



**HAL**  
open science

## Analyse et spéciation du tritium dans des matrices environnementales

Audrey Bacchetta

► **To cite this version:**

Audrey Bacchetta. Analyse et spéciation du tritium dans des matrices environnementales. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066026 . tel-00978875

**HAL Id: tel-00978875**

**<https://theses.hal.science/tel-00978875>**

Submitted on 14 Apr 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

**L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

ÉCOLE DOCTORALE : Chimie Physique & Chimie Analytique de Paris Centre

Par Audrey BACCHETTA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : Chimie analytique

**ANALYSE ET SPECIATION DU TRITIUM DANS DES  
MATRICES ENVIRONNEMENTALES**

Directeur de recherche : Jean AUPIAIS

Soutenue le : 28/01/2014

Devant la commission d'examen formée de :

|               |           |   |            |
|---------------|-----------|---|------------|
| Mme Valérie   | CABUIL    | Professeur, Université Pierre et Marie Curie      | Président  |
| M Eric        | ANSOBORLO | Expert international, CEA de Marcoule             | Rapporteur |
| M Michel      | FROMM     | Professeur, Université de Franche-Comté           | Rapporteur |
| Mme Catherine | LANDESMAN | Ingénieur de recherche, CNRS, Nantes              | Examineur  |
| M Jean        | AUPIAIS   | Directeur de recherche, CEA de Bruyères-le-Châtel | Directeur  |
| M Nicolas     | BAGLAN    | Ingénieur-chercheur, CEA de Bruyères-le-Châtel    | Encadrant  |



## Avant-propos

*Je ne pensais pas que les remerciements seraient finalement une partie difficile à écrire... Après trois années passées au laboratoire, je tiens, par ces quelques lignes, à remercier toutes les personnes qui ont participé et/ou contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*

*Je tiens d'abord à remercier les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse : Merci à Eric Ansoborlo et Michel Fromm d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'à Valérie Cabuil et Catherine Landesman d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Merci à Jean Aupiais d'avoir dirigé cette thèse et de s'être rendu disponible à chacune de mes demandes. Je te remercie d'avoir pris de temps de me former en relisant mes travaux, en me donnant des conseils avisés, toujours dans la bonne humeur.*

*Merci à Nicolas Baglan qui m'a fait découvrir le monde du tritium et qui m'a suivie au jour le jour. Je te remercie de m'avoir aidée à orienter mes travaux et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions. Merci également de m'avoir permis de faire des présentations, aussi bien en congrès que lors de réunions, pour mettre en avant mon travail mais également pour « me faire connaître ». Bref, merci de m'avoir prise sous ton aile et de la confiance que tu m'as accordée.*

*Je remercie Christophe Moulin, Fabien Pointurier puis Xavier Machuron-Mandard de m'avoir accueillie respectivement au sein de leur service et laboratoires.*

*Des remerciements tout particuliers à présent à l'équipe « tritium » telle qu'elle était à mon arrivée au laboratoire, et durant les deux premières années de cette thèse : merci pour votre accueil chaleureux, pour votre bonne humeur et votre soutien aussi bien technique que moral. J'ai eu de la chance de travailler dans votre équipe et notre petite virée à Balaruc restera un excellent souvenir. Je pense à Gilles Alanic, notre « Directeur de Montlhéry », avec qui j'ai passé de nombreuses heures sur la base militaire et qui a toujours été disponible pour mes petits problèmes pratiques. Tu vides le bureau 113 en même temps que moi alors je te souhaite une excellente retraite. Merci aussi à Florence Delage qui m'a encouragée à maintes reprises, vers qui j'ai pu me tourner à chaque fois qu'il me manquait quelque chose puisque « chez Flo, c'est comme chez casto... » et qui a toujours gardé sa bonne humeur et son franc-parler. Bonne continuation à toi ! Enfin un grand merci à Sidy Diallo qui a d'abord été mon « co-bureau » et qui est rapidement devenu plus qu'un collègue. Merci pour tes conseils aussi bien professionnels que personnels, merci d'avoir toujours répondu présent pour mes petits tracas quotidiens, merci d'avoir pris le temps de m'écouter, de me reconforter, de me remotiver. Ne plus se parler au quotidien va me manquer !*

*Merci aux personnes qui m'ont permis de réaliser mes travaux dans de bonnes conditions :  
Merci à Maxime Bridoux qui a pris le temps de me présenter l'« Orbitrap » et qui m'a laissée travailler en autonomie sur l'appareil. Merci aux membres du laboratoire de biogéochimie, biodisponibilité et transfert des radionucléides de l'IRSN à Cadarache, notamment Frédéric Coppin et Sylvie Pierrisnard avec qui j'ai pu réaliser les mesures de carbone organique total et de fluorescence.*

*Je veux également remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont bien intégrée dans leur équipe et qui m'ont donc permis de travailler dans de très bonnes conditions. Merci à Olivier Marie qui a eu la gentillesse de relire l'intégralité du manuscrit, et qui est donc parti à la recherche des virgules en trop, des « s » manquants et autres fautes diverses, et qui n'a pas hésité à me dire « non c'est trop lourd » ou « cette figure est moche, une thèse ça doit être beau »... Merci, entre autre, pour ta contribution à ce manuscrit. Je pense également à Amélie Hubert qui m'a beaucoup encouragée, et vers qui j'ai pu me tourner pour discuter de sujets à la fois professionnels et personnels, Gilles Le Coq qui m'a ouvert les portes du cercle de généalogie et qui m'a donné de nombreuses pistes pour mes recherches, Jean-Pierre Fontaine, avec qui j'ai également eu l'occasion d'échanger sur toutes sortes de sujets.*

*Une pensée toute particulière pour les « non-permanents » que j'ai croisé au cours de ces trois années : Benoît Brunel (Ah Benoît ! petit coquinou va !), Anne Salaün (merci de m'avoir considérée comme ton « poulain »), Mickaël Mendès, Colas Lelong, Tracy Millart, William Mourrier, Julien Roger... Bonne continuation à vous, aussi bien dans votre vie professionnelle que personnelle.*

*En dehors de ce cercle professionnel, je souhaite également remercier le côté privé sans qui il m'aurait été plus compliqué de parvenir à mes fins :*

*Merci à mes amis, notre « team Arpajon » qui m'a supportée et apporté soutien moral et bonne humeur. Je pense tout spécialement à Thibaut (encore « presque docteur » à l'heure où j'écris ces lignes...), ça fait un petit bout de temps maintenant qu'on se suit donc merci d'être toujours là pour moi. Merci Alex, Marie, Agnès et Vincent... pour nos grandes discussions animées et nos escapades rocambolesques qui m'ont sorti de mon quotidien et permis de penser à autre chose.*

*Merci à mes parents, Marine, Karine et Bastien qui me supportent au quotidien. Merci d'avoir toujours été derrière moi, de m'avoir poussée toujours plus loin et de croire en mes capacités plus que moi-même. Merci de m'avoir permis de faire mes études dans les meilleures conditions qui soient, trouvez dans ce travail toute ma reconnaissance. J'ai également une pensée pour mes grands parents, ceux toujours présents mais également ceux disparus qui sont toujours avec moi.*

*Enfin, Ted, je te remercie de m'avoir écoutée te répéter la même chose des dizaines de fois, de m'avoir soutenue et rassurée. Merci pour ta patience, tes encouragements et ta présence quotidienne.*

## Table des matières

|   |            |
|---|------------|
| <i>Avant-propos</i> .....   | 3          |
| <i>Table des matières</i> .....   | 5          |
| <b>Introduction</b> .....   | <b>7</b>   |
| <b>Etat de l'art</b> .....  | <b>11</b>  |
| <b>Démarche expérimentale</b> .....   | <b>51</b>  |
| Chapitre 1 : Stratégie analytique.....  | 52         |
| Chapitre 2 : Description des outils analytiques.....  | 70         |
| <b>Résultats</b> .....  | <b>89</b>  |
| Chapitre 3 : L'analyseur élémentaire : un outil pour l'analyse et la spéciation du tritium.....   | 90         |
| Chapitre 4 : Impact de l'échange labile sur la détermination de l'activité du tritium organiquement lié non échangeable.....  | 109        |
| Chapitre 5 : Etude de la spéciation du tritium.....   | 131        |
| <b>Conclusion et perspectives</b> .....   | <b>161</b> |
| <i>Références bibliographiques</i> .....  | 167        |
| <i>Annexes</i> .....  | 179        |
| <i>Annexe A : Outils analytiques et description des calculs</i> .....   | 180        |
| A.1. La scintillation liquide.....  | 180        |
| A.2. Analyse élémentaire : description des calculs et incertitudes.....   | 182        |
| A.3. Carbone organique total.....   | 183        |
| <i>Annexe B : Données relatives aux échantillons placés en échange labile et procédure expérimentale mise en œuvre</i> .....  | 186        |
| B.1. Compositions des échantillons cibles.....  | 186        |
| B.2. Analyse des molécules constitutives des échantillons par spectrométrie de masse : données de la littérature.....   | 190        |
| B.3. Echanges labiles : procédure expérimentale.....  | 193        |
| B.4. Données expérimentales.....  | 196        |
| <i>Annexe C : Résultats complémentaires</i> .....   | 197        |
| C.1. Qualification de l'analyseur élémentaire : Comparaison des droites d'étalonnage simples et de la droite d'étalonnage mixte pour les éléments C, N, S et O..... | 197        |
| C.2. Teneurs en carbone et azote des matériaux de référence certifiés déterminées avec les étalonnages simples et mixtes.....                                       | 199        |
| C.3. Détermination des fractions d'échantillon et de carbone solubilisées lors des échanges labiles réalisés dans les conditions « stomacales ».....                | 200        |
| C.4. Comparaison des compositions élémentaires des échantillons « non-ciblés » avant et après échange labile.....   | 202        |
| C.5. Evolution des compositions élémentaires des échantillons.....  | 205        |
| C.6. Spectres d'absorption UV-Visible des solvants d'échange labile des échantillons « non-ciblés ».....  | 207        |
| C.7. Spectres de fluorescence 3D des solvants d'échange labile des échantillons « non-ciblés ».....   | 209        |
| <i>Annexe D : Glossaire</i> .....   | 212        |
| <i>Annexe E : Communications scientifiques</i> .....  | 216        |



# Introduction

L'hydrogène est l'élément le plus abondant dans l'univers puisqu'il contribue pour  $\frac{3}{4}$  de sa masse. Sur Terre, l'hydrogène se trouve essentiellement sous forme d'eau mais il est également présent dans la matière organique comme dans la végétation, dans des roches sédimentaires telles que le charbon, ou même comme élément libre, à l'échelle de traces, dans l'atmosphère. Le cycle de l'hydrogène dans l'environnement est essentiellement associé au cycle de l'eau, mais également à de nombreux cycles de la biosphère (cycle du carbone et de l'oxygène : photosynthèse, respiration...). A l'état naturel, trois isotopes sont intégrés au cycle de cet élément dans l'environnement : le protium, constitué d'un proton (99,99 %), le deutérium, constitué d'un proton et d'un neutron (0,01 %) et le tritium, constitué d'un proton et de deux neutrons ( ${}^3\text{H}/{}^1\text{H} = 10^{-18}$ ). Ce dernier est la seule forme instable de l'hydrogène, et est le seul radionucléide pour lequel les prévisions de rejet dans les années futures sont en hausse (développement des réacteurs à fusion nucléaire notamment). Dès son rejet, le tritium intègre le cycle de l'hydrogène et est majoritairement retrouvé sous forme d'eau tritiée. Il est ensuite rapidement incorporé aux organismes vivants dans lesquels il est incorporé sous forme organique (tritium organiquement lié). Au sein même du tritium organiquement lié, diverses fractions peuvent être distinguées. Les définitions de celles-ci ne forment pas, à l'heure actuelle, de consensus puisqu'elles diffèrent en fonction de l'application considérée (analyse, dosimétrie) [Baumgartner et Donhaerl 2004 ; DeVol et Powell, 2004 ; Kim et al, 2013a]. Il est toutefois possible de distinguer une fraction dite « échangeable » en équilibre avec l'environnement de l'organisme et une fraction dite « non échangeable » qui n'évolue pas au cours du temps. Le tritium est donc omniprésent dans l'environnement et dans les systèmes biologiques.

L'intégration du tritium au sein des organismes vivants entraîne différents questionnements concernant son transfert à l'homme car les processus de transfert du tritium dans les réseaux trophiques sont dépendants de sa forme initiale qui doit donc être clairement définie. Un intérêt sociétal récent est porté au tritium, notamment suite à la parution de rapports faisant état de concentrations élevées en tritium, sous forme organique, dans des organismes marins. Une réévaluation du facteur de pondération du tritium pour le calcul des doses induites par celui-ci y est même préconisée [AGIR, 2007]. Ce facteur est un élément essentiel pour évaluer l'impact biologique du tritium sur l'homme. A la suite de ces rapports, l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) a publié un livre-synthèse des connaissances et points de vue techniques relatifs au tritium [ASN, 2010]. Dans ce cadre, des thèmes de recherche prioritaires concernant le tritium et ses différentes formes ont été définis : Quelles sont les formes de tritium retrouvées dans l'environnement ? Quel est le comportement du tritium dans l'environnement ? Y-a-t-il une accumulation de tritium dans les produits de la chaîne alimentaire ? Y-a-t-il une potentielle bioaccumulation du tritium dans les organismes vivants ? Quel est l'impact du tritium sur l'environnement et l'homme ? Faut-il

reconsidérer la radio toxicité du tritium ? Tous ces facteurs sont dépendants de la forme tritiée initiale. En effet, d'un point de vue analytique, la procédure expérimentale à suivre pour quantifier le tritium diffère en fonction de la forme (forme gazeuse, liquide, organique) considérée. De plus, les effets du tritium sur la santé sont différents en fonction de la forme à laquelle l'individu est exposé. En effet, si l'eau tritiée est évacuée en quelques jours par les organismes, les formes organiques de tritium peuvent quant à elles être incorporées aux molécules constitutives et persister dans les organismes. De ce fait, la caractérisation des formes physicochimiques du tritium est essentielle. Il est de plus impératif de connaître le comportement du tritium dans l'environnement (formes sous lesquelles il est retrouvé, circulation et dispersion dans l'environnement, incorporation à la matière organique...) pour estimer son impact dans les différents compartiments (temps de résidence, accumulation, dose...). Des questions persistent quant à l'impact du tritium sur l'homme, en fonction des nombreuses espèces chimiques dans lesquelles il peut être retrouvé. Les études concernant le tritium et plus particulièrement sous sa forme organique s'accroissent, avec notamment la création de groupes de travail internationaux visant à valider les procédures analytiques existantes et à établir un état des lieux des connaissances actuelles concernant le tritium organiquement lié [Baglan et al, 2013].

L'ensemble de ces interrogations justifie cette étude qui consiste à :

- (i) optimiser et valider la procédure analytique de détermination du tritium organiquement lié,
- (ii) identifier les molécules organiques, porteuses de tritium, responsables du transfert de ce radionucléide de l'environnement à l'homme, via la chaîne alimentaire, dans le but de mettre en évidence les processus de migration du tritium en fonction de sa forme.

La démarche a consisté dans un premier temps à mettre en place une stratégie analytique pour répondre aux différentes problématiques posées par les objectifs de ce travail (chapitre 1). En ce sens, le système dynamique de base de l'étude a été défini (l'échange labile, étape de séparation des fractions de tritium organique) et décrit (définition des conditions expérimentales). L'approche expérimentale adoptée est également présentée et, des propriétés inhérentes aux matrices étudiées, susceptibles d'être déterminantes pour l'interprétation des résultats, sont récapitulées. Dans un deuxième temps, les outils analytiques choisis pour caractériser les échantillons à chaque étape sont présentés (chapitre 2).

La composition élémentaire des échantillons environnementaux, et particulièrement leur teneur en hydrogène, est un élément essentiel pour optimiser l'analyse du tritium organiquement lié. Cette donnée est un point clé pour la détermination du tritium organiquement lié non échangeable. En

effet, en fonction de son évolution au cours de l'échange labile, le choix du pourcentage d'hydrogène à utiliser (avant ou après échange labile) peut biaiser le calcul des activités du tritium organiquement lié non échangeable. L'évolution des compositions globales des échantillons est quant à elle indicatrice des familles de molécules susceptibles d'être impliquées dans la migration du tritium. De ce fait, quel que soit l'objectif considéré, la première étape du travail expérimental a été le développement et la validation d'une procédure d'analyse pour la détermination des compositions élémentaires des échantillons (chapitre 3). Les objectifs de cette étape ont été (i) d'assurer la fiabilité de la méthode analytique développée, (ii) de définir la variabilité intrinsèque de l'analyseur élémentaire afin de discerner les variations provenant de l'appareil de mesure de celles inhérentes aux échantillons, et (iii) de définir les incertitudes entraînées par la méthode analytique pour le calcul des activités du tritium organiquement lié. Pour cela, l'outil a été qualifié en termes de linéarité de la réponse, de justesse des résultats de mesure et de fidélité de la méthode d'analyse. De plus, le développement de cartes de contrôles a été nécessaire afin d'assurer un suivi de l'outil et de définir des plages de travail optimales pour l'analyse des échantillons.

L'étape suivante a été d'utiliser cette méthode analytique, combinée à des mesures de carbone organique total, pour évaluer l'impact de l'échange labile sur la détermination des activités du tritium organiquement lié non échangeable (chapitre 4). Il a en effet été question de mettre en évidence une solubilisation de matière lors de l'échange labile ainsi qu'une modification, ou non, des teneurs en hydrogène des échantillons au cours de cette étape. Pour cela, des échanges labiles, réalisés dans des conditions expérimentales définies, ont été effectués sur un large panel d'échantillons. Les quantités d'échantillon et de carbone solubilisés ont été déterminées dans les solvants d'échange labile. De plus, les teneurs en hydrogène des matrices étudiées ont été comparées avant et après échange labile suivant des critères choisis.

La dernière étape de ce travail a été l'étude de la spéciation du tritium dans les échantillons issus de l'environnement, c'est-à-dire la différenciation des formes du tritium au sein de la matière organique (chapitre 5). L'objectif de cette étape a été l'identification des molécules solubilisées pendant l'échange labile. En effet, la compréhension des processus de migration du tritium dans l'environnement et chez l'homme passe par le suivi des molécules tritiées présentes dans ces milieux. Leur identification préalable est donc nécessaire. Pour cela, divers outils analytiques usuels (analyse élémentaire, spectrophotométrie UV-Visible, fluorescence) ont été combinés afin de cibler les identifications en formulant des hypothèses sur les familles de molécules concernées. La spectrométrie de masse haute résolution, permettant l'obtention d'informations unitaires sur les composés en solution, a ensuite été utilisée.

# Etat de l'art

# Le tritium, de l'environnement à l'homme

|   |    |
|---|----|
| <i>I. Généralités sur le tritium</i> .....  | 14 |
| I.1. Découverte du tritium .....  | 14 |
| I.2. Caractéristiques physicochimiques et radiologiques du tritium .....                                | 14 |
| I.3. Voies d'exposition des organismes au tritium.....  | 15 |
| I.3.1. Incorporation du tritium par inhalation .....  | 15 |
| I.3.2. Incorporation du tritium par ingestion.....  | 16 |
| I.3.3. Incorporation du tritium par absorption cutanée.....   | 16 |
| <i>II. Le tritium et ses différentes formes dans l'environnement</i> .....                              | 16 |
| II.1. Les origines du tritium dans l'environnement.....   | 16 |
| II.1.1. Les origines naturelles.....  | 16 |
| II.1.2. Le tritium issu des activités anthropiques.....   | 17 |
| II.1.2.1. Le tritium dispersé lors des essais nucléaires atmosphériques.....                            | 17 |
| II.1.2.2. Le tritium relâché par les installations nucléaires .....                                     | 18 |
| II.1.2.2.1. Les réacteurs de puissance et retraitement du combustible.....                              | 18 |
| II.1.2.2.2. Réacteurs dédiés à la production de tritium et autres installations .....                   | 18 |
| II.1.2.3. Importance relative des sources artificielles et naturelles.....                              | 19 |
| II.1.2.4. Futures sources de production de tritium .....  | 20 |
| II.2. Les différentes formes de tritium dans l'environnement et leur analyse.....                       | 21 |
| II.2.1. Le tritium sous d'eau tritiée .....   | 21 |
| II.2.1.1. Définition .....  | 21 |
| II.2.1.2. Analyse.....  | 21 |
| II.2.2. Le tritium sous forme gazeuse .....   | 21 |
| II.2.2.1. Définition .....  | 21 |
| II.2.2.2. Analyse.....  | 22 |
| II.2.3. Le tritium dans les organismes vivants.....   | 22 |
| II.2.3.1. Définitions.....  | 22 |
| II.2.3.1.1. Le tritium dans l'eau tissulaire des organismes .....                                       | 22 |
| II.2.3.1.2. Le tritium dans la matière organique .....  | 23 |
| II.2.3.1.3. Les différentes définitions des fractions tritium des organismes vivants ....               | 24 |
| II.2.2.1.3.1. Vision du dosimétriste .....  | 24 |
| II.2.2.1.3.2. Définition analytique.....  | 24 |
| II.2.2.1.3.3. Définition intégrant la disponibilité du tritium dans les macromolécules organiques ..... | 25 |
| II.2.3.2. Analyse.....  | 26 |
| II.2.3.2.1. Extraction de l'eau libre.....  | 27 |
| II.2.3.2.2. Séparation des fractions TOL-E et TOL-NE .....  | 27 |
| II.2.3.2.3. Extraction du tritium lié à la matière organique (TOL et TOL-NE) .....                      | 28 |
| II.2.4. Les molécules organiques tritiées .....   | 29 |
| <i>III. Circulation et transfert du tritium dans l'environnement et chez l'homme</i> .....              | 30 |
| III.1. Circulation du tritium dans l'environnement .....  | 30 |
| III.1.1. Dispersion du tritium après rejet dans l'atmosphère et dans les milieux aquatiques .....       | 30 |
| III.1.2. Transfert du tritium dans les sols.....  | 32 |

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| III.1.2.1.   | Absorption de l'hydrogène tritié par le sol .....                                      | 32 |
| III.1.2.2.   | Absorption de la vapeur d'eau tritiée par le sol .....                                 | 32 |
| III.1.2.3.   | Comportement des dépôts de tritium dans le sol .....                                   | 33 |
| III.2.       | Transfert du tritium dans la végétation .....  | 34 |
| III.2.1.     | Absorption de l'eau tritiée par la végétation .....                                    | 35 |
| III.2.1.1.   | Absorption de l'eau tritiée par voie racinaire .....                                   | 35 |
| III.2.1.2.   | Absorption de l'eau tritiée par voie foliaire .....                                    | 36 |
| III.2.2.     | Incorporation du tritium dans la matière organique .....                               | 37 |
| III.2.2.1.   | Incorporation du tritium organiquement lié échangeable .....                           | 37 |
| III.2.2.2.   | Incorporation du tritium organiquement lié non échangeable .....                       | 37 |
| III.2.2.2.1. | Formation du TOL-NE .....  | 37 |
| III.2.2.2.2. | Fractionnement isotopique .....  | 38 |
| III.2.2.2.3. | Translocation du TOL dans les plantes .....  | 38 |
| III.3.       | Transfert du tritium aux animaux et à l'homme .....                                    | 39 |
| III.3.1.     | Incorporation du tritium dans les animaux .....  | 39 |
| III.3.1.1.   | Absorption .....   | 39 |
| III.3.1.2.   | Elimination .....  | 40 |
| III.3.2.     | Le tritium dans l'alimentation humaine .....   | 40 |
| IV.          | <i>Impact du tritium sur les organismes vivants</i> .....                              | 41 |
| IV.1.        | Biocinétique des composés tritiés dans l'organisme .....                               | 41 |
| IV.2.        | dosimétrie du tritium .....  | 43 |
| IV.3.        | Effets biologiques du tritium .....  | 44 |
| IV.3.1.      | Effets cellulaires .....   | 44 |
| IV.3.2.      | Risque chez l'homme .....  | 45 |
| IV.3.3.      | Distribution du tritium organiquement lié dans les organismes .....                    | 45 |
| V.           | <i>Les principaux composants chimiques des produits de la chaîne alimentaire</i> ..... | 46 |
| V.1.         | Structure des aliments .....   | 47 |
| V.1.1.       | Structure de base .....  | 47 |
| V.1.2.       | Produits végétaux .....  | 47 |
| V.2.         | Les composants chimiques des produits alimentaires .....                               | 49 |
| V.2.1.       | L'eau .....  | 49 |
| V.2.2.       | Les lipides .....  | 49 |
| V.2.3.       | Les glucides digestibles et les fibres alimentaires .....                              | 49 |
| V.2.4.       | Les protides .....   | 50 |
| V.2.5.       | Autres composés .....  | 50 |

## I. GENERALITES SUR LE TRITIUM

### I.1. DECOUVERTE DU TRITIUM

Lord Rutherford utilise en 1934 le deutérium, identifié par H. Urey en 1932, pour bombarder une cible d'eau lourde. Il observe l'émission de neutrons et de protons, qu'il attribue à la formation d'un isotope de masse 3 de l'hélium ainsi qu'un isotope de masse 3 de l'hydrogène. Il suppose alors que le tritium est l'élément stable et que l'hélium est l'élément instable [Libby, 1973 ; Belot et al, 1996]. En 1939, Alvarez utilise la spectrométrie de masse et détecte un atome d'hélium-3 parmi un million d'atomes d'hélium-4 dans l'atmosphère, prouvant ainsi que l'hélium-3 est, soit un élément possédant une demi-vie radioactive conséquente, soit un élément stable [Alvarez et Cornog, 1939a ; Libby, 1973]. Il montrera par la suite que le tritium est bien un élément radioactif, et supposera par conséquent que l'hélium-3 détecté parmi l'hélium atmosphérique est issu de la production de tritium suite à l'action des rayonnements cosmiques sur l'air [Alvarez et Cornog, 1939b ; Grosse et al, 1951].

### I.2. CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES ET RADIOLOGIQUES DU TRITIUM

Le tritium est l'isotope radioactif de l'hydrogène. C'est un émetteur  $\beta^-$  avec une demi-vie radioactive de  $(12,312 \pm 0,025)$  ans [Bé et al, 2006] qui se désintègre en hélium-3 en émettant un électron de faible énergie.



La constante de décroissance du tritium est de  $5,6 \times 10^{-2} \text{ a}^{-1}$ , ce qui signifie que 5,6 % du tritium disparaît chaque année. Cette décroissance est relativement rapide par comparaison à d'autres radionucléides tel que l'uranium-238 ( $T_{1/2} = [4,468 \pm 0,005] \times 10^9$  ans, ce qui correspond à une constante de décroissance de  $1,55 \times 10^{-10} \text{ a}^{-1}$ ) [Belot et al, 1996 ; Bé et al, 2006].

L'énergie moyenne de la particule émise lors de la désintégration du tritium est de  $(5,68 \pm 0,01)$  keV et l'énergie maximale de  $(18,564 \pm 0,003)$  keV [Okada et Momoshima, 1993 ; M.-M. Bé et al, 2006].

La faible énergie de l'électron émis suite à la désintégration entraîne un parcours moyen dans l'eau de  $0,56 \mu\text{m}$  et des parcours maximums respectifs dans l'eau et dans l'air de  $6 \mu\text{m}$  et  $5 \text{ mm}$ .

L'activité d'un gramme de tritium est de  $(3,59 \pm 0,64) \times 10^{14} \text{ Bq}$ .

Les propriétés chimiques des isotopes étant identiques, la seule différence est liée aux propriétés physiques comme la masse. C'est le cas pour le tritium et le protium, pour lesquels les différences physiques ou biologiques sont essentiellement basées sur leur différence de masse. Les réactions chimiques impliquant l'hydrogène sont similaires quel que soit l'isotope considéré. Seules

les cinétiques de réaction sont impactées par la différence de masse entre les isotopes. Ainsi, les réactions impliquant le tritium sont plus lentes que celles impliquant le protium. Des phénomènes de ségrégation isotopique sont observés notamment lors des changements de phase de l'eau et entraînent un faible enrichissement en tritium par rapport au protium dans la phase la plus condensée [McFarlane et al, 1979 ; ASN, 2010]. En conditions naturelles, cette faible discrimination isotopique n'entraîne aucune accumulation de tritium qui puisse être significative [Belot et al, 1996].

### I.3. VOIES D'EXPOSITION DES ORGANISMES AU TRITIUM

Le tritium est classé parmi les radionucléides les moins radiotoxiques compte tenu de la faible énergie de l'électron émis suite à la désintégration [Delacroix et al, 2006]. Cette faible énergie entraîne un parcours moyen dans l'eau, et donc dans les tissus humains, relativement faible (6  $\mu\text{m}$ ). En comparant ce parcours moyen à l'épaisseur de la peau, composée de l'épiderme (épaisseur de 20 à 100  $\mu\text{m}$ ) et du derme (épaisseur de 1 à 3 mm), il apparaît rapidement que les électrons issus de la désintégration du tritium et émis à l'extérieur du corps ne franchiront pas cette barrière cutanée. Le tritium ne présente donc un risque radiologique que s'il est incorporé dans l'organisme [Okada et Momoshima, 1993]. Son incorporation par l'homme peut donc se produire après toute exposition à l'air, à l'eau ou à la nourriture contenant du tritium, c'est-à-dire par inhalation, ingestion ou absorption cutanée [Hill et Johnson, 1993]. La pénétration dans les tissus, les organes ou les fluides biologiques est plus ou moins rapide en fonction de la forme chimique initiale. En effet, en considérant la taille d'une cellule (entre 10 et 20  $\mu\text{m}$ ), l'atteinte au noyau dépendra fortement de la spéciation du tritium (eau tritiée plutôt pénétrante, molécules organiques tritiées avec des pénétrations différentes). Les composés tritiés suivent ensuite les mêmes mécanismes dans l'organisme que l'eau ou les substances non radioactives [Okada et Momoshima, 1993 ; Belot et al, 1996 ; Trivedi et al, 1997].

#### I.3.1. Incorporation du tritium par inhalation

L'incorporation par inhalation peut être considérée si le tritium se trouve sous forme gazeuse ou particulaire dans l'air. Usuellement, il peut être retrouvé sous forme de vapeur d'eau tritiée (HTO), d'hydrogène tritié (HT) ou de méthane tritié ( $\text{CH}_3\text{T}$ ) [ICRP, 1994 ; Hill et Johnson, 1993 ; Belot et al, 1996]. De toutes ces formes susceptibles d'être inhalées, seule la vapeur d'eau tritiée, à plus de 99 %, est transférée dans le sang. Le tritium gazeux étant peu soluble, seule une très faible fraction (environ 0,01 % de l'activité inhalée sous forme d'hydrogène tritié) est transférée dans le sang à travers les épithéliums respiratoires. Le méthane tritié inhalé n'est quant à lui guère plus transféré au sang (environ 1 % de l'activité inhalée). Divers composés peuvent être retrouvés dans l'air inhalé

sous forme d'aérosols ou de vapeurs (tritiures métalliques, peintures radioluminescentes) [Belot et al, 1996].

### I.3.2. Incorporation du tritium par ingestion

L'ingestion est le mode d'exposition au tritium dominant pour le public [ASN, 2010]. En effet, le tritium, sous forme d'eau tritiée ou de composés organiques tritiés, peut être incorporé suite à l'absorption d'aliments et d'eau contaminés par le tritium. Les composés organiques tritiés ingérés sont majoritairement dégradés par la digestion, et le tritium alors retrouvé sous forme d'eau tritiée suit le même métabolisme que l'eau corporelle. Une fraction mineure de ces composés organiques peut toutefois rester intacte et passer directement dans le sang [ICRP, 1979 ; Belot et al, 1996 ; ICRP, 2006].

### I.3.3. Incorporation du tritium par absorption cutanée

L'eau tritiée est très facilement absorbée à travers la peau quelle que soit sa forme liquide ou gazeuse, puis elle est rapidement transférée dans le sang. Dans une atmosphère contenant de la vapeur d'eau tritiée, il est estimé que l'absorption se fait pour un tiers par absorption cutanée et pour deux tiers par inhalation [Hill et Johnson, 1993 ; Belot et al, 1996 ; NCRP, 2006]. L'hydrogène tritié pénètre très peu dans la peau mais peut en revanche s'adsorber sur des surfaces inertes. Dans ce cas, un contact entre la peau et ces surfaces contaminées peut résulter en un transfert de tritium, sous forme HT, entre la surface contaminée et les cellules cutanées, suivi par une transformation de l'hydrogène tritié en HTO [Hill et Johnson, 1993 ; Belot et al, 1996].

Les composés organiques (huiles), les tritiures métalliques et les peintures radioluminescentes peuvent également conduire à une absorption cutanée [Hill et Johnson, 1993 ; Belot et al, 1996].

## **II. LE TRITIUM ET SES DIFFERENTES FORMES DANS L'ENVIRONNEMENT**

### II.1. LES ORIGINES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

#### II.1.1. Les origines naturelles

Le tritium est produit suite au bombardement des principaux constituants de l'atmosphère (azote, oxygène) par les neutrons issus du rayonnement cosmique [Grosse et al, 1951 ; Kaufman et Libby, 1954]. Les relations (2), (3) et (4) décrivent les principales réactions conduisant à la formation de tritium [Okada et Momoshima, 1993 ; Belot et al, 1996] :



Une très faible fraction tritium est produite naturellement dans la croûte terrestre par réaction des neutrons (issus de la fission spontanée de l'uranium et des réactions engendrées par le rayonnement alpha de l'uranium et du thorium) sur les traces de lithium  $^6\text{Li}$  contenues dans les roches [Kaufman et Libby, 1954 ; Belot et al, 1996].

L'inventaire naturel global du tritium est évalué à environ 3,5 kg ( $1,3 \times 10^{18}$  Bq), ce qui correspond à une production annuelle de 150 à 200 g ( $5,4$  à  $7,2 \times 10^{16}$  Bq), en supposant que la production équilibre la décroissance [Belot et al, 1996 ; Guétat et al, 2008].

## II.1.2. Le tritium issu des activités anthropiques

### II.1.2.1. ***Le tritium dispersé lors des essais nucléaires atmosphériques***

Entre 1945 et 1963, et principalement à partir de 1952, ont eu lieu la plupart des essais nucléaires russes et américains [Belot et al, 1996 ; Guétat et al, 2008]. Le tritium est un sous-produit des réactions se produisant lors des explosions thermonucléaires puisqu'il est formé, soit par interaction des neutrons rapides avec les constituants de l'air (engins à fission), soit suite aux réactions successives se produisant au moment de l'explosion (engins à fusion) [Belot et al, 1996]. Ces essais nucléaires ont libéré 650 kg de tritium dans l'environnement, dont 520 kg dans l'hémisphère nord et 130 kg dans l'hémisphère sud, quantité correspondant à 185 à 240 fois l'inventaire naturel global du tritium [Okada et Momoshima, 1993 ; Belot et al, 1996]. Compte tenu de la décroissance radioactive du tritium, l'inventaire global de tritium dû aux explosions nucléaires peut être estimé aujourd'hui à 35 kg, réparti pour 90 % en mer, 9 % dans les eaux continentales et environ 1 % dans l'atmosphère.

Avant les essais atmosphériques, les activités mesurées dans les eaux de pluie, les fleuves et les océans étaient respectivement de  $0,6 \text{ Bq.L}^{-1}$ ,  $0,3$  à  $0,8 \text{ Bq.L}^{-1}$  et inférieures à  $0,1 \text{ Bq.L}^{-1}$  [ASN, 2010]. Après l'arrêt des essais atmosphériques, la concentration en tritium dans l'eau de pluie moyennée dans l'hémisphère Nord a atteint  $150 \text{ Bq.L}^{-1}$  et a pu dépasser  $700 \text{ Bq.L}^{-1}$  localement, mais est restée inférieure à  $10 \text{ Bq.L}^{-1}$  dans l'hémisphère sud [Belot et al, 1996]. Elle est aujourd'hui de l'ordre de  $1 \text{ Bq.L}^{-1}$  [ASN, 2010].

## II.1.2.2. *Le tritium relâché par les installations nucléaires*

### II.1.2.2.1. *Les réacteurs de puissance et retraitement du combustible*

Les quantités de tritium rejetées dans l'environnement dépendent du type de réacteur nucléaire et de la quantité d'énergie fournie [ASN, 2010]. Pour tous les types de réacteurs de puissance, à l'exception des réacteurs à eau lourde (production de tritium à partir du deutérium), le tritium est produit principalement lors de la fission ternaire de certains isotopes de l'uranium et du plutonium dans le combustible. Cependant, le tritium ainsi formé reste confiné dans les gaines en alliage de zirconium des crayons de combustible, où il se trouve sous forme d'hydrure de zirconium [Belot et al, 1996 ; ASN, 2010]. Le tritium est donc principalement libéré lorsque le combustible est mis en solution lors de la phase de retraitement. Les installations de retraitement (La Hague, Sellafield) se situent généralement en bord de mer et rejettent essentiellement le tritium sous forme liquide dans le milieu marin. L'usine de La Hague rejette globalement 30 g de tritium ( $1 \times 10^{16}$  Bq) par an pour 1600 tonnes de combustible retraité. Les rejets atmosphériques ont une incidence mineure sur l'atmosphère et ne représentent qu'une fraction, inférieure à dix pour-cent, du rejet total de ces installations [Belot et al, 1996 ; Guétat et al, 2008].

Le tritium est également produit dans le fluide du système de refroidissement des réacteurs par activation neutronique d'éléments légers tels que le bore-10 et le lithium-6 qui servent respectivement à contrôler la réactivité en absorbant les neutrons et à contrôler le pH. Le tritium ainsi produit constitue la majeure partie des rejets des centrales nucléaires de production d'électricité (CNPE) dans le cadre de leur fonctionnement normal [Belot et al, 1996 ; Le Guen, 2008]. Dans le cas des réacteurs à eau lourde (filière canadienne CANDU), la production de tritium par activation neutronique du deutérium de l'eau lourde (de l'ordre de  $53650 \text{ TBq.GWe}^{-1}.\text{an}^{-1}$ ) dépasse de très loin la production de tritium dans le combustible lui-même (de l'ordre de  $520 \text{ TBq.GWe}^{-1}.\text{an}^{-1}$ ) [ASN, 2010]. Des rejets importants dans le milieu aquatique et dans l'air ne peuvent donc être évités [Belot et al, 1996].

### II.1.2.2.2. *Réacteurs dédiés à la production de tritium et autres installations*

Deux utilisations industrielles conduisant à une production de quantité significative de tritium doivent être mentionnées. La première concerne l'utilisation industrielle de tritium pour la production d'objets luminescents (éclairage...) contenant du tritium sous forme de gaz. Par exemple, une plaque luminescente « EXIT » peut contenir de 280  $\mu\text{g}$  à 1,4 mg ( $1 \times 10^{11}$  à  $5 \times 10^{11}$  Bq) de tritium [Guétat et al, 2008 ; ASN, 2010]. A ces fins, du tritium est produit dans des réacteurs nucléaires spécifiques par irradiation neutronique d'éléments fertiles tel que le lithium-6. La seconde utilisation concerne la production et l'utilisation de molécules marquées pour des applications médicales ou dans le cadre de recherches scientifiques. A titre d'exemple, les installations d'Amersham (GE

Healthcare), en Grande-Bretagne, rejettent de l'ordre de 1,4 g de tritium par an ( $5 \times 10^{14}$  Bq.an<sup>-1</sup>) avant les années 2000. Les rejets sont aujourd'hui de l'ordre de 0,3 g de tritium par an ( $1 \times 10^{14}$  Bq.an<sup>-1</sup>) [Guétat et al, 2008]. Il existe d'autres installations susceptibles de relâcher des quantités importantes de tritium dans l'environnement, tels que les centres de recherche civils et militaires et les entreposages de déchets tritiés. La quantité de tritium rejetée dans l'atmosphère à partir de ces différentes installations est de 5 g.an<sup>-1</sup> ( $1,80 \times 10^{15}$  Bq.an<sup>-1</sup>) pour la France [Belot et al, 1996]. Les « petits utilisateurs » de molécules marquées (hôpitaux, laboratoires pharmaceutiques, recherche en biologie...) produisent peu de rejets. Les stocks de déchets en France sont évalués à 1,4 g ( $5 \times 10^{14}$  Bq) [Guétat et al, 2008].

### II.1.2.3. *Importance relative des sources artificielles et naturelles*

Les rejets industriels se font en milieu aquatique (océans ou rivières), ou dans l'atmosphère. Les rejets en milieu aquatique sont très fortement dilués et influent peu sur le niveau de tritium dans les eaux de surface à l'échelle globale [Belot et al, 1996]. La production naturelle annuelle de tritium (200 g) reste cependant la source principale de production de tritium dans l'environnement (tableau 1).

**Tableau 1** : Bilan 2013 des quantités de tritium produites par an en fonction des principales sources passées et actuelles [Belot et al, 1996 ; Guétat et al, 2008 ; Glugla et al, 2007 ; Le Guen, 2008 ; ASN, 2010].

|  | Inventaire global (kg) | Quantité produite par an   |  |
|--|------------------------|----------------------------|--|
|  |                        | g / an                     | Bq / an  |
| Production naturelle   | 3,5                    | 200                        | $7,2 \times 10^{16}$   |
| Essais nucléaires  | 35                     | -                          | -  |
| Centrales nucléaires   |                        | (1) 0,03 (liquide)         | (1) $10 \times 10^{12}$ (liquide)                            |
| CNPE   |                        | (1) 0,0006 (gaz)           | (1) $0,2 \times 10^{12}$ (gaz)                               |
| (1) pour une production de 900 MWe.an <sup>-1</sup>  | -                      | (2) 0,08 (liquide)         | (2) $30 \times 10^{12}$ (liquide)                            |
| (2) pour une production de 1300 MWe.an <sup>-1</sup>                                       |                        | (2) 0,004 (gaz)            | (2) $1,3 \times 10^{12}$ (gaz)                               |
| CANadian Deuterium natural Uranium (CANDU), pour une production de 10 GWe.an <sup>-1</sup> |                        | 4,4 (liquide)<br>5,8 (gaz) | $1,6 \times 10^{15}$ (liquide)<br>$2,1 \times 10^{15}$ (gaz) |
| Retraitement du combustible (La Hague)   | -                      | 30 (liquide)<br>0,2 (gaz)  | $1 \times 10^{16}$ (liquide)<br>$7 \times 10^{13}$ (gaz)     |
| Réacteurs dédiés à la production de tritium et autres installations                        | -                      | 5                          | $1,8 \times 10^{15}$   |

#### II.1.2.4. **Futures sources de production de tritium**

Les gestions futures du combustible (taux de combustion plus élevés) dans les centrales nucléaires françaises conduiront à une augmentation de la production de tritium, à énergie produite égale, du fait du plus fort taux d'enrichissement en  $^{235}\text{U}$  (> 4,5 %). En effet, la production de tritium est essentiellement liée à l'énergie produite par le réacteur et au mode de gestion du combustible. Un taux d'enrichissement en  $^{235}\text{U}$  plus important nécessite d'augmenter la concentration en bore dans le circuit primaire pour compenser l'excès de réactivité du combustible. Le tritium étant essentiellement formé par activation neutronique du bore-10, l'augmentation de la concentration en bore-10 entraînera donc une production de tritium accrue. Avec les nouveaux combustibles, les rejets liquides de tritium seront d'environ 55 TBq/an (0,15 g/an) au lieu de 30 TBq/an (0,08 g/an) pour une production de 1300 MWe.an<sup>-1</sup> (tableau 1) [Le Guen, 2008].

Le réacteur EPR (European Pressurized Reactor), réacteur à eau sous pression, permettra une production de plus de 1600 MWe d'électricité et est actuellement en construction en France, en Finlande et en Chine. En France, les rejets de tritium dans les effluents liquides associés à ce réacteur seront un peu plus élevés que les rejets de la centrale déjà existante à Flamanville (environ 30 000 GBq/tranche), tandis que les rejets gazeux devraient être du même ordre de grandeur (environ 1000 GBq/tranche) [ASN, 2010].

De nouvelles installations dédiées à la recherche et au développement contribueront également à l'augmentation des rejets de tritium dans l'environnement. Les réacteurs à fusion et notamment le projet ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor), ayant pour objectif la maîtrise de l'énergie produite suite aux réactions de fusion nucléaire, entraîneront une utilisation et une production importante de tritium. En effet, à la fois consommateur et producteur de tritium, l'inventaire global maximal de l'installation serait de 4 kg, avec une consommation annuelle de l'ordre de 1 à 1,2 kg [Glugla et al, 2007 ; ASN, 2010]. Les rejets associés au projet ITER ne sont pas encore évalués mais pourraient être de l'ordre de quelques grammes par an (environ  $3,6 \times 10^{14}$  Bq/an). D'autres installations, notamment le laser mégajoule qui devrait utiliser et rejeter quelques milligrammes de tritium par an (environ  $3,6 \times 10^{11}$  Bq/an) [Guétat et al, 2008].

En considérant l'ensemble des rejets de tritium actuels et l'ensemble de ceux en prévision à moyen terme, une augmentation des rejets de l'ordre de 3 à 3,5 % surviendrait dans le futur. Néanmoins, la production naturelle demeurera la principale source de tritium dans l'environnement.

## II.2. LES DIFFERENTES FORMES DE TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT ET LEUR ANALYSE

En tant qu'isotope de l'hydrogène, le tritium peut être présent dans toute molécule hydrogénée, dans l'atmosphère, dans les eaux de surface ou dans la matière organique. Le tritium peut donc être retrouvé sous forme liquide dans les différents réservoirs d'eau de la planète (océans, eaux de surface, eaux de pluie...), sous forme gazeuse dans l'atmosphère ou à la fois sous forme aqueuse et solide incorporé dans la matière organique. L'analyse du tritium sous ses différentes formes passe par une étape de prélèvement de l'échantillon, puis par une étape d'extraction du tritium sous sa forme d'intérêt et enfin par sa mesure. La méthode utilisée de manière générale pour déterminer l'activité du tritium dans des échantillons environnementaux est la scintillation liquide (annexe A.1.) [Cassette, 2004]. La spectrométrie de masse est une méthode alternative basée sur la mesure de l'hélium-3 issu de la désintégration du tritium présent dans un échantillon [Jean-Baptiste et al, 1992 ; Wood et al, 1993 ; Cassette, 2004].

### II.2.1. Le tritium sous forme d'eau tritiée

#### II.2.1.1. **Définition**

Le tritium est rejeté majoritairement sous forme d'eau tritiée HTO dans les eaux de surface. Cette forme de tritium est la plus abondante dans le milieu naturel et dans les espèces vivantes [Belot et al, 1996].

#### II.2.1.2. **Analyse**

Dans les eaux continentales et marines, les échantillons sont généralement collectés de manière manuelle dans des récipients étanches. Les eaux, préalablement à leur mesure par scintillation liquide, peuvent être distillées pour éviter tout phénomène parasite (affaiblissement lumineux, chimiluminescence).

L'eau des précipitations doit être isolée de la vapeur d'eau atmosphérique pour limiter les échanges. De l'huile peut être ajoutée dans les collecteurs pour faire office de barrière entre l'eau de pluie et l'eau atmosphérique [Wood et al, 1993].

### II.2.2. Le tritium sous forme gazeuse

#### II.2.2.1. **Définition**

Le tritium est rejeté à l'état gazeux majoritairement sous forme de vapeur d'eau tritiée mais il est également retrouvé sous forme d'hydrogène tritié (HT) et de méthane tritié (CH<sub>3</sub>T) [Belot et al, 1996].

### II.2.2.2. Analyse

Dans l'air, le tritium atmosphérique peut être prélevé en mode dynamique par aspiration d'air, par des systèmes dits « barboteurs » utilisés pour piéger la vapeur d'eau tritiée et l'hydrogène tritié (figure 1).

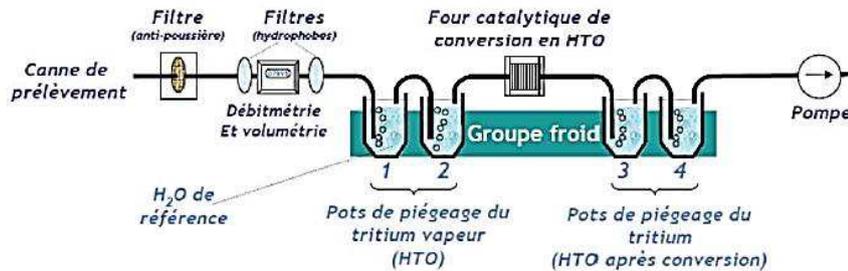


Figure 1 : Système de prélèvement du tritium atmosphérique de type « MARC 7000 » (SDEC) [AFNOR, 2011].

L'air est successivement entraîné, à débit constant connu pendant une période de temps déterminée, dans 4 flacons remplis d'un volume connu d'eau à très faible teneur en tritium. Les deux premiers flacons sont dédiés au piégeage de la vapeur d'eau tritiée atmosphérique par affinité chimique. L'air est ensuite entraîné dans un four contenant un catalyseur pour oxyder l'hydrogène tritié en eau tritiée. Cette dernière est ensuite collectée dans les deux derniers flacons [Wood et al, 1993 ; Belot et al, 1996]. L'eau des pots de piégeage est récupérée puis analysée par scintillation liquide (annexe A.1.). Les activités mesurées sont ensuite rapportées au volume d'air total échantillonné pour déterminer la concentration volumique d'eau tritiée dans l'air [Wood et al, 1993 ; Belot et al, 1996 ; AFNOR, 2011].

### II.2.3. Le tritium dans les organismes vivants

#### II.2.3.1. Définitions

Deux fractions distinctes de tritium dans les organismes vivants sont considérées. La première concerne le tritium présent dans le pool « eau tissulaire » de l'organisme et la seconde concerne le tritium directement lié à la matière organique. Cette fraction est elle-même subdivisée en deux fractions tritium en fonction de la nature de la liaison entre le tritium et les autres atomes.

##### II.2.3.1.1. Le tritium dans l'eau tissulaire des organismes

Le tritium peut être retrouvé, sous forme d'eau tritiée, dans les compartiments aqueux de tous les organismes vivants. Il constitue ainsi la fraction dite « tritium libre de l'organisme », plus communément appelée TFWT pour « Tissue Free Water Tritium ». Cette fraction est en équilibre permanent avec le tritium se trouvant dans son proche environnement.

### II.2.3.1.2. Le tritium dans la matière organique

Le tritium dans la matière organique, Tritium Organiquement Lié (TOL) ou « Organically Bound Tritium » (OBT), est le tritium incorporé directement dans les molécules organiques constitutives de la matrice considérée. Il est formé dans les organismes vivants à partir de l'eau tritiée et est issu de tout processus naturel ou biologique tel que la photosynthèse [Kim et al, 2013a]. Il est communément admis que le TOL peut être divisé en deux fractions en fonction du caractère fort ou faible de la liaison chimique entre le tritium et les autres atomes (figure 2).

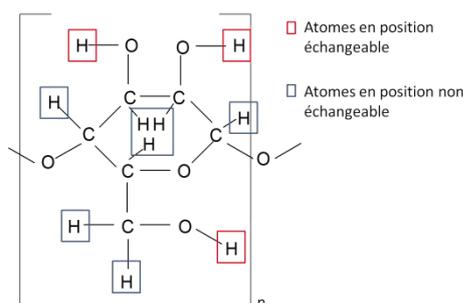


Figure 2 : Répartition des atomes d'hydrogène échangeables et non échangeables dans la cellulose.

La première fraction est relative au tritium substitué à un atome d'hydrogène et impliqué dans des liaisons à caractère labile. Il peut donc être lié à un hétéroatome, dans des groupements tels que  $-OH$ ,  $=NH$ ,  $-SH$ , à un halogène (F, Cl, Br...) ou être situé sur le carbone  $\alpha$  d'une cétone ou d'un aldéhyde énoisable  $-CO-CH_2-$  [Diabaté et Strack, 1993].

Dans ces liaisons covalentes faibles, les atomes d'hydrogène, et de tritium, sont en équilibre à tout moment avec ceux présents dans le milieu. Pour des organismes vivants, ces atomes sont en équilibre avec l'eau tissulaire et se comportent comme celle-ci [Thompson et Nelson, 1971 ; Guenot et Belot, 1984 ; Kim et al, 2013a]. La proportion exacte de ces positions dites « échangeables » peut varier en fonction des échantillons. Il a été montré, et calculé, qu'entre 20 et 30 % des atomes d'hydrogène des végétaux sont des atomes situés dans ces positions [Lang et Mason, 1960 ; Guenot et Belot, 1984 ; Yamada et al, 1992 ; Diabaté et Strack, 1993 ; Pointurier et al, 2004].

La deuxième fraction est la fraction relative au tritium substitué à des atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons avec des atomes de carbone ( $-C-H$ ). Ces liaisons sont stables, excepté en présence d'acides forts, de bases fortes ou de catalyseurs [Thompson et Nelson, 1971 ; Diabaté et Strack, 1993]. Le tritium ainsi lié ne peut être éliminé qu'après décomposition du composé organique auquel il est incorporé. Ces composés sont uniquement dégradés par l'intermédiaire de réactions métaboliques. Par conséquent, le temps de résidence du tritium lié aux atomes de carbone est beaucoup plus important que celui du tritium lié aux hétéroatomes [Kim et al, 2013a]. Le tritium impliqué dans des liaisons carbonées n'est pas soumis à échange avec les atomes d'hydrogène

environnants. Il est intégré dans les végétaux lors de la formation des molécules et est donc représentatif de la quantité de tritium présente dans l'environnement pendant cette période. Cette fraction est considérée comme un indicateur de la contamination au tritium dans le cas de rejets accidentels ou chroniques [Guenot et Belot, 1984 ; Pointurier et al, 2004]. Elle est notamment utilisée pour réaliser des suivis historiques des rejets de tritium en analysant les cernes d'arbres [Fuma et Inoue, 1995]. En moyenne 70 % du tritium lié à la matière organique se trouve sous cette forme [Belot et al, 1996].

#### *II.2.3.1.3. Les différentes définitions des fractions tritium des organismes vivants*

Les chercheurs s'accordent sur la définition des fractions tritium dans les organismes vivants décrite dans le paragraphe précédent, cependant, différentes visions concernant la répartition de ces fractions au sein de divers compartiments s'affrontent [Kim et al, 2013a].

##### II.2.2.1.3.1. Vision du dosimétriste

L'estimation de la dose induite par le tritium pour un individu est liée à la période effective du tritium au sein de l'organisme. Celle-ci dépend de la période radioactive et de la période biologique du tritium, qui est le temps nécessaire pour que la moitié du tritium soit éliminée par le corps. Cette période est dépendante de la forme chimique tritiée incorporée dans les organismes vivants, et elle est plus longue pour la forme tritium organique que pour la forme eau tritiée (paragraphe IV.1.1., biocinétique des composés tritiés dans l'organisme) [Hill et Johnson, 1993 ; ICRP, 1979]. La période effective est dominée par la période la plus courte entre la période radioactive et la période biologique (10 à 40 jours entre le tritium « libre » et le tritium organiquement lié). D'un point de vue dosimétrique, deux compartiments sont donc définis en fonction des temps de résidence du tritium dans les organismes : le tritium ayant un temps de résidence long, donc lié aux atomes de carbone, et le tritium ayant un temps de résidence court, soit la fraction TFWT et le tritium lié aux hétéroatomes [DeVol et Powell, 2004].

##### II.2.2.1.3.2. Définition analytique

D'un point de vue purement analytique, les formes de tritium dans les organismes vivants sont réparties en deux à trois fractions qui peuvent être séparées en appliquant un protocole simple [Baglan et al, 2005] :

- ✓ Le tritium dans l'eau constitutive de l'échantillon (TFWT),
- ✓ Le tritium organiquement lié (TOL), divisé en deux fractions :
  - Le tritium organiquement lié échangeable (TOL-E), pour les atomes de tritium situés sur les positions dites échangeables des molécules organiques,

- Le tritium organiquement lié non-échangeable (TOL-NE), pour les atomes de tritium impliqués dans les liaisons covalentes avec les atomes de carbone.

L'activité de l'eau libre d'un échantillon reflète la concentration instantanée de vapeur d'eau tritiée dans l'environnement. Le résultat de la mesure correspond à une « photographie » de l'activité de l'eau libre de l'échantillon, en équilibre avec son environnement et au moment de son prélèvement. Le TOL-E se comporte de la même manière que la fraction TFWT [Kim et al, 2013a]. L'activité TOL-NE reflète, quant à elle, l'activité intégrée dans l'organisme pendant sa croissance, avant son prélèvement.

Dans une étude récente visant à quantifier la proportion relative de TOL-E et TOL-NE, les auteurs ont montré que le pourcentage de TOL-E est dépendant de la nature de l'échantillon ainsi que des conditions d'exposition à la vapeur d'eau tritiée. Il peut ainsi s'étendre de 20 à 57 % de l'activité TOL [Kim et Korolevych, 2013]. Etant donné la proportion de positions dites échangeables (entre 20 et 30 %), la définition analytique ne permet pas d'expliquer l'étendue de la proportion relative de l'activité TOL-E par rapport à l'activité TOL.

#### II.2.2.1.3.3. Définition intégrant la disponibilité du tritium dans les macromolécules organiques

Il existe une vision définissant les fractions tritium organique en fonction de la disponibilité des atomes et non plus en fonction de la nature de la liaison chimique. Une partie du tritium organiquement lié, considérée comme échangeable, peut tout de même se comporter comme le tritium organiquement lié non échangeable. En effet, le tritium incorporé dans la sphère d'hydratation de macromolécules biologiques (protéines, cellulose...) ou situé sur des sites internes peut être piégé, voire bloqué par des interactions électrostatiques [Diabaté et Strack, 1993]. Dans ce cas, le tritium organiquement lié est défini par les auteurs comme étant la somme de deux contributions :  $TOL = CBT + XBT_{buried}$  où CBT fait référence au tritium lié aux atomes de carbone et  $XBT_{buried}$  au tritium lié à des hétéroatomes mais piégé dans la molécule [Baumgärtner et Donhaerl, 2004 ; Baumgaertner et al, 2009]. Le tritium « buried » n'est donc pas lié à un atome de carbone et n'est pas accessible pour être échangé avec des atomes d'hydrogène de l'eau, contrairement au tritium dit « rinsed »,  $XBT_{rinsed}$ , qui se comporte comme le TOL-E de l'analyste [Kim et al, 2013a].

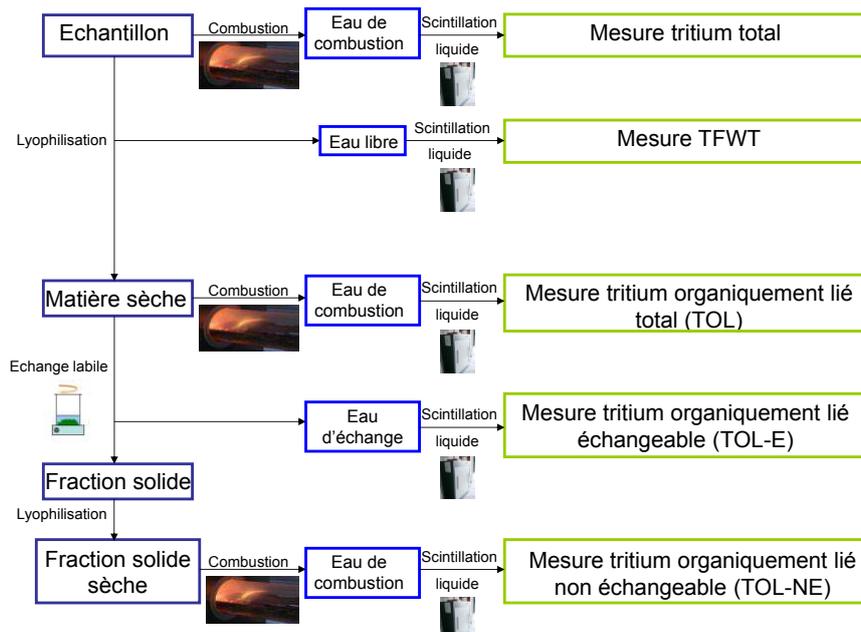
Des travaux récents ont montré que la prise en compte, ou non, de la fraction organique dite « buried » n'a pas ou peu d'influence sur la dose ou sur l'activité TOL mesurée. Les méthodes traditionnelles d'estimation de ces données ne nécessitent donc pas de changement particulier [Kim et al, 2008].

En présence de ces différentes définitions, il faut exprimer clairement l'appellation « tritium organiquement lié » et la nature de la fraction considérée. Dans cette étude, sauf indication contraire, le TOL, TOL-E et TOL-NE se rapporteront toujours à la définition analytique.

En considérant toutes ces définitions, il apparaît que la distribution du tritium organiquement lié au sein de la matière organique est conditionnée par la nature des liaisons chimiques dans lesquelles il est impliqué. Cependant, aucune de ces définitions ne tient compte des propriétés chimiques et biologiques des molécules portant le tritium. D'un point de vue macroscopique, le comportement du tritium organiquement lié dépend de sa capacité d'échange avec l'environnement : les temps de résidence dans les organismes sont liés à la nature faible ou forte de la liaison chimique. D'un point de vue microscopique, il faut s'intéresser à la nature même des molécules portant le tritium. En effet, quelle que soit la forme tritiée considérée (TOL-E, TOL-NE, CBT,  $XBT_{buried}$ ), le comportement du tritium dans l'environnement et chez l'homme (migration, temps de résidence...) est corrélé à celui de la molécule le portant. En raison de la grande variété de molécules ou réactions métaboliques dans lesquelles les isotopes de l'hydrogène peuvent être impliqués, la spéciation du tritium dans l'environnement est complexe. Le comportement du tritium organiquement lié est directement dépendant de sa forme et reste à ce jour mal connu.

### II.2.3.2. Analyse

L'analyse du tritium dans les organismes vivants nécessite l'extraction préalable des différentes fractions définies précédemment (figure 3).



**Figure 3** : Procédure de séparation des fractions tritium d'un échantillon biologique en vue de leur analyse au laboratoire (2013).

Les échantillons prélevés ne sont pas analysables immédiatement et sont donc stockés avant les phases d'extraction des fractions tritium. Les échanges isotopiques doivent être bloqués pour limiter toute perturbation de la signature isotopique de l'échantillon [Alanic et Le Meignen, 2008]. Les échantillons sont systématiquement emballés dans des sachets hermétiques et étanches pour les isoler de la vapeur d'eau atmosphérique. Ils sont ensuite congelés et conservés dans un congélateur jusqu'à leur traitement [Alanic et Le Meignen, 2008].

#### *II.2.3.2.1. Extraction de l'eau libre*

L'eau libre de l'échantillon peut être extraite par lyophilisation, distillation simple, distillation azéotrope, dilution ou séchage simple [Wood et al, 1993]. La lyophilisation est la technique recommandée par rapport à la distillation azéotrope ou à l'étuvage en raison notamment des risques de dégradation de la matière organique [CETAMA, 2013]. Elle consiste à congeler rapidement l'échantillon pour ensuite éliminer la majeure partie de l'eau constitutive du produit par sublimation [Marin et René, 2000 ; Belot et al, 1996]. Cette eau est ensuite récupérée pour la mesure.

La matière déshydratée récupérée peut ensuite soit être calcinée pour la mesure du TOL, soit être traitée afin de séparer les fractions TOL-E et TOL-NE.

#### *II.2.3.2.2. Séparation des fractions TOL-E et TOL-NE*

La propriété labile de la liaison tritium-hétéroatome est utilisée pour éliminer le tritium échangeable par échange isotopique avec de l'hydrogène « léger » [Baglan et al, 2010]. Le principe de cette opération, dite « échange labile », est de placer l'échantillon, préalablement séché, dans un bécher fermé et de l'immerger dans de l'eau non tritiée [Pointurier et al, 2003]. Ainsi, un équilibre isotopique entre le TOL-E et l'eau d'échange ajoutée en excès (facteur 10 environ) s'établit (relation 5).



Il a été montré que les activités TOL décroissent rapidement (quelques heures) après l'échange isotopique jusqu'à atteindre un palier équivalent au bruit de fond après 48h d'échange labile [Pointurier et al, 2004]. L'activité résiduelle en TOL-E dans l'échantillon solide est alors négligeable [Baglan et al, 2010]. A l'issue de cette étape, seule la fraction TOL-NE reste dans l'échantillon solide.

La séparation du TOL-E et TOL-NE peut également être effectuée par percolation de vapeur d'eau non tritiée sur l'échantillon sec. Dans ce cas, l'échantillon est placé sur un support, dans un flacon hermétiquement clos et contenant de l'eau non tritiée. Le système est chauffé, placé sous vide et l'eau est récupérée dans un piège froid [Baglan et al, 2008]. Cette méthode alternative permet de réduire drastiquement le facteur de dilution rendant la mesure du TOL-E dans l'eau d'échange labile délicate.

### II.2.3.2.3. Extraction du tritium lié à la matière organique (TOL et TOL-NE)

Les échantillons déshydratés, récupérés après extraction de l'eau libre et/ou après déshydratation de la matière organique collectée après échange labile, contiennent le tritium lié à la matière organique. En fonction de l'outil analytique utilisé pour la mesure du tritium, l'échantillon sec peut être traité de deux manières :

❶ Il peut être calciné pour extraire le tritium sous forme d'eau tritiée par oxydation à haute température. La combustion de l'échantillon sec est la méthode courante utilisée pour extraire le tritium lié à la matière organique. Cette fraction peut être extraite par combustion dans une bombe de Parr ou dans un four tubulaire en quartz [Belot et al, 1996].

Les échantillons introduits dans la bombe de Parr sont calcinés dans un système clos sous oxygène pressurisé et sont conditionnés sous forme de pastilles de 15 g maximum pour éviter toute réaction explosive [Belot et al, 1996 ; CETAMA, 2013]. L'eau de combustion extraite sous vide ou sous flux gazeux est condensée dans un ou plusieurs pièges froids [CETAMA, 2013]. Cette technique ne convient qu'à des masses relativement faibles d'échantillons. Pour des masses importantes d'échantillons environnementaux (plusieurs dizaines de grammes), les calcinations sont réalisées dans des fours à combustion sous courant d'oxygène. Ceux-ci consistent en un tube en quartz de diamètre suffisant pour le traitement de masses élevées (au minimum 20 g d'échantillon frais pour récupérer une masse d'eau de combustion minimale de 10 g pour sa mesure ultérieure). Ce tube est inséré dans deux unités chauffantes (figure 4) [Baglan et al, 2010]. L'échantillon est, quant à lui, placé dans une nacelle en quartz qui est introduite dans le tube en quartz.

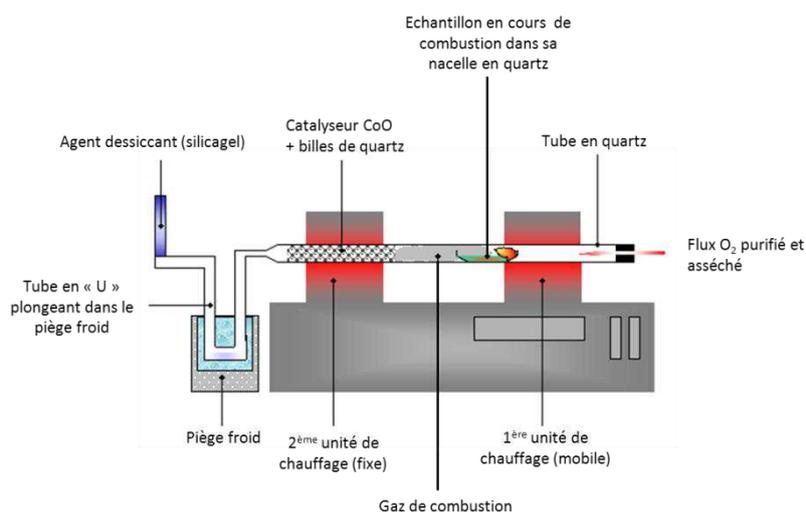


Figure 4 : Schéma de principe de la combustion des échantillons tritiés dans un four tubulaire [Baglan et al, 2010].

La première unité de combustion, mobile, permet une combustion complète et lente de l'échantillon. La deuxième unité permet l'oxydation catalytique des produits de combustion entraînés par un flux

d'oxygène sur un catalyseur, à base d'oxyde de cobalt et de grains de quartz. L'eau de combustion ainsi formée est récupérée dans un piège froid [Baglan et al, 2010].

Dans les deux cas (bombe de Parr et four à combustion), un traitement postcombustion de l'eau de combustion est nécessaire avant sa mesure. Il existe un appareillage spécifique (OXIDISER) permettant d'effectuer la combustion de l'échantillon dans une chambre à combustion, sous courant d'oxygène et qui conditionne de manière autonome l'eau récupérée pour sa mesure. Ce type d'appareil n'est cependant adapté qu'à de faibles prises d'essai (maximum 1 g) [CETAMA, 2013].

② Il peut être conservé dans un flacon en verre après l'avoir purgé de tout hélium atmosphérique pour la mesure du produit de décroissance radioactive du tritium, l'hélium 3 [Jean-Baptiste et al, 1992 ; Jean-Baptiste et al, 2010]. L'hélium-3 diffuse à travers les composés organiques et s'accumule dans le flacon de conservation pendant la durée de stockage. La teneur en tritium est alors déduite de la teneur en hélium 3 mesurée [Baglan et al, 2009 ; Jean-Baptiste et al, 2010]. Cette méthode est intéressante pour la détermination de teneurs en tritium environnementales proches des limites de détection des compteurs à scintillation liquide à bas bruit de fond (de l'ordre de  $1 \text{ Bq.L}^{-1}$ ) mais nécessite de longs temps de stockage, typiquement de 100 à 150 jours pour des matrices environnementales telles que les légumes, la végétation, l'herbe... [Jean-Baptiste et al, 2010].

#### II.2.4. Les molécules organiques tritiées

Les classifications « chimiques » de tritium organiquement lié (TOL-E, TOL-NE) ne tiennent pas compte du comportement biologique des molécules. Par exemple, en considérant du méthanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , liquide) dont tous les atomes d'hydrogène auraient été remplacés par du tritium, la définition « TOL-E et TOL-NE » nous indique que  $\frac{3}{4}$  de l'activité mesurée serait sous forme de TOL-NE. Cependant, quand du méthanol tritié est introduit dans des systèmes contenant des organismes vivants, l'assimilation du tritium à partir de celui-ci ne diffère pas de l'assimilation du tritium à partir de l'eau tritiée. Par conséquent, la présence d'une liaison stable carbone-tritium au sein d'un liquide n'est pas directement corrélée à une incorporation potentielle de tritium sous forme organique. Les composés comprenant ces liaisons doivent être disponibles pour la biosynthèse de molécules [Williams et al, 2001]. Ainsi, les molécules organiques tritiées sont définies comme étant des molécules organiques pouvant faire office de précurseur organique et sont directement rejetées dans l'environnement. Elles font notamment référence aux rejets aqueux issus des installations nucléaires comme l'installation GE Healthcare. Celle-ci synthétise des molécules marquées (acides aminés, acides gras, lipides, précurseurs d'acides nucléiques, glucides, prostaglandines, vitamines, stéroïdes, alcaloïdes...) pour l'industrie pharmaceutique. Ces composés, ainsi que de nombreux sous-

produits tritiés formés pendant la synthèse des produits commerciaux, sont susceptibles d'être retrouvés dissous dans les rejets aqueux [McCubbin et al, 2001 ; Taylor, 2007 ; Hunt et al, 2009].

### III. CIRCULATION ET TRANSFERT DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT ET CHEZ L'HOMME

#### III.1. CIRCULATION DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

##### III.1.1. Dispersion du tritium après rejet dans l'atmosphère et dans les milieux aquatiques

Le tritium est rejeté dans l'environnement majoritairement sous forme d'eau tritiée (HTO), et dans une moindre mesure, sous forme de tritium moléculaire (HT) et de méthane tritié (CH<sub>3</sub>T). Après rejet, qu'il soit liquide ou gazeux, le tritium sous forme d'eau tritiée est intégré dans le cycle géochimique de l'eau et est rapidement dilué dans les eaux de surface (ruisseaux, rivières, océans) ou par dispersion dans l'atmosphère [Momoshima et al, 1991]. Les grandes capacités de dilution de l'hydrosphère et de l'atmosphère réduisent la concentration moyenne de tritium à de très bas niveaux [McFarlane et al, 1979]. Le transport du tritium dans l'environnement (figure 5) peut être considéré comme identique à celui de l'hydrogène, et par conséquent, à celui de l'eau [Boyer et al, 2009].

