



HAL
open science

Spéciation du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales

Anne-Laure Nivesse

► **To cite this version:**

Anne-Laure Nivesse. Spéciation du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales. Radiochimie. Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique, 2020. Français. NNT : 2020IMTA0216 . tel-03305159v2

HAL Id: tel-03305159

<https://theses.hal.science/tel-03305159v2>

Submitted on 3 Sep 2021

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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE MINES-TELECOM ATLANTIQUE
BRETAGNE PAYS DE LA LOIRE - IMT ATLANTIQUE

ÉCOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux

Spécialité : Chimie Analytique et Radiochimie

Par

Anne-Laure NIVESSE

Spéciation du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales

Thèse présentée et soutenue à Nantes le 16 Décembre 2020

Unités de recherche : SUBATECH – UMR 6457 et CEA Bruyères-le-Châtel

Thèse N° : 2020IMTA0216

Rapporteurs avant soutenance :

Pr. Pierre-Marie BADOT
Dr. Denis MARO

Professeur, Chrono-Environnement Besançon
Directeur de recherche, IRSN Cherbourg-Octeville

Composition du Jury :

Président : Pr. Abdesselam ABDELOUAS

Professeur, IMT Atlantique Nantes

Rapporteurs : Pr. Pierre-Marie BADOT
Dr. Denis MARO

Professeur, Chrono-Environnement Besançon
Directeur de recherche, IRSN Cherbourg-Octeville

Examineurs : Pr. Michel FROMM
Dr. Laurence LEBARON-JACOBS

Professeur, Chrono-Environnement Besançon
Docteur en médecine, CEA Cadarache

Dir. de thèse : Dr. Gilles MONTAVON
Co-encadrant : Dr. Olivier PERON
Co-encadrant : Dr. Nicolas BAGLAN

Directeur de recherche, SUBATECH Nantes
Maitre de conférence, SUBATECH Nantes
Responsable de laboratoire, CEA Bruyères-le-Châtel

"If you know you are on the right track, if you have this inner knowledge, then nobody can turn you off... no matter what they say."

Barbara McClintock
(1902-1992)
Cytogénéticienne et lauréate du prix Nobel 1983
de physiologie ou médecine

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes ayant accepté de faire partie du jury d'évaluation de cette thèse : Merci à Pierre-Marie Badot et Denis Maro d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'à Michel Fromm, Abdesselam Abdelouas et Laurence Lebaron-Jacobs d'avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse mes remerciements à Gilles Montavon, pour avoir dirigé cette thèse et pour la confiance qu'il m'a accordée pendant ces trois années. Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance et ma gratitude envers Olivier Péron et Nicolas Baglan pour leur encadrement scientifique, leurs conseils, leur disponibilité et pour le temps qu'ils ont pris à relire mes travaux. Je les remercie d'avoir veillé au bon déroulement de cette thèse et de m'avoir permis de valoriser ce travail, en congrès ou par le biais de publications. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée.

Je veux également remercier tous les membres du groupe Radiochimie du laboratoire SUBATECH ainsi que le laboratoire LEXAN pour m'avoir accueillie et intégrée au sein de leurs équipes. Je remercie plus particulièrement tous mes collègues et amis doctorants, post-docs, alternants, stagiaires, permanents et non-permanents pour leur soutien, leur aide dans la réalisation de ces travaux et leur bonne humeur au quotidien. Un grand merci à Soumaya K., Yahaya H.L., Sabrina A., Fengqi X., Alexis M., Lu L., Haohan Z., Amaury C., Jules G., Emeline C., Nicolas B., et tant d'autres ... nos soirées raclette et nos discussions sur le marché des portes-échantillons me manquent déjà.

Une pensée toute particulière aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Gaëlle Granger et Tanguy Angelliaume, encore merci pour votre implication dans ce projet. Vous avez été les meilleurs et je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

Je tiens également à exprimer ma plus profonde gratitude envers Sébastien Petit, sans qui je n'aurai jamais eu le courage de tenter ma chance dans ce monde merveilleux qu'est celui de la recherche. Je n'oublie pas que si tout ceci a un jour été possible pour moi, c'est bien grâce à la confiance que tu as su m'accorder dès le début. Encore une fois, merci, pour tout.

Enfin, je souhaite remercier l'ensemble de mes proches, les membres de ma famille et mes amis pour le soutien qu'ils ont su me témoigner. J'ai une pensée pour mes grands-parents, ceux toujours présents mais également ceux disparus qui sont toujours avec moi. J'adresse de grands remerciements à mon grand-père paternel pour avoir relu ce travail et à mes parents pour m'avoir permis de faire mes études dans les meilleures conditions qui soient, trouvez dans ce travail toute ma reconnaissance.

Et pour finir, Aurélien, je te remercie de m'avoir écoutée t'exposer mes idées en boucle et pour tes encouragements au quotidien. Merci pour ta patience et de m'avoir toujours soutenue et rassurée.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES NOTATIONS	13
INTRODUCTION GENERALE	17
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART	23
1. INTRODUCTION	26
2. GENERALITES SUR LE TRITIUM	27
3. ORIGINES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	29
4. LES DIFFERENTES FORMES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	34
5. CIRCULATION DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	46
6. RADIOTOXICITE ET TRANSFERT DU TRITIUM CHEZ L'HOMME	54
7. LES PRINCIPALES BIOMOLECULES DE LA BIOMASSE VEGETALE	58
8. CONCLUSION	66
CHAPITRE 2 : DEMARCHE EXPERIMENTALE	69
1. INTRODUCTION	71
2. STRATEGIE DE L'ETUDE	72
3. L'ECHANGE ISOTOPIQUE DE L'ATOME D'HYDROGENE	88
4. LES OUTILS ANALYTIQUES	94
5. CONCLUSION	109
CHAPITRE 3 : ECHANGEABILITE DE L'ATOME D'HYDROGENE ET SPECIATION DU TRITIUM ORGANIQUEMENT LIE	111
1. INTRODUCTION	113
2. LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR LES MODELES MOLECULAIRES FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE	114
3. LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR L'INDICE DE CRISTALLINITE FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE	133
4. LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR LA DEPROTONATION FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE	152
5. CONCLUSION	164
CHAPITRE 4 : LA QUANTIFICATION DU TOL-NE DANS LES MATRICES ENVIRONNEMENTALES	167
1. INTRODUCTION	168
2. ETUDE COMPARATIVE DES METHODES D'ECHANGE ISOTOPIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE LA FRACTION TOL-NE DANS UN ECHANTILLON	169
3. CONCLUSION	185

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
ANNEXES	211

Liste des Figures

Chapitre 1

Figure I-1 : Répartition des positions hydrogènes théoriques échangeables et non-échangeables dans la molécule de glucose.....	38
Figure I-2 : Procédure pour l'analyse des différentes fractions de tritium dans les matrices environnementales, adaptée de (ASN, 2010).....	43
Figure I-3 : Cycle géochimique de l'eau en milieu tempéré océanique, circulation et transfert dans les compartiments terrestres (Keller, 1980).....	46
Figure I-4 : 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).	47
Figure I-5 : Transfert et circulation du tritium de l'environnement dans les végétaux (Bacchetta, 2013).....	50
Figure I-6 : Schéma de l'organisation structurale d'une cellule végétale (GNIS, 2018).....	58
Figure I-7 : Représentation moléculaire de (a) l'amylose et (b) l'amylopectine (Thiebaud-Roux et al., 2017).....	60
Figure I-8 : Schéma simplifié de l'organisation du complexe pectocellulosique dans la paroi primaire de la cellule végétale, adapté de (Lloyd, 1991).....	61
Figure I-9 : Représentation schématique des liaisons hydrogènes intramoléculaires (bleues) et intermoléculaires (rouges) des chaînes de cellulose (Reblere, 2017).....	62
Figure I-10 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (Cummings, 2001).....	65

