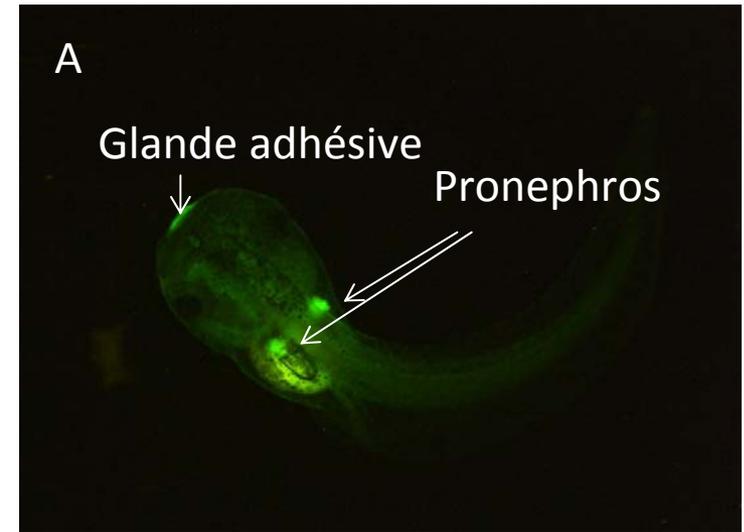
*Optimisation de la construction génétique MTZF pour développer une lignée répondant à des concentrations en uranium naturel avec une sensibilité de 50 µg/L*

- ▶ Réalisation de nouveaux biomarqueurs plus sensibles
- ▶ Augmentation de la sensibilité pour la lignée « mâle 4 »

# Intégration du système woodchuck



- ▶ WatchFrog a cloné un fragment plus long du promoteur pour augmenter le nombre d'élément de réponse aux métaux (10 MRE)
  - ▶ Le système « woodchuck » (WPRE) qui augmente la stabilité de l'ARN rapporteur GFP a été utilisé
  - ▶ La séquence de polyadénylation a été optimisée pour amplifier le signal
-  **Fluorescence plus faible chez les têtards F0 exposés à l'uranium mais non significatif. La génération F1 permettra de valider l'intérêt de cette lignée**