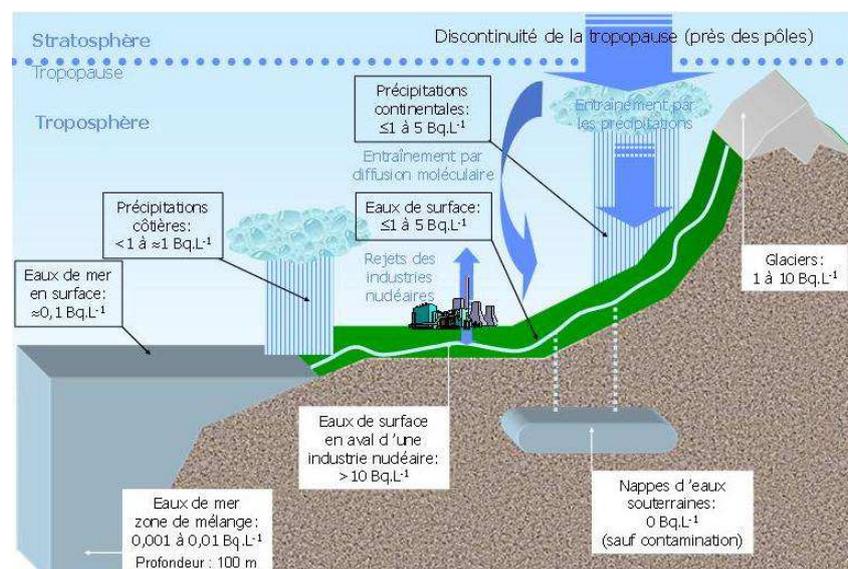
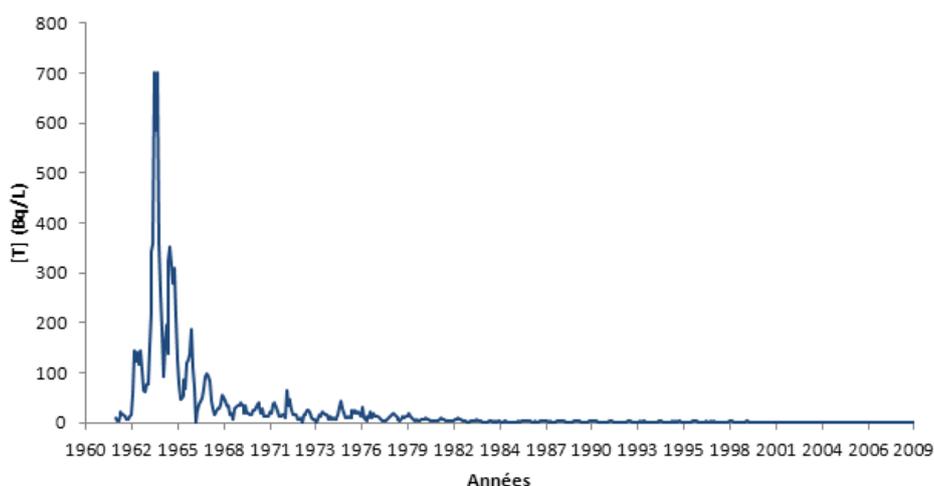


Figure 5 : Circulation et distribution du tritium dans l'environnement [Baglan, 2006].

Après l'injection de vapeur d'eau tritiée dans la stratosphère, le tritium est transporté vers la troposphère à travers la tropopause. Cette zone étant relativement étanche, le transfert se fait essentiellement au niveau des pôles où existent des discontinuités de la tropopause [Belot et al, 1996]. Les processus atmosphériques d'élimination du tritium, appelés les dépôts secs ou humides

en fonction de l'implication, ou non, de précipitations, et les échanges avec les molécules de surface entraînent ensuite la dispersion du tritium dans l'environnement.

Du fait de leur faible solubilité dans l'eau, les formes HT et CH<sub>3</sub>T sont essentiellement entraînées par dépôts secs, tandis que la vapeur d'eau tritiée, facilement échangée avec les gouttes de pluie, peut être entraînée à la fois par dépôts secs et humides. L'eau de pluie a ainsi été l'indicateur le plus sensible des grandes quantités de tritium injectées dans la stratosphère pendant les essais nucléaires atmosphériques [Momoshima et al, 1991]. L'impact de ces essais sur les concentrations en tritium retrouvées dans les eaux de pluie est clairement mis en évidence sur la figure 6. Des valeurs de concentrations peuvent en effet être trouvées sur le site officiel de l'AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique - <http://www.iaea.org/>), dans sa base de données GNIP (Global Network of Isotopes in Precipitations). Aujourd'hui, le niveau tritium mesuré dans l'eau de pluie est quasiment celui mesuré avant la période des essais nucléaires puisqu'une étude espagnole a montré en 2007 que l'activité tritium des eaux de pluie était inférieure à 0,6 Bq.L<sup>-1</sup> [Palomo et al, 2007].



**Figure 6** : Evolution de la teneur en tritium dans l'eau de pluie de 1960 à 2009 à Vienne, d'après les données AIEA (Global Network of Isotopes in Precipitations, the GNIP database).

Les océans ont collecté une grande partie du tritium relâché par les essais nucléaires atmosphériques sans pour autant voir leur concentration en tritium augmenter [Belot et al, 1996]. En effet, l'eau tritiée apportée par la pluie ou par échange avec l'atmosphère se dilue dans une zone de mélange pouvant s'étendre d'une centaine de mètres à quelques kilomètres, notamment dans l'océan pacifique ou la mer du Japon où il est reconnu que le tritium est distribué verticalement sur 1000 et 2000 m respectivement [Momoshima et al, 1991 ; Belot et al, 1996].

### III.1.2. Transfert du tritium dans les sols

Le comportement du tritium dans l'environnement, et notamment les processus de migration à travers les différents compartiments environnementaux, est conditionné par les processus de dépôt et de réémission (figure 7).

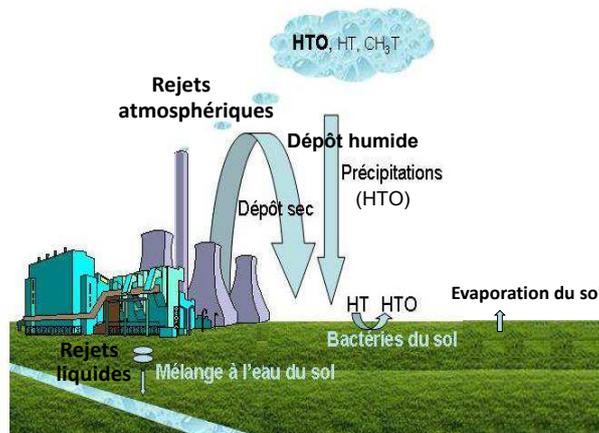


Figure 7 : Transfert du tritium dans les sols

#### III.1.2.1. **Absorption de l'hydrogène tritié par le sol**

L'apport au sol de tritium sous forme HT s'effectue par dépôt sec en raison de la faible solubilité de l'hydrogène dans l'eau. La vitesse de dépôt de l'hydrogène tritié sur les sols est liée au type de sol, à sa teneur en micro-organismes oxydants, en eau et en air. Le paramètre clé définissant la vitesse de dépôt est l'humidité du sol [ASN, 2010]. En effet, cette vitesse a tendance à diminuer lorsque la teneur en eau du sol augmente. Elle est généralement comprise entre  $10^{-5}$  et  $10^{-3}$  m.s<sup>-1</sup> [Belot et al, 1996 ; ASN, 2010]. L'hydrogène tritié, au contact du sol, diffuse dans un premier temps à travers les pores du sol puis est très rapidement, dans les premiers centimètres, oxydé et transformé en HTO (environ 1 % s<sup>-1</sup>). Cette oxydation est attribuée à des micro-organismes (bactéries, protozoaires, champignons...) produisant une enzyme oxydante (enzyme hydrogénase) [Belot et al, 1996 ; Galeriu et al, 2008 ; Boyer et al, 2009]. Le taux de conversion dépend de l'humidité et de la température du sol. Des expériences visant à définir les profils verticaux de concentrations d'hydrogène tritié dans les sols ont été menées et ont permis de définir une profondeur caractéristique de pénétration de l'hydrogène tritié dans les sols de l'ordre de 2,3 cm [Belot et al, 1996]. L'espèce HT, peu réactive, se retrouve donc sous forme d'eau tritiée, se mélange ensuite à l'eau du sol pour suivre tous les cheminements de l'eau sous forme liquide ou vapeur [ASN, 2010].

#### III.1.2.2. **Absorption de la vapeur d'eau tritiée par le sol**

L'eau tritiée peut être entraînée vers le sol par dépôt humide (précipitations) et infiltration directe dans le sol ou par dépôt sec. Ce dépôt sec consiste en l'absorption du tritium de la vapeur

d'eau atmosphérique par le sol, par l'intermédiaire d'échanges entre la vapeur d'eau tritiée arrivant à l'interface sol-air et la vapeur d'eau déjà présente dans les pores de la couche superficielle du sol [Belot et al, 1996 ; ASN, 2010]. Cet échange implique donc un transport de la vapeur d'eau tritiée jusqu'à la surface, un échange entre eau tritiée et eau légère et la diffusion de l'eau tritiée dans le sol. La vitesse de dépôt de la vapeur d'eau tritiée au sol dépend donc de la teneur en eau du sol et est généralement comprise entre 0,001 et 0,1 m.s<sup>-1</sup>, soit 10 à 100 fois plus élevée que celle de l'hydrogène tritié [Galeriu et al, 2008]. Cette vitesse diminue lorsque les concentrations en tritium de la vapeur d'eau atmosphérique et de la vapeur d'eau dans le sol s'équilibrent.

### III.1.2.3. **Comportement des dépôts de tritium dans le sol**

Tout le tritium déposé sur le sol s'intègre finalement au pool « eau du sol » et participe donc à tous les mouvements d'eau du sol, qu'il s'agisse d'évaporation, de transport vers les nappes profondes ou de transfert dans les plantes [Boyer et al, 2009].

La majorité de l'eau tritiée déposée au sol, entre 70 et 90 % selon une étude coréenne, est réémise dans l'air par évaporation [Choi et al, 2000]. Dans ce phénomène d'évaporation, les molécules d'eau tritiée sont indépendantes des molécules d'eau légère, et leur transport par diffusion est fonction de leur distribution initiale dans le sol et l'atmosphère. Lorsque la concentration en eau tritiée est plus grande dans le sol que dans l'atmosphère, le système va tendre vers un équilibre qu'il pourra atteindre avec une évaporation d'eau tritiée plus importante que d'eau légère [Belot et al, 1996]. Le taux de réémission de l'eau tritiée du sol dans des conditions stationnaires a été évalué à 1 % par heure [Belot et al, 1996]. Cette réémission est rapide dans les premières heures suivant le dépôt de tritium puis décroît exponentiellement avec une période de quelques jours [Boyer et al, 2009].

La fraction d'eau tritiée ne s'évaporant pas, elle peut être absorbée par les végétaux par voie racinaire et/ou migrer par diffusion dans les pores du sol. La concentration en eau tritiée de ceux-ci est un reflet de l'équilibre dynamique entre l'air et l'eau située dans les pores du sol suite à un rejet récent ayant eu lieu dans le proche environnement [Kim et al, 2012]. Le profil de concentration en profondeur évolue en fonction de l'absorption racinaire, de l'infiltration d'eau et de la diffusion. Des études sur des sols cultivés ont montré que l'eau tritiée peut migrer sur une profondeur de 30 cm, avec un maximum d'activité dans une couche de sol située à une profondeur de 5 à 10 cm (10 % de l'activité apportée) [Belot et al, 1996 ; Choi et al, 2007].

Une partie de l'eau tritiée du sol peut être utilisée pour la synthèse de la biomasse par les microorganismes, conduisant ainsi à l'intégration partielle de l'eau tritiée au sein de la matière organique [Boyer et al, 2009]. Une étude récente a ainsi montré que la majeure partie du tritium

sous forme TOL dans le sol se situe dans la couche supérieure de celui-ci (0-5 cm) et peut être un reflet des rejets tritiés atmosphériques [Kim et al, 2012].

### III.2. TRANSFERT DU TRITIUM DANS LA VEGETATION

La compréhension des processus d'intégration de tritium dans les plantes par le tritium est essentielle puisque les plantes chlorophylliennes sont à la base des chaînes alimentaires. Par conséquent, la compréhension des processus de transfert de ce radionucléide à l'homme passe par la connaissance de son intégration dans les végétaux. Le comportement du tritium dans les végétaux est déterminé par le fonctionnement hydrique du végétal qui conditionne l'absorption racinaire et foliaire de l'eau, par les divers échanges entre les différents compartiments tritiés ainsi que par la photosynthèse et les processus métaboliques [ASN, 2010]. La figure 8 représente le schéma global d'incorporation du tritium dans les végétaux à l'interface sol-plante-atmosphère.

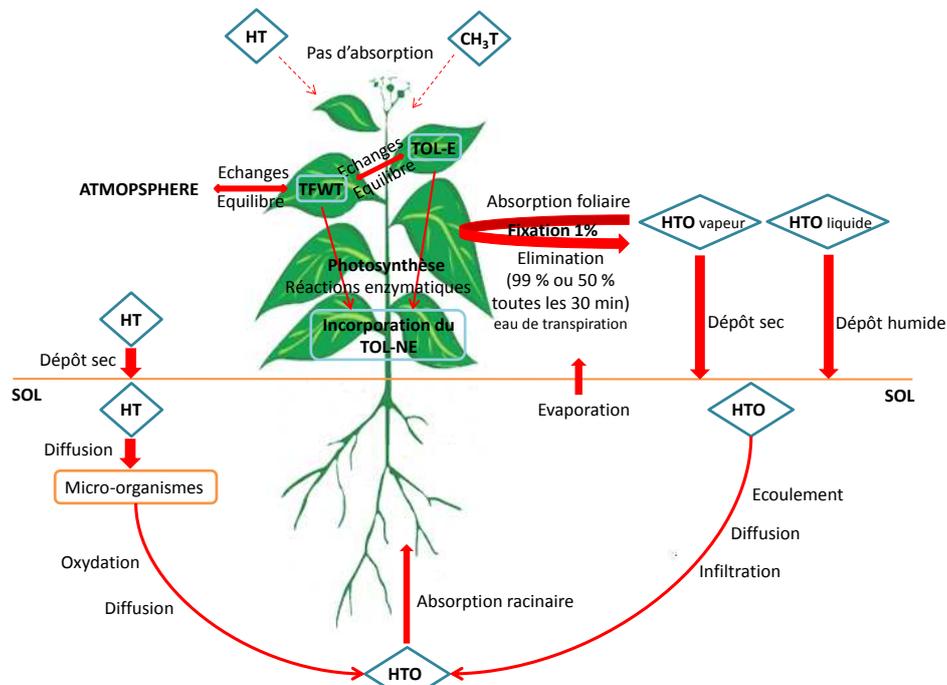


Figure 8 : Transfert du tritium de l'environnement aux végétaux.

Du fait de la très faible solubilité du tritium moléculaire dans l'eau, le tritium sous forme d'hydrogène tritié n'est pas absorbé par la végétation [Belot et al, 1996]. Son incorporation résulte donc de l'incorporation d'eau tritiée suite à l'oxydation de l'hydrogène tritié, soit dans le sol, soit directement sur les végétaux [McFarlane et al, 1979 ; Belot, 1986]. De même, l'exposition foliaire à du méthane tritié peut résulter en la contamination des plantes, mais, cette voie d'exposition est rare et généralement négligeable [McFarlane et al, 1979]. Seule la forme eau tritiée est donc susceptible d'être incorporée dans les végétaux et rejoint ensuite le pool « eau tissulaire » de la plante.

### III.2.1. Absorption de l'eau tritiée par la végétation

L'eau tritiée peut être incorporée dans les végétaux par le système racinaire à partir de l'eau tritiée contenue dans le sol, et/ou par échange avec la vapeur d'eau tritiée de l'atmosphère par l'intermédiaire des stomates (orifices de petite taille dans l'épiderme des végétaux permettant les échanges gazeux et lieu privilégié pour les processus photosynthétiques) présents sur les parties aériennes des plantes [ASN, 2010]. La concentration en tritium dans l'eau constitutive de l'organisme est donc liée à ces deux contributions. Pour certains auteurs, l'exposition d'une plante au tritium par voie racinaire est prépondérante par rapport à la voie foliaire puisque l'eau entre dans les plantes essentiellement par l'intermédiaire des racines. Par conséquent, la contamination des végétaux est principalement dépendante de la distribution et de la concentration de l'eau tritiée dans les sols [McFarlane et al, 1979]. Cependant, des études plus récentes ont montré que la contribution du sol au transfert de tritium vers la plante est en réalité très limitée tandis que la voie foliaire joue un rôle primordial dans l'absorption du tritium au sein du végétal [Boyer, 2009]. Les activités du tritium dans l'eau du sol ( $C_{\text{HTO sol}}$ ) de cette étude sont néanmoins relativement faibles puisque le rapport moyen  $C_{\text{HTO sol}}/C_{\text{HTO air}}$  est compris entre 0,21 et 0,30 pour les couches de sol supérieures. Par conséquent, l'apport de tritium au sein des organismes par le sol, via les racines, est limité et le tritium est essentiellement absorbé par les parties aériennes des plantes. D'autres auteurs se basent sur l'hypothèse selon laquelle le tritium dans l'eau de la plante a une origine essentiellement atmosphérique puisqu'il a été reporté que la contribution d'une contamination au tritium par voie atmosphérique est quatre fois supérieure à la contribution due au transfert de tritium par voie racinaire [Diabaté et Strack, 1997 ; Raskob, 1995]. Si la teneur en tritium dans les sols a pu être le facteur prépondérant pour la contamination des plantes dans les années 1970 – 1980, la diminution globale des concentrations en tritium dans l'environnement depuis lors tend à inverser cette tendance.

#### III.2.1.1. ***Absorption de l'eau tritiée par voie racinaire***

Plus de 99 % de l'eau entrant dans les plantes est absorbé par les racines, puis circule de celles-ci jusqu'aux feuilles où une partie s'évapore à travers les stomates [McFarlane et al, 1979]. L'autre partie de l'eau absorbée par les racines est diluée dans le pool d'eau du végétal (cellulaire et extracellulaire). L'exposition de la plante au tritium est largement dépendante de la concentration et de la distribution de l'eau tritiée dans le sol. La concentration du tritium dans l'eau des racines est ainsi sensiblement égale à sa concentration moyenne dans l'eau de la zone du sol où se développent les racines. De même, la durée de cette exposition est déterminée par le temps de résidence du tritium dans ce sol [McFarlane et al, 1979 ; Belot et al, 1996]. Le temps de résidence du tritium, absorbé du sol dans la végétation dépend de la taille, de l'âge, de la morphologie du végétal ainsi que

de la disponibilité de l'eau du sol et des conditions atmosphériques. Il peut varier de quelques minutes à plusieurs jours et est plus long lorsqu'une plante est cultivée sur un sol contaminé [McFarlane et al, 1979 ; Belot, 1986 ; Belot et al, 1996].

#### III.2.1.2. ***Absorption de l'eau tritiée par voie foliaire***

Le mécanisme de marquage des plantes le plus important suite à une exposition atmosphérique est un échange gazeux entre les stomates et l'atmosphère [Kline et Stewart, 1974]. L'absorption d'eau tritiée par les feuilles s'effectue essentiellement par transfert diffusif à travers les orifices stomatiques. Ce phénomène est principalement contrôlé par les conditions climatiques (température, humidité relative, lumière) et la physiologie de la plante (densité stomatale, âge des feuilles...) [Boyer et al, 2009 ; Galeriu et al, 2013]. Le flux de tritium à travers les surfaces foliaires est proportionnel à la différence des concentrations volumiques de la vapeur d'eau tritiée dans l'atmosphère et à la surface des feuilles [Belot et al, 1996]. La vitesse d'échange varie également en fonction des conditions d'ouverture et de fermeture des stomates. Les échanges gazeux sont donc beaucoup plus rapides en journée, lorsque les orifices sont ouverts, que la nuit lorsqu'ils sont fermés ou partiellement fermés [Kline et Stewart, 1974 ; Belot et al, 1996]. Il existe cependant, dans des conditions nocturnes, une incorporation d'eau tritiée non négligeable même si les stomates sont fermés [Galeriu et al, 2013]. A titre d'exemple, pour des jeunes plants de laitue, les taux d'incorporation d'eau tritiée par les feuilles dans les conditions nocturnes ou diurnes sont pratiquement équivalents [Boyer, 2009 ; Galeriu et al, 2013]. Ces taux sont dépendants du stade de développement des organismes puisqu'à maturité des laitues, le taux d'incorporation d'eau tritiée dans les conditions nocturnes est 88 % moindre que dans les conditions diurnes [Boyer et al, 2009 ; Galeriu et al, 2013].

Une fois à l'intérieur de la cavité stomatale, la vapeur d'eau est absorbée puis se mélange à l'ensemble des liquides du système [McFarlane et al, 1979]. L'activité de l'eau des feuilles des plantes reste toujours inférieure à la vapeur d'eau atmosphérique, même quand les expositions sont suffisamment longues pour arriver à un état d'équilibre dynamique. En effet, l'eau tritiée des feuilles est diluée par l'eau non-contaminée provenant du sol [Kline et Stewart, 1974 ; Belot et al, 1996]. L'élimination de l'eau tritiée des plantes dépend de la transpiration de celles-ci [Kline et Stewart, 1974]. Ainsi, la majeure partie du tritium des feuilles disparaît avec une demi-vie de 30 minutes [Belot et al, 1996]. Cependant, lorsque la transpiration est lente, le temps de résidence de l'eau tritiée à la surface évaporative est plus long, permettant ainsi la diffusion de l'eau à travers la surface et le transport de celle-ci dans d'autres portions de la plante [McFarlane et al, 1979].

### III.2.2. Incorporation du tritium dans la matière organique

Les plantes sont les principaux contributeurs à la formation du tritium organiquement lié, et les mécanismes d'incorporation du tritium diffèrent en fonction de la fraction échangeable ou non échangeable [Diabaté et Strack, 1993]. En effet, deux processus gouvernent l'incorporation dans la matière organique : les réactions d'échange entre l'eau tissulaire et les positions « hydrogène échangeable » et la photosynthèse [Guenot et Belot, 1984].

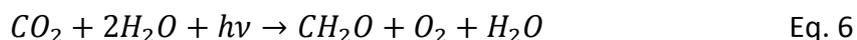
#### III.2.2.1. ***Incorporation du tritium organiquement lié échangeable***

Certains atomes de tritium initialement présents dans la fraction eau tissulaire de la plante peuvent se retrouver en position organiquement liée échangeable suite à des réactions d'échanges isotopiques dans les tissus végétaux [Belot, 1986]. Le taux d'échange dépend de la configuration de la molécule et de l'accessibilité des atomes d'hydrogène situés sur les positions dites échangeables. Les atomes d'hydrogène les plus accessibles peuvent être échangés rapidement en quelques secondes tandis que ceux situés à l'intérieur de macromolécules enroulées sur elles-mêmes ne sont échangés que très lentement [Belot et al, 1996]. L'incorporation du tritium sous forme échangeable se fait sans aucun fractionnement isotopique. La contamination avec l'eau tritiée entraîne un marquage uniforme de la fraction échangeable, et il a été montré que la fraction TOL-E est en équilibre avec l'eau tissulaire et se comporte de la même manière [Guenot et Belot, 1984 ; Diabaté et Strack, 1993].

#### III.2.2.2. ***Incorporation du tritium organiquement lié non échangeable***

##### III.2.2.2.1. *Formation du TOL-NE*

La voie principale d'incorporation de tritium au sein des diverses structures moléculaires organiques est la photosynthèse, dont l'équation bilan est rappelée dans l'équation 6 [Belot, 1986 ; IRSN, 2009a ; ASN, 2010].



La photosynthèse peut donc impliquer de l'eau tritiée pour former un sucre tritié (équation 7).



En moyenne, les glucides produits lors de la photosynthèse sont la cellulose et l'amidon (80-85 %), le sucrose (10-15 %) et le glucose (5 %) [Kim et al, 2002]. Des études ont montré que le tritium est incorporé 3 à 10 fois plus vite dans des conditions lumineuses que dans l'obscurité, prouvant ainsi que le tritium organiquement lié est majoritairement formé via la photosynthèse mais qu'il peut également être formé à la suite d'autres réactions, notamment des processus biochimiques comme des réactions enzymatiques, la respiration cellulaire ou le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) [Moses et Calvin, 1959 ; Thompson et Nelson, 1971 ; Guenot et Belot, 1984]. Lors de ces

études, indépendamment des conditions lumineuses considérées, du tritium organiquement lié est retrouvé dans de nombreuses molécules. Celles-ci sont les premiers produits de la photosynthèse et appartiennent à des familles de composés différentes (sucres, acides aminés, acides organiques) : glucose, fructose, sucrose, acide aspartique, acide glutamique, acide malique, acide citrique, acide succinique... Ces observations démontrent ainsi la grande capacité de dispersion du tritium dans les organismes auxquels il a été incorporé, et son incorporation probable dans des molécules plus complexes comme des protéines, lipides ou polysaccharides [Diabaté et Strack, 1993 ; Kim et al, 2013a]. La quantité de tritium incorporée à la matière organique dépend de l'état de développement de l'organisme au moment de la contamination, et la période biologique du TOL-NE est estimée à 25 jours [Choi et al, 2002 ; Choi et al, 2005 ; Korolevych et Kim, 2013].

#### *III.2.2.2.2. Fractionnement isotopique*

La différence de masse entre le tritium et l'hydrogène entraîne une discrimination isotopique non négligeable dans les processus chimiques et biologiques. Le tritium est défavorisé par rapport au protium dans les réactions enzymatiques d'incorporation de l'hydrogène sous forme non échangeable [Diabaté et Strack, 1993 ; Belot et al, 1996]. Par conséquent, les molécules organiques formées par réactions enzymatiques sont un peu appauvries en tritium par rapport à l'eau environnante [Belot et al, 1996]. A l'inverse, la pression de vapeur saturante de l'eau tritiée étant de 9 % inférieure à celle de l'eau légère, il est probable que, pour une plante en équilibre isotopique à l'interface sol-plante-atmosphère, et dans des conditions d'évaporation normales, la teneur en tritium de ses feuilles soit accrue de 9 % par rapport à l'eau légère [Garland et Ameen, 1979]. Lorsque le tritium ensuite incorporé est lié à un atome de carbone, la liaison est rompue beaucoup plus difficilement qu'une liaison C-H [Diabaté et Strack, 1993].

#### *III.2.2.2.3. Translocation du TOL dans les plantes*

Le phénomène de translocation conduit à la dispersion de molécules organiques tritiées dans l'organisme et vers des organes initialement non contaminés [Thompson et Nelson, 1971 ; Belot, 1986]. Le taux d'incorporation du tritium dans les différentes parties de la plante, et notamment dans les organes de stockage dépend du stade de développement de la plante et de la durée d'exposition. Il est plus grand lorsque l'exposition a lieu lors de la période de croissance de l'organisme (période végétative). Le renouvellement des molécules tritiées dans les organes de stockage est relativement lent, et le TOL-NE incorporé lors d'une simple exposition ne diminuera pas de manière significative tant que la plante n'aura pas été récoltée [Diabaté et Strack, 1993].

### III.3. TRANSFERT DU TRITIUM AUX ANIMAUX ET A L'HOMME

L'ingestion et l'absorption de vapeur d'eau par inhalation et par passage au travers de la peau sont les deux processus permettant l'incorporation du tritium dans les animaux, et par voie de conséquences, chez l'homme (figure 9) [ASN, 2010].

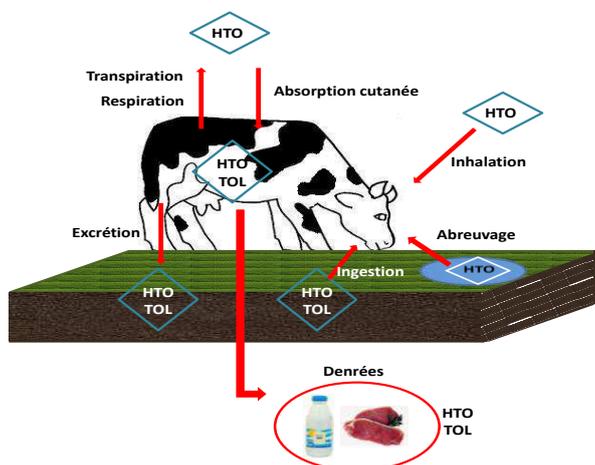


Figure 9 : Transfert du tritium dans la chaîne alimentaire (d'après [ASN, 2010]).

#### III.3.1. Incorporation du tritium dans les animaux

##### III.3.1.1. **Absorption**

L'hydrogène tritié étant peu soluble dans l'eau et dans les fluides corporels, son assimilation dans les organismes résulte principalement en son oxydation sous forme d'eau tritiée par les organismes l'inhalant. Il a notamment été montré que moins de 0,1 % de l'activité tritium présente dans l'atmosphère sous forme HT apparaît dans les fluides corporels de rats sous forme d'eau tritiée [Pinson et Anderson, 1950]. Le tritium peut donc être absorbé par les organismes sous sa forme eau tritiée ou sous sa forme tritium organiquement lié [Belot et al, 1996].

L'absorption de tritium par inhalation de vapeur d'eau tritiée est très importante puisque 99 % du tritium inhalé sous cette forme est retenu dans l'organisme. L'eau tritiée diffuse ensuite rapidement à travers toutes les membranes cellulaires et s'équilibre avec les fluides corporels en quelques minutes [Belot et al, 1996]. L'absorption transcutanée est à peu près équivalente à l'absorption par inhalation et est dépendante de la température de la peau. L'eau tritiée peut également être directement ingérée via l'eau de boisson ou l'alimentation. Elle apparaît ensuite en quelques minutes dans le sang, dans les divers organes, fluides et tissus du corps [Belot et al, 1996]. Une faible quantité de tritium, incorporée sous forme d'eau tritiée, peut être intégrée dans les molécules organiques des organismes sous forme de TOL-NE via des réactions enzymatiques.

Le tritium peut également être ingéré directement sous sa forme organiquement liée par l'intermédiaire de nourriture tritiée. Le tritium ainsi incorporé peut être oxydé sous forme d'eau

tritiée ou suivre les mêmes processus métaboliques que les molécules non-tritiée auxquelles il est lié [Belot et al, 1996]. Par conséquent, l'identification de ces molécules porteuses de tritium est essentielle pour avoir une meilleure appréhension de la distribution et du devenir du tritium dans l'organisme humain.

Le pourcentage de tritium incorporé dans la matière organique est significativement plus élevé suite à l'ingestion de nourriture tritiée (4,1 à 4,2 %) que suite à l'ingestion d'eau tritiée (0,3 à 0,7 %) mais reste relativement faible [Belot et al, 1996]. Il a été montré dans des études sur des rats et des porcs nourris avec de la nourriture contaminée et de l'eau tritiée que le tritium organiquement lié n'était pas distribué de manière homogène parmi les différents organes. De plus, au sein même d'un simple organe, le TOL a été retrouvé de manière non uniforme dans les différents constituants de celui-ci, comme dans les acides aminés [König, 1990].

#### III.3.1.2. *Elimination*

Le tritium est généralement éliminé du corps des animaux sous forme d'eau tritiée (urines, fèces, vapeur d'eau exhalée, transpiration). La relation entre le volume d'eau dans l'animal et la perte d'eau journalière est le facteur déterminant du temps de renouvellement du tritium dans le corps une fois que l'animal a été contaminé. Habituellement, 97 % du tritium est éliminé avec une demi-vie de quelques jours (10 jours) [ICRP, 1979]. Le reste du tritium, correspondant à la fraction tritium organique est éliminé avec des demi-vies plus longues, de quelques dizaines (40 jours) à quelques centaines (350 jours) de jours, selon le métabolisme des molécules organiques tritiées [ICRP, 1979 ; Belot et al, 1996 ; Taylor, 2003].

#### III.3.2. Le tritium dans l'alimentation humaine

L'incorporation du tritium, à partir de la chaîne alimentaire, par l'homme est déterminée par le métabolisme de l'hydrogène dans le corps humain. Bien que la proportion massique de l'hydrogène dans le corps humain ne soit que de 10 %, il représente en réalité plus de 60 % de ses atomes constitutifs. Un « homme standard » (70 kg) [ICRP, 1975] est ainsi constitué de 7 kg d'hydrogène, dont 68 % sous forme aqueuse [Garland et Ameen, 1979]. Chaque jour,  $2,1 \times 10^{26}$  atomes d'hydrogène (350 g d'hydrogène) ou 5 % de la totalité des atomes d'hydrogène du corps participent aux divers processus métaboliques. La possibilité d'une substitution d'un atome de tritium à un atome d'hydrogène est donc d'un intérêt majeur puisque le tritium sera susceptible d'être impliqué dans tous les processus métaboliques corporels [König, 1990].

La voie principale de transfert du tritium organique à l'homme est son incorporation suite à l'ingestion de nourriture contaminée. Certains auteurs s'intéressent donc aux teneurs en tritium des produits de l'alimentation, et ont notamment évalué les activités en eau libre et tritium

organiquement lié d'un large panel de denrées européennes. Celles-ci s'échelonnaient de 1 à 4 Bq.L<sup>-1</sup> dans des échantillons tels que des endives ou du camembert [Hisamatsu et al, 1990].

L'incorporation du TOL dans le corps humain et dans les organes dépend de la forme chimique initiale de ce dernier puisque la nature de la liaison chimique entre le tritium et les autres atomes conditionne son comportement [König, 1990]. Dans la plupart des cas, il ne s'agit que de tritium organiquement lié non échangeable. En effet, le tritium organiquement lié échangeable est facilement éliminé suite à des échanges isotopiques qui ont pu se produire lors du stockage des denrées dans une atmosphère non contaminée ou lors du traitement de celles-ci (rinçage notamment) [Diabaté et Strack, 1993]. Une importante fraction du TOL ingérée est oxydée suite à des processus métaboliques en HTO et rejoint donc le pool eau libre corporelle. Une autre fraction peut participer aux divers processus métaboliques et être transformée en un autre type de tritium organiquement lié. La fraction organique des aliments est principalement constituée de protéines à haut poids moléculaire, de sucres et de graisses. Ces molécules sont digérées après ingestion, c'est-à-dire réduites à de plus petites molécules (acides aminés, monosaccharides, acides gras, nucléotides) suite aux processus hydrolytiques. Ces molécules sont ensuite transférées, via le flux sanguin, aux organes qui les utiliseront pour divers processus métaboliques. Ainsi, une partie du TOL-NE ingéré est utilisée pour la production d'énergie, résultant en la production d'adénosine-5'-triphosphate (ATP), de dioxyde de carbone et d'eau tritiée. Cette eau est ensuite intégrée au pool d'eau corporelle et se comporte donc comme celle-ci (temps de résidence). Une autre fraction est utilisée pour la synthèse de composants fonctionnels du corps tels que des enzymes, des hormones ou des sécrétions corporelles, la plupart de ces composés étant des protéines. Enfin, une dernière fraction du TOL-NE ingéré est utilisée pour la synthèse de réserves corporelles, et particulièrement les graisses dans les tissus adipeux. Dans ces deux derniers cas, le TOL-NE est susceptible d'être utilisé à tout instant pour la synthèse de nouvelles molécules, d'être sécrété ou d'être stocké et de perdurer dans les organismes [Diabaté et Strack, 1993 ; Taylor, 2007 ; Hunt et al, 2009].

#### **IV. IMPACT DU TRITIUM SUR LES ORGANISMES VIVANTS**

##### **IV.1. BIOCINETIQUE DES COMPOSES TRITIÉS DANS L'ORGANISME**

Le comportement du tritium incorporé dans les organismes est fonction de sa forme chimique initiale. Ainsi, la biocinétique des molécules marquées dépend de la structure chimique et de la position du tritium dans la molécule.

L'eau tritiée est la forme majoritairement incorporée dans les organismes, et même si l'hydrogène tritié peut s'absorber par voie transcutanée ou si le tritium peut être ingéré par l'intermédiaire de composés organiques tritiés, la forme majoritaire résultant des mécanismes d'oxydation et des différents processus métaboliques reste l'eau tritiée. L'eau tritiée incorporée par un organisme vivant se comporte de la même façon que l'eau constitutive de l'organisme. Elle diffuse à travers les membranes cellulaires et s'équilibre rapidement avec les fluides corporels pour être répartie de manière homogène dans le corps. L'eau tritiée est retenue dans l'organisme avec une période biologique d'une dizaine de jours, période correspondant au renouvellement de l'eau libre corporelle. Elle est ensuite éliminée normalement par la transpiration, par l'air expiré et par l'excrétion urinaire [Hill et Johnson, 1993 ; Belot et al, 1996 ; Trivedi et al, 1997 ; ASN, 2010].

Le tritium sous forme organique est toutefois à considérer dans les organismes. En effet, une faible fraction d'eau tritiée (3 %) contribue aux synthèses organiques intracorporelles, entraînant ainsi l'incorporation du tritium dans des molécules organiques telles que des protéines, des sucres... De plus, des composés organiques tritiés peuvent être directement incorporés par ingestion ou inhalation de composés organiques volatils. Il est considéré que 50 % du tritium ingéré sous forme organique sont transformés en HTO mais que 50 % restent sous cette forme organique [Galeriu et al, 2005 ; IRSN, 2009b]. Ces composés entrent ensuite dans le sang puis peuvent être utilisés en tant que précurseurs pour des réactions métaboliques, voire être incorporés dans les composants des organes. L'incorporation dans les tissus corporels est plus ou moins importante selon le composé chimique considéré puisque la distribution du tritium et son temps de résidence varient en fonction du taux de dégradation métabolique de la molécule considérée. Ces formes de tritium organique sont retenues à plus long terme dans les organismes et le modèle biocinétique actuel considère deux compartiments ayant des périodes biologiques respectives de 40 (entre 21 et 76) et de 450 (entre 280 et 550) jours. En effet, certains composés tritiés peuvent suivre le taux de renouvellement du carbone dans l'organisme, estimé à 40 jours [ICRP, 1979] . D'autres peuvent être incorporés dans des composés de type collagène, lipides ou dans le cerveau et demeurer plus longtemps dans les organismes [Hill et Johnson, 1993 ; Okada et Momoshima, 1993 ; Belot et al, 1996 ; Galeriu et al, 2005 ; IRSN 2009b].

Dans une étude récente [Hunt et al, 2009], des mesures d'eau tritiée et de tritium sous forme organique dans des excréments d'individus ont été effectuées sur une période de 100 à 150 jours. Ces volontaires ont été exposés au tritium suite à l'ingestion de poissons (soles) tritiés et ont éliminé le tritium avec une période de 4 à 11 jours, valeurs en accord avec la période biologique de 10 jours pour l'élimination de l'eau tritiée préconisée par la CIPR (Commission Internationale de Protection Radiologique). Ainsi, les individus ont incorporé du tritium par l'intermédiaire de soles dans

lesquelles les concentrations en tritium organique s'échelonnaient de 4300 à 15500 Bq.kg<sup>-1</sup> de matière fraîche. Les auteurs ont montré que le tritium est principalement excrété dans l'urine sous forme d'eau tritiée. A titre d'exemple, la quantité de tritium sous forme d'eau tritiée dans les urines d'une femme de 38 ans recueillies le jour suivant l'ingestion du poisson s'élevait à 282 Bq tandis que la quantité de tritium sous forme de tritium organiquement lié s'élevait à 163 Bq.

## IV.2. DOSIMETRIE DU TRITIUM

La dose reçue, après exposition aux rayonnements, dépend de leur nature et de leur énergie. L'exposition aux rayonnements modifie les constituants de l'organisme à l'échelle des atomes et des molécules, pouvant entraîner des modifications de l'ADN, des cancers, des modifications du patrimoine génétique, une mortalité cellulaire...[Belot et al, 1996]. Le stress radiatif que peut engendrer le tritium est principalement lié à l'irradiation interne entraînée en cas d'incorporation du tritium dans les organismes. Son impact dosimétrique dépend de sa forme physico-chimique. La majeure partie de la dose reçue par la population résulte de l'incorporation de l'eau tritiée et non pas de celle de tritium sous forme organique via la chaîne alimentaire [IRSN, 2009b].

Ainsi, le tritium sous forme d'eau tritiée, réparti de manière homogène dans l'organisme distribue une dose uniforme dans le corps. Cependant, une fraction de cette activité est métabolisée sous forme organique, et la dose entraînée par ce tritium organique a été évaluée à 10 % de la dose due au tritium dans l'eau corporelle [Trivedi et al, 1997]. Dans le cas d'une exposition après rejets atmosphériques d'eau tritiée, il a été montré que le TOL contribue pour 11 à 50 % de la dose totale liée au tritium [Korolevych et Kim, 2013].

Les composés organiques tritiés localisés dans des cellules spécifiques entraînent une dose non homogène en fonction de l'organe ou macromolécule considéré [Hill et Johnson, 1993]. En effet, la faible énergie du rayonnement émis lors de la désintégration du tritium conduit à un dépôt d'énergie local pouvant amplifier les conséquences biologiques. Le parcours moyen du rayonnement bêta étant du même ordre de grandeur que la dimension du noyau cellulaire, 70 % de l'énergie se dépose dans le noyau lors de l'intégration du tritium à l'ADN [ASN, 2010].

Le tritium peut également être ingéré directement sous forme organique, et il est reporté que la dose due à l'incorporation de tritium sous cette forme est, pour une même activité incorporée, supérieure d'un facteur 2 environ à la dose due au tritium sous forme d'eau tritiée [IRSN, 2009b].

Les doses efficaces par unité d'incorporation (DPUI), correspondant à la somme des doses équivalentes pondérées par un facteur de risque associé à chaque organe, déterminées chez l'adulte sont reportées dans le tableau 2.

Tableau 2 : DPUI chez l'adulte en fonction de la forme physico-chimique du tritium et de son mode d'incorporation dans l'organisme [ICRP, 1995 ; ICRP, 1996 ]

| Composé / mode d'incorporation | DPUI adulte (Sv.Bq <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------|------------------------------------|
| HT / inhalation                | 1,8 x 10 <sup>-15</sup>            |
| HTO / inhalation               | 1,8 x 10 <sup>-11</sup>            |
| HTO / ingestion                | 1,8 x 10 <sup>-11</sup>            |
| CH <sub>3</sub> T / inhalation | 1,8 x 10 <sup>-13</sup>            |
| Tritium organique / inhalation | 4,1 x 10 <sup>-11</sup>            |
| Tritium organique / ingestion  | 4,2 x 10 <sup>-11</sup>            |

La dose annuelle due à l'exposition au tritium d'origine naturelle est estimée à 0,01 µSv, valeur à comparer avec la dose annuelle liée à l'exposition à la radioactivité d'origine naturelle qui est de 3,7 mSv [Le Guen, 2008, Belot et al, 1996, ASN, 2010].

### IV.3. EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM

Chez l'homme, l'action biologique du rayonnement bêta émis par le tritium est due aux périodes effectives des composés tritiés dans l'organisme qui peuvent varier d'une dizaine de jours, pour l'eau tritiée, à quelques semaines voire plusieurs années dans le cas du tritium organiquement lié. Globalement, 80 à 90 % de la dose délivrée par le tritium est liée à l'eau tritiée qui est répartie uniformément dans l'organisme. La proportion de tritium organique est faible par rapport à l'eau tritiée mais sa distribution n'est pas homogène dans toutes les cellules. Dans les expositions chroniques, l'accumulation est plus importante dans les lipides du système nerveux central que dans la peau, le muscle, le foie et les cellules adipeuses [Belot et al, 1996].

En raison du peu de données disponibles concernant la toxicité du tritium chez l'homme, le risque associé au tritium est essentiellement basé sur les expériences cellulaires ou animales. Ce type d'expériences montre qu'une exposition à l'eau tritiée ou à de la thymidine tritiée peut entraîner des altérations de la prolifération cellulaire, des augmentations de l'apoptose, des risques de cancers, de mutations...[Di Giacomo et al, 2011 ; Okada et Momoshima, 1993 ; Paquet et Métivier, 2008]. Les activités auxquelles sont exposées les cellules sont cependant très élevées (de l'ordre du kBq.mL<sup>-1</sup> ou de la dizaine de kBq.mL<sup>-1</sup> par exemple [Di Giacomo et al, 2011]).

#### IV.3.1. Effets cellulaires

L'estimation du risque à long terme lié à l'exposition au tritium est liée à son incorporation dans l'ADN. Le tritium peut ainsi être intégré par l'intermédiaire du tritium incorporé dans les

précurseurs biologiques c'est à dire du tritium organiquement lié ou des molécules organiques tritiées rejetées dans l'environnement. Les lésions entraînées par cette incorporation peuvent avoir deux origines. La première peut être un dommage causé par le rayonnement bêta, susceptible de produire 0,1 cassure double brin par noyau cellulaire. A titre de comparaison, les radicaux libres générés par l'oxygène respiré entraînent plusieurs dizaines de cassures doubles brins par noyau cellulaire et par jour [Straume, 1993]. La deuxième, d'importance biologique faible, peut être un dommage causé par la transmutation du tritium en hélium-3. L'atome d'hélium ainsi formé a une liaison faible avec le carbone, qui, après dissociation, conduit à un carbone réactif chargé positivement qui peut entraîner des cassures simple brins [Belot et al, 1996].

L'efficacité biologique relative (EBR) du tritium a été évaluée, pour des effets et des doses déterminées sur des lignées cellulaires de rongeurs ou humaines, ou sur des animaux, par comparaison avec des rayonnements de référence (rayonnement  $\gamma$  du cobalt-60 ou du césium-137). Les résultats montrent que l'EBR dépend de l'organisme ou de la cellule considérée ainsi que de la dose délivrée. Il y a donc autant d'EBR que d'effets biologiques observés [Belot et al, 1996 ; Paquet et Métivier, 2008].

#### IV.3.2. Risque chez l'homme

D'une manière générale, les travailleurs du nucléaire, la population voisine de sites nucléaires et les enfants de travailleurs du nucléaire sont les trois types de populations qui ont fait l'objet d'études épidémiologiques. Néanmoins, la plupart de ces études sont peu informatives puisqu'elles ne contiennent pas suffisamment de données pour estimer le risque lié à l'exposition au tritium. Les résultats ne montrent pas de risque spécifique associé au tritium, et concernent des populations ayant été exposées au tritium mais également à d'autres types d'expositions (gamma, neutrons) [AGIR, 2007 ; IRSN, 2009b]. A ce jour, une étude de mortalité rassemblant des données concernant des travailleurs du nucléaire monoexposés au tritium est en cours.

#### IV.3.3. Distribution du tritium organiquement lié dans les organismes

L'incorporation du tritium dans les tissus organiques et son élimination dépend du caractère chimique ou biologique de chaque composé tritié, mais également de l'activité métabolique de chaque tissu. Dans une étude visant à comparer le métabolisme du tritium organiquement lié à celui de l'eau tritiée chez le rat, il a été montré que les composés organiques sont retenus plus longtemps dans les organismes que l'eau tritiée. L'incorporation du tritium dans les tissus individuels est dépendante de la forme chimique initiale de la molécule tritiée au sein de la nourriture ingérée et de l'activité métabolique de chaque tissu. Ainsi, de plus grandes concentrations en tritium (tritium total

et tritium organiquement lié) sont mesurées après exposition des animaux à des acides aminés ou précurseurs d'acides nucléiques tritiés (lysine, thymidine, uridine) tandis que de plus faibles concentrations sont mesurées après exposition à des glucides tritiés (glucose, glucosamine). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les acides aminés et précurseurs d'acides nucléiques sont utilisés pour la synthèse des protéines, constituants majoritaires des cellules des organismes, tandis que les sucres sont plutôt utilisés pour la production d'énergie. De plus, des différences significatives d'incorporation ont été observées en fonction du composé tritié initial, spécifiquement dans le foie, les reins, les poumons et le cœur. Cependant, des similarités dans cette distribution sont constatées puisque, quel que soit le composé tritié auquel les animaux ont été exposés, la concentration en tritium organiquement lié est plus faible dans le cerveau que dans le foie (45 % plus faible après exposition à du glucose tritié) [Takeda, 1991]. Dans une étude récente visant à étudier la formation de tritium organiquement lié dans des poissons (truites arc-en-ciel) exposés à de l'eau et de la nourriture tritiée, les auteurs ont montré que la concentration en tritium organiquement lié est plus importante dans les viscères (foie, cœur, reins, rate) que dans les muscles. Ils l'expliquent par le fait que le tritium organiquement lié est d'abord formé dans les organes internes puis transféré aux muscles [Kim et al, 2013b].

Les conclusions des différents rapports [ASN, 2010 ; AGIR, 2007] font état d'un manque de connaissances concernant le comportement des formes organiques du tritium et notamment dans les réseaux trophiques. Des connaissances supplémentaires sont indispensables sur la nature de ces composés organiques, sur leur spéciation physico-chimique dans l'environnement et sur leur éventuelle capacité de bioamplification dans les chaînes trophiques [ASN, 2010]. Le transfert du tritium sous ses différentes formes à l'homme passe par l'identification des composés susceptibles d'être vecteurs du radionucléide, et par conséquent, passe par la connaissance des principales familles de molécules constitutives des produits de la chaîne alimentaire.

## **V. LES PRINCIPAUX COMPOSANTS CHIMIQUES DES PRODUITS DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE**

En tant que dernier maillon de la chaîne alimentaire, l'homme est susceptible d'ingérer le tritium présent dans des végétaux (fruits ou légumes) et dans des produits animaux (viande, lait) potentiellement contaminés suite à leur exposition au tritium sous ses diverses formes. L'animal peut ingérer le tritium aussi bien sous forme d'eau tritiée que de tritium organiquement lié, et également, être exposé à des composés tritiés ayant des périodes effectives différentes. A titre d'exemple, les rejets liquides de molécules organiques tritiées en baie de Cardiff (de l'ordre de 500 TBq.an<sup>-1</sup> dans les années 1990) ont « marqué » la chaîne alimentaire de l'environnement estuarien puisque des

facteurs de concentration importants (jusqu'à des valeurs de 7000) ont été observés dans la faune marine [ASN, 2010]. Afin d'estimer l'impact d'une contamination au tritium suite à l'ingestion d'une denrée, il est important de connaître les différentes molécules tritiées susceptibles d'être incorporées dans l'organisme. Ce paragraphe dresse donc un aperçu des principales familles de molécules constitutives des aliments.

## V.1. STRUCTURE DES ALIMENTS

### V.1.1. Structure de base

Tous les aliments de l'homme ont une origine biologique et peuvent être issus de produits animaux ou de produits végétaux. L'unité de base de tous ces produits est la cellule, et qu'elle soit végétale ou animale, les mêmes constituants la composent (tableau 3).

Tableau 3 : Composition chimique (en %) des cellules animales et végétales [Siret, 2004]

| Constituants         | Cellule |          |
|----------------------|---------|----------|
|                      | Animale | Végétale |
| Eau                  | 66      | 74       |
| Protides             | 16,8    | 3,5      |
| Lipides              | 10,3    | 0,8      |
| Glucides             | 0,9     | 18,7     |
| Substances minérales | 6       | 3        |

Les glucides ont une place prépondérante dans la composition des cellules. Les protides et les lipides sont quant à elles des substances organiques très majoritaires dans les cellules animales [Siret, 2004]. Au sein de ces cellules ont lieu les divers processus métaboliques, notamment la photosynthèse pour les cellules végétales, qui conduisent ensuite à la diversité des produits alimentaires. Le tritium organiquement lié étant directement issu de la photosynthèse, les produits végétaux bruts sont d'un grand intérêt pour tenter d'identifier les composés tritiés susceptibles d'être incorporés par l'homme. De plus, les produits végétaux sont la base de l'alimentation de nombreux animaux et, par voie de conséquence, constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire.

### V.1.2. Produits végétaux

La dénomination « produits végétaux » fait référence à toute denrée directement issue du végétal, c'est-à-dire les céréales, les légumes et les fruits. Les produits résultant de la transformation de ces denrées de base, tels que les pâtes alimentaires, ne seront pas abordés. Le tableau 4 présente

de manière succincte la proportion des diverses familles de molécules constitutives des principaux végétaux faisant partie de l'alimentation humaine.

**Tableau 4 :** Composition caractéristique (%) des différentes catégories de produits alimentaires végétaux d'après [Siret, 2004]

|                 | Céréales          | Légumes secs           | Produits amylacés | Légumes frais  | Fruits                        |
|-----------------|-------------------|------------------------|-------------------|--|-------------------------------|
|                 | Riz, blé, maïs... | Lentilles, pois...     | Pomme de terre    | Salade, carotte...                                       | Pomme, framboise...           |
| Eau             | 8 à 18            | 11 à 17                | 75 à 80           | 90   | 85 à 90                       |
| Protides        | 7 à 18            | 20 à 25                | 2                 | 3  | np                            |
| Lipides         | 2 à 8             | np                     | np                | 1  | np                            |
| Amidon          | 55 à 65           | 45 à 50                | 16                | np   | np                            |
| Autres Glucides | 2 à 10            | $\alpha$ -galactosides | np                | 1 à 5  | 12                            |
| Fibres          | 1 à 8             | 8 à 18                 | 3                 | 2 à 4  | np                            |
| Sels minéraux   | 2 à 6             | np                     | np                | np   | np                            |
| Autres          | -                 | -                      | Vitamine C        | Vitamine C, Acides organiques, Constituants aromatisants | Acides organiques (0,5 à 1,5) |

np : non précisé

L'unité de base constitutive de la plupart des composés majoritaires répertoriés dans le tableau 4 est l'hexose ( $C_6H_{12}O_6$ ), dont les isomères (fructose, glucose...) peuvent être retrouvés de manière unitaire (oses ou sucres simples) ou assemblés (osides ou sucres complexes) pour former des molécules plus complexes. Ainsi, l'amidon, molécule de réserve énergétique des végétaux, est un polysaccharide constitué de chaînes de D-glucose. Les fibres sont des macromolécules complexes constituées de mélanges de glucides provenant essentiellement des parois cellulaires des végétaux (cellulose, hémicellulose, pectine, lignine). La catégorie « autres glucides » fait référence à tout glucide (« carbohydrate ») n'entrant pas dans les catégories « amidon » ou « fibres » et pouvant se trouver à la fois sous forme de sucres simples (glucose, fructose) ou de sucres plus complexes tels que le saccharose (issu de la condensation de glucose et de fructose).

Les compositions chimiques, et notamment les proportions sont données à titre indicatif et peuvent évoluer au cours du temps, notamment dans les phases de maturation des fruits, au cours desquelles l'augmentation de la quantité de sucres, de vitamines ou d'arômes est accompagnée de la diminution d'autres substances comme les acides organiques ou les tanins [Siret, 2004].

L'eau, les glucides, les lipides et les protéines sont les principaux composés ingérés par l'homme. Ces biopolymères (protéines et glucides) sont des molécules au sein desquelles le tritium va s'incorporer préférentiellement, en raison notamment du fractionnement isotopique, puisque l'isotope lourd sera favorisé dans les liaisons hydrogène caractéristiques de ces macromolécules [Baumgärtner et al, 2001]. La compréhension du rôle de ces composés dans l'incorporation et le devenir du tritium chez l'homme passe par une description plus précise de ces molécules et macromolécules biologiques.

## V.2. LES COMPOSANTS CHIMIQUES DES PRODUITS ALIMENTAIRES

### V.2.1. L'eau

L'eau représente environ 65 % de la masse de l'organisme humain adulte [Siret, 2002]. Son renouvellement, et la compensation des pertes hydriques sont assurés par des apports d'eau quotidiens provenant de 3 origines distinctes : l'eau constitutive des aliments, l'eau de boisson et l'eau métabolique résultant de l'oxydation cellulaire des lipides et des glucides [Siret, 2002]. Par conséquent, un individu pourra être exposé à une contamination à l'eau tritiée aussi bien suite à l'ingestion d'eau de boisson tritiée que suite à l'ingestion d'aliments et ce par l'intermédiaire de la fraction TFWT de l'échantillon biologique. L'eau ainsi intégrée à l'organisme rejoint rapidement le pool « eau corporelle ».

### V.2.2. Les lipides

Les lipides sont des molécules à fort caractère hydrophobe et peuvent être divisés en deux groupes ayant des fonctions biologiques distinctes : les lipides de constitution permettant par exemple l'élaboration des membranes biologiques (lipides amphiphiles) et les lipides de dépôt constituant les réserves énergétiques (lipides neutres). Les lipides neutres sont les molécules majoritaires sur le plan alimentaire. Les mammifères et l'homme réalisent leur stockage dans le tissu adipeux, tissu ayant un rôle de réserve énergétique, de protection et d'isolant thermique [Siret, 2002].

Dans une étude s'intéressant à l'incorporation du tritium au sein des molécules après exposition d'une micro-algue verte d'eau douce à de l'eau tritiée, Moses et Calvin ont montré que l'activité tritium des lipides était bien inférieure à celle observée dans d'autres types de molécules (acides aminés notamment). Ils ont donc suggéré que les composés lipidiques n'intégraient pas rapidement le tritium dans les positions non échangeables, que ce soit par des processus cycliques ou suite à de nouvelles synthèses [Moses et Calvin, 1958]. Par conséquent, après ingestion de denrées tritiées, les lipides ne devraient pas constituer une catégorie de molécules à forte teneur en tritium.

### V.2.3. Les glucides digestibles et les fibres alimentaires

Les glucides dits « digestibles » sont les glucides directement assimilables (oses et dérivés d'oses) ainsi que les glucides assimilables suite à leur dégradation par des enzymes digestifs (amidon, glycogène). Les fibres alimentaires sont, pour l'essentiel, des glucides non assimilables, c'est-à-dire non dégradables par les enzymes digestifs [Siret, 2002]. Les unités de base de ces molécules, les oses, sont directement issues de la photosynthèse et des réactions enzymatiques.

Des études ont montré que les sucres (glucose, fructose, saccharose), directement issus de la photosynthèse, incorporent le tritium après exposition d'organismes à de l'eau tritiée (micro-algues vertes, soja) [Moses et Calvin, 1958 ; Thompson et Nelson, 1971]. Le comportement de ces composés dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire est donc important pour comprendre le devenir du tritium dans les organismes vivants.

#### V.2.4. Les protides

Les acides aminés sont les unités de base, non hydrolysables des protides. L'enchaînement des acides aminés par condensation entraîne la formation de peptides (jusqu'à 50 acides aminés) puis de protéines (plus de 50 acides aminés) [Siret, 2002]. La structure de base de tous les acides aminés naturels est identique puisqu'ils sont dérivés d'acides carboxyliques et d'acides aminés.

Les acides aminés, notamment l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'asparagine, la glutamine sont également des molécules incorporant du tritium suite à l'exposition d'organismes à de l'eau tritiée puisqu'ils sont retrouvés parmi les produits tritiés directement issus de la photosynthèse et des réactions enzymatiques [Moses et Calvin, 1958 ; Thompson et Nelson, 1971]. Le devenir du tritium chez l'homme peut être directement corrélé à celui des acides aminés, et étant donné leur rôle dans les organismes (synthèse des protéines), le suivi des acides aminés porteurs de tritium est d'un intérêt majeur.

#### V.2.5. Autres composés

Les vitamines, les acides organiques, les composés phénoliques et les sels minéraux sont également des éléments constitutifs des produits de la chaîne alimentaire. Les sels minéraux ne présentent pas un grand intérêt vis-à-vis des études liées à la spéciation du tritium, par contre, les vitamines, acides organiques et composés phénoliques sont tout à fait susceptibles d'incorporer le tritium de manière non échangeable. Les acides organiques (acide malique, acide citrique, acide succinique) font partie des composés incorporant du tritium organiquement lié à la suite des processus photosynthétiques [Moses et Calvin, 1958 ; Thompson et Nelson, 1971].

Le tritium est susceptible d'être intégré dans toutes molécules organiques, et notamment dans tous les composants de la chaîne alimentaire. Son comportement dépend de sa forme chimique initiale qui s'étend de l'eau tritiée aux macromolécules complexes comme les protéines. Compte tenu de la diversité des molécules potentiellement porteuses de tritium, il est essentiel d'identifier celles impliquées dans les processus de transfert du tritium de l'environnement à l'homme pour déterminer leurs cibles et donc pour pouvoir évaluer l'impact des rejets tritium sur ces systèmes.

# Démarche expérimentale

# Chapitre 1

## Stratégie analytique

|  |    |
|--|----|
| <i>Introduction</i> .....  | 53 |
| <i>I. Problématiques de l'étude</i> .....  | 53 |
| I.1. Problématique « analyse » .....   | 54 |
| I.1.1. Contexte .....  | 54 |
| I.1.2. L'échange labile .....  | 54 |
| I.1.3. La mesure du tritium organiquement lié par scintillation liquide .....                                  | 55 |
| I.1.4. Bilan .....   | 57 |
| I.2. Problématique « spéciation » .....  | 57 |
| <i>II. Démarche expérimentale adoptée</i> .....  | 59 |
| II.1. Choix du modèle de base de l'étude .....   | 59 |
| II.2. Approche expérimentale .....   | 59 |
| <i>III. Mise en place des échanges labiles, modèles dynamiques de base de l'étude</i> .....                    | 60 |
| III.1. Choix des échantillons .....  | 60 |
| III.1.1. Définition de la nature des échantillons .....  | 60 |
| III.1.2. Composition théorique des échantillons .....  | 61 |
| III.1.3. Caractéristiques physicochimiques permettant la caractérisation des composés organiques dissous ..... | 62 |
| III.1.3.1. Caractéristiques globales de la matière organique dissoute .....                                    | 62 |
| III.1.3.1.1. Caractéristiques spectrophotométriques .....  | 62 |
| III.1.3.1.2. Caractéristiques fluorimétriques .....  | 63 |
| III.1.3.2. Identification des molécules organiques .....   | 65 |
| III.2. Définition des conditions expérimentales .....  | 67 |
| III.2.1. Choix de la nature des solvants .....   | 67 |
| III.2.2. Procédure expérimentale mise en œuvre .....   | 68 |
| <i>Conclusion</i> .....  | 69 |

## INTRODUCTION

Les fractions de tritium organiquement lié ne sont à ce jour pas bien définies puisqu'elles évoluent en fonction des thématiques de recherche (dosimétrie, analyse). D'une manière générale, l'intérêt est essentiellement porté à la nature de la liaison chimique impliquant le tritium. De ce fait, la procédure d'analyse mise en place pour quantifier les différentes fractions de tritium organique ne tient pas compte des propriétés chimiques inhérentes aux molécules porteuses de tritium. Celles-ci n'ont aucune incidence pour la mesure du tritium organiquement lié mais peuvent avoir un impact lors de la quantification du tritium organiquement lié non échangeable. En effet, des phénomènes mettant en jeu des processus mal définis à ce jour, et susceptibles de perturber l'analyse existent. De plus, ces molécules porteuses de tritium peuvent être impliquées dans les processus de transfert du tritium de l'environnement à l'homme. Leur identification est donc un enjeu majeur pour l'étude de la distribution du tritium dans ces différents compartiments.

Dans ce chapitre, les objectifs de l'étude sont clairement définis. Ainsi, deux axes de recherche complémentaires se dégagent. Le premier est purement analytique. Il concerne l'optimisation de la procédure d'analyse du tritium organiquement lié. Le deuxième axe s'inscrit quant à lui dans une optique de compréhension du comportement du tritium par l'étude de sa spéciation. La démarche expérimentale adoptée pour répondre aux problématiques est présentée dans la suite du chapitre. Le système dynamique de base et les matrices étudiées sont également caractérisés.

### I. PROBLEMATIQUES DE L'ETUDE

Le comportement du tritium dépend de sa forme chimique initiale. Par conséquent, les études concernant la différenciation des formes du tritium, notamment au sein de la matière organique doivent être accentuées. Ainsi, les processus de migration ou de persistance dans les organismes de composés tritiés pourront être mis en évidence et des organes ou compartiments cibles pourront être identifiés. Ces phénomènes sont en effet des facteurs influant directement sur l'impact potentiel du tritium, c'est-à-dire sur la dose liée au tritium en fonction de sa forme.

L'étude du comportement du tritium passe également par la maîtrise des méthodes d'analyse du tritium, et notamment du tritium organique. En effet, elles permettent de séparer les différentes formes de tritium pour les quantifier. Outre la surveillance environnementale, la maîtrise de ces procédures est synonyme de « être sûr de ce qu'on mesure ». Ce point est essentiel pour définir clairement la forme tritiée analysée.

Les problématiques de cette étude s'inscrivent donc à la fois dans une volonté de maîtrise de la procédure analytique et d'apport d'informations concernant la spéciation du tritium dans l'environnement.

## I.1. PROBLEMATIQUE « ANALYSE »

### I.1.1. Contexte

A ce jour, seules les eaux environnementales et constitutives des échantillons (TFWT) sont mesurées pour le contrôle des rejets tritium des installations nucléaires. Même si l'analyse du tritium organiquement lié (TOL) tend à se développer, il n'existe pas actuellement de mesures de routine pour du contrôle règlementaire. Cependant, la procédure d'analyse du tritium dans des matrices environnementales (TFWT, TOL) est maîtrisée. Il n'existe pas, a priori, d'incertitude sur la nature des fractions analysées puisque la relation  $T_{\text{total}} = \text{TFWT} + \text{TOL}$  a été démontrée [Ansoborlo et al, 2010 ; Baglan et al, 2010 ; CETAMA, 2013]. La fraction de tritium organiquement lié est divisée en deux sous-fractions, parmi lesquelles seule la fraction tritium organiquement lié non échangeable (TOL-NE) est réellement représentative de la quantité de tritium rejetée dans l'environnement au cours de la phase de croissance de l'organisme. Par conséquent, un intérêt croissant est porté à cette fraction et l'élimination de la fraction tritium organiquement lié échangeable est un prérequis pour déterminer l'activité TOL-NE.

### I.1.2. L'échange labile

L'échange labile est l'étape clé de la procédure d'analyse du TOL-NE. Elle est basée sur l'hypothèse selon laquelle, lors de l'immersion de l'échantillon dans un large volume d'eau, seul un échange isotopique entre les atomes de tritium situés sur les positions dites échangeables et les atomes d'hydrogène de l'eau se met en place. Cependant, les observations expérimentales (figure 10) montrent qu'une fraction de la matière organique est « perdue » dans le solvant d'échange labile. Ainsi, une décomposition de l'échantillon et/ou une solubilisation de petites particules et de composés hydrosolubles sont susceptibles d'entraîner une perte d'information pour la quantification du tritium organiquement lié non échangeable [Pointurier et al, 2004 ; Baglan et al, 2008].



Figure 10 : Eaux d'échanges labiles. De gauche à droite : Blanc de poireau, pomme, cèdre, chêne, vert de poireau.

L'étude de l'impact de l'échange labile sur la quantification du tritium organiquement lié non échangeable est donc essentielle pour déterminer (i) si la matière organique se dégrade, (ii) la quantité d'échantillon solubilisée, afin de statuer sur la procédure actuelle d'extraction du tritium organiquement lié échangeable [Baglan et Alanic, 2011 ; Le Meignen et al, 2011].

### 1.1.3. La mesure du tritium organiquement lié par scintillation liquide

Que ce soit pour l'analyse du tritium organiquement lié ou du tritium organiquement lié non échangeable, après combustion des échantillons solides secs, l'eau de combustion récupérée est distillée, neutralisée puis analysée par scintillation liquide (annexe A.1.). Les résultats de comptages, pour le blanc et l'échantillon, respectivement  $N_0$  et  $N$ , sont exprimés en nombre de coups. La concentration d'activité massique ( $C_{A_{Comb}^{HTO}}$ ) d'un échantillon, exprimée en  $Bq.kg^{-1}$  d'eau de combustion est calculée à l'aide de la relation 8 [Baglan et al, 2010].

$$C_{A_{Comb}^{HTO}} = \frac{(N-N_0)}{t \times \eta} \times \frac{1}{m} \quad \text{Eq. 8}$$

Où  $m$  est la masse d'eau de combustion récupérée (kg),  $t$  est le temps de comptage des échantillons (s) et  $\eta$  est l'efficacité de comptage (nombre sans dimension compris entre 0 et 1).

L'activité mesurée dans l'eau de combustion est ensuite convertie en Becquerels par kilogramme d'échantillon sec et/ou frais. Cette transformation nécessite de connaître à la fois le pourcentage d'hydrogène de l'eau et de l'échantillon pour déterminer le rendement hydrogène de la combustion :

$$C_{A_{m_s}^{TOL(-NE)}} = C_{A_{Comb}^{HTO}} \times \frac{\%H_{ech}}{\%H_{eau}} \quad \text{et} \quad C_{A_{m_f}^{TOL(-NE)}} = C_{A_{m_s}^{TOL(-NE)}} \times \frac{m_s}{m_f} \quad \text{Eq. 9 et 10}$$

Où  $C_{A_{m_s}^{TOL(-NE)}}$  et  $C_{A_{m_f}^{TOL(-NE)}}$  sont respectivement les concentrations en activité du tritium organiquement lié (ou tritium organiquement lié non échangeable) exprimées en  $Bq.kg^{-1}$  de matière sèche et fraîche,  $\% H_{ech}$  et  $\% H_{eau}$  sont respectivement les pourcentages massiques d'hydrogène de l'échantillon et de l'eau ( $\%H_{eau} \approx 11 \%$ ).

Jusqu'à récemment, au laboratoire, la teneur en hydrogène des échantillons végétaux était prise comme étant celle de la cellulose ( $6,2 \pm 1,2$ ) % pour le calcul des activités en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  de matière sèche et fraîche. Cette estimation est satisfaisante en première approche mais est entachée de plusieurs limitations :

- L'approximation effectuée ne tient pas compte de la variabilité environnementale [Pointurier et al, 2003 ; Baglan et al, 2009]. A titre d'exemple, les teneurs en hydrogène mesurées sur un large panel d'échantillons environnementaux, dont des algues ( $\% \text{ H} = 4,51 \pm 0,07$ ) ou des pommes de terre ( $\% \text{ H} = 6,34 \pm 0,22$ ) varient de quelques pourcents [Baglan et Alanic, 2011] ;
- Afin de couvrir une large gamme de teneurs en hydrogène, une incertitude relative conséquente associée à la teneur en hydrogène de la cellulose a été choisie (20 %). Excepté pour les activités proches de la limite de détection (de l'ordre du  $\text{Bq.L}^{-1}$  d'eau de combustion), cette incertitude est le facteur dominant pour l'incertitude sur les activités tritium organiquement lié et tritium organiquement lié non échangeable [Pointurier et al, 2003] ;
- Cette approximation est susceptible d'influer sur la justesse, voire d'entraîner un biais sur le résultat de la mesure ;
- La teneur en hydrogène de la cellulose ne peut être utilisée pour estimer la teneur en hydrogène d'échantillons n'appartenant pas à la catégorie « végétaux » (sédiments, animaux...).

Une étape de détermination expérimentale de cette teneur en hydrogène a donc été introduite dans la procédure analytique.

Une aliquote de matière sèche prélevée après lyophilisation de l'échantillon frais est mesurée par analyse élémentaire. La valeur expérimentale est ensuite utilisée pour le calcul des activités tritium organiquement lié total, mais également pour le calcul des activités tritium organiquement lié non échangeable. la mesure du pourcentage d'hydrogène étant effectuée avant l'échange labile, l'hypothèse sous-jacente est la non-évolution de la teneur en hydrogène au cours de cette étape. Dans le cas contraire, l'utilisation de la teneur en hydrogène déterminée avant l'échange labile entrainera un biais dans la valeur des activités du tritium organiquement lié non échangeable déterminées.

Etant donné les interrogations concernant l'impact de l'échange labile sur la composition de l'échantillon, cette hypothèse doit être vérifiée expérimentalement.

#### I.1.4. Bilan

Dans un premier temps, une méthode d'analyse robuste et simple doit être développée afin de déterminer expérimentalement les teneurs en hydrogène des échantillons pour améliorer la justesse du résultat de mesure d'activités et réduire les incertitudes associées à cette valeur.

Dans un deuxième temps, plusieurs points concernant la procédure de séparation des fractions tritium organiquement lié échangeable et non échangeable doivent être éclaircis :

- Une solubilisation, et/ou une dégradation de matière organique durant l'échange labile est-elle confirmée ?
- Si tel est le cas, quelle quantité de matière est « perdue » et/ou solubilisée durant l'échange labile ?

En fonction de la quantité de matière solubilisée lors de l'échange labile, l'activité du tritium organiquement lié peut être sous-estimée :

- Par conséquent, quel est l'impact de l'échange labile sur la quantification du tritium organiquement lié non échangeable ?
- La définition de l'analyste décrivant les fractions tritium organiquement lié échangeable et non échangeable est-elle suffisante pour décrire la répartition du tritium au sein de l'organisme ?

Enfin, la conversion des activités tritium organiquement lié et tritium organiquement lié non échangeable étant dépendante du pourcentage d'hydrogène de l'échantillon solide, l'hypothèse selon laquelle le pourcentage d'hydrogène reste invariant au cours de l'échange labile doit être vérifiée expérimentalement. Cette étape permettra de définir clairement quelle valeur utiliser pour le calcul des activités du tritium organiquement lié total et du tritium organiquement lié non échangeable.

## I.2. PROBLEMATIQUE « SPECIATION »

Actuellement, de nombreuses interrogations existent quant au comportement du tritium dans l'environnement et chez l'homme, et quant à la forme chimique sous laquelle le tritium est retrouvé après rejet. Les définitions relatives au tritium organiquement lié sont nombreuses (TOL, TOL-E, TOL-NE, CBT, XBT...) et plutôt orientées à un niveau macroscopique [Kim et al, 2013a]. Ainsi, si seules les propriétés physico-chimiques de l'hydrogène sont considérées, la nature des liaisons chimiques (tritium-carbone, tritium-hétéroatome « accessible », tritium-hétéroatome « piégé dans des macromolécules ») gouvernent la distribution du tritium dans la matière organique. Cependant, cette vision est limitée. En effet, en considérant la procédure analytique de séparation des fractions

TOL-E et TOL-NE, il apparaît que du tritium en position échangeable peut rester piégé dans la matière organique tandis que du tritium en position non échangeable peut être retrouvé dans le solvant d'échange labile suite à la solubilisation de molécules organiques porteuses de tritium. Ces molécules peuvent migrer dans l'environnement, dans les organismes, dans certains compartiments, être utilisées pour la synthèse de nouveaux composés... Par conséquent, le tritium organiquement lié peut également être défini en fonction de la solubilité des molécules porteuses de tritium.

Quelle que soit la forme organiquement liée considérée, le devenir du tritium dans l'environnement et dans les organismes vivants est donc également conditionné par les propriétés physico-chimiques (solubilité dans l'eau...) et biologiques (temps de résidence...) des molécules porteuses de tritium. Le tritium organiquement lié non échangeable est formé via la photosynthèse et est donc retrouvé en premier lieu dans des glucides simples. Les réactions métaboliques peuvent ensuite entraîner l'incorporation du tritium dans des molécules plus complexes de type polysaccharides, acides nucléiques, protéines, lipides... La dispersion du tritium dans les organismes, son incorporation préférentielle dans certains compartiments ou son temps de résidence vont donc dépendre de la nature de la molécule portant le tritium.

La notion de spéciation du tritium est relativement complexe compte tenu de la grande variété de molécules et de réactions métaboliques dans lesquelles les isotopes de l'hydrogène peuvent être impliqués. Afin d'améliorer les connaissances concernant le comportement du tritium organiquement lié dans l'environnement et son transfert à l'homme via la chaîne alimentaire, il est important de se focaliser sur le niveau moléculaire pour identifier les composés impliqués dans la migration du tritium.