Chapitre 2

Figure II-1 : Schéma bilan de la démarche expérimentale associée à la problématique « spéciation ».....	73
Figure II-2 : Schéma bilan de la démarche expérimentale associée à la problématique « analytique ».....	77
Figure II- 3 : Schéma du principe de la combustion d'échantillons tritiés dans un four tubulaire (Baglan et al., 2010).	94
Figure II- 4 : Chaîne de détection des photons en double coïncidence (Cassette, 2004).....	97

Chapitre 3

Figure III-1 : Diffractogrammes des analyses DRX sur les matrices (a) « Myriophylle » et (b) « Myriophylle-Paroi cellulosique » comparés aux résultats obtenus sur la cellulose D. 148

Annexes

Figure A-1 : Schéma du procédé d'extraction des glucides simples de la pomme..... 213

Figure A-2 : Schéma du procédé d'extraction de l'amidon du grain de blé..... 214

Figure A-3 : Schéma du procédé de purification de la paroi cellulosique du *Myriophyllum Spicatum*.
..... 216

Figure A-4 : Compositions des différentes matrices d'étude..... 218

Figure A-5 :Schéma du procédé d'isolation des différentes fractions des substances humiques.
..... 228

Figure A-6 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Pomme » après marquages et appauvrissement en tritium. 230

Figure A-7 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Pomme - Glucides simples » après marquages et appauvrissement en tritium..... 230

Figure A-8 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Grain de blé » après marquages et appauvrissement en tritium, d'après les travaux présentés dans (Péron et al., 2018)..... 231

Figure A-9 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Blé - Amidon » après marquages et appauvrissement en tritium.
..... 231

Figure A-10 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Myriophylle » après marquages et appauvrissement en tritium.
..... 232

Figure A-11 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Myriophylle - Paroi cellulosique » après marquages et appauvrissement en tritium..... 232

Figure A-12 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 1 » après marquages en tritium. 233

Figure A-13 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 2 » après marquages en tritium. 233

Figure A-14 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 3 » après marquages en tritium. 234

Figure A-15 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L^{-1} d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 4 » après marquages en tritium. 234

Figure A-16 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L^{-1} d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « SH-Li » après (a) marquages en tritium et (b) appauvrissements d'échantillons préalablement marqués en tritium. 235

Figure A-17 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L^{-1} d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « SH-Le » après (a) marquages en tritium et (b) appauvrissements d'échantillons préalablement marqués en tritium. 235

Liste des Tableaux

Chapitre 1

Tableau I-1 : Récapitulatif des différentes quantités et sources de tritium dans l'environnement. 33

Tableau I-2 : DPUI chez l'adulte en fonction de la forme physico-chimique du tritium et de son mode d'incorporation (ASN, 2010). 57

Chapitre 2

Tableau II-1 : Descriptif des matrices d'étude dans le cadre des problématiques « spéciation » et « analytique ». 81

Tableau II-2 : Paramètres de préparation des dérivés de celluloses natives commerciales. 85

Chapitre 3

Tableau III-1 : Détermination des paramètres d'échangeabilité basés sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) de la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » (B-2) en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose et application à la détermination du paramètre (α_{prot}) pour les protéines. ⁽¹⁾ résultats obtenus en considérant le paramètre ($\alpha_{modèle}$) des protéines et ⁽²⁾ résultats obtenus en considérant le paramètre (α_{prot}) des protéines..... 151

Annexes

Tableau A-1 : Liste des composés analysés dans les matrices environnementales d'étude, leur formule brute, leur structure moléculaire et leur paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) associé..... 219

Tableau A-2 : Liste des acides aminés présents dans les matrices environnementales d'étude, leur formule brute, leur paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) associé et leur répartition dans le grain de blé (selon les travaux présentés dans (Péron et al., 2018)) et le *Myriophyllum Spicatum* (selon les travaux présentés dans (Muztar et al., 1978)). 222

Tableau A-3 : Humidité relative de l'air (%) au contact de solutions salines saturées dans un milieu clos et en fonction de la température (°C), d'après (Greenspan, 1977). 223

Tableau A-4 : Exemples de paramètres de temps de comptage (minutes) par scintillation liquide en fonction de la gamme de concentration d'activité en tritium dans l'échantillon ($Bq.L^{-1}$) et de l'équipement utilisé (Packard modèle Tri-Carb 3170 TR/SL ou Wallac Quantulus modèle 1220) par rapport à une incertitude relative ciblée inférieure ou égale à 10 % et temps de comptage (minutes) optimisé pour l'équipement Wallac Quantulus modèle 1220 avec l'incertitude relative associée..... 224

Liste des Notations

Abréviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CANDU	CANada Deuterium Uranium
CBT	Carbon Bound Tritium
CH₃T	Méthane tritié
CNPE	Centre National de Production d'Electricité
CrI	Cristallinity Index ou Indice de Cristallinité
HT	Hydrogène tritié
HTO	Eau tritiée
INB	Installation Nucléaire de Base
INBS	Installation Nucléaire de Base Secrète
ITER	International Thermonuclear Experimental Reactor
MOT	Molécule Organique Tritiée
NEEDS	Nucléaire, Energie, Environnement, Déchets, Société
TED (TFWT)	Tritium de l'Eau de Déshydratation (Tissue Free Water Tritium)
TICE ou TICEN	Traité d'interdiction complète des essais nucléaires
TOL (OBT)	Tritium Organiquement Lié (Organically Bound Tritium)
TOL-E (E-OBT)	Tritium Organiquement Lié Echangeable (Exchangeable Organically Bound Tritium)
TOL-NE (NE-OBT)	Tritium Organiquement Lié Non-Echangeable (Non-Exchangeable Organically Bound Tritium)
XBT_{buried}	Buried Tritium Bound to X : O, N, S.
XBT_{rinsed}	Rinsed Tritium Bound to X : O, N, S.