**TRICASTIN**

# Intégration du système « GAL 4 UAS »

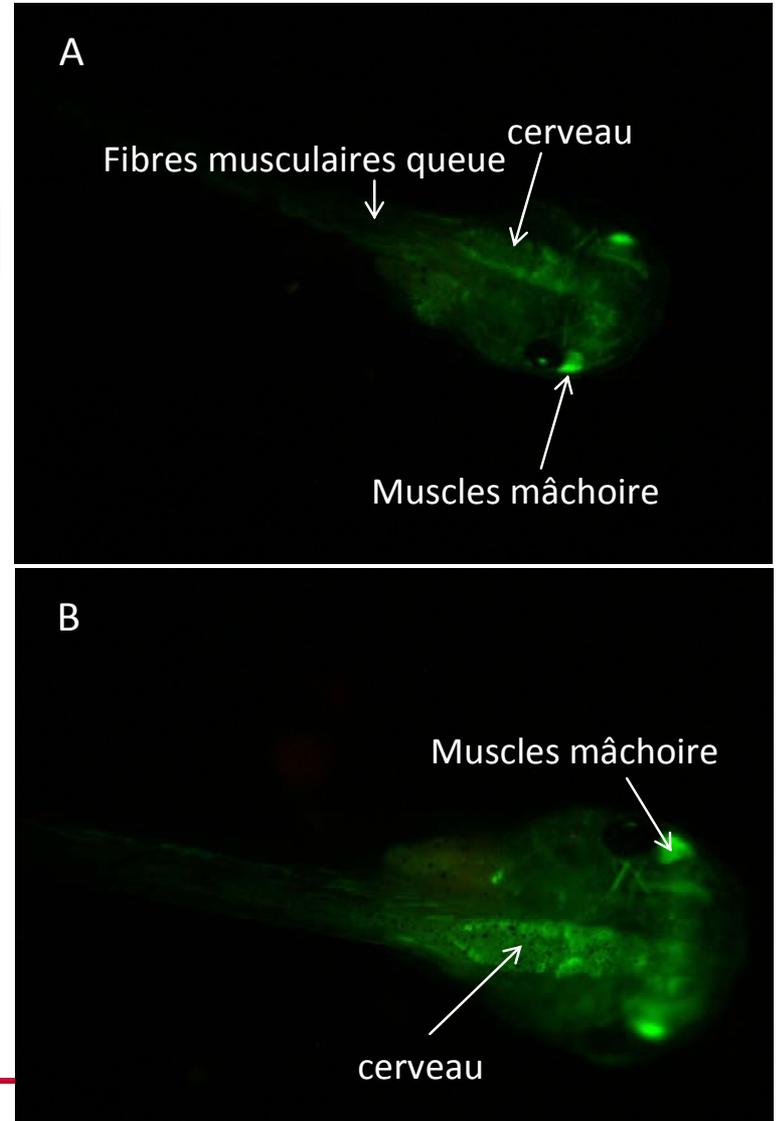


► WatchFrog a intégré le système GAL 4 UAS pour amplifier le signal



Fluorescence plus faible chez les têtards F0 exposés à l'uranium mais non significatif. La génération F1 permettra de valider l'intérêt de cette lignée

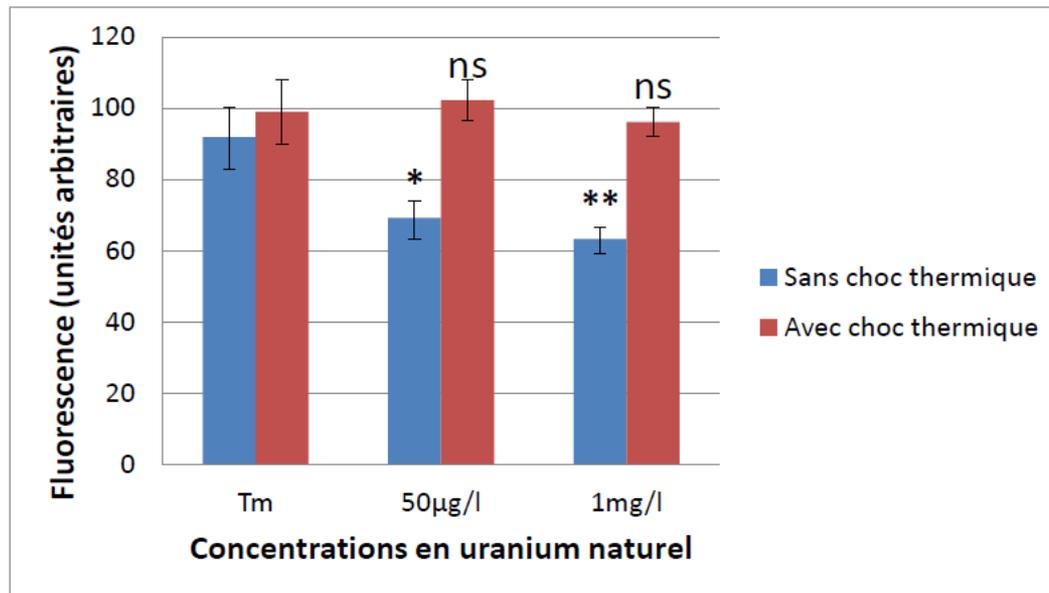
**TRICASTIN**



# Augmentation de la sensibilité pour la lignée « mâle 4 »

Le mâle 4 a été mis en accouplement avec des femelles sauvages mais les tests ont été retardés par la faible fertilité du sujet

L'application d'un nouveau protocole a néanmoins permis d'obtenir un niveau de sensibilité de 50 µg/L sur les larves F0.



# Bilan et perspectives

- ▶ **Des résultats encourageants ... mais qui ont nécessité de nombreux efforts et de la créativité par rapport au protocole expérimental initial !**
- ▶ **Des résultats à conforter avec la génération F1 issue du mâle 4 avant d'envisager d'engager une phase de test *in situ***
- ▶ **Pour la recherche de nouveaux biomarqueurs, une analyse du transcriptome est envisagée et parallèlement, des lignées GADD45 (Miller et al., 2004) sont testées par WatchFrog**

# GADD 45

Gène identifié comme potentiellement pertinent dans la bibliographie :

- GADD45 *Miller et al. 2004*