En résumé, le comportement du tritium organiquement lié dans l'environnement et chez l'homme est à l'heure actuelle mal connu et le comportement du tritium est dépendant de celui de la molécule le portant :

- A quelles familles de composés appartiennent les composés susceptibles de migrer dans l'environnement et chez l'homme ? Est-il possible de les identifier ?
- Ces composés se dispersent-ils de manière homogène dans les organismes ? Sont-ils susceptibles de migrer préférentiellement vers des compartiments définis ?
- Quels sont ces compartiments/organes cibles et par conséquent, quel pourrait être l'impact pour l'homme ?

## II. DEMARCHE EXPERIMENTALE ADOPTEE

### II.1. CHOIX DU MODELE DE BASE DE L'ETUDE

L'échange labile est l'étape clé de la procédure analytique de séparation des fractions tritium organiquement lié et tritium organiquement lié non échangeable. Cette étape est une source d'incertitudes voire d'introduction de biais dans la quantification du tritium organiquement lié non échangeable. De plus, l'échange labile peut être représentatif de phénomènes retrouvés dans l'environnement, chez l'animal ou chez l'homme, comme des phénomènes de lixiviation des végétaux par l'eau de pluie, des phénomènes d'immersion de végétaux dans l'eau ou dans d'autres milieux proches des conditions stomacales. Dans ces conditions, de nombreux composés sont susceptibles d'être extraits de leur matrice initiale et entraînés dans les milieux environnementaux ou dans des organismes. L'échange labile est donc le modèle choisi pour modéliser ces phénomènes et répondre aux différentes problématiques de l'étude.

### II.2. APPROCHE EXPERIMENTALE

L'approche expérimentale se base sur la procédure de séparation des fractions tritium organiquement lié échangeable et non échangeable existante (figure 11).

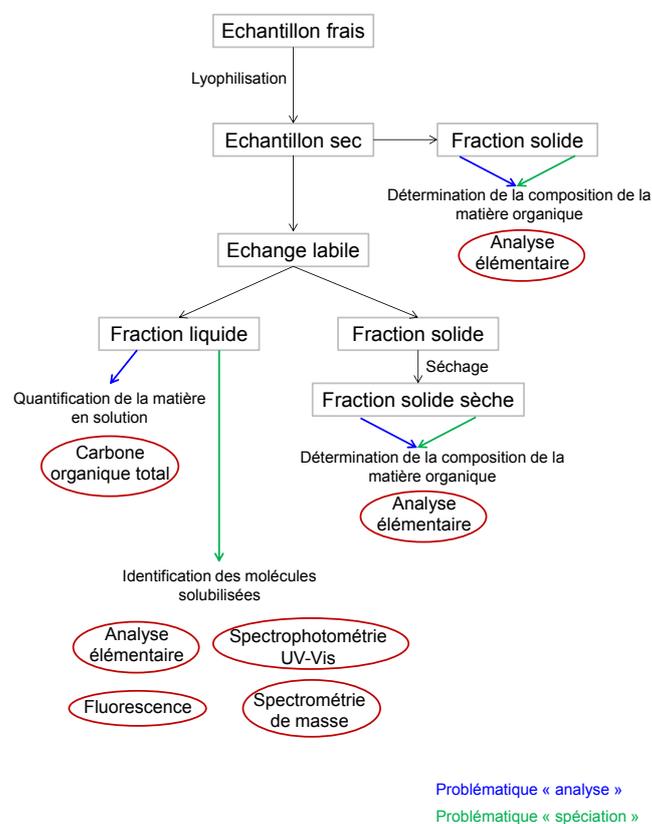


Figure 11 : Démarche expérimentale adoptée pour répondre aux différentes problématiques de l'étude.

Afin de répondre à la problématique purement analytique de l'étude, la première étape a consisté dans le développement, l'optimisation et la qualification de la procédure de détermination des compositions élémentaires des échantillons (analyse élémentaire). La connaissance de la variabilité intrinsèque de l'outil analytique est indispensable pour la discrimination des variations analytiques de celles inhérentes aux échantillons. Par conséquent, l'application de cette méthode d'analyse permet d'étudier l'évolution de la composition des échantillons au cours de l'échange labile.

L'étude de la spéciation du tritium nécessite la combinaison de différents outils analytiques. Certains permettent d'obtenir des informations génériques sur les familles de molécules en solution (analyse élémentaire, carbone organique total, spectrophotométrie UV-Visible, fluorescence) et sont utilisés pour orienter les recherches visant à l'identification des molécules en solution. La spectrométrie de masse haute résolution est quant à elle une technique de choix pour l'obtention d'informations unitaires sur les molécules individuelles en solution (formules brutes).

La procédure expérimentale mise en œuvre pour réaliser les échanges labiles a été figée pour permettre la comparaison des données en s'affranchissant de paramètres susceptibles d'avoir une quelconque influence sur les échantillons au cours de l'échange (température, durée d'échange...).

### **III. MISE EN PLACE DES ECHANGES LABILES, MODELES DYNAMIQUES DE BASE DE L'ETUDE**

#### **III.1. CHOIX DES ECHANTILLONS**

##### **III.1.1. Définition de la nature des échantillons**

Les matrices environnementales utilisées lors de cette étude, à la fois pour les problématiques analyse et spéciation, couvrent un large panel d'espèces mais sont limitées aux produits végétaux, produits les plus fréquemment analysés au laboratoire. Les matrices étudiées sont (tableau 5) :

- représentatives de la chaîne alimentaire ;
- utilisées pour le suivi environnemental, actuel ou passé, des abords des installations nucléaires [Kozak, 1982 ; Fuma et Inoue, 1995 ; Pointurier et al, 2003 ; Stark et al, 2005 ; Baglan et al, 2011].

Tableau 5 : Nature des échantillons utilisés dans cette étude

|  | Echantillon      |
|--|------------------|
| Chaîne alimentaire                             | Pomme            |
|  | Pomme de terre   |
|  | Poireau          |
|  | Carotte          |
|  | Herbe            |
| Surveillance environnementale<br>Rétrospective | Chêne            |
|  | Cèdre            |
|  | Feuille de chêne |

### III.1.2. Composition théorique des échantillons

La composition des échantillons cibles de cette étude est un point de départ pour la vérification de la cohérence des résultats, notamment par rapport aux pourcentages élémentaires mesurés, ainsi que pour l'orientation de l'étude de spéciation. Comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, l'eau est un constituant majoritaire des échantillons et, leurs compositions de base sont similaires. Cependant, au sein des grandes familles constitutives, certaines molécules caractéristiques peuvent différer ou être présentes en quantités moindres en fonction de la matrice. De plus, les caractéristiques chimiques de ces molécules, notamment leur caractère hydrophile ou hydrophobe, peuvent apporter des informations intéressantes pour comprendre les processus de migration des composés tritiés. Les matrices étudiées ont été regroupées par « familles d'échantillons » (fruits & légumes, bois, herbage), et un récapitulatif de la composition d'un échantillon représentatif de chaque famille (pomme, chêne, herbe) a été établi (Annexe B.1.) Ainsi, pour chaque grande famille de molécules constitutives (glucides, lipides...) des échantillons, les principaux marqueurs ont été répertoriés. Parmi ceux-ci figurent essentiellement des glucides (glucose principalement), des acides aminés tels que l'acide aspartique ou la leucine, des acides organiques tels que l'acide malique ou l'acide citrique, des composés phénoliques (coumarine, acide chlorogénique) et des macromolécules complexes comme la cellulose, l'hémicellulose ou la lignine. Les compositions chimiques des échantillons présentées en annexe B.1. ne sont pas exhaustives puisqu'elles varient au sein d'une même espèce en fonction de la variété et du stade de développement du produit.

En prenant en compte la solubilité dans l'eau des molécules constitutives, des composés comme la coumarine ou la catéchine (composés phénoliques), très peu solubles dans l'eau, ne se retrouveront probablement pas dans les eaux d'échanges labiles, au contraire de composés comme l'acide chlorogénique, un ose simple ou un acide organique de faible poids moléculaire. Même si certains glucides ou autres composés peuvent être extraits du bois et de l'herbe, ces échantillons sont essentiellement constitués de macromolécules biologiques complexes (cellulose, hémicellulose, lignine), comme l'illustre la figure 12 représentant une structure simplifiée de la lignine.

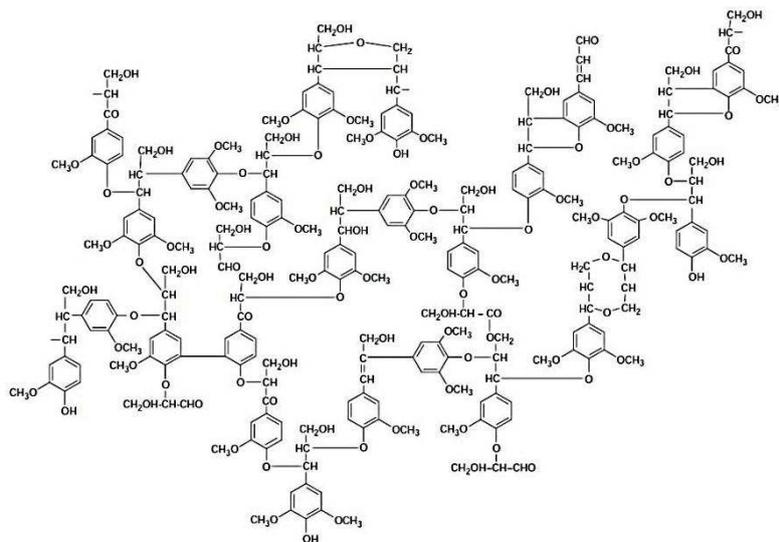


Figure 12 : Structure simplifiée de la lignine [Deglise, 2004].

Ces macromolécules n'étant pas ou peu solubles dans l'eau, la probabilité d'observer leur passage en phase aqueuse lors de divers processus environnementaux est relativement faible. Cependant, les « briques » constitutives de ces polymères sont susceptibles d'être identifiées en raison de leur présence au sein de l'organisme ou en raison de leur dégradation.

### III.1.3. Caractéristiques physicochimiques permettant la caractérisation des composés organiques dissous

L'identification de la matière organique en solution peut se faire de manière globale, via l'obtention d'informations relatives aux groupements fonctionnels présents en solution, ou de manière unitaire, par l'intermédiaire d'informations sur les composés solubilisés (réponses caractéristiques).

#### III.1.3.1. **Caractéristiques globales de la matière organique dissoute**

##### III.1.3.1.1. *Caractéristiques spectrophotométriques*

Dans le cas de mélanges simples avec peu de constituants absorbant la lumière, il est possible d'identifier des espèces telles que des pigments qui ont une réponse distinctive (par exemple, bande d'absorption à  $\lambda = 430$  nm pour la chlorophylle a). De même, les protéines ont une réponse caractéristique puisque leur maximum d'absorption est usuellement compris entre les longueurs d'onde 275 et 280 nm. Cette absorbance est essentiellement due à l'absorption de la lumière par les acides aminés aromatiques tels que le tryptophane ou la tyrosine (tableau 6). Les

acides nucléiques quant à eux présentent de fortes absorbances dans la région 240-275 nm en raison des transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  des cycles de la pyrimidine et de la purine [Schmid, 2001].

Tableau 6 : Longueurs d'onde caractéristique des maximums d'absorption de certains composés de type protides, d'après [Schmid, 2001]

| Composé       | $\lambda_{\max}$ (nm) |
|---------------|-----------------------|
| Tryptophane   | 280                   |
| Tyrosine      | 275                   |
| Phénylalanine | 258                   |
| Guanine       | 253                   |
| Cytosine      | 271                   |

Dans le cas de mélanges complexes où plusieurs espèces absorbent, les spectres d'absorption détectés sont en réalité des superpositions de spectres de chacune de ces espèces. De fortes concentrations de certaines molécules sont donc nécessaires pour que des pics caractéristiques se distinguent. La réponse en absorbance dans l'ultraviolet et le visible de la matière organique dissoute est spécifique puisque, quelle que soit l'origine de la matière organique, l'absorbance augmente exponentiellement vers les faibles longueurs d'onde [Coble, 2007]. Ce phénomène est illustré dans la figure 13 qui représente l'absorbance dans l'UV-visible des eaux de rejets issues de différentes villes [Pons et al, 2004].

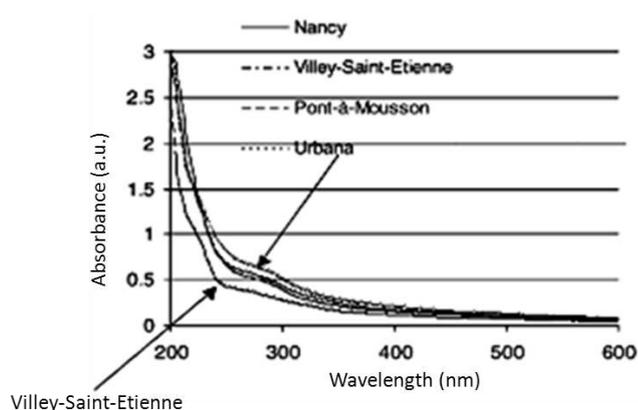


Figure 13 : Absorbance caractéristique de la matière organique dissoute dans des eaux de rejets [Pons et al, 2004].

L'observation de ce type de réponse valide l'hypothèse d'une solubilisation de matière organique, mais, l'absence de pics discernables ne permet pas une caractérisation plus fine de celle-ci.

#### III.1.3.1.2. Caractéristiques fluorimétriques

De nombreux composés biologiques (protéines, enzymes, coenzymes, pigments, métabolites primaires ou secondaires) présentent des réponses caractéristiques en fluorescence en fonction des longueurs d'onde d'excitation ou des longueurs d'onde d'émission (figure 14) [Pons et al, 2004].

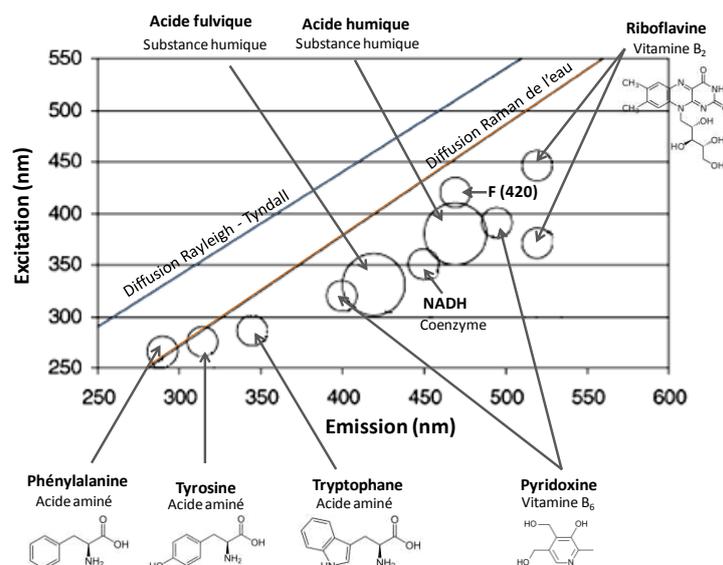


Figure 14 : Localisation des réponses en fluorescence en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de différentes molécules biologiques d'après [Pons et al, 2004].

Les spectres de fluorescence peuvent être enregistrés sur deux dimensions pour obtenir des spectres d'émission de fluorescence (c'est-à-dire fixation de la longueur d'onde d'excitation et mesure de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'émission) ou des spectres d'excitation de fluorescence (c'est-à-dire fixation de la longueur d'onde d'émission et mesure de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation). Cependant, le choix de la longueur d'onde fixée est arbitraire et, en utilisant cette méthode, il est possible de ne pas extraire toute l'information exploitable de l'échantillon. Par conséquent, l'utilisation de la fluorescence sur 3 dimensions ( $\lambda_{\text{excitation}}$  ;  $\lambda_{\text{émission}}$  ; intensité) permet de couvrir l'intégralité des longueurs d'onde et de distinguer la nature des fluorophores présents dans le milieu étudié. Les pics identifiés à ce jour dans la littérature [Cobble, 1996 ; Cobble, 2007 ; Hudson et al, 2007 ; Tedetti et al, 2011], correspondant à différentes catégories de molécules et définis en fonction du couple ( $\lambda_{\text{excitation}}$  ;  $\lambda_{\text{émission}}$ ) sont répertoriés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Propriétés de fluorescence des pics identifiés à ce jour

| Composé                     | $\lambda_{\text{excitation}}$ (nm) | $\lambda_{\text{émission}}$ (nm) |
|-----------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Protéines, type tyrosine    | 220-235                            | 304-321                          |
|                             | 270-280                            | 304-310                          |
| Protéines, type tryptophane | 220-235                            | 334-381                          |
|                             | 270-280                            | 334-360                          |
| Nucléotides                 | 260                                | 335                              |
| Substances humiques         | 230-260                            | 380-460                          |
| Substances humiques marines | 290-310                            | 380-410                          |
| Substances humiques         | 300-380                            | 400-500                          |
| Pigments                    | 398                                | 660                              |
| Chlorophylle a              | 431                                | 670                              |
| Chlorophylle b              | 435                                | 659                              |

### III.1.3.2. *Identification des molécules organiques*

La détermination de la formule brute des molécules présentes dans les milieux d'étude par spectrométrie de masse haute résolution est un moyen rapide permettant leur identification. Des formules brutes peuvent être déterminées pour chaque pic détecté, et l'interprétation des données expérimentales peut être grandement facilitée par comparaison des spectres expérimentaux à ceux de matériaux de référence, ou aux données existantes dans des bases de données. Pour cette raison, les réponses caractéristiques des molécules constitutives des échantillons (pic pseudo-moléculaire et fragments caractéristiques) trouvées dans la littérature sont répertoriées en annexe B.2. D'autre part, les données de certaines molécules constitutives des échantillons et disponibles en tant que matériaux de référence ont été enregistrées expérimentalement. Les réponses expérimentales et leur interprétation [Harrison et Young, 2006 ; Bylund et al, 2007 ; Dytrtova et al, 2012 ; Wabaidur et al, 2013] sont reportées dans le tableau 8.

**Tableau 8 :** Données expérimentales résultant de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de matériaux de référence constitutifs des échantillons cibles (ionisation : électrospray et analyseur : piège d'ions électrostatique)

| Famille / Biomolécule | Molécule         |   | Mode d'ionisation | m/z détectés | Formule brute logiciel                           | Interprétation  |
|-----------------------|------------------|---|-------------------|--------------|--|---|
| Glucides              | Glucose          | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | Positif           | 203          | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Na | [M+Na] <sup>+</sup>                                   |
|                       |                  |   | Négatif           | 179          | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>    | [M-H] <sup>-</sup>                                    |
|                       |                  |   | Négatif           | 161          | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>     | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                   |
| Protides              | Acide aspartique | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub> | Négatif           | 132,0305     | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>4</sub>    | [M-H] <sup>-</sup>                                    |
|                       |                  |   | Négatif           | 88,0462      | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> N   | [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                   |
|                       |                  |   | Négatif           | 71,0142      | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>     | [M-H-NH <sub>3</sub> -CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>  |
|                       |                  |   | Négatif           | 61,9886      | -  | -   |
| Acides organiques     | Acide malique    | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  | Négatif           | 133,0144     | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>     | [M-H] <sup>-</sup>                                    |
|                       |                  |   | Négatif           | 124,8942     | -  | -   |
|                       |                  |   | Négatif           | 112,9859     | -  | -   |
|                       |                  |   | Négatif           | 103,0039     | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>     | [M-H-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>    |
|                       |                  |   | Négatif           | 87,0090      | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>     |   |
|                       |                  |   | Négatif           | 75,0090      | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>     |   |
|                       |                  |   | Négatif           | 61,9887      | -  | -   |
|                       | Acide quinique   | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | Négatif           | 191,0557     | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>    | [M-H] <sup>-</sup>                                    |
|                       |                  |   | Négatif           | 168,9894     | -  | -   |
|                       |                  |   | Négatif           | 124,9843     | -  | -   |
|                       |                  |   | Négatif           | 112,9858     | -  | -   |
|                       |                  |   | Négatif           | 61,9886      | -  | -   |
|                       | Acide citrique   | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>  | Négatif           | 191,0194     | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>     | [M-H] <sup>-</sup>                                    |
|                       |                  |   | Négatif           | 173,0087     | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>     | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                   |
|                       |                  |   | Négatif           | 111,0086     | C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>     | [M-H-2H <sub>2</sub> O-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> |
| Négatif               |                  |   | 87,0295           | -            | -  |   |
| Négatif               |                  |   | 85,0295           | -            | -  |   |
| Vitamines             | Acide ascorbique | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  | Négatif           | 175,0250     | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub>     | [M-H] <sup>-</sup>                                    |
|                       |                  |   | Négatif           | 157,0140     | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>     | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                   |
|                       |                  |   | Négatif           | 115,0039     | C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>     | [M-H-CHO-CH <sub>2</sub> OH] <sup>-</sup>             |
|                       |                  |   | Négatif           | 87,0090      | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>     | -   |
|                       |                  |   | Négatif           | 71,0140      | -  | -   |

Compte tenu du nombre de pics détectés même après l'analyse d'un composé simple comme l'acide aspartique (figure 15), seuls les pics majoritaires et/ou clairement identifiés sont récapitulés dans le tableau 8.

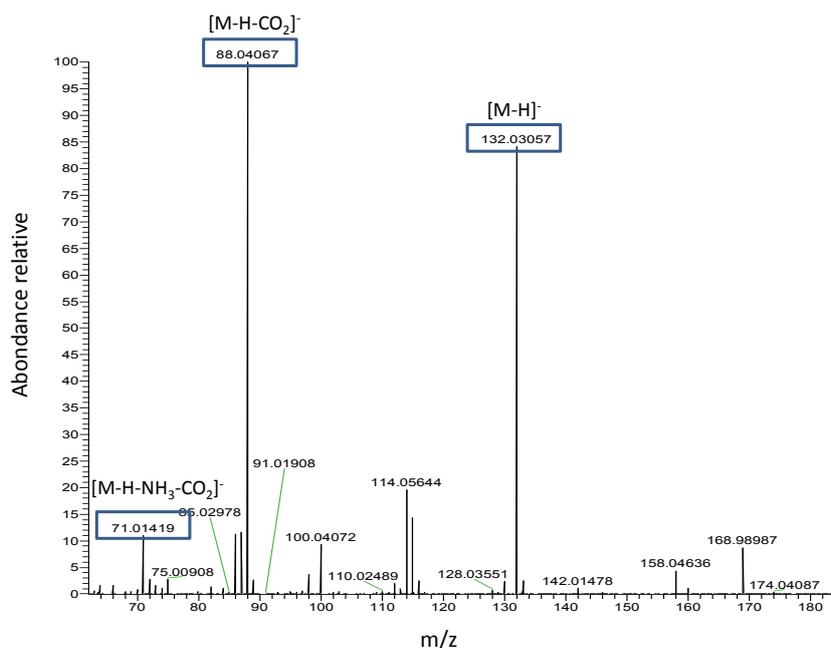


Figure 15 : Spectre de masse de l'acide aspartique (ionisation : électrospray en mode négatif).

Ces données issues de l'analyse de matériaux de référence certifiés sont utilisables comme un guide, voire une base de données non exhaustive pour identifier les molécules solubilisées lors des échanges labiles.

## III.2. DEFINITION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

### III.2.1. Choix de la nature des solvants

Les échanges labiles réalisés pour séparer les fractions tritium organiquement lié échangeable et tritium organiquement lié non échangeable sont classiquement effectués dans de l'eau non tritiée [Pointurier et al, 2003]. Afin de vérifier la procédure de séparation des fractions TOL, le solvant de base utilisé pour cette étude est logiquement l'eau de référence usuelle utilisée pour la séparation des fractions, soit une eau de forage, appartenant à une nappe d'eau fossile et prélevée dans un puits de géothermie à 600 m de profondeur [Alanic et Le Meignen, 2008]. Sa teneur en tritium, déterminée par la méthode de re-croissance de l'hélium 3 (circuit inter-comparaison « eau de référence » du groupe de travail 31 de la CETAMA, 2012), est de 0,005 Bq.kg<sup>-1</sup> d'eau [Fourré et al, 2014]. L'eau de forage est de plus, un solvant de choix pour l'étude de la spéciation du tritium dans l'environnement. En effet, elle peut être utilisée pour modéliser les phénomènes environnementaux tels que la lixiviation des végétaux par l'eau de pluie ou l'immersion des produits dans les eaux naturelles, mais elle n'est pas suffisante pour l'étude de la spéciation du tritium chez l'homme. C'est pourquoi les échanges labiles de cette étude sont également effectués dans un deuxième solvant, de composition voisine des conditions stomacales. De nombreuses compositions de sucs gastriques

artificiels sont disponibles dans la littérature et elles incluent souvent des acides aminés ou des enzymes [Sun et Griffiths, 2000 ; Al-Behaisi et al, 2002 ; Mokarram et al, 2009 ; Stefaniak et al, 2010]. Afin de ne pas introduire de molécules organiques dans le milieu « échange labile », le solvant « conditions stomacales » se résume à de l'eau de forage acidifiée en présence d'un sel (tableau 9).

Tableau 9 : Description des solvants d'échange labile de l'étude

| Solvant 1     | Solvant 2  |
|---------------|--|
| Eau de forage | <b>Conditions stomacales</b>   |
|               | [HCl] = 0,1 mol.L <sup>-1</sup><br>[NaCl] = 2 g.L <sup>-1</sup><br>Eau de forage |

### III.2.2. Procédure expérimentale mise en œuvre

La procédure classique de traitement de l'échantillon pour l'analyse du TOL-NE est suivie [Pointurier et al, 2004]. Celle-ci est décrite succinctement dans ce paragraphe. Le lecteur intéressé pourra se reporter en annexe B.3. pour plus de détails. L'échantillon frais a été déshydraté puis immergé dans un des solvants décrits précédemment. La durée minimale des échanges labiles a été fixée à 48h, durée classiquement utilisée [Pointurier et al, 2004]. Afin de caractériser les fractions liquides et solides récupérées après les échanges labiles, ces deux fractions ont été séparées. Plusieurs étapes ont été introduites afin de parvenir à la distinction précise des fractions liquides et solides (séparation manuelle, centrifugation, filtration à 8µm puis à 0,45 µm). Les fractions solides ont ensuite été déshydratées, et pour limiter les échanges avec l'atmosphère, elles ont été conditionnées dans des flacons en polyéthylène et conservées dans un dessiccateur. Pour éviter toute contamination, les solvants d'échange filtrés ont été conditionnés dans des flacons en verre (figure 16) puis conservés au réfrigérateur pour limiter la dégradation de la matière organique. Toutes les données expérimentales des échanges labiles réalisés sont disponibles en annexe B.4.



Figure 16 : Solvants d'échange labile filtrés à 0,45 µm. De gauche à droite : pommes de terre, carottes, pommes, blanc de poireau, vert de poireau, herbe, feuilles de chêne, cèdre, chêne

## CONCLUSION

Dans ce chapitre les différents questionnements ayant conduit à la mise en place de ce projet ont été énoncés. Ces questionnements ont entraîné la définition d'une stratégie analytique avec l'échange labile comme modèle de base de l'étude. La procédure expérimentale a été figée pour comparer les résultats entre les échantillons en s'affranchissant des paramètres environnementaux. Les échantillons choisis sont tous d'origine végétale. Ils appartiennent aux produits de la chaîne alimentaire ou sont régulièrement utilisés dans le cadre d'études environnementales. L'identification des composés solubilisés lors des échanges labiles et susceptibles de migrer de l'environnement à l'homme nécessite l'utilisation combinée de plusieurs outils analytiques décrits dans le chapitre suivant : des techniques optiques simples (spectrophotométrie UV-Visible, spectrométrie de fluorescence), la mesure de carbone organique total ainsi que la spectrométrie de masse haute résolution pour analyser les solvants d'échange labile. L'analyse élémentaire est quant à elle utilisée à la fois pour déterminer les teneurs en hydrogène des échantillons ainsi que pour étudier l'évolution des compositions des fractions solides au cours de l'échange labile.

## Chapitre 2

### Description des outils analytiques

|   |    |
|---|----|
| <i>Introduction</i> .....   | 71 |
| <i>I. Outils utilisés pour la problématique « analyse »</i> .....   | 71 |
| I.1. Analyse élémentaire .....  | 72 |
| I.1.1. Principe et instrumentation .....  | 72 |
| I.1.2. Procédure pour l'analyse d'échantillons inconnus .....   | 74 |
| I.1.2.1. Séquence analytique type .....   | 74 |
| I.1.2.2. Description des calculs .....  | 74 |
| I.1.3. Limites de l'analyse élémentaire .....   | 75 |
| I.1.4. Etude de l'évolution du pourcentage d'hydrogène .....  | 76 |
| I.2. Approche statistique pour le développement et la validation de la méthode d'analyse élémentaire .....          | 77 |
| I.2.1. Caractéristiques de l'étalonnage .....   | 77 |
| I.2.2. Vérification de la linéarité .....   | 80 |
| I.2.3. Justesse de la méthode d'analyse .....   | 81 |
| I.2.4. Fidélité de la méthode d'analyse .....   | 81 |
| I.2.5. Elaboration des cartes de contrôle .....   | 82 |
| I.3. Détermination de l'échantillon solubilisé au cours de l'échange labile .....                                   | 83 |
| <i>II. Etude de la spéciation du tritium</i> .....  | 84 |
| II.1. Outils analytiques pour l'obtention d'informations globales .....   | 85 |
| II.2. Outil analytique pour l'obtention d'informations unitaires : la spectrométrie de masse haute résolution ..... | 85 |
| II.2.1. Principe et instrumentation .....   | 86 |
| II.2.1.1. Principe .....  | 86 |
| II.2.1.2. Appareillage .....  | 86 |
| II.2.1.2.1. La source d'ionisation .....  | 87 |
| II.2.1.2.2. Le système LTQ-Orbitrap .....   | 87 |
| <i>Conclusion</i> .....   | 88 |

## INTRODUCTION

Les outils analytiques choisis pour répondre aux problématiques de l'étude sont présentés dans ce chapitre. L'analyse élémentaire est la technique utilisée pour déterminer les fractions massiques des différents éléments (C, H, N, S, O) constitutifs des échantillons. L'activité du tritium organiquement lié est ensuite convertie en Becquerels par kilogramme d'échantillon à l'aide du pourcentage d'hydrogène expérimental. Par conséquent, l'analyseur élémentaire est un outil de base de cette étude. En outre, l'analyse élémentaire est également un outil de choix pour suivre l'évolution des teneurs des différents éléments, dont l'hydrogène, au cours de l'échange labile. Cependant, son utilisation ne permet ni la quantification, ni l'identification de la fraction de matière organique solubilisée lors des échanges labiles. D'autres outils (COT-mètre, spectrophotomètre, spectromètre de masse) ont donc été utilisés dans ce but.

### I. OUTILS UTILISES POUR LA PROBLEMATIQUE « ANALYSE »

Les teneurs en hydrogène, utilisées pour convertir les activités Tritium Organiquement Lié (TOL) et Tritium Organiquement Lié Non Echangeable (TOL-NE) en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  de matière sèche ou fraîche sont déterminées par analyse élémentaire. Par conséquent, une procédure d'analyse doit être développée pour s'assurer de la fiabilité des valeurs mesurées. De plus, l'analyse élémentaire est également un moyen d'étude de l'impact de l'échange labile sur les teneurs en différents éléments (C, H, N, S, O) des échantillons.

La quantité d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile est déterminée par différence de masse entre l'échantillon sec avant et après échange labile. Cette fraction solubilisée est déterminée en considérant une solubilisation totale de la matière « perdue » lors des échanges. Elle est donc entachée d'une large incertitude. Au sein de cette fraction, les éléments constitutifs de la matière (C, H, N, S, O) ne sont pas différenciés. Cette étude porte sur l'analyse et l'étude du comportement du tritium organiquement lié non échangeable qui est lié aux atomes de carbone. Par conséquent, pour la quantification des activités TOL-NE, les quantités d'hydrogène, et donc de carbone, solubilisées lors des échanges labiles sont d'une importance majeure. La quantité de carbone solubilisée est déterminable en utilisant un COTmètre et la combinaison des résultats avec les données issues de l'analyse élémentaire est nécessaire pour déterminer la fraction de l'échantillon initial solubilisée. L'analyseur élémentaire étant un des outils de base de cette étude, une description détaillée de son fonctionnement est proposée dans les paragraphes suivants. Concernant le COTmètre, le lecteur intéressé pourra se reporter à l'annexe A.3.

## I.1. ANALYSE ELEMENTAIRE

L'analyse élémentaire a été développée pour la détermination simultanée des teneurs en azote, carbone, hydrogène et soufre suite à la combustion de la matière organique [Condon, 1966 ; Culmo, 1969 ; Merz, 1978 ; Fadeeva et Tikhova, 2008]. Les fractions échantillons solides sèches sont analysées à l'aide d'un analyseur FlashEA® 1112 ThermoFisher Scientific (figure 17) disposant de deux chaînes analytiques.



Figure 17: Analyseur élémentaire FlashEA® 1112.

### I.1.1. Principe et instrumentation

Dans sa configuration « CHNS », le système se divise en plusieurs parties (figure 18) : l'injecteur, le four contenant le tube de combustion en quartz, la colonne chromatographique et le système de détection (détecteur à conductivité thermique). Dans sa configuration « oxygène », un piège à eau est intégré entre la sortie du tube de réaction et la colonne chromatographique.

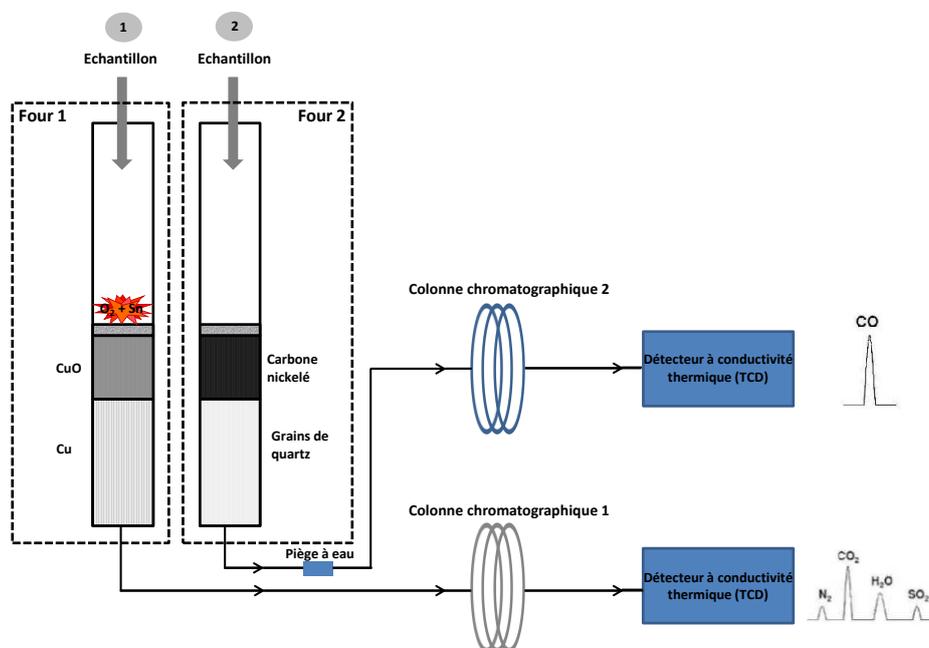
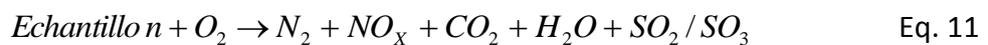


Figure 18 : Principe de l'analyseur élémentaire. 1 : chaîne d'analyse CHNS ; 2 : chaîne d'analyse oxygène ; four 1 : 900°C ; four 2 : 1100°C, colonne chromatographique 1 : polytétrafluoroéthylène (PTFE) 200 cm x 6 mm x 5 mm, divinylbenzène et polymère divinylbenzène/4-vinyl-pyridine ; colonne chromatographique 2 : acier, 100 cm x 6 mm x 5 mm, tamis moléculaire ; piège à eau : chaux sodée (oxyde de calcium et hydroxyde de sodium) et perchlorate de magnésium [ $Mg(ClO_4)_2$ ].

L'analyse simultanée des teneurs en carbone, hydrogène, azote et soufre nécessite une combustion de l'échantillon à haute température dans un environnement riche en oxygène [Analytical Methods Committee, 2006]. Les échantillons sont donc conditionnés dans des nacelles en étain qui permettent d'augmenter rapidement la température de l'échantillon lors de la combustion. Pour déterminer les teneurs en soufre, un catalyseur ( $V_2O_5$ , pentoxyde de vanadium) doit être ajouté à l'échantillon. En effet, l'introduction de ce composé assure une combustion complète des molécules portant des groupements fonctionnels tels que les sulfonates [Marco et al, 2003]. Avant leur injection, les échantillons sont placés dans l'injecteur automatique connecté au tube de réaction CHNS. Ce dernier est situé dans un four chauffé à  $900^\circ\text{C}$  pour entraîner une combustion dynamique « flash » des échantillons (équation 11).



Les produits de combustion sont entraînés par le gaz vecteur (hélium) vers le bas du tube où sont placés des réactifs d'oxydation et de réduction (CuO, Cu). Les oxydes d'azote sont alors réduits en  $N_2$ , les oxydes de soufre en  $SO_2$  et l'oxygène en excès est fixé (équations 12 et 13).



Les gaz présents après la conversion catalytique sont entraînés vers le système de séparation par chromatographie en phase gazeuse. La colonne (PTFE 200 cm x 6 mm x 5 mm, polymère divinylbenzène et divinylbenzène/4-vinyl-pyridine) est remplie avec une phase stationnaire à longue durée de vie (>10 ans) et est placée dans un four ( $\approx 75^\circ\text{C}$ ). Le détecteur situé en sortie de colonne est un détecteur à conductivité thermique (TCD), dont le principe est fondé sur une comparaison continue entre le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur pur et le flux de chaleur emporté par le gaz vecteur chargé des molécules d'intérêt [Tranchant, 1996]. Il permet leur quantification puisque sa réponse est proportionnelle à la quantité de soluté détectée.

Pour la détermination des teneurs en oxygène, les échantillons, conditionnés dans des nacelles en argent, sont introduits dans le second tube de réaction situé dans un four chauffé à  $1100^\circ\text{C}$ . La teneur en oxygène de l'échantillon est évaluée suite à la pyrolyse de celui-ci. Les gaz résultants du craquage thermique sont entraînés sur un piège à eau (chaux sodée/perchlorate de magnésium) puis transférés vers la colonne chromatographique (acier, 100 cm x 6 mm x 5 mm, tamis moléculaire) située dans un four ( $\approx 60^\circ\text{C}$ ). Le détecteur à conductivité thermique permet ensuite la détection et la quantification de l'oxygène sous forme de monoxyde de carbone.

## I.1.2. Procédure pour l'analyse d'échantillons inconnus

### I.1.2.1. **Séquence analytique type**

Chaque séquence débute par l'injection d'au moins un matériau de référence certifié (MRC) (tableau 10).

Tableau 10 : Compositions élémentaires (%) des matériaux de référence certifiés (k = 1)

|                                  | N            | C            | H           | S            | O            |
|----------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|
| BBOT<br>$C_{26}H_{26}N_2O_2S$    | 6,51 ± 0,03  | 72,53 ± 0,27 | 6,09 ± 0,06 | 7,44 ± 0,19  | 7,43 ± 0,11  |
| Cystine<br>$C_6H_{12}N_2O_4S$    | 11,66 ± 0,13 | 29,99 ± 0,28 | 5,03 ± 0,14 | 26,69 ± 0,20 | 26,63 ± 0,22 |
| Méthionine<br>$C_5H_{11}NO_2S$   | 9,39 ± 0,11  | 40,25 ± 0,34 | 7,43 ± 0,20 | 21,49 ± 0,14 | 21,45 ± 0,19 |
| Sulfanilamide<br>$C_6H_8N_2O_2S$ | 16,27 ± 0,25 | 41,84 ± 0,24 | 4,68 ± 0,14 | 18,62 ± 0,24 | 18,58 ± 0,20 |

Cette première injection a pour objectifs (i) le conditionnement de la chaîne analytique et (ii) la vérification de son bon fonctionnement via le contrôle du temps de rétention des différents éléments. Un blanc est ensuite injecté pour évaluer le bruit de fond. Le signal enregistré étant dépendant de l'état des catalyseurs situés dans les différents réacteurs, un étalonnage est réalisé pour chaque nouvelle séquence d'analyse. La méthode la plus courante utilisée pour réaliser les étalonnages en analyse élémentaire est la méthode dite du « k-factor ». Elle consiste en l'utilisation d'un seul point d'étalonnage obtenu à partir de la pesée d'un étalon, en supposant que la droite passe par l'origine. Il a été montré que des résultats obtenus par la méthode du k-factor ou par la méthode d'étalonnage traditionnelle en pesant différentes masses d'étalon sont similaires [Marco et al, 2002 ; Marco et al, 2007]. Cependant, l'utilisation de cette méthode nécessite l'injection de quantités d'éléments similaires aussi bien pour les étalons que pour les échantillons. Dans le cas des études liées au tritium organiquement lié, des échantillons de natures diverses sont analysés, c'est pourquoi la méthode traditionnelle consistant à réaliser un étalonnage avec plusieurs points a été préférée. Des contrôles (matériaux de référence certifiés) encadrent ensuite des séries d'échantillons inconnus afin de valider les résultats expérimentaux. En ce sens, des cartes de contrôle ont été mises en place (chapitre 3).

### I.1.2.2. **Description des calculs**

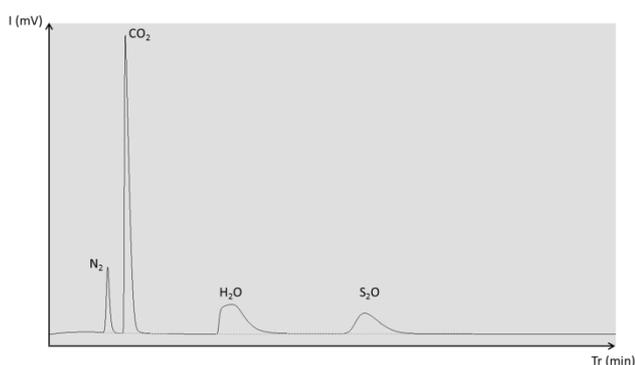
La proportion des éléments constitutifs des échantillons analysés est classiquement déterminée à partir de la droite d'étalonnage. Les incertitudes sont ensuite déterminées en

combinant les sources d'incertitude identifiées (étalonnage et pesée). Pour plus de détails, le lecteur intéressé pourra se reporter à l'annexe A.2.

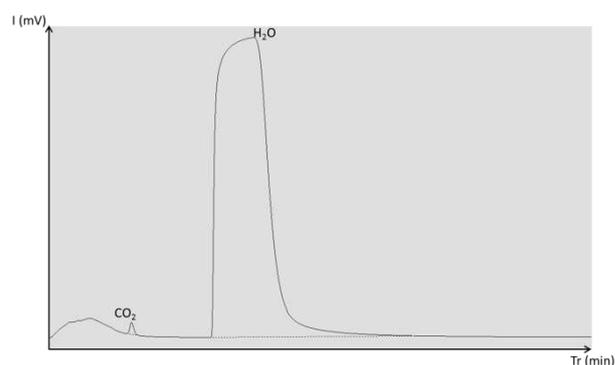
### I.1.3. Limites de l'analyse élémentaire

L'évolution de la composition des échantillons au cours de l'échange labile est une information importante à la fois pour l'aspect analytique de l'étude (variation du pourcentage d'hydrogène et teneurs en carbone) et pour l'aspect spéciation (variation des teneurs en hétéroatomes). La principale limite de l'outil réside dans le fait que la mesure effectuée est une mesure relative. Par conséquent, une solubilisation de l'échantillon dans des proportions équivalentes à la composition initiale ne peut être mise en évidence par cette méthode. Dans ce cas, les pourcentages en éléments constitutifs de l'échantillon, dont l'hydrogène, restent invariants après l'échange labile, même si une solubilisation importante de l'échantillon s'est produite. Le résultat calculé pour les concentrations en activités du tritium organiquement lié non échangeable, en utilisant la valeur du pourcentage d'hydrogène mesuré avant échange labile, n'est donc pas biaisé. Cependant, en fonction de la quantité d'échantillon solubilisée, une partie de l'information peut ne pas être prise en compte et le résultat de la mesure peut ainsi être sous-estimé. La combinaison de cet outil avec le COT-mètre est donc essentielle pour obtenir l'intégralité de l'information souhaitée.

L'analyseur élémentaire est utilisable pour l'analyse d'échantillons liquides. L'analyse des solvants d'échange labile pour la détermination de leurs compositions est donc théoriquement possible. Cependant, le solvant utilisé étant l'eau, la quantité d'hydrogène injectée par rapport aux autres constituants élémentaires est telle que sa quantification n'est plus possible (figures 19 et 20).



**Figure 19** : Chromatogramme obtenu après l'analyse élémentaire d'une masse  $m = 1,796$  mg de cystine.



**Figure 20** : Chromatogramme obtenu après l'analyse élémentaire d'un échantillon aqueux de cystine ( $[C] = 1,6$  mg/g<sub>H<sub>2</sub>O</sub>).

Par conséquent, dans sa configuration actuelle, il ne semble pas possible d'utiliser cet outil pour analyser les solvants d'échange labile. De ce fait, la composition élémentaire des solvants d'échange labile, pour l'identification des familles de molécules solubilisées, ne peut être déterminée

par cette méthode. Cependant, la modification de cette configuration, par l'introduction d'un piège à eau sur la chaîne CHNS par exemple, pourrait le permettre et serait une voie à envisager pour les études ultérieures. Cette modification permettrait en effet de finaliser les bilans massiques ainsi que de vérifier et valider les hypothèses formulées quant à l'évolution des compositions élémentaires des fractions solides avant et après échange labile.

#### 1.1.4. Etude de l'évolution du pourcentage d'hydrogène

Un des objectifs de la problématique analytique est de s'assurer que le résultat calculé pour les activités TOL-NE n'est pas biaisé par l'utilisation du pourcentage d'hydrogène mesuré avant l'échange labile. L'approche choisie est de comparer les teneurs avant et après échange labile. Par conséquent, il est important d'introduire des critères permettant cette comparaison pour déterminer si la différence entre les deux valeurs est significative.

Dans cette étude, deux critères sont utilisés. Le premier, le test de STUDENT de comparaison des moyennes expérimentales est purement statistique [Cetama, 1986]. Il permet d'accepter ou de rejeter l'hypothèse d'égalité des moyennes des populations avant et après échange labile.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Eq. 14}$$

Où 1 et 2 font référence aux populations avant échange labile et après échange labile,  $\bar{x}_1$  et  $\bar{x}_2$  sont les moyennes expérimentales des populations,  $n_1$  et  $n_2$  sont les nombres de valeurs utilisées pour calculer les moyennes expérimentales des populations 1 et 2 et  $s$  est l'écart type commun aux deux populations, défini dans la relation 15.

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Eq. 15}$$

Où  $s_1^2$  et  $s_2^2$  sont les variances des deux populations.

La valeur  $t$  calculée est comparée aux valeurs limites définissant le domaine de refus de l'hypothèse de départ. Elles sont tabulées pour un risque  $\alpha$ , toujours pris dans cette étude égal à 0,05, et un nombre de degrés de liberté attaché à l'estimation de la variance commune  $\nu = n_1 + n_2 - 2$ . L'hypothèse d'égalité des moyennes expérimentales est validée lorsque  $t_{\frac{\alpha}{2}} < t < t_{1-\frac{\alpha}{2}}$ .

Ce test statistique peut être utilisé uniquement si les populations suivent une distribution normale (test de SHAPIRO-WILK, utilisé pour  $n < 50$ ) et si l'homoscédasticité a été vérifiée (test de FISHER-SNEDECOR de comparaison de 2 variances).

Ce test n'est cependant pas suffisant pour statuer quant à la différence ou non des teneurs en hydrogène avant et après échange labile. En effet, il ne tient pas compte des incertitudes expérimentales liées notamment à la variabilité propre de l'outil utilisé. Par conséquent, un deuxième critère est utilisé. Celui-ci consiste simplement à vérifier si les incertitudes liées à la méthode d'analyse se recoupent. Pour mettre en place ce critère, il est donc nécessaire de qualifier l'analyseur élémentaire pour en définir la variabilité intrinsèque (chapitre 3).

## I.2. APPROCHE STATISTIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT ET LA VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE ELEMENTAIRE

Les compositions élémentaires, et en particulier les teneurs en hydrogène des échantillons déterminées expérimentalement doivent être les plus justes et fidèles possible. Par conséquent, le modèle d'étalonnage choisi doit être validé et les paramètres tels que justesse et fidélité évalués. De plus, pour disposer de moyens de contrôle de la séquence analytique et donc de validation des résultats, des outils spécifiques (cartes de contrôle) doivent être mis en place.

### I.2.1. Caractéristiques de l'étalonnage

Disposant de plusieurs matériaux de référence certifiés (MRC), une question se pose : faut-il réaliser un étalonnage simple, c'est-à-dire construit à partir de l'un des 4 MRC disponibles, ou un étalonnage « mixte », c'est-à-dire en utilisant l'ensemble ou une partie des 4 MRC ? Afin de définir la droite d'étalonnage la plus adaptée à cette étude, couvrant la plus large gamme de masses, notamment pour l'analyse de l'hydrogène, ces 5 droites d'étalonnage sont comparées, après vérification de l'homogénéité des variances liées à chacune d'elles (test de Bartlett, car nombre d'observations différentes). Cette comparaison de droites s'effectue à l'aide de tests d'hypothèses successifs pour lesquels le rejet ou le non-rejet des hypothèses nulles formulées se base sur la comparaison des critères calculés  $F_{\text{calc}}$  avec les valeurs  $F_{\text{tab}}(\alpha, \nu)$  répertoriées dans les tables de Fisher-Snedecor, pour un risque  $\alpha$  défini et  $\nu$  degrés de liberté [CETAMA, 1986]. Ainsi, lorsque  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}(\alpha, \nu)$ , l'hypothèse nulle est rejetée.

Dans cette étude, chaque droite d'étalonnage est évaluée à partir d'un nombre  $N_i$  de couples  $(m_{x_{ij}} ; A_{ij})$  où  $i$  fait référence à l'étalonnage considéré ( $i = 1, \dots, 5$ ),  $j$  renvoie aux différentes masses des étalons introduites pour établir une droite  $i$  ( $j = 1, \dots, 7$ ),  $m_x$  est la masse de l'élément  $x$  injectée et  $A$  l'aire détectée correspondante.

Si les  $n$  droites d'étalonnage ( $n=5$ ) sont équivalentes, elles sont confondues avec la « droite commune » estimée à partir des 5 séries de couples.

La première hypothèse nulle à vérifier  $H_{conf}^0$  peut se formuler sous la forme « les  $n$  droites d'étalonnage sont confondues avec la droite commune ». Le critère  $F_{calc}^{conf}$  est exprimé comme suit :

$$F_{calc}^{conf} = \frac{Q_c}{\nu_c \times s^2} \quad \text{Eq. 16}$$

Où  $\nu_c = 2(n-1)$  ;  $s^2$  est la variance moyenne, représentative des variations entre les différentes

droites et s'exprimant de la manière suivante :  $s^2 = \frac{\sum_i (N_i - 2) \cdot s_{y/x_i}^2}{\sum_i N_i - 2n}$  ;  $s_{y/x_i}^2$  est la variance résiduelle liée à

l'étalonnage  $i$  et  $Q_c$  représente les fluctuations des droites  $i$  par rapport à la droite commune (eq. 17).

$$Q_c = Q_T - Q \quad \text{Eq. 17}$$

Où  $Q_T$  représente les fluctuations des valeurs  $A_{ij}$  autour de la droite commune :

$$Q_T = \sum_i \sum_j (A_{ij} - \bar{A})^2 - \frac{\left[ \sum_i \sum_j (m_{x_{ij}} - \bar{m}_x) (A_{ij} - \bar{A}) \right]^2}{\sum_i \sum_j (m_{x_{ij}} - \bar{m}_x)^2} \quad \text{Eq. 18}$$

$\bar{A}$  est la moyenne générale de toutes les aires détectées pour les  $n$  étalonnages et  $\bar{m}_x$  est la moyenne générale des masses de l'élément  $x$  injectées pour les  $n$  étalonnages.

$Q$  représente les fluctuations des valeurs  $A_{ij}$  autour des droites  $i$  :

$$Q = \sum_i (N_i - 2) \cdot s_{y/x_i}^2 \quad \text{Eq. 19}$$

Si  $F_{calc}^{conf} < F_{tab}^{conf}(\nu_c; \nu)$ , où  $\nu = \sum_i N_i - 2n$ ,  $H_{conf}^0$  est vérifiée. Dans ce cas, il est possible d'admettre

avec un risque  $\alpha$  donné que toutes les droites d'étalonnage sont confondues. Dans ce cas, le résultat de la mesure sera équivalent quel que soit l'étalonnage utilisé pour les calculs. Ainsi, pour définir la droite d'étalonnage optimale, l'égalité des compositions élémentaires et des valeurs certifiées doit être vérifiée et tout phénomène de sous- ou surestimation doit être écarté.

En revanche, si  $H_{conf}^0$  est rejetée, le test d'hypothèse peut être décomposé en plusieurs hypothèses nulles élémentaires afin d'identifier l'origine de la divergence des droites :

- $H_p^0$  : « les  $n$  pentes sont équivalentes », dont le critère  $F_{calc}^p$  se détermine comme suit :

$$F_{calc}^p = \frac{Q_p}{\nu_p \times s^2} \quad \text{Eq. 20}$$

Où  $v_p = n - 1$ ,  $Q_p$  représente la dispersion des pentes des  $n$  droites :

$$Q_p = \sum_i \frac{\left[ \sum_j (m_{x_j} - \bar{m}_{x_i})(A_{ij} - \bar{A}_i) \right]^2}{\sum_j (m_{x_j} - \bar{m}_{x_i})^2} - \frac{\left[ \sum_i \sum_j (m_{x_j} - \bar{m}_{x_i})(A_{ij} - \bar{A}_i) \right]^2}{\sum_i \sum_j (m_{x_j} - \bar{m}_{x_i})^2} \quad \text{Eq. 21}$$

Où  $\bar{m}_{x_i}$  et  $\bar{A}_i$  sont respectivement la moyenne générale des masses de l'élément  $x$  injectées et la moyenne générale des aires détectées pour l'étalonnage  $i$ .

Si  $H_p^0$  est vérifiée, le parallélisme des droites est validé. Dans ce cas, les résultats obtenus pour un échantillon inconnu doivent être équivalents aux ordonnées à l'origine près.

- $H_{pm}^0$  : « les points moyens  $(\bar{m}_{x_i}; \bar{A}_i)$  sont alignés », dont le critère  $F_{calc}^{pm}$  se détermine comme suit :

$$F_{calc}^{pm} = \frac{Q_{pm}}{v_{pm} \times s^2} \quad \text{Eq. 22}$$

Où  $v_{pm} = n - 2$  et  $Q_{pm}$  représente la dispersion des points moyens autour de la droite estimée par ceux-ci :

$$Q_{pm} = \sum_i N_i (\bar{A}_i - \bar{A})^2 - \frac{\left[ \sum_i N_i (\bar{m}_{x_i} - \bar{m}_x) (\bar{A}_i - \bar{A}) \right]^2}{\sum_i N_i (\bar{m}_{x_i} - \bar{m}_x)^2} \quad \text{Eq. 23}$$

Si  $H_{pm}^0$  est vérifiée, les points moyens de chacune des droites d'étalonnage  $i$  sont alignés.

- $H_{c-pm}^0$  : « La droite commune et la droite des points moyens ont des pentes équivalentes »

$$F_{calc}^{c-pm} = \frac{Q_{c-pm}}{v_{c-pm} \times s^2} \quad \text{Eq. 24}$$

Où  $v_{c-pm} = 1$  et  $Q_{c-pm}$  représente l'écart entre la pente de la droite commune aux  $n$  droites et la pente de la droite des points moyens :

$$Q_{c-pm} = Q_c - Q_p - Q_{pm} \quad \text{Eq. 25}$$

Si  $H_{c-pm}^0$  est vérifiée, la pente de la droite commune et celle de la droite des points moyens sont équivalentes. Cette conclusion signifie qu'en plus de l'égalité des pentes, les ordonnées à l'origine sont équivalentes.

### 1.2.2. Vérification de la linéarité

La réponse des détecteurs à conductivité thermique est généralement linéaire sur une large gamme de concentrations [Littlewood, 1970]. Ce point a néanmoins été validé expérimentalement pour s'assurer de la proportionnalité de la réponse détectée et de la masse d'élément injectée.

L'étalonnage est acceptable si le modèle linéaire explique bien les variations des valeurs d'information, en l'occurrence les aires détectées. De plus, la gamme est valide s'il n'existe pas d'erreur de modèle résultant en une courbure significative. Ces deux points sont contrôlés par l'intermédiaire d'une analyse de variance dont l'objectif est de vérifier si la part de variance due à l'erreur de modèle n'est pas supérieure à la part de variance due à l'erreur expérimentale [AFNOR, 1999 ; Feinberg, 2001]. Pour cela, les sources de variations sont identifiées :

- Erreur de modèle (non-linéarité),
- Régression linéaire.

Des valeurs critiques  $F_{calc}^{mod}$  et  $F_{calc}^{reg}$  sont ensuite calculées (tableau 11).

**Tableau 11** : Description de l'analyse de variances pour la vérification de la linéarité de la courbe d'étalonnage

| Sources de variation | Somme des carrés des écarts  | Degrés de liberté   | Variances                                 | $F_{calc}$                                 | $F_{tab}$                                     |
|----------------------|--|---------------------|---|--|---|
| Erreur de modèle     | $SCE_{mod} = \sum_j \sum_g p \times (\bar{A}_j - \hat{A}_{m_{x_j}})$ | $\nu_{mod} = N - 2$ | $s_{mod}^2 = \frac{SCE_{mod}}{\nu_{mod}}$ | $F_{calc}^{mod} = \frac{s_{mod}^2}{s_e^2}$ | $F_{tab}^{mod}(\nu_{mod}; \nu_e; 1 - \alpha)$ |
| Regression linéaire  | $SCE_{reg} = \sum_j \sum_g p \times (\hat{A}_{m_{x_j}} - \bar{A})^2$ | $\nu_{reg} = 1$     | $s_{reg}^2 = SCE_{reg}$                   | $F_{calc}^{reg} = \frac{s_{reg}^2}{s_e^2}$ | $F_{tab}^{reg}(\nu_{reg}; \nu_e; \alpha)$     |

$N$  est le nombre de niveaux de masses étalons pour une droite;  $j$  fait référence au niveau de masse étalon injectée pour la droite considérée ( $1 \leq j \leq N$ );  $p$  est le nombre de répétitions de l'étalon  $j$  pour la droite considérée;  $g$  renvoie au numéro de la répétition de l'étalon  $j$  pour la droite considérée ( $1 \leq g \leq p$ );  $m_{x_j}$  est la masse de l'élément injectée pour l'étalon  $j$ ;  $\bar{A}_j$  est la moyenne des  $p$  répétitions pour l'étalon  $j$ ,

exprimée comme suit :  $\bar{A}_j = \frac{\sum_{g=1}^{g=p} A_{jg}}{p}$ ;  $\hat{A}_{m_{x_j}}$  est la réponse prédite par le modèle :  $\hat{A}_{m_{x_j}} = b_0 + b_1 m_{x_j}$ ;  $\bar{A}$  est la moyenne générale de toutes

les réponses détectées  $\bar{A} = \frac{\sum_{j=1}^{j=N} \sum_{g=1}^{g=p} A_{jg}}{Np}$ ;  $s_e^2$  est la variance due à l'erreur expérimentale  $s_e^2 = \frac{\sum_j \sum_g (A_{jg} - \bar{A}_j)^2}{N(p-1)}$ ;  $A_{jg}$  est l'aire détectée pour

la répétition  $g$  de l'étalon  $j$ ;  $\nu_e$  est le degré de liberté associé à l'erreur expérimentale;  $F_{tab}^{mod}$  et  $F_{tab}^{reg}$  sont les valeurs tabulées dans les tables de Fisher-Snedecor, fonctions du risque  $\alpha$  choisi ( $\alpha=0,05$ ).

L'interprétation des données se mène en deux temps :

- Si  $F_{calc}^{mod} \leq F_{tab}^{mod}$ , il n'y a pas de courbure sur le domaine défini. L'erreur de modèle est négligeable sur le domaine d'étalonnage choisi ;
- Si  $F_{calc}^{reg} > F_{tab}^{reg}$ , la régression explique bien une grande partie de la variation. Le modèle linéaire pour l'étalonnage est acceptable.

### 1.2.3. Justesse de la méthode d'analyse

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence [BIPM, 2008]. Elle est généralement exprimée en termes d'écart à cette valeur de référence. La teneur en hydrogène d'un échantillon étant le point clé pour la conversion des activités tritium organiquement lié et tritium organiquement lié non échangeable en Bq.kg<sup>-1</sup> de matière fraîche, il faut s'assurer que le résultat de la mesure n'est pas biaisé. Cette vérification est effectuée suite à l'analyse de matériaux de référence certifiés et à la comparaison des moyennes expérimentales obtenues pour chaque élément aux teneurs certifiées. Cette comparaison est réalisée dans cette étude en appliquant le test statistique de l'écart normalisé, calculé comme suit [AFNOR, 2010] :

$$E_n = \frac{|\overline{x_{exp}} - x_{ref}|}{\sqrt{U_{exp}^2 + U_{ref}^2}} \quad \text{Eq. 26}$$

Où  $\overline{x_{exp}}$  et  $x_{ref}$  sont respectivement la moyenne expérimentale obtenue pour l'élément x et la valeur certifiée ;  $U_{exp}$  et  $U_{ref}$  sont les incertitudes élargies associées (k=2). Les valeurs sont équivalentes lorsque  $E_n \leq 1$ . Dans ce cas, l'écart observé est jugé comme étant non significatif.

### 1.2.4. Fidélité de la méthode d'analyse

La fidélité est l'étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées [BIPM, 2008]. La mesure de fidélité est une mesure de la dispersion des mesures et se calcule à partir d'un écart-type [Feinberg, 2001]. Ainsi, une méthode faiblement fidèle est reflétée par un grand écart-type. Dans cette étude, la fidélité de la méthode d'analyse, pour chacun des éléments N, C, H, S, O considérés peut être estimée dans des conditions de répétabilité ( $s_{rep}$ ) et de fidélité intermédiaire ( $s_{FI}$ ) [AFNOR, 2009].

Cette estimation s'effectue suite à l'analyse de matériaux de référence certifiés. La composition de ceux-ci est variable et la réponse de l'analyseur varie en fonction de la masse d'élément injectée, or l'étude de la variabilité de la méthode se base sur un paramètre constant. Par conséquent, les calculs peuvent être effectués sur la réponse obtenue après injection d'une masse constante d'élément x, donc variable en fonction du MRC utilisé, ou sur la réponse normalisée par rapport à la masse introduite. De plus, cette étude sert de base pour l'élaboration des cartes de contrôle qui doivent pouvoir être utilisées aisément. Par conséquent, les réponses normalisées ont été préférées (eq. 27).

$$r_x = \frac{A_x}{m_x} \quad \text{Eq. 27}$$

L'étude de la fidélité de la méthode se base donc sur ces ratios r (tableau 12).

**Tableau 12** : Détermination des écarts types et coefficients de variation de la méthode d'analyse dans des conditions de répétabilité et de fidélité intermédiaire

|  |   |
|--|---|
| Écart-type de répétabilité                         | $s_{rep} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n s_i^2}{n}}$   |
| Coefficient de variation de répétabilité           | $RSD_{rep} = \frac{s_{rep}}{\bar{r}} \times 100$  |
| Variance inter-série                               | $s_{IS}^2 = s(\bar{r}_i)^2 - \frac{s_{rep}^2}{q}$<br>Si $s(\bar{r}_i)^2 - \frac{s_{rep}^2}{q} < 0$ alors $s_{IS}^2 = 0$ |
| Écart-type inter-série                             | $s_{IS} = \sqrt{s_{IS}^2}$  |
| Écart-type de fidélité intermédiaire               | $s_{FI} = \sqrt{s_{IS}^2 + s_{rep}^2}$  |
| Coefficient de variation de fidélité intermédiaire | $RSD_{FI} = \frac{s_{FI}}{\bar{r}} \times 100$  |

$n$  est le nombre de séries;  $q$  est le nombre de répétitions;  $i$  fait référence à une séquence d'analyse ( $1 \leq i \leq n$ );  $\bar{r}_i$  est la moyenne des  $q$  répétitions dans la séquence d'analyse  $i$ ;  $\bar{r}$  est la moyenne générale des

ratios  $r$  :  $\bar{r} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{r}_i}{n}$ ;  $S_i^2$  est la variance des  $q$  répétitions dans la séquence  $i$  et  $s(\bar{r}_i)^2$  est la variance de

la moyenne  $\bar{r}_i$  :  $s(\bar{r}_i)^2 = \frac{\sum (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{n-1}$

L'estimation de la fidélité de la méthode d'analyse est essentielle pour étudier l'évolution des compositions, et particulièrement des teneurs en hydrogène, des échantillons après échange labile puisqu'elle permet la définition de la variabilité intrinsèque de l'outil.

#### 1.2.5. Elaboration des cartes de contrôle

Les cartes de contrôles sont des outils essentiels pour suivre la variation du signal et pour détecter tout écart lié à une dégradation des performances de l'analyseur. Elles sont construites à partir d'une ligne centrale, déterminée dans cette étude par la moyenne des ratios définis dans l'équation 27, calculée lors de l'étude de fidélité. Les limites de surveillance sont situées de part et d'autre de cette ligne centrale, à une distance égale à  $\pm 2$  écarts-types. Ces écarts-types sont ceux déterminés dans des conditions de fidélité intermédiaire. Les limites de contrôle sont quant à elles situées de part et d'autre de la ligne centrale, à une distance égale à  $\pm 3$  écarts-types de fidélité intermédiaire [AFNOR, 1995].

Ces cartes permettent de mettre en évidence les limites de bon fonctionnement de la chaîne analytique. Celles-ci sont essentiellement dues à la dégradation des réactifs d'oxydation et de réduction présents dans les tubes de réaction qui est directement liée au nombre d'analyses

réalisées avec un même tube. De plus, des cendres produites par l'utilisation des nacelles en étain et par la présence de tout résidu inorganique dans l'échantillon, peuvent s'accumuler dans la partie supérieure du tube en quartz [Analytical method committee, 2006]. Ces deux phénomènes ont une influence sur le débit du gaz vecteur et, le détecteur à conductivité thermique étant sensible à toute variation de débit, une variation du signal est donc entraînée. Ainsi, une augmentation du débit de 1 % entraîne une diminution de la réponse de 0,7 à 0,8 %. L'obtention d'une réponse stable ne peut se faire qu'avec des débits stables. Par conséquent, tous les phénomènes pouvant avoir une influence quelconque sur le signal doivent être maîtrisés. En ce sens, les cartes de contrôle permettent d'assurer un suivi de cette variation de signal pour définir la périodicité des opérations de maintenance.

Les cartes de contrôle permettent également de définir la dispersion maximale autorisée des valeurs expérimentales. Par conséquent, d'après ces dispersions, il est possible de comparer des teneurs mesurées et de discriminer les variations intrinsèques à l'outil de celles propres aux échantillons. Ainsi, pour un même échantillon, 95 % des teneurs mesurées doivent appartenir à l'intervalle défini par les limites de surveillance. Ces limites ont donc été choisies comme définissant la variabilité de l'outil, c'est-à-dire, définissant un intervalle au sein duquel deux valeurs ne peuvent être considérées différentes.

### I.3. DETERMINATION DE L'ÉCHANTILLON SOLUBILISÉ AU COURS DE L'ÉCHANGE LABILE

Si l'on se réfère au protocole expérimental mis en place pour récupérer le solvant à analyser (figure 21), plusieurs hypothèses sont nécessaires pour exprimer le résultat de carbone organique total en fonction de l'échantillon de départ. Afin de déterminer la fraction de carbone solubilisée au cours de l'échange, il faut convertir le résultat initialement exprimé en « milligramme de carbone solubilisé par litre de solvant ( $\text{mg}_C/\text{L}$ ) » en « milligramme de carbone solubilisé par gramme de carbone de l'échantillon solide initial ( $\text{mg}_C/\text{g}_{C\_ech}$ ) ».

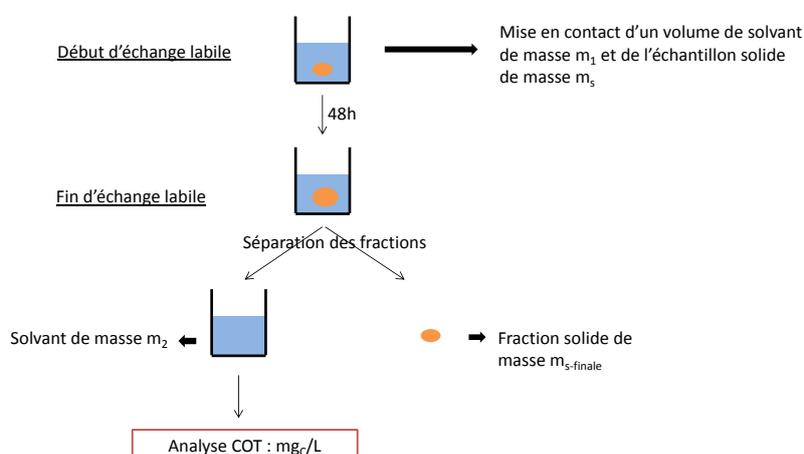


Figure 21 : Schéma du protocole expérimental préalable à l'analyse COT.

Le solvant d'échange labile étant de l'eau, un litre de solvant est considéré comme étant équivalent à un kilogramme de solvant. Le résultat COT peut donc être exprimé en milligramme de carbone par gramme de solvant ( $\text{mg}_C/\text{g}_{\text{solvant}}$ ). La concentration en carbone du solvant est une concentration nette : la concentration en carbone mesurée dans les blancs pour chaque série d'échanges labiles est soustraite à la concentration brute mesurée dans les solvants « échantillons ». Par conséquent, l'approximation selon laquelle tout le carbone mesuré en solution provient de l'échantillon sec de départ peut être effectuée. De plus, à la fin de l'échange labile, les concentrations en carbone dans la fraction liquide et dans la fraction liquide « absorbée » par l'échantillon sec initial sont considérées équivalentes. La masse de carbone solubilisée dans le solvant de masse  $m_1$  ( $m_{C\text{-solubilisée}}$ ) provient de l'échantillon sec de masse  $m_s$ , placé en échange labile et peut donc être déterminée par simple multiplication. Le résultat peut s'exprimer en milligramme de carbone par gramme d'échantillon ( $\text{mg}_C/\text{g}_{\text{ech}}$ ).

$$[\text{COT}]_{\text{mg}_C/\text{g}_{\text{ech}}} = \frac{[\text{COT}]_{\text{mg}_C/\text{g}_{\text{solvant}}} \times m_1}{m_s} = \frac{m_{C\text{-solubilisé}}}{m_s} \quad \text{Eq. 28}$$

Finalement, la fraction de carbone de l'échantillon solubilisée est déterminée par rapport à la quantité de carbone initiale dans l'échantillon (eq. 29).

$$\% C_{\text{solub}} = \frac{m_{C\text{-solubilisé}}}{m_{C\text{-échantillon}}} \quad \text{Eq. 29}$$

Où  $m_{C-m_s}$  est la quantité de carbone dans l'échantillon sec de départ. Cette valeur est déterminée par le calcul à l'aide de la relation 30.

$$m_{C\text{-échantillon}} = x_c \times m_s \quad \text{Eq. 30}$$

Où  $x_c$  est un nombre compris entre 0 et 1 correspondant à la proportion de carbone de l'échantillon de départ, déterminée expérimentalement après analyse élémentaire.

## **II. ETUDE DE LA SPECIATION DU TRITIUM**

L'étude de la spéciation du tritium passe par l'identification des composés solubilisés au cours de l'échange labile et, en raison de la complexité des milieux étudiés, plusieurs outils analytiques ont été utilisés (analyseur élémentaire, spectrophotomètre UV-Visible, spectrofluorimètre, spectromètre de masse haute résolution).

## II.1. OUTILS ANALYTIQUES POUR L'OBTECTION D'INFORMATIONS GLOBALES

Des outils (analyseur élémentaire, spectrophotomètre UV-Visible, fluorimètre) permettant de formuler des hypothèses sur les familles de molécules (glucides, protides...) solubilisées sont exploités dans un premier temps. Ceux-ci sont en effet relativement simples d'utilisation et permettent d'orienter les identifications. Ainsi, l'étude de l'évolution des compositions élémentaires, et notamment des hétéroatomes (N, O) des échantillons solides avant et après échange labile peut fournir des informations quant au type de molécules solubilisées. En effet, une diminution des teneurs en oxygène peut signifier la solubilisation de molécules à forte teneur en oxygène comme des glucides ou des acides organiques. De la même manière, une diminution des teneurs en azote laisse présager la solubilisation de molécules à forte teneur en azote, comme des molécules de type acides aminés ou protéines. Dans le cas de mélanges complexes, les interactions moléculaires peuvent conduire à l'obtention de bandes d'absorption plus ou moins larges, sur les spectres d'absorbance ou de fluorescence, qui soulèvent des interrogations et entraînent des hypothèses concernant les molécules présentes dans le milieu, sans possibilité de les identifier. Seule une identification « macroscopique », par famille de molécules peut être effectuée. Ces outils ne fournissent donc pas d'indications unitaires sur les molécules individuelles solubilisées. Par conséquent, l'introduction d'un outil plus adapté pour une identification à une échelle moléculaire (sensibilité, résolution) est essentielle.