Etablissements et organismes :

AIEA	Agence Internationale de l'Energie Atomique
ASN	Autorité de Sûreté Nucléaire
CEA	Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives
CETAMA	Commission d'ETablissement des Méthodes d'Analyse
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
EDF	Electricité de France
ICRP	Commission internationale de protection radiologique
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
LNE	Laboratoire National de métrologie et d'Essais
LNHE	Laboratoire National Henri Becquerel
LSCE	Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement
OECD	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
UICPA	Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée
UNSCEAR	Comité scientifique des Nations unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants

Notations :

(α)	paramètre d'échangeabilité relatif à la labilité de l'atome d'hydrogène
$(\alpha_{\text{modèle}})$	paramètre d'échangeabilité théorique / basé sur les modèles moléculaires
(α_{iso})	paramètre d'échangeabilité isotopique
$(\alpha_{\text{isocelluloses}})$	paramètre d'échangeabilité isotopique des celluloses natives
(α_{CrI})	paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité
$(\alpha_{\text{CrI}_{\text{cellulose}}})$	paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité attribué à une cellulose
(α_{depro})	paramètre d'échangeabilité basé sur la déprotonation
(α_{prot})	paramètre d'échangeabilité attribué aux protéines
TOL-NE_{dure}	TOL-NE mesuré après le processus de la méthode « voie dure »
TOL-NE_{douce}	TOL-NE mesuré ou calculé après le processus de la méthode « voie douce »

Unités :

A	ampère
a	an
Bq	Becquerel
cpm	coup par minute
DPUI	Dose Par Unité Incorporée
x g	accélération de la pesanteur à la surface de la Terre
g	gramme
GWe	Gigawatt électrique
L	litre
keV	kilo electron-Volt
m	mètre
min	minute
rpm	tour par minute (round per minute)
SV	Sievert
V	volt
θ	angle thêta
°C	degré Celsius
Ω	ohm

Introduction générale

L'hydrogène est l'élément le plus abondant sur Terre et dans l'Univers. Sur Terre, sa grande mobilité le rend présent de façon ubiquiste dans l'ensemble des compartiments environnementaux. Cet élément chimique s'y retrouve essentiellement sous forme d'eau, mais également dans la matière organique, dans des roches sédimentaires ou encore comme élément libre, à l'échelle de traces, dans l'atmosphère. Dans l'environnement, l'hydrogène intègre principalement le cycle naturel de l'eau mais s'associe également aux nombreux cycles de la biosphère (cycle du carbone et de l'oxygène).

L'hydrogène se compose de trois isotopes naturels aux propriétés chimiques identiques : le protium, constitué d'un proton, le deutérium, constitué d'un proton et d'un neutron, tous deux qualifiés de stables ; et le tritium, constitué d'un proton et de deux neutrons, qualifié d'instable et seul isotope radioactif naturel de l'élément hydrogène. Produit de façon naturelle dans les hautes couches de l'atmosphère et dans la croûte terrestre ($7,2 \times 10^{16}$ Bq sur Terre par an), le tritium est également l'un des principaux radionucléides rejetés par les installations nucléaires en fonctionnement normal et le seul pour lequel les prévisions de rejet dans les années futures sont en hausse (projet ITER pour le développement des réacteurs à fusion nucléaire notamment).

Une fois rejeté dans l'environnement, le tritium intègre le cycle de l'hydrogène et se retrouve majoritairement sous forme d'eau tritiée. Par la suite, il s'incorpore rapidement dans les organismes vivants dans lesquels il intègre la matière organique sous forme de tritium organiquement lié (TOL). L'existence de deux formes de TOL est communément admise : une fraction dite « échangeable » (TOL-E) en équilibre permanent avec l'environnement proche et une fraction dite « non-échangeable » (TOL-NE) qui persiste dans la molécule organique porteuse jusqu'à sa dégradation. Cependant, il n'existe pas à ce jour de consensus pour décrire la répartition exacte de ces deux formes dans une molécule organique et plusieurs déclinaisons se retrouvent dans la littérature en fonction de l'application considérée (Kim *et al.*, 2013).

Bien que la faible radiotoxicité de ce radionucléide engendre un impact sanitaire et environnemental des rejets tritiés limité, un intérêt sociétal important est porté au tritium depuis la fin des années 2000. De nombreuses interrogations sur son comportement dans l'environnement et l'existence éventuelle d'un phénomène de bioaccumulation ont ainsi émergé à la suite de la parution des rapports AGIR (AGIR, 2007) et RIFE (RIFE, 2005).

En réponse, l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) a publié en 2010 le Livre Blanc du Tritium, un document de synthèse des connaissances et points de vue techniques relatifs au radionucléide (ASN, 2010). Ce document présentait des axes de recherches prioritaires à développer, notamment sur les questions des différentes formes du tritium, son comportement, sa potentielle bioaccumulation et son impact dans l'environnement et à l'Homme. A la suite de plusieurs projets

menés ces dernières années, l'hypothèse de la bioaccumulation a été écartée mais de nombreuses études ont fait état de déséquilibres, parfois importants, entre les formes libres (eau tritiée HTO) et liées à la matière organique (tritium organiquement lié TOL) (Baglan *et al.*, 2011 ; Jean-Baptiste *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2012 ; Péron *et al.*, 2016 ; Thompson *et al.*, 2015). Le défaut d'harmonisation actuel et passé sur la nature exacte des différentes formes de TOL est alors considéré à l'origine de la controverse sur la potentielle bioaccumulation du tritium mais également responsable des difficultés d'interprétation des résultats inter-laboratoires. En 2017, l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) a publié un rapport d'actualisation des connaissances sur le tritium dans lequel l'intérêt de mieux déterminer les formes du tritium organiquement lié est confirmé (IRSN, 2017). Une meilleure compréhension de la spéciation du TOL permettrait alors d'améliorer les interprétations de la distribution du tritium dans l'environnement et d'apporter des réponses univoques aux questionnements soulevés sur sa rémanence et ses potentiels facteurs de concentration. Pour approfondir les connaissances sur le comportement du tritium dans l'environnement, il est alors considéré comme fondamental d'engager des investigations axées sur la répartition des formes TOL-E et TOL-NE dans les matrices environnementales.

Selon un point de vue assez répandu (Baglan *et al.*, 2005 ; Pointurier *et al.*, 2003), la nature des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans une molécule organique pourrait s'établir en fonction du type de liaison chimique dans lequel le tritium est impliqué. Pourtant, cette description a été plusieurs fois remise en question depuis la mise en évidence de limitations majeures des capacités d'échange de cette fraction supposée échangeable du TOL au sein de matrices environnementales (Baumgartner et Donhaerl, 2004 ; Péron *et al.*, 2018 ; Sepall et Mason, 1961). Les conformations moléculaires adoptées par les macromolécules porteuses de TOL seraient alors responsables de phénomènes de liaisons et d'entraves de positions hydrogènes dans leur structure, réduisant significativement les capacités d'échange des atomes impliqués. Pour prendre en considération ces phénomènes, plusieurs études ont suggéré d'inclure les propriétés structurales des molécules organiques porteuses pour décrire la répartition des formes échangeable et non-échangeable du TOL (Baumgartner et Donhaerl, 2004 ; Diabaté et Strack, 1993 ; Kim *et al.*, 2013). Cependant, le lien exact entre les types de structures moléculaires impliqués et la significativité de leur impact sur les capacités d'échange globales des atomes d'hydrogène d'une matrice environnementale restent à établir. En ce sens, il apparaît toujours un besoin d'informations supplémentaires pour une compréhension plus globale de la nature et de la répartition des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans l'ensemble des biomolécules et matrices de la biomasse terrestre.

Par ailleurs, une méthode validée fait à ce jour défaut pour l'analyse des fractions TOL-E et TOL-NE dans une matrice environnementale. L'intrusivité des procédures actuelles est supposée responsable d'un potentiel biais analytique, qui ne permet pas de bénéficier d'une certitude quant à la nature des fractions analysées (Bacchetta, 2013).