## II.2. OUTIL ANALYTIQUE POUR L'OBTECTION D'INFORMATIONS UNITAIRES : LA SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION

Le spectromètre de masse haute résolution du laboratoire (LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS, Thermo scientific©) (figure 22) permet l'identification des composés présents dans les solvants d'échange labile par la détermination de leur masse exacte.



Figure 22 : Spectromètre de masse LTQ Orbitrap Thermo scientific©.

## II.2.1. Principe et instrumentation

### II.2.1.1. **Principe**

La spectrométrie de masse haute résolution permet l'identification de structures moléculaires en déterminant la formule brute (par l'intermédiaire de la masse exacte) des molécules injectées. Ces calculs et identifications sont possibles si l'appareillage utilisé possède une très bonne résolution, c'est-à-dire si deux pics de masse très proches peuvent être différenciés (figure 23).

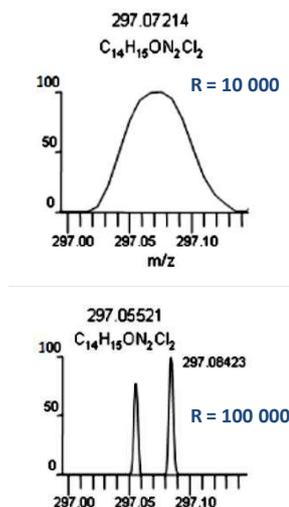


Figure 23 : Illustration de l'effet de la résolution sur la détection de composés [Makarov et Scigelova, 2010].

La résolution se définit comme le rapport entre la masse d'un ion et la différence entre le pic de l'ion considéré et un pic voisin tout juste différenciable ( $m/\Delta m$ ). La résolution de l'appareillage utilisé dans cette étude est de 163 000. Typiquement, pour une masse exacte de 180,0634 (glucose), des molécules ayant une différence de masse de 0,0011 unités de masse peuvent être séparées. Lors de l'interprétation des données d'un spectre de masse, pour chaque pic détecté, une ou plusieurs formules brutes sont calculées par rapport aux masses exactes des atomes. Chaque formule brute proposée est fournie avec un écart relatif ( $\Delta\text{ppm}$ ) à la valeur théorique. De nombreuses formules brutes sont susceptibles d'être générées pour un même ratio  $m/z$ . C'est pourquoi un critère ( $\Delta\text{ppm} < 5$ ) a été fixé pour exclure certaines formules et identifier le composé.

### II.2.1.2. **Appareillage**

L'appareil se divise en plusieurs parties (figure 24) : le système de génération d'ions (source d'ionisation), le système de transfert des ions, le système de séparation des ions et la détection.

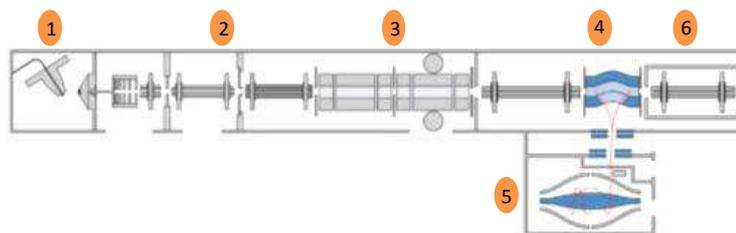


Figure 24 : Schéma du spectromètre de masse [Makarov et Scigelova, 2010].

1 : source d'ionisation ; 2 : système de transfert des ions ; 3 : piège à ions linéaire (LTQ) ; 4 : C-trap ; 5 : Orbitrap ; 6 : cellule de collision.

#### II.2.1.2.1. La source d'ionisation

La molécule ne doit pas être fragmentée au cours de son ionisation pour s'assurer de la détermination de sa formule brute. Par conséquent, une source d'ionisation douce est privilégiée. L'électrospray a donc été utilisé dans cette étude. La solution est injectée dans le spectromètre de masse par nébulisation sous forme de gouttelettes chargées. Les molécules d'intérêt sont désolvatées sous l'action jumelée de l'évaporation accélérée du solvant suite à l'application d'un gaz de nébulisation ( $N_2$ ) et de la répulsion coulombienne. En fonction de la polarité des tensions appliquées, les ions formés peuvent être chargés positivement ou négativement. D'une manière générale, l'électrospray conduit à la formation d'ions moléculaires protonnés  $[M+H]^+$ , déprotonnés  $[M-H]^-$  ou d'adduits de type  $[M+Na]^+$  ou  $[M+Cl]^-$ . Ce mode d'ionisation peut également entraîner la formation d'ions multichargés.

#### II.2.1.2.2. Le système LTQ-Orbitrap

Les ions formés sont entraînés dans un piège linéaire (LTQ) qui permet la sélection des ions. Ils s'accumulent et sont ensuite stockés dans la « C-trap », quadripôle de stockage nécessaire lorsque l'analyseur « Orbitrap » est couplé à la source électrospray. En effet, cette dernière fonctionne en continu tandis que l'Orbitrap opère par pulses. Lorsque suffisamment d'ions ont été accumulés dans la « C-trap », ils en sont extraits par l'intermédiaire d'un champ électrique et sont délivrés par « paquets » à l'entrée de l'orbitrap (figure 25).

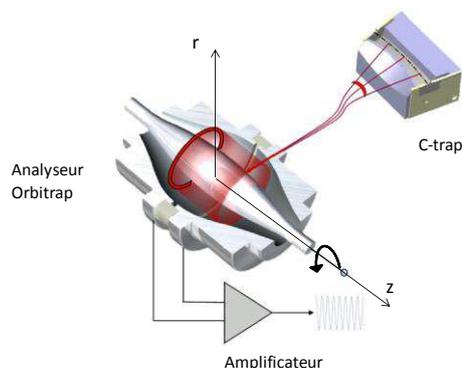


Figure 25 : Schéma de la « C-trap » couplée à l'orbitrap [Zubarev et Makarov, 2013].

L'analyseur Orbitrap est basé sur le piégeage d'ions dans un champ électrostatique. Les ions piégés dans l'analyseur décrivent un mouvement rotatoire autour de l'axe central ainsi que des oscillations le long de l'axe z. Le mouvement des ions peut être décrit comme celui d'un oscillateur harmonique et est indépendant du rayon de l'orbite et de la vitesse angulaire. Le ratio m/z est simplement dépendant de la fréquence d'oscillation des ions le long de l'axe z (relation 31).

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{z}{m}\right) \times k} \quad \text{Eq. 31}$$

Où z est la charge de l'ion, m la masse de l'ion et k est une constante caractéristique du champ. Tous les ions de même masse vont former des anneaux autour de l'axe central qui vont osciller à une fréquence caractéristique. Les différents paquets d'ions génèrent donc un signal transitoire multifréquence qui est enregistré puis converti en signal exploitable par transformée de Fourier [Hu et al, 2005 ; Makarov et Scigelova, 2010 ; Zubarev et Makarov, 2013].

## CONCLUSION

Dans ce chapitre, les outils analytiques utilisés pour répondre aux problématiques de l'étude ont été présentés. La combinaison de ces outils est indispensable, aussi bien pour les problématiques analytiques que pour l'étude de la spéciation du tritium.

Les mesures de carbone organique total doivent être corrélées aux proportions en carbone des échantillons secs pour estimer la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile. L'identification de ces composés solubilisés passe par la combinaison de nombreux outils analytiques, des plus simples à mettre en œuvre (spectrophotométrie) aux plus complexes (spectrométrie de masse haute résolution).

Les compositions élémentaires des échantillons (C, H, N, S, O) sont déterminées par analyse élémentaire. Cette mesure permet d'évaluer l'impact de l'échange labile sur la quantification du tritium organiquement lié non échangeable (% C et % H) mais également d'estimer le type de composés solubilisés lors des échanges labiles (% O, % N). Par conséquent, la mise en place d'une méthode d'analyse robuste et la détermination de la variabilité de l'outil sont essentielles pour (i) s'assurer de la valeur mesurée et écarter l'hypothèse d'introduction de biais, (ii) définir les incertitudes à utiliser pour le calcul des activités tritium organiquement lié, et (iii) étudier l'évolution des compositions élémentaires des échantillons au cours de l'échange labile. Cette étude fait l'objet du chapitre 3.

# Résultats

## Chapitre 3

# L'analyseur élémentaire : un outil pour l'analyse et la spéciation du tritium

|  |            |
|--|------------|
| Introduction.....                                    | 91         |
| <i>I. Etude de l'étalonnage.....</i>                 | <i>91</i>  |
| I.1. Résultats .....                                 | 91         |
| I.2. Discussion .....                                | 93         |
| <i>II. Vérification de la linéarité .....</i>        | <i>96</i>  |
| II.1. Résultats .....                                | 96         |
| II.2. Discussion .....                               | 97         |
| <i>III. Justesse de la méthode d'analyse.....</i>    | <i>97</i>  |
| III.1. Résultats.....                                | 97         |
| III.2. Discussion.....                               | 98         |
| <i>IV. Fidélité de la méthode d'analyse.....</i>     | <i>100</i> |
| IV.1. Résultats .....                                | 100        |
| IV.2. Discussion .....                               | 101        |
| <i>V. Mise en place des cartes de contrôle .....</i> | <i>104</i> |
| V.1. Résultats .....                                 | 104        |
| V.2. Discussion .....                                | 105        |
| <i>VI. Validation de la méthode d'analyse.....</i>   | <i>106</i> |
| VI.1. Résultats .....                                | 106        |
| VI.2. Discussion .....                               | 106        |
| <i>Conclusion.....</i>                               | <i>107</i> |

## Introduction

L'analyseur élémentaire est l'outil analytique de base de cette étude puisqu'il est à la fois nécessaire pour répondre aux problématiques analytiques et de spéciation. Ainsi, le pourcentage d'hydrogène utilisé pour la conversion des activités du tritium organiquement lié et du tritium organiquement lié non-échangeable est déterminé expérimentalement avec l'analyseur élémentaire. Une méthode d'analyse doit donc être développée pour assurer la fiabilité des résultats de mesure et pour disposer d'outils permettant de valider les données. Quelle que soit la nature de l'échantillon étudié, cette procédure doit écarter l'hypothèse de l'introduction éventuelle d'un biais lié à une détermination erronée des teneurs en hydrogène pour le calcul des activités du tritium organiquement lié. Le développement de la procédure doit également permettre la réduction des incertitudes généralement associées à la valeur du pourcentage d'hydrogène (20 %) et donc la diminution des incertitudes associées aux activités du tritium organiquement lié exprimées en Becquerels par kilogramme d'échantillon. De plus, afin d'étudier l'évolution des compositions élémentaires des échantillons au cours de l'échange labile, il est essentiel de pouvoir discriminer les variations liées aux échantillons des variations propres à l'outil analytique. Cette discrimination permettra à la fois d'étudier l'évolution des teneurs en hydrogène au cours de l'échange labile et l'évolution des teneurs en hétéroatomes pour l'identification des familles de molécules organiques solubilisées.

Afin de définir l'étalonnage optimal à mettre en place, de vérifier la linéarité de la réponse et la justesse des résultats, et d'estimer la variation de l'outil dans des conditions spécifiques (répétabilité, fidélité intermédiaire), une étude statistique a été effectuée. Le présent chapitre en présente les résultats. La distribution normale des données utilisées pour les différents tests statistiques a systématiquement été vérifiée (SHAPIRO-WILK), et les valeurs aberrantes recherchées au préalable (GRUBBS, DIXON, t-test).

### I. ETUDE DE L'ETALONNAGE

#### I.1. RESULTATS

Le présent paragraphe se focalise essentiellement sur les résultats obtenus pour l'analyse de l'hydrogène. Ceux concernant les autres éléments sont disponibles en annexe C.1. Ainsi, les droites « simples » (construites à partir d'un seul matériau de référence certifié) et la droite mixte (construite à partir de tous les matériaux de référence certifiés) ont été comparées suivant la procédure décrite dans le chapitre 2 (tableau 13) [Cetama, 1986].

**Tableau 13** : Paramètres calculés pour la comparaison des droites d'étalonnage simples et mixte, cas de l'hydrogène.

| Source de variation  | Somme des carrés              | Degrés de liberté | $F_{calc}$ | $F_{tab}$ |
|--|-------------------------------|-------------------|------------|-----------|
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour des droites $i$                    | $Q = 2,44 \times 10^9$        | $v = 25$          |            |           |
| Fluctuation des droites $i$ par rapport à la droite commune ( $F^{conf}$ ) | $Q_c = 1,09 \times 10^9$      | $v_c = 8$         | 1,40       | 2,34      |
| Dispersion des pentes des $n$ droites ( $F^p$ )                            | $Q_p = 3,06 \times 10^8$      | $v_p = 4$         | 0,78       | 2,76      |
| Dispersion des points moyens autour de la droite moyenne ( $F^{pm}$ )      | $Q_{pm} = 6,98 \times 10^8$   | $v_{pm} = 3$      | 2,38       | 2,99      |
| Ecart entre les pentes commune et moyenne ( $F^{c-pm}$ )                   | $Q_{c-pm} = 8,65 \times 10^7$ | $v_{c-pm} = 1$    | 0,89       | 4,24      |
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour de la droite commune               | $Q_T = 3,53 \times 10^9$      | $v_T = 33$        |            |           |

Avec  $F_{calc}^{conf} < F_{tab}^{conf}$ , l'hypothèse nulle de départ « les  $n$  droites d'étalonnage sont confondues avec la droite commune » est vérifiée. Par conséquent, il est possible d'admettre au risque  $\alpha$  choisi ( $\alpha = 0,05$ ) que toutes les droites d'étalonnage sont confondues. Les mêmes résultats sont obtenus pour les éléments C et N (annexe C.1.). Pour l'oxygène et le soufre cependant, l'étude statistique ne valide pas l'égalité des droites d'étalonnage (annexe C.1.).

Les teneurs en hydrogène d'un échantillon déterminées expérimentalement doivent donc être similaires indépendamment de l'étalonnage considéré. Ce point est vérifié expérimentalement par l'analyse des 4 matériaux de référence certifiés et par le calcul de leur composition élémentaire à l'aide de chacune des 5 droites d'étalonnage (tableau 14).

**Tableau 14** : Moyennes expérimentales des teneurs en hydrogène des matériaux de référence certifiés déterminées avec chacun des 5 étalonnages testés ( $k=2$ )

|             |  | Etalonnage  |             |               |             |             |
|-------------|--|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
|             |  | Mixte       | BBOT        | Sulfanilamide | Méthionine  | Cystine     |
| Echantillon | BBOT<br>$x_{H-certifié} = (6,09 \pm 0,12) \%$          | 6,06 ± 0,25 | 6,07 ± 0,23 | 6,03 ± 0,27   | 6,09 ± 0,27 | 6,03 ± 0,23 |
|             | Sulfanilamide<br>$x_{H-certifié} = (4,68 \pm 0,28) \%$ | 4,69 ± 0,23 | 4,70 ± 0,18 | 4,67 ± 0,21   | 4,72 ± 0,25 | 4,67 ± 0,18 |
|             | Méthionine<br>$x_{H-certifié} = (7,43 \pm 0,40) \%$    | 7,41 ± 0,24 | 7,44 ± 0,22 | 7,38 ± 0,27   | 7,45 ± 0,27 | 7,39 ± 0,27 |
|             | Cystine<br>$x_{H-certifié} = (5,03 \pm 0,28) \%$       | 5,06 ± 0,24 | 5,05 ± 0,19 | 5,02 ± 0,26   | 5,10 ± 0,27 | 5,02 ± 0,19 |
|             |  |             |             |               |             |             |

Les résultats reportés dans le tableau 14 semblent confirmer l'hypothèse d'une égalité des valeurs expérimentales et des valeurs certifiées quel que soit l'étalonnage utilisé. L'emploi du test de l'écart normalisé ( $E_n$ ) pour comparer les moyennes expérimentales aux valeurs certifiées confirme à chaque fois l'égalité des valeurs ( $E_n < 1$ ). Il n'y a donc pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les échantillons avec les 5 droites d'étalonnage testées. Des résultats similaires sont obtenus pour les éléments C et N (annexe C.2.).

## I.2. DISCUSSION

Les résultats montrent que les droites d'étalonnage simples et la droite mixte sont équivalentes pour les éléments hydrogène, carbone et azote. De plus, les moyennes expérimentales déterminées avec les 5 étalonnages pour un matériau de référence certifié sont équivalentes aux valeurs certifiées. Par conséquent, pour la détermination du pourcentage d'hydrogène dans le cadre de l'analyse du tritium organiquement lié, l'utilisation de l'une ou l'autre de ces droites n'entraîne pas de différence statistiquement significative.

Cependant, l'utilisation d'une droite d'étalonnage simple peut entraîner des écarts aux valeurs de référence systématiquement négatifs ou positifs alors qu'une distribution aléatoire autour de la valeur certifiée semble être obtenue avec un étalonnage mixte (figure 26). En effet, les teneurs moyennes déterminées avec les étalonnages sulphanilamide et cystine sont systématiquement légèrement inférieures aux valeurs certifiées tandis que celles déterminées avec les étalonnages BBOT et méthionine sont légèrement supérieures aux valeurs certifiées.

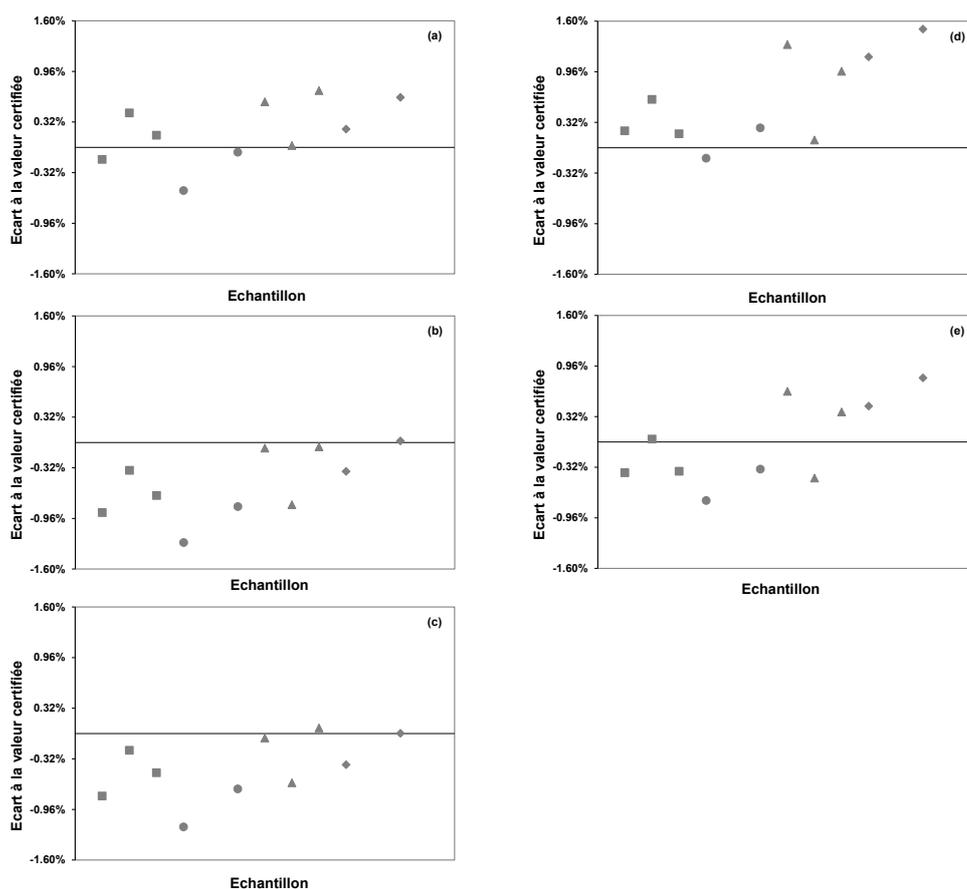


Figure 26 : Ecart à la valeur certifiée des teneurs expérimentales en hydrogène des matériaux de référence certifiés pour chaque étalonnage testé 
$$\text{écart} = \left( \frac{x_{\text{exp}} - x_{\text{certifié}}}{x_{\text{certifié}}} \right)$$
.

(a) étalonnage BBOT, (b) étalonnage sulphanilamide, (c) étalonnage cystine, (d) étalonnage méthionine, (e) étalonnage mixte. (■) Échantillon méthionine, (●) échantillon BBOT, (▲) échantillon sulphanilamide, (◆) échantillon cystine.

Quels que soient les matériaux de référence certifiés, ou mélanges de matériaux de référence certifiés, utilisés pour établir la droite d'étalonnage, l'écart à la valeur certifiée est toujours inférieur à 2 %. C'est pourquoi l'égalité des valeurs expérimentales et certifiées est toujours vérifiée. L'utilisation d'étalonnages simples entraîne systématiquement une légère sous- ou surestimation des teneurs en hydrogène au contraire de l'utilisation d'un étalonnage mixte qui est caractérisé par une distribution aléatoire des écarts aux valeurs certifiées autour de zéro. La distribution normale de ces écarts autour de zéro a été vérifiée en utilisant une droite de Henry (figure 27) [AFNOR, 1995]. Celle-ci permet notamment d'estimer approximativement la moyenne de la distribution par l'intersection à l'origine.

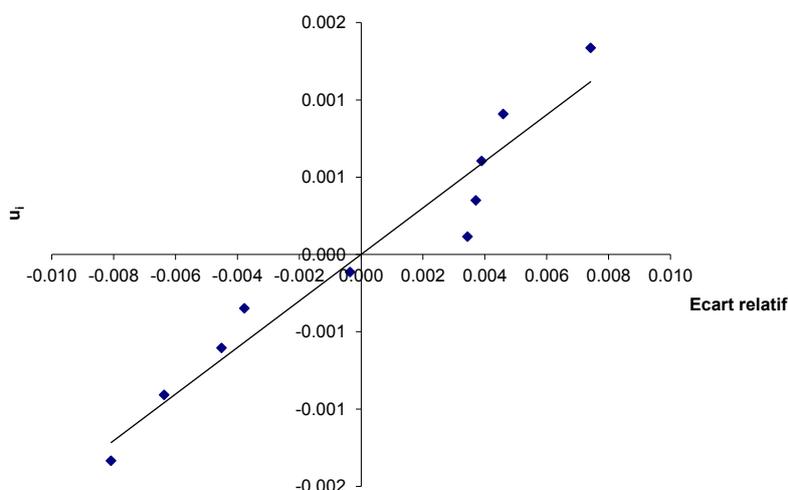


Figure 27 : Droite de Henry construite à partir des écarts relatifs entre les teneurs en hydrogène, de chaque matériau de référence certifié déterminées expérimentalement avec un étalonnage mixte, et les valeurs certifiées.  $u_i$  correspond au « normit de x » pour « normal unit ». Cette valeur est calculée à partir de la variable normale réduite [AFNOR, 1995].

L'ajustement des points étant voisin d'une droite, l'hypothèse d'une distribution normale des écarts relatifs entre les valeurs expérimentales et certifiées est acceptée. En outre, la distribution des écarts relatifs entre les teneurs en hydrogène déterminées expérimentalement avec un étalonnage mixte et les valeurs certifiées, soit l'intersection à l'origine de la droite de Henry, est quasiment égale à zéro ( $1,7 \times 10^{-6}$ ). Ceci signifie que l'écart moyen entre les valeurs expérimentales déterminées avec une droite d'étalonnage mixte et les valeurs certifiées est quasiment nul (tableau 15).

Tableau 15 : Estimation de la valeur centrale de la distribution des écarts relatifs entre les teneurs en hydrogène déterminées expérimentalement avec chaque étalonnage testé et les valeurs certifiées

| Etalonnage    | Ecart relatif moyen entre les valeurs expérimentales et certifiées (%) |
|---------------|--|
| Mixte         | $1,7 \times 10^{-4}$   |
| BBOT          | 0,2  |
| Sulfanilamide | -0,5   |
| Cystine       | -0,4   |
| Méthionine    | 0,6  |

Les écarts moyens entre les teneurs en hydrogène déterminées expérimentalement avec un étalonnage simple et les valeurs certifiées sont relativement faibles mais toujours supérieures à celui obtenu avec un étalonnage mixte (d'un facteur 1000 environ). Ces valeurs confirment les observations précédentes puisqu'avec des écarts moyens négatifs, l'utilisation des droites d'étalonnage sulfanilamide et cystine entraîne une légère sous-estimation des résultats tandis que l'utilisation des droites méthionine et BBOT entraîne une légère surestimation des résultats. Par conséquent, l'étalonnage mixte qui permet de s'affranchir des biais associés à l'utilisation d'un matériau de référence unique est à privilégier pour les analyses des teneurs en hydrogène.

L'hydrogène étant l'élément d'intérêt dans le cadre de l'analyse du tritium organiquement lié, il conditionne le choix de l'étalonnage. Les éléments C, N et S sont donc déterminés simultanément avec un étalonnage mixte. Les teneurs en carbone et azote des différents MRC déterminées avec chacune des droites d'étalonnage testées sont équivalentes aux valeurs certifiées. Par conséquent, l'utilisation d'un étalonnage mixte pour ces éléments est tout aussi cohérente que pour l'hydrogène.

Pour les éléments oxygène et soufre, les résultats sont quelque peu différents. En effet, l'étude statistique ne valide pas, à l'heure actuelle, l'égalité des droites d'étalonnage ( $F_{calc}^{conf} > F_{tab}^{conf}$ ). Cependant, cette dérive s'explique par différents points liés à la procédure analytique.

L'oxygène fait partie des éléments majoritaires dans les échantillons de l'environnement. Par conséquent, l'optimisation de la procédure d'analyse de l'oxygène est d'un intérêt majeur, notamment pour l'étude de la spéciation du tritium. La non-validation de l'hypothèse d'une égalité des réponses observées, pour une même masse d'oxygène injectée, s'explique par une dégradation de la colonne chromatographique au cours des expériences réalisées pour l'évaluation des performances analytiques de l'analyseur élémentaire. En effet, sur 150 analyses réalisées, un décalage de 26 % du temps de rétention du pic « oxygène » vers les faibles temps de rétention est observé ( $Tr_1 = 2,42$  min ;  $Tr_2 = 1,79$  min). Ce dernier peut s'expliquer par une saturation rapide du piège à eau situé en amont de la colonne chromatographique puis, par une dégradation de la colonne chromatographique. Cette dégradation a probablement entraîné l'obtention de réponses variables pour l'oxygène. En effet, pour toutes les analyses ultérieures, une attention particulière a été portée à la périodicité de maintenance du piège à eau (toutes les 50-100 analyses). Les données ainsi acquises présentent une variation du temps de rétention de l'ordre de 5 % ( $n > 300$ ). Cette variation est tout à fait acceptable par rapport à l'incertitude associée au temps de rétention et fixée à 10 % (chapitre 2). Ces données n'ont pas été acquises spécifiquement pour l'évaluation des performances de l'analyseur, mais leur utilisation pour une étude succincte des

différents étalonnages tend à valider l'égalité des réponses pour une même masse injectée, quel que soit le matériau de référence considéré.

Pour l'analyse du soufre, un catalyseur ( $V_2O_5$  par exemple) doit être ajouté dans la nacelle lors de la préparation de l'échantillon pour optimiser la combustion et la conversion catalytique des composés soufrés (chapitre 2) [Marco et al, 2002 ; Marco et al, 2003]. En fonction du catalyseur et de l'échantillon, le ratio quantité d'échantillon/quantité de catalyseur doit être optimisé. Les résultats issus de la littérature montrent qu'en fonction de la nature du catalyseur et du ratio échantillon/catalyseur, les teneurs déterminées en soufre pour un même échantillon varient [Marco et al, 2003]. A titre d'exemple, un échantillon ayant une teneur en soufre certifiée à 19,12 % a été analysé avec un catalyseur (oxyde de tungstène et oxyde de magnésium) et deux ratios échantillon/catalyseur différents. Le résultat de la mesure obtenue avec un ratio 2/1 est de 18,25 % tandis qu'il est de 19,25 % pour un ratio 1/2. Par conséquent, l'introduction de quantités variables de  $V_2O_5$  lors des analyses est susceptible d'avoir une influence sur la combustion des groupements soufrés, et d'entraîner des variations importantes dans les aires détectées pour une même masse de soufre injectée. Les quantités de catalyseur introduites lors des analyses dans le cadre de cette étude ont été aléatoires, pour l'obtention de ratios échantillon/catalyseur de l'ordre 1/2. Ce ratio doit donc être optimisé et de nouvelles données acquises pour conclure sur l'étalonnage optimal à utiliser. Le soufre étant cependant un composé minoritaire, dans les échantillons environnementaux, pour la détermination des activités du tritium organiquement lié, cette optimisation n'a pas été entreprise dans le cadre de ces recherches.

Les données concernant ces deux éléments sont donc également basées sur un étalonnage mixte.

## **II. VERIFICATION DE LA LINEARITE**

### **II.1. RESULTATS**

La linéarité est vérifiée en calculant deux fonctions discriminantes  $F_{calc}$  et en les comparant avec les valeurs tabulées dans les tables de Fisher-Snedecor pour un risque  $\alpha = 0,05$  comme décrit dans le chapitre 2 (tableau 16) [AFNOR, 1999].

Tableau 16 : Validation du modèle linéaire sur la gamme d'étalonnage choisie. Comparaison des valeurs critiques calculées et des valeurs tabulées.

| élément | gamme (mg)    | $F_{calc}^{mod}$ | $F_{tab}^{mod}$ | $F_{calc}^{reg}$ | $F_{tab}^{reg}$ |
|---------|---------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| H       | [0,03 ; 0,10] | 0,035            | 3,634           | 1451             | 4,49            |
| N       | [0,03 ; 0,10] | 0,009            | 4,459           | 125              | 5,32            |
| C       | [0,37 ; 1,13] | 0,009            | 3,885           | 1079             | 4,75            |
| O       | [0,07 ; 0,41] | 0,784            | 2,485           | 6145             | 4,12            |

Pour chaque élément, avec  $F_{calc}^{reg} > F_{tab}^{reg}$ , la variance associée à la régression linéaire est plus faible que celle associée à l'erreur expérimentale. De plus,  $F_{calc}^{mod}$  est inférieur à  $F_{tab}^{mod}$ , indiquant que l'erreur de modèle est négligeable sur le domaine choisi. Par conséquent, le modèle linéaire et les gammes d'étalonnage sont validés.

## II.2. DISCUSSION

La réponse de l'analyseur élémentaire pour l'analyse des compositions élémentaires, et plus particulièrement pour la détermination des teneurs en hydrogène est bien linéaire. Par conséquent, une simple relation de proportionnalité lie la réponse observée à la masse injectée. De plus, la gamme d'étalonnage choisie est optimisée pour la détermination des teneurs en hydrogène d'échantillons de l'environnement, typiquement autour de 6 % (cellulose). Les gammes d'étalonnage pour les autres éléments analysés simultanément (C, N, S) sont conditionnées par l'hydrogène.

## III. JUSTESSE DE LA METHODE D'ANALYSE

### III.1. RESULTATS

Afin de vérifier la justesse de la méthode d'analyse, la composition élémentaire des matériaux de référence certifiés, considérés comme des échantillons inconnus, est déterminée à partir d'un étalonnage mixte. Les moyennes expérimentales calculées à partir des  $n$  répétitions sont ensuite comparées aux valeurs certifiées en utilisant le test statistique de l'écart normalisé ( $E_n$ ) (tableau 17).

**Tableau 17** : Comparaison des valeurs expérimentales et certifiées des matériaux de référence certifiés pour la validation de la justesse de la méthode d'analyse (k=2)

| Echantillon   | élément | $n_{\text{répétitions}}$ | Moyenne expérimentale | Valeur certifiée | $E_n$ |
|---------------|---------|--------------------------|-----------------------|------------------|-------|
| BBOT          | N       | 10                       | 6,58 ± 0,17           | 6,51 ± 0,06      | 0,37  |
|               | C       | 10                       | 71,45 ± 1,13          | 72,53 ± 0,54     | 0,87  |
|               | H       | 10                       | 6,04 ± 0,17           | 6,09 ± 0,12      | 0,23  |
|               | O       | 6                        | 7,44 ± 0,49           | 7,43 ± 0,22      | 0,02  |
| Cystine       | N       | 7                        | 11,65 ± 0,17          | 11,66 ± 0,26     | 0,04  |
|               | C       | 7                        | 29,76 ± 0,87          | 29,99 ± 0,56     | 0,20  |
|               | H       | 7                        | 5,01 ± 0,16           | 5,03 ± 0,28      | 0,06  |
|               | O       | 8                        | 25,81 ± 1,23          | 26,63 ± 0,44     | 0,65  |
| Méthionine    | N       | 7                        | 9,42 ± 0,18           | 9,39 ± 0,22      | 0,10  |
|               | C       | 8                        | 39,84 ± 1,21          | 40,25 ± 0,68     | 0,30  |
|               | H       | 8                        | 7,32 ± 0,19           | 7,43 ± 0,40      | 0,25  |
|               | O       | 8                        | 20,92 ± 1,06          | 21,44 ± 0,38     | 0,47  |
| Sulfanilamide | N       | 4                        | 16,38 ± 0,28          | 16,27 ± 0,50     | 0,20  |
|               | C       | 4                        | 41,80 ± 0,99          | 41,84 ± 0,48     | 0,02  |
|               | H       | 4                        | 4,70 ± 0,25           | 4,68 ± 0,28      | 0,06  |
|               | O       | 7                        | 17,64 ± 1,20          | 18,58 ± 0,40     | 0,77  |

Pour chaque élément et chaque échantillon, les moyennes expérimentales sont équivalentes aux valeurs certifiées ( $E_n < 1$ ). Par conséquent, l'écart entre ces valeurs est considéré statistiquement négligeable. L'égalité des teneurs expérimentales et certifiées montre que l'étalonnage mixte, et la gamme de linéarité, sont bien adaptés pour la détermination des compositions élémentaires des échantillons ayant des teneurs en hydrogène proches de celle de la cellulose ( $\approx 6\%$ ).

### III.2. DISCUSSION

Un des objectifs principaux de cette étude était de développer une procédure analytique permettant d'assurer la fiabilité des teneurs en hydrogène déterminées pour les échantillons environnementaux analysés au laboratoire. L'étalonnage le plus adapté étant défini, la linéarité du modèle étant validée et l'égalité des moyennes expérimentales et des valeurs certifiées étant à présent confirmée, la justesse de la méthode est vérifiée pour des échantillons purs ayant des teneurs en hydrogène s'échelonnant de 4,7 à 7,4 % en masse. Ces teneurs étant représentatives de celles retrouvées dans des échantillons environnementaux analysés dans le cadre des études liées au tritium organiquement lié (algues, herbe, pommes de terre...) [Baglan et Alanic, 2011], l'hypothèse de l'introduction d'un biais instrumental par l'intermédiaire des teneurs en hydrogène expérimentales est écartée, sur la gamme d'étalonnage validée. De la même façon, les teneurs en carbone des échantillons de fruits, de légumes, d'herbe et de bois avoisinent les 50 % (chapitre 1).

Les échantillons purs de cette étude couvrant une gamme s'échelonnant de 30 à 70 %, les teneurs expérimentales en carbone mesurées ne devraient également pas être biaisées.

L'un des autres objectifs de cette étude était de réduire les incertitudes associées à la teneur expérimentale en hydrogène utilisée pour la détermination des activités du tritium organiquement lié et du tritium organiquement lié non-échangeable (20 % à k=2) [Pointurier et al, 2003]. Pour l'hydrogène, l'incertitude relative (k=2) associée à la valeur expérimentale est globalement de 3 %. Par conséquent, pour des activités bas niveaux, la teneur en hydrogène de l'échantillon ne doit plus être considérée comme le facteur dominant, par rapport à l'activité de l'eau de combustion, pour la détermination des activités du tritium organiquement lié et du tritium organiquement lié non échangeable. Une méthode pour évaluer les performances de la procédure d'analyse est de comparer les incertitudes estimées à celles (i) données par le constructeur et (ii) publiées dans la littérature, pour des molécules de compositions similaires.

Les spécifications techniques (gammes de concentrations, justesse déclarée par le constructeur...) de plusieurs analyseurs élémentaires, incluant le modèle utilisé dans cette étude, ont été récemment reportées dans la littérature [Eksperiandova et al, 2011]. Les auteurs ont mis l'accent sur le fait que les constructeurs préconisent une incertitude constante sur une large gamme de concentrations (incertitude relative de 0,3 % pour des gammes de  $10^{-2}$  à 100 % en masse). Les incertitudes trouvées dans cette étude diffèrent de manière significative de celles publiées par les constructeurs (facteur 10) puisqu'elles sont de l'ordre de 3 %. Toutefois, cet ordre de grandeur, bien qu'en désaccord avec les données des constructeurs, est en accord avec des valeurs publiées dans la littérature, malgré les différentes conditions expérimentales (nature des réactifs d'oxydation, température des fours...).

Eksperiandova et al ont analysé de la cystine en utilisant un analyseur élémentaire EuroVector EA-3000, avec des réactifs tels que de l'oxyde de tungstène et du cuivre dans les tubes de combustion [Eksperiandova et al, 2011]. Les incertitudes relatives ont été déterminées en considérant uniquement l'incertitude statistique ( $\delta = \frac{s \cdot t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$ , où s est l'écart type, t le coefficient de Student pour  $\alpha = 0,05$  et n le nombre de mesures parallèles). Les teneurs en hydrogène expérimentales obtenues sont de  $(5,04 \pm 0,12)$  % pour 5 mesures parallèles. Ils obtiennent donc une incertitude relative de l'ordre de 3 % comme dans cette étude, malgré la non prise en compte de l'incertitude liée à l'étalonnage. Le facteur dominant dans le calcul des incertitudes de cette étude est l'incertitude liée à l'étalonnage. En effet, l'incertitude relative liée à la pesée de l'échantillon est de l'ordre de 0,1 % pour des masses d'échantillon de l'ordre du milligramme tandis que celle liée à l'étalonnage peut s'étendre de 1 à 5 % en fonction du niveau de masse considéré. Cet aspect rejoint des informations publiées dans la littérature affirmant que la principale source d'incertitude à l'incertitude combinée

calculée est l'incertitude liée à l'étalonnage [Marco et al, 2007]. D'une manière générale, les incertitudes relatives des teneurs en hydrogène déterminées dans des matériaux purs lors d'exercices d'intercomparaison sont de l'ordre de 1,5 à 7 % pour des gammes de fractions massiques d'hydrogène de 1,7 à 5,3 % [Companyo et al, 2008]. Par conséquent, avec une moyenne de 3 % d'incertitude relative, la méthode développée au laboratoire permet la détermination de teneurs en hydrogène avec une dispersion comparable, et donc acceptable par rapport aux méthodes déjà existantes.

A l'exception de l'oxygène, les résultats pour les autres éléments s'expriment avec des incertitudes relatives inférieures à 5 %. L'oxygène est cependant à considérer à part puisque ces incertitudes diminuent lorsque davantage de précautions sont prises vis-à-vis de la périodicité de la maintenance du piège à eau. Le carbone est quant à lui l'élément pour lequel les incertitudes relatives sont les plus faibles (incertitude relative moyenne de l'ordre de 2,5 %). D'une manière générale, et pour tout type de matrice (sols, lait en poudre, huiles végétales, matériaux purs...), le carbone est l'élément pour lequel les teneurs sont déterminées avec les incertitudes relatives les plus faibles (incertitudes relatives s'échelonnant entre 1 et 3 % pour des gammes de masse de carbone de 30 à 90 %) [Companyo et al, 2008].

Toutes ces observations, relatives à la justesse et aux incertitudes associées à la procédure d'analyse développée confirment la pertinence et l'adéquation de la méthode mise au point vis-à-vis des objectifs liés à la détermination du tritium organiquement lié.

#### **IV. FIDELITE DE LA METHODE D'ANALYSE**

##### **IV.1. RESULTATS**

Les écarts-types reflétant la dispersion de la méthode sont déterminés comme décrit dans le chapitre 2 [AFNOR, 2009]. Le constructeur préconise une dispersion, pour un même tube de combustion, ne devant pas excéder 5 %. Dans cette étude, les données utilisées pour les calculs sont tirées de séquences d'analyses réparties sur une large période de temps (> 1 an) qui couvrent donc les phénomènes associés au vieillissement des réacteurs, aux différentes maintenances effectuées, incluant le changement de réacteur (tableau 18).

**Tableau 18** : Coefficients de variation de répétabilité (CV<sub>r</sub>), inter-série (CV<sub>is</sub>) et de fidélité intermédiaire (CV<sub>Fi</sub>)

| Elément | moyenne expérimentale de r | CV <sub>r</sub> (%) | CV <sub>is</sub> (%) | CV <sub>Fi</sub> (%) |
|---------|----------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| N       | 1,90 x 10 <sup>6</sup>     | 1,42                | 2,59                 | 2,95                 |
| C       | 4,44 x 10 <sup>6</sup>     | 0,37                | 0,87                 | 0,94                 |
| H       | 1,40 x 10 <sup>7</sup>     | 0,92                | 1,50                 | 1,76                 |
| S       | 1,85 x 10 <sup>6</sup>     | 2,04                | 2,49                 | 3,22                 |
| O       | 3,12 x 10 <sup>6</sup>     | 0,96                | 2,23                 | 2,43                 |

r a été défini dans le chapitre 2 et est la réponse détectée normalisée par rapport à la masse d'élément injecté, paramètre constant quel que soit le matériau de référence considéré ( $r_x = \frac{A_x}{m_x}$ ).

Le coefficient de variation caractérisant la dispersion des mesures est défini comme le rapport des écarts-types sur la moyenne de r. Pour chaque élément et dans des conditions normales de fonctionnement de l'outil analytique, ce paramètre est une constante. Par conséquent, ces coefficients de variations doivent également être constants. Pour tous les éléments, et quelles que soient les conditions (répétabilité et fidélité intermédiaire), la dispersion des mesures est inférieure à 5 %. Cette faible dispersion des mesures confirme le fait que la méthode d'analyse est fidèle selon le critère fourni par le constructeur.

## IV.2. DISCUSSION

Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire (CV<sub>Fi</sub>) traduit la dispersion des mesures au sein du laboratoire mais dans des conditions instrumentales pouvant être variables (tubes de combustion différents, quantités de cendres accumulées dans le tube variables...). Ce coefficient sert donc à définir la variabilité intrinsèque de l'outil. Il est déterminé à partir de deux autres indicateurs de la dispersion des mesures :

- (i) le coefficient de variation de répétabilité (CV<sub>r</sub>), qui traduit les dispersions des résultats de mesures réalisées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire au sein d'une même séquence d'analyse avec le même tube de combustion et dans un laps de temps relativement court (de l'ordre d'une journée),
- (ii) le coefficient de variation inter-série (CV<sub>is</sub>), qui traduit les dispersions des résultats de mesures entre les séquences d'analyse, donc obtenus dans des conditions différentes (état des réactifs présents dans les tubes de combustion par exemple). Cette variation est corrélée à l'état de l'outil analytique (« âge » des réactifs dans les tubes de combustion, encrassement des tubes de jonction des différents éléments ou de l'injecteur, variations de débit, fuites, accumulation de cendres...)

Ces deux facteurs conditionnent la variabilité de l'outil et doivent donc être tous les deux considérés pour mieux appréhender les phénomènes pouvant entraîner une variation des teneurs en différents éléments, et particulièrement pour l'hydrogène.

D'une manière générale, tous les coefficients de variation de fidélité intermédiaire étant inférieurs à 5 %, la dispersion des mesures est satisfaisante. Cette dispersion dépend de la maîtrise de la procédure analytique ainsi que de chaque élément. De ce fait, pour le soufre et l'oxygène des voies de réduction de cette dispersion existent.

Le soufre est l'élément pour lequel la variation des données est la plus importante ( $CV_{FI} = 3,22 \%$ ), et est le seul élément pour lequel la variation au sein d'une même série est équivalente à la variation entre séries. En effet, pour les autres éléments (C, H, N, S), un facteur d'environ 2 est observé entre le  $CV_r$  et le  $CV_{IS}$ . L'ajout de quantités variables de catalyseur à l'échantillon et le fait que le ratio quantité d'échantillon/quantité de catalyseur ne soit pas encore optimisé sont les principales causes identifiées pour expliquer ces dispersions. En effet, en fonction de la quantité de catalyseur introduite, le rendement de combustion peut varier et donc influencer directement sur le paramètre  $r$ . Par conséquent, les données concernant le soufre sont à considérer avec précautions et devraient être améliorées après optimisation du ratio échantillon/catalyseur.

Le coefficient de variation de fidélité intermédiaire de l'azote est également proche de 3 % avec une contribution prépondérante du facteur  $CV_{IS}$ . L'azote n'est pas retenu par la colonne chromatographique et est donc logiquement le premier composé élué. De ce fait, l'azote est élué à un instant où le débit fluctue. En effet, les opérations successives ayant lieu au début du processus (injection d'oxygène, combustion de l'échantillon, absorption de l'oxygène en excès) entraînent une zone de non-stabilité de débit. Il est donc essentiel d'avoir les mêmes variations de débit à chaque injection pour obtenir une réponse stable de l'azote. Pour conserver une variation de débit constante, l'écoulement du gaz doit s'effectuer toujours de la même façon. Cependant, ce dernier est principalement affecté par l'état du tube de réaction, notamment par l'accumulation de cendres ou la formation d'oxyde de cuivre (piégeage de l'oxygène en excès par les fils de cuivre). Par conséquent, au sein d'une même séquence analytique les fluctuations de débit sont à peu près similaires, mais elles varient entre les séquences analytiques en raison de l'évolution de la quantité de cendres et de l'« âge » des réactifs. L'azote est donc un des éléments pour lesquels les coefficients de variation sont les plus importants.

Pour l'oxygène, en dépit d'un fonctionnement initialement non contrôlé (saturation du piège à eau, dégradation des performances de la colonne chromatographique), la variation des données est proche de 2,5 %. Pour cet élément, ces valeurs doivent pouvoir être réduites notamment en prenant plus de précautions vis-à-vis de la périodicité de la maintenance du piège à eau. En effet, au

sein d'une même séquence, les données sont répétables puisque le coefficient de variation de répétabilité est inférieur à 1 %. Cependant, la probable accumulation d'eau dans la colonne chromatographique à la suite de la saturation du piège à eau entraîne de larges variations entre les séries, expliquant ainsi la dispersion des valeurs de r entre les séquences d'analyse.

Le carbone est l'élément pour lequel les coefficients de variation sont les plus faibles, ce qui est cohérent avec le fait qu'il est l'élément majoritaire des échantillons. Le rapport signal sur bruit est donc important et la réponse relativement stable.

Les données concernant l'hydrogène sont satisfaisantes et légèrement supérieures à celles du carbone. En effet, le signal de l'hydrogène, détecté sous forme d'H<sub>2</sub>O peut être perturbé par des phénomènes d'adsorption, dans le réacteur dans des zones de « vide », en sortie de réacteur à cause de raccords chauds et dans la colonne chromatographique. Ces phénomènes peuvent entraîner une variation de signal, qui peut être limitée par le « conditionnement » de la chaîne analytique en début de séquence. Ces phénomènes peuvent expliquer la différence de dispersion de données par rapport au carbone.

Cette étude de fidélité de la méthode d'analyse est un point clé pour répondre aux problématiques analytiques et de spéciation puisqu'elle permet la définition de la variabilité intrinsèque de l'outil utilisé. Ainsi, 95 % des données acquises pour un même échantillon doivent appartenir à l'intervalle défini par  $\bar{m} \pm 2s_{FI}$ , où  $\bar{m}$  est la moyenne expérimentale et  $s_{FI}$  l'écart-type de fidélité intermédiaire. La variation propre à l'outil peut donc être exprimée en termes de pourcentages de dispersion par élément (tableau 19).

Tableau 19 : Variations relatives attribuées à l'analyseur élémentaire pour chacun des éléments constitutifs des échantillons ( $2 \times CV_{FI}$ )

|   | variation (%) |
|---|---------------|
| N | 5,91          |
| C | 1,89          |
| H | 3,51          |
| S | 6,44          |
| O | 4,87          |

Toute différence, entre deux valeurs, inférieure à l'écart défini par  $2s_{FI}$  ne peut être attribué spécifiquement à l'échantillon. En revanche, dans les conditions normales de fonctionnement de l'outil, si cette différence est supérieure à  $2s_{FI}$ , la contribution seule de l'outil peut être écartée, et une différence non négligeable de composition doit être considérée. Les conditions normales de fonctionnement doivent donc être validées expérimentalement à l'aide d'échantillons de compositions connues, par l'intermédiaire de cartes de contrôles.

## V. MISE EN PLACE DES CARTES DE CONTROLE

### V.1. RESULTATS

Les cartes de contrôle sont établies à partir des ratios  $r$  définis précédemment et sont donc utilisables quel que soit le matériau de référence certifié considéré. La ligne centrale, les limites de surveillance et les limites de contrôle sont définies à partir de l'étude de fidélité (tableau 20).

Tableau 20 : Expression de la ligne centrale, des limites de surveillance et de contrôle des cartes de contrôles établies pour chacun des éléments

|   | $\bar{r}$          | $2s_{FI}$          | $3s_{FI}$          |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| N | $1,90 \times 10^6$ | $0,11 \times 10^6$ | $0,17 \times 10^6$ |
| C | $4,44 \times 10^6$ | $0,08 \times 10^6$ | $0,13 \times 10^6$ |
| H | $1,40 \times 10^7$ | $0,05 \times 10^7$ | $0,07 \times 10^7$ |
| S | $1,85 \times 10^6$ | $0,12 \times 10^6$ | $0,18 \times 10^6$ |
| O | $3,12 \times 10^6$ | $0,15 \times 10^6$ | $0,23 \times 10^6$ |

A titre d'illustration, la carte de contrôle établie pour l'hydrogène est présentée dans la figure 28.

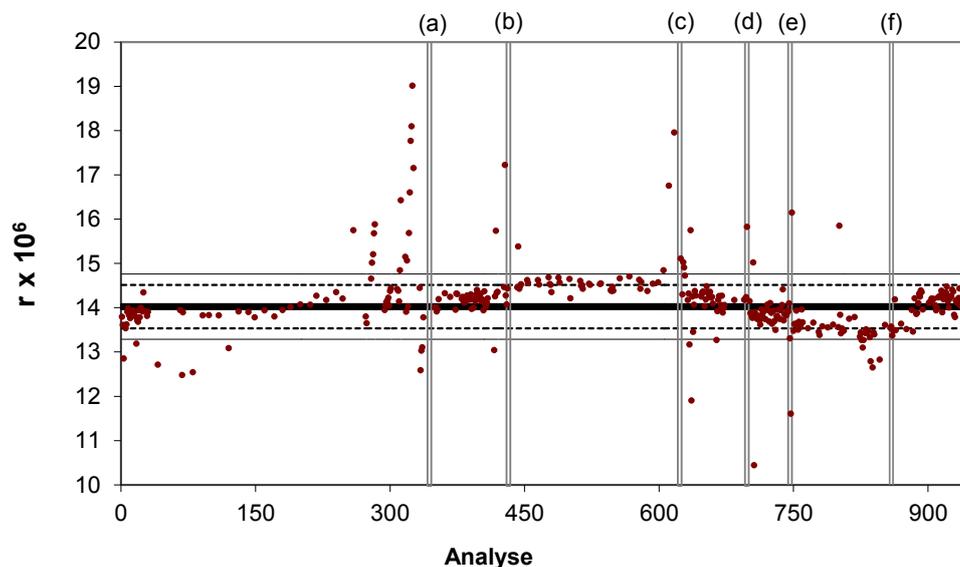


Figure 28 : Carte de contrôle de l'hydrogène obtenue après l'analyse de matériaux de référence certifiés sur une période d'un an. (—) ligne centrale ; (---) limites de surveillance ; (—) limites de contrôle ; (a) (c) (e) changement de réacteur ; (b) (d) (f) retrait des cendres.

Les différentes augmentations de signal observées sur cette carte sont dues à une diminution du débit de gaz entraîné par l'accumulation de cendres et/ou la dégradation des réactifs d'oxydation et de réduction présents dans le tube de réaction.

Sur une période d'environ 1000 analyses, les phénomènes conduisant à ces dérives de signal ont été appréhendés et ont entraîné la mise en place d'opérations de maintenance :

- (a) (c) (e) font référence aux changements de réacteur,
- (b) (d) (f) font référence aux retraits des cendres dans le haut du tube de réaction.

## V.2. DISCUSSION

Les principales sources de variation de signal sont (i) les dégradations des réactifs d'oxydation et de réduction et (ii) les variations de débits, qui peuvent notamment être entraînées par des micros fuites présentes dans le système. Les performances du réacteur dépendent du nombre d'analyses réalisées qui doit donc être estimé pour limiter les dérives de signal. Il est reporté que si les cendres s'accumulent dans le réacteur ne sont pas enlevées régulièrement, elles peuvent interférer dans les processus de combustion, entraîner des pertes de charge et perturber les mesures [Analytical method committee, 2006]. Ainsi, dans cette étude, les données montrent qu'un nettoyage du réacteur est nécessaire toutes les 100 analyses environ, et un changement de réacteur toutes les 200-250 analyses. Ces valeurs sont en accord avec le constructeur qui préconise un retrait des cendres toutes les 80-100 analyses. Il est reporté dans la littérature un changement des réactifs d'oxydation du tube de combustion toutes les 125-150 combustions, avec un retrait des cendres à chaque fin de séquence analytique [Marco et al, 2003]. Ces données sont moitié moindres que celles de cette étude. Un retrait des cendres aussi fréquent implique l'extinction du four du tube de réaction en fin de chaque séquence analytique pour effectuer cette opération. Plusieurs inconvénients sont liés à ce processus. L'oxyde de cuivre présent dans le réacteur gonfle lors du refroidissement du tube et peut donc le « boucher », entraîner des variations de débit et donc, de signal. Le constructeur préconise de limiter le nombre de cycle chauffage-refroidissement des tubes de combustion. De plus, en limitant les processus nécessitant l'ouverture de l'appareil, l'apparition de fuites susceptibles de perturber les analyses est limitée.

Les cartes de contrôle ont permis d'avoir une meilleure appréhension de tous les phénomènes pouvant perturber les mesures et de définir les plages de travail optimales. Ainsi, pour l'analyse du pourcentage d'hydrogène dans le cadre des mesures de tritium organiquement lié, l'encadrement des échantillons par des matériaux de référence certifiés permettra à l'opérateur, via l'utilisation de ces cartes de contrôle, de s'assurer que les résultats ont été obtenus dans des conditions normales de fonctionnement de l'analyseur élémentaire.

## VI. VALIDATION DE LA METHODE D'ANALYSE

### VI.1. RESULTATS

Afin de valider la méthode d'analyse, des composés, autres que les matériaux de référence certifiés utilisés pour la qualification de l'outil, mais de composition élémentaire connue, ont été analysés. Les résultats expérimentaux sont comparés aux valeurs théoriques (tableau 21).

Tableau 21: Comparaison des compositions théoriques et expérimentales de molécules connues pour la validation de la procédure analytique (exprimées en %,  $k = 2$ )

|                  | Elément | valeur théorique  | valeur expérimentale | $E_n$ |
|------------------|---------|-------------------|----------------------|-------|
| urée             | C       | 19,999 ± 0,003    | 19,93 ± 0,92         | 0,08  |
|                  | H       | 6,710 ± 0,001     | 6,66 ± 0,11          | 0,42  |
|                  | N       | 46,650 ± 0,016    | 48,00 ± 2,20         | 0,62  |
|                  | S       | /                 | /                    |       |
|                  | O       | 26,641 ± 0,009    | 25,73 ± 2,80         | 0,54  |
|                  | somme   | 100,00 ± 0,02     | 100,33 ± 3,68        |       |
| acide ascorbique | C       | 40,9167 ± 0,0024  | 40,85 ± 0,97         | 0,07  |
|                  | H       | 4,5783 ± 0,0002   | 4,55 ± 0,12          | 0,24  |
|                  | N       | /                 | /                    |       |
|                  | S       | /                 | /                    |       |
|                  | O       | 54,5050 ± 0,0015  | 51,17 ± 6,19         | 0,54  |
|                  | somme   | 100,0000 ± 0,0029 | 96,58 ± 6,26         |       |
| fructose         | C       | 40,0010 ± 0,0024  | 40,04 ± 1,01         | 0,04  |
|                  | H       | 6,7138 ± 0,0003   | 6,66 ± 0,13          | 0,39  |
|                  | N       | /                 | /                    |       |
|                  | S       | /                 | /                    |       |
|                  | O       | 53,2852 ± 0,0015  | 50,75 ± 6,70         | 0,38  |
|                  | somme   | 100,0000 ± 0,0028 | 97,45 ± 6,78         |       |

Pour chaque élément et chaque échantillon, les valeurs moyennes expérimentales sont équivalentes aux valeurs théoriques ( $E_n < 1$ ), validant la justesse de la méthode d'analyse.

### VI.2. DISCUSSION

Dans le cadre de la validation de la méthode d'analyse, un étalonnage mixte a été utilisé pour déterminer la composition élémentaire des matériaux injectés. L'écart entre les moyennes expérimentales et valeurs certifiées est considéré statistiquement négligeable, même pour l'oxygène, élément pour lequel l'optimisation de la méthode d'analyse est toujours en cours. La justesse des résultats de mesure est donc vérifiée. Par conséquent, les résultats obtenus pour des échantillons de compositions connues valident la méthode d'analyse. De plus, les teneurs en hydrogène sont déterminées avec des incertitudes relatives élargies inférieures à 3 %. Elles ont donc diminué de

manière drastique par rapport à l'incertitude relative de 20 %, basée sur la composition de la cellulose, préconisée pour la détermination des activités du tritium organiquement lié. Les plus grandes incertitudes sont celles associées aux résultats de l'oxygène qui n'a cependant pas été déterminé dans les meilleures conditions expérimentales (dégradation de la colonne chromatographique).

## CONCLUSION

Dans ce chapitre, la **procédure analytique** utilisée pour la détermination des teneurs en hydrogène des échantillons nécessaires à la conversion des activités du tritium organiquement lié et du tritium organiquement lié non-échangeable **a été développée et validée**. Les résultats montrent qu'un **étalonnage de type mixte est à privilégier** pour déterminer la composition élémentaire des échantillons. Celui-ci est en effet plus susceptible de compenser toute dérive liée à l'utilisation d'un seul matériau de référence certifié. La linéarité du détecteur à conductivité thermique sur de larges gammes de concentrations [Littlewood, 1970] a été vérifiée expérimentalement. Ainsi, la validité du modèle linéaire des gammes d'étalonnage optimisées pour l'analyse des teneurs en hydrogène a été confirmée. La méthode d'analyse est, de plus, juste et fidèle car pour des matériaux de référence certifiés, les compositions élémentaires expérimentales sont équivalentes aux valeurs certifiées. La dispersion des valeurs est également toujours inférieure à 5 %, valeur préconisée par le constructeur. Par conséquent, cette méthode peut être appliquée dans le cadre des analyses de tritium organiquement lié.

Un des objectifs de cette étude était de réduire les incertitudes associées à la valeur du pourcentage d'hydrogène utilisée pour convertir les activités du tritium organiquement lié en Becquerels par kilogramme d'échantillon. En effet, jusqu'à présent, le pourcentage d'hydrogène était un des facteurs dominant pour les incertitudes associées aux activités exprimées en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  d'échantillon et était estimé à 20 % pour couvrir la plus large gamme de teneurs possible [Pointurier et al, 2003]. Dans ce chapitre, il a été montré que **les résultats peuvent être rendus avec des incertitudes relatives inférieures à 3 % au lieu des 20 % utilisés précédemment**. Par conséquent, à présent, l'incertitude associée à l'activité de l'eau de combustion d'échantillons de faible activité (inférieure à  $100 \text{ Bq.kg}^{-1}$  de matière fraîche) est le facteur dominant pour la détermination des incertitudes associées aux activités de tritium organiquement lié, en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  d'échantillon.

Un autre objectif de ce travail était de s'assurer de la nature (expérimentale ou analytique) des variations observées entre des valeurs pour étudier l'impact de l'échange labile, à la fois sur les teneurs en hydrogène et sur les hétéroatomes, pour l'identification des familles de molécules organiques solubilisées. De plus, il était important de mettre en place un outil permettant de

s'assurer du bon fonctionnement de l'appareil dans le temps et d'identifier les principales sources de variation. **Des cartes de contrôles ont donc été mises en place** avec trois objectifs :

- (i) contrôler, en « routine », la chaîne analytique,
- (ii) avoir une meilleure appréhension sur tous les phénomènes susceptibles de perturber le signal pour définir des plages de travail optimales,
- (iii) définir la variation intrinsèque de l'outil pour définir les limites à partir desquelles une discrimination peut être effectuée entre les variations de l'outil et celles propres à l'échantillon.

Les cartes de contrôle ont été mises en place pour chaque élément à partir de l'étude de fidélité de l'outil. Les coefficients de variation, calculés pour le paramètre constant  $r$  dans les conditions de fidélité intermédiaire, ont été utilisés pour définir les limites de contrôle et de surveillance de ces cartes. **Ces cartes seront utilisées à l'avenir pour vérifier le bon fonctionnement de la chaîne d'analyse et assurer la fiabilité des résultats**, notamment des teneurs en hydrogène des échantillons de l'environnement. De plus, elles ont permis l'établissement de plages de travail optimales en définissant la périodicité de la maintenance. Les principales sources de variations de signaux sont liées aux sources de variation de débit, elles-mêmes liées aux phénomènes de vieillissement des tubes et de dégradation de la chaîne analytique. Les cendres s'accumulant dans le tube de combustion doivent être éliminées régulièrement (toutes les 100 analyses environ), et les réactifs dans les tubes de combustion doivent être remplacés toutes les 200-250 analyses.

**La variabilité de l'outil a été définie** à partir du coefficient de variation de fidélité intermédiaire. Ainsi, 95 % des résultats de mesure d'un même échantillon doivent être compris dans l'intervalle (moyenne  $\pm 2 CV_{FI}$ ). **Pour l'hydrogène, cette variation a été estimée à 3,5 %**. Par conséquent, si le résultat de la mesure d'un échantillon après échange labile diffère de moins de 3,5 % du résultat de la mesure de ce même échantillon avant échange labile, alors les deux valeurs ne pourront pas être considérées comme différentes puisque la plage de variation propre à l'outil a été estimée à 3,5 %. En revanche, si la différence entre les deux valeurs est supérieure à 3,5 %, alors une discrimination entre ces deux valeurs peut être établie. L'impact de l'échange labile sur le pourcentage d'hydrogène de l'échantillon peut donc être mis en évidence. De même, ce raisonnement s'applique pour la problématique spéciation puisqu'il est également possible pour les autres éléments de discriminer les variations propres à l'outil de celles liées à l'échantillon lui-même. De plus, si la quantité d'échantillon solubilisée est inférieure à la plage de variation de l'outil, l'impact de l'échange labile sur les compositions élémentaires des échantillons ne pourra pas être mis en évidence. L'étude de l'impact de l'échange labile fait l'objet du chapitre 4.

## Chapitre 4

### Impact de l'échange labile sur la détermination de l'activité du tritium organiquement lié non échangeable

|  |            |
|--|------------|
| Introduction.....  | 110        |
| <i>I. Détermination de la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile.....</i> | <i>110</i> |
| I.1. Quantification du carbone organique total dans les solvants d'échange labile .....            | 111        |
| I.1.1. Résultats .....   | 111        |
| I.1.2. Discussion .....  | 111        |
| I.2. Teneur en carbone des échantillons solides secs.....  | 114        |
| I.2.1. Résultats .....   | 114        |
| I.2.2. Discussion .....  | 114        |
| I.3. Fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile .....                         | 115        |
| I.3.1. Estimation globale de la quantité d'échantillon solubilisée.....                            | 115        |
| I.3.2. Estimation de la fraction de carbone solubilisée .....                                      | 115        |
| I.3.3. Discussion .....  | 116        |
| I.3.4. Conséquences pour l'analyse du tritium organiquement lié non échangeable.....               | 117        |
| <i>II. Evolution de la teneur en hydrogène au cours de l'échange labile .....</i>                  | <i>122</i> |
| II.1. Teneurs en hydrogène des échantillons.....   | 122        |
| II.1.1. Résultats .....  | 122        |
| II.1.2. Discussion .....   | 123        |
| II.2. Evolution des teneurs en hydrogène au cours des échanges labiles                             | 124        |
| II.2.1. Résultats .....  | 124        |
| II.2.2. Discussion .....   | 125        |
| II.2.3. Conséquences pour l'analyse du tritium organiquement lié non échangeable.....              | 128        |
| <i>Conclusion.....</i>   | <i>129</i> |

## Introduction

Dans ce chapitre sont présentés les résultats visant à définir si l'échange labile entraîne une solubilisation de matière et à estimer son impact sur la quantification du tritium organiquement lié. En effet l'hypothèse d'une sous-estimation des activités du tritium organiquement lié non échangeable suite à une solubilisation de matière lors de cette étape doit être écartée ou mise en évidence. De plus, les activités du tritium organiquement lié non échangeable sont actuellement calculées en utilisant le pourcentage d'hydrogène déterminé expérimentalement avant l'échange labile. Les observations expérimentales, comme la coloration des solvants, amènent des questions concernant l'évolution des échantillons et surtout l'évolution de la répartition des différents éléments constitutifs de la matière. Afin de définir si cette étape est susceptible de modifier la composition élémentaire des échantillons, et donc d'entraîner un biais dans le calcul des activités du tritium organiquement lié non échangeable, il faut vérifier expérimentalement la conservation, ou non, de cette valeur au cours de l'échange labile. De ce fait, le choix de l'utilisation du pourcentage d'hydrogène mesuré avant ou après échange labile pour les calculs des activités du tritium organiquement lié non échangeable pourra être effectué.

Les échanges labiles réalisés dans le cadre de la détermination des activités tritium organiquement lié non échangeable sont réalisés avec de l'eau non tritiée. Par conséquent, dans ce chapitre, les résultats obtenus après les échanges labiles effectués dans des conditions « stomacales » ne sont pas considérés.

### **I. DETERMINATION DE LA FRACTION D'ÉCHANTILLON SOLUBILISÉE AU COURS DE L'ÉCHANGE LABILE**

La détermination des fractions d'échantillon et de carbone solubilisées au cours de l'échange labile s'effectue en 3 étapes. Dans un premier temps, les concentrations de carbone total, carbone inorganique et carbone organique dans les solvants d'échange labile sont évaluées. Dans un deuxième temps, les teneurs en carbone de l'échantillon initial, essentielles pour faire le lien entre les fractions liquides et solides, sont mesurées sur l'échantillon solide sec initial. Enfin, ces données sont combinées pour déterminer la quantité de carbone solubilisée lors de l'échange labile, et la fraction d'échantillon solubilisée est estimée simplement par différence de masse.

## I.1. QUANTIFICATION DU CARBONE ORGANIQUE TOTAL DANS LES SOLVANTS D'ÉCHANGE

### LABILE

#### I.1.1. Résultats

Les résultats des mesures de carbone organique réalisées sur les solvants d'échange labile sont des résultats nets, déterminés en soustrayant les concentrations calculées dans les « blancs d'expérience » aux concentrations brutes des solvants d'échange des échantillons. Des blancs d'expérience ont donc été introduits dans chaque série d'échange labile effectuée. Ces « blancs d'expérience » sont les solvants d'échange non mis en contact avec de la matière solide sèche. Ils ont été traités exactement comme les échantillons (agitation pendant 48h, centrifugation et filtration). Les concentrations de chaque type de carbone dans les blancs d'expérience sont données à titre indicatif (tableau 22).

Tableau 22 : Concentrations nettes en carbone total [TC], carbone inorganique [IC] et carbone organique [OC] des solvants d'échange labile dans les conditions « eau de forage »

| Echantillon       | Série | [TC] (mg/L)<br>(k=2) | [IC] (mg/L)<br>(k=2)     | [OC] (mg/L)<br>(k=2) |
|-------------------|-------|----------------------|--------------------------|----------------------|
| Blanc             | 1     | 35 ± 2               | 33 ± 2                   | 2 ± 2                |
| Cèdre             | 1     | 1 331 ± 48           | <LQ                      | 1 331 ± 48           |
| Feuilles de chêne | 1     | 2 061 ± 59           | <LQ                      | 2 061 ± 59           |
| Pommes            | 1     | 16 340 ± 929         | 7 ± 5                    | 16 333 ± 929         |
| Pommes de terre   | 1     | 7 993 ± 439          | <LQ                      | 7 993 ± 439          |
| Blanc             | 2     | 35 ± 1               | 34 ± 2                   | 1 ± 2                |
| Chêne             | 2     | 1 599 ± 65           | <LQ                      | 1 599 ± 65           |
| Vert de poireau   | 2     | 3 779 ± 85           | Résultat exclu (u> [IC]) | 3 779 ± 85           |
| Blanc de poireau  | 2     | 15 725 ± 632         | 70 ± 15                  | 15 655 ± 632         |
| Herbe             | 2     | 971 ± 22             | 35 ± 6                   | 936 ± 23             |
| Carottes          | 2     | 24 453 ± 1 307       | <LQ                      | 24 453 ± 1 307       |

Limites de quantification calculées : [TC] = 1,63 mg/L ; [IC] = 0,33 mg/L

Ces valeurs confirment la solubilisation d'une quantité de carbone non négligeable qui reste à relier à la quantité d'échantillon solide placé en échange.

#### I.1.2. Discussion

Les concentrations déterminées dans les eaux d'échange labile peuvent être comparées à des valeurs de carbone organique dissous typiquement retrouvées dans des eaux naturelles. Les teneurs les plus basses sont retrouvées dans l'eau de mer (0,5 ppm), les eaux de pluie (typiquement < 1 ppm) et les eaux souterraines profondes (< 1 ppm). Des teneurs intermédiaires, entre 1 et 30

ppm, sont retrouvées dans les eaux des fleuves et des rivières. Enfin, les teneurs les plus élevées sont rencontrées dans les eaux des sols, avec des maximums dans les eaux de tourbières parfois supérieurs à 100 ppm [Petitjean et al, 2004]. Les eaux d'échanges labiles de cette étude se situent donc clairement parmi des eaux très chargées puisque leurs teneurs s'échelonnent entre 1331 et 24 453 ppm. Ces concentrations sont probablement liées à la durée d'immersion de l'échantillon lors des échanges labiles. De ce fait, dans des conditions naturelles, le fait d'une lixiviation d'un échantillon par l'eau de pluie ne conduira probablement pas à de telles teneurs tandis que l'immersion d'un échantillon dans de l'eau pourra conduire à une solubilisation massive de composés organiques.

La contribution du carbone inorganique à la quantité de carbone total est quasiment négligeable pour tous les échantillons, excepté pour les blancs. Dans ces derniers, la tendance inverse est observée puisque le carbone inorganique constitue la quasi-intégralité du carbone dissous (94 %). Ce phénomène peut être attribué à deux facteurs : l'altération ou la solubilisation des roches constituant le puits de géothermie (calcaire et/ou craie  $\text{CaCO}_3$ ) dans lequel l'eau de forage est prélevée, et la contribution du dioxyde de carbone atmosphérique dissous. Cette fraction peut être estimée à partir de la loi de Henry, du pH des solutions et des constantes d'acidité des couples  $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$  ( $K_1 = 6,35$  à  $25^\circ\text{C}$ ) et  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  ( $K_2 = 10,33$  à  $25^\circ\text{C}$ ) [Sigg et al, 1992] (relation 32).

$$[\text{IC}]_{\text{atm}} = K_0 \cdot P_{\text{CO}_2} \cdot \frac{[\text{H}^+]^2 + K_1 \cdot [\text{H}^+] + K_1 \cdot K_2}{[\text{H}^+]^2} \quad \text{Eq. 32}$$

Où  $K_0$  est le coefficient de solubilité du  $\text{CO}_2$  atmosphérique ( $0,034 \text{ M} \cdot \text{atm}^{-1}$ ),  $P_{\text{CO}_2}$  est la pression partielle de  $\text{CO}_2$  dans l'atmosphère (prise comme étant une constante égale à  $0,0003 \text{ atm}$ ) et  $[\text{H}^+]$  est la concentration en ions  $\text{H}^+$  déterminée à partir du pH des solvants d'échanges labiles.

La contribution du  $\text{CO}_2$  atmosphérique dissous aux teneurs en carbone inorganique a été déterminée par le calcul pour tous les échantillons (tableau 23).

Tableau 23 : Contribution du CO<sub>2</sub> atmosphérique dissous à la concentration en carbone inorganique mesurée

| Echantillon       | Série | pH  | [IC] (mg/L) à 23°C<br>(k=2) | [IC] <sub>atm</sub> (mg/L) |
|-------------------|-------|-----|-----------------------------|----------------------------|
| Blanc             | 1     | 7   | 33 ± 2                      | 12                         |
| Cèdre             | 1     | 5,5 | <LQ (0,33 mg/L)             | 0,6                        |
| Feuilles de chêne | 1     | 5   | <LQ (0,33 mg/L)             | 0,5                        |
| Pommes            | 1     | 3,5 | 7 ± 5                       | 0,4                        |
| Pommes de terre   | 1     | 5   | <LQ (0,33 mg/L)             | 0,5                        |
| Blanc             | 2     | 7   | 34 ± 2                      | 12                         |
| Chêne             | 2     | 5   | <LQ (0,33 mg/L)             | 0,5                        |
| Vert de poireau   | 2     | 5   | Résultat exclu (u>[IC])     | 0,5                        |
| Blanc de poireau  | 2     | 4   | 70 ± 15                     | 0,5                        |
| Herbe             | 2     | 6,5 | 35 ± 6                      | 2,4                        |
| Carottes          | 2     | 3,5 | <LQ (0,33 mg/L)             | 0,4                        |

Le carbone dissous issu du dioxyde de carbone atmosphérique explique donc une partie de la concentration en carbone inorganique présent dans les blancs (35 %), mais ce dernier a une deuxième origine. Celle-ci est attribuée à la dissolution des roches composant le sol. La contribution du CO<sub>2</sub> atmosphérique dissous et du carbone inorganique, d'une manière générale, est largement dépendante du pH des solutions et diminue rapidement avec celui-ci. C'est pourquoi malgré la composition chimique de base de l'eau de forage, la majeure partie des échantillons présente des teneurs en carbone inorganique inférieures à la limite de quantification. Le pH des échantillons a été déterminé grossièrement, il est donc entaché d'une large incertitude. Par conséquent, pour la majorité des échantillons, le calcul est en accord avec la mesure. Seuls 3 types d'échantillons (pomme, blanc de poireau et herbe) ont des concentrations en carbone inorganique supérieures à la limite de quantification, qui ne s'expliquent ni par la contribution du CO<sub>2</sub> atmosphérique ni par la composition de l'eau liée aux roches sédimentaires. De ce fait, ces teneurs peuvent être liées à la composition chimique minérale même des échantillons considérés. Pour les analyses TOL et TOL-NE, les échantillons sont « essuyés » mais ne sont pas rincés préalablement à leur traitement pour limiter les échanges du tritium organiquement lié échangeable. L'herbe et le blanc de poireau poussant directement dans le sol, ce carbone inorganique peut provenir de résidus de sols restés sur les échantillons. Pour la pomme, la concentration en carbone inorganique est relativement faible et déterminée avec une grande incertitude. Par conséquent, le carbone solubilisé est essentiellement du carbone organique.

Compte tenu des différences de volumes d'échange introduits, les concentrations entre les échantillons sont difficilement comparables à ce stade de l'étude.

## I.2. TENEUR EN CARBONE DES ECHANTILLONS SOLIDES SECS

### I.2.1. Résultats

Les teneurs en carbone des échantillons solides secs avant l'échange labile sont un élément essentiel pour déterminer les fractions de carbone solubilisées au cours des échanges labiles. Elles sont déterminées par analyse élémentaire (tableau 24).

Tableau 24 : Teneurs en carbone des échantillons secs avant échange labile déterminées expérimentalement par analyse élémentaire et comparaison avec des données retrouvées dans la littérature [Baglan et Alanic, 2010]

|                   | Cette étude  | [Baglan et Alanic, 2010] |                |
|-------------------|--------------|--------------------------|----------------|
|                   | % C (k=2)    | % C (k=2)                | E <sub>N</sub> |
| Cèdre             | 51,05 ± 2,14 | 51,22 ± 1,22             | 0,07           |
| Feuilles de chêne | 46,73 ± 0,52 | 48,30 ± 0,80             | 1,65           |
| Pommes            | 39,84 ± 2,56 | 40,81 ± 0,98             | 0,36           |
| Pommes de terre   | 40,82 ± 0,81 | 42,55 ± 2,08             | 0,78           |
| Chêne             | 47,43 ± 0,58 | 51,22 ± 1,22             | 2,81           |
| Vert de poireau   | 40,99 ± 0,78 | 43,14 ± 2,66             | 0,77           |
| Blanc de poireau  | 40,70 ± 0,79 | 39,89 ± 2,28             | 0,34           |
| Herbe             | 41,82 ± 0,80 | 45,07 ± 0,54             | 3,35           |
| Carottes          | 39,90 ± 2,10 | /                        | /              |

Les valeurs expérimentales sont des moyennes déterminées avec un nombre minimum de répétitions égal à 5.

### I.2.2. Discussion

Le carbone est un élément majoritaire pour chacun des échantillons étudiés. Ces teneurs sont cohérentes avec la composition élémentaire de chacune de ces matrices. En effet, les échantillons de type « fruits et légumes », qui sont essentiellement constitués de glucides C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (chapitre 1), ont une teneur en carbone de 40 %. Les échantillons de type « bois » se composent majoritairement de macromolécules complexes. En considérant les unités de base de celles-ci, la cellulose et de l'hémicellulose dont les teneurs en carbone sont proches de 40 % et la lignine pour laquelle les valeurs s'échelonnent plutôt entre 60 et 70 %, les teneurs résultantes sont d'environ 50 %. Enfin, pour la catégorie « herbage », les teneurs en carbone sont moyennées autour de 45 %. De plus, pour la majorité des échantillons, ces valeurs, aux incertitudes près, sont en accord avec d'autres données issues de la littérature (tableau 24) [Baglan et Alanic, 2010]. Pour 3 échantillons (feuilles de chêne, chêne, herbe), la statistique ne valide pas l'égalité des teneurs en carbone entre les deux études (E<sub>N</sub> > 1). Cette différence peut s'expliquer par l'origine géographique différente des

échantillons, par la nature même des échantillons puisqu'au sein d'une même espèce (chêne), les organismes sont divisés par « genre » (chêne blanc, chêne-liège...) ou par une analyse à différents stades de développement des organismes (notamment pour les feuilles de chêne ou l'herbe).

### I.3. FRACTION D'ÉCHANTILLON SOLUBILISÉE AU COURS DE L'ÉCHANGE LABILE

#### I.3.1. Estimation globale de la quantité d'échantillon solubilisée

Une estimation globale de la quantité d'échantillon solubilisée est effectuée en supposant que l'intégralité de la fraction d'échantillon « perdue » est en réalité solubilisée lors de l'échange labile. Ainsi, cette information est obtenue par différence de masse entre l'échantillon sec de départ placé en échange labile et l'échantillon sec récupéré après l'échange (tableau 25).

Tableau 25 : Estimation globale par différence de masse de la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile

|                   | $m_{\text{sec-avant échange}} \text{ (g)}$ | $m_{\text{sec-après échange}} \text{ (g)}$ | $m_{\text{ech-solubilisé}} \text{ (g)}$ | échantillon solubilisé (%) |
|-------------------|--|--|---|----------------------------|
| Cèdre             | 15,85 ± 0,10                               | 15,53 ± 0,10                               | 0,32 ± 0,03                             | 2,0 ± 0,2                  |
| Feuilles de chêne | 15,22 ± 0,10                               | 12,31 ± 0,10                               | 2,91 ± 0,27                             | 19 ± 2                     |
| Pommes            | 15,41 ± 0,10                               | 8,75 ± 0,10                                | 6,66 ± 0,67                             | 43 ± 4                     |
| Pommes de terre   | 16,77 ± 0,10                               | 12,13 ± 0,10                               | 4,64 ± 0,46                             | 28 ± 3                     |
| Chêne             | 13,88 ± 0,10                               | 13,14 ± 0,10                               | 0,74 ± 0,07                             | 5,3 ± 0,5                  |
| Vert de poireau   | 14,35 ± 0,10                               | 8,71 ± 0,10                                | 5,64 ± 0,56                             | 39 ± 4                     |
| Blanc de poireau  | 15,93 ± 0,10                               | 10,01 ± 0,10                               | 5,92 ± 0,59                             | 37 ± 4                     |
| Herbe             | 11,79 ± 0,10                               | 8,81 ± 0,10                                | 2,98 ± 0,30                             | 25 ± 3                     |
| Carotte           | 15,69 ± 0,10                               | 9,71 ± 0,10                                | 5,98 ± 0,64                             | 38 ± 4                     |

Ces valeurs font référence à l'ensemble de l'échantillon et incluent donc tous les éléments constitutifs (C, H, N, S, O). Les incertitudes affichées pour les masses des fractions avant et après échange labile correspondent aux incertitudes de pesées (écart maximal toléré). L'incertitude liée à la perte d'échantillon au cours des différentes étapes de séparation des fractions liquides et solides n'est pas quantifiable. Cependant, compte tenu du nombre d'étapes mises en jeu et des différentes méthodes employées, elle doit être considérée comme étant égale à 10 % au minimum.

#### I.3.2. Estimation de la fraction de carbone solubilisée

La quantité de carbone solubilisée au cours de l'échange labile est déterminée à partir des concentrations en carbone organique mesurées dans les solvants d'échange et des quantités de carbone dans la matière sèche avant l'échange labile. La comparaison de la masse de carbone dans

l'échantillon initial et de la masse de carbone solubilisée permet la détermination de la proportion de carbone de l'échantillon de départ solubilisée (tableau 26).

**Tableau 26** : Corrélation des résultats COT et AE pour la détermination de la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile

|                   | [COT]<br>(mg/g <sub>solvant</sub> ) | m <sub>C-solubilisé</sub><br>(mg) | m <sub>C-échantillon</sub><br>(mg) | % C <sub>solubilisé</sub> | échantillon<br>solubilisé (%) |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Cèdre             | 1,33 ± 0,05                         | 318 ± 11                          | 8 092 ± 100                        | 3,9 ± 0,4                 | 2,0 ± 0,2                     |
| Feuilles de chêne | 2,06 ± 0,06                         | 1 520 ± 44                        | 7 112 ± 89                         | 21 ± 2                    | 19 ± 2                        |
| Pommes            | 16,33 ± 0,93                        | 3 946 ± 225                       | 6 139 ± 76                         | 64 ± 7                    | 43 ± 4                        |
| Pommes de terre   | 7,99 ± 0,44                         | 1 174 ± 65                        | 6 845 ± 83                         | 17 ± 2                    | 28 ± 3                        |
| Chêne             | 1,60 ± 0,06                         | 236 ± 10                          | 6 583 ± 84                         | 3,6 ± 0,4                 | 5,3 ± 0,5                     |
| Vert de poireau   | 3,78 ± 0,09                         | 1 867 ± 42                        | 5 882 ± 75                         | 32 ± 3                    | 39 ± 4                        |
| Blanc de poireau  | 15,65 ± 0,64                        | 3 887 ± 158                       | 6 484 ± 80                         | 60 ± 7                    | 37 ± 4                        |
| Herbe             | 0,94 ± 0,04                         | 695 ± 31                          | 4 931 ± 67                         | 14 ± 2                    | 25 ± 3                        |
| Carotte           | 24,45 ± 1,31                        | 3 620 ± 194                       | 6 260 ± 77                         | 58 ± 7                    | 38 ± 4                        |

Pour chaque échantillon, la fraction de carbone solubilisée a un ordre de grandeur similaire à la fraction d'échantillon solubilisée.

### 1.3.3. Discussion

Ces données mettent en évidence que, quel que soit l'échantillon considéré, il y a une solubilisation de matière organique lors de l'échange labile. De plus, en considérant les « familles d'échantillons » définies au sens du chapitre 1, à quelques exceptions près, une tendance se dégage, aussi bien pour les fractions d'échantillon solubilisées que pour les fractions de carbone solubilisées (tableau 27).

**Tableau 27** : Estimation globale des fractions d'échantillon et de carbone solubilisées lors des échanges labiles en fonction de la catégorie d'échantillon et composition moyenne des échantillons (annexe B.1.)

|  | Fruits et légumes | Bois | Herbage |
|--|-------------------|------|---------|
| Fraction d'échantillon solubilisée (%) | 40                | 4    | 20      |
| Fraction de carbone solubilisée (%)    | 60                | 4    | 20      |
| Glucides                               | 69                | 1    | 22      |
| Lipides                                | 2                 | -    | 3       |
| Protides                               | 2                 | -    | 14      |
| Fibres                                 | 21                | 98   | 36,5    |
| Acides organiques                      | 4                 | -    | -       |
| Composés phénoliques                   | 0,9               | 1    | 0,5     |
| Autres                                 | 0,1               | -    | 24      |

Les familles de composés « bleues » sont essentiellement constituées de molécules solubles tandis que les familles de composés « rouges » sont essentiellement constituées de molécules insolubles dans l'eau.

Ainsi, pour les fruits et légumes, et à l'exception de la pomme de terre, environ 40 % de l'échantillon de départ sont solubilisés durant l'échange labile. Les fruits et légumes sont essentiellement composés de glucides simples, solubles dans l'eau expliquant la forte solubilisation de matière pour ce type d'échantillon. La particularité de la pomme de terre (28 % d'échantillon solubilisée, 17 % de carbone solubilisé) s'explique par sa composition de base. En effet, la pomme de terre fait partie des produits amylicés (état de l'art, V.1.2.) et est essentiellement constituée d'amidon (environ 60 % de la matière sèche) [Rodriguez-Galdon et al, 2012]. L'amidon est un glucide complexe, insoluble dans l'eau, mélange de deux polymères (amylose et amylopectine) dont l'unité de base est le glucose. Par conséquent, la quantité de matière organique solubilisée dans l'eau d'échange de la pomme de terre est moins importante que pour les autres fruits et légumes. Elle résulte de la solubilisation de ses autres constituants minoritaires et de la dégradation de l'amidon. En suivant cette logique, les résultats sont cohérents puisque le bois, essentiellement composé de macromolécules (cellulose, hémicellulose, lignine) est très faiblement solubilisé. Les « herbages » sont quant à eux constitués à la fois de macromolécules (cellulose, hémicellulose, lignine) faiblement solubles mais également de glucides simples pouvant être solubilisés aisément.

#### 1.3.4. Conséquences pour l'analyse du tritium organiquement lié non échangeable

Le tritium organiquement lié non échangeable concerne les atomes de tritium liés de manière covalente aux atomes de carbone. L'intérêt est donc porté à la proportion de carbone solubilisée par rapport à la quantité de carbone dans l'échantillon à l'état initial. En effet, en considérant que tout le TOL-NE est lié aux atomes de carbone, que l'activité est répartie de manière homogène au sein de l'échantillon, et qu'il n'y a pas de solubilisation préférentielle entre les molécules non tritiées et les molécules tritiées, la proportion de TOL-NE solubilisée au cours de l'échange labile est la même que celle de carbone solubilisée. Ainsi, lors des échanges labiles, pour des échantillons de type « bois », 4 % du TOL-NE présent dans l'échantillon initial sont solubilisés tandis que cette fraction vaut 60 % pour des échantillons de type « fruits et légumes » et 20 % pour des échantillons de type « herbage ». D'une manière générale, pour des mesures bas niveau, les activités TOL sont exprimées en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  de matière fraîche ou sèche et sont rendues avec des incertitudes proches de 20 % [Pointurier et al 2004 ; Baglan et al, 2005 ; Workman et al, 2005 ; Baglan et al, 2008 ; Baglan et al, 2009]. Pour des échantillons de type « bois », la quantité de TOL-NE solubilisée lors de l'échange labile semble négligeable face aux incertitudes. La solubilisation de TOL-NE pour des échantillons de type «herbage » est quant à elle du même ordre de grandeur que ces incertitudes. Concernant les échantillons de type « fruits et légumes », la proportion de TOL-NE solubilisé lors de l'échange labile est très largement supérieure aux incertitudes habituelles des

résultats. Une quantité d'informations non négligeable est donc « perdue » dans le solvant d'échange labile. Cependant, pour le calcul des activités du tritium organiquement lié non échangeable selon la procédure usuelle, seule l'activité mesurée dans l'eau de combustion de l'échantillon sec récupéré après échange labile, et exprimée en Bq.kg<sup>-1</sup> d'eau (l'activité volumique), est importante. En effet, l'échantillon sec récupéré après l'échange labile est calciné pour cette mesure. L'eau de combustion récupérée permet ensuite la conversion des concentrations en activités, exprimées en Becquerels par kilogramme d'eau de combustion, en Becquerels par kilogramme de matière fraîche. Cette conversion est effectuée par l'intermédiaire des rapports de masses sèches et fraîches et du rendement hydrogène comme rappelé dans l'équation 33.

$$C_{A_{m_f}^{TOL-NE}} = C_{A_{comb}^{HTO}} \times \frac{\% H_{ech}}{\% H_{eau}} \times \frac{m_s}{m_f} \quad \text{Eq. 33}$$

Où  $C_{A_{comb}^{HTO}}$  est l'activité volumique mesurée dans l'eau de combustion, exprimée en Bq.kg<sup>-1</sup> d'eau de combustion ( $C_{A_{comb}^{HTO}} = \frac{(N-N_0)}{t \times \eta} \times \frac{1}{m}$ , voir chapitre 1),  $\% H_{ech}$  et  $\% H_{eau}$  sont respectivement le pourcentage d'hydrogène de l'échantillon et de l'eau,  $m_s$  fait référence à la masse d'échantillon sec récupéré après lyophilisation de l'échantillon frais, donc la masse d'échantillon sec avant échange labile,  $m_f$  est la masse d'échantillon frais.

En supposant que l'activité du tritium organiquement lié non échangeable est répartie de manière homogène au sein de l'échantillon de départ, et qu'il n'y a pas de solubilisation préférentielle des molécules tritiées, l'activité volumique mesurée dans l'eau de combustion, exprimée en Bq.kg<sup>-1</sup> d'eau de combustion, sera inchangée quelle que soit la fraction d'échantillon solubilisée. De plus, en gardant l'hypothèse de base d'une répartition homogène de l'activité tritium organiquement lié non échangeable dans l'échantillon initial, le ratio  $m_s/m_f$  est figé avant l'échange labile. Par conséquent, si la teneur en hydrogène de l'échantillon est constante au cours de l'échange, le fait d'une solubilisation plus ou moins massive de matière durant les échanges aura un impact sur la masse d'échantillon récupérée après l'échange labile mais pas sur l'activité volumique de l'eau de combustion. Le seul impact probable d'une solubilisation massive d'échantillon réside donc dans la récupération d'une quantité d'eau de combustion de l'échantillon sec insuffisante pour la mesure par scintillation liquide.

En revanche, en raisonnant non plus en termes d'activité volumique (Bq.kg<sup>-1</sup> d'eau de combustion) mais en termes d'activité du tritium organiquement lié non échangeable de l'échantillon (Bq), deux phénomènes sont à considérer dans la matrice solide pour expliquer l'évolution de l'activité au cours de l'échange labile : (i) le « confinement » d'une certaine quantité de TOL-E en fonction de

l'accessibilité de l'atome de tritium considéré et (ii) la solubilisation de molécules organiques porteuses de TOL-NE. Dans une étude récente, la contribution du tritium dit « buried » à l'activité du tritium organiquement lié a été déterminée en utilisant des agents dénaturants (dodécylsulfate de sodium par exemple) pour libérer les atomes de tritium « coincés » dans les macromolécules complexes [Kim et al, 2008]. Les auteurs ont montré que les concentrations en TOL dans des plantes diminuent de 5 % après dénaturation de l'échantillon. De ce fait, le tritium « buried » ne compte que pour une faible fraction de l'activité TOL. Par conséquent, dans le cas de l'évolution des activités de la fraction solide placée en échange labile, la contribution du TOL-E « buried » est négligée. La solubilisation de molécules organiques porteuses de tritium organiquement lié non échangeable peut quant à elle entraîner une diminution de l'activité mesurée. En effet, si l'activité est répartie de manière homogène dans l'échantillon de départ, alors l'activité de la matière sèche récupérée après l'échange labile est proportionnelle à la quantité de matière solubilisée. De ce fait, la quantité de molécules organiques porteuses de tritium organiquement lié non échangeable solubilisée est dépendante de la quantité d'échantillon solubilisée. Elle peut être estimée par le calcul en comparant l'activité de la matière sèche après échange labile, exprimée en Bq, à celle qui aurait été mesurée s'il n'y avait pas de solubilisation de matière lors de l'échange labile. Le facteur de proportionnalité ainsi déterminé sera représentatif de la proportion de molécules porteuses de tritium organiquement lié solubilisées.

L'activité du tritium organiquement lié non échangeable, exprimée en Bq pour l'échantillon frais est calculée à l'aide de la relation 34.

$$A_{m_f}^{TOL-NE} = A_{comb}^{HTO} \times \frac{\% H_{ech}}{\% H_{eau}} \times \frac{m_{s-après\ échange}}{m_f} \quad \text{Eq. 34}$$

Où  $A_{comb}^{HTO}$  est l'activité de l'eau de combustion exprimée en Bq ( $A_{comb}^{HTO} = \frac{(N-N_0)}{t \times \eta}$ ), et  $m_{s-après\ échange}$  est la masse sèche d'échantillon récupérée après l'échange labile. L'équation 34 peut s'exprimer en fonction d'un facteur  $x$  représentant la solubilisation de matière lors de l'échange labile.

- (1) Soit un échantillon ayant une teneur en eau de  $f_{eau}$ . La masse sèche avant échange labile peut s'exprimer en fonction de la masse fraîche :

$$m_{s-avant\ échange} = (1 - f_{eau}) \times m_f \quad \text{Eq. 35}$$

- (2) En considérant une solubilisation de matière lors de l'échange labile égale à  $x$ , la masse sèche récupérée après échange labile peut s'exprimer en fonction de la masse sèche avant échange labile, et donc en fonction de la masse fraîche initiale :

$$m_{s\text{-aprèséchange}} = (1 - x) \times m_{s\text{-avantéchange}} = (1 - x)(1 - f_{eau}) \times m_f \quad \text{Eq. 36}$$

X est donc compris entre 0 et 1, où 0 correspondrait à un échange labile au cours duquel aucune solubilisation ne serait entraînée et 1, un échange labile au cours duquel tout l'échantillon serait solubilisé,

- (3) En considérant que l'activité du tritium organiquement lié non échangeable est répartie de manière homogène dans l'échantillon initial, l'activité dans l'eau de combustion ( $A_{comb}^{HTO-x}$ ) peut s'exprimer en fonction de l'activité de l'eau de combustion mesurée s'il n'y avait pas de solubilisation ( $A_{comb}^{HTO}$ ) :

$$A_{comb}^{HTO-x} = (1 - x) \times A_{comb}^{HTO} \quad \text{Eq. 37}$$

Par conséquent, en remplaçant les termes de l'équation 34, l'activité du tritium organiquement lié non échangeable, exprimée en Bq et déterminée après un échange labile au cours duquel une solubilisation de quantité x est entraînée, peut s'écrire :

$$A_{m_f-x}^{TOL-NE} = (1 - f_{eau})(1 - x)^2 \times A_{comb}^{HTO} \times \frac{\% H_{ech}}{\% H_{eau}} \quad \text{Eq. 38}$$

Pour estimer l'impact de la solubilisation sur les activités du tritium organiquement lié non échangeable, les activités obtenues avec une solubilisation x lors de l'échange labile sont comparées à l'activité obtenue si l'échange labile n'entraînait aucune solubilisation (x = 0) et l'équation 39 est obtenue:

$$\frac{A_{m_f-x}^{TOL-NE}}{A_{m_f}^{TOL-NE}} = (1 - x)^2 \quad \text{eq. 39}$$

Dans les conditions réelles, l'activité du tritium organiquement lié dans la matière fraîche, exprimée en Bq, correspond à la valeur calculée à partir de l'activité de l'eau de combustion récupérée après calcination de l'échantillon sec, lui-même récupéré après l'échange labile. Comme la solubilisation de matière a été démontrée pour tous les échantillons, la valeur obtenue correspond à  $A_{m_f-x}^{TOL-NE}$ . Par conséquent, un facteur multiplicatif doit être introduit pour remonter à l'activité réelle, en Bq, de l'échantillon initial. Ce facteur est représentatif de la quantité de molécules organiques porteuses de tritium organiquement lié non échangeable solubilisées lors de l'échange labile. Il peut être déterminé en fonction de la fraction x d'échantillon solubilisée suivant la fonction  $f(x) = (1 - x)^2$ .

Pour les familles d'échantillons de cette étude, il est donc possible d'estimer la proportion de molécules porteuses de TOL-NE solubilisées en fonction de la fraction d'échantillon solubilisée (tableau 28).

Tableau 28 : Facteurs correctifs à appliquer à l'activité du tritium organiquement lié non échangeable calculée pour la détermination de l'activité réelle (Bq)

|                    | « Fruits et légumes » | « Bois » | « Herbage » |
|--------------------|-----------------------|----------|-------------|
| x                  | 0,40                  | 0,04     | 0,20        |
| (1-x) <sup>2</sup> | 0,36                  | 0,92     | 0,64        |
| Facteur correctif  | 2,78                  | 1,09     | 1,56        |

De ce fait, la solubilisation de matière lors de l'échange labile entraîne bien une sous-estimation des activités du tritium organiquement lié non échangeable calculées en Bq pour les échantillons frais qui avoisine un facteur proche de 3 pour les échantillons de type « fruits et légumes ». Par conséquent, cette activité TOL-NE devrait être retrouvée dans le solvant d'échange labile et mesurée en tant que « TOL-E ». Afin de vérifier cette hypothèse, un échantillon de type « fruit et légume » tritié pourrait être mesuré. En considérant que l'activité du tritium organiquement lié se répartit pour 70 % sous la forme TOL-NE et 30 % sous la forme TOL-E, l'activité de chacune des formes TOL-NE et TOL-E peut être estimée en déterminant l'activité TOL à l'aide de la procédure validée. L'activité TOL-NE déterminée ensuite expérimentalement devrait être 3 fois inférieure à l'activité estimée tandis que l'activité TOL-E devrait être surestimée. L'utilisation du facteur correctif déterminé dans cette étude devrait permettre de retrouver par le calcul les activités des différentes fractions considérées.

Lors de l'échange labile, de la matière organique issue de l'échantillon de départ est solubilisée. Cette étape entraîne donc :

- Un échange isotopique entre les atomes de tritium situés sur les positions échangeables des molécules constituant l'échantillon,
- Une solubilisation de matière organique, constituée de molécules ayant pu intégrer du tritium aussi bien en position échangeable qu'en position non échangeable.

Les solubilisations sont largement dépendantes de la nature des échantillons et plus précisément de leurs compositions chimiques. En considérant la définition des fractions tritium d'un organisme vivant au sens de l'analyste, la combustion de la matière sèche récupérée après l'échange labile permet de déterminer l'activité volumique du tritium organiquement lié non échangeable, si et seulement si l'activité est répartie uniformément dans l'échantillon initial et indépendamment de la fraction solubilisée. Cependant, en termes d'activité, l'échange labile entraîne une perte d'information liée à une solubilisation de molécules organiques, probablement constitutives de

l'échantillon de départ. La définition des fractions du tritium organiquement lié au sens de l'analyste, basée sur les propriétés de l'élément hydrogène, n'est donc pas suffisante pour rendre compte du comportement du tritium lors de l'échange labile. En effet, l'échange labile entraîne également la solubilisation de matière, donc de molécules dans leur intégralité avec les atomes de tritium situés dans les positions non échangeable. Par conséquent, la description des fractions TOL-E et TOL-NE n'est pas aussi « simple » que la vision ne tenant compte que des propriétés élémentaires des liaisons chimiques impliquant le tritium. Les fractions de tritium au sein d'un organisme dépendent donc à la fois de l'origine du tritium, de la forme chimique du tritium au sein de l'organisme ainsi que de la composition de l'échantillon [Kim et al, 2013a]. L'introduction d'une nouvelle définition proposée par Kim et al [Kim et al, 2013a] et prenant en compte la solubilité des composés porteurs de tritium est à envisager. Il est donc essentiel d'identifier ces molécules, à la fois pour mieux comprendre le comportement du tritium dans l'environnement mais également pour avoir une meilleure vision de la répartition du tritium dans les organismes et ainsi être capable, *in-fine*, d'évaluer l'impact du tritium chez l'homme [Baglan et al, 2013].

## **II. EVOLUTION DE LA TENEUR EN HYDROGENE AU COURS DE L'ECHANGE LABILE**

Quelle que soit la fraction d'échantillon solubilisée, cela n'a pas d'impact sur l'activité volumique du tritium organiquement lié non échangeable. Le seul facteur susceptible d'introduire un biais dans le calcul des activités en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  de matière fraîche est le pourcentage d'hydrogène mesuré avant l'échange labile. Il faut donc vérifier si cette teneur est modifiée au cours de l'échange labile et choisir la valeur la plus pertinente pour les calculs. Cette étude se fait par la comparaison des valeurs obtenues avant et après échange labile.

### **II.1. TENEURS EN HYDROGENE DES ECHANTILLONS**

#### **II.1.1. Résultats**

Les données présentées dans le tableau 29 sont les moyennes expérimentales déterminées après élimination des valeurs aberrantes et vérification de la distribution aléatoire des données suivant une loi normale.

Tableau 29 : Teneurs moyennes en hydrogène des échantillons solides secs avant échange labile ( $k=2$ ) et comparaison avec des teneurs en hydrogène des différents échantillons répertoriées dans la littérature. Les incertitudes associées aux valeurs issues de [Baglan et Alanic, 2011] et [CETAMA, 2013] correspondent aux écarts type des mesures.

|                   | % H         |                        |              |
|-------------------|-------------|------------------------|--------------|
|                   | Cette étude | Baglan et Alanic, 2011 | Cetama, 2013 |
| Cèdre             | 6,09 ± 0,26 | 6,03 ± 0,08            | 6,01 ± 0,26  |
| Feuilles de chêne | 5,89 ± 0,16 | 5,77 ± 0,22            | 5,80 ± 0,18  |
| Pommes            | 6,43 ± 0,30 | 6,29 ± 0,14            | 6,43 ± 0,34  |
| Pommes de terre   | 6,15 ± 0,15 | 6,34 ± 0,44            | 6,21 ± 0,38  |
| Chêne             | 5,71 ± 0,16 | 5,78 ± 0,18            | 5,77 ± 0,24  |
| Vert de poireau   | 5,82 ± 0,13 | 6,22 ± 0,30            | -            |
| Blanc de poireau  | 6,04 ± 0,14 | 6,02 ± 0,26            | -            |
| Herbe             | 5,59 ± 0,13 | 5,87 ± 0,14            | 5,92 ± 0,36  |
| Carotte           | 6,18 ± 0,26 | -                      | 6,03 ± 0,06  |

La teneur en hydrogène des échantillons est globalement moyennée autour de 6 %, teneur quasiment équivalente à celle de la cellulose (6,2 %) qui était utilisée précédemment dans les calculs des concentrations en activité de tritium organiquement lié et tritium organiquement lié non échangeable en  $\text{Bq.kg}^{-1}$  de matière fraîche.

### II.1.2. Discussion

La teneur en hydrogène de la cellulose utilisée précédemment pour la conversion des activités TOL et TOL-NE induisait une large incertitude mais englobait bien l'intégralité des teneurs retrouvées dans le tableau 29 ( $6,2 \pm 1,2$ ) %. Celles-ci sont néanmoins plus justes et les incertitudes sont réduites drastiquement puisqu'elles n'excèdent pas 5 %. De ce fait, la méthode d'analyse des teneurs en hydrogène développée permet bien de réduire les incertitudes liées à cette valeur. D'autre part, les valeurs expérimentales sont globalement en accord avec d'autres teneurs retrouvées dans la littérature (tableau 29) [Baglan et Alanic, 2011 ; CETAMA, 2013]. Pour chaque échantillon, le test  $E_N$  de l'écart normalisé valide l'égalité des teneurs expérimentales et des valeurs reportées dans [CETAMA, 2013] lorsque celles-ci sont considérées comme les valeurs de référence ( $E_N < 1$ ). Dans le cas où les valeurs issues de [Baglan et Alanic, 2011] sont considérées comme les valeurs de référence, seules les teneurs en hydrogène obtenues pour le vert de poireau et l'herbe sont en désaccord ( $E_N > 1$ ). L'écart est net pour le vert de poireau et pourrait s'expliquer par la provenance de l'échantillon voire par une séparation entre le blanc et le vert de poireau approximative et entraînant une dispersion des données importante. En revanche, pour l'herbe, le test statistique ne valide pas l'égalité des teneurs alors que la différence entre les valeurs est plus

faible que celle entre les valeurs de cette étude et celles issues de [CETAMA, 2013]. Cette différence de conclusion s'explique par les incertitudes puisque dans le cas de l'étude menée par Baglan et Alanic [Baglan et Alanic, 2011], l'incertitude affichée, correspondant à l'écart type des mesures, est relativement faible et conduit à un  $E_N$  supérieur à 1 du fait d'une petite valeur au dénominateur. De plus, l'herbe analysée a différentes origines puisque dans le cadre de cette étude, elle a été directement prélevée sur le site de l'étude (91) tandis que les valeurs répertoriées dans [CETAMA, 2013] proviennent à la fois du site de La Hague (50), du centre CEA de Valduc (21) ainsi que du centre de Bruyères-le-Châtel (91).

## II.2. EVOLUTION DES TENEURS EN HYDROGENE AU COURS DES ECHANGES LABILES

### II.2.1. Résultats

La teneur en hydrogène des échantillons est l'élément déterminant pour la conversion des activités volumiques du tritium organiquement lié non échangeable en  $Bq.kg^{-1}$  de matière fraîche. La mise en évidence d'une évolution, ou non, lors de l'échange labile est donc un point clé pour la validation de la procédure actuelle de quantification. Les teneurs en hydrogène de chaque échantillon déterminées expérimentalement avant et après échange labile sont comparées en utilisant les critères de comparaison des valeurs définis dans le chapitre 2 (tableau 30).

Tableau 30 : Comparaison des teneurs en hydrogène avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiances définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (S). 1 fait référence à la population avant échange labile et 2 à la population après échange labile.

|                   | % H avant<br>échange labile | % H après<br>échange labile | statistique          | S   |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|-----|
| Cèdre             | 6,09 ± 0,21                 | 6,03 ± 0,21                 | $m_1=m_2$            | oui |
| Feuilles de chêne | 5,89 ± 0,21                 | 5,98 ± 0,21                 | moyennes différentes | oui |
| Pommes            | 6,43 ± 0,23                 | 6,44 ± 0,23                 | $m_1=m_2$            | oui |
| Pommes de terre   | 6,15 ± 0,22                 | 6,20 ± 0,22                 | $m_1=m_2$            | oui |
| Chêne             | 5,71 ± 0,20                 | 5,80 ± 0,20                 | $m_1=m_2^*$          | oui |
| Vert de poireau   | 5,82 ± 0,20                 | 6,21 ± 0,22                 | moyennes différentes | oui |
| Blanc de poireau  | 6,04 ± 0,21                 | 6,13 ± 0,22                 | moyennes différentes | oui |
| Herbe             | 5,59 ± 0,20                 | 5,93 ± 0,21                 | moyennes différentes | oui |
| Carotte           | 6,18 ± 0,22                 | 6,29 ± 0,22                 | moyennes différentes | oui |

\* Pour cet échantillon, le test de STUDENT n'a pas pu être utilisé à cause de la non-validation de l'homoscédasticité. En effet, les valeurs obtenues après échange labile étaient caractérisées par une dispersion plus importante que la population avant échange labile (écart type relatif avant échange = 0,4 % et écart type relatif après échange = 2 %). Cependant, les résultats sont validés par les contrôles encadrant les échantillons et restent dans les conditions de validité de l'outil définies dans le chapitre 3. Aucune valeur aberrante n'a, de plus, été mise en évidence et l'échantillon après échange labile a été analysé dans les mêmes conditions que celui avant échange labile. L'échantillon a également été homogénéisé de manière similaire à tous les autres. De ce fait, les conditions expérimentales ne justifient pas cette différence observée. Par conséquent, un test non-paramétrique de comparaison des moyennes a été utilisé (test d'ASPIN-WELCH).

Le recouvrement des intervalles de confiance définissant la variabilité propre de l’outil est validé pour l’ensemble des échantillons. Il ne semble a priori pas possible de discerner une différence entre les teneurs en hydrogène avant et après échange labile.

Les conclusions du test statistique de comparaison des moyennes expérimentales sont néanmoins variables. Ainsi, des échantillons pour lesquels les écarts entre les moyennes expérimentales déterminées avant et après échange labile sont quasiment similaires (par exemple la pomme de terre, le blanc de poireau, la feuille de chêne et la carotte) ont des conclusions statistiques différentes (tableau 31).

**Tableau 31** : Comparaison des teneurs en hydrogène des échantillons, déterminées avant et après échange labile.  $\Delta$  représente l’écart entre les moyennes expérimentales ( $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ ),  $t_{\text{calc}}$  est le critère de STUDENT calculé (chapitre 2),  $t_{\alpha/2}$  et  $t_{1-\alpha/2}$  sont les critères tabulés pour  $\alpha = 0,05$

|                   | $\Delta$ | STUDENT           |                |                  |                      | $E_N$ |
|-------------------|----------|-------------------|----------------|------------------|----------------------|-------|
|                   |          | $t_{\text{calc}}$ | $t_{\alpha/2}$ | $t_{1-\alpha/2}$ |                      |       |
| Pommes            | 0,01     | -0,33             | -2,31          | 2,31             | m1=m2                | 0,04  |
| Cèdre             | 0,06     | 1,69              | -2,36          | 2,36             | m1=m2                | 0,19  |
| Pommes de terre   | 0,06     | -1,86             | -2,31          | 2,31             | m1=m2                | 0,19  |
| Chêne             | 0,08     |                   |                |                  | -                    | 0,30  |
| Blanc de poireau  | 0,09     | -2,41             | -2,31          | 2,31             | moyennes différentes | 0,30  |
| Feuilles de chêne | 0,10     | -3,21             | -2,23          | 2,23             | moyennes différentes | 0,32  |
| Carotte           | 0,10     | -4,42             | -2,31          | 2,31             | moyennes différentes | 0,33  |
| Herbe             | 0,34     | -10,00            | -2,23          | 2,23             | moyennes différentes | 1,18  |
| Vert de poireau   | 0,39     | -11,31            | -2,31          | 2,31             | moyennes différentes | 1,30  |

Le critère de STUDENT dépend de l’écart entre les moyennes, du nombre de mesures réalisées pour un même échantillon et de la dispersion des mesures (écart type commun aux deux populations comparées). Ces valeurs sont toutefois équivalentes pour chaque série de données et ne permettent donc pas de justifier d’une différence de conclusion statistique. Lorsque le critère de sélection est élargi ( $\alpha = 0,01$ ), la statistique valide l’égalité des moyennes expérimentales avant et après échange labile pour le blanc de poireau uniquement. Par conséquent, pour les autres échantillons la simple prise en compte de la dispersion des valeurs expérimentales ne permet pas la validation statistique des moyennes expérimentales. En revanche, lorsque l’écart normalisé est introduit et que les données avant échange labile sont considérées en tant que référence, la statistique valide l’égalité des teneurs en hydrogène pour tous les échantillons, à l’exception de l’herbe et du vert de poireau.

## II.2.2. Discussion

Les deux critères de comparaison utilisés permettent de définir 3 catégories d’échantillons :

- Catégorie 1 : le test statistique valide l'hypothèse d'égalité des moyennes et les intervalles de confiance se recourent,
- Catégorie 2 : le test statistique ne valide pas l'hypothèse d'égalité des moyennes mais les intervalles de confiance se recourent,
- Catégorie 3 : le test statistique ne valide pas l'hypothèse d'égalité des moyennes et les intervalles de confiance ne se recourent pas.

Les échantillons de cette étude se répartissent dans les deux premières catégories définies (figure 29).

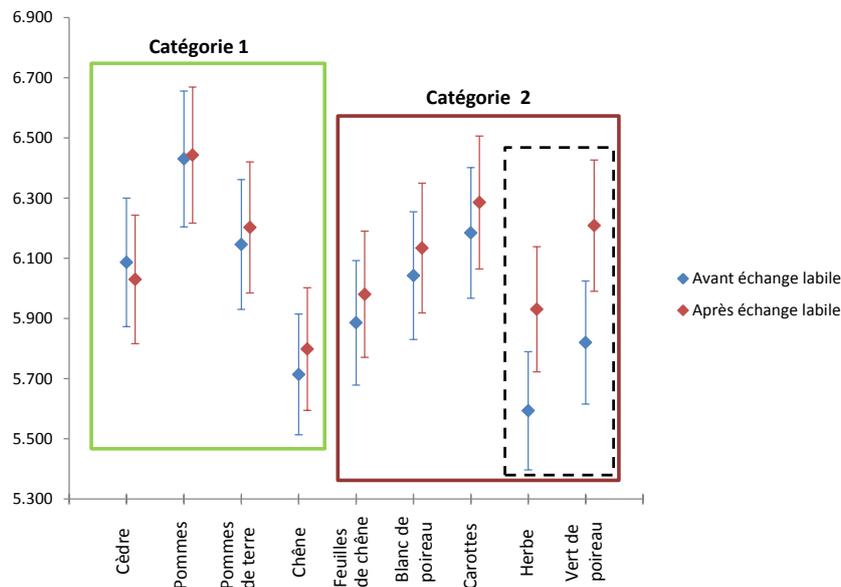


Figure 29 : Evolution des teneurs en hydrogène avant et après échange labile.

Les teneurs mesurées avant et après échange labile pour le cèdre, les pommes, les pommes de terre et le chêne sont strictement équivalentes. Le test de STUDENT est très sensible puisque le critère  $t_{calc}$  calculé sort très vite de l'intervalle de non-rejet de l'hypothèse nulle, même pour des valeurs relativement proches comme celles obtenues pour les feuilles de chêne. Le deuxième critère, le recouvrement des intervalles de confiance, est donc nécessaire puisqu'il apparaît nettement que les pourcentages d'hydrogène mesurés avant et après échange labile pour les feuilles de chêne, le blanc de poireau et les carottes sont relativement similaires. De plus, le test de l'écart normalisé, qui contrairement au test de STUDENT prend en compte l'incertitude élargie des données, valide l'égalité des teneurs en hydrogène avant et après échange labile pour ces échantillons. L'herbe et le vert de poireau ont, quant à eux, des moyennes expérimentales avant et après échange labile différentes (STUDENT et  $E_N$ ), et le recouvrement des intervalles de confiance est très faible. Ces échantillons sont donc à la limite de la 3<sup>ème</sup> catégorie dans laquelle aucun des deux critères n'est respecté. Globalement, à l'exception de l'herbe et du vert de poireau pour lesquels le résultat doit

être pris avec précaution, l'ensemble des échantillons conserve le pourcentage d'hydrogène après les échanges labiles.

Une première approche de l'étude de l'évolution des pourcentages d'hydrogène au cours de l'échange labile a également montré que le pourcentage d'hydrogène peut être (i) inchangé pour certains échantillons (chêne, feuilles de chêne, cèdre, herbe, pommes de terre) ou (ii) variable au cours de l'échange labile (blanc et vert de poireau, pommes, algues) [Baglan et Alanic, 2011]. Ces données sont en accord avec les résultats de cette étude obtenus pour les échantillons de type « bois » ainsi que pour la pomme de terre qui appartiennent à la catégorie 1. Cependant, pour des échantillons de type « fruits et légumes » ou « herbage », les conclusions diffèrent. Ainsi, pour les pommes notamment, les auteurs indiquent qu'il existe une variation des teneurs en hydrogène après l'échange labile tandis que dans cette étude, les teneurs avant et après échange sont strictement équivalentes. De même, pour l'herbe, cette étude met en évidence une possible variation dans les teneurs avant et après échange qui n'apparaît pas dans l'étude menée par Baglan et Alanic [Baglan et Alanic, 2011] (tableau 32). Ces divergences peuvent provenir de conditions opératoires différentes (durée d'échange labile, température de la pièce...) ainsi que de l'échantillon en lui-même.

**Tableau 32** : Comparaison de l'évolution des teneurs en hydrogène au cours de l'échange labile. = : les teneurs avant et après échange labile sont équivalentes, + : les teneurs en hydrogène après échange labile sont supérieures à celles mesurées avant échange labile, - : les teneurs après échange labile sont inférieures aux teneurs mesurées avant échange labile.

|                   | Cette étude              |                          |            | [Baglan et Alanic, 2011] |                          |            |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|------------|
|                   | % H avant échange labile | % H après échange labile | Conclusion | % H avant échange labile | % H après échange labile | Conclusion |
| Cèdre             | 6,09 ± 0,21              | 6,03 ± 0,21              | =          | 6,03 ± 0,08              | 5,97 ± 0,14              | =          |
| Feuilles de chêne | 5,89 ± 0,21              | 5,98 ± 0,21              | =          | 5,77 ± 0,22              | 5,82 ± 0,18              | =          |
| Pommes            | 6,43 ± 0,23              | 6,44 ± 0,23              | =          | 6,29 ± 0,14              | 6,53 ± 0,22              | +          |
| Pommes de terre   | 6,15 ± 0,22              | 6,20 ± 0,22              | =          | 6,34 ± 0,44              | 6,45 ± 0,20              | =          |
| Chêne             | 5,71 ± 0,20              | 5,80 ± 0,20              | =          | 5,78 ± 0,18              | 5,82 ± 0,16              | =          |
| Vert de poireau   | 5,82 ± 0,20              | 6,21 ± 0,22              | = ou +     | 6,22 ± 0,30              | 5,65 ± 0,30              | -          |
| Blanc de poireau  | 6,04 ± 0,21              | 6,13 ± 0,22              | =          | 6,02 ± 0,26              | 5,19 ± 0,22              | -          |
| Herbe             | 5,59 ± 0,20              | 5,93 ± 0,21              | = ou +     | 5,87 ± 0,14              | 5,97 ± 0,10              | =          |

Il est probable que l'impact de l'échange labile sur les teneurs en hydrogène soit dépendant de la nature de l'échantillon (composition chimique de base, origine...) ainsi que du protocole suivi (durée de l'échange labile). De ce fait, des échantillons principalement constitués de macromolécules complexes (cellulose, lignine, amidon) sont peu affectés et se comportent de la même manière à

chaque nouvel échange. Des « fruits et légumes » sont quant à eux plus fortement impactés et susceptibles d'évoluer différemment en fonction de l'échange labile considéré.

Ces données peuvent être corrélées aux résultats de carbone organique total. En effet, il apparaît que le chêne et le cèdre, donc les échantillons de type « bois » pour lesquels la solubilisation de carbone est négligeable, ont des teneurs en hydrogène qui n'évoluent pas au cours de l'échange labile. Ces résultats sont cohérents avec leur composition initiale. Cette « non-évolution » des teneurs en hydrogène au cours de l'échange labile peut laisser présager une solubilisation homogène de l'échantillon.

### II.2.3. Conséquences pour l'analyse du tritium organiquement lié non échangeable

Quelle que soit la catégorie à laquelle l'échantillon appartient, il n'y a aucun impact pour la quantification du tritium organiquement lié puisque la combustion a lieu directement après la lyophilisation de l'échantillon frais. Seul le pourcentage d'hydrogène déterminé avant l'échange labile est important.

Les activités volumiques du tritium organiquement lié non échangeable sont quant à elle déterminées à partir de la combustion de l'échantillon sec récupéré après échange labile. Par conséquent, l'évolution du pourcentage d'hydrogène lors de l'échange labile peut entraîner un biais dans l'activité calculée à partir du pourcentage d'hydrogène mesuré avant l'échange labile. Les résultats montrent que pour le cèdre, la pomme, la pomme de terre et le chêne, les pourcentages d'hydrogène avant et après échange labile sont strictement équivalents. Par conséquent, les activités calculées seront les mêmes quelle que soit la valeur (avant ou après échange labile) utilisée. De plus, pour les feuilles de chêne, le blanc de poireau et les carottes, compte tenu des incertitudes, notamment liées à la variabilité propre de l'analyseur élémentaire, les activités calculées avec les pourcentages d'hydrogène mesurés avant ou après échange labile devraient également être similaires. Pour l'herbe et le vert de poireau, le choix du pourcentage d'hydrogène à utiliser pour le calcul doit se faire avec précaution. En effet, le recouvrement des intervalles de confiance des résultats avant et après échange labile est limité, et l'écart entre les deux valeurs ne peut être négligé. Il est possible de calculer un biais potentiel entraîné par l'utilisation du pourcentage d'hydrogène mesuré avant échange labile dans le calcul des activités TOL-NE [Baglan et Alanic, 2011].

$$b = \frac{\% H_{\text{avant échange}} - \% H_{\text{après échange}}}{\% H_{\text{avant échange}}} \quad \text{Eq. 40}$$

Ainsi, pour l'herbe et le vert de poireau, l'utilisation du pourcentage d'hydrogène mesuré avant l'échange labile est susceptible de provoquer des sous-estimations des activités TOL-NE en introduisant un biais, dans les calculs, de -6 % et de -7 % respectivement.

De plus, des auteurs ont quant à eux montré qu'une surestimation de 15 % pour le blanc de poireau et de 10 % pour le vert de poireau pouvait être entraînée par l'utilisation du pourcentage d'hydrogène mesuré avant l'échange labile [Baglan et Alanic, 2011]. Ces données supplémentaires mettent en évidence le fait que chaque échange labile peut avoir un impact différent sur la quantification du TOL-NE.

Compte tenu de ces observations, le pourcentage d'hydrogène mesuré avant l'échange labile peut être utilisé pour le calcul des activités tritium organiquement lié non échangeable pour les échantillons de type bois. Pour les autres catégories d'échantillons, il faut s'assurer de la reproductibilité des échanges labiles pour mettre en évidence, ou non, une variation identique entre les échanges ou une conservation des teneurs en hydrogène après chaque échange labile. Par conséquent, à l'heure actuelle et pour tout autre échantillon que du bois, il est préférable d'utiliser le pourcentage d'hydrogène mesuré après l'échange labile pour limiter l'introduction de tout biais potentiel dans les calculs d'activités.

## CONCLUSION

La méthode d'analyse élémentaire développée permet de réduire considérablement les incertitudes relatives liées aux pourcentages d'hydrogène (de 20 à 5 %). L'étude de l'évolution des teneurs en hydrogène au cours de l'échange labile et l'utilisation de critères de comparaison rigoureux a permis la définition de trois catégories pour classer les échantillons étudiés. Dans cette étude, **les teneurs en hydrogène des différentes matrices ne varient pas drastiquement après l'échange labile**. Pour les échantillons de type « bois », les teneurs en hydrogène sont équivalentes avant et après échange labile, résultat en accord avec d'autres données publiées. Cependant, pour les échantillons de type « fruits et légumes » et « herbage », les résultats divergent en fonction des études. Par conséquent, il est possible de supposer que **l'évolution des teneurs en hydrogène est dépendante des échantillons et des conditions expérimentales**, et qu'elle peut ne pas être reproductible pour un même échantillon. De ce fait, **l'utilisation du pourcentage d'hydrogène mesuré après l'échange labile**, pour des échantillons de type « fruits et légumes » et « herbage » est à privilégier.

La **solubilisation de matière organique** lors de l'échange labile, pour tous les échantillons étudiés, a été mise en évidence. Cette **quantité de matière solubilisée est dépendante** de la nature des échantillons, et essentiellement de la **composition chimique de base des matrices étudiées**.

Ainsi, les échantillons de type « bois » sont moins impactés que les échantillons de type « fruits et légumes ». Cette solubilisation ne devrait avoir **aucun impact sur la détermination des activités volumiques du tritium organiquement lié non échangeable** si l'activité est répartie de manière homogène au sein de l'échantillon initial. De ce fait, aucun biais analytique ne doit être entraîné pour le calcul de ces concentrations. En revanche, suite à la **solubilisation de molécules** organiques lors de l'échange labile, une certaine quantité de **tritium, sous forme organiquement lié non échangeable est retrouvée dans le solvant d'échange labile**. La définition de l'analyste, qui ne tient compte que des propriétés chimiques de l'élément hydrogène, ne rend donc pas bien compte de la distribution réelle des fractions de tritium au sein de matrices biologiques. Ainsi, après l'échange labile, du tritium organiquement lié non échangeable est retrouvé en quantité variable dans la fraction solide tandis que dans le solvant d'échange labile sont retrouvées aussi bien les fractions échangeables, suite à l'échange isotopique, que les fractions tritium organiquement lié non échangeable entraînées par les molécules organiques solubles. Par conséquent, **l'introduction d'une définition des fractions tritium considérant la nature de la molécule porteuse de l'atome de tritium et non plus la nature de la liaison chimique doit être considérée**. Pour ce faire, l'identification de ces molécules est essentielle. Elle devrait également permettre de mieux comprendre le comportement du tritium dans l'environnement et chez l'homme en identifiant des cibles ou des voies de migration potentielles. Cet aspect fait l'objet du chapitre 5.

## Chapitre 5

### Etude de la spéciation du tritium

|  |     |
|--|-----|
| <i>Introduction</i> .....  | 132 |
| <i>I. Hypothèses générales sur les familles de molécules solubilisées</i> .....                      | 132 |
| I.1. Etude de l'évolution de la composition des échantillons au cours de l'échange labile            | 132 |
| I.1.1. Résultats .....   | 133 |
| I.1.1.1. Bilan .....   | 136 |
| I.2. Caractérisation spectrophotométrique des solvants d'échange labile .....                        | 140 |
| I.3. Etude de la réponse en fluorescence des solvants d'échange labile .....                         | 141 |
| I.4. Discussion .....  | 144 |
| <i>II. Identification des composés solubilisés par spectrométrie de masse haute résolution</i> ..... | 145 |
| II.1. Résultats .....  | 147 |
| II.2. Discussion .....   | 150 |
| II.3. Limites et voies d'améliorations .....   | 154 |
| <i>III. Molécules organiques tritiées solubilisées : discussion générale</i> .....                   | 156 |
| <i>Conclusion</i> .....  | 159 |

## INTRODUCTION

Dans le chapitre 4, une solubilisation de matière lors des échanges labiles, dépendante de la composition de l'échantillon de départ, a été mise en évidence. Dans le cas d'échantillons tritiés, du tritium organiquement lié non échangeable, au sens de l'analyste, est probablement inclus dans ces composés. L'identification des molécules organiques potentiellement solubilisées, donc mobiles dans l'environnement et chez l'homme est essentielle pour toute étude d'impact ultérieure. Il faut s'attendre à la présence de molécules hydrophiles issues de la solubilisation de molécules constitutives des échantillons (glucides, protides, acides organiques...), et/ou de la dégradation de la matière organique initiale. Les concentrations en carbone étant importantes, les solvants d'échange labile sont des milieux complexes, c'est pourquoi plusieurs outils analytiques sont combinés pour identifier ces composés.

### I. HYPOTHESES GENERALES SUR LES FAMILLES DE MOLECULES SOLUBILISEES

La connaissance de la composition de la matrice solide initiale ainsi que les résultats expérimentaux obtenus avec des outils analytiques usuels sont les premières informations utilisées pour étudier les familles de molécules organiques en solution.

Ces outils (analyse élémentaire, spectrophotométrie, fluorescence) sont relativement simples d'utilisation et apportent des informations globales sur la nature des composés en solution. L'interprétation des réponses pouvant se faire de manière systématique, l'ensemble des échantillons étudiés a été analysé.

#### I.1. ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA COMPOSITION DES ECHANTILLONS AU COURS DE L'ECHANGE LABILE

Outre l'application évoquée dans le chapitre 4, l'analyse élémentaire est également d'un intérêt majeur pour évaluer le type de composés solubilisés en fonction de l'évolution des compositions des matrices solides. Dans ce but, les compositions élémentaires des échantillons solides avant et après échange labile, dans les conditions « eau de forage » et « stomacales » sont déterminées en utilisant la méthode développée dans le chapitre 3. L'évolution des compositions élémentaires des fractions solides au cours de l'échange labile est directement liée à la fraction solubilisée et quantifiée, pour les conditions « eau de forage », dans le chapitre précédent. Les fractions solubilisées dans les conditions « stomacales » ont également été déterminées (annexe C.3.) et sont similaires à celles observées dans les conditions « eau de forage ».

### I.1.1. Résultats

Les compositions élémentaires des échantillons sont comparées à l'aide des critères définis dans le chapitre 1 (test de STUDENT, recouvrement des intervalles de confiance définis par la variabilité de l'outil). Cette comparaison des teneurs en éléments C, H, N, S, O avant et après échange labile permet de dégager une tendance sur la nature des composés solubilisés. Les résultats expérimentaux obtenus pour les trois échantillons cibles (pomme, chêne, herbe) avant et après échange labile sont détaillés dans les tableaux 33 à 36. Les résultats obtenus pour les autres échantillons sont disponibles en annexe C.4.

**Tableau 33** : Comparaison des teneurs en carbone des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

| Conditions |    | % C avant échange labile | % C après échange labile | statistique          | S   |
|------------|----|--------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Pommes     | ST | $m_1 = 39,84 \pm 0,75$   | $m_3 = 44,27 \pm 0,84$   | moyennes différentes | non |
|            | F  |                          | $m_2 = 41,62 \pm 0,79$   | moyennes différentes | non |
| Chêne      | ST | $m_1 = 47,43 \pm 0,89$   | $m_3 = 47,45 \pm 0,90$   | $m_1 = m_3$          | oui |
|            | F  |                          | $m_2 = 47,55 \pm 0,90$   | $m_1 = m_2$          | oui |
| Herbe      | ST | $m_1 = 41,82 \pm 0,79$   | $m_3 = 44,57 \pm 0,84$   | moyennes différentes | non |
|            | F  |                          | $m_2 = 44,89 \pm 0,85$   | moyennes différentes | non |

Le chêne est le seul échantillon pour lequel l'échange labile n'a pas d'impact sur les teneurs en carbone des fractions solides analysées avant et après échange labile. Pour la pomme et l'herbe, les teneurs avant et après échange labile sont différentes, quelles que soient les conditions considérées.

**Tableau 34** : Comparaison des teneurs en hydrogène des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

| Conditions |    | % H avant échange labile | % H après échange labile | statistique          | S   |
|------------|----|--------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Pommes     | ST | $m_1 = 6,43 \pm 0,23$    | $m_3 = 5,66 \pm 0,20$    | moyennes différentes | non |
|            | F  |                          | $m_2 = 6,44 \pm 0,23$    | $m_1 = m_2$          | oui |
| Chêne      | ST | $m_1 = 5,71 \pm 0,20$    | $m_3 = 5,69 \pm 0,20$    | $m_1 = m_3$          | oui |
|            | F  |                          | $m_2 = 5,80 \pm 0,20$    | $m_1 = m_2^*$        | oui |
| Herbe      | ST | $m_1 = 5,59 \pm 0,20$    | $m_3 = 5,87 \pm 0,21$    | moyennes différentes | oui |
|            | F  |                          | $m_2 = 5,93 \pm 0,21$    | moyennes différentes | oui |

\* Pour cet échantillon, le test de STUDENT n'a pu être utilisé à cause de la non-validation de l'homoscédasticité. Par conséquent, un test non-paramétrique de comparaison des moyennes a été utilisé (test d'ASPIN-WELCH).

Une différence de comportement entre les conditions « eau de forage » et « stomacales » est mise en évidence pour la pomme car les teneurs en hydrogène des fractions solides avant et après échange labile sont différentes. Cette observation est cohérente avec « l'état » de l'échantillon récupéré par rapport aux conditions « eau de forage » (figure 30).

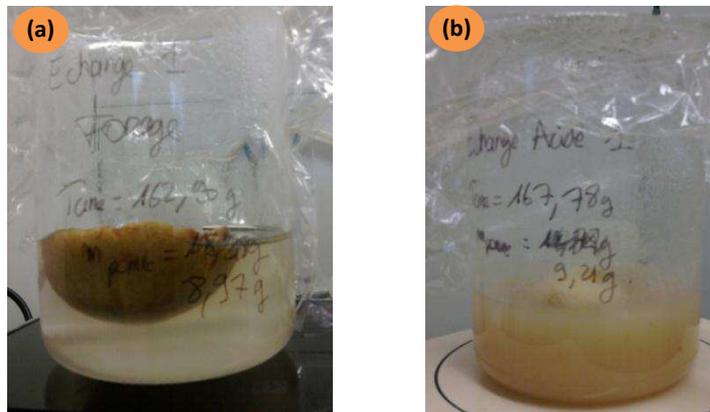


Figure 30: Exemple d'une pomme en fin d'échange labile dans les conditions « eau de forage » (a) et « stomacales » (b).

En revanche, pour le chêne, aucune évolution n'est constatée pour les deux conditions testées, observation cohérente avec la composition de l'échantillon (macromolécules complexes) et l'aspect similaire des fractions solides récupérées après les échanges labiles réalisés dans les deux conditions testées. Pour l'herbe, le critère statistique ne valide pas l'égalité des teneurs avant et après échange labile tandis que les intervalles de confiance se recoupent. Il n'est donc, a priori, pas possible de discerner une variation de l'échantillon par rapport à la variabilité intrinsèque de l'outil. Cependant, en considérant la valeur du pourcentage d'hydrogène avant échange labile comme référence, l'écart normalisé ( $E_N$ ) valide l'égalité des moyennes après un échange réalisé dans des conditions « stomacales » ( $E_N = 0,97$ ) et non dans les conditions « eau de forage » ( $E_N = 1,18$ ). Ce résultat est à prendre avec précaution car si les deux valeurs mesurées après les échanges labiles (« forage » et « conditions stomacales ») sont comparées, la statistique valide l'égalité de ces valeurs ( $E_N = 0,21$ ) et les intervalles de confiance se recoupent. Les limites de significativité des tests statistiques étant atteintes, il semble peu vraisemblable de mettre en évidence une différence de comportement en fonction des conditions considérées. L'herbe est, comme les échantillons de type « bois », composée de macromolécules complexes (cellulose, hémicellulose, lignine) mais également de composés simples de type glucides ou de composés phénoliques comme les échantillons de type « fruits et légumes ». De ce fait, l'échange labile a un impact plus important que pour les échantillons de type « bois » (environ 20 % de carbone solubilisé) sans pour autant faire apparaître de différence en fonction des conditions d'échange labile

**Tableau 35** : Comparaison des teneurs en azote des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

| Conditions |    | % N avant échange labile | % N après échange labile | statistique                            | S                    |
|------------|----|--------------------------|--------------------------|--|----------------------|
| Pommes     | ST | $m_1 = 0,29 \pm 0,02$    | $m_3 = 0,32 \pm 0,02$    | moyennes différentes<br>$m_1 = m_2$    | oui                  |
|            | F  |                          | $m_2 = 0,28 \pm 0,02$    |  | oui                  |
| Chêne      | ST | $m_1 = 0,21 \pm 0,01$    | $m_3 = 0,15 \pm 0,01$    | moyennes différentes*<br>$m_1 = m_2^*$ | non                  |
|            | F  |                          | $m_2 = 0,18 \pm 0,01$    |  | oui                  |
| Herbe      | ST | $m_1 = 1,90 \pm 0,11$    | $m_3 = 1,67 \pm 0,10$    | moyennes différentes                   | non                  |
|            | F  |                          | $m_2 = 1,62 \pm 0,10$    |  | moyennes différentes |

\* Pour cet échantillon, le test de STUDENT n'a pu être utilisé à cause de la non-validation de l'homoscédasticité. Par conséquent, un test non-paramétrique de comparaison des moyennes a été utilisé (test d'ASPIN-WELCH).

Pour la pomme, les résultats obtenus pour l'azote après les échanges labiles réalisés dans les conditions « stomacales » sont différents de ceux obtenus après les échanges labiles réalisés dans les conditions « eau de forage ». Ainsi, malgré le recouvrement des intervalles de confiance, les teneurs mesurées après échange labile dans les conditions stomacales sont différentes de celles mesurées avant l'échange labile ( $E_N = 1,47$ ). Pour le chêne, à la différence des conditions « eau de forage », les conditions « stomacales » entraînent une évolution des teneurs en azote. Cependant, pour ces deux échantillons, compte-tenu des faibles teneurs, ces données sont à prendre avec précaution puisque les réponses sont hors de la gamme d'étalonnage validée. Il est donc difficile de conclure quant à la significativité des observations puisque les incertitudes calculées, en combinant les sources définies dans le chapitre 2 (étalonnage, pesée) sont très importantes et très différentes de celles affichées qui ne prennent en compte que la variabilité de l'outil. Enfin, dans le cas de l'herbe, quelles que soient les conditions considérées, les teneurs mesurées après les échanges labiles sont différentes de celles mesurées avant les échanges labiles.

**Tableau 36** : Comparaison des teneurs en oxygène des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

| Conditions |    | % O avant échange labile | % O après échange labile | statistique                                  | S   |
|------------|----|--------------------------|--------------------------|--|-----|
| Pommes     | ST | $m_1 = 49,91 \pm 2,43$   | $m_3 = 43,11 \pm 2,10$   | moyennes différentes<br>moyennes différentes | non |
|            | F  |                          | $m_2 = 48,15 \pm 2,34$   |  | oui |
| Chêne      | ST | $m_1 = 43,09 \pm 2,10$   | $m_3 = 42,78 \pm 2,08$   | $m_1 = m_3$<br>$m_1 = m_2$                   | oui |
|            | F  |                          | $m_2 = 42,64 \pm 2,07$   |  | oui |
| Herbe      | ST | $m_1 = 39,19 \pm 1,91$   | $m_3 = 37,50 \pm 1,82$   | moyennes différentes<br>$m_1 = m_2$          | oui |
|            | F  |                          | $m_2 = 38,85 \pm 1,89$   |  | oui |

Quelles que soient les conditions considérées, les échanges labiles n'ont pas d'impact sur les teneurs en oxygène du chêne. Dans le cas de l'herbe, la teneur en oxygène est conservée dans les conditions « eau de forage ». Dans les conditions « stomacales », les conclusions tirées des deux critères choisis diffèrent. Les intervalles de confiances se recoupant, il ne semble pas possible de discerner une variation de l'échantillon par rapport à la variabilité de l'outil. De même, en considérant la valeur avant échange labile comme référence, le test  $E_N$  valide l'égalité des valeurs avant et après échange labile ( $E_N = 0,64$ ). Par conséquent, les deux valeurs avant et après échanges labiles réalisés dans les conditions « stomacales » sont considérées comme équivalentes. Enfin, pour la pomme, la conclusion est évidente dans les conditions « stomacales » puisque les deux critères valident la différence entre les deux valeurs. En revanche, dans les conditions « eau de forage », le même raisonnement que pour l'herbe est suivi. Le critère  $E_N$  valide l'égalité des moyennes expérimentales ( $E_N = 0,52$ ).

D'une manière générale, l'évolution des compositions élémentaires des fractions solides dans les conditions « eau de forage » et « stomacales » est identique pour la plupart des échantillons (annexe C.5.) et dépend essentiellement de la composition chimique initiale des matrices considérées. En effet, seules les compositions des échantillons de type « fruits et légumes » semblent plus impactées par les échanges réalisés dans les conditions « stomacales ». Il a cependant été montré que la fraction de carbone solubilisée lors des échanges labiles est similaire pour les deux milieux (annexe C.3.). De ce fait, l'hypothèse formulée ne peut être vérifiée. Pour tenter d'expliquer la différence d'évolution des compositions lors des échanges labiles réalisés dans les conditions « stomacales », deux hypothèses peuvent être avancées, (i) dans les conditions « stomacales », l'échantillon est dégradé (figure 30) en « briques individuelles » de petites tailles (ii) si la fraction solubilisée est identique dans des conditions « stomacales » et « eau de forage », et si les deux fractions solides après échanges labiles ont des compositions différentes, la différence proviendrait des résidus de filtration restés sur les filtres. Une expérience mettant en jeu plusieurs seuils de filtration dégressifs et incluant l'analyse de chaque fraction solide récupérée, apporterait probablement des éléments de réponse.

#### 1.1.1.1. **Bilan**

L'évolution des teneurs des différents éléments avant et après échange labile est un critère qualitatif évalué à partir des compositions élémentaires expérimentales permettant de formuler les premières hypothèses concernant les molécules solubilisées.

- Lorsque la statistique (test de STUDENT) valide l'égalité des teneurs en éléments avant et après échange labile, et lorsque les intervalles de confiance définis par la variabilité de l'outil se recouvrent, les teneurs sont considérées comme inchangées. Une égalité des compositions élémentaires avant et après échange labile ne signifie cependant pas l'absence de solubilisation de composés puisque la présence de carbone organique dans les solvants d'échange de tous les échantillons (de l'ordre de 4 % pour le « bois », 20 % pour l' « herbage » et 60 % pour les « fruits et légumes ») a été démontrée. Par conséquent, une égalité des compositions avant et après échange labile peut être synonyme d'une solubilisation respectant la distribution stœchiométrique de l'échantillon de départ.
- Lorsqu'aucun des deux critères n'est validé, les teneurs diminuent ou augmentent. En effet, l'analyse élémentaire étant une mesure relative, une teneur en un élément après l'échange labile plus faible est compensée par une augmentation relative des teneurs des autres éléments. Ainsi, pour toutes les conditions considérées, une diminution des teneurs en oxygène est représentative d'une perte de cet élément et donc d'une solubilisation de molécules à forte teneur en oxygène. De même, une diminution des teneurs en azote de la fraction solide est significative d'une solubilisation de molécules azotées.
- Lorsque le critère statistique ne valide pas l'égalité des moyennes mais que les intervalles de confiance se recouvrent, une ambiguïté persiste. En effet, théoriquement le recouvrement des intervalles de confiance définis par la variabilité de l'outil ne doit pas permettre de discerner la variation due à l'outil de celle de l'échantillon. Cependant, étant donné les résultats obtenus pour l'herbe et le vert de poireau dans le chapitre 4, un recouvrement minimal des intervalles de confiance ne peut valider explicitement l'égalité des valeurs avant et après échange labile. Dans ce cas, en considérant les teneurs déterminées avant échange labile comme valeurs de référence, le critère  $E_N$  est utilisé pour conclure.

Parmi les trois échantillons ciblés, le chêne est le seul échantillon pour lequel les compositions avant et après échange labile sont invariantes, indépendamment des conditions expérimentales (excepté le résultat obtenu pour l'azote dans les conditions « stomacales », résultat à prendre avec précaution). L'égalité des teneurs avant et après échange labile peut être synonyme d'une solubilisation des « briques » constitutives de la matrice initiale. Les compositions des fractions solides avant et après échange labile du chêne n'apportent que peu d'informations exploitables pour l'identification des composés solubilisés.

Pour l'herbe, une diminution des teneurs en azote est constatée dans les deux milieux considérés. Les seules molécules constitutives de l'herbe ayant une teneur en azote non négligeable

appartiennent aux catégories des protides ou des vitamines. De ce fait, leur solubilisation, en quantité suffisante pour discerner une évolution, est suspectée.

Pour la pomme, la diminution des teneurs en oxygène dans les conditions « stomacales » associée à la connaissance de la composition initiale de la pomme permettent de formuler des hypothèses sur les familles de composés solubilisés. En effet, la pomme est essentiellement composée de glucides, molécules hydrophiles à forte teneur en oxygène (> 50 %) ainsi que d'acides organiques présentant également des teneurs en oxygène supérieures à 50 %. Par conséquent, cette diminution des teneurs en oxygène dans la matière sèche récupérée après échange labile laisse présager une solubilisation de composés de type glucides et/ou acides organiques.

Les principales classes de molécules (lipides, glucides...) sont caractérisées par des ratios molaires H/C, O/C voire C/N. Par exemple, les protides ont des ratios H/C compris entre 1,0 et 2,2 et des ratios O/C compris entre 0,1 et 0,67. De même, les glucides sont caractérisés par des ratios H/C et O/C respectivement supérieurs à 1,5 et 0,4 [Hockaday et al, 2009]. De ce fait, ces ratios ont été calculés pour toutes les familles de molécules constitutives des échantillons étudiés (tableau 37) à l'aide des marqueurs principaux répertoriés en annexe B.1.

Tableau 37 : Ratios H/C, O/C et C/N théoriques des familles de molécules constitutives des matrices étudiées

|                      | H/C  | O/C  | C/N  |
|----------------------|------|------|------|
| Glucides             | 1,93 | 0,97 | -    |
| Lipides              | 1,87 | 0,11 | -    |
| Protides             | 2,02 | 0,59 | 4,46 |
| Acides organiques    | 1,50 | 1,08 | -    |
| Composés phénoliques | 0,91 | 0,42 | -    |
| Fibres (pectine)     | 2,00 | 0,97 | -    |
| Vitamines            | 1,17 | 0,78 | -    |
| Cellulose            | 1,67 | 0,83 | -    |
| Hémicellulose        | 2,00 | 0,97 | -    |
| Lignine              | 1,07 | 0,38 | -    |

A partir des pourcentages massiques élémentaires déterminés expérimentalement (tableaux 33 à 36), les ratios molaires H/C, O/C et C/N sont calculés pour caractériser les échantillons analysés dans cette étude (tableau 38). Leur évolution au cours de l'échange labile peut être un indicateur du type de composés solubilisés.

**Tableau 38** : Ratios H/C, O/C et C/N caractérisant les matrices étudiées, calculés à partir des données expérimentales (fractions massiques) et des compositions théoriques

|        |                            | Formule empirique                                 | H/C  | O/C  | C/N   |
|--------|----------------------------|---|------|------|-------|
| Pommes | "Théorique"                | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,91 | 0,94 | -     |
|        | Avant échange              | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,92 | 0,94 | -     |
|        | Après échange « Forage »   | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,84 | 0,87 | -     |
|        | Après échange « Stomacal » | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,52 | 0,73 | -     |
| Chêne  | "Théorique"                | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O                   | 1,63 | 0,70 | -     |
|        | Avant échange              | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,43 | 0,68 | -     |
|        | Après échange « Forage »   | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,45 | 0,67 | -     |
|        | Après échange « Stomacal » | CH <sub>2</sub> O                                 | 1,43 | 0,68 | -     |
| Herbe  | "Théorique"                | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>11</sub> N | 1,69 | 0,61 | 0,65  |
|        | Avant échange              | C <sub>26</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub> N | 1,59 | 0,70 | 25,67 |
|        | Après échange « Forage »   | C <sub>32</sub> H <sub>51</sub> O <sub>21</sub> N | 1,57 | 0,65 | 32,31 |
|        | Après échange « Stomacal » | C <sub>31</sub> H <sub>49</sub> O <sub>20</sub> N | 1,57 | 0,63 | 31,12 |

Les ratios « théoriques » sont les moyennes pondérées par la teneur estimée de chaque famille de molécules au sein de la matière sèche (annexe B.1.)

Les proportions relatives en chaque élément permettent également l'établissement d'une « formule brute empirique » décrivant les échantillons analysés. Pour les échantillons pomme et chêne, les teneurs en azote déterminées étant entachées d'incertitudes relatives de l'ordre de 100 %, elles ont été écartées des calculs. De ce fait, les formules brutes estimées sont de la forme C<sub>n</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>p</sub>, formule générique de base des glucides, avec n = p = 1. Cette observation est cohérente puisque la pomme est essentiellement constituée de glucides et le chêne est essentiellement constitué de macromolécules complexes ayant pour unité de base les hexoses de type glucose.

Pour la pomme, les ratios H/C et O/C déterminés avant échange labile sont similaires aux ratios théoriques. Les valeurs diminuent respectivement de 4 % (H/C) et 7 % (O/C) pour les échantillons mesurés après échange labile dans les conditions « eau de forage » et de 21 % (H/C) et 22 % (O/C) dans les conditions « stomacales ». Ceci signifie donc que des molécules caractérisées par des ratios H/C et O/C importants sont solubilisées. En considérant la composition de base de la pomme ainsi que la solubilité des composés, ces molécules solubilisées peuvent appartenir aux classes des « glucides », « protides » voire « acides organiques ».