Pour répondre à l'ensemble de ces questionnements, ces travaux proposent une étude en deux parties qui consiste à :

- (i) établir et comprendre l'implication de structures moléculaires spécifiques en lien avec le comportement et la spéciation du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales, dans le cadre d'une problématique « spéciation » et,
- (ii) statuer sur la fiabilité et la pertinence des méthodes d'échange isotopique actuelles pour l'analyse de la forme non-échangeable du TOL dans les échantillons environnementaux, dans le cadre d'une problématique « analytique ».

Dans le chapitre 1, une étude bibliographique a été réalisée afin de présenter une synthèse des connaissances actuelles sur le tritium, sa spéciation, son transfert et sa mesure au sein des matrices environnementales. Pour chaque point clé de cette étude, des parties de discussion sont également mises en avant afin d'introduire l'ensemble des différentes problématiques étudiées au cours de ces travaux.

Le chapitre 2 présente la démarche expérimentale globale adoptée pour répondre à ces problématiques et détaille dans une première partie la stratégie mise en place dans cette étude. Dans une seconde partie, les deux méthodes d'échange isotopique de l'atome d'hydrogène employées durant ces travaux sont présentées. Par la suite, les outils analytiques choisis pour caractériser les échantillons à chaque étape et leurs spécificités propres sont abordés.

Afin d'évaluer les capacités d'échange retrouvées dans plusieurs matrices environnementales d'intérêt (la pomme, le grain de blé et le myriophylle), une étude de la labilité des atomes d'hydrogène en lien avec les caractéristiques structurales de leurs constituants est proposée dans le chapitre 3. Pour approfondir ce point particulier, un intérêt spécifique est accordé à la molécule de cellulose et sa structure supramoléculaire semi-cristalline. Les capacités de rétention du TOL dans les sols sont également explorées à partir d'une étude des capacités d'échange et de déprotonation des atomes d'hydrogène dans de la matière riche en substances humiques.

Par la suite, une étude comparative entre deux méthodes d'échange isotopique pour la quantification de la fraction non-échangeable du TOL est proposée dans le chapitre 4. Leur fiabilité et leur pertinence sont évaluées pour des applications de recherche mais également dans le cadre de la surveillance environnementale.

Enfin, le chapitre 5 récapitule l'ensemble des réponses apportées aux différentes problématiques de cette étude avant de proposer un ensemble de perspectives à développer pour la suite de l'exploration de la spéciation du tritium organiquement lié.

Chapitre 1

Etat de l'art

Table des matières

1. INTRODUCTION	26
2. GENERALITES SUR LE TRITIUM	27
2.1. DECOUVERTE DU TRITIUM	27
2.2. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET RADIOLOGIQUES	27
3. ORIGINES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	29
3.1. ORIGINES NATURELLES	29
3.1.1. COSMOGENIQUES	29
3.1.2. TELLURIQUES	29
3.2. ORIGINES ANTHROPIQUES	30
3.2.1. ESSAIS NUCLEAIRES ATMOSPHERIQUES	30
3.2.2. INSTALLATIONS NUCLEAIRES ET INDUSTRIELLES	30
3.2.2.1. Les Centres Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE)	30
3.2.2.2. Les centres de retraitement du combustible	31
3.2.2.3. Les réacteurs dédiés à la production de tritium	31
3.2.2.4. Les centres de recherche et d'étude	32
3.2.2.5. Autres productions technologiques industrielles	32
3.2.3. FUTURES SOURCES DE PRODUCTION DE TRITIUM	32
3.2.3.1. Les gestions futures du combustible	32
3.2.3.2. Les réacteurs à fusion	33

4. LES DIFFERENTES FORMES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	34
4.1. LE TRITIUM SOUS FORME LIQUIDE	34
4.2. LE TRITIUM SOUS FORMES GAZEUSES	34
4.3. LE TRITIUM DANS LES ORGANISMES VIVANTS	35
4.3.1. LE TRITIUM DANS L'EAU TISSULAIRE (TED)	35
4.3.2. LE TRITIUM DANS LA MATIERE ORGANIQUE	35
4.3.2.1. Introduction à la spéciation	36
4.3.2.2. La nature du TOL-E et du TOL-NE	37
4.3.2.2.1. Le point de vue analytique	37
4.3.2.2.2. Le point de vue structural	39
4.3.2.3. Discussion	40
4.3.3. ANALYSES DU TRITIUM	41
4.3.3.1. La mesure de la fraction TED	42
4.3.3.2. La mesure de la fraction TOL	42
4.3.3.3. La quantification des fractions TOL-E et TOL-NE	42
4.3.3.4. Discussion	44
4.4. LE TRITIUM SOUS FORMES TECHNOGENIQUES	45
5. CIRCULATION DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	46
5.1. LE TRITIUM DANS LE CYCLE DE L'EAU	46
5.2. LA CIRCULATION DU TRITIUM DANS LES SOLS	48
5.2.1. LES TRANSFERTS SOUS FORME D'EAU TRITIEE	48
5.2.2. LES TRANSFERTS SOUS FORME DE MATIERE ORGANIQUE	49
5.3. LA CIRCULATION DU TRITIUM DANS LES VEGETAUX	50
5.3.1. L'ABSORPTION DE L'EAU TRITIEE	51
5.3.2. L'INCORPORATION DU TRITIUM DANS LA MATIERE ORGANIQUE	52
5.3.2.1. Les processus de formation du tritium organiquement lié (TOL)	52
5.3.2.2. Le fractionnement isotopique dans la matière organique	53
6. RADIOTOXICITE ET TRANSFERT DU TRITIUM CHEZ L'HOMME	54
6.1. L'INCORPORATION DU TRITIUM	54
6.2. LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM	55
6.2.1. LA BIO-CINETIQUE DU TRITIUM DANS L'ORGANISME	55
6.2.2. L'IMPACT DU TRITIUM SUR LES ORGANISMES VIVANTS	56
6.3. LA DOSIMETRIE DU TRITIUM	57
7. LES PRINCIPALES BIOMOLECULES DE LA BIOMASSE VEGETALE	58
7.1. LES BIOMOLECULES DE STOCKAGE	59
7.1.1. LES GLUCIDES SIMPLES	59
7.1.2. L'AMIDON	60
7.2. LES BIOMOLECULES PARIETALES	61
7.2.1. LA CELLULOSE	62

7.2.2.	L'HEMICELLULOSE	63
7.2.3.	LA PECTINE	63
7.2.4.	LA LIGNINE	63
7.3.	LES BIOMOLECULES MEMBRANAIRES ET FONCTIONNELLES	64
7.3.1.	LES PHOSPHOLIPIDES	64
7.3.2.	LES PROTEINES	64
8.	CONCLUSION	66

1. INTRODUCTION

Ce chapitre présente une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur le tritium dans l'environnement et traite principalement de sa spéciation et sa métrologie au sein des matrices environnementales.

Dans une première partie, les généralités sur le tritium sont rappelées ainsi que ses origines naturelles et anthropiques.

Dans un second temps, les différentes formes de tritium retrouvées dans l'environnement et plus spécifiquement dans la matière organique sont abordées. Dans cette partie, des éléments de discussion viennent apporter des informations concernant l'ensemble des interrogations qui ont conduit au développement des différentes problématiques de cette thèse.