Pour le chêne, les ratios H/C théoriques et expérimentaux avant échange labile diffèrent. Cependant, l'estimation théorique est entachée d'une large incertitude (non quantifiée) et doit juste être considérée à titre indicatif. Les ratios déterminés avant échange labile et après échange labile quelles que soient les conditions expérimentales considérées sont relativement stables et indiquent donc

une solubilisation de molécules dans les mêmes proportions que l'échantillon de départ, ou une variation non discernable due à une faible solubilisation de matière ( $\approx 4\%$ ).

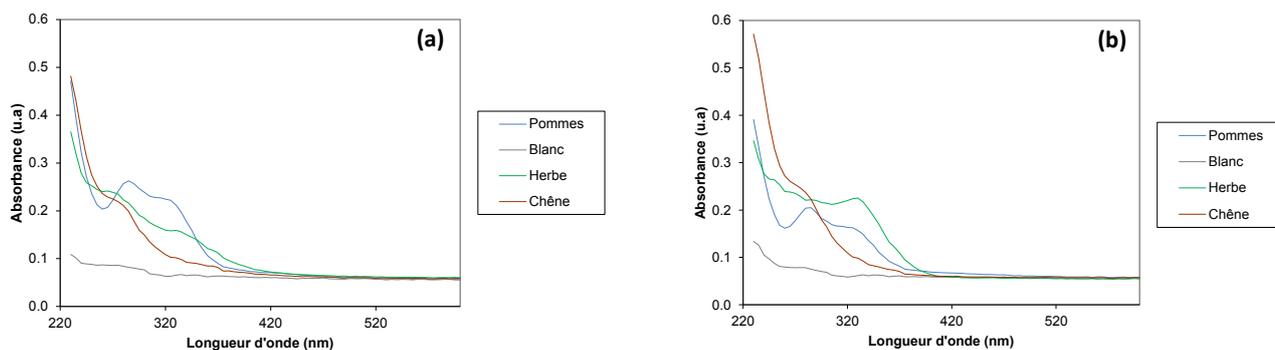
Pour l'herbe, les ratios H/C semblent stables au cours de l'échange labile tandis que des diminutions relatives de 7 % (conditions « eau de forage ») et de 10 % (conditions « stomacales ») sont observées pour les ratios O/C, pouvant être reliées à une solubilisation de composés de type « glucides », « protides » voire « vitamines ».

La question concernant la reproductibilité de l'évolution des compositions élémentaires peut se poser. En effet, l'évolution constatée lors de cette étude est-elle systématique ? Dans ce cas, les composés solubilisés seraient toujours identiques pour des conditions expérimentales (ou naturelles) identiques. Dans une étude récente [Baglan et Alanic, 2011], l'évolution des compositions élémentaires lors des échanges labiles (conditions « eau de forage ») a été étudiée, et des conclusions similaires ont été énoncées. Ainsi, les échantillons de type « bois » (chêne et cèdre) conservent les mêmes compositions élémentaires avant et après échange labile. Une diminution des teneurs en azote est constatée après échange labile pour l'herbe et la pomme de terre, favorisant l'hypothèse d'une solubilisation de molécules de type protides. Des conclusions différentes sont cependant obtenues pour la pomme (diminution des teneurs en oxygène dans les conditions eau de forage), la feuille de chêne (conservation des compositions élémentaires après échange labile), et le poireau (diminution des teneurs en azote). Ces différences de tendances peuvent être dues à des conditions expérimentales initiales (durée d'échange labile, température de la pièce) différentes, aux faibles teneurs en azote mesurées, à une maîtrise de l'analyse de l'oxygène moins aboutie lors de l'étude effectuée en 2011 ou à la non-reproductibilité des échanges labiles avec une solubilisation de molécules de nature différentes.

## I.2. CARACTERISATION SPECTROPHOTOMETRIQUE DES SOLVANTS D'ÉCHANGE LABILE

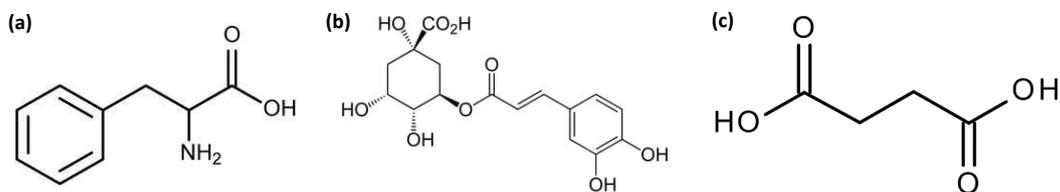
En fonction de la complexité des milieux étudiés, la spectrophotométrie UV-Visible permet (i) de confirmer la présence de matière organique dissoute en solution grâce à la réponse caractéristique en décroissance exponentielle et (ii) d'identifier des catégories de molécules en fonction des zones d'absorbance caractéristiques (chapitre 1).

Pour chaque échantillon, les spectres d'absorption UV-Visible dans les conditions « eau de forage » et « stomacales » sont similaires (figures 31-a et -b) pour les échantillons cibles pommes, chêne, herbe et annexe C.6. pour les autres).



**Figure 31** : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile des échantillons cibles dans les conditions « eau de forage » (a) et « stomacales » (b). Toute la zone du visible (jusqu'à 800 nm) a été balayée et l'échelle est coupée à 600 nm à cause du retour à la ligne de base de la réponse.

Les réponses observées pour les trois échantillons cibles sont représentative de celles observées pour le panel d'échantillons analysés. Les absorbances observées décroissent avec l'augmentation des longueurs d'onde et les spectres obtenus ne présentent pas de pics distincts. Cependant, des « épaulements » sont visibles dans la zone [265 – 285] nm, zone caractéristique des composés organiques, notamment de type protides. Les spectres d'absorbance des solvants d'échange labile de la pomme présentent quant à eux une plus large bande d'absorption ([265-370] nm) reflétant également la présence de composés organiques (chapitre 1). Ces intervalles de longueur d'onde sont en effet caractéristiques de groupements chromophores impliquant systématiquement une liaison multiple de type  $C=C$ ,  $C=O$  ou  $C\equiv N$  par exemple. En considérant la composition chimique initiale des échantillons étudiés, ces liaisons peuvent être retrouvées dans les molécules de type acide aminé (figure 32-a), dans des composés phénoliques (figure 32-b) ou des acides organiques (figure 32-c). A titre d'exemple, le groupement « cétone » présente une transition électronique ayant une longueur d'onde maximale d'absorption à 280 nm.



**Figure 32** : (a) Phénylalanine ; (b) Acide chlorogénique ; (c) Acide succinique

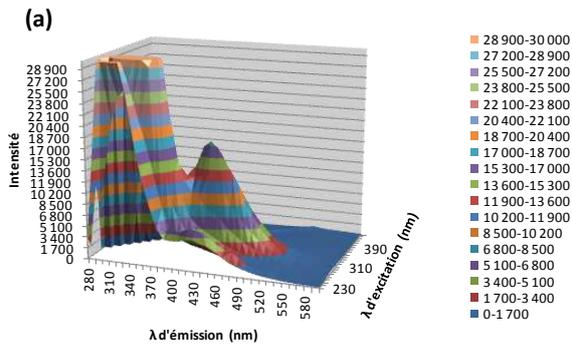
### 1.3. ÉTUDE DE LA REPONSE EN FLUORESCENCE DES SOLVANTS D'ÉCHANGE LABILE

A la différence de la spectrophotométrie UV-Visible, la spectrofluorimétrie en trois dimensions permet d'identifier les familles de composés présents en solution même pour des mélanges complexes. Son utilisation apporte donc des informations complémentaires pour caractériser la matière organique dissoute en solution.

Pour chaque échantillon, les réponses sont similaires dans les solvants « eau de forage » et « conditions stomacales » (figures 33 à 35 pour les échantillons cibles, annexe C.7. pour les autres).

✓ Pomme :

Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange de la pomme



Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange de la pomme, coupe transversale

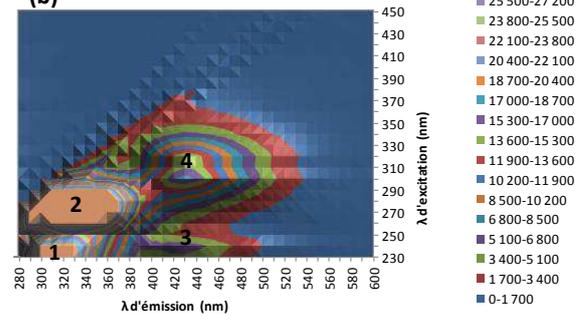
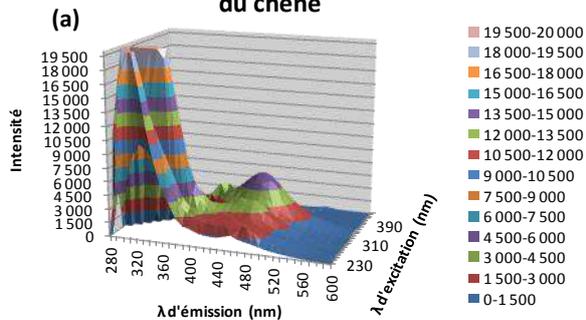


Figure 33 : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile de la pomme ; (b) Coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 39.

✓ Chêne :

Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du chêne



Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du chêne, coupe transversale

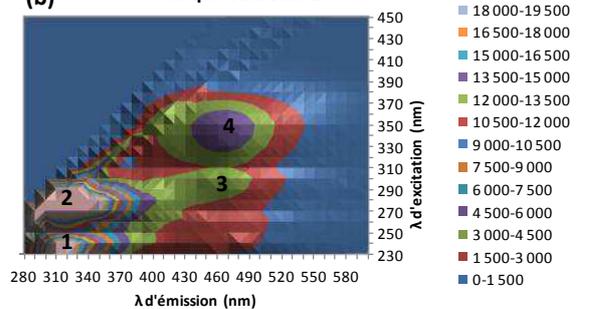


Figure 34 : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile du chêne ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 39.

✓ Herbe :

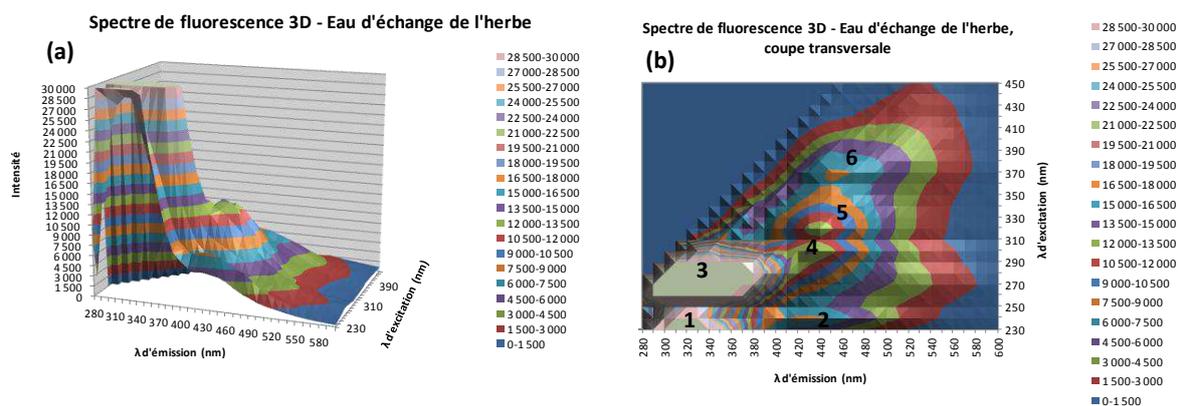


Figure 35 : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile de l'herbe ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 39.

Pour chaque échantillon, une coupe transversale du spectre de fluorescence en 3 dimensions permet de mieux distinguer les pics identifiés (tableau 39). L'interprétation de ces pics s'appuie sur les données récapitulées dans le chapitre 1 (tableau 7).

Tableau 39 : Identification des pics caractéristiques des solvants d'échange labile pour les échantillons cibles. *F* : conditions « eau de forage », *ST* : « conditions stomacales »

| Echantillon   | Conditions | Pic | $\lambda_{excitation}$ (nm) | $\lambda_{émission}$ (nm) | Attribution / Interprétation |
|---------------|------------|-----|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <b>Pommes</b> | F + ST     | 1   | 230                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|               | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|               | F + ST     | 3   | 240                         | 420                       | Substances humiques          |
|               | F          | 4   | 300                         | 430                       | Substances humiques          |
| <b>Chêne</b>  | F + ST     | 1   | 230                         | 300                       | Protéines, type tyrosine     |
|               | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|               | F          | 3   | 300                         | 420-430                   | Substances humiques          |
|               | ST         | 3   | 300                         | 450                       | Substances humiques          |
|               | F          | 4   | 330                         | 450                       | Substances humiques          |
|               | ST         | 4   | 350                         | 470                       | Substances humiques          |
| <b>Herbe</b>  | F + ST     | 1   | 230                         | 300-310                   | Protéines, type tyrosine     |
|               | F          | 2   | 240                         | 430-420                   | Substances humiques          |
|               | F + ST     | 3   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|               | F + ST     | 4   | 300                         | 430-440                   | Substances humiques          |
|               | F + ST     | 5   | 320                         | 440                       | Substances humiques          |
|               | F          | 6   | 370                         | 450                       | -                            |

D'une manière générale, pour les trois échantillons cibles, le même type de réponse des solvants d'échange labile est observé (protéinique, substances humiques). Des pics caractéristiques de composés de type protéines sont détectés, permettant de supposer leur solubilisation.

Des pics présents dans des zones caractéristiques des substances humiques sont également observés. Les substances humiques sont définies comme étant une catégorie de composés d'origine naturelle, formée par la dégradation de la matière organique [McDonald et al, 2004]. Ces substances sont en réalité des mélanges complexes de composés, encore mal définis, et sont issues de processus tels que la condensation ou la polymérisation de composés de faible poids moléculaire. Ces processus sont lents à se mettre en place, c'est pourquoi la formation de substances humiques dans les solvants d'échange labile, à partir des composés solubilisés, est peu probable. De ce fait, la réponse spectrale observée peut provenir de la solubilisation de molécules composant à la fois les échantillons d'intérêt et les substances humiques comme la cellulose, l'hémicellulose, les composés phénoliques, les sucres, les acides aminés, les acides aliphatiques, les alcools, les protéines et/ou les composés aromatiques. La détection de pics dans une zone caractéristique des substances humiques ne permet donc pas d'affiner plus rigoureusement l'identification des composés solubilisés.

#### I.4. DISCUSSION

La combinaison de ces divers outils analytiques, associée à la connaissance de la composition des échantillons permet de (i) mettre en évidence la complexité des systèmes étudiés et (ii) d'identifier les grandes familles de composés auxquels appartiennent les molécules solubilisées. Les données ne montrent pas de différence significative entre les solvants « eau de forage » ou « stomacal ». De ce fait, à ce stade de l'étude, les conclusions sont identiques pour les deux milieux.

Une solubilisation de matière, déjà mise en évidence dans le chapitre 4 pour les conditions « eau de forage », est également confirmée pour les conditions « stomacales ». Mis à part la détermination de la quantité de composés en solution, ces mesures ne permettent pas l'identification de familles de molécules en solution. Le carbone étant essentiellement d'origine organique, il peut être issu de toutes les familles de composés constituant les échantillons : glucides, acides organiques, protides... Outre la quantité de carbone en solution (> 1 000 ppm), la complexité du milieu est également mise en évidence par la réponse en absorbance dans l'UV-Visible des solutions. En effet, la décroissance exponentielle de l'absorbance vers les grandes longueurs d'onde est la signature caractéristique de la matière organique dissoute en solution [Pons et al, 2004 ; Coble, 2007]. Ce signal représente la réponse globale de l'échantillon, composé de molécules ayant des spectres d'absorbance se superposant, sans composés réellement dominants (acides organiques, composés phénoliques...). Cette observation permet donc également de supposer que ces milieux sont en réalité des mélanges complexes.

Les familles de molécules composant les solvants d'échange labile peuvent être divisées en deux catégories : les familles de composés présents initialement dans les échantillons et les familles des composés issus de la dégradation des matrices.

Ainsi, la présence d'épaulements dans une zone d'absorbance caractéristique de la réponse de groupements saturés de type  $C=C, C=O$  laisse supposer une solubilisation de molécules porteuses de ces groupements, tels que des protides [Schmid, 2001], des composés phénoliques ou des acides organiques. La diminution des teneurs en oxygène des fractions solides récupérées après les échanges labiles corrobore cette hypothèse puisque ces derniers sont des composés à forte teneur en oxygène. De plus, cette observation est cohérente avec la solubilisation de glucides, non détectables par spectrophotométrie [Pons et al, 2004]. L'analyse élémentaire tend également à confirmer la présence de composés appartenant à la famille des protides suite à la diminution des teneurs en azote observée après les échanges labiles. Cette tendance est également validée suite à l'analyse par spectrofluorimétrie des solvants. En effet, pour tous les échantillons étudiés, un signal dans une zone caractéristique des protéines est détecté.

A ce stade de l'étude, il n'est cependant pas possible d'identifier clairement les molécules en solution, c'est pourquoi la spectrométrie de masse haute résolution a été utilisée.

## **II. IDENTIFICATION DES COMPOSES SOLUBILISES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION**

La spectrométrie de masse haute résolution est un outil très performant pour l'identification des molécules puisqu'elle permet la discrimination de composés dont les masses sont très proches. En effet, la résolution de l'appareil étant fixée à 163000 (chapitre 2), l'écart  $\Delta m$  séparant deux pics varie en fonction de la masse considérée mais est systématiquement inférieur à 0,01 unités de masses pour des gammes de masses allant de 50 à 500 Da. De ce fait, cet outil est extrêmement intéressant pour l'identification de composés de poids moléculaires proches, et donc, des molécules susceptibles de porter du tritium, pour l'estimation de leur impact potentiel.

Dans le cas de l'analyse de milieux complexes tels que les solvants d'échange labile, la détection d'une multitude d'ions complique le traitement des données puisque chaque pic du spectre de masse résultant peut représenter un composé chimique distinct, un adduit ou un fragment de composé (figure 36).

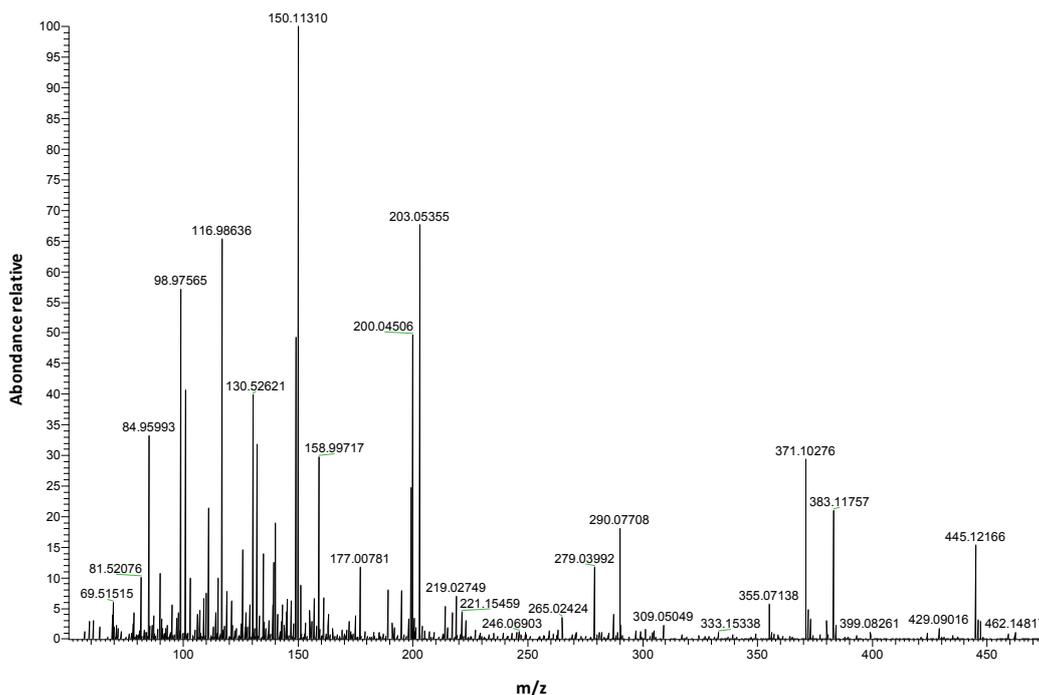


Figure 36 : Spectre de masse de l'eau d'échange labile de la pomme (eau de forage) enregistré en mode d'ionisation positif

Pour limiter le traitement des données, cette étude s'est focalisée sur l'analyse des 3 échantillons cibles, la pomme, le chêne et l'herbe. De plus, la solubilisation des molécules organiques semblait indépendante du milieu, seuls les résultats obtenus pour les conditions « stomacales », où la dégradation de l'échantillon pourrait être plus importante sont traités. En fonction du mode positif ou négatif de la source d'ionisation, des spectres de masse très différents sont obtenus pour un même échantillon. Les deux modes d'ionisation doivent donc être considérés pour caractériser complètement un échantillon. En effet, si un composé est particulièrement sensible à un mode d'ionisation, le spectre de masse résultant ne représentera pas l'ensemble des molécules de manière équivalente. L'efficacité d'ionisation est déterminée par la nature des groupements fonctionnels présents dans le milieu et par leur capacité à perdre (privilégier le mode négatif) ou accepter un proton (privilégier le mode positif) [Sleighter et Hatcher, 2007]. Par exemple, pour un échantillon avec des groupements acides de type acide carboxylique (portés notamment par des acides organiques de type acide malique), le mode d'ionisation négatif sera très efficace tandis que pour un échantillon avec beaucoup de groupements basiques de type amine (acides aminés), le mode d'ionisation positif est à considérer. Etant donné la composition des échantillons (glucides essentiellement), les hypothèses émises quant à la nature des molécules solubilisées (glucides, acides organiques) et les données issues de la littérature, le mode d'ionisation négatif a été privilégié.

## II.1. RESULTATS

Les molécules constitutives des échantillons (Annexe B.1.) ont été systématiquement recherchées dans les solvants d'échange labile. A titre d'illustration, certains des composés identifiés dans le solvant d'échange labile de la pomme sont directement reportés sur le spectre de masse résultant de son analyse (figure 37). La pomme est l'échantillon pour lequel le plus grand nombre de composés est détecté, résultat cohérent avec la quantité de carbone organique mesurée en solution. Le nombre de composés détectés décroît ensuite pour l'herbe puis le chêne (tableaux 40 à 43).

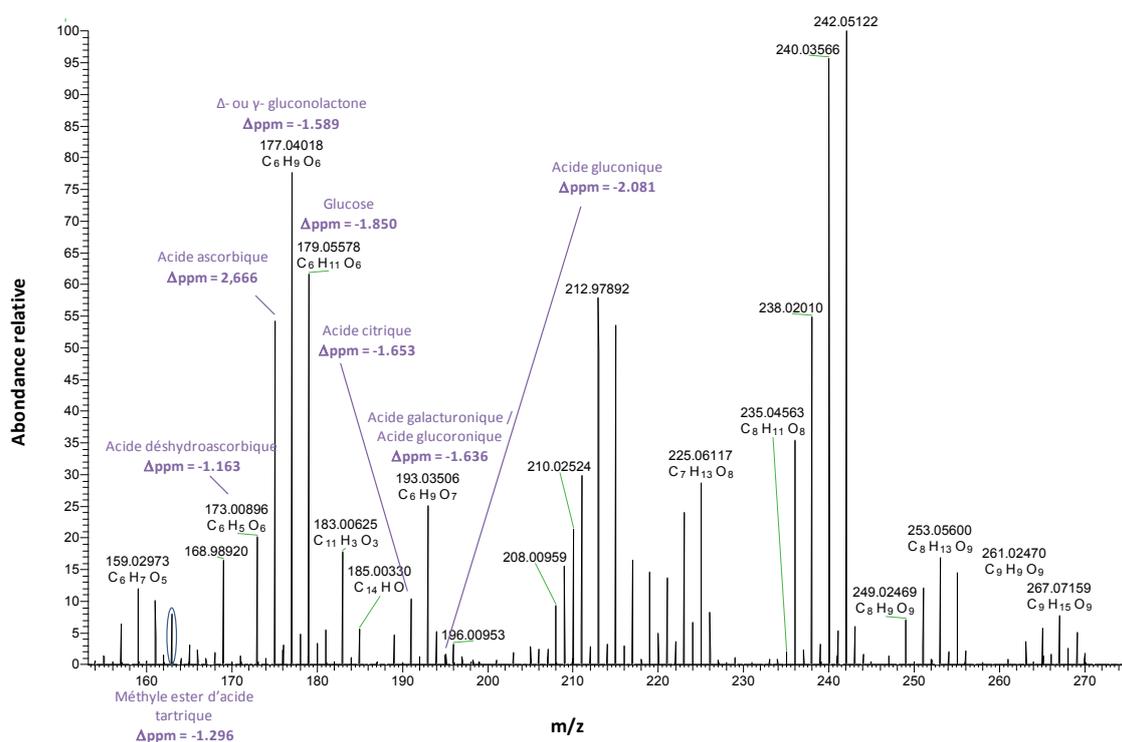


Figure 37 : Spectre de masse du solvant d'échange labile de la pomme (« conditions stomacales »), enregistré en mode d'ionisation négatif.

Tableau 40 : Molécules identifiées dans le solvant d'échange labile (conditions « eau de forage ») de la pomme, analyses réalisées en mode d'ionisation positif. Les valeurs en gras correspondent à l'ion pseudo-moléculaire.

| m/z détectés     | Formule brute logiciel                           | Δppm  | Interprétation                    | Molécule identifiée   | O/C  | H/C  |
|------------------|--|-------|-----------------------------------|---|------|------|
| <b>116,07092</b> | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> N  | 2,713 | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> Proline               | 0,40 | 1,80 |
| <b>118,08657</b> | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub> N  | 2,666 | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> Valine               | 0,40 | 2,20 |
| <b>132,10241</b> | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub>   | 3,821 | [M+H] <sup>+</sup>                | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> Leucine / isoleucine | 0,33 | 2,17 |
| <b>203,05352</b> | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Na | 4,633 | [M+Na] <sup>+</sup>               | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> Glucose               | 1,00 | 2,00 |
| <b>198,09799</b> | C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> N  | 3,919 | [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>                       |      |      |

**Tableau 41** : Molécules identifiées dans le solvant d'échange labile (conditions « stomacales ») de la pomme, analyses réalisées en mode d'ionisation négatif. Les valeurs en gras correspondent à l'ion pseudo-moléculaire.

| m/z détectés     | Formule brute logiciel                        | Δppm   | Interprétation                                     |   | Molécule identifiée                            | O/C  | H/C  |
|------------------|---|--------|--|---|--|------|------|
| <b>59,01405</b>  | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>  | 3,38   | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | Acide acétique                                 | 1,00 | 2,00 |
| <b>89,02449</b>  | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>  | 0,84   | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>  | Acide lactique                                 | 1,00 | 2,00 |
| <b>103,00369</b> | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | 0,07   | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>  | Acide malonique                                | 1,00 | 1,00 |
| <b>115,00348</b> | C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | -1,400 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>  | Acide fumarique                                | 1,00 | 1,50 |
| <b>117,01920</b> | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>  | -1,270 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>  | Acide succinique                               | 1,00 | 1,50 |
| <b>133,01398</b> | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>  | -2,004 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  |  |      |      |
| 112,98548        | -   | -      | -  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  |  |      |      |
| 103,00367        | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | -0,115 | -  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  | Acide malique                                  | 1,25 | 1,50 |
| 87,00879         | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | 0,261  | [M-H-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  |  |      |      |
| 75,00890         | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | 1,769  | -  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  |  |      |      |
| <b>153,01922</b> | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>  | -0,72  | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>  | Acide dihydroxybenzoïque                       | 0,57 | 0,86 |
| <b>163,02400</b> | C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub>  | -1,296 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  | Méthyl ester d'acide tartrique                 | 1,20 | 1,60 |
| <b>169,01394</b> | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>  | -1,82  | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>  | Acide gallique                                 | 0,71 | 0,86 |
| <b>173,00896</b> | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>  | -1,163 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>  | Acide déshydroascorbique                       | 1,00 | 1,00 |
| <b>173,04523</b> | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>  | -1,81  | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> | Acide shikimique                               | 0,71 | 1,43 |
| <b>175,02458</b> | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub>  | 2,666  | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  |  |      |      |
| 157,01407        | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>  | -1,120 | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  | Acide ascorbique                               | 1,00 | 1,33 |
| 115,00348        | C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>  | -1,400 | [M-H-CHO-CH <sub>2</sub> OH] <sup>-</sup>          | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  |  |      |      |
| 87,00879         | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>  | 0,240  | -  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  |  |      |      |
| <b>177,04018</b> | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>  | -1,589 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub> | Δ -ou γ-gluconolactone                         | 1,00 | 1,67 |
| <b>179,05578</b> | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> | -1,850 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | Glucose / Fructose                             | 1,00 | 2,00 |
| 161,04535        | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>  | -1,220 | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> |  |      |      |
| <b>181,07145</b> | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> | -1,710 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> | Sorbitol                                       | 1,00 | 2,33 |
| <b>191,01941</b> | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>7</sub>  | -1,653 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>  |  |      |      |
| 173,00896        | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>  | -1,163 | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>  | Acide citrique                                 | 1,17 | 1,33 |
| 85,02951         | -   | -      | -  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>  |  |      |      |
| <b>191,05571</b> | C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> | -2,101 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> |  |      |      |
| 168,98920        | -   | -      | -  | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> | Acide quinique                                 | 0,86 | 1,71 |
| 124,98408        | -   | -      | -  | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> |  |      |      |
| 61,98852         | -   | -      | -  | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> |  |      |      |
| <b>193,03506</b> | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>  | -1,636 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> | Acide galacturonique / Acide glucuronique      | 1,17 | 1,67 |
| <b>195,05063</b> | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> | -2,081 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> | Acide gluconique                               | 1,17 | 2,00 |
| <b>207,05073</b> | C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> | -1,429 | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> | Méthyl-ester d'acide galacturonique / lactones | 1,00 | 1,71 |
| <b>209,02997</b> | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>  | -1,53  | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub> | Acide saccharique                              | 1,33 | 1,67 |

**Tableau 42** : Molécules identifiées dans le solvant d'échange labile (conditions « stomacales ») de l'herbe, analyses réalisées en mode d'ionisation négatif. Les valeurs en gras correspondent à l'ion pseudo-moléculaire.

| m/z détectés     | Formule brute logiciel                         | $\Delta$ ppm | Interprétation                                     |  | Molécule identifiée   | O/C  | H/C  |
|------------------|--|--------------|--|--|---|------|------|
| <b>73,02964</b>  | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>   | 1,9          | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | Acide propanoïque   | 0,67 | 2,00 |
| <b>89,02453</b>  | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>   | 1,31         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>   | Acide lactique  | 1,00 | 2,00 |
| 115,00376        | C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>   | 0,65         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>   | Acide maléique / Acide fumarique                                    | 1,00 | 1,00 |
| 117,01943        | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>   | 0,81         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>   | Acide succinique  | 1,00 | 1,50 |
| <b>121,02962</b> | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>   | 0,95         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>   | p-Hydroxybenzaldéhyde   | 0,29 | 0,86 |
| <b>133,01422</b> | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>   | -0,21        | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   |   |      |      |
| 112,98594        | -  | -            | -  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   |   |      |      |
| 103,00384        | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>   | 1,55         | -  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   | Acide malique   | 1,25 | 1,50 |
| 87,00893         | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>   | 1,82         | [M-H-CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   |   |      |      |
| 75,00898         | C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>   | 2,86         | -  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>   |   |      |      |
| <b>149,06120</b> | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>   | 2,67         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | Alcool p-coumarylique   | 0,22 | 1,11 |
| <b>151,04014</b> | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>   | 0,48         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>   | Vanilline / Méthyl d'acide salicylique                              | 0,38 | 1,00 |
| <b>153,01940</b> | C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>   | 0,45         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>   | Acide dihydroxybenzoïque (acide gentisique / acide protocatéchique) | 0,57 | 0,86 |
| <b>167,03513</b> | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>   | 0,88         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | Acide vanillique  | 0,50 | 1,00 |
| <b>173,00920</b> | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>6</sub>   | 0,230        | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>   | Acide déshydroascorbique  | 1,00 | 1,00 |
| <b>175,02481</b> | C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub>   | 0,01         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   |   |      |      |
| 157,01433        | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub>   | 0,51         | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   | Acide ascorbique  | 1,00 | 1,33 |
| 115,00376        | C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>   | 0,65         | [M-H-CHO-CH <sub>2</sub> OH] <sup>-</sup>          | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   |   |      |      |
| 87,00893         | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>   | 1,82         | -  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>   |   |      |      |
| <b>179,05610</b> | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>  | -0,06        | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | Glucose   | 1,00 | 2,00 |
| 161,04552        | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>   | -0,15        | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  |   |      |      |
| <b>179,07131</b> | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> | -0,34        | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | Alcool coniférylique  | 0,30 | 1,20 |
| <b>181,05098</b> | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>   | 1,91         | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>  | Syringaldéhyde  | 0,44 | 1,11 |
| <b>193,05023</b> | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>  | -2,06        | [M-H] <sup>-</sup>                                 | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> | Acide férulique   | 0,40 | 1,00 |

Tableau 43 : Molécules identifiées dans le solvant d'échange labile (conditions « stomacales ») du chêne, analyses réalisées en mode d'ionisation négatif. Les valeurs en gras correspondent à l'ion pseudo-moléculaire.

| m/z détectés      | Formule brute logiciel                         | $\Delta$ ppm | Interprétation                      |  | Molécule identifiée              | O/C  | H/C  |
|-------------------|--|--------------|-------------------------------------|--|----------------------------------|------|------|
| <b>87,00892</b>   | C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>   | 1,79         | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>   | Acide pyruvique                  | 1,00 | 1,33 |
| <b>89,02454</b>   | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>   | 1,37         | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>   | Acide lactique                   | 1,00 | 2,00 |
| <b>115,00361</b>  | C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub>   | -0,63        | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>   | Acide maléique / Acide fumarique | 1,00 | 1,00 |
| <b>117,01935</b>  | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>   | 0,15         | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>   | Acide succinique                 | 1,00 | 1,50 |
| 149,06134         | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>   | 3,62         | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>  | Alcool p-coumarylique            | 0,22 | 1,11 |
| <b>167,03492</b>  | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>   | -0,35        | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>   | Acide vanillique                 | 0,50 | 1,00 |
| <b>179,056337</b> | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>  | 1,78         | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | Hexose (Glucose)                 | 1,00 | 2,00 |
| 161,04545         | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>   | -0,6         | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  |                                  |      |      |
| <b>179,07118</b>  | C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> | -1,047       | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | Alcool coniférylique             | 0,30 | 1,20 |
| <b>197,04547</b>  | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>   | -0,37        | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | Acide syringique                 | 0,56 | 1,11 |
| <b>209,08202</b>  | C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> | 0,410        | [M-H] <sup>-</sup>                  | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> | Alcool sinapylique               | 0,36 | 1,27 |

De nombreuses molécules constitutives de chaque échantillon ou issues de la dégradation de ces dernières sont identifiées dans les solvants d'échange labile, confirmant l'hypothèse de complexité du milieu. Le tritium organiquement lié non échangeable lié à ces molécules peut donc être entraîné dans l'environnement et dans les organismes via leur solubilisation.

## II.2. DISCUSSION

Pour la pomme, des composés appartenant aux familles des « glucides » (glucose et/ou fructose), des « protides » (proline, leucine et/ou isoleucine, valine), des « acides organiques » (acide succinique, acide malique, acide shikimique, acide citrique et acide quinique), des « composés phénoliques » (acide gallique, acide dihydroxybenzoïque) et des « vitamines » (acide ascorbique) sont identifiés. De nombreux composés, directement issus de la dégradation des premiers, sont également identifiés. Ainsi, la gluconolactone, les acides galacturonique, glucuronique, gluconique et saccharique sont des produits d'oxydation du glucose et du galactose (figure 38).

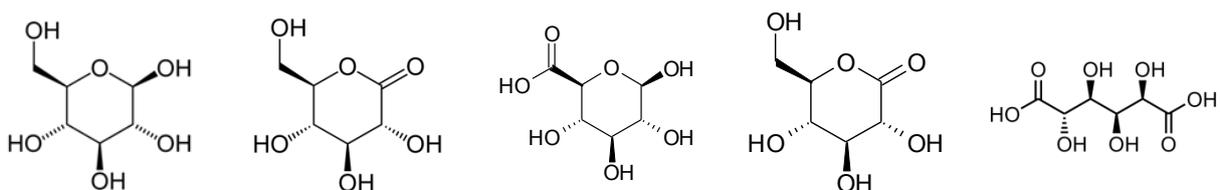


Figure 38 : Structure des composés dérivés du glucose identifiés dans l'eau d'échange labile de la pomme. De gauche à droite : glucose, gluconolactone, acide glucuronique, acide gluconique, acide saccharique.

De même, l'acide déshydroascorbique est une forme oxydée de l'acide ascorbique (figure 39).

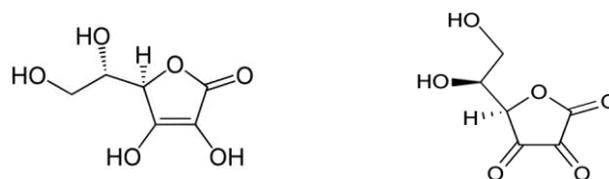
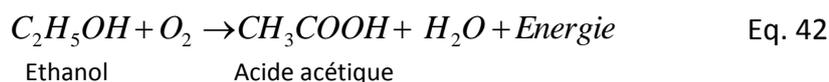
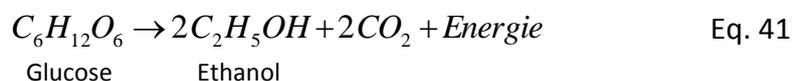
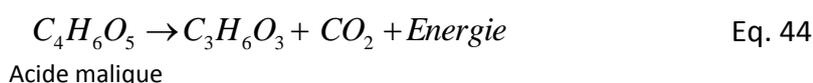


Figure 39 : Structure de l'acide ascorbique (à gauche) et de l'acide déshydroascorbique (à droite) identifiés dans l'eau d'échange labile de la pomme

Des réactions chimiques ont également lieu dans les milieux d'échange labile puisque la détection d'acide acétique, combinée à un dégagement gazeux lors de l'ouverture du flacon de conservation est un indicateur de la mise en place de la fermentation alcoolique du glucose (équations 41 et 42).



De même, l'acide lactique peut être produit par la fermentation lactique du glucose, et/ou par la fermentation malolactique, à partir de l'acide malique (équations 43 et 44).



Globalement, la plupart des composés identifiés dans les solvants d'échange labile de la pomme sont soit des molécules régulièrement retrouvées lors de la caractérisation des jus de fruits ou lors de l'étude de la composition des fruits (pommes notamment), en fonction de leur stade de développement par exemple [Chinnici et al, 2005 ; Eisele et Drake, 2005 ; Zhang et Cheng, 2010], soit des composés résultant des processus de dégradation du glucose.

Pour l'herbe, des composés appartenant aux familles « glucides » (glucose), « composés phénoliques » (acide férulique) ou « vitamines » (acide ascorbique) et composant la matrice initiale [Paulickova et al, 2006] sont détectés dans le solvant d'échange labile. L'acide férulique est

notamment un élément participant à la synthèse des lignines, l'une des fibres constitutives de l'herbe. Des molécules directement issues de ces composés (acide déshydroascorbique) sont également identifiées. Par ailleurs, plusieurs molécules identifiées lors de cette étude sont des composés analysés dans des extraits de plantes herbacées (acide succinique, acide malique, acide lactique) pour la caractérisation chimique de celles-ci [Schiller et al, 2002]. En plus de ces composés « libres » dans la plante de départ, des « briques » constitutives des macromolécules composant l'herbe [Xu et al, 2007] sont identifiées. Ainsi, l'alcool p-coumarylique et l'alcool coniférylique, deux des trois principaux monolignols, monomères constitutifs de la lignine (figure 40), sont retrouvés dans le solvant d'échange labile de l'herbe.

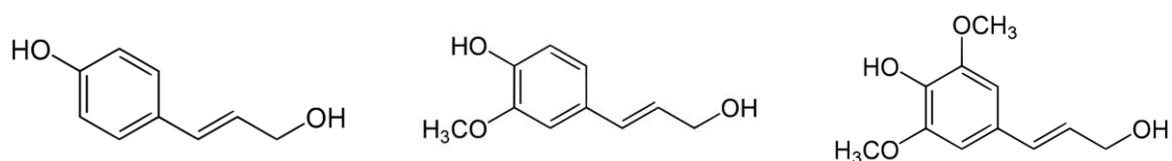


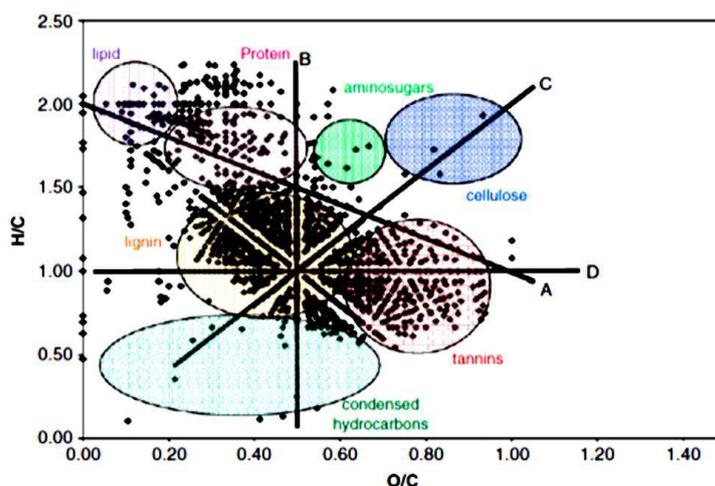
Figure 40 : Monomères constitutifs de la lignine. De gauche à droite : alcool p-coumarylique, alcool coniférylique et alcool sinapylique

De même, l'acide vanillique, l'acide férulique, le syringaldéhyde, la vanilline ou le parahydroxybenzaldéhyde sont des composés identifiés dans des fractions riches en lignine extraite de plantes herbacées [Xu et al, 2007]. De plus, la présence d'acide lactique, combinée à celle du glucose et de l'acide malique est un indicateur de la mise en place de réactions de fermentation conduisant à la formation d'acide lactique.

Pour le chêne, les résultats sont similaires à ceux de l'herbe puisque les trois monomères de base de la lignine sont identifiés dans le solvant d'échange labile, ainsi que d'autres molécules constitutives de tous les organismes vivants (glucose, acide succinique).

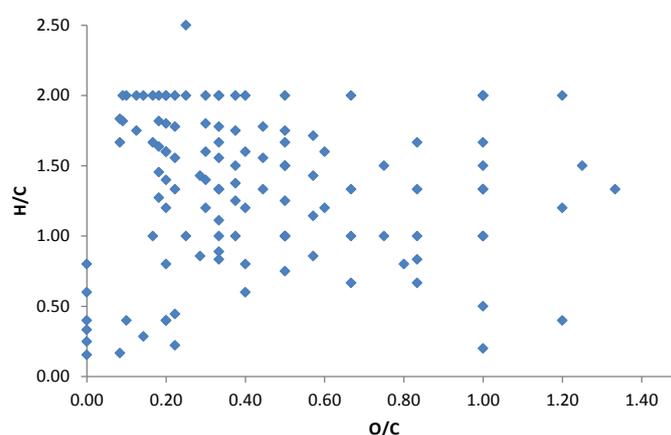
Malgré l'identification de nombreux composés dans les solvants d'échange labile, il reste une majorité de pics non identifiés sur les spectres de masse. Afin de caractériser de la matière organique naturelle, et de discerner la nature des molécules présentes dans l'échantillon, il existe une approche graphique, le diagramme de Van Krevelen, pour l'étude des spectres de masse haute résolution [Kim et al, 2003 ; Sleighter et Hatcher, 2007 ; Hockaday et al, 2009]. Ces diagrammes sont construits à partir des ratios O/C, en abscisse, et H/C, en ordonnée, calculés à partir des formules chimiques brutes générées pour chaque pic. Les grandes familles de molécules d'origine naturelle (lipides, cellulose, protéines...) sont caractérisées par des ratios spécifiques (figure 41). Ainsi, la nature ou l'origine de chaque composé peut être déduite en fonction de sa position sur le diagramme. De plus,

sur ce type de diagramme, des droites apparaissent entre les massifs de points et sont indicatrices de réactions entre les composés, impliquant des pertes ou des gains de groupements chimiques.



**Figure 41** : Diagramme de Van Krevelen construit à partir d'un spectre de masse résultant de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution de matière organique dissoute et positionnement des zones caractéristiques définies par les ratios O/C et H/C pour les grandes familles moléculaires. Ligne A : méthylation/dé-méthylation ; ligne B : hydrogénation/déshydrogénation ; ligne C : hydratation/condensation ; ligne D : oxydation/réduction [Sleighter et Hatcher, 2007].

L'application de cette méthode pour le traitement des données expérimentales obtenues a permis de construire des diagrammes pour les solvants d'échange labile de la pomme, du chêne et de l'herbe. Les résultats étant similaires pour les trois matrices, seul celui de l'herbe, caractérisé par un plus grand nombre de points expérimentaux est présenté (figure 42).



**Figure 42** : Diagramme de Van Krevelen construit à partir de l'analyse du solvant d'échange labile de l'herbe (conditions « stomacales », mode d'ionisation négatif).

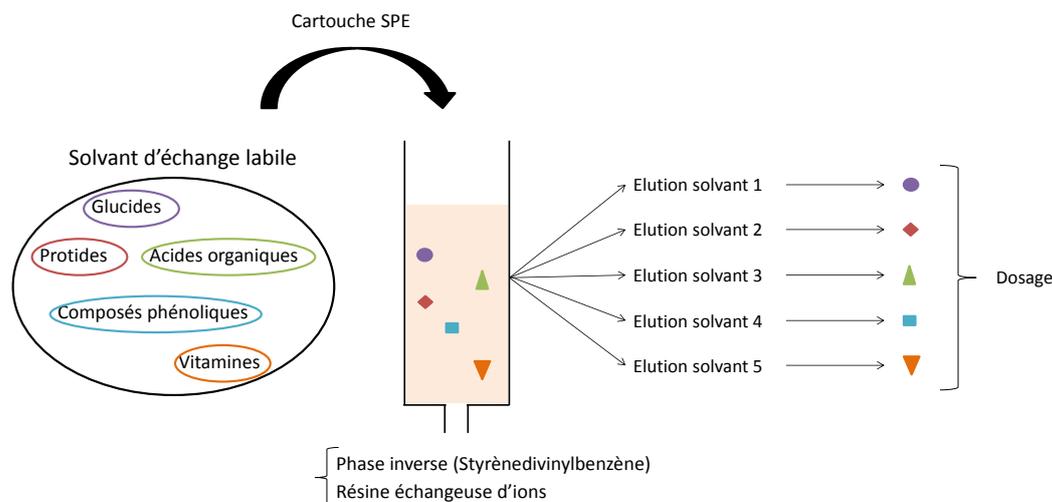
Les résultats expérimentaux ne permettent pas de mettre en évidence des points regroupés dans des zones caractéristiques telles que proposées dans la littérature. Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce résultat :

- (1) Les points expérimentaux sont trop peu nombreux pour observer les zones caractéristiques des différentes familles de molécules. De plus, pour de nombreux ratios  $m/z$  détectés, aucune formule brute n'est générée, probablement à cause des critères très sélectifs choisis pour le traitement des spectres de masse (choix des éléments - N, C, H, O - en quantité restreinte pour le calcul des masses exactes notamment). Par conséquent, un élargissement de ces critères, en introduisant d'autres éléments susceptibles d'être présents en solution doit être envisagé (inclure le soufre par exemple). Par ailleurs, de nombreuses formules brutes générées mathématiquement ne sont chimiquement pas envisageables (par exemple «  $C_{14}HN$  » pour  $m/z$  239,02368 avec  $\Delta ppm = -0,28$  ou «  $C_2H_7O_7N_5$  » pour  $m/z$  213,03536 avec  $\Delta ppm = -1,26$ ). Ces composés sont donc écartés de l'interprétation.
- (2) L'injection de solutions trop concentrées peut également influencer sur la réponse, notamment sur le bruit de fond. De ce fait, certains pics d'intérêt peuvent se confondre dans le bruit de fond et être écartés de l'interprétation pour cause de rapports « signal sur bruit » trop faibles.
- (3) Les diagrammes de Van Krevelen sont associés à la détection de formules brutes obtenues suite à l'ionisation douce des molécules du milieu échantillon et ne sont pas forcément adaptés pour traiter les fragments d'ions. Dans cette étude, malgré l'utilisation d'une source d'ionisation douce, il a été montré que certaines molécules (glucose, acides organiques) identifiées dans les solvants d'échange labile se fragmentent. Ces composés sont les molécules majoritairement identifiées dans les solvants d'échange labile de la pomme. De ce fait, ce phénomène de fragmentation peut également expliquer le non aboutissement de cette voie d'interprétation des données.

### II.3. LIMITES ET VOIES D'AMELIORATIONS

Les solvants d'échange labile sont des milieux complexes au sein desquels de nombreux composés coexistent. Il existe donc probablement des phénomènes d'ionisations préférentielles de certains composés lors de l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. De ce fait, certains composés peuvent ne pas être identifiés lors de l'analyse de l'échantillon brut. Il existe de nombreuses méthodes de purifications des échantillons préalables à la mesure, notamment des séparations des composés par familles de molécules via des processus d'extraction sur phase solide (SPE) qu'il serait intéressant de mettre en œuvre [SUPELCO, 1998 ; Schiller et al, 2002 ; Ding et al, 2003 ; Chinnici et al, 2005 ; Sanz et al, 2007 ; Ignat et al, 2011]. Ces méthodes de purifications

pourraient également être mises en place afin de quantifier les différentes molécules solubilisées (figure 43).



**Figure 43 :** Procédure envisageable pour une purification des solvants d'échange labile afin (i) d'améliorer les identifications et (ii) de doser les composés d'intérêt.

Les solvants d'échange labile étant des milieux aqueux, avec des analytes d'intérêt plus solubles dans l'eau que dans des solvants organiques, des cartouches de type phase inverse (phase apolaire) et/ou de type échangeuses d'ions pourraient être utilisées pour la mise en place d'une procédure d'extraction sur phase solide. Les mécanismes de séparation dépendent principalement du caractère lipophile ou hydrophile des composés ainsi que des formes anioniques ou cationiques mises en jeu en fonction du pH. Ainsi, en considérant la complexité du milieu « échange labile », des procédures combinant différentes cartouches, utilisant des solvants d'élution de polarité variable et à caractère acide ou basique, devront être considérés. A titre d'exemple, chaque fraction liquide récupérée après percolation des solvants à travers la cartouche SPE sera analysée par spectrométrie de masse haute résolution pour identifier les composés isolés. Ainsi, la fractions aqueuse obtenue après percolation du solvant d'échange labile ne devrait plus contenir que les composés les plus polaires n'ayant pas interagi avec la phase stationnaire. Un premier lavage de la cartouche, à l'aide d'une solution d'eau distillée par exemple, permettrait ensuite la récupération des composés les plus polaires de type glucide ( $\log P_{\text{glucose}} = -3,3$ ) ou acides organiques ( $\log P_{\text{acide citrique}} = -1,64$ ). En utilisant des mélanges de solvants, par exemple du méthanol et de l'acétonitrile, et en modifiant les proportions de chacun pour diminuer la polarité du solvant d'élution, les composés pourraient être extraits des phases SPE en fonction de leur polarité. De même, en utilisant des résines échangeuses d'anions ou de cations et en modifiant le pH des solvants, les composés de type « acide aminé » (isoleucine :  $pK_{a1} = 2,26$  ;  $pK_{a2} = 9,60$  à  $25^{\circ}\text{C}$ ) et/ou acides organiques (acide malique :  $pK_{a1} = 3,40$  ;  $pK_{a2} = 5,11$  à  $25^{\circ}\text{C}$ ) pourraient être séparés des composés neutres (sucres et alcools). A la suite de ces séparations et

identifications, une procédure de quantification par chromatographie en phase liquide, associée par exemple à un détecteur de type spectrométrie de masse, pourrait être envisagée et développée.

### **III. MOLECULES ORGANIQUES TRITIEES SOLUBILISEES : DISCUSSION GENERALE**

Au sein de la matière organique, le tritium est incorporé dans toutes les molécules hydrogénées et est retrouvé en position « échangeable » ou « non-échangeable » en fonction du processus d'incorporation impliqué (échange isotopique, photosynthèse, processus biochimique...). De ce fait, le comportement du tritium dans l'environnement et chez l'homme est lié à la nature de la liaison chimique et à la nature de la molécule organique dans laquelle il est incorporé. Le tritium organiquement lié non échangeable est essentiellement incorporé aux molécules organiques lors des processus photosynthétiques [Moses et Calvin, 1958 ; Thompson et Nelson, 1971 ; Guenot et Belot, 1984]. Il peut ensuite être retrouvé dans toutes les molécules hydrogénées, parmi lesquelles le glucose, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide succinique et des acides aminés. Ces composés sont précisément ceux identifiés dans les solvants d'échange labile. Par conséquent, le comportement du tritium dans l'environnement et dans les organismes dépendra également de la migration et/ou du métabolisme de ces composés. De plus, la dose induite par le TOL-NE intégré dans l'organisme est liée à son temps de résidence, et donc au métabolisme des molécules porteuses du tritium.

En se focalisant sur les résultats obtenus pour la pomme, directement ingérée par l'homme, les informations essentielles sont l'identification de composés dont le rôle est crucial dans le métabolisme : des acides aminés et du glucose.

En effet, les acides aminés sont directement impliqués dans la synthèse des protéines, éléments majeurs dans le règne végétal et animal et de ce fait dans l'organisme humain. Elles constituent en effet 17 % de la masse et environ 50 % des substances organiques du corps. Ces molécules sont les composants élémentaires des structures cellulaires, donnent leur forme aux cellules et aux organites et forment l'essentiel du tissu conjonctif. De plus, les protéines catalysent dans l'organisme la plupart des réactions chimiques de synthèse et de dégradation des molécules organiques. Enfin, certains messagers chimiques dans l'organisme, par exemple des hormones comme l'insuline sont des protéines [Vander, 1977]. Tous les acides aminés essentiels ne sont pas nécessairement présents dans une même protéine, c'est pourquoi le devenir du tritium fixé à des acides aminés tels que la leucine/isoleucine ou la valine dépend du rôle de ces acides aminés dans les synthèses protéiques. Globalement, les acides aminés tritiés vont marquer des protéines, et la répartition du tritium, son temps de résidence et son métabolisme dans l'organisme seront dépendants du métabolisme de la protéine dans laquelle il sera incorporé.

Les glucides représentent seulement 1 % de la masse du corps humain mais ils sont au centre de la biochimie, c'est-à-dire impliqués dans les réactions chimiques ayant lieu au sein des cellules (production d'énergie, synthèse de molécules, dégradation de molécules...). En effet, le rôle essentiel des glucides dans l'organisme est d'être la principale source de l'énergie consommée par les cellules. Le sucre le plus important de l'organisme, le glucose, peut être catabolisé en présence d'oxygène en dioxyde de carbone et en eau avec libération d'énergie (686 kcal). Cette voie de dégradation du glucose est divisée en deux parties. La première consiste en la dégradation du glucose à partir de la consommation de 2 molécules d'adénosine triphosphate (ATP), molécule transportant l'énergie cellulaire. Cette réaction conduit à la formation d'acide pyruvique et de 4 molécules d'ATP (glycolyse, figure 44).

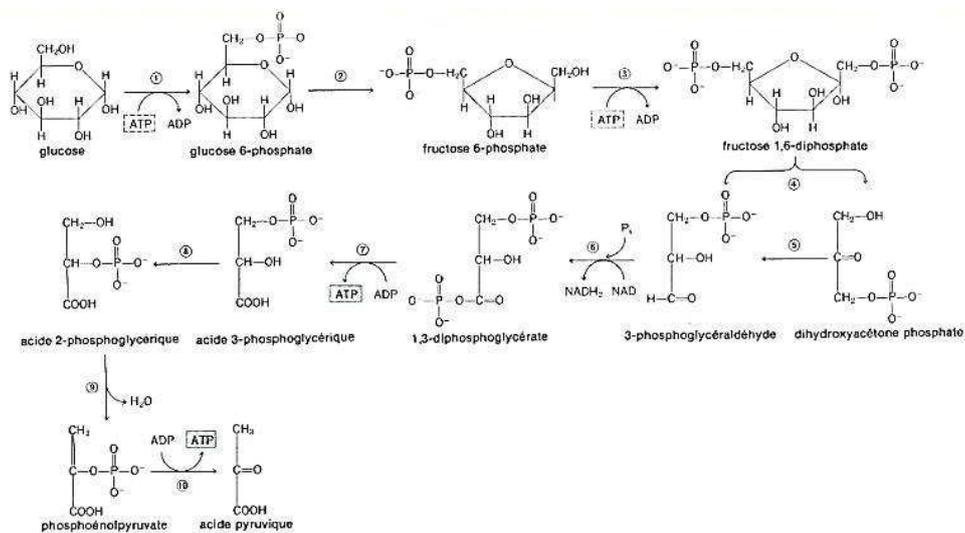


Figure 44 : Schéma résumé de la glycolyse [Vander, 1977].

La seconde consiste en la conversion de l'acide pyruvique en dioxyde de carbone et en eau, avec synthèse d'ATP (cycle de Krebs, figure 45).

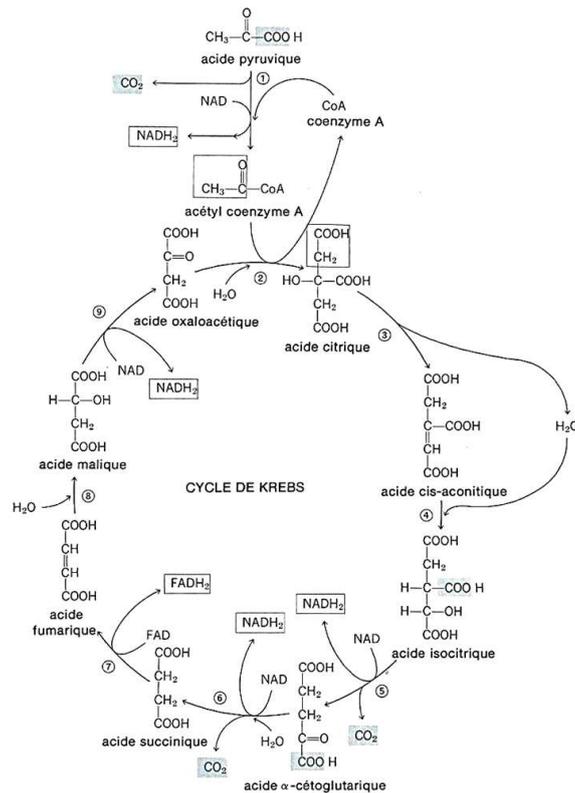


Figure 45 : Schéma du cycle de Krebs [Vander, 1977].

De nombreuses molécules identifiées dans le solvant d'échange labile de la pomme (acide malique, acide fumarique, acide succinique, acide citrique) participent au cycle de Krebs. Par conséquent, si du tritium est incorporé dans ces molécules, il est susceptible d'être intégré au cycle de Krebs et de participer aux synthèses en dérivant.

Par opposition aux végétaux, la capacité de stockage du glucose par les humains est faible. La plupart du glucose des aliments est soit dégradée pour servir à la synthèse de l'ATP, soit convertie en lipides pour constituer des réserves. La faible quantité emmagasinée, essentiellement dans les muscles et le foie, l'est sous forme d'un polysaccharide, le glycogène, qui est semblable à l'amidon pour les végétaux [Vander, 1977].

Le glucose étant le moteur énergétique de toutes les cellules, l'incorporation de glucose porteur de tritium organiquement lié (échangeable et non échangeable) mène donc à une répartition ubiquitaire de tritium dans l'organisme. De plus, sa consommation par la cellule est quasi-instantanée. Le TOL-NE rejoint donc rapidement le pool « eau corporelle » et est éliminé avec une période effective de 10 jours. Il est toutefois possible que du glucose tritié soit incorporé dans du glycogène et soit ainsi stocké dans les muscles et le foie. Dans ce cas, le temps de résidence du tritium dans l'organisme est directement lié à la durée de stockage du glycogène. Cette durée est variable puisque le glycogène est dégradé lors des efforts musculaires. Le tritium organiquement lié incorporé dans le glycogène pourrait entraîner un dépôt d'énergie local et entraîner un détérioration

local en fonction de la radiosensibilité du muscle considéré, de l'activité incorporée et du temps de séjour du composé [ICRP, 1995].

L'incorporation du tritium dans l'organisme humain dépend de sa répartition dans l'aliment initial. Ainsi, en partant d'une pomme, il est important de déterminer la localisation du tritium (glucides, lipides, fibres...). Si le tritium organiquement lié est préférentiellement fixé dans les fibres, il restera dans la fraction solide et suivra les processus digestifs après l'ingestion de la pomme. De ce fait, les composés tritiés rejoindront pour moitié le pool « eau corporelle » de l'individu. L'autre fraction restera sous forme organique et pourra être utilisée dans les divers processus biochimiques de l'organisme. En parallèle, le tritium porté par les molécules solubilisées identifiées dans cette étude, sera dispersé dans l'organisme et participera aux processus biochimiques corporels. Il serait donc intéressant de réaliser des échanges labiles avec des échantillons tritiés pour vérifier expérimentalement si les molécules identifiées dans les solvants d'échange sont celles contenant du tritium.

## CONCLUSION

Dans ce chapitre, une partie des molécules solubilisées lors des échanges labiles a été identifiée. Ainsi, les premiers outils analytiques utilisés ont permis l'identification des **familles de molécules** (« glucides », « protides », « acides organiques », « composés phénoliques » et « vitamines ») dans les milieux d'échange. De nombreux composés constitutifs des échantillons de départ mais également résultant de la dégradation de ceux-ci ont ainsi pu être identifiés par spectrométrie de masse haute résolution. Des molécules différentes ont pu être détectées dans les solvants d'échange en fonction de l'échantillon considéré (« briques » élémentaires de la lignine dans le solvant du chêne et de l'herbe par exemple). Cependant, certains composés sont systématiquement retrouvés (glucose notamment). Les molécules identifiées appartiennent aux catégories définies précédemment avec les outils analytiques « simples » et corroborent ainsi les hypothèses formulées.

L'élément essentiel concerne l'**identification de glucose et d'acides aminés** dans les solvants d'échange labile de la pomme puisque ces **molécules sont directement assimilées par les organismes vivants**. Il serait intéressant de déterminer la quantité de ces molécules présentes dans les solvants d'échange labile et de lier cette donnée à la concentration en carbone organique déterminée dans les solvants d'échange labile pour estimer les proportions relatives de chaque familles de molécules solubilisées. Ces quantifications pourraient être réalisées suite à la mise en place de procédures de purification des solvants étudiés puis par l'utilisation d'outils de type

chromatographie en phase liquide. Les **molécules identifiées** dans les solvants d'échange labile sont, de plus, les **premiers produits de la photosynthèse** et ont déjà été identifiées comme étant des **molécules porteuses de tritium**. Ainsi, une fraction majeure de glucose tritié intégré dans l'organisme se répartira de manière homogène et, compte-tenu de la consommation rapide du glucose par la cellule, le tritium rejoindra rapidement le pool « eau corporelle » pour être éliminé avec une période effective d'une dizaine de jours. En revanche, le stockage du glucose sous forme glycogène est susceptible d'induire une dose supplémentaire dans les muscles ou le foie. En fonction de la protéine synthétisée à partir de l'unité de base initiale, le tritium porté par les acides aminés est quant à lui susceptible de se répartir de manière homogène et/ou de se fixer sur un organe spécifique et de perdurer dans l'organisme.

## **Conclusion et perspectives**

Les objectifs de cette thèse étaient (i) d'optimiser et de valider la procédure analytique pour la détermination du tritium organiquement lié et (ii) d'identifier les molécules organiques, porteuses de tritium, responsables du transfert de ce radionucléide de l'environnement à l'homme.

Les activités du tritium organiquement lié, et du tritium organiquement lié non échangeable, sont calculées en utilisant les teneurs en hydrogène expérimentales des échantillons étudiés. L'optimisation de la procédure d'analyse du tritium organiquement lié passe donc par la maîtrise de la méthode de détermination du pourcentage d'hydrogène. Ce paramètre, ainsi que les teneurs en carbone, azote, soufre et oxygène sont déterminés par analyse élémentaire. La procédure analytique à utiliser a été développée et validée (% H, % C, % N). Celle-ci peut donc être appliquée dans le cadre des mesures de tritium organiquement lié, et permet notamment une réduction drastique de l'incertitude associée à la valeur du pourcentage d'hydrogène. Afin de s'assurer de la justesse des teneurs en hydrogène mesurées, des cartes de contrôle ont également été mises en place. Celles-ci permettent également le contrôle en « routine » de la procédure et la définition de la variabilité intrinsèque de l'outil. Cette variabilité peut être utilisée pour la discrimination de valeurs expérimentales, notamment dans le cadre de la vérification de la stabilité des compositions élémentaires lors des phases de traitement des échantillons, ou pour l'étude de l'évolution des compositions des échantillons. La procédure d'analyse n'est cependant pas totalement optimisée pour la mesure des éléments soufre et oxygène. Certains paramètres (définition de la périodicité de maintenance du piège à eau, ratio quantité d'échantillon-quantité de catalyseur) peuvent encore être améliorés. Ainsi, pour l'oxygène, la source ayant entraîné de fortes variations au début de l'étude a été identifiée (saturation rapide du piège à eau) et de ce fait, une attention particulière s'est portée sur le nombre d'analyses réalisées entre chaque maintenance. Par conséquent l'optimisation de la mesure de cet élément est quasiment finalisée. En revanche pour l'élément soufre, le ratio quantité d'échantillon/quantité de catalyseur doit être optimisé afin de finaliser l'étude.

Afin de maîtriser complètement l'analyseur élémentaire, notamment pour la mesure d'échantillons liquides, des études supplémentaires doivent être réalisées. Un développement de méthode, avec par exemple une modification du schéma actuel de l'outil, comme l'introduction d'un piège à eau, pourrait être envisagé pour une application à des échantillons aqueux. Ce développement permettrait en outre de déterminer la composition élémentaire de la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile.

Le deuxième point essentiel à l'optimisation de la procédure d'analyse du tritium organiquement lié, et particulièrement du tritium organiquement lié non échangeable, était la

compréhension des phénomènes se produisant lors de l'échange labile. Deux paramètres clés devaient être vérifiés : (i) la conservation des teneurs en hydrogène au cours de l'échange labile pour écarter, ou valider, l'hypothèse de l'introduction d'un biais expérimental lors du calcul des concentrations en activité et (ii) la vérification et la quantification d'une solubilisation de matière lors des échanges labiles.

L'étude de l'évolution des teneurs en hydrogène s'est basée sur la comparaison des valeurs mesurées avant et après les échanges labiles, suivant des critères statistiques et expérimentaux, définis en fonction de la variabilité de l'outil. Pour la plupart des échantillons étudiés, le pourcentage d'hydrogène est invariant au cours de l'échange labile. Cependant, pour certains d'entre eux, l'égalité des valeurs avant et après échange labile ne peut être affirmée. De plus, certaines conclusions sont différentes de celles reportées dans la littérature [Baglan et Alanic, 2011]. De ce fait, tant que la répétabilité et la reproductibilité des échanges labiles n'a pas été démontrée, l'utilisation des teneurs en hydrogène mesurées après les échanges labiles doit être privilégiée pour le calcul des activités, pour limiter l'introduction de tout biais. En conservant la notion de tritium organiquement lié non échangeable définie au sens de l'analyste, l'étude de la répétabilité et de la reproductibilité des échanges labiles doit être envisagée pour valider, ou invalider, les tendances observées concernant le devenir du pourcentage d'hydrogène lors des échanges labiles.

Cette étude a mis en évidence la solubilisation de matière organique lors des échanges labiles. Les quantités d'échantillons solubilisées sont dépendantes des compositions initiales des échantillons. En effet, de faibles solubilisations (de l'ordre de 4 %) sont observées pour des matrices de type « bois », essentiellement constituées de macromolécules complexes et insolubles, tandis que pour des échantillons de type « fruits et légumes », des solubilisations de matière de l'ordre de 60 % sont atteintes, probablement liées au fait que ces matrices sont essentiellement composées de glucides, molécules très solubles dans les milieux aqueux. Le tritium organiquement lié non échangeable est la seule fraction qui, après avoir été incorporée lors de la photosynthèse, n'est pas sujette à des échanges avec l'environnement. C'est pourquoi, cette fraction, définie au sens de l'analyste, est intéressante pour des études rétrospectives de rejets de tritium dans l'environnement. La concentration en activité du tritium organiquement lié non échangeable est classiquement déterminée après l'échange labile. Si l'activité est répartie de manière homogène au sein d'un échantillon, quelle que soit la fraction d'échantillon solubilisée, l'activité volumique calculée sera inchangée. Cependant, étant donné les conclusions de cette étude, il apparaît que des composés organiques carbonés, donc très probablement porteurs de tritium organiquement lié non échangeable, sont solubilisés lors de l'échange labile. La définition de l'analyste selon laquelle le tritium organiquement lié non échangeable (i) concerne les atomes de tritium liés aux atomes de carbone et (ii) reste dans la fraction solide récupérée après l'échange labile peut donc être discutée.

En effet, malgré leur position « non échangeable », certains atomes de tritium peuvent être retrouvés dans les solvants d'échange labile. De ce fait, doivent-ils être considérés comme du tritium organiquement lié échangeable ? En parallèle, la fraction tritium organiquement lié dite « buried » doit-elle être considérée comme du tritium organiquement lié non échangeable ? Comment pourrait-on séparer les fractions TOL-E et TOL-NE afin de mesurer le TOL-NE ? Par conséquent, à l'heure actuelle, la pertinence d'une détermination du tritium organiquement lié non échangeable, défini au sens de l'analyste, peut être discutée. Cette définition n'est, en effet, pas suffisante pour décrire le comportement du tritium dans l'environnement. C'est pourquoi, dans le cadre de la surveillance de l'environnement et de l'analyse du tritium organique, et tant que l'incertitude sur la nature des fractions analysées persiste, seul le tritium organiquement lié « total » devrait être considéré. La distribution du tritium au sein d'un organisme est dépendante des propriétés chimiques de la liaison dans laquelle il est impliqué mais également de la nature des composés organiques le portant. Etant donné le nombre de molécules dans lesquelles du tritium est susceptible d'être incorporé, il paraît peu vraisemblable de considérer chaque molécule individuellement pour définir la nature du tritium organiquement lié. En parallèle, et comme déjà évoqué dans la littérature [Kim et al, 2013a], l'introduction d'une définition du tritium organique, prenant en compte la solubilité des familles de molécules, peut être envisagée.

Le devenir du tritium étant également lié aux propriétés physico-chimiques de la molécule organique le portant, l'étude du transfert du tritium dans les différents compartiments environnementaux, et dans les réseaux trophiques, passe par l'identification de ces molécules. Dans ce but, l'échange labile a été choisi comme modèle dynamique pour simuler des conditions environnementales susceptibles de libérer ces composés (immersion d'un échantillon dans de l'eau, lixiviation par de l'eau de pluie, ingestion par l'homme...). Les principales familles de molécules constitutives des échantillons étudiés ont été identifiées dans les solvants d'échange labile en combinant divers outils analytiques. Ainsi, les données expérimentales montrent que les familles « glucides », « protides », « acides organiques », « composés phénoliques » et « vitamines » sont présentes dans les solvants d'échange labile. L'identification de certaines molécules (glucose, proline, acide malique, acide férulique, acide ascorbique...) a pu être effectuée par spectrométrie de masse haute résolution, confirmant les hypothèses concernant les familles de molécules émises. Cependant, en considérant la complexité du milieu étudié, de nombreux composés solubilisés n'ont probablement pas été identifiés. Dans ce but, et connaissant les familles de molécules en solution, des méthodes analytiques de purification d'échantillon pourraient être développées, notamment en introduisant des étapes d'extraction sur phase solide et/ou de séparation par chromatographie en

phase liquide. Ces développements permettraient d'affiner les identifications et de quantifier les composés d'intérêt comme le glucose.

Un intérêt particulier est porté aux échantillons de type « fruits et légumes » puisqu'ils sont susceptibles d'être directement ingérés par l'homme. De ce fait, dans une optique d'étude de l'impact du tritium sur les organismes, il faut s'intéresser au métabolisme des composés identifiés dans les solvants d'échange labile. Ainsi, en première approche, cette étude s'est focalisée sur celui de la pomme, dans lequel des acides aminés et du glucose ont été identifiés. Ces molécules ont un rôle majeur dans l'organisme puisque les premiers participent à la synthèse des protéines, et le glucose est le moteur énergétique des cellules. De ce fait, ces composés ont une répartition ubiquitaire, et en fonction de leur utilisation par l'organisme, ils peuvent être stockés, et donc persister dans le corps, ou être consommés instantanément. Par conséquent, si ces composés contiennent du tritium initialement, leur taux de renouvellement conditionne le devenir du tritium dans l'organisme. Afin d'étudier l'impact du tritium dans les organismes, mais également dans l'environnement, plusieurs études peuvent être envisagées. Dans un premier temps, la répartition du tritium dans la matrice de base doit être définie. Après exposition d'une pomme à de l'eau tritiée, dans quelles molécules le tritium est-il retrouvé ? Pour répondre à cette question, après lyophilisation de l'échantillon, une séparation des composés par famille de molécules pourrait être tout d'abord envisagée. Les fractions récupérées seraient probablement de très faible masse et de très faible activité. Leur mesure serait cependant compliquée à envisager puisque des appareils de type « OXIDISER » sont adaptés pour l'analyse de faibles prises d'essai mais de fortes activités, tandis que la calcination des échantillons dans les fours tubulaires nécessite une quantité d'échantillon suffisante pour la récupération d'une masse d'eau minimum pour les comptages par scintillation liquide. La spectrométrie de masse, adaptée pour de faibles activités, mais nécessitant des délais d'attente, pourrait être envisagée. Pour l'identification unitaire des molécules porteuses de tritium, une séparation, au sein d'une famille de molécules pourrait être envisagée. Dans un deuxième temps, il faudrait réaliser des échanges labiles pour déterminer si les molécules solubilisées sont celles porteuses de tritium. En fonction des données, une focalisation sur certaines molécules serait d'un intérêt majeur pour étudier le devenir du tritium dans les organismes, ou les voies de migration probables de composés dans les différents compartiments.

En résumé, outre le développement d'une méthode analytique pour la détermination des compositions élémentaires de matrices solides, cette étude a mis en évidence plusieurs résultats principaux :

- L'analyse du tritium organiquement lié est optimisée et adaptée pour la surveillance de l'environnement,

- La définition des fractions de tritium organiquement lié de l'analyste n'est pas suffisante pour décrire la répartition du tritium dans l'environnement et dans les organismes. Cependant, les autres définitions, prenant notamment en compte la disponibilité du tritium dans les macromolécules (tritium « buried ») ne sont pas plus adaptées,
- Le comportement du tritium dans l'environnement et dans les organismes dépend à la fois des propriétés physico-chimiques de l'élément hydrogène et de celles des molécules porteuses de tritium. De nombreuses molécules, appartenant à toutes les familles constitutives de la matière vivante, sont susceptibles d'être impliquées dans le devenir du tritium dans les organismes et dans l'environnement, notamment des molécules ayant un rôle majeur dans les organismes comme le glucose et les acides aminés.

# Références bibliographiques

**AFNOR**, NF X 06-031-1 : Application de la statistique, Cartes de contrôle – Partie 1 : Cartes de contrôle de Shewhart aux mesures (1995) ;

**AFNOR**, X06-050 : Application de la statistique – Etude de la normalité d'une distribution (1995) ;

**AFNOR**, XP T90-210 : Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence (1999) ;

**AFNOR**, NF T90-210 : Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire (2009) ;

**AFNOR**, NF EN ISO/CEI 17043 : Evaluation de la conformité – Exigences générales concernant les essais d'aptitude (2010) ;

**AFNOR**, NF M 60-822-2 : Energie nucléaire – Mesure de la radioactivité dans les effluents et rejets gazeux, partie 2 : Détermination de l'activité du tritium dans la solution de piégeage des effluents ou rejets d'effluents gazeux échantillonnés par la technique de barbotage (2011) ;

**AGIR**, Review of risks from tritium, *Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation* (2007) ;

**AIEA**, Global Network of Isotopes in Precipitations, the GNIP database available from <http://isohis.iaea.org> ;

**Al-Behaisi, S., Antal, I., Morovjan, G., Szunyog, J., Drabant, S., Marton, S., Klebovich, I.**, In vitro simulation of food effect on dissolution of deramciclane film-coated tablets and correlation with in vivo data in health volunteers, *European journal of pharmaceutical sciences* 15 (2002) 157-162 ;

**Alanic, G., Le Meignen, R.**, Mode opératoire pour la mesure des différentes fractions du tritium dans des échantillons biologiques, *Rapport technique ENV SUR MERBCMO-08000468 A* (2008) 1-37 ;

**Alvarez, L.W., Cornog, R.**, He<sup>3</sup> in helium, *Phys. Rev* 56 (1939a) 379 ;

**Alvarez, L.W., Cornog, R.**, Helium and hydrogen of mass three, *Phys. Rev* 56 (1939b) 613 ;

**Analytical methods committee**, Evaluation of analytical instrumentation, part XIX : CHNS elemental analysers, *Accred qual assur* 11 (2006) 569-576 ;

**ANSES**, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, tables CIQUAL de composition nutritionnelle des aliments, [www.anses.fr](http://www.anses.fr) ;

**Ansoborlo, E., Baglan, N., Granier, G., Henry, A., Fouhal, L., Baumier, D., Losset, Y., Cossonnet, C., Deniau, I., Tanguy, C., Hurtgen, C., Kopka, B., Kim, S.B., Momoshima, N.**, Circuit intercomparaison 2009-2010 tritium organiquement lié dans une matrice herbe, *Note Technique DEN/DCRP/CETAMA/NT/2010/03* (2010) ;

**APRIFEL**, Agence Pour la Recherche et l'Information en Fruits et Légumes Frais, [www.aprifel.com](http://www.aprifel.com) ;

**Arvidsson, K., Gustavsson, A.-M., Martinsson, K.**, Fatty acids in forages: a comparison of different pre-treatments prior to analysis, *Animal feed science and technology* 151 (2009) 143-152 ;

**ASN**, Le livre blanc du tritium, groupes de réflexion menés de mai 2008 à avril 2010 sous l'égide de l'ASN, *publié par l'ASN* (2010) ;

**Baglan, N., Alanic, G., Pointurier, F.**, Tritium determination at trace level: which strategy to determine accurately HTO and OBT in environmental samples ?, *Fusion science and technology* 48 (2005) 749-754 ;

**Baglan, N.**, Le tritium dans l'environnement : origine, analyse et distribution, *Formation INSTN* (2006) ;

- Baglan, N., Le Meignen, R., Alanic, G., Pointurier, F.**, Determination of the non-exchangeable-organically bound tritium (NE-OBT) fraction in tree leaf samples collected around a nuclear research center, *Fusion science and technology* 54 (2008) 243-247 ;
- Baglan, N., Ansozorlo, E., Cossonnet, C., Fouhal, L., Fourné, E., Henry, A., Kim, S.B., Mokili, M., Olivier, A., Granier, G.**, Assessment and interpretation of a round-robin exercise for organically bound tritium determination, in LSC 2008, J. Eikenberg, M. Jaggi, H. Beer, H. Baehrle (Eds.), *Radiocarbon*, the university of Arizona, Tucson, Arizona, USA (2009) 229-240 ;
- Baglan, N., Alanic, G.**, Contribution de l'analyse élémentaire et de la spectrophotométrie UV-Visible à la compréhension du comportement du TOL-E lors de l'étape d'échange labile, *Rapport technique ENV SURRD RBC CRE 10000467 A* (2010) 1-26 ;
- Baglan, N., Ansozorlo, E., Cossonnet, C., Fouhal, L., Deniau, I., Mokili, M., Henry, A., Fourre, E., Olivier, A.**, Métrologie du tritium dans différentes matrices : cas du tritium organiquement lié (TOL), *Radioprotection* 45 (2010) 369-390 ;
- Baglan, N., Alanic, G.**, Contribution of elemental analysis and UV-Vis spectrophotometry to the understanding of E-OBT elimination stage, *Fusion science and technology* 60 (2011) 948-951 ;
- Baglan, N., Alanic, G., Le Meignen, R., Pointurier, F.**, A follow up of the decrease of non-exchangeable organically bound tritium levels in the surroundings of a nuclear research center, *Journal of environmental radioactivity* 102 (2011) 695-702 ;
- Baglan, N., Kim, S.B., Cossonnet, C., Croudace, I.W., Fournier, M., Galeriu, D., Warwick, P.E., Momoshima, N., Ansozorlo, E.**, Organically bound tritium (OBT) behaviour and analysis: outcomes of the seminar held in Balaruc-les-Bains in may 2012, *Radioprotection* 48 (2013) 127-144 ;
- Baumgärtner, F., Kardinal, C., Müllen, G.**, Distribution of tritium between water and exchangeable hydrogen bridges of biomolecules, *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry* 249 (2001) 513-517 ;
- Baumgärtner, F., Donhaerl, W.**, Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature, *Analytical and bioanalytical chemistry* 379 (2004) 204-209 ;
- Baumgaertner, F., Yankovich, T.L., Kim, S.B.**, Logistic analysis of OBT dynamics, *Health physics* 97 (2009) 572-580 ;
- Bé, M.-M., Chisté, V., Dulieu, C., Browne, E., Baglin, C., Chechev, V., Kuzmenko, N., Helmer, R., Kondev F., MacMahon, D., Lee, K.B.**, Table of radionuclides 3 (2006) Ed. BIPM, p. 1 ;
- Belot, Y.**, Tritium in plants : a review; *Radiation protection dosimetry* 16 (1986) 101-105 ;
- Belot, Y., Roy, M., Métivier, H.**, Le tritium, de l'environnement à l'Homme, IPSN, les éditions de physique (1996) ;
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, IUPAC, IUPAP, ISO, OIML**, International vocabulary of metrology – Basics and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition, JCGM 200:2008 (2008) 1-90, <http://www.bipm.org/vim> ;
- Bisutti, I., Hilke, I., Raessler, M.**, Determination of total organic carbon – an overview of current methods, *Trends in analytical chemistry* 23 (2004) 716-726 ;
- Boyer, C., Vichot, L., Fromm, M., Losset, Y., Tatin-Froux, F., Guétat, P., Badot, P.M.**, Tritium in plants : a review of current knowledge, *Environmental and experimental botany* 67 (2009) 34-51 ;
- Boyer, C.**, Etude des transferts du tritium atmosphérique chez la laitue : Etude cinétique, état d'équilibre et intégration du tritium sous forme organique lors d'une exposition atmosphérique continue, *thèse de l'université de Franche-Comté* (2009) ;

- Bylund, D., Norström, S.H., Essen, S.A., Lundström, U.S.**, Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of chromatography A* 1176 (2007) 89-93 ;
- Cassette, P.**, Mesures de radioactivité par scintillation liquide, *Techniques de l'ingénieur*, dossier P2552 (2004) 1-19 ;
- CETAMA**, Statistique appliquée à l'exploitation des mesures, 2<sup>nde</sup> édition, Ed. Masson Paris (1986) ;
- CETAMA**, Analyse des radionucléides dans l'environnement – Analyse du tritium dans les matrices environnementales – méthode 384, Note technique DEN/DRCP/CETAMA/NT/2013/03 (2013) ;
- Chinnici, F., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A.**, Optimization of the determination of organic acids and sugar in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography, *Journal of food composition and analysis* 18 (2005) 121-130 ;
- Choi, Y.H., Kim, S.B., Lim, K.M., Park, H.K., Lee, W.Y.**, Incorporation into organically bound tritium and the underground distribution of HTO applied to a simulated rice field, *Journal of environmental radioactivity* 47 (2000) 279-290 ;
- Choi, Y.H., Lim, K.M., Lee, W.Y., Dabaté, S., Strack, S.**, Tissue free water tritium and organically bound tritium in the rice plant acutely exposed to atmospheric HTO vapor under semi-outdoor conditions, *Journal of environmental radioactivity* 58 (2002) 67-85 ;
- Choi, Y.H., Lim, K.M., Lee, W.Y., Park H.G., Choi, G.S. Keum D.K., Lee, H., Kim, S.B., Lee, C.L.**, Tritium levels in Chinese cabbage and radish plants acutely exposed to HTO vapor at different growth stages, *Journal of environmental radioactivity* 84 (2005) 79-94 ;
- Choi, Y.H., Kang, H.S., Jun, I., Keum, D.K., Lee, H., Kim, S.B., Lee, C.W.**, Fate of HTO followings its acute soil deposition at different growth stages of Chinese cabbage, *Journal of environmental radioactivity* 97 (2007) 20-29 ;
- Coble, P.G.**, Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy, *Marine chemistry* 51 (1996)325-346 ;
- Coble, P.G.**, Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color, *Chemical reviews* 107 (2007) 402-418 ;
- Companyo, R., Rubio, R., Sahuquillo, A., Boqué, R., Maroto, A., Riu, J.**, Uncertainty estimation in organic elemental analysis using information from proficiency tests, *Analytical and bioanalytical chemistry* 392 (2008) 1497-1505 ;
- Condon, R.D.**, A new automatic organic elemental microanalyzer, *Microchemical journal* 10 (1966) 408-426 ;
- Cotton, J.**, Principe de la scintillation liquide, *Formation de l'Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires « Mesures d'activité par scintillation liquide »* (2012) ;
- Culmo, R.**, Automatic microdetermination of carbon, hydrogen, and nitrogen: improved combustion train and handling techniques, *Mikrochimica acta* (1969) 175-180 ;
- De Paepe, D., Servaes, K., Noten, B., Diels, L., De Loose, M., Van Droogenbroeck, B., Voorspoels, S.**, An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits, *Food chemistry* 136 (2013) 368-375 ;
- Deglise, X., Donnot, A.**, Bois énergie, *Techniques de l'ingénieur*, dossier BE8535 (2004) 1-21 ;
- Delacroix, D., Guerre, J.P., Leblanc, P.**, Guide pratique radionucléides & radioprotection, EDP sciences (2006) ;
- DeVol, T.A., Powell, B.A.**, Theoretical organically bound tritium dose estimates, *Health physics* 86 (2004) 183-186 ;

**Di Giacomo, F., Granotier, C., Barroca, V., Laurent, D., Boussin, F.D., Lewandowski, D., Saintigny, Y., Romeo, P.-H.**, Tritium contamination of hematopoietic stem cells alters long-term hematopoietic reconstitution, *International journal of radiation biology* (2011) 1-15 ;

**Diabaté, S., Strack, S.**, Organically bound tritium, *Health physics* 65 (1993) 698-712 ;

**Diabaté, S., Strack, S.**, Organically bound tritium in wheat after short-term exposure to atmospheric tritium under laboratory conditions, *Journal of environmental radioactivity* 36 (1997) 157-175 ;

**Ding, Y., Yu, H., Mou, S.**, Off line elimination of carbohydrates for amino acids analysis of samples with high carbohydrate content by ion exchange chromatography, *Journal of chromatography A* 997 (2003) 155-160 ;

**Duval, M., Perret, P., Pierry, L., Frechou, C., Fichet, P., Casanova, F.**, Etude de la mise en place d'un analyseur de carbone organique total, *Note technique CEA DPC/SECR/LANIE* (2007) ;

**Dytrtova, J., Jakl, M., Schröder, D.**, Complexation of malic acid with cadmium (II) probed by electrospray ionization mass spectrometry, *Talanta* 90 (2012) 63-68 ;

**Eisele, T.A., Drake, S.R.**, The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties, *Journal of food composition and analysis* 18 (2005) 213-221 ;

**Eksperiandova, L.P., Fedorov, O.I., Stepanenko, N.A.**, Estimation of metrological characteristics of the element analyzer EuroVector EA-3000 and its potential in the single-reactor CHNS mode, *Microchemical journal* 99 (2011) 235-238 ;

**Escarpa, A., Gonzalez, M.C.**, High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties, *Journal of chromatography A* 823 (1998) 331-337 ;

**Eurachem/CITAC**, guide CG 4: quantifying uncertainty in analytical measurement, third edition (2012), S.L.R. Ellison (Ed .) & A. Williams, UK ;

**Fadeeva, V.P., Tikhova, V.D.**, Elemental analysis of organic compounds with the use of automated CHNS analyzers, *Journal of analytical chemistry* 63 (2008) 1094-1106 ;

**Feinberg, M.**, Validation interne des méthodes d'analyse, *Techniques de l'ingénieur*, dossier P224 (2001) 1-23 ;

**Fourré, E., Jean-Baptiste, P., Dapoigny, A., Ansoborlo, E., Baglan, N.**, « Reference waters » in french laboratories involved in tritium monitoring : how tritium-free are they ?, *en preparation* (2014) ;

**Fuma, S., Inoue, Y.**, Simplified and sensitive analysis of organically bound tritium in tree rings to retrospect environmental tritium levels, *Applied radiation and isotopes* 46 (1995) 991-997 ;

**Galeriu, D., Takeda, H., Melintescu, A., Trivedi, A.**, Energy metabolism and human dosimetry of tritium, *Fusion science and technology* 48 (2005) 795-798 ;

**Galeriu, D., Davis, P., Raskob, W., Melintescu, A.**, Recent progresses in tritium radioecology and dosimetry, *Fusion science and technology* 54 (2008) 237-242 ;

**Galeriu, D., Melintescu, A., Strack, S., Atarashi-Andoh, M., Kim, S.B.**, An overview of organically bound tritium experiments in plants following a short atmospheric HTO exposure, *Journal of environmental radioactivity* 118 (2013) 40-56 ;

**Garland, J.A., Ameen, M.**, Incorporation of tritium in grain plants, *Health physics* 36 (1979) 35-38 ;

**Glugla, M., Antipenkov, A., Beloglazov, S., Caldwell-Nichols, C., Critescu, I.R., Critescu, I., Day, C., Doerr, L., Girard, J.-P., Tada, E.**, The ITER tritium systems, *Fusion engineering and design* 82 (2007) 472-487 ;

**Gogichaeva, N.V., Williams, T., Alterman, M.A.**, MALDI TOF/TOF tandem mass spectrometry as a new tool for amino acid analysis, *American society for mass spectrometry* published by Elsevier Inc. (2007) 279-284 ;

**Gomez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.**, Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit, *Phytochemistry* 71 (2010) 1848-1864 ;

**Grosse, A.V., Johnston, W.M., Wolfgang, R.L., Libby, W.F.**, Tritium in nature, *Science* 113 (1951) 1-2 ;

**Guenot, J., Belot, Y.**, Assimilation of  $^3\text{H}$  in photosynthesizing leaves exposed to HTO, *Health physics* 47 (1984) 849-855 ;

**Guétat, P., Douche, C., Hubinois, J.C.**, Le tritium et l'environnement : sources, mesures et transferts, *Radioprotection* 43 (2008) 547-569 ;

**Harrison, A., Young, A.B.**, Fragmentation reactions of deprotonated peptides containing aspartic acid, *International journal of mass spectrometry* 255-256 (2006) 111-122 ;

**Hill, R.L., Johnson, J.R.**, Metabolism and dosimetry of tritium, *Health physics* 65 (1993) 628-647 ;

**Hisamatsu, S., Hashimoto, T., Takizawa, Y.**, Tritium concentration in some European foods, *J. Radioanal. Nucl. Chem., letters* 146 (1990) 245-253 ;

**Hockaday, N.C., Purcell, J.M., Marshall, A.G., Baldock, J.A., Hatcher, P.G.**, Electrospray and photoionization mass spectrometry for the characterization of organic matter in natural waters: a qualitative assessment, *Limnology and oceanography: methods* 7 (2009) 81-95 ;

**Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Cooks, R.G.**, The Orbitrap: a new mass spectrometer, *Journal of mass spectrometry* 40 (2005) 430-443 ;

**Hudson, N., Baker, A., Reynolds, D.**, Fluorescence analysis of dissolved organic matter in natural, waste and polluted waters – a review, *River research and application* 23 (2007) 631-649 ;

**Hunt, J., Bailey, T., Reese, A.**, The human body retention time of environmental organically bound tritium, *Journal of radiological protection* 29 (2009) 23-36 ;

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)**, Report of the task group on reference man (1975) ICRP publication 23, Elsevier science Ltd, Oxford ;

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)**, Limits for intakes of radionuclides by workers (1979) Annals of the ICRP volume 2 n° 3-4, ICRP publication 30, Elsevier science Ltd, Oxford ;

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)**, Human respiratory tract model for radiological protection (1994) Annals of the ICRP volume 24 n° 1-3, ICRP publication 66, Elsevier science Ltd, Oxford ;

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)**, Age-dependant doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 4 : Inhalation dose coefficient (1995) Annals of the ICRP volume 25 n° 3-4, ICRP publication 71, Elsevier science Ltd, Oxford ;

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)**, Age-dependant doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 5 : Compilation of ingestion and inhalation dose coefficients (1996) Annals of the ICRP volume 26 n° 1, ICRP publication 72, Elsevier science Ltd, Oxford ;

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)**, Human alimentary tract model for radiological protection (2006) Annals of the ICRP volume 36 n° 1-2, ICRP publication 100, Elsevier science Ltd, Oxford ;

**Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I.**, A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food chemistry* 126 (2011) 1821-1835 ;

**IRSN**, Le tritium dans l'environnement synthèse des connaissances, *Rapport DEI 2009-05 (2009a)* ;

**IRSN**, Eléments de réflexion sur le risque sanitaire posé par le tritium, *Rapport IRSN DRPH/DIR/2009-18 (2009b)* ;

**Jean-Baptiste, P., Mantsi, F., Dapoigny, A., Stievenard, M.**, Design and performance of a mass spectrometric facility for measuring helium isotopes in natural waters and for low-level tritium determination by the  $^3\text{He}$  ingrowth method, *Applied radiation and isotopes* 43 (1992) 881-891 ;

**Jean-Baptiste, P., Fourré, E., Dapoigny, A., Baumier, D., Baglan, N., Alanic, G.**,  $^3\text{He}$  mass spectrometry for very low-level measurement of organic tritium in environmental samples, *Journal of environmental radioactivity* 101 (2010) 185-190 ;

**Kaufman, S., Libby, W.F.**, The natural distribution of tritium, *Physical review* 93 (1954) 1337-1344 ;

**Kim, S.B., Kotzer, T.G., Davis, P.A.**, Conceptual model for OBT formation at night in edible parts of non-leafy vegetables, report COG-01-083-CANDU owners Group Inc. (2002) ;

**Kim, S., Kramer, R.W., Hatcher, P.G.**, Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the Van Krevelen diagram, *Analytical chemistry* 75 (2003) 5336-5344 ;

**Kim, S.B., Workman, W.J.G., Davis, P.A.**, Experimental investigation of buried tritium in plant and animal tissues, *Fusion science and technology* 54 (2008) 257-260 ;

**Kim, S.B., Bredlaw, M., Korolevych, V.Y.**, HTO and OBT activity concentrations in soil at the historical atmospheric HT release site (Chalk River Laboratories), *Journal of environmental radioactivity* 103 (2012) 34-40 ;

**Kim, S.B., Baglan, N., Davis, P.A.**, Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment, *Journal of environmental radioactivity* 126 (2013a) 83-91 ;

**Kim, S.B., Shultz, C., Stuart, M., McNamara, E., Festarini, A., Bureau, D.P.**, Organically bound tritium (OBT) formation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : HTO and OBT-spiked food exposure experiments, *Applied radiation and isotopes* 72 (2013b) 114-122 ;

**Kim, S.B., Korolevych, V.**, Quantification of exchangeable and non-exchangeable organically bound tritium (OBT) in vegetation, *Journal of environmental radioactivity* 118 (2013) 9-14 ;

**Kline, J.R., Stewart, M.L.**, Tritium uptake and loss in grass vegetation which has been exposed to an atmospheric source of tritiated water, *Health physics* 26 (1974) 567-573 ;

**König, L.A.**, Tritium in the food chain, *Radiation protection dosimetry* 30 (1990) 77-86 ;

**Korolevych, V.Y., Kim, S.B.**, Relation between the tritium in continuous atmospheric release and the tritium content of fruits and tubers, *Journal of environmental radioactivity* 118 (2013) 113-120 ;

**Kozak, K.**, Analysis of tritium in tree rings, *Acta physica academiae scientiarum hungaricae* 52 (1982) 429-434 ;

**Lang, A.R.G., Mason, S.G.**, Tritium exchange between cellulose and water: accessibility measurements and effects of cyclic drying, *Canadian journal chemistry* 38 (1960) 373-387 ;

**Le Guen, B.**, Impact du tritium autour des centrales nucléaires EDF, *Radioprotection* 43 (2008) 177-191 ;

**Le Meignen, R., Baglan, N., Pointurier, F.**, Optimisation de la méthodologie d'analyse du tritium organique dans des échantillons biologiques, *Rapport technique ENV SURME RBC CRE 08000449 A (2011)* 1-36 ;

**Libby, W.F.**, History of tritium, from TRITIUM, edited by A. Alan Moghissi and M. W. Carter (1973) prepared from papers presented at the tritium symposium (28/08-3/09 1971, Las Vegas) ;

**Littlewood, A.B.**, Gas chromatography – Principles, techniques and applications, chapter 10: Thermal conductivity detectors, second edition, ed. Academic press, Londres (1970) 339-381 ;

**Makarov, A., Scigelova, M.**, Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry, *Journal of chromatography A* 1217 (2010) 3938-3945 ;

**Marco, A., Compano, R., Rubio, R., Domenech, P., Palangues, A., Maestro, M.**, Assessment of four inter-comparison exercises in organic elemental analysis, *Microchimica acta* 140 (2002) 131-139 ;

**Marco, A., Compano, R., Rubio, R., Casals, I.**, Assessment of additives for nitrogen, carbon, hydrogen and sulfur determination by organic elemental analysis, *Microchimica acta* 140 (2003) 131-139 ;

**Marco, A., Companyo, R., Rubio, R., Pueyo, M., Vilalta, E.**, Comparison of “bottom-up” and “top-down” strategies for the estimation of the uncertainty in organic elemental analysis, *Microchimica acta* 159 (2007) 387-393 ;

**Marin, M., René, F.**, Lyophilisation, *Techniques de l'ingénieur*, dossier F3240 (2000) 1-9 ;

**Mauchien, P.**, Spectrofluorimétrie moléculaire et spectrométrie de fluorescence atomique, *Techniques de l'ingénieur*, dossier P2835 (1990) 1-12 ;

**McCubbin, D., Leonard, K.S., Bailey, T.A., Williams, J., Tossell, P.**, Incorporation of organic tritium (<sup>3</sup>H) by marine organisms and sediment in the Severn estuary/Bristol channel (UK), *Marine pollution bulletin* 42 (2001) 852-863 ;

**McDonald, S., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K.**, Analytical chemistry of freshwater humic substances, *Analytica chimica acta* 527 (2004) 105-124 ;

**McFarlane, J.C., Beckert, W.F., Brown, K.F.**, Tritium in plants, *Journal of environmental quality* 8 (1979) 270-276 ;

**Merz, W.**, Automated rapid method in organic elemental analysis, *Mikrochimica acta* (1978) 519-534 ;

**Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi, M.B., Shahidi, F.**, The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice, *Food research international* 42 (2009) 1040-1045 ;

**Momoshima, N., Okai, T., Kaji, T., Takashima, Y.**, Distribution and transformation of various chemical forms of tritium in the environment, *Radiochemica acta* 54 (1991) 129-132 ;

**Morales-Soto, A., Gomez-Caravaca, A.M., Garcia-Salas, P., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.**, High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annum* L.) samples, *Food research international* 51 (2013) 977-984 ;

**Morel, I., Wyss, U., Collomb, M., Bütikofer, U.**, Influence de la composition botanique de l'herbe ou du foin sur la composition du lait, *Agroscope – Revue Suisse d'agriculture* 38 (2006) 9-15 ;

**Moses, V., Calvin, M.**, Photosynthesis studies with tritiated water, *Lawrence Berkeley National Laboratory, rapport issu de* <http://www.escholarship.org/uc/item/6r01q5dx> (1958) 1-31 ;

**National Council on Radiation Protection and measurements (NCRP)**, Development of a biokinetic model for radionuclide-contaminated wounds and procedures for their assessment, dosimetry and treatment (2006) report No 156 ;

**Neuilly, M., CETAMA**, Modélisation et estimation des erreurs de mesure (1993), Ed. Technique et documentation-Lavoisier ;

**Nielsen, N.J., Granby, K., Hedegaard, R.V., Skibsted, L.H.**, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugar in bread, *Analytica chimica acta* 557 (2006) 211-220 ;

**Okada, S., Momoshima, N.**, Overview of tritium: characteristics, sources, and problems, *Health physics* 65 (1993) 595-609 ;

**Özcan, S., Senyuva, H.Z.**, Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods, *Journal of chromatography A* 1135 (2006) 179-185 ;

**Palafox-Carlos, H., Yahia, E.M., Gonzalez-Aguilar, G.A.**, Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening, *Food chemistry* 135 (2012) 105-111 ;

**Palomo, M., Penalver, A., Aguilar, C., Borrull, F.**, Tritium activity levels in environmental water samples from different origins, *Applied radiation and isotopes* 65 (2007) 1048-1056 ;

**Paquet, F., Métivier, H.**, Les riches liés au tritium sont-ils sous-évalués ?, *Radioprotection* 43 (2008) 193-201 ;

**Paulickova, I., Ehrenbergerova, J., Fiedlerova, V., Gabrovská, D., Havlova, P., Holasova, M., Kopacek, J., Ouhračkova, J., Pinkrova, J., Rysova, J., Vaculova, K., Winterova, R.**, Evaluation of barley grass as a potential source of some nutritional substances, *Czech journal of food sciences* 25 (2006) 65-72 ;

**Pérez-Illarbe, J., Hernandez, T., Estrella, I.**, Phenolic compounds in apples: varietal differences, *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 192 (1991) 551-554 ;

**Petitjean, P., Henin, O., Gruau, G.**, Dosage du carbone organique dissous dans les eaux douces naturelles – Interêt, principe, mise en œuvre et précautions opératoires, *Cahiers techniques de géosciences Rennes n°3*, Editions de géosciences Rennes (2004) 1-64 ;

**Pinson, E.A., Anderson, E.C.**, The absorption, distribution, and excretion of tritium in men and animals, *rapport de la commission à l'énergie atomique des Etats-Unis AECU-937* (1950) ;

**Pointurier, F., Baglan, N., Alanic, G., Chiappini, R.**, Determination of organically bound tritium background level in biological samples from a wide area in the south-west of France, *Journal of environmental radioactivity* 68 (2003) 171-189 ;

**Pointurier, F., Baglan, N., Alanic, G.**, A method for the determination of low-level organic-bound tritium activities in environmental samples, *Applied radiation and isotopes* 61 (2004) 293-298 ;

**Pons, M.-N., Le Bonté, S., Potier, O.**, Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterisation, *Journal of biotechnology* 113 (2004) 211-230 ;

**Raessler, M., Wissuwa, B., Breul, A., Unger, W., Grimm, T.**, Determination of water-extractable nonstructural carbohydrates, including inulin, in grass samples with high-performance anion exchange chromatography and pulsed amperometric detection, *Journal of agricultural and food chemistry* 56 (2008) 7649-7654 ;

**Raessler, M., Wissuwa, B., Breul, A., Unger, W., Grimm, T.**, Chromatographic analysis of major non-structural carbohydrates in several wood species – an analytical approach for higher accuracy of data, *Analytical methods* (2010) 532-538 ;

**Raskob, W.**, Assessment of the environmental impact from tritium releases under normal operation conditions and after accidents, *Fusion technology* 48 (1995) 934-939 ;

**Reis, S.F., Rai, D.K., Abu-Ghannam, N.**, Water at room temperature as a solvent for the extraction of apple pomace phenolic compounds, *Food chemistry* 135 (2012) 1991-1998 ;

**Rodriguez-Medina, I.C., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A.**, Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices, *Journal of chromatography A* 1216 (2009) 4736-4744 ;

**Rodriguez Galdon, B., Hernandez Rodriguez L., Rios Mesa, D., Leon, H.L., Perez, N.L., Rodriguez Rodriguez E.M., Diaz Romero, C.**, Differentiation of potato cultivars experimentally cultivated based on their chemical composition and by applying linear discriminant analysis, *Food chemistry* 133 (2012) 1241-1248 ;

**Sanz, M.L., Martinez-Castro, I.**, Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates, *Journal of chromatography A* 1153 (2007) 74-89 ;

**Schiller, M., Von Der Heydt, H., März, F., Schmid, P.C.**, Quantification of sugars and organic acids in hygroscopic pharmaceutical herbal dry extracts, *Journal of chromatography A* 968 (2002) 101-111 ;

**Schimd, F.-X.**, Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry, *Encyclopedia of life science* (2001) 1-4 ;

**Senila, L., Gog, A., Senila, M., Roman, C., Silaghi-Dumitrescu, L.**, Analysis of carbohydrates obtained from wood by gas chromatography-mass spectrometry, *Review of chemistry (Bucharest)* 62 (2011) 149-153 ;

**Sigg, L., Stumm, W., Behra, P.**, Chimie des milieux aquatiques – chimie des eaux et des interfaces dans l'environnement, *Ed. Masson, Paris* (1992) ;

**Simonnet, G., Oria, M.**, Les mesures de radioactivité à l'aide des compteurs à scintillation liquide, Editions Eyrolles (1977) Paris ;

**Siret, C.**, Les composants chimiques des produits alimentaires, *Techniques de l'ingénieur, dossier F1010* (2002) 1-19 ;

**Siret, C.**, Structure des aliments, *Techniques de l'ingénieur, dossier F1012* (2004) 1-21 ;

**Sleighter, R.L., Hatcher, P.G.**, The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter, *Journal of mass spectrometry* 42 (2007) 559-574 ;

**Starke, I., Holzberger, A., Kamm, B., Kleinpeter, E.**, Qualitative and quantitative analysis of carbohydrates in green juices (wild mix grass and alfalfa) from a green biorefinery by gas chromatography/mass spectrometry, *Fresenius journal of analytical chemistry* 367 (2000) 65-72 ;

**Stark, S., Statham, P.J., Stanley, R., Jenkins, W.J.**, Using tree ring cellulose as a tool to estimate past tritium inputs to the ocean, *Earth and planetary science letters* 237 (2005) 341-353 ;

**Stefaniak, A.B., Virji, M.A., Harvey, C.J., Sbarra, D.C., Day, G.A., Hoover, M.D.**, Influence of artificial gastric juice composition on bioaccessibility of cobalt- and tungsten- containing powders, *International journal of hygiene and environmental health* 213 (2010) 107-115 ;

**Straume, T.**, Tritium risk assessment, *Health physics* 65 (1993) 673-682 ;

**Sun, W., Griffiths, M.W.**, Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads, *International journal of food microbiology* 61 (2000) 17-25 ;

**SUPELCO**, Guide to solid phase extraction, bulletin 910 (1998) ;

**Takeda, H.**, Incorporation and distribution of tritium in rats after chronic exposure to various tritiated compounds, *International journal of radiation biology* 59 (1991) 843-853 ;

- Taylor, D.M.**, A biokinetic model for predicting the retention of  $^3\text{H}$  in the human body after intakes of tritiated water, *Radiation protection dosimetry* 105 (2003) 225-228 ;
- Taylor, D.M.**, Radiation doses from some [ $^3\text{H}$ ]-labelled organic compounds following ingestion, *Radiation protection dosimetry* (2007) 1-10 ;
- Tedetti, M., Cuet, P., Guigue, C., Goutx, M.**, Characterization of dissolved organic matter in a coral reef ecosystem subjected to anthropogenic pressures (La Réunion island, Indian ocean) using multi-dimensional fluorescence spectroscopy, *Science of the total environment* 409 (2011) 2198-2210 ;
- Termentzi, A., Kefalas, P., Kokkalou, E.**, LC-DAD-MS (ESI+) analysis of the phenolic content of *Sorbus domestica* fruits in relation to their maturity stage, *Food chemistry* 106 (2008) 1234-1245 ;
- Thompson, R.G., Nelson, C.D.**, Photosynthetic assimilation and translocation of  $^3\text{H}$ - and  $^{14}\text{C}$ - organic compounds after  $^3\text{H}_2\text{O}$  and  $^{14}\text{CO}_2$  were simultaneously offered to a primary leaf of soybean, *Canadian journal of botany* 49 (1971) 757-766 ;
- Tranchant, J.**, Chromatographie en phase gazeuse, *Techniques de l'ingénieur*, dossier P1485 (1996) 1-27 ;
- Trivedi, A., Galeriu, D., Richardson, R.B.**, Dose contribution from metabolized organically bound tritium after acute tritiated water intakes in humans, *Health physics* 73 (1997) 579-586 ;
- Vander, A.J., Sherman, J.H., Luciano, D.S.**, Physiologie humaine, McGraw-Hill Editeurs, Montréal (1977) ;
- Wabaidur, S.M., Alothman, Z.A., Khan, M.R.**, A rapid method for the simultaneous determination of L-ascorbic acid and acetylsalicylic acid in aspirin C effervescent tablet by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Spectrochimica acta part A : Molecular and biomolecular spectroscopy* 108 (2013) 20-25 ;
- Williams, J.L., Russ, R.M., McCubbin, D., Knowles, J.F.**, An overview of tritium behavior in the Severn estuary (UK), *Journal of radiological protection* 21 (2001) 337-344 ;
- Wood, M.J., McElroy, R.G.C., Surette, R.A., Brown, R.M.**, Tritium sampling and measurement, *Health physics* 65 (1993) 610-627 ;
- Workman, W.J.G., Kim, S.B., Kotzer, T.G.**, Interlaboratory comparison of organically bound tritium measurements in environmental samples, *Fusion science and technology* 48 (2005) 763-766 ;
- Wu, J., Gao, H., Zhao, L., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., Hu, X.**, Chemical composition of some apple cultivars, *Food chemistry* 103 (2007) 88-93 ;
- Xu, F., Zhou, Q-A., Sun, J-X., Liu, C-F., Ren, J-L., Sun, R-C., Curling, S., Fowler, P., Baird, M.S.**, Fractionation and characterization of chlorophyll and lignin from de-juiced Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and timothy grass (*Phleum pratense*), *Process biochemistry* 42 (2007) 913-918 ;
- Yamada, Y., Itoh, M., Egawa, K., Kiriya, N., Komura, K., Ueno, K.**, Effect of labile hydrogens on measurement of tritium preserved in hydrogen of cellulose, *Journal of radioanalytical chemistry, letters* 164 (1992) 47-57 ;
- Zhang, H., Cha, S., Yeung, E.S.**, Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MSn of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits, *Analytical chemistry* 79 (2007) 6575-6584 ;
- Zhang, Y., Li, P., Cheng, L.**, Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh, *Food chemistry* 123 (2010) 1013-1018 ;
- Zubarev, R.A., Makarov, A.**, Orbitrap mass spectrometry, *Analytical chemistry* 85 (2013) 5288-5296 ;



# Annexes

## ANNEXE A : OUTILS ANALYTIQUES ET DESCRIPTION DES CALCULS

### A.1. LA SCINTILLATION LIQUIDE

Le tritium est un émetteur  $\beta^-$  dont l'énergie ( $E_{\max} = 18,564 \pm 0,003$  keV) est trop faible pour être détectée par des détecteurs de type Geiger-Müller [Simonnet et Oria, 1977]. En effet, le parcours maximum de la particule  $\beta^-$  émise, proportionnelle à l'énergie de la particule, est de 5 mm dans l'air et de l'ordre d'une dizaine de microns dans l'eau [Belot et al, 1996]. De ce fait, sa détection nécessite la transformation du rayonnement ionisant consécutif à la désintégration de l'atome radioactif en un rayonnement lumineux détectable et quantifiable [Cassette, 2004]. Le principe de la scintillation liquide consiste donc à mélanger la solution radioactive à mesurer à un solvant, le liquide scintillant ou scintillateur, qui doit (i) pouvoir être excité suite à la désintégration de l'atome radioactif (ii) transférer l'énergie d'excitation pour (ii) exciter des solutés fluorescents et permettre ainsi la détection du nombre de désintégrations par l'intermédiaire de la lumière émise (figure 46).

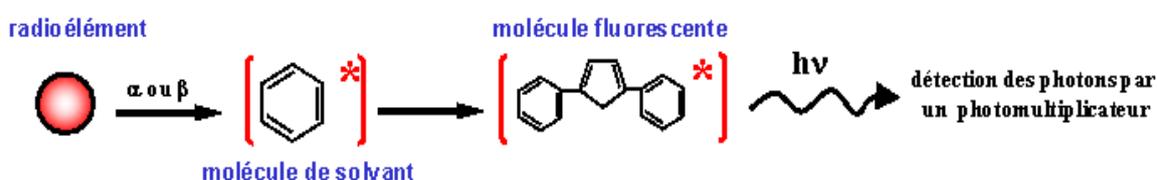


Figure 46 : Principe de la scintillation liquide [Cotton, 2012]

Lorsqu'un atome de tritium se désintègre, une particule  $\beta^-$  est libérée. Celle-ci excite les molécules de solvant présentes dans le liquide scintillant. Ces molécules sont des molécules organiques aromatiques dont les électrons  $\pi$  absorbent l'énergie libérée (solvants à base de diisopropylnaphtalène par exemple). Le nombre de molécules excitées sur la trajectoire d'une particule  $\beta^-$  est proportionnel à l'énergie cédée par la particule. Les molécules de solvant peuvent ensuite revenir à leur état fondamental en restituant l'énergie sous forme de photons de fluorescence, mais également en dissipant l'énergie sous forme thermique (conversion interne) ou en transférant l'énergie d'excitation à une autre molécule (formation de dimères, phénomène étant la cause de « l'auto-extinction »). Afin d'augmenter les rendements de fluorescence, des solutés (1,5-diphényloxazole, ou PPO, par exemple), à l'état de traces, sont présents dans le scintillateur. Ainsi, le solvant transmet l'énergie absorbée aux solutés qui émettent des photons lumineux par fluorescence.

Les photons lumineux issus du scintillateur sont collectés à l'aide d'une cellule photoélectrique (tube photomultiplicateur constitué d'une photocathode et de dynodes). La photocathode émet des

électrons par effet photoélectrique après l'absorption de lumière. Afin d'optimiser le rendement de détection des électrons, il est important de s'assurer que le scintillateur émet des photons dont la longueur d'onde est située dans une zone où le rendement de la cellule est maximum. C'est pourquoi des solutés secondaires sont généralement introduits dans le milieu (le 1,4-bis-2-méthylstyril-benzène, ou Bis-MSB, par exemple). Les électrons sont ensuite accélérés par un champ électrique pour atteindre les dynodes où ils sont multipliés (figure 47).

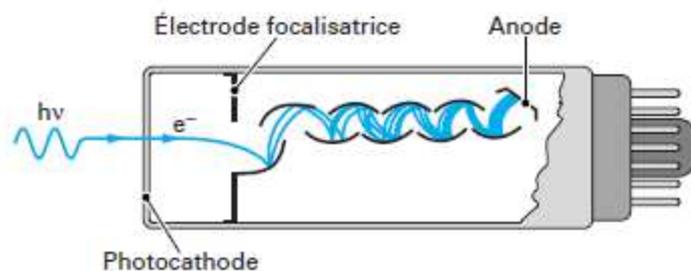


Figure 47 : Schéma d'un photomultiplicateur [Cassette, 2004]

L'amplitude des signaux est proportionnelle au nombre de photoélectrons émis par la photocathode, donc au nombre de photons ayant atteint le tube photomultiplicateur. Le signal est ensuite traité et mis en forme par un circuit électronique associé.

Le bruit de fond associé aux photomultiplicateurs étant important (fortes tensions appliquées aux photocathodes, bruit d'obscurité résultant de l'émission thermique de photoélectrons), le système de détection des électrons intègre deux photodétecteurs fonctionnant en coïncidence (figure 48) pour discriminer le bruit de fond du signal.

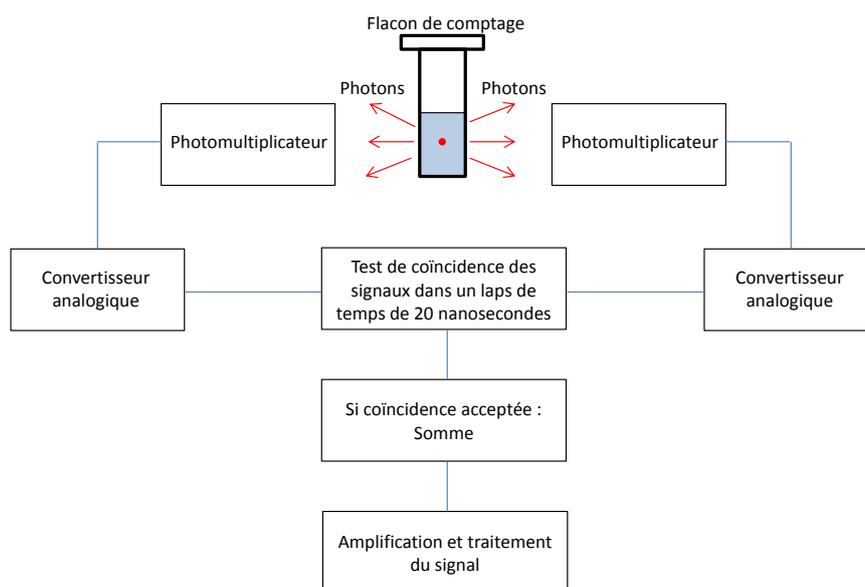


Figure 48 : Chaîne de détection des photons issus de la désintégration des atomes de tritium d'après [Cassette, 2004 et Cotton, 2012]

Le système ne prend en compte que les signaux détectés par les deux photomultiplicateurs dans un laps de temps court. Seuls les signaux résultant de la désintégration du tritium sont observés simultanément. De ce fait, ce système permet la réjection du bruit de fond mais entraîne cependant une diminution du rendement de détection. Les impulsions issues des photomultiplicateurs sont ensuite envoyées vers des échelles de comptage et des spectres en énergie peuvent être obtenus grâce aux analyseurs multicanaux.

## A.2. ANALYSE ELEMENTAIRE : DESCRIPTION DES CALCULS ET INCERTITUDES

La réponse obtenue, pour chaque élément, à l'issue de l'injection de l'échantillon dans l'analyseur élémentaire, est l'aire des pics identifiés sur le chromatogramme. La proportion d'un élément  $x$ , exprimée en pourcents est calculée, à partir de la droite d'étalonnage, suivant la relation 45.

$$x = \frac{m_x}{m_p} = \left( \frac{A_x - b_{0,x}}{b_{1,x} \times m_p} \right) \quad \text{Eq. 45}$$

Où  $m_x$ ,  $A_x$ ,  $b_{0,x}$ ,  $b_{1,x}$  font respectivement référence à la masse, à l'aire du pic sur le chromatogramme, et aux paramètres de la droite d'étalonnage relatifs à l'élément  $x$ .

D'une manière générale, les incertitudes liées aux résultats des mesures sont déterminées suivant l'approche décrite dans le guide EURACHEM/CITAC Guide CG 4 [Eurachem/Citac, 2012] qui consiste à identifier les différentes sources d'incertitudes puis à les combiner.

Deux sources d'incertitude associées à cette valeur sont identifiées :

- Incertitude liée à l'étalonnage ( $U_{cal}$ ) [Neuilly et CETAMA, 1993] :

$$U_{cal} = \frac{t_{\alpha,\nu} \times s_{y/x}}{b_{1,x}} \sqrt{\frac{1}{q} + \frac{1}{N \cdot q'} + \frac{(m_x - \overline{m_{N,x_i}})^2}{\sum (m_{x_i} - \overline{m_{N,x_i}})^2}} \quad \text{Eq. 46}$$

Où  $t_{\alpha,\nu}$  est la valeur de Student tabulée pour un risque  $\alpha$  (0,05) et  $\nu$  degrés de liberté,  $s_{y/x}$  est la variance résiduelle liée à l'étalonnage,  $q$  est le nombre de mesures répétées pour un même échantillon,  $N$  est le nombre de points utilisés pour réaliser l'étalonnage,  $q'$  est le nombre de mesures répétées de chaque point de l'étalonnage,  $m_x$  est la masse de l'élément  $x$  dans l'échantillon injecté pour analyse,  $m_{x_i}$  fait référence à la masse de l'élément  $x$  dans l'étalon  $i$  et  $\overline{m_{N,x_i}}$  est la masse moyenne de l'élément  $x$  injecté pour l'étalonnage.

- Incertitude liée à la pesée de l'échantillon ( $U_p$ ) :

$$U_p = k \times u_p \quad \text{Eq. 47}$$

Ces deux termes sont combinés pour déterminer l'incertitude relative sur x suivant l'équation 48 :

$$\frac{U_x}{x} = \sqrt{\left(\frac{U_{cal}}{m_x}\right)^2 + \left(\frac{U_p}{m_p}\right)^2} \quad \text{Eq. 48}$$

Pour améliorer la justesse du résultat pour chaque échantillon, n aliquotes sont mesurées ( $n \geq 5$ ) et l'incertitude statistique de la moyenne expérimentale est combinée avec l'incertitude relative moyenne déterminée sur les n résultats de mesure (eq. 49).

$$u_x = \sqrt{\left(\frac{s}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{u_x}{x}\right)^2} \quad \text{Eq. 49}$$

Où s est l'écart type calculé sur les n déterminations de la proportion de x dans l'échantillon

### A.3. CARBONE ORGANIQUE TOTAL

Les mesures de carbone organique total (COT) sont réalisées, sur les solvants d'échange, à l'aide d'un COTmètre SHIMADZU® TOC 5000-A (figure 49).



Figure 49 : COTmètre SHIMADZU® TOC 5000-A du laboratoire de biogéochimie, biodisponibilité et transfert des radionucléides (L2BT) de l'IRSN.

Le COT représente l'ensemble des molécules organiques dont la taille est inférieure au seuil de coupure du filtre utilisé pour la séparation des phases liquides et solides à la fin des échanges labiles (0,45  $\mu\text{m}$ ).

Plusieurs voies sont disponibles pour doser le COT (analyse directe, analyse indirecte, oxydation chimique, oxydation thermique...) et dans cette étude, un dosage indirect par la méthode d'oxydation thermique a été utilisé [Bisutti et al, 2004]. La teneur en COT est ainsi déterminée par le

calcul suite à la détermination des fractions « carbone total (TC) » et « carbone inorganique (IC) » (relation 50).

$$COT = TC - IC$$

Eq. 50

Le système se divise en plusieurs parties (figures 50 et 51) : le passeur automatique d'échantillons (ASI 5000-A), le système de prélèvement, le four d'oxydation, le réacteur et le détecteur (cellule infrarouge).

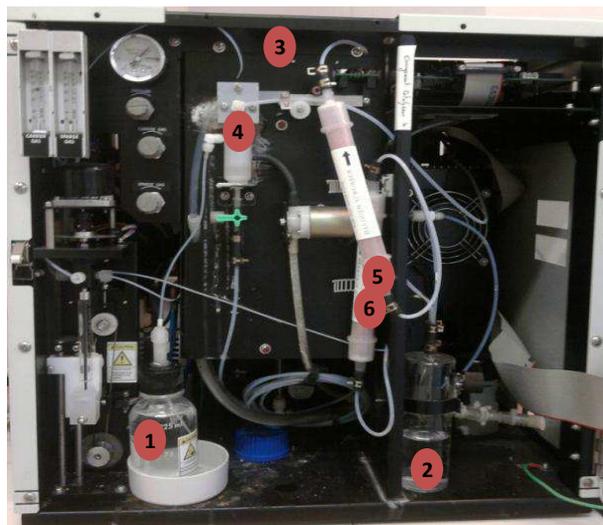


Figure 50 : Vue détaillée de l'analyseur SHIMADZU® TOC 5000-A du L2BT

1 : Réservoir d'acide phosphorique à 50 % ; 2 : Réservoir d'eau pour l'humidification du gaz ; 3 : Four ; 4 : Réacteur pour l'analyse IC ; 5 & 6 : assécheur et filtres.

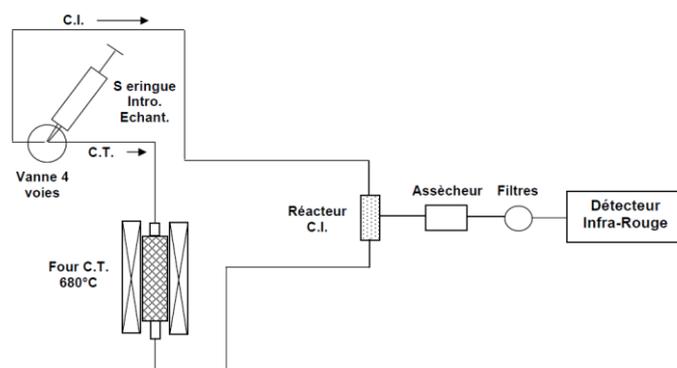


Figure 51 : Schéma simplifié d'un COTmètre (d'après [Petitjean & al, 2004]).

Les échantillons sont placés dans des tubes à essais, recouverts par de la paraffine pour prévenir toute contamination par des composés organiques. Les échantillons sont prélevés à l'aide d'une seringue automatique et transférés dans une boucle d'injection à 4 voies. En fonction de la fraction carbone analysée, l'échantillon est injecté soit dans un réacteur en verre (carbone inorganique), soit dans un tube en quartz placé dans un four (carbone total). Le gaz vecteur transfère ensuite le produit de chacune des réactions ( $CO_2$ ) dans la cellule de détection infrarouge, après passage par un système d'assèchement, un piège à halogénures et un filtre à poussières.

#### A.3.1. Détermination du carbone total

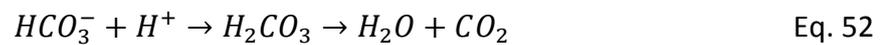
Le carbone total (TC), c'est-à-dire le carbone présent dans toute particule ou molécule de l'échantillon, est déterminé par la méthode d'oxydation thermique. Cette méthode est basée sur la combustion de l'échantillon en présence d'un catalyseur.

L'échantillon est introduit dans le tube en quartz, rempli d'un catalyseur de platine, placé dans un four à 680°C. La totalité du carbone de l'échantillon est alors transformée en CO<sub>2</sub>. Après combustion de l'échantillon, le CO<sub>2</sub> est transféré par un flux d'oxygène vers le détecteur infrarouge, et l'aire du pic formé est proportionnelle à la quantité de carbone détectée.

### A.3.2. Détermination du carbone inorganique

Le carbone inorganique (IC) est la somme des espèces inorganiques en solution, constituées du CO<sub>2</sub> dissous, des carbonates et bicarbonates de l'échantillon [Duval et al, 2007].

L'échantillon est prélevé puis injecté dans le réacteur en verre contenant de l'acide phosphorique à 50 %. Les espèces inorganiques en solution sont ainsi transformées en CO<sub>2</sub> suivant les relations 51 et 52.



Comme pour le circuit « carbone total », le CO<sub>2</sub> est transféré par un flux d'oxygène vers le détecteur infrarouge.

## **ANNEXE B : DONNEES RELATIVES AUX ECHANTILLONS PLACES EN ECHANGE LABILE ET PROCEDURE EXPERIMENTALE MISE EN ŒUVRE**

### **B.1. COMPOSITIONS DES ECHANTILLONS CIBLES**

Le tableau 44 répertorie, de manière non exhaustive, les principales molécules constitutives des trois échantillons cibles pomme, chêne et herbe [APRIFEL ; ANSES ; Perez et al, 1991 ; Escarpa et Gonzalez, 1998 ; Starke et al, 2000 ; Deglise et Donnot, 2004 ; Eisele et Drake, 2005 ; Morel et al, 2006 ; Paulickova et al, 2006 ; Xu et al, 2007 ; Wu et al, 2007 ; Raessler et al, 2008 ; Arvidsson et al, 2009 ; Raessler et al, 2010 ; Senila et al, 2011]. Ces molécules sont classées dans les grandes catégories de composés constitutifs de la matière sèche de chaque échantillon.



Tableau 44 : Compositions globales et marqueurs principaux des échantillons

| Pomme                 |   |  | Chêne                 |   |  | Herbe                 |   |  |
|-----------------------|---|--|-----------------------|---|--|-----------------------|---|--|
|                       |   |  |                       |   |  |                       |   |  |
| Famille / Biomolécule | Composants majoritaires   | Formule brute  | Famille / Biomolécule | Composants majoritaires                     | Formule brute  | Famille / Biomolécule | Composants majoritaires   | Formule brute  |
| Glucides<br>(≈ 69 %)  | Fructose<br>Glucose<br>Saccharose   | $C_6H_{12}O_6$<br>$C_6H_{12}O_6$<br>$C_{12}H_{22}O_{11}$   | Glucides<br>(≈ 1%)    | Fructose<br>Glucose<br>Saccharose<br>Amidon | $C_6H_{12}O_6$<br>$C_6H_{12}O_6$<br>$C_{12}H_{22}O_{11}$<br>$(C_6H_{10}O_5)_n$ | Glucides<br>(≈ 22 %)  | Glucose<br>Saccharose<br>Amidon<br>Galactose<br>Mannose<br>Xylose                             | $C_6H_{12}O_6$<br>$C_6H_{12}O_6$<br>$(C_6H_{10}O_5)_n$<br>$C_{12}H_{22}O_6$<br>$C_5H_{10}O_5$<br>$C_5H_{10}O_5$            |
| Lipides<br>(≈ 2 %)    | Ac. palmitique<br>Ac. linoléique<br>Ac. stéarique<br>Ac. oléique<br>Ac. linoléique    | $C_{16}:0 (C_{16}H_{32}O_2)$<br>$C_{18}:2 (C_{18}H_{32}O_2)$<br>$C_{18}:0 (C_{18}H_{36}O_2)$<br>$C_{18}:1 (C_{18}H_{34}O_2)$<br>$C_{18}:3 (C_{18}H_{30}O_2)$ | -                     | -   | -  | Lipides<br>(≈ 3 %)    | Ac. palmitique<br>Ac. linoléique<br>Ac. stéarique<br>Ac. oléique<br>Ac. linoléique            | $C_{16}:0$<br>$C_{18}:2$<br>$C_{18}:0$<br>$C_{18}:1$<br>$C_{18}:3$   |
| Protides<br>(≈ 2 %)   | Proline<br>Ac. aspartique<br>Ac. glutamique<br>Leucine<br>Lysine<br>Alanine<br>Sérine | $C_5H_9NO_2$<br>$C_4H_7O_4N$<br>$C_5H_9O_4N$<br>$C_6H_{13}O_2N$<br>$C_6H_{14}O_2N_2$<br>$C_3H_7O_2N$<br>$C_3H_7O_3N$   | -                     | -   | -  | Protides<br>(≈ 14 %)  | Ac. aspartique<br>Ac. glutamique<br>Leucine<br>Alanine<br>Valine<br>Arginine<br>Phénylalanine | $C_4H_7O_4N$<br>$C_5H_9O_4N$<br>$C_6H_{13}O_2N$<br>$C_3H_7O_2N$<br>$C_5H_{11}O_2N$<br>$C_6H_{14}O_2N_4$<br>$C_9H_{11}O_2N$ |
| Fibres<br>(≈ 21 %)    | Pectine   | -  | Fibres<br>(≈ 98%)     | Cellulose<br>Hémicellulose<br>Lignine       | $(C_6H_{10}O_5)_n$<br>-<br>-   | Fibres<br>(≈ 37 %)    | Cellulose<br>Hémicellulose<br>Lignine<br>Inuline  | $(C_6H_{10}O_5)_n$<br>-<br>-<br>-  |

| Pomme                        |  |   | Chêne                       |  |  | Herbe                         |  |   |
|------------------------------|--|---|-----------------------------|--|--|-------------------------------|--|---|
| Famille / Biomolécule        | Composants majoritaires  | Formule brute   | Famille / Biomolécule       | Composants majoritaires  | Formule brute  | Famille / Biomolécule         | Composants majoritaires  | Formule brute   |
| Acides organiques (≈ 4 %)    | Ac. malique<br>Ac. quinique<br>Ac. citrique<br>Ac. succinique<br>Ac. tartrique<br>Ac. shikimique           | C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub><br>C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub><br>C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | -                           | -  | -  | -                             | -  | -   |
| Composés phénoliques (≈ 1 %) | Ac. chlorogénique<br>Epicatechine<br>Coumarine<br>Phloridzine<br>Catéchine<br>Acide caféique<br>Quercétine | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub><br>C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub><br>C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub> | Composés phénoliques (≈ 1%) | Ac. vanillique<br>Ac. syringique                                     | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | Composés phénoliques (≈ 0,5%) | Ac. ferulique<br>Glycérol  | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>  |
| Vitamines (≈ 0,1 %)          | Ac. ascorbique<br>α-tocopherol<br>Niacine  | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>   | -                           | -  | -  | Autres (≈ 24 %)               | Ac. ascorbique   | C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>  |
|                              |  |   | Cellulose (≈ 40%)           | Glucose  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>  | Cellulose (≈ 22 %)            | Glucose  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>   |
|                              |  |   | Hémicellulose (≈ 29%)       | Glucose<br>Galactose<br>Mannose<br>Xylose<br>Arabinose<br>Rhamnose   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub><br>C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> | Hémicellulose (≈ 18 %)        | Glucose<br>Galactose<br>Mannose<br>Xylose<br>Arabinose<br>Rhamnose   | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub><br>C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>  |
|                              |  |   | Lignine (≈ 29%)             | Alcool. p-coumarylique<br>Alcool coniférylique<br>Alcool sinapylique | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>  | Lignine                       | Alcool p-coumarylique<br>Alcool coniférylique<br>Alcool sinapylique<br>p-Hydroxybenzaldehyde<br>Ac. syringique<br>Syringaldéhyde<br>Ac. vanillique<br>Vanilline<br>Acide ferulique | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> |

## B.2. ANALYSE DES MOLECULES CONSTITUTIVES DES ECHANTILLONS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE : DONNEES DE LA LITTERATURE

Afin d'établir une « base de données » pour faciliter l'interprétation des spectres de masse expérimentaux des solvants d'échange labile, les réponses caractéristiques des molécules constitutives des échantillons (pics pseudo-moléculaires et fragments caractéristiques) trouvées dans la littérature [Nielsen et al, 2006 ; Özcan et Senyuva, 2006 ; Gogichaeva et al, 2007 ; Zhang et al, 2007 ; Termentzi et al, 2008 ; Rodriguez-Medina et al, 2009 ; Gomez-Romero et al, 2010 ; Palafox-Carlos et al, 2012 ; Reis et al, 2012 ; De Paepe et al, 2013 ; Morales-Soto et al, 2013] sont répertoriées dans les tableaux 45 et 46.

Tableau 45 : Réponse issue de la littérature des molécules constitutives des échantillons analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation négatif (GALDI : Désorption-Ionisation Laser Assistée par du Graphite ; ESI : ElectroSpray Ionisation ; LTQ : trappe ionique linéaire ; TOF : temps de vol ; Orbitrap : Piège d'ions électrostatique)

| Famille / Biomolécule | Molécule            | Ionisation - Analyseur | m/z   |  |
|-----------------------|---------------------|------------------------|---|--|
| Glucides              | Glucose             | GALDI - LTQ            | 179   | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Saccharose          | GALDI - LTQ            | 341   | [M-H] <sup>-</sup>   |
| Lipides               | Acide palmitique    | GALDI - LTQ            | 255   | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Acide linoléique    | GALDI - LTQ            | 279   | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Acide oléique       | GALDI - LTQ            | 281   | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Acide linoléique    | GALDI - LTQ            | 277   | [M-H] <sup>-</sup>   |
| Protides              | Acide aspartique    | ESI - TOF              | 132,0308  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Acide glutamique    | ESI - TOF              | 146,0466  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       |                     |                        | 128,0368  | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                            |
|                       | Sérine              | ESI - TOF              | 104,0339  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Phénylalanine       | ESI - TOF              | 164,0721  | [M-H] <sup>-</sup>   |
| Acides organiques     | Acide malique       | ESI -TOF               | 133,0144  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       |                     |                        | 115,0030  | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                            |
|                       | Acide quinique      | ESI - TOF              | 191,0567  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       |                     |                        | 173,0444  | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                            |
|                       | Acide citrique      | ESI - TOF              | 191,0195  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       |                     |                        | 173,0092  | [M-H-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>                            |
|                       |                     | 111,0087               | [M-H-CO <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> |  |
|                       | Acide succinique    | ESI - TOF              | 117,0184  | [M-H] <sup>-</sup>   |
| Composés phénoliques  | Acide chlorogénique | ESI - Orbitrap         | 353,0872  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Epicatéchine        | ESI-Orbitrap           | 289,07  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Phloridzine         | ESI - TOF              | 435,1291  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       |                     |                        | 273,0755  | [C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup> |
|                       |                     |                        | 167,0341  | [C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>   |
|                       | Catéchine           | ESI - Orbitrap         | 289,07  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       | Acide caféique      | ESI - TOF              | 179,0341  | [M-H] <sup>-</sup>   |
|                       |                     |                        | 135,0452  | [M-H-CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>                            |
|                       | Quercétine          | ESI - TOF              | 301,0341  | [M-H] <sup>-</sup>   |
| Acide vanillique      | ESI - TOF           | 168                    | [M-H] <sup>-</sup>                                    |  |
| Acide férulique       | ESI - Orbitrap      | 193,05                 | [M-H] <sup>-</sup>                                    |  |
| Vitamines             | Acide ascorbique    | ESI - TOF              | 175,0244  | [M-H] <sup>-</sup>   |

**Tableau 46 :** Réponse issue de la littérature des molécules constitutives des échantillons analysés par spectrométrie de masse en mode d'ionisation positif (ESI : Ionisation par ElectroSpray ; GALDI : Désorption-Ionisation Laser Assistée par du Graphite ; APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique ; MALDI : Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice ; Triple quad : triple quadripôle ; LTQ : trappe ionique linéaire ; TOF : temps de vol ; Quad : quadripôle)

| Famille / Biomolécule | Molécule            | Ionisation - Analyseur  | m/z   |
|-----------------------|---------------------|---|---|
| Glucides              | Glucose             | ESI – Triple quad   | 383 [2M+Na] <sup>+</sup>  |
|                       |                     |   | 203 [M+Na] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 198 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                                 |
|                       | Fructose            | GALDI - LTQ & ESI – Triple quad                                       | 203 [M+Na] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 219 [M+K] <sup>+</sup>  |
|                       |                     |   | 383 [2M+Na] <sup>+</sup>  |
|                       | Saccharose          | GALDI - LTQ & ESI – Triple quad                                       | 198 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>                                 |
|                       |                     |   | 365 [M+Na] <sup>+</sup>   |
| Protides              | Proline             | APCI & MALDI - TOF  | 116 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 70 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                  |
|                       | Acide aspartique    | APCI & MALDI - TOF  | 134 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 116 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                |
|                       |                     |   | 88 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                  |
|                       | Acide glutamique    | APCI & MALDI - TOF  | 148 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 130 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>                                |
|                       |                     |   | 84 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |
|                       | Leucine             | APCI & MALDI - TOF  | 132 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 86 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                  |
|                       | Lysine              | APCI & MALDI - TOF  | 147 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 130 [MH-NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>                                |
|                       |                     |   | 84 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> |
|                       | Alanine             | APCI & MALDI - TOF  | 90 [MH] <sup>+</sup>  |
|                       |                     |   | 44 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>                  |
| Sérine                | APCI & MALDI - TOF  | 106 [MH] <sup>+</sup>   |   |
|                       |                     | 43 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> |   |
|                       |                     | 42 [MH-CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> |   |
| Composés phénoliques  | Acide chlorogénique | ESI - Quad  | 355 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       |                     |   | 377 [M+Na] <sup>+</sup>   |
|                       | Quercétine          | ESI - Quad  | 303 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       | Acide vanillique    | ESI - Quad  | 169 [MH] <sup>+</sup>   |
|                       | Acide syringique    | ESI - Quad  | 199 [MH] <sup>+</sup>   |

### B.3. ECHANGES LABILES : PROCEDURE EXPERIMENTALE

Comme déjà abordé dans le chapitre 1, la procédure expérimentale est basée sur le processus classique utilisé pour réaliser les échanges labiles [Pointurier et al, 2004].

#### B.3.1. Echantillon placé en échange labile

Pour l'extraction du tritium organiquement lié échangeable, l'échantillon est déshydraté par lyophilisation pour éliminer la fraction TFWT préalablement à sa mise en échange labile. Le suivi de cette déshydratation est effectué par pesée et, elle est arrêtée lorsque les masses d'échantillon sont stabilisées [CETAMA, 2013]. Une aliquote sèche de chaque échantillon avant échange labile a été conservée pour les analyses ultérieures.

Il n'existe, a priori, pas de recommandation précise concernant la granulométrie de l'échantillon placé en échange labile. Afin d'optimiser les échanges, la surface de contact entre l'échantillon et le solvant doit être maximisée. L'échantillon doit également être sous une forme permettant une séparation des fractions solides et liquides aisée. Afin de combiner ces deux critères, les échantillons de cette étude ont été coupés finement.

#### B.3.2. Volume de solvant

Le solvant d'échange doit être ajouté en excès afin de favoriser les échanges isotopiques entre les atomes de tritium situés sur les positions dites « échangeables » et les atomes d'hydrogène du solvant, en l'occurrence, l'eau. Il n'existe, a priori, pas de recommandations précises concernant le volume de solvant à introduire, cependant, il doit être suffisant pour immerger l'intégralité de l'échantillon et ainsi entraîner toutes les surfaces de celui-ci dans des situations propices aux échanges isotopiques [Baglan et al, 2010]. Par conséquent, pour des masses équivalentes d'échantillon sec, la quantité de solvant varie en fonction du volume de l'échantillon. De plus, il n'est pas nécessaire d'introduire le solvant à profusion puisqu'il a été montré qu'un volume usuel d'un litre pouvait être divisé par 3 tout en conservant de bonnes capacités d'échange [Le Meignen et al, 2011]. A titre d'illustration, pour des masses d'échantillon sec similaires (environ 15 g), 150 mL de solvant ont été introduits pour les échanges labiles des pommes de terre tandis que 750 mL ont été nécessaires pour immerger les feuilles de chêne.

#### B.3.3. Durée des échanges labiles

Les solvants et les échantillons sont mis en contact dans des béciers en verre recouverts de film pour limiter les pollutions. L'ensemble est placé sous agitation magnétique pour une efficacité

d'échange plus importante. Il a été montré que quelques heures sont suffisantes pour que l'activité tritium organiquement lié totale diminue drastiquement, synonyme d'élimination de la fraction TOL-E, puis qu'elle n'évolue plus pour des durées supérieures à 48 h [Pointurier et al, 2004]. Par conséquent, la durée minimale choisie pour les échanges labiles réalisés dans cette étude est de 48h.

#### B.3.4. Protocole de séparation et traitement des fractions liquides et solides

##### ***B.3.4.1. Séparation des fractions liquides et solides***

Le seuil de filtration choisi dans cette étude (0,45  $\mu\text{m}$ ) correspond au seuil permettant de retenir la phase particulaire ainsi que les plus petits organismes vivants (bactéries) pouvant être présents dans le milieu. Le compartiment dissous isolé peut ainsi rassembler de nombreux composés simples tels que des glucides ou acides organiques mais également des substances plus complexes comme les substances humiques [Petitjean et al, 2004].

En considérant l'aspect physique du milieu « échange labile » en fin d'opération (figure 52), plusieurs étapes ont été introduites afin de parvenir à la distinction précise des fractions liquides et solides.



Figure 52 : Aspect général des béchers en fin d'échange labile. Les échanges réalisés dans l'eau de forage sont au premier plan, ceux réalisés dans les « conditions stomacales » sont à l'arrière-plan. De gauche à droite : blanc, pomme de terre, cèdre, feuilles de chêne, pomme.

Certains fragments d'échantillon peuvent être récupérés manuellement. Cependant, pour séparer les particules en suspension du milieu aqueux, diverses étapes sont nécessaires : la centrifugation a d'abord été utilisée pour isoler les particules en suspension s'étant accumulées sur la paroi sous forme de sédiment. Deux étapes successives de filtration ont ensuite été nécessaires. Afin d'éviter la saturation du filtre à 0,45  $\mu\text{m}$ , chaque solvant d'échange labile a, dans un premier temps été filtré à 8  $\mu\text{m}$  puis, dans un second temps, à 0,45  $\mu\text{m}$ . Les résidus solides présents sur les filtres après la filtration ont été récupérés lorsque cela était possible (figure 53).



Figure 53 : Unité de filtration (8  $\mu\text{m}$ ) de l'eau d'échange labile du cèdre.

#### ***B.3.4.2. Traitement des échantillons solides***

Dans la procédure de détermination des activités tritium organiquement lié non échangeable, la matière solide récupérée après échange labile est déshydratée avant combustion. De la même manière que pour l'étape « extraction de l'eau constitutive de l'échantillon », l'échantillon a été déshydraté par lyophilisation [CETAMA, 2013]. Globalement, le temps de séchage nécessaire pour chaque fraction solide est de 48 à 72 heures.

Pour les déterminations des compositions élémentaires des échantillons, les fractions solides sèches avant et après échange labile sont broyées finement à l'aide d'un robot ménager

## B.4. DONNEES EXPERIMENTALES

Tableau 47 : Données expérimentales relatives aux échanges labiles réalisés dans les conditions « eau de forage » et « stomacales »

| Echantillon       | Série | Conditions    | m <sub>sèche</sub> avant échange labile (g) | m <sub>sèche</sub> après échange labile (g) | Quantité de solvant (g) | Durée de l'échange (h) |
|-------------------|-------|---------------|---|---|-------------------------|------------------------|
| Blanc             | 1     | Eau de forage | -   | -   | 148,52 ± 0,10           | 46h                    |
|                   |       | Stomacales    | -   | -   | 145,15 ± 0,10           | 69h40                  |
| Cèdre             | 1     | Eau de forage | 15,85 ± 0,10                                | 15,53 ± 0,10                                | 238,83 ± 0,10           | 66h                    |
|                   |       | Stomacales    | 15,87 ± 0,10                                | 15,55 ± 0,10                                | 247,45 ± 0,10           | 68h45                  |
| Feuilles de chêne | 1     | Eau de forage | 15,22 ± 0,10                                | 12,48 ± 0,10                                | 737,79 ± 0,20           | 65h30                  |
|                   |       | Stomacales    | 15,17 ± 0,10                                | 13,09 ± 0,10                                | 742,23 ± 0,20           | 71h05                  |
| Pommes            | 1     | Eau de forage | 15,41 ± 0,10                                | 8,75 ± 0,10                                 | 241,57 ± 0,10           | 64h                    |
|                   |       | Stomacales    | 15,58 ± 0,10                                | 9,2 ± 0,10                                  | 246,58 ± 0,10           | 70h25                  |
| Pommes de terre   | 1     | Eau de forage | 16,77 ± 0,10                                | 12,13 ± 0,10                                | 146,82 ± 0,10           | 45h45                  |
|                   |       | Stomacales    | 15,65 ± 0,10                                | 6,59 ± 0,10                                 | 148,47 ± 0,10           | 50h15                  |
| Blanc             | 2     | Eau de forage | -   | -   | 147,82 ± 0,10           | 65h20                  |
|                   |       | Stomacales    | -   | -   | 147,80 ± 0,10           | 72h10                  |
| Carottes          | 2     | Eau de forage | 15,69 ± 0,10                                | 9,32 ± 0,10                                 | 148,05 ± 0,10           | 46h30                  |
|                   |       | Stomacales    | 16,41 ± 0,10                                | 11,12 ± 0,10                                | 148,53 ± 0,10           | 69h50                  |
| Chêne             | 2     | Eau de forage | 13,88 ± 0,10                                | 9,34 ± 0,10                                 | 147,78 ± 0,10           | 46h                    |
|                   |       | Stomacales    | 14,50 ± 0,10                                | 14,17 ± 0,10                                | 146,34 ± 0,10           | 66h                    |
| Herbe             | 2     | Eau de forage | 11,79 ± 0,10                                | 8,81 ± 0,10                                 | 742,18 ± 0,20           | 64h20                  |
|                   |       | Stomacales    | 11,56 ± 0,10                                | 8,80 ± 0,10                                 | 742,40 ± 0,20           | 70h50                  |
| Blanc de poireau  | 2     | Eau de forage | 15,93 ± 0,10                                | 10,01 ± 0,10                                | 248,27 ± 0,10           | 47h05                  |
|                   |       | Stomacales    | 15,33 ± 0,10                                | 10,32 ± 0,10                                | 246,28 ± 0,10           | 70h30                  |
| Vert de poireau   | 2     | Eau de forage | 14,35 ± 0,10                                | 8,71 ± 0,10                                 | 494,06 ± 0,10           | 47h50                  |
|                   |       | Stomacales    | 14,33 ± 0,10                                | 9,71 ± 0,10                                 | 504,77 ± 0,20           | 69h45                  |

## ANNEXE C : RESULTATS COMPLEMENTAIRES

### C.1. QUALIFICATION DE L'ANALYSEUR ELEMENTAIRE : COMPARAISON DES DROITES D'ETALONNAGE SIMPLES ET DE LA DROITE D'ETALONNAGE MIXTE POUR LES ELEMENTS C, N, S ET O

Les paramètres répertoriés dans les tableaux 48 à 51 pour les éléments C, N, S et O respectivement ont été déterminés suivant la procédure décrite dans le chapitre 2.