Par la suite, la circulation du radionucléide dans l'environnement ainsi que sa radiotoxicité et son transfert à l'Homme sont également détaillés.

Enfin, un récapitulatif des principales biomolécules de la biomasse terrestre et de leur structure moléculaire associée est proposé afin de clôturer ce chapitre.

2. GENERALITES SUR LE TRITIUM

2.1. Découverte du tritium

En 1934, Lord Rutherford utilise du deutérium pour bombarder une cible d'eau lourde et observe l'émission de protons et de neutrons. Il attribue ces émissions à la formation d'un isotope de masse 3 de l'hélium, qu'il suppose instable, et d'un isotope de masse 3 de l'hydrogène, qu'il suppose stable (Belot *et al.*, 1996). Trois ans plus tard, Luis Walter Alvarez utilise la spectrométrie de masse et conclut que l'hélium-3 est soit un isotope instable avec une demi-vie radioactive conséquente, soit un isotope stable (Alvarez et Cornog, 1939a). Il démontre par la suite que le tritium est radioactif à l'inverse de l'hélium-3, qu'il supposera issu du tritium d'origine naturelle, suite à l'action des rayonnements cosmiques sur l'air (Alvarez et Cornog, 1939b).

2.2. Caractéristiques physico-chimiques et radiologiques

Le tritium (T ou ^3H) est l'isotope radioactif de masse 3 de l'hydrogène. Son noyau, appelé le triton, possède un proton et deux neutrons.

Les propriétés chimiques du tritium sont identiques à celles des isotopes stables naturels de l'hydrogène : le protium de masse 1 (^1H) et le deutérium de masse 2 (D ou ^2H). Ses propriétés physiques diffèrent des autres isotopes dans le cas de phénomènes et de réactions basés sur la masse. La différence de masse entre le protium et le tritium permet ainsi d'observer une cinétique différente pour une même réaction en fonction de l'isotope impliqué. Un phénomène de ségrégation et de faible enrichissement en tritium par rapport au protium dans une phase condensée peut également être observé lors de changements de phase de l'eau (ASN, 2010 ; McFarlane *et al.*, 1979). Cependant, la faible discrimination isotopique du tritium dans des conditions naturelles n'entraîne aucune accumulation qui puisse être significative (Belot *et al.*, 1996).

La demi-vie radioactive du tritium est de $12,312 \pm 0,025$ ans (Bé *et al.*, 2006) et sa constante de décroissance est de $5,6 \times 10^{-2} \text{ a}^{-1}$, ce qui signifie que 5,6 % du tritium disparaît chaque année. Son activité spécifique est de $3,560 \times 10^{14} \text{ Bq.g}^{-1}$ de tritium.

Le tritium est un émetteur β^- pur de faible énergie ($E_{\text{moyenne}} = 5,68 \pm 0,01 \text{ keV}$ et $E_{\text{max}} = 18,564 \pm 0,003 \text{ keV}$) (LNE-LNHB/CEA, 2006) qui se désintègre en hélium-3 par conversion d'un neutron en proton et en émettant un électron (Eq. I-1).



En raison de la faible énergie des électrons émis lors de la désintégration, leur parcours moyen dans l'eau est de 0,56 μm , avec des parcours maximum dans l'eau et dans l'air respectifs de 6 μm et 5mm (Browne et Firestone, 1986 ; ICRP, 1983).

3. ORIGINES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

3.1. Origines naturelles

3.1.1. Cosmogéniques

Le tritium est majoritairement produit dans l'atmosphère par des réactions nucléaires entre les principaux atomes atmosphériques (azote, oxygène) et les neutrons issus du rayonnement cosmique (Grosse *et al.*, 1951 ; Kaufman et Libby, 1954). Les réactions conduisant à la formation du tritium sont décrites par les équations (Eq. I-2), (Eq. I-3) et (Eq. I-4) suivantes (Belot *et al.*, 1996 ; Okada et Momoshima, 1993) :



3.1.2. Telluriques

Le tritium est produit en très faibles quantités dans la croûte terrestre, principalement par des réactions neutroniques entraînées par les phénomènes de fissions spontanées d'uranium-235 sur les traces de lithium-6 contenues dans les roches, ou par irradiation du deutérium (Belot *et al.*, 1996 ; Kaufman et Libby, 1954 ; Okada et Momoshima, 1993).

Les fusions nucléaires de type deutérium-deutérium dans le noyau terrestre sont également rapportées comme sources de formation du tritium après mesures dans des lacs volcaniques (Jiang et He, 2008).

L'inventaire naturel global du tritium est aujourd'hui estimé à $1,3 \times 10^{18}$ Bq (3,5 kg de tritium) correspondant à une production annuelle naturelle de $7,2 \times 10^{16}$ Bq.an⁻¹ (0,2 kg de tritium) (Belot *et al.*, 1996 ; IRSN, 2009b).

3.2. Origines anthropiques

3.2.1. Essais nucléaires atmosphériques

Les essais nucléaires atmosphériques réalisés entre 1945 et 1963, et principalement à partir de 1952, représentent la principale origine anthropique du tritium rémanent dans l'environnement. Le radionucléide est un sous-produit de réactions se produisant lors des explosions thermonucléaires, se formant à partir des réactions possibles suivantes (Belot *et al.*, 1996) :

- Pour les engins de type « fission », par l'interaction de neutrons rapides avec les constituants de l'air.
- Pour les engins de type « fusion », par les réactions successives se produisant lors de l'explosion.

Ces essais nucléaires auraient libéré 650 kg de tritium dans l'atmosphère, soit $2,34 \times 10^{20}$ Bq, dont 520 kg dans l'hémisphère Nord (UNSCEAR, 2000). Cette quantité produite a récemment été réévaluée à $1,86 \times 10^{20}$ Bq (UNSCEAR, 2016).

Considérant la décroissance radioactive du tritium, l'inventaire anthropique global du tritium dû aux essais nucléaires est estimé en 2020 à $5,9 \times 10^{18}$ Bq (16 kg de tritium), avec une répartition de 90 % dans les océans, 9 % dans les eaux continentales et 1 % dans l'atmosphère.

3.2.2. Installations nucléaires et industrielles

3.2.2.1. Les Centres Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE)

En fonctionnement normal, le tritium est le principal radionucléide rejeté par les installations nucléaires françaises, avec le carbone-14. Le tritium est un sous-produit des divers processus ayant lieu dans les réacteurs nucléaires et les quantités rejetées dans l'environnement dépendent du type de réacteur utilisé et de l'énergie produite (ASN, 2010). Les rejets en tritium entraînés sont des rejets principalement aquatiques et atmosphériques.

Sa production principale pour l'ensemble des types réacteurs, excepté le réacteur à eau lourde, a lieu dans le combustible lors de la fission ternaire de certains isotopes de l'uranium et du plutonium. Cependant, il reste en grande partie confiné dans les gaines du combustible sous forme d'hydrure de zirconium et ne participe donc que très peu aux rejets directs dans l'environnement (ASN, 2010 ; Belot *et al.*, 1996). Pour la majorité du tritium rejeté, la production est entraînée par des réactions d'activation de neutrons avec des isotopes de lithium et du bore dans le fluide du système de refroidissement des réacteurs (Belot *et al.*, 1996 ; Le Guen, 2008).

Les réacteurs à eau lourde (filrière canadienne CANDU) sont les réacteurs qui produisent et rejettent le plus de tritium dans l'environnement. Le tritium est alors principalement formé par activation neutronique du deutérium présent dans le caloporteur primaire. La production de tritium de l'ordre de 53650 TBq.GWe⁻¹.an⁻¹ dépasse de très loin la production principale des autres réacteurs dans le combustible lui-même (de l'ordre de 520 TBq.GWe⁻¹.an⁻¹) (ASN, 2010).

3.2.2.2. Les centres de retraitement du combustible

Le tritium produit par les CNPE dans le combustible est rejeté dans l'environnement par les centres de retraitement du combustible usé. Après dissolution du combustible sous forme d'oxyde, les rejets en tritium sont essentiellement évacués dans les effluents liquides sous forme d'eau tritiée dans le milieu marin. En France, l'installation de retraitement de la Hague rejette 1,0 x 10¹⁶ Bq.an⁻¹ pour 1600 tonnes de combustible retraité (Guétat *et al.*, 2008 ; Le Guen, 2008).

3.2.2.3. Les réacteurs dédiés à la production de tritium

Pour différentes applications, le tritium est produit artificiellement en quantité significative dans des réacteurs dédiés par irradiation du métal, d'alliages ou de sels de lithium ou encore dans des accélérateurs utilisant des neutrons pour bombarder de l'hélium-3 (Zerriffi, 1996). Outre les rejets en fonctionnement normal, des rejets accidentels importants de ces installations ont déjà été rapportés entre 1974 et 1984 (Ducros, 2018 ; UNSCEAR, 2016).

3.2.2.4. Les centres de recherche et d'étude

En France, plusieurs installations produisent et utilisent du tritium à des fins de recherche et développement. Les programmes de recherche principaux associés portent sur les réacteurs à eau pressurisée (CEA Cadarache), le marquage de molécules organiques et la production de faisceaux de neutrons (CEA Saclay) ou encore la neutronographie et la structure de la matière (ILL Grenoble). Certaines Installations Nucléaires de Base (INB) et Installations Nucléaires de Base Secrète (INBS) sont également concernées, avec des rejets en tritium de l'ordre de $7,5 \times 10^{14}$ Bq.an⁻¹ pour les INBS de Valduc et Marcoule en 2010 (ASN, 2010 ; Ducros, 2018).

3.2.2.5. Autres productions technogéniques industrielles

Des utilisations industrielles du tritium sont également sources de rejets de tritium technogéniques. Ces rejets se font sous forme de particules hautement tritiées provenant des industries pharmaceutiques ou encore de fabrication de lampes de sécurité de domaines aéronautiques et militaires. La production d'objets luminescents contenant du tritium sous forme de gaz comme dans l'industrie horlogère génère chaque année une proportion non négligeable des rejets en tritium (jusqu'à 5 % des rejets totaux). L'utilisation de molécules marquées pour des applications médicales est également responsable aujourd'hui de rejets environnementaux à hauteur de $1,0 \times 10^{14}$ Bq.an⁻¹ (Bacchetta, 2013 ; Guétat *et al.*, 2008).

3.2.3. Futures sources de production de tritium

3.2.3.1. Les gestions futures du combustible

Les combustibles utilisés dans les CNPE françaises vont progressivement évoluer vers des combustibles à plus fort taux d'enrichissement en uranium-235, nécessitant une augmentation du taux de bore dans le circuit primaire de refroidissement de réacteur afin de compenser l'excès de réactivité du combustible. Le tritium se formant par activation neutronique du bore-10, l'augmentation de sa concentration dans le circuit va entraîner une production accrue en tritium, menant à des rejets environnementaux plus importants. Une augmentation de près de 90% des rejets liquides annuels est estimée ($0,15$ g.an⁻¹ contre $0,08$ g.an⁻¹) (Le Guen, 2008).

3.2.3.2. Les réacteurs à fusion

L'installation ITER (International Thermonuclear Experimental Reactor) en France fait partie des projets de réacteurs thermonucléaires en cours d'élaboration dans le monde. Le principe de fonctionnement du réacteur à fusion repose sur la production d'énergie à partir de la réaction de fusion nucléaire entre le deutérium et le tritium. Ce type de réacteur contiendra des inventaires importants en tritium (de l'ordre de 10^{19} Bq) et sera également producteur de l'ordre de 5×10^{17} Bq par jour pour une puissance nominale de 1000 MW(e) (Coyle, 1978 ; Crowson, 1973 ; Häfele *et al.*, 1977). Après un processus de filtration et de détritiation, les rejets en tritium produit dans l'environnement sont estimés à $9,0 \times 10^{13}$ Bq.an⁻¹ (IRSN, 2009b).

Un bilan récapitulatif des différentes sources de tritium dans l'environnement est présenté dans le Tableau I-1.

Tableau I-1 : Récapitulatif des différentes quantités et sources de tritium dans l'environnement.

Source	Inventaire global (kg)	Quantité rejetées (Bq.an ⁻¹)	Références
Production naturelle (Monde)	3,5	$7,2 \times 10^{16}$	(Belot <i>et al.</i> , 1996 ; IRSN, 2009b)
Essais nucléaires atmosphériques (Monde)	16	-	(UNSCEAR, 2016)
Installations nucléaires (Monde)	-	$2,8 \times 10^{16}$	(UNSCEAR, 2016)
CNPE (France en 2008)	-	$1,0 \times 10^{15}$	(IRSN, 2009b)
Centre de retraitement de combustible usé de la Hague (France)	-	$1,0 \times 10^{16}$	(Guétat <i>et al.</i> , 2008 ; UNSCEAR, 2016)
INBS de Valduc et Marcoule (France en 2010)	-	$7,5 \times 10^{14}$	(ASN, 2010)
Réacteurs dédiés à la production de tritium et autres installations	-	$1,8 \times 10^{15}$	(ASN, 2010)
ITER (France – rejets prévus)	-	$9,0 \times 10^{13}$	(IRSN, 2009b)

4. LES DIFFERENTES FORMES DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

En tant qu'isotope de l'hydrogène, le tritium présent dans l'environnement suit le cycle de l'eau et peut se retrouver dans toute molécule hydrogénée et dans tous les compartiments de la planète.

4.1. Le tritium sous forme liquide

Dans le milieu naturel et les espèces vivantes, l'eau tritiée (HTO) est la forme prépondérante du tritium. Elle est également la forme principale rejetée dans les eaux de surface après production anthropique (Belot *et al.*, 1996). Après rejet, cette forme suit le cycle géochimique de l'eau et se dilue dans tous les compartiments de la Terre.

Les molécules d'eau (H₂O) ont des propriétés de dissociation partielle en ions H⁺ et HO⁻ (ASN, 2010). Le tritium sous forme d'eau tritiée (HTO) a alors la faculté de s'échanger de façon rapide avec les atomes de protium environnants et les équilibres décrits par les équations (Eq. I-5) et (Eq. I-6) s'établissent :



4.2. Le tritium sous formes gazeuses

Dans l'atmosphère, des formes gazeuses du tritium sont présentes en quantités bien inférieures à l'eau tritiée (HTO), pour une participation maximale de 10 % à la quantité totale de tritium dans l'environnement (Jacobs, 1968). Le tritium rejeté à l'état gazeux est majoritairement sous forme de vapeur d'eau tritiée mais peut également être retrouvé sous forme d'hydrogène tritié (HT) et de méthane tritié (CH₃T). Sous l'effet de processus d'oxydation, une partie du tritium sous forme gazeuse passe à l'état liquide et rejoint le cycle de l'eau (Belot *et al.*, 1996).

4.3. Le tritium dans les organismes vivants

4.3.1. Le tritium dans l'eau tissulaire (TED)

Le tritium peut se retrouver dans l'eau libre des organismes vivants sous forme d'eau tritiée. Cette fraction est appelée « Tritium de l'Eau de Déshydratation » (TED) ou « Tissue Free Water Tritium » (TFWT) en anglais. L'eau tissulaire tritiée a une concentration en équilibre permanent avec le tritium de son environnement proche. Cette capacité provient de la propriété d'échange (ou labile) des atomes d'hydrogène jusqu'à l'obtention d'un équilibre isotopique.

4.3.2. Le tritium dans la matière organique

Après incorporation dans un organisme vivant, le tritium se lie à la matière organique et forme la fraction tritium organiquement lié (TOL). Les liaisons TOL dans les molécules organiques sont générées à partir de processus de biosynthèse (comme la photosynthèse), de processus métaboliques ou d'échanges avec l'environnement proche (Kim *et al.*, 2013). Dans la fraction TOL, le tritium est substitué à un atome d'hydrogène et s'implique dans les mêmes liaisons chimiques. Le TOL peut alors se retrouver engagé dans deux types de liaisons :

- Des liaisons covalentes faibles : en liaison polarisée avec des hétéroatomes (azote, oxygène, soufre) ou des halogènes (F, Cl, Br, ...); ou bien encore avec un carbone α d'une cétone ou d'un aldéhyde énolisable.
- Des liaisons covalentes fortes : en liaison avec des atomes de carbone. Dans les végétaux, il est estimé que 70 à 80 % des atomes d'hydrogène sont impliqués dans ces liaisons carbonées stables (Diabaté et Strack, 1993 ; Guenot et Belot, 1984 ; Lang et Mason, 1960 ; Pointurier *et al.*, 2004 ; Yamada *et al.*, 1992).

Le tritium organiquement lié (TOL) peut se distinguer sous deux formes : le tritium organiquement lié échangeable (TOL-E) et le tritium organiquement lié non-échangeable (TOL-NE) (Guenot et Belot, 1984 ; Jean-Baptiste *et al.*, 2010 ; Mann, 1971), qui se différencient selon les propriétés suivantes:

- *Le tritium organiquement lié échangeable (TOL-E)* : Cette forme de tritium est en équilibre constant avec l'eau libre de l'organisme vivant, elle-même en équilibre avec le tritium de l'environnement proche. L'équilibre établi entre ces différentes formes est représenté par l'équation (Eq. I-7) suivante :

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{env} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{TED} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-E} \quad \text{Eq. I-7}$$

Avec :

$\left(\frac{T}{H}\right)_{env}$: le rapport tritium sur hydrogène dans l'environnement proche,

$\left(\frac{T}{H}\right)_{TED}$: le rapport tritium sur hydrogène dans l'eau libre de l'organisme,

$\left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-E}$: le rapport tritium sur hydrogène de la fraction échangeable du TOL de l'organisme.

- *Le tritium organiquement lié non-échangeable (TOL-NE)* : Cette forme de tritium n'est pas soumise à l'échange avec les atomes d'hydrogène de l'environnement proche et persiste dans la molécule organique porteuse dès son intégration. Le TOL-NE est éliminé de l'organisme uniquement par dégradation du composé organique auquel il est incorporé. Cette faculté de stabilité lui permet d'être représentatif de la quantité de tritium présente dans l'environnement au moment de son incorporation et de la formation de la molécule porteuse. Le TOL-NE est notamment utilisé pour réaliser des suivis rétrospectifs de rejets tritiés à partir de cernes d'arbres (Fuma et Inoue, 1995).

4.3.2.1. Introduction à la spéciation

Le terme « spéciation » est utilisé pour exprimer un concept dont la définition varie en fonction du contexte. Dans le domaine de la biologie, la spéciation fait référence à un processus évolutif par lequel de nouvelles espèces biologiques se développent à partir d'organismes communs (Templeton et Fujishiro, 2017). Pour les géochimistes, la spéciation désigne les phénomènes de transformation d'espèces chimiques pendant le cycle géochimique. En chimie, la spéciation peut s'apparenter à différents concepts précédemment définis comme l'analyse des espèces, la description de l'abondance des espèces, la réactivité d'une espèce donnée ou bien encore la transformation d'une espèce en une autre (Bernhard *et al.*, 1986 ; Templeton et Fujishiro, 2017).

A partir de ces informations, l'UICPA (l'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée) a défini la spéciation chimique d'un élément comme la représentation de sa distribution parmi des espèces chimiques définies dans un système (Nordberg *et al.*, 2004).

Dans le cadre des présents travaux de recherche, la spéciation du tritium organiquement lié se caractérise alors par la distinction entre les différentes formes de TOL et la compréhension de leur nature associée au sein d'un environnement donné.

4.3.2.2. La nature du TOL-E et du TOL-NE

Les propriétés des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans les organismes vivants ont été définies dans le point précédent. Cependant, la description de leur nature exacte ne fait pas consensus au sein de la communauté scientifique et plusieurs visions s'opposent concernant leur répartition dans un organisme vivant (Kim *et al.*, 2013).

4.3.2.2.1. *Le point de vue analytique*

Le point de vue analytique décrit les formes échangeable et non-échangeable du TOL en fonction du type de liaison dans laquelle le tritium est impliqué (Baglan *et al.*, 2005 ; Pointurier *et al.*, 2003).

Dans le cas du TOL-E, le tritium est supposé impliqué dans une liaison covalente faible, ce qui explique sa capacité d'échange avec les atomes d'hydrogène environnants et ses propriétés labiles. Dans le cas du TOL-NE, le tritium est alors supposé impliqué dans une liaison covalente forte, avec un atome de carbone. La stabilité de cette liaison explique alors sa non-intervention dans les processus basés sur les équilibres isotopiques et sa persistance dans la molécule organique porteuse.

A partir de ces descriptions, il est alors possible de calculer un facteur de répartition des positions théoriquement échangeables et non-échangeables dans toutes les molécules dont la formule développée est connue. L'exemple en Figure I-1 représente la molécule de glucose ($C_6H_{12}O_6$) et la répartition de 5 atomes d'hydrogène en positions théoriques échangeables (env. 42 % de l'hydrogène total) et 7 atomes d'hydrogène en positions théoriques non-échangeables (env. 58 % de l'hydrogène total).

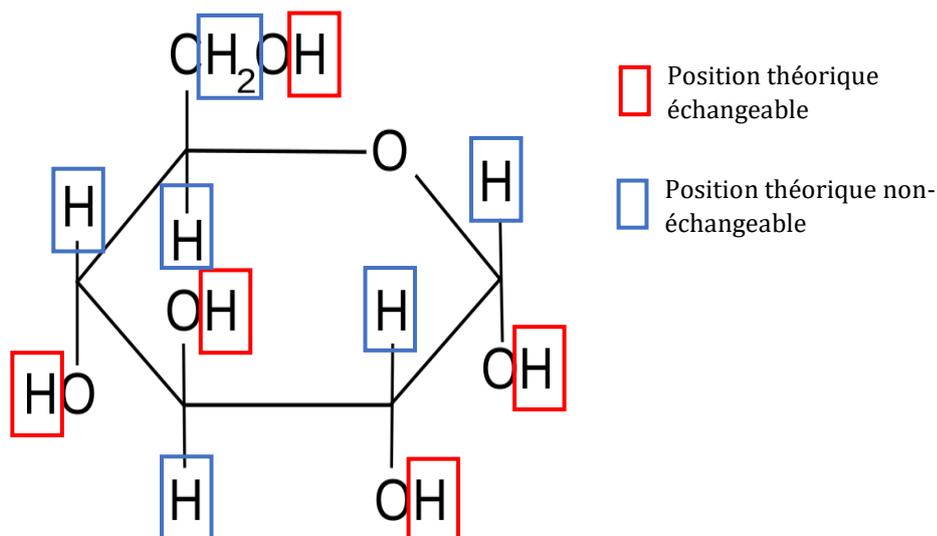


Figure I-1 : Répartition des positions hydrogènes théoriques échangeables et non-échangeables dans la molécule de glucose.

Le paramètre ($\alpha_{\text{modèle}}$) d'une molécule permet alors de représenter la proportion d'atomes d'hydrogène en position théorique échangeable dans la molécule, selon l'équation (Eq. I-8).

$$(\alpha_{\text{modèle}}) = \frac{H_{\text{échangeable théorique}}}{H_{\text{totaux}}} \quad \text{Eq. I-8}$$

Par extension, il est possible de calculer le paramètre d'échangeabilité basé sur les modèles moléculaires des biomolécules ou paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{\text{modèle}}$) dans toutes les matrices environnementales dont la composition exacte est connue, selon l'équation (Eq. I-9).

$$(\alpha_{\text{modèle}}) = \frac{\sum_{i=1}^n (\alpha_{\text{modèle}})_i \times t_i}{\sum_{i=1}^n t_i} \quad \text{Eq. I-9}$$

Avec :

$(\alpha_{\text{modèle}})_i$: le paramètre ($\alpha_{\text{modèle}}$) de chaque molécule « i » de la matrice,

t_i : la teneur en chaque molécule « i » dans la matrice.

La vision de l'analyste se base alors sur l'hypothèse que l'ensemble des atomes d'hydrogène impliqués dans ces positions définies comme échangeables vont réellement s'échanger avec leur environnement proche, à l'inverse de ceux impliqués dans les positions définies comme non-échangeables.

Cependant, plusieurs études ont montré un décalage entre le paramètre ($\alpha_{\text{modèle}}$), répondant à la vision analytique, par rapport à des taux d'échangeabilité de l'atome d'hydrogène obtenus expérimentalement sur certaines matrices (Kim et Korolevych, 2013 ; Péron *et al.*, 2018). Les descriptions établies par le point de vue analytique ne sont donc pas suffisantes pour décrire la nature des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans l'ensemble des matrices environnementales.

4.3.2.2.2. *Le point de vue structural*

Le point de vue structural reprend la vision analytique pour décrire la répartition des fractions TOL-E et TOL-NE mais ajoute un critère de disponibilité et d'accessibilité des atomes dans les macromolécules organiques (Baumgartner et Donhaerl, 2004 ; Diabaté et Strack, 1993 ; Kim *et al.*, 2013).

En effet, certaines macromolécules biologiques (cellulose, protéines...) présentent des conformations moléculaires impliquant des liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires ou encore des interactions de van der Waals. Ces interactions sont impliquées au niveau des liaisons covalentes faibles de la macromolécule, i.e. au niveau des positions théoriques échangeables de la vision analytique. De plus, la complexité structurale d'une macromolécule entraînée par des phénomènes électrostatiques et des interactions hydrophobes peut également provoquer le piégeage de ces positions par enfouissement.

Ces phénomènes vont alors réduire la disponibilité pour l'échange isotopique des atomes impliqués et le tritium incorporé dans ces positions dites échangeables se retrouve piégé dans la macromolécule, par liaison ou par entrave dans la structure. De fait, ce tritium non accessible, renommé « tritium enfoui » ou « buried tritium » en anglais, n'a plus la capacité de s'échanger rapidement avec les atomes d'hydrogène environnants et se comporte comme un tritium organiquement lié non-échangeable.

Dans ce cas, les auteurs décrivent le TOL-NE comme étant la somme de ces deux contributions : $\text{TOL-NE} = \text{CBT} + \text{XBT}_{\text{buried}}$ où CBT correspond au tritium lié aux atomes de carbone (i.e. TOL-NE selon la vision analytique) et $\text{XBT}_{\text{buried}}$ au tritium en liaison covalente faible mais enfoui dans la molécule.

Le TOL-E est alors décrit comme le tritium impliqué dans une liaison covalente faible et qui reste disponible et accessible pour l'échange isotopique dans la macromolécule. Ce TOL-E doit pouvoir s'échanger avec les atomes d'hydrogène de l'eau et est donc nommé XBT_{rinsed} , le tritium de rinçage (Baumgaertner *et al.*, 2009 ; Baumgartner et Donhaerl, 2004).

4.3.2.3. Discussion

En considérant toutes ces descriptions, il est possible de discerner le manque de consensus global sur la nature des formes échangeable et non-échangeable du TOL des matrices environnementales. Dans son Livre Blanc du Tritium publié en 2010, l'ASN établit que ce défaut d'harmonisation est responsable des difficultés d'interprétation des résultats inter-laboratoires et à l'origine d'une controverse sur l'existence éventuelle d'un phénomène de bioaccumulation du tritium dans des organismes marins (ASN, 2010). En 2017, le rapport d'actualisation de l'IRSN confirme l'intérêt de mieux déterminer les formes du TOL afin de permettre des interprétations correctes des facteurs de concentration et d'évaluation de la rémanence du tritium dans l'environnement (IRSN, 2017). Pour approfondir les connaissances sur le comportement du tritium, il est alors fondamental d'engager des investigations sur la distribution des fractions TOL-E et TOL-NE dans les matrices environnementales.

En ce sens, la spéciation du tritium organiquement lié est un concept qui permet de décrire et d'établir la nature des différentes formes du TOL dans les molécules organiques des matrices environnementales. Dans les précédents travaux consacrés à cette thématique, la spéciation a été perçue dans le cas de matrices individuelles uniquement et par la comparaison de leur paramètre ($\alpha_{\text{modèle}}$) à un paramètre d'échangeabilité obtenu expérimentalement. Cependant, il apparaît toujours un manque d'informations nécessaires à une compréhension plus globale de la nature et de la répartition des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans l'ensemble des matrices de la biomasse terrestre.

Un premier objectif de ce présent travail de thèse est alors d'apporter des éléments de réponse supplémentaires aux questionnements soulevés sur l'implication de l'ensemble des biomolécules et de leurs structures moléculaires présentes dans la biomasse terrestre dans l'établissement du comportement du TOL des matrices