**Tableau 48** : Paramètres calculés pour la comparaison des droites d'étalonnage, du **carbone**, simples et mixte

| Source de variation  | Somme de carrés       | Degrés de liberté | $F_{calc}$ | $F_{tab}$ |
|--|-----------------------|-------------------|------------|-----------|
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour des droites $i$                    | $Q = 1,15E+10$        | $v = 25$          |            |           |
| Fluctuation des droites $i$ par rapport à la droite commune ( $F^{conf}$ ) | $Q_c = 1,04E+09$      | $v_c = 8$         | 0,28       | 2,34      |
| Dispersion des pentes des $n$ droites ( $F^p$ )                            | $Q_p = 9,09E+08$      | $v_p = 4$         | 0,49       | 2,76      |
| Dispersion des points moyens autour de la droite moyenne ( $F^{pm}$ )      | $Q_{pm} = 1,21E+08$   | $v_{pm} = 3$      | 0,09       | 2,99      |
| Ecart entre les pentes commune et moyenne ( $F^{c-pm}$ )                   | $Q_{c-pm} = 1,07E+07$ | $v_{c-pm} = 1$    | 0,02       | 4,24      |
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour de la droite commune               | $Q_T = 1,26E+10$      | $v_T = 33$        |            |           |

Avec  $F_{calc}^{conf} < F_{tab}^{conf}$ , l'hypothèse nulle de départ « les  $n$  droites d'étalonnage sont confondues avec la droite commune » est vérifiée. Par conséquent, il est possible d'admettre au risque  $\alpha$  choisi ( $\alpha = 0,05$ ) que toutes les droites d'étalonnage sont confondues. La décomposition du test d'hypothèses en plusieurs hypothèses nulles élémentaires n'est pas nécessaire mais les données sont reportées à titre indicatif.

**Tableau 49** : Paramètres calculés pour la comparaison des droites d'étalonnage, de l'**azote**, simples et mixte

| Source de variation  | Somme de carrés       | Degrés de liberté | $F_{calc}$ | $F_{tab}$ |
|--|-----------------------|-------------------|------------|-----------|
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour des droites $i$                    | $Q = 5,99E+08$        | $v = 20^*$        |            |           |
| Fluctuation des droites $i$ par rapport à la droite commune ( $F^{conf}$ ) | $Q_c = 2,39E+08$      | $v_c = 6$         | 1,33       | 2,60      |
| Dispersion des pentes des $n$ droites ( $F^p$ )                            | $Q_p = 7,21E+07$      | $v_p = 3$         | 0,80       | 3,10      |
| Dispersion des points moyens autour de la droite moyenne ( $F^{pm}$ )      | $Q_{pm} = 4,04E+07$   | $v_{pm} = 2$      | 0,68       | 3,49      |
| Ecart entre les pentes commune et moyenne ( $F^{c-pm}$ )                   | $Q_{c-pm} = 1,27E+08$ | $v_{c-pm} = 1$    | 4,23       | 4,35      |
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour de la droite commune               | $Q_T = 8,38E+08$      | $v_T = 26$        |            |           |

\*La droite d'étalonnage BBOT n'est pas prise en compte dans les calculs car la part de variance liée à cette droite est beaucoup plus importante que les autres, entraînant une inhomogénéité des variances,

Avec  $F_{calc}^{conf} < F_{tab}^{conf}$ , l'hypothèse nulle de départ « les  $n$  droites d'étalonnage sont confondues avec la droite commune » est vérifiée. Par conséquent, il est possible d'admettre au risque  $\alpha$  choisi ( $\alpha =$

0,05) que toutes les droites d'étalonnage sont confondues. La décomposition du test d'hypothèses en plusieurs hypothèses nulles élémentaires n'est pas nécessaire mais les données sont reportées à titre indicatif.

Tableau 50 : Paramètres calculés pour la comparaison des droites d'étalonnage, du **soufre**, simples et mixte

| Source de variation  | Somme de carrés       | Degrés de liberté | $F_{calc}$ | $F_{tab}$ |
|--|-----------------------|-------------------|------------|-----------|
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour des droites $i$                    | $Q = 2,65E+08$        | $v = 20$          |            |           |
| Fluctuation des droites $i$ par rapport à la droite commune ( $F^{conf}$ ) | $Q_c = 2,65E+08$      | $v_c = 6$         | 3,33       | 2,60      |
| Dispersion des pentes des $n$ droites ( $F^p$ )                            | $Q_p = 1,53E+08$      | $v_p = 3$         | 3,85       | 3,10      |
| Dispersion des points moyens autour de la droite moyenne ( $F^{pm}$ )      | $Q_{pm} = 4,16E+07$   | $v_{pm} = 2$      | 1,57       | 3,49      |
| Ecart entre les pentes commune et moyenne ( $F^{c-pm}$ )                   | $Q_{c-pm} = 7,03E+07$ | $v_{c-pm} = 1$    | 5,29       | 4,35      |
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour de la droite commune               | $Q_T = 5,31E+08$      | $v_T = 26$        |            |           |

\*La droite d'étalonnage cystine n'est pas prise en compte dans les calculs car la part de variance liée à cette droite est beaucoup plus importante que les autres, entraînant une inhomogénéité des variances,

$F_{calc}^{conf}$  étant supérieur à la valeur critique, l'hypothèse nulle de départ « les  $n$  droites d'étalonnage sont confondues avec la droite commune » n'est pas vérifiée. De ce fait, les tests complémentaires ont été réalisés pour déterminer l'origine de la divergence. A l'exception de l'hypothèse « les points moyens ( $\overline{m_{x_i}}; \overline{A_i}$ ) sont alignés », toutes les hypothèses nulles sont invalidées. Les droites d'étalonnage réalisées avec des matériaux de référence certifiés ainsi que la droite mixte sont différentes. Ceci signifie que, pour une même masse d'élément injectée, la réponse de l'analyseur est différente en fonction de l'échantillon considéré. Ce résultat est cependant obtenu avant que l'optimisation du ratio quantité d'échantillon/quantité de catalyseur ne soit effectuée. De ce fait, les conditions de répétabilité n'étant pas établies, les données concernant le soufre sont juste estimées et données à titre indicatif.

Tableau 51 : Paramètres calculés pour la comparaison des droites d'étalonnage, de l'**oxygène**, simples et mixte

| Source de variation  | Somme de carrés       | Degrés de liberté | $F_{calc}$ | $F_{tab}$ |
|--|-----------------------|-------------------|------------|-----------|
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour des droites $i$                    | $Q = 8,18E+08$        | $v = 25$          |            |           |
| Fluctuation des droites $i$ par rapport à la droite commune ( $F^{conf}$ ) | $Q_c = 1,58E+09$      | $v_c = 8$         | 6,05       | 2,34      |
| Dispersion des pentes des $n$ droites ( $F^p$ )                            | $Q_p = 4,97E+08$      | $v_p = 4$         | 3,79       | 2,76      |
| Dispersion des points moyens autour de la droite moyenne ( $F^{pm}$ )      | $Q_{pm} = 8,49E+08$   | $v_{pm} = 3$      | 8,65       | 2,99      |
| Ecart entre les pentes commune et moyenne ( $F^{c-pm}$ )                   | $Q_{c-pm} = 2,38E+08$ | $v_{c-pm} = 1$    | 7,27       | 4,24      |
| Fluctuation des valeurs $A_{ij}$ autour de la droite commune               | $Q_T = 2,40E+09$      | $v_T = 33$        |            |           |

$F_{calc}^{conf}$  étant supérieur à la valeur critique, l'hypothèse nulle de départ « les  $n$  droites d'étalonnage sont confondues avec la droite commune » n'est pas vérifiée. De ce fait, les tests complémentaires ont été réalisés pour déterminer l'origine de la divergence. Toutes les hypothèses nulles sont

invalidées. Les droites d'étalonnage réalisées avec des matériaux de référence certifiés ainsi que la droite mixte sont différentes. Ceci signifie que, pour une même masse d'élément injectée, la réponse de l'analyseur est différente en fonction de l'échantillon considéré. Ce résultat est cependant obtenu avant que l'optimisation du nombre d'analyses à réaliser avant la saturation du piège à eau ne soit effectuée.

## C.2. TENEURS EN CARBONE ET AZOTE DES MATERIAUX DE REFERENCE CERTIFIES DETERMINEES AVEC LES ETALONNAGES SIMPLES ET MIXTES

**Tableau 52** : Teneurs en carbone des matériaux de référence certifiés déterminées avec chacun des 5 étalonnages testés (k=2)

| Echantillon |  | Etalonnage   |              |               |              |              |
|-------------|--|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
|             |  | Mixte        | BBOT         | Sulfanilamide | Méthionine   | Cystine      |
| Echantillon | BBOT<br>$x_{C\text{-certifié}} = (72,53 \pm 0,54) \%$          | 72,84 ± 1,33 | 72,74 ± 1,93 | 72,71 ± 1,62  | 72,43 ± 1,20 | 72,71 ± 1,18 |
|             | Sulfanilamide<br>$x_{C\text{-certifié}} = (41,84 \pm 0,48) \%$ | 41,91 ± 0,79 | 41,88 ± 1,38 | 41,85 ± 1,08  | 41,81 ± 0,70 | 41,86 ± 0,64 |
|             | Méthionine<br>$x_{C\text{-certifié}} = (40,25 \pm 0,68) \%$    | 40,35 ± 1,09 | 40,38 ± 2,01 | 40,33 ± 1,55  | 40,49 ± 0,83 | 40,35 ± 0,83 |
|             | Cystine<br>$x_{C\text{-certifié}} = (29,99 \pm 0,56) \%$       | 29,83 ± 1,07 | 29,92 ± 2,15 | 29,85 ± 1,64  | 30,18 ± 0,81 | 29,89 ± 0,79 |

Il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les échantillons avec les 5 droites d'étalonnage testées. De plus, le test de l'écart normalisé ( $E_n$ ) utilisé pour comparer les moyennes expérimentales aux valeurs certifiées valide à chaque fois l'égalité des valeurs ( $E_n < 1$ ).

**Tableau 53** : Teneurs en azote des matériaux de référence certifiés déterminées avec chacun des 5 étalonnages testés (k=2)

| Echantillon |  | Calibration  |              |               |              |              |
|-------------|--|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
|             |  | Mixte        | BBOT         | Sulfanilamide | Méthionine   | Cystine      |
| Echantillon | BBOT<br>$x_{N\text{-certifié}} = (6,51 \pm 0,06) \%$           | 6,41 ± 0,50  | 6,43 ± 0,29  | 6,91 ± 1,24   | 6,57 ± 0,49  | 6,52 ± 0,58  |
|             | Sulfanilamide<br>$x_{N\text{-certifié}} = (16,27 \pm 0,50) \%$ | 15,95 ± 0,42 | 15,78 ± 0,26 | 16,20 ± 0,89  | 15,86 ± 0,49 | 16,09 ± 0,44 |
|             | Méthionine<br>$x_{N\text{-certifié}} = (9,39 \pm 0,11) \%$     | 9,31 ± 0,65  | 9,29 ± 0,47  | 9,81 ± 1,36   | 9,43 ± 0,63  | 9,44 ± 0,63  |
|             | Cystine<br>$x_{N\text{-certifié}} = (11,66 \pm 0,13) \%$       | 11,60 ± 0,49 | 11,55 ± 0,21 | 12,10 ± 1,33  | 11,69 ± 0,49 | 11,74 ± 0,58 |

Il n'y a pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les échantillons avec les 5 droites d'étalonnage testées. De plus, le test de l'écart normalisé ( $E_n$ ) utilisé pour comparer les moyennes expérimentales aux valeurs certifiées valide à chaque fois l'égalité des valeurs ( $E_n < 1$ ).

### C.3. DETERMINATION DES FRACTIONS D'ÉCHANTILLON ET DE CARBONE SOLUBILISÉES LORS DES ÉCHANGES LABILES RÉALISÉS DANS LES CONDITIONS « STOMACALES »

Dans les conditions « stomacales », plus agressives (pH 1) que les conditions « eau de forage », une solubilisation de matière plus importante, et donc une quantité d'échantillon récupérée après l'échange labile plus faible devraient être observées par rapport aux conditions « eau de forage ». Les fractions d'échantillon solubilisées sont déterminées par la différence de masse entre les fractions solides récupérées avant et après échanges labiles.

**Tableau 54** : Estimation par différence de masse de la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile réalisé dans les conditions « stomacales »

|                   | m <sub>sec-avant échange</sub> (g) |        | m <sub>sec-après échange</sub> (g) |        | m <sub>ech-solubilisé</sub> (g) |        | échantillon solubilisé (%) |       |
|-------------------|------------------------------------|--------|------------------------------------|--------|---------------------------------|--------|----------------------------|-------|
| Cèdre             | 15,87                              | ± 0,10 | 15,55                              | ± 0,10 | 0,32                            | ± 0,03 | 2,0                        | ± 0,2 |
| Feuilles de chêne | 15,17                              | ± 0,10 | 12,93                              | ± 0,10 | 2,24                            | ± 0,22 | 15                         | ± 2   |
| Pommes            | 15,58                              | ± 0,10 | 9,2                                | ± 0,10 | 6,38                            | ± 0,64 | 41                         | ± 4   |
| Pommes de terre   | 15,65                              | ± 0,10 | 6,59                               | ± 0,10 | 9,06                            | ± 0,91 | 58                         | ± 6   |
| Chêne             | 14,50                              | ± 0,10 | 13,72                              | ± 0,10 | 0,78                            | ± 0,03 | 5                          | ± 1   |
| Vert de poireau   | 14,33                              | ± 0,10 | 9,71                               | ± 0,10 | 4,62                            | ± 0,46 | 32                         | ± 3   |
| Blanc de poireau  | 15,33                              | ± 0,10 | 10,32                              | ± 0,10 | 5,01                            | ± 0,50 | 33                         | ± 3   |
| Herbe             | 11,56                              | ± 0,10 | 8,80                               | ± 0,10 | 2,76                            | ± 0,28 | 24                         | ± 2   |
| Carotte           | 16,41                              | ± 0,10 | 11,12                              | ± 0,10 | 5,29                            | ± 0,53 | 32                         | ± 3   |

Les fractions de carbone solubilisées sont déterminées à partir des mesures de carbone organique total réalisées sur les solvants d'échange labile et des teneurs en carbone des échantillons (chapitre 4).

**Tableau 55** : Concentrations nettes en carbone total, carbone inorganique et carbone organique des solvants d'échange labile dans les conditions « stomacales »

| Echantillon       | Série | [TC] (mg/L)<br>(k=2) | [IC] (mg/L)<br>(k=2) | [OC] (mg/L)<br>(k=2) |
|-------------------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Blanc             | 1     | 2 ± 1                | <LQ                  | 2 ± 1                |
| Cèdre             | 1     | 1 350 ± 35           | <LQ                  | 1 350 ± 35           |
| Feuilles de chêne | 1     | 2 251 ± 65           | <LQ                  | 2 251 ± 65           |
| Pommes            | 1     | 17 880 ± 874         | <LQ                  | 17 880 ± 874         |
| Pommes de terre   | 1     | 7 449 ± 533          | <LQ                  | 7 449 ± 533          |
| Blanc             | 2     | 2 ± 1                | <LQ                  | 2 ± 1                |
| Chêne             | 2     | 1 723 ± 55           | <LQ                  | 1 723 ± 55           |
| Vert de poireau   | 2     | 5 030 ± 643          | <LQ                  | 5 030 ± 643          |
| Blanc de poireau  | 2     | 17 033 ± 1 076       | <LQ                  | 17 033 ± 1 076       |
| Herbe             | 2     | 1 463 ± 32           | <LQ                  | 1 463 ± 32           |
| Carottes          | 2     | 25 820 ± 1 281       | <LQ                  | 25 820 ± 1 281       |

Les teneurs en carbone déterminées dans le chapitre 4 sont utilisées pour estimer la fraction de carbone solubilisée lors des échanges labiles.

**Tableau 56** : Corrélation des résultats COT et AE pour la détermination de la fraction d'échantillon solubilisée au cours de l'échange labile réalisé dans les conditions « stomacales »

|                   | [COT]<br>(mg/g <sub>solvant</sub> ) | m <sub>C-solubilisé</sub><br>(mg) | m <sub>C-échantillon</sub><br>(mg) | % C <sub>solubilisé</sub> |
|-------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Cèdre             | 1,35 ± 0,03                         | 334 ± 9                           | 8 102 ± 100                        | 4,1 ± 0,4                 |
| Feuilles de chêne | 2,25 ± 0,06                         | 1 671 ± 48                        | 7 088 ± 88                         | 24 ± 2                    |
| Pommes            | 17,88 ± 0,87                        | 4 409 ± 216                       | 6 206 ± 77                         | 71 ± 8                    |
| Pommes de terre   | 7,45 ± 0,53                         | 1 106 ± 79                        | 6 388 ± 79                         | 17 ± 2                    |
| Chêne             | 1,72 ± 0,06                         | 252 ± 8                           | 6 877 ± 87                         | 3,7 ± 0,4                 |
| Vert de poireau   | 5,03 ± 0,64                         | 2 539 ± 325                       | 5 874 ± 75                         | 43 ± 7                    |
| Blanc de poireau  | 17,03 ± 1,08                        | 4 195 ± 265                       | 6 240 ± 78                         | 67 ± 8                    |
| Herbe             | 1,46 ± 0,03                         | 1 086 ± 23                        | 4 835 ± 66                         | 22 ± 2                    |
| Carotte           | 25,82 ± 1,28                        | 3 835 ± 190                       | 6 547 ± 80                         | 59 ± 7                    |

Les taux de solubilisation de composés (échantillon et fraction de carbone) dans les conditions « stomacales » sont comparés à ceux des conditions « eau de forage » (tableau 57) afin d'évaluer la pertinence de l'hypothèse d'une solubilisation préférentielle dans les conditions « stomacales ».

**Tableau 57** : Comparaison des fractions d'échantillon et de carbone solubilisées lors des échanges labiles réalisés dans les conditions « eau de forage » et « stomacales ». La fraction d'échantillon solubilisée est déterminée par la différence entre la masse sèche récupérée avant échange labile et la masse sèche après échange labile. La fraction de carbone solubilisée est déterminée à partir des mesures de carbone organique total et d'analyse élémentaire.

|                   | Fraction d'échantillon solubilisée (%) |                           | Fraction de carbone solubilisée (%) |                           |
|-------------------|--|---------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
|                   | Conditions « eau de forage »           | Conditions « stomacales » | Conditions « eau de forage »        | Conditions « stomacales » |
| Cèdre             | 2,0 ± 0,2                              | 2,0 ± 0,2                 | 3,9 ± 0,4                           | 4,1 ± 0,4                 |
| Feuilles de chêne | 19 ± 2                                 | 15 ± 2                    | 21 ± 2                              | 24 ± 2                    |
| Pommes            | 43 ± 4                                 | 41 ± 4                    | 64 ± 7                              | 71 ± 8                    |
| Pommes de terre   | 28 ± 3                                 | 58 ± 6                    | 17 ± 2                              | 17 ± 2                    |
| Chêne             | 5 ± 1                                  | 5 ± 1                     | 3,6 ± 0,4                           | 3,7 ± 0,4                 |
| Vert de poireau   | 39 ± 4                                 | 32 ± 3                    | 32 ± 3                              | 43 ± 7                    |
| Blanc de poireau  | 37 ± 4                                 | 33 ± 3                    | 60 ± 7                              | 67 ± 8                    |
| Herbe             | 25 ± 3                                 | 24 ± 2                    | 14 ± 2                              | 22 ± 2                    |
| Carotte           | 38 ± 4                                 | 32 ± 3                    | 58 ± 7                              | 59 ± 7                    |

A quelques exceptions près (pomme de terre notamment), les fractions d'échantillon et de carbone solubilisées lors des échanges labiles réalisés dans les conditions « eau de forage » et « stomacales » sont similaires, aux incertitudes près. De ce fait, une différence significative entre les différentes conditions n'est pas mise en évidence.

Cependant, en considérant « l'état » de l'échantillon récupéré après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (figure 30, chapitre 5), ces dernières doivent entraîner une dégradation de la matière organique, la réduisant à des fragments de matrices solides, récupérables avec un seuil de filtration de 0,45 µm usuel pour la séparation des fractions dissoutes et particulaires.

La pomme de terre est le seul échantillon pour lequel une différence de solubilisation après échange labile dans les conditions « stomacales » est mise en évidence (58 % d'échantillon solubilisé). La pomme de terre est un produit amylicé dont la matière sèche est composée d'amidon (16 %). Dans les conditions « stomacales », l'hydrolyse acide de l'amidon, et sa dissociation en oses simples, peuvent conduire à une solubilisation de matière plus importante. Cependant, les quantités de carbone solubilisées étant similaires, cette hypothèse impliquerait une solubilisation plus massive de composés à fortes teneurs en hétéroatomes.

Les résultats expérimentaux montrent que, pour la majorité des échantillons, les quantités de carbone solubilisées lors des échanges labiles sont indépendantes des conditions expérimentales considérées, mais que la quantité de matière solubilisée est fonction de la composition de l'échantillon.

#### C.4. COMPARAISON DES COMPOSITIONS ELEMENTAIRES DES ECHANTILLONS « NON-CIBLES » AVANT ET APRES ECHANGE LABILE

L'évolution des compositions élémentaires des échantillons, pour les deux conditions « eau de forage » et « stomacales » testées, est décrite dans les tableaux 58 à 62 pour les éléments C, H, N, O et S respectivement. Les critères de comparaison utilisés ont été définis précédemment (chapitre 2).

**Tableau 58** : Comparaison des teneurs en carbone des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

|                   | Conditions | % C avant échange labile | % C après échange labile | statistique          | S   |
|-------------------|------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Cèdre             | ST         | $m_1 = 51,05 \pm 0,96$   | $m_3 = 50,50 \pm 0,96$   | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 50,27 \pm 0,96$   | moyennes différentes | oui |
| Feuilles de chêne | ST         | $m_1 = 46,73 \pm 0,88$   | $m_3 = 49,22 \pm 0,93$   | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 48,42 \pm 0,91$   | moyennes différentes | oui |
| Pommes de terre   | ST         | $m_1 = 40,82 \pm 0,77$   | $m_3 = 40,86 \pm 0,77$   | $m_1 = m_3$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 41,39 \pm 0,78$   | $m_1 = m_2$          | oui |
| Vert de poireau   | ST         | $m_1 = 40,99 \pm 0,77$   | $m_3 = 42,92 \pm 0,81$   | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 44,27 \pm 0,84$   | moyennes différentes | non |
| Blanc de poireau  | ST         | $m_1 = 40,70 \pm 0,77$   | $m_3 = 42,37 \pm 0,80$   | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 41,82 \pm 0,79$   | moyennes différentes | oui |
| Carotte           | ST         | $m_1 = 39,90 \pm 0,75$   | $m_3 = 39,38 \pm 0,74$   | $m_1 = m_3$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 40,63 \pm 0,77$   | moyennes différentes | oui |

**Tableau 59** : Comparaison des teneurs en hydrogène des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

|                   | Conditions | % H avant échange labile | % H après échange labile | statistique          | S   |
|-------------------|------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Cèdre             | ST         | $m_1 = 6,09 \pm 0,21$    | $m_3 = 6,08 \pm 0,21$    | $m_1 = m_2$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 6,03 \pm 0,21$    | $m_1 = m_2$          | oui |
| Feuilles de chêne | ST         | $m_1 = 5,89 \pm 0,21$    | $m_3 = 6,07 \pm 0,21$    | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 5,98 \pm 0,21$    | moyennes différentes | oui |
| Pommes de terre   | ST         | $m_1 = 6,15 \pm 0,22$    | $m_3 = 6,27 \pm 0,22$    | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 6,20 \pm 0,22$    | $m_1 = m_2$          | oui |
| Vert de poireau   | ST         | $m_1 = 5,82 \pm 0,20$    | $m_3 = 5,95 \pm 0,21$    | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 6,21 \pm 0,22$    | moyennes différentes | oui |
| Blanc de poireau  | ST         | $m_1 = 6,04 \pm 0,21$    | $m_3 = 5,57 \pm 0,20$    | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 6,13 \pm 0,22$    | moyennes différentes | oui |
| Carotte           | ST         | $m_1 = 6,18 \pm 0,22$    | $m_3 = 6,19 \pm 0,22$    | $m_1 = m_3$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 6,29 \pm 0,22$    | moyennes différentes | oui |

**Tableau 60** : Comparaison des teneurs en azote des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

|                   | Conditions | % N avant échange labile | % N après échange labile | statistique          | S   |
|-------------------|------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Cèdre             | ST         | $m_1 = 0,064 \pm 0,004$  | $m_3 = 0,058 \pm 0,003$  | $m_1 = m_2$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 0,061 \pm 0,004$  | $m_1 = m_2$          | oui |
| Feuilles de chêne | ST         | $m_1 = 2,84 \pm 0,17$    | $m_3 = 3,27 \pm 0,19$    | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 3,89 \pm 0,23$    | moyennes différentes | non |
| Pommes de terre   | ST         | $m_1 = 1,81 \pm 0,11$    | $m_3 = 0,67 \pm 0,04$    | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 1,26 \pm 0,07$    | $m_1 = m_2$          | non |
| Vert de poireau   | ST         | $m_1 = 2,87 \pm 0,17$    | $m_3 = 3,04 \pm 0,18$    | $m_1 = m_3$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 3,20 \pm 0,19$    | moyennes différentes | oui |
| Blanc de poireau  | ST         | $m_1 = 1,90 \pm 0,11$    | $m_3 = 2,43 \pm 0,14$    | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 2,34 \pm 0,14$    | moyennes différentes | non |
| Carotte           | ST         | $m_1 = 0,91 \pm 0,05$    | $m_3 = 0,98 \pm 0,06$    | $m_1 = m_3$          | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 1,03 \pm 0,06$    | $m_1 = m_2$          | oui |

**Tableau 61** : Comparaison des teneurs en oxygène des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

|                   | Conditions | % O avant échange labile | % O après échange labile | statistique          | S   |
|-------------------|------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|-----|
| Cèdre             | ST         | $m_1 = 40,07 \pm 1,95$   | $m_3 = 40,80 \pm 1,98$   | $m_1 = m_2^*$        | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 40,83 \pm 1,99$   | moyennes différentes | oui |
| Feuilles de chêne | ST         | $m_1 = 37,87 \pm 1,84$   | $m_3 = 34,87 \pm 1,70$   | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 34,82 \pm 1,69$   | moyennes différentes | oui |
| Pommes de terre   | ST         | $m_1 = 45,90 \pm 2,23$   | $m_3 = 46,99 \pm 2,29$   | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 46,88 \pm 2,28$   | $m_1 = m_2$          | oui |
| Vert de poireau   | ST         | $m_1 = 37,79 \pm 1,84$   | $m_3 = 33,49 \pm 1,63$   | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 34,70 \pm 1,69$   | moyennes différentes | oui |
| Blanc de poireau  | ST         | $m_1 = 44,95 \pm 2,19$   | $m_3 = 37,09 \pm 1,80$   | moyennes différentes | non |
|                   | F          |                          | $m_2 = 43,96 \pm 2,14$   | moyennes différentes | oui |
| Carotte           | ST         | $m_1 = 47,54 \pm 2,31$   | $m_3 = 43,65 \pm 2,12$   | moyennes différentes | oui |
|                   | F          |                          | $m_2 = 45,69 \pm 2,22$   | moyennes différentes | oui |

\* Pour cet échantillon, le test de STUDENT n'a pas pu être utilisé à cause de la non-validation de l'homoscédasticité. Par conséquent, un test non-paramétrique de comparaison des moyennes a été utilisé (test d'ASPIN-WELCH)

**Tableau 62** : Comparaison des teneurs en soufre des échantillons avant et après échange labile en utilisant les critères définis dans le chapitre 2 : test de STUDENT (statistique) et recouvrement des intervalles de confiance définis par rapport à la variabilité de l'outil déterminée dans le chapitre 3 (k=2). 1 fait référence à la population avant échange labile, 2 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « eau de forage » (F) et 3 à la population après échange labile réalisé dans les conditions « stomacales » (ST).

|                   | Conditions | % S avant échange labile | % S après échange labile                       | statistique                                  | S          |
|-------------------|------------|--------------------------|--|--|------------|
| Cèdre             | ST<br>F    | n.d                      | n.d  | n.d  | n.d        |
| Feuilles de chêne | ST<br>F    | $m_1 = 0,38 \pm 0,02$    | $m_3 = 0,38 \pm 0,02$<br>$m_2 = 0,41 \pm 0,03$ | $m_1 = m_2^*$<br>moyennes différentes        | oui<br>oui |
| Pommes de terre   | ST<br>F    | n.d                      | n.d  | n.d  | n.d        |
| Vert de poireau   | ST<br>F    | $m_1 = 0,71 \pm 0,05$    | $m_3 = 0,51 \pm 0,03$<br>$m_2 = 0,55 \pm 0,04$ | moyennes différentes<br>moyennes différentes | non<br>non |
| Blanc de poireau  | ST<br>F    | $m_1 = 0,56 \pm 0,04$    | $m_3 = 0,54 \pm 0,04$<br>$m_2 = 0,54 \pm 0,03$ | $m_1 = m_3$<br>$m_1 = m_2$                   | oui<br>oui |
| Carotte           | ST<br>F    | n.d                      | n.d  | n.d  | n.d        |

\* Pour cet échantillon, le test de STUDENT n'a pas pu être utilisé à cause de la non-validation de l'homoscédasticité. Par conséquent, un test non-paramétrique de comparaison des moyennes a été utilisé (test d'ASPIN-WELCH)

## C.5. EVOLUTION DES COMPOSITIONS ELEMENTAIRES DES ECHANTILLONS

En fonction des conclusions statistiques et du recouvrement des intervalles de confiance définis par la variabilité de l'analyseur élémentaire, des tendances concernant l'évolution des compositions des matrices étudiées avant et après échange labile se dégagent (tableau 63 et 64). L'évolution des compositions élémentaires des fractions solides dans les conditions « eau de forage » est identique pour la plupart des échantillons. De ce fait, seuls ceux pour lesquels une différence est constatée sont répertoriés dans le tableau 64.

**Tableau 63** : Evolution des compositions des échantillons après échange labile, conditions « stomacales ».

= : les teneurs avant et après échange labile sont invariantes ; + et - : les teneurs relatives des éléments après échange labile des échantillons solides sont respectivement plus et moins importantes que les teneurs relatives avant échange labile ; n.d : élément non détecté.

|                   | C | H | N | S   | O |
|-------------------|---|---|---|-----|---|
| Cèdre             | = | = | = | n.d | = |
| Feuilles de chêne | + | = | + | =   | - |
| Pommes            | + | - | + | n.d | - |
| Pommes de terre*  | = | = | - | n.d | = |
| Chêne             | = | = | - | n.d | = |
| Vert de poireau   | + | = | = | -   | - |
| Blanc de poireau  | + | - | + | =   | - |
| Herbe             | + | + | - | n.d | = |
| Carotte           | = | = | = | n.d | = |

\* Pour cet échantillon, la diminution de l'azote ne semble pas compensée par l'augmentation relative d'un autre élément. Cependant, les teneurs en oxygène mesurées après échange labile sont supérieures à celles mesurées avant échange labile (annexe C.4.). L'écart n'est pas suffisant pour être distingué à l'aide des critères mis en place, notamment à cause de l'incertitude attribuée à l'oxygène. De ce fait, l'oxygène est probablement le facteur compensant cette évolution.

**Tableau 64** : Evolution des compositions des échantillons après échange labile, conditions « eau de forage ».

= : les teneurs avant et après échange labile sont invariantes ; + et - : les teneurs relatives des éléments après échange labile des échantillons solides sont respectivement plus et moins importantes que les teneurs relatives avant échange labile ; n.d : élément non détecté.

|                   | C | H | N | S   | O |
|-------------------|---|---|---|-----|---|
| Pommes*           | + | = | = | n.d | = |
| Chêne             | = | = | = | n.d | = |
| Vert de poireau   | + | + | + | -   | - |
| Blanc de poireau* | + | = | + | =   | = |

\* Pour ces échantillons, l'évolution de l'un (ou de plusieurs) des éléments ne semble pas compensée par l'évolution relative inverse d'un autre élément. Cependant, les teneurs en oxygène mesurées après échange labile évoluent systématiquement dans le sens contraire, même si l'écart n'est pas suffisant pour être distingué à l'aide des critères mis en place, notamment à cause de l'incertitude attribuée à cet élément. Par conséquent, l'oxygène peut être le facteur qui compense ces tendances.

## C.6. SPECTRES D'ABSORPTION UV-VISIBLE DES SOLVANTS D'ÉCHANGE LABILE DES ÉCHANTILLONS

« NON-CIBLES »

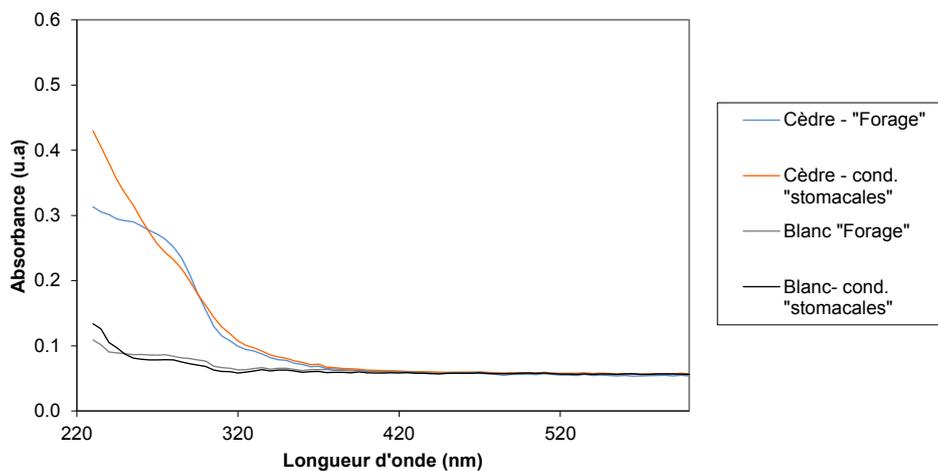


Figure 54 : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile du cèdre

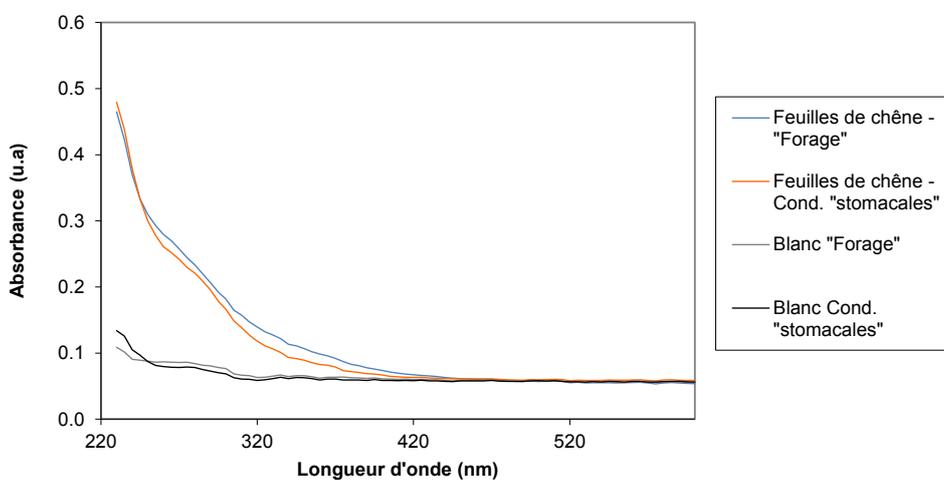


Figure 55 : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile des feuilles de chêne

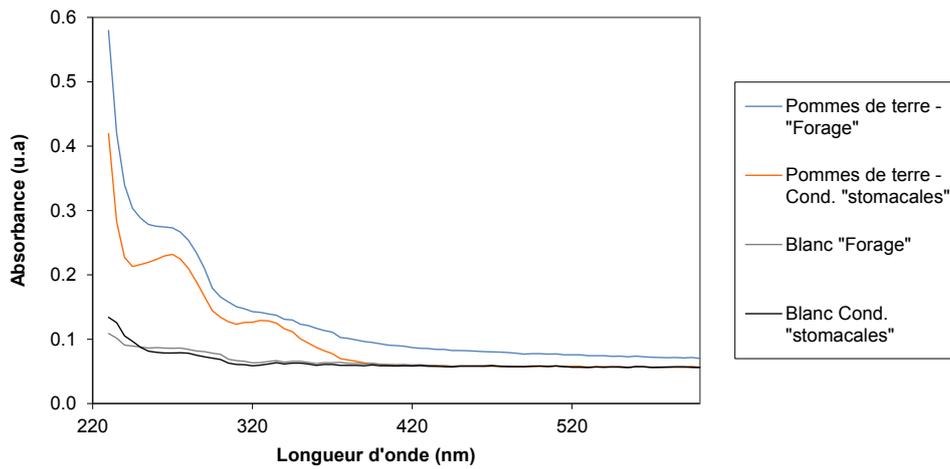


Figure 56 : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile des pommes de terre

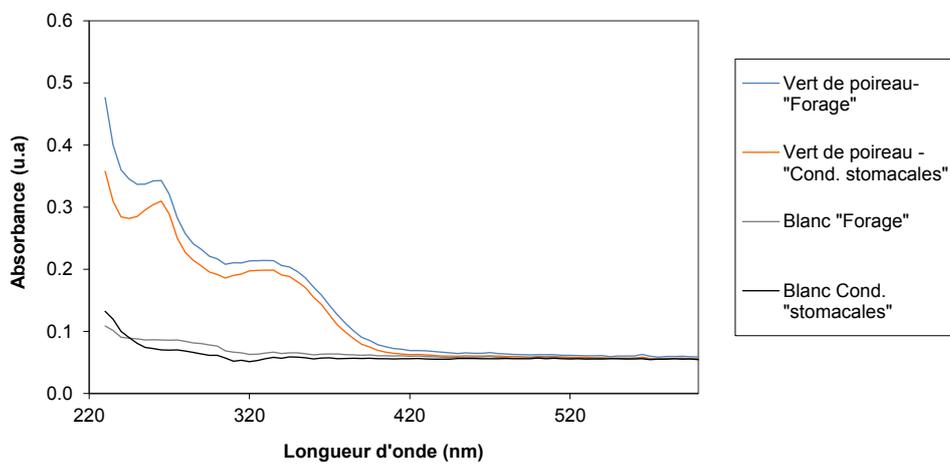


Figure 57 : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile du vert de poireau

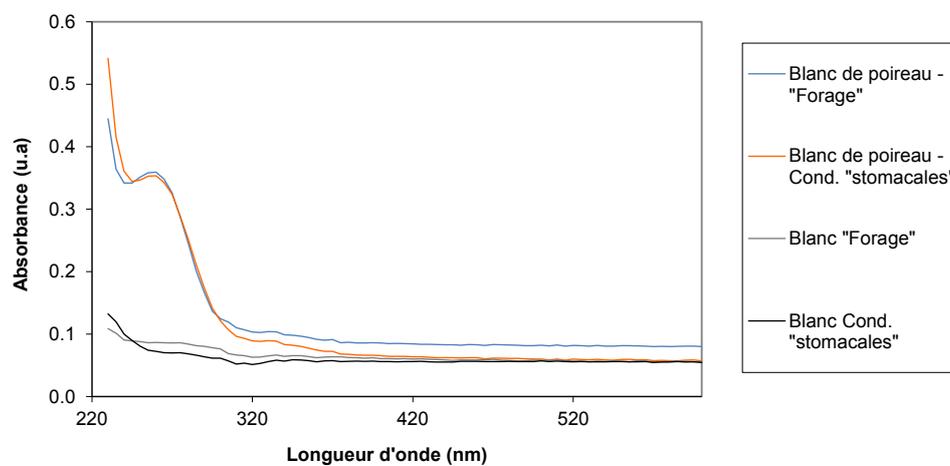


Figure 58 : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile du blanc de poireau

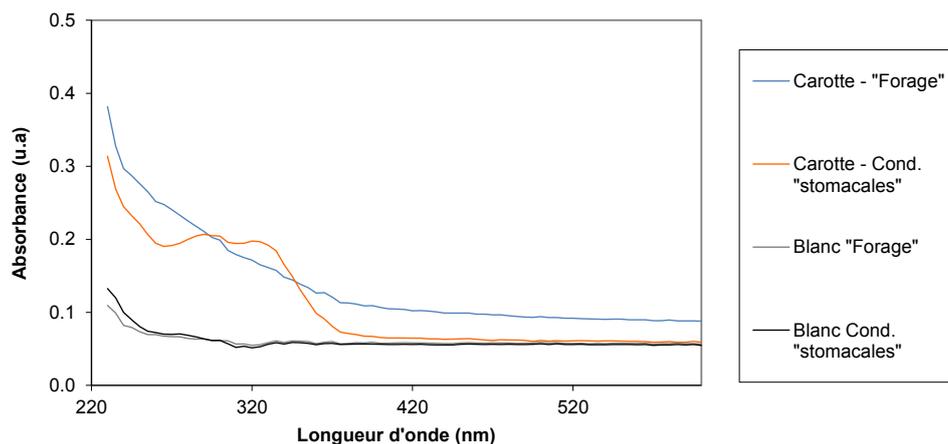
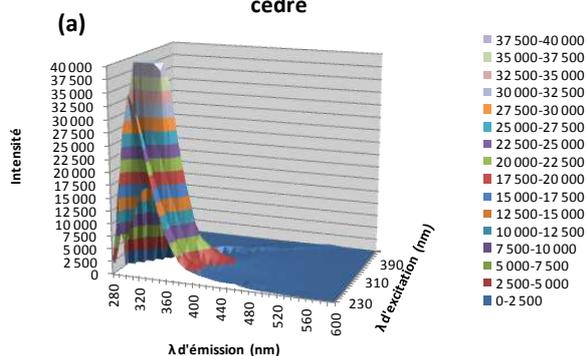


Figure 59 : Spectre UV-Visible des solvants d'échange labile de la carotte

## C.7. SPECTRES DE FLUORESCENCE 3D DES SOLVANTS D'ÉCHANGE LABILE DES ECHANTILLONS

« NON-CIBLES »

Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du cèdre



Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du cèdre, coupe transversale

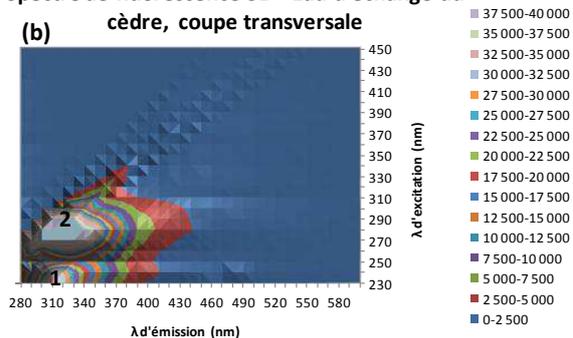
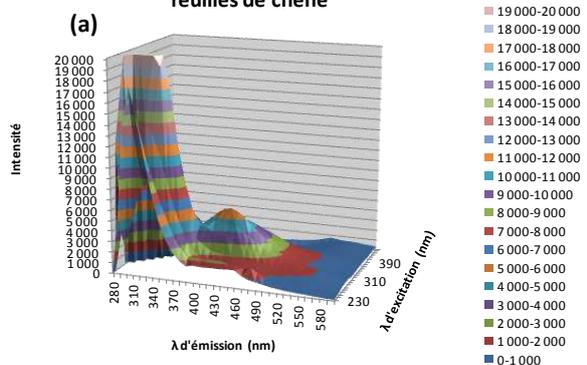


Figure 60 : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile du cèdre ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 65.

Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange des feuilles de chêne



Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange des feuilles de chêne, coupe transversale

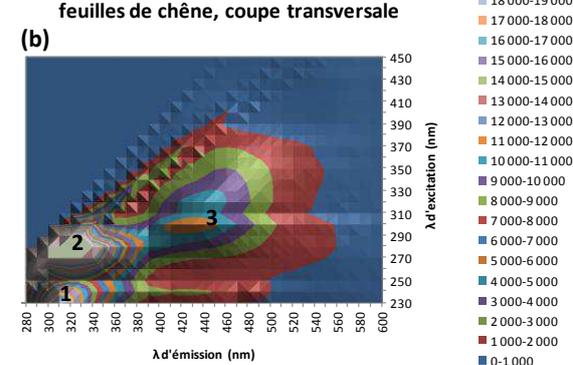
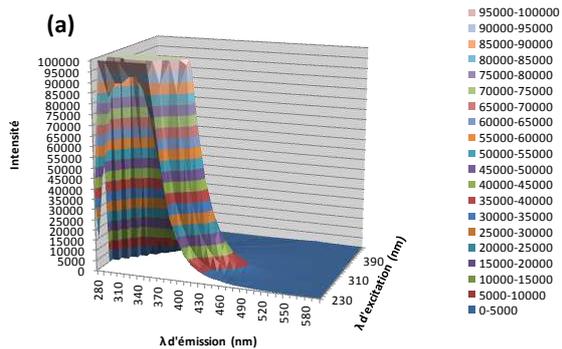
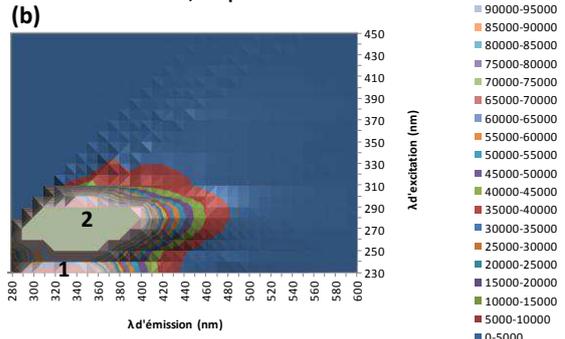


Figure 61 : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile des feuilles de chêne ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 65.

**Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange des pommes de terre**

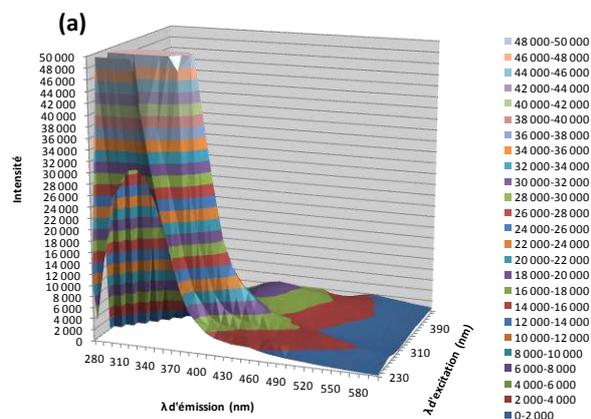


**Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange des pommes de terre, coupe transversale**

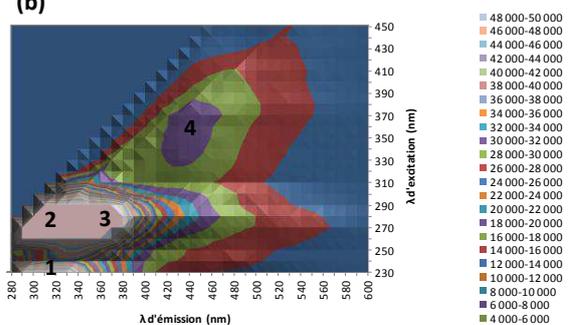


**Figure 62** : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile des pommes de terre ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 65.

**Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du vert de poireau**

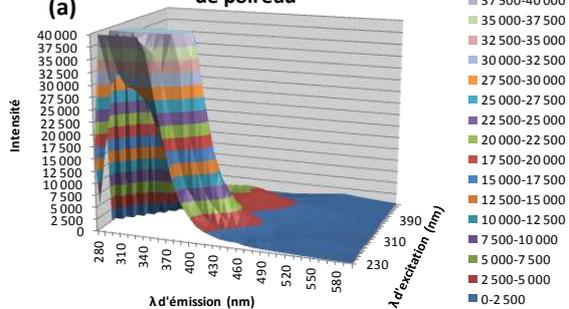


**Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du vert de poireau, coupe transversale**

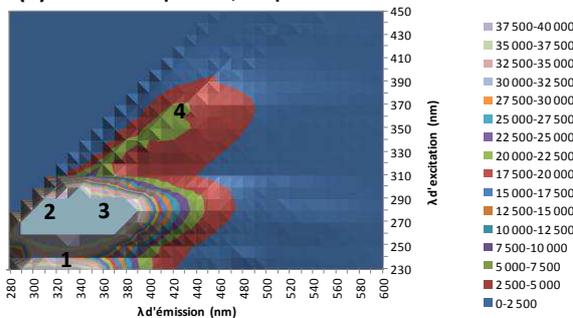


**Figure 63** : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile du vert de poireau ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 65.

**Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du blanc de poireau**



**Spectre de fluorescence 3D - Eau d'échange du blanc de poireau, coupe transversale**



**Figure 64** : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile du blanc de poireau ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 65.

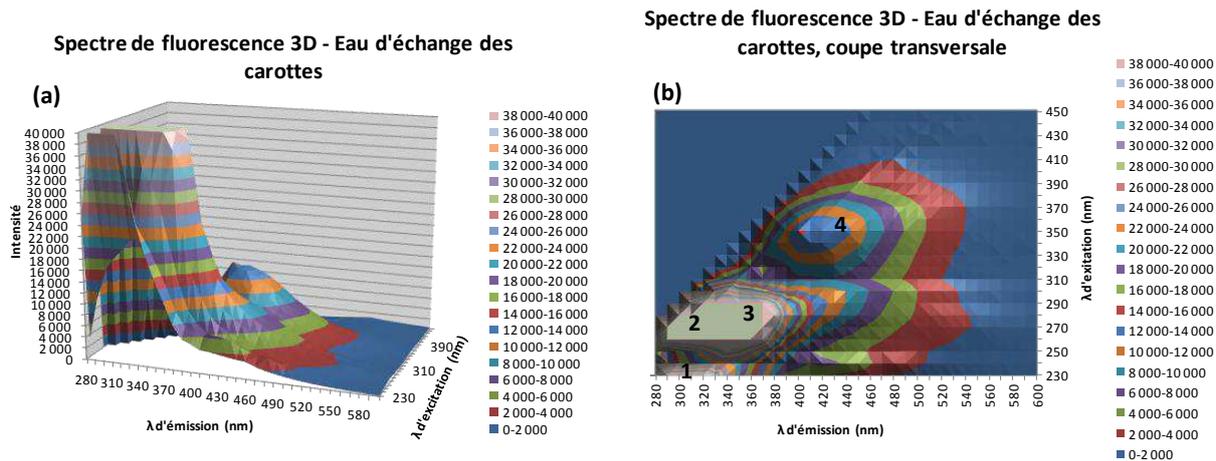


Figure 65 : (a) Spectre de fluorescence 3D du solvant d'échange labile des carottes ; (b) coupe transversale avec l'identification des pics répertoriés dans le tableau 65.

Tableau 65 : Identification des pics caractéristiques des solvants d'échange labile.

F : conditions « eau de forage », ST : « conditions stomacales »

| Echantillon              | Conditions | Pic | $\lambda_{excitation}$ (nm) | $\lambda_{émission}$ (nm) | Attribution / Interprétation |
|--------------------------|------------|-----|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <b>Cèdre</b>             | F + ST     | 1   | 230                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
| <b>Feuilles de chêne</b> | F + ST     | 1   | 230                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 3   | 300                         | 420-430                   | Substances humiques          |
|                          | ST         | 4   | 320-330                     | 440-450                   | -                            |
| <b>Pommes de terre</b>   | F + ST     | 1   | 230                         | 300                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 2   | 280                         | 300-310                   | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 3   | 280                         | 340                       | Protéines, type tryptophane  |
| <b>Vert de poireau</b>   | F + ST     | 1   | 230                         | 300                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 3   | 280                         | 340                       | Protéines, type tryptophane  |
|                          | F + ST     | 4   | 330-350                     | 430-440                   | Substances humiques          |
| <b>Blanc de poireau</b>  | F + ST     | 1   | 230                         | 300                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 3   | 280                         | 340                       | Protéines, type tryptophane  |
|                          | F + ST     | 4   | 350-370                     | 400-430                   | Substances humiques          |
| <b>Carotte</b>           | F + ST     | 1   | 230                         | 300                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 2   | 280                         | 310                       | Protéines, type tyrosine     |
|                          | F + ST     | 3   | 270-280                     | 340-350                   | -                            |
|                          | F + ST     | 4   | 350                         | 400-420                   | Substances humiques          |

## ANNEXE D : GLOSSAIRE

**Adénosine triphosphate (ATP) :** Molécule qui fournit par hydrolyse l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme. L'ATP est un nucléotide triphosphate servant à stocker et transporter l'énergie et constitué d'adénosine (adénine et ribose) et de 3 groupements phosphates.

**Amidon :** Substance de réserve formée dans les cellules végétales effectuant la photosynthèse. L'amidon est un polysaccharide digestible constitué de deux polymères : l'amylose et l'amylopectine.

**Becquerel :** Unité de mesure internationale utilisée pour la mesure de la radioactivité. Le Becquerel correspond à la désintégration d'un noyau radioactif par seconde.

**Biais :** Estimation d'une erreur systématique, erreur de justesse [BIPM, 2008]. Le biais de mesure est la différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essai et une valeur de référence acceptée.

**Bioaccumulation :** Terme général désignant l'accumulation progressive d'un contaminant ou d'une substance toxique dans un organisme à partir de diverses sources, y compris l'atmosphère, l'eau et les aliments, jusqu'à obtention d'un état d'équilibre entre accumulation et élimination de la substance [ASN, 2010].

**Carte de contrôle :** Outil graphique utilisé afin de contrôler certains paramètres de la méthode analytique. Ces paramètres doivent rester stables ou conformes aux spécifications, compte tenu d'une certaine variabilité inévitable. La carte de contrôle permet de déterminer le moment où apparaît une cause particulière de variation du paramètre, entraînant une altération du processus.

**Catabolisme :** Composante du métabolisme qui regroupe l'ensemble des réactions de dégradations moléculaires de l'organisme permettant de générer de l'énergie. Les réactions du catabolisme peuvent être des oxydations ou des déshydrogénations.

**Catalyseur :** Élément qui provoque une réaction chimique.

**Cellulose :** Polysaccharide constitué d'une chaîne linéaire de glucose et classé comme fibre alimentaire. La cellulose est le principal constituant des végétaux et en particulier des parois des cellules végétales.

**Condition de fidélité intermédiaire :** Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, le même lieu et des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une période de temps étendue, mais peuvent comprendre d'autres conditions que l'on fait varier [BIPM, 2008].

**Condition de répétabilité :** Condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps [BIPM, 2008].

**Cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques :** Cycle intervenant dans la respiration cellulaire dont la finalité est la production d'intermédiaires énergétiques pour la synthèse d'ATP. Ce cycle permet la conversion de l'acide pyruvique, produit de la glycolyse, en dioxyde de carbone et en eau.

**Dose absorbée :** Énergie, exprimée en gray ( $1 \text{ J.kg}^{-1}$ ), cédée par le rayonnement à l'organe ou au tissu considéré [Belot et al, 1996].

**Dose efficace :** Somme des doses équivalentes pondérée par un facteur de risque  $W_T$  associé à chaque organe et représentatif du détriment global. La dose efficace s'exprime en Sievert (Sv) [Belot et al, 1996].

**Dose équivalente :** Produit de la dose absorbée par le facteur de pondération  $W_R$  attribué au rayonnement considéré. La dose équivalente s'exprime en Sievert (Sv) [Belot et al, 1996].

**Dose par unité d'incorporation** : Dose efficace ou dose équivalente par becquerel incorporé d'un radionucléide déterminé ( $\text{Bq}\cdot\text{Sv}^{-1}$ ) [Belot et al, 1996].

**Efficacité biologique relative (EBR)** : Efficacité relative des différents types de rayonnements à produire un même effet biologique. L'EBR est définie comme étant le ratio de la dose absorbée entraînée par le rayonnement de référence (X ou gamma) sur la dose absorbée entraînée par le rayonnement testé nécessaire pour produire une réponse biologique équivalente.

**Enzyme** : Macromolécule d'origine protéique synthétisée par l'organisme, qui joue le rôle de catalyseur biologique en permettant l'activation ou l'accélération de réactions chimiques. Les enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions, comme la digestion, la purification du sang...

**Facteur de pondération  $W_R$**  : Facteur dont la valeur dépend de la nature et de l'énergie du rayonnement considéré. Le facteur de pondération permet de calculer une valeur de dose produisant un effet de même importance pour tous les types de rayonnements. La valeur du facteur de pondération actuellement attribuée par la Commission Internationale de Protection Radiologique pour le tritium est égale à 1 [IRSN, 2009b].

**Fibre alimentaire** : Substance résiduelle provenant de la paroi des cellules végétales constituées de mélanges complexes de glucides et non transformées par les enzymes de la digestion. La cellulose, l'hémicellulose et la lignine sont des fibres insolubles dans l'eau.

**Fidélité** : Étroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées [BIPM, 2008].

**Foliaire** : Qui concerne les feuilles des végétaux.

**Glucides** : Classe de molécules organiques dont la formule chimique est basée sur le modèle  $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_p$ . Les glucides font partie des constituants essentiels des êtres vivants et sont l'un des principaux intermédiaires biologiques de stockage et de consommation d'énergie. Les glucides sont divisés en familles de composés en fonction du nombre d'unités de base constitutives des molécules [Siret, 2002]. Les oses, ou monosaccharides, forment ces unités de base, non hydrolysables. Les hexoses et leurs divers isomères, notamment le glucose, sont des oses naturels courants. Les oligosides (ou oligosaccharides, ou holosides) sont constitués d'oses en nombre inférieur à 10. Les polysides ou polysaccharides sont des holosides à très grand nombre d'oses constitutifs. Ils peuvent être constitués soit d'un seul et unique ose, soit d'un motif constitué de plusieurs oses. Les hétérosides ou glycosides sont des glucides dont l'hydrolyse libère un ou plusieurs oses et un groupement non glucidique.

**Glycogène** : Glucide complexe constitué d'une longue chaîne de molécules de glucose. Il est utilisé par les animaux pour stocker de l'énergie et permet de libérer rapidement du glucose (principalement dans le foie et dans les cellules musculaires) au même titre que l'amidon pour les végétaux.

**Glycolyse** : Voie métabolique d'assimilation du glucose et de production d'énergie. Ce cycle intervient dans la respiration cellulaire et correspond à une série de réactions catalysées par des enzymes qui dégradent une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, avec la formation de 4 molécules d'ATP.

**Hémicellulose** : Polysaccharide constitué d'une chaîne de linéaire de glucose et de chaînes latérales avec différents type d'oses. En plus du glucose, les monomères de l'hémicellulose peuvent être du xylose, du mannose, du fructose, du galactose, du rhamnose ou de l'arabinose. L'hémicellulose est classée comme fibre alimentaire et est, après la cellulose, le deuxième composant des parois pectocellulosiques des végétaux.

**Homoscédasticité** : Terme utilisé en statistique pour désigner l'homogénéité ou l'égalité des variances de plusieurs populations d'individus.

**Hormone** : Molécule sécrétée par une glande du système endocrinien en réponse à une stimulation, qui permet de transmettre des messages chimiques. L'action d'une hormone sur un organe cible peut être une stimulation d'une de ses fonctions ou au contraire son inhibition.

**Insuline** : Hormone sécrétée dans le pancréas et ayant un rôle de régulation des substrats énergétiques (glucose essentiellement).

**Justesse** : Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence [BIPM, 2008].

**Lignine** : Biopolymère phénolique, la lignine est un constituant fondamental du bois qui renforce les propriétés mécaniques des tiges, imperméabilise les parois des tissus conducteurs et constitue une barrière contre les micrororganismes pathogènes. La structure des lignines n'est pas complètement élucidée mais elles sont constituées d'unités p-hydroxyphényles H, guaiacyles G et syringyles S issues de la polymérisation des monolignols, les alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique.

**Linéarité** : Capacité de la méthode d'analyse, à l'intérieur d'un intervalle spécifié, à obtenir des résultats de mesure directement proportionnels à la concentration ou quantité de la substance d'intérêt au sein de l'échantillon analysé.

**Lipides** : Molécules organiques constituant la matière grasse des êtres vivants. Les lipides peuvent être divisés en deux groupes : les lipides amphiphiles (lipides de constitution) et les lipides neutres (réserves énergétiques). Les lipides neutres sont les molécules majoritaires sur le plan alimentaire. Parmi celles-ci, sont retrouvés les acides gras (acides carboxyliques à longue chaîne carbonée) et les triacylglycérols (TAG – 3 molécules d'acides gras estérifiant les 3 fonctions alcool du glycérol). Les acides gras sont des substances très concentrées en énergie, et leur absorption intestinale est variable en fonction de leur forme. Ainsi, les acides gras libres, liquides à la température corporelle, sont bien absorbés. La digestion des TAG conduit quant à elle à des mélanges de monoacylglycérols et de diacylglycérols (mono- ou di-esters d'acides gras et de glycérol) dont l'absorption intestinale est variable [Siret, 2002].

**Log P** : Coefficient de partage d'une substance entre l'octanol et l'eau. Le Log P s'exprime comme étant le logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau :  $\text{Log P} = \text{Log} ([X]_{\text{octanol}}/[X]_{\text{eau}})$ . Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule.

**Lyophilisation** : Opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans un produit [Marin et René, 2000].

**Matériel de référence certifié** : Matériel de référence, accompagné d'une documentation délivrée par un organisme faisant autorité et fournissant une ou plusieurs valeurs de propriétés spécifiées avec les incertitudes et les traçabilités associées, en utilisant des procédures valables [BIPM, 2008].

**Métabolisme** : Ensemble des réactions physico-chimiques se déroulant au sein d'un organisme et permettant la synthèse ou la dégradation des molécules nécessaires au maintien en vie de l'organisme, à son développement ou à sa reproduction.

**Nucléotide** : Élément de base d'un acide nucléique (ADN, ARN) composé d'une base azotée (adénine, guanine, cytosine, uracyle ou thymine), d'un sucre à 5 atomes de carbone (désoxyribose pour l'ADN et ribose pour l'ARN) et d'un groupement phosphate fixé sur le carbone 5 du désoxyribose.

**Période effective** : Temps au bout duquel l'activité dans l'organisme aura été divisé par deux. La période effective dépend de la période radioactive et de la période biologique :  $1/T_{\text{eff}} = 1/T_{\text{bio}} + 1/T_{\text{radio}}$

**Protéine** : Macromolécule biologique composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Les protéines sont définies par une structure primaire (leur séquence en acide aminé), une structure secondaire (enroulements ou repliements de certains segments de cette chaîne par le biais de liaisons hydrogène), une structure tertiaire (contorsions irrégulières de la

chaîne via des liaisons hydrogène, ioniques, des ponts disulfures ou encore des effets hydrophobes) et enfin, une structure quaternaire (appariement possible de plusieurs sous-unités polypeptidiques pour former une protéine fonctionnelle).

**Radionucléide** : Isotope à noyau instable dont la désintégration est accompagnée d'un rayonnement électromagnétique.

**Réseau trophique** : Ensemble des chaînes alimentaires entre espèces qui assurent la circulation de matière et d'énergie dans un écosystème.

**Respiration cellulaire** : Réaction d'oxydoréduction fournissant l'énergie nécessaire à une cellule pour fonctionner, grâce à la production d'adénosine triphosphate, source d'énergie directement utilisable par la cellule.

**Spéciation** : Distribution d'un élément parmi les espèces chimiques définies dans un système [IUPAC recommandations, 2000].

**Stomate** : Orifice de petite taille situé au niveau de l'épiderme des feuilles et des tiges aériennes des plantes. Ces structures jouent un rôle fondamental dans la physiologie de la plante puisqu'elles permettent de réguler les échanges gazeux (dioxyde de carbone, dioxygène, vapeur d'eau) de la plante avec l'atmosphère.

**Stratosphère** : Couche de l'atmosphère se situant au dessus de la troposphère. La limite inférieure de la stratosphère se situe entre 8 et 17 km et la limite supérieure se situe entre 40 à 60 km d'altitude. Dans cette zone, la température augmente avec l'altitude suite à l'absorption des rayons ultra-violet provenant du soleil.

**Tissu conjonctif** : Tissu dont les cellules sont séparées par de la matrice extracellulaire (le sang par exemple) contrairement aux épithéliums (l'épiderme par exemple) où les cellules sont jointives. Ces tissus constituent la majorité de la masse du corps des animaux et sont impliqués dans les fonctions de soutien, de protection, de nutrition, de liaison, de réparation des tissus, de mouvement, de réponse immunitaire, de croissance et de stockage.

**Translocation** : Processus de transfert de composés organiques et d'autres substances solubles issues de la photosynthèse des feuilles vers les autres organes de la plante, notamment les organes en croissance (bourgeons, fleurs...) et les organes de réserve (racines et tubercules).

**Tritium Organiquement Lié** : Tritium incorporé dans les molécules organiques constitutives des organismes vivants, à partir de l'eau tritié et de processus naturels ou biologiques tels que la photosynthèse ou des échanges isotopiques.

**Tritium Organiquement Lié Echangeable** : Tritium incorporé dans les molécules constitutives d'un organisme et substitué à un atome d'hydrogène impliqué dans une liaison chimique faible de type -OH, =NH, -SH....

**Tritium Organiquement Lié Non Echangeable** : Tritium incorporé dans les molécules constitutives d'un organisme et substitué à un atome d'hydrogène impliqué dans une liaison covalente de type -C-H.

**Tropopause** : Limite supérieure de la troposphère et limite inférieure de la stratosphère. La tropopause est la limite de l'atmosphère à partir de laquelle la température cesse de décroître pour atteindre une valeur moyenne de -57°C. L'altitude de la tropopause est comprise entre 8 km pour les régions polaires et 17 km pour les régions équatoriales

**Troposphère** : Couche de l'atmosphère, représentant environ 80 % de sa masse totale, la plus proche de la surface du globe. Au sein de la troposphère, la température décroît en moyenne de 6,5°C par kilomètre, jusqu'à la tropopause.

**Valeur aberrante** : Elément d'un ensemble de valeurs qui est incohérent avec les autres éléments de cet ensemble.

## ANNEXE E : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### E.1. COMMUNICATIONS LORS DE CONGRES – SEMINAIRES

Mesure du tritium organiquement lié : Apport de l'analyse élémentaire, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *journées des jeunes chercheurs de la société française des isotopes stables*, 13/10/2011 – Brest (29) – communication orale ;

Incorporation du tritium dans les végétaux, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *1<sup>ère</sup> journée scientifique SRCE*, 14/12/2011 – Arpajon (91) – communication orale ;

Etude de l'impact des rejets tritium d'une installation nucléaire sur les doses induites par le tritium organiquement lié (TOL) présent dans les produits de la chaîne alimentaire locale, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *journée des thésards et post doc de la DIF*, 15/03/2012 – Arpajon (91) – poster ;

Analytical speciation of <sup>3</sup>H in environmental samples, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *1<sup>st</sup> workshop on OBT (organically bound tritium) and its analysis*, 23/05/2012 – Balaruc les Bains (34) – communication orale ;

Capacités analytiques pour la quantification et la « spéciation » du tritium dans des échantillons environnementaux, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *Ecole de Giens 2012 « Tout ce que vous avez toujours voulu savoir sur le tritium »*, 14/06/2012 – Presqu'île de Giens (83) – communication orale ;

Tritium organiquement lié : analyse et compréhension, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *XIII<sup>èmes</sup> journées nationales de radiochimie et de chimie nucléaire*, 4-5 octobre 2012 – Nantes (44) – communication orale ;

Incorporation du tritium dans les végétaux, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *2<sup>ème</sup> journée scientifique SRCE*, 09/01/2013 – Arpajon (91) ;

Tritium organiquement lié (TOL) : Analyse et compréhension, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *Journée de l'école doctorale 388*, 25/04/2013 – Paris (75) et *journée des thésards et post doc de la DIF*, 13/06/2013 – Arpajon (91) – posters ;

Speciation of tritium in environmental samples, **N. BAGLAN, A. BACCHETTA, J. AUPIAIS**, *2<sup>nd</sup> OBT Workshop*, 23<sup>rd</sup>-25<sup>th</sup> September 2013 – Southampton (Grande-Bretagne) – communication orale ;

Speciation of tritium in environmental samples, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *10<sup>th</sup> international conference on tritium science and technology*, 21-24/10/2013 – Nice (06) – communication orale ;

Speciation of tritium in environmental samples, **A. BACCHETTA, N. BAGLAN, J. AUPIAIS**, *10<sup>th</sup> international conference on tritium science and technology*, 21-24/10/2013 – Nice (06) ;

### E.2. PUBLICATIONS

Le tritium : de l'environnement à l'homme, **P. Le Goff, A. Bacchetta, N. Baglan, L. Vichot, P. Guétat**, *CHOCS – revue scientifique et technique de la direction des applications militaires*, volume 43 (2014) 35-42 ;

Assessment of elemental analysis method for organically bound tritium measurements, **A. Bacchetta, N. Baglan, J. Aupiais**, *en cours de finalisation* ;

Analytical speciation of tritium in environmental samples, **A. Bacchetta, N. Baglan, J. Aupiais**, *prevue*.







## ANALYSE ET SPECIATION DU TRITIUM DANS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES

### Résumé

Cette étude s'inscrit dans le domaine de la surveillance de l'environnement. Elle consiste à optimiser et valider la procédure analytique de détermination du tritium sous forme organique, et à identifier les molécules organiques, porteuses de tritium, responsables de son transfert de l'environnement à l'homme. La démarche s'est organisée en trois temps. Une procédure analytique a d'abord été mise en place pour déterminer, la teneur en hydrogène des échantillons, élément clé, utilisée pour le calcul des activités de tritium organique. L'impact de la séparation des fractions de tritium organique (l'échange labile) sur la détermination de l'activité de la fraction représentative du niveau de tritium environnemental a ensuite été évalué. Pour cela, les quantités d'échantillon solubilisées ont été estimées. Enfin, la spéciation du tritium dans des échantillons environnementaux a été abordée. Pour cela, les familles de molécules, puis les composés organiques solubilisés lors des échanges labiles ont été identifiés. Les résultats montrent que la répartition du tritium dans les organismes dépend à la fois des propriétés de la liaison chimique dans laquelle il est impliqué et des propriétés des molécules organiques le portant. Les composés identifiés appartiennent aux familles de molécules constitutives (glucides, acides aminés) de la matière vivante. Il serait à présent intéressant d'étudier la répartition du tritium au sein d'un échantillon de l'environnement pour cibler les molécules d'intérêt et étudier de manière plus approfondie la distribution du tritium dans l'environnement et son impact, de l'environnement à l'homme.

*Mots-clés : tritium, tritium organiquement lié, tritium organiquement lié non échangeable, échange labile, analyse, spéciation*

### Abstract

This study deals with environmental monitoring. The main aims are (i) the optimisation of the analytical procedure for the tritium in organic form determination, and (ii) the identification of the tritium bearing molecules which are responsible for its transfer from the environment to man. The study was divided into three stages. First an analytical method was developed to determine hydrogen content of several samples, which is a key element to calculate accurate organically bound tritium activities. Secondly, the impact of the organically bound tritium fractions separation (labile exchange) for the determination of the representative fraction of the level of environmental tritium activity was then evaluated. For that, the amount of solubilised sample was estimated. Finally, the speciation of tritium in environmental samples was investigated. Several molecules classes and organic compounds dissolved in the labile exchanges solvent were identified. The results show that the distribution of tritium in organisms depends on both properties of the chemical bond in which it is involved and chemical properties of tritium bearing molecules. The identified compounds belong to the molecules classes such as carbohydrates or amino acids, constitutive of living organisms. It would now be of interest to study the tritium distribution in an environmental sample to target molecules of interest and study the impact of tritium from the environment to man.

*Key words: tritium, organically bound tritium, non-exchangeable organically bound tritium, labile exchange, analysis and speciation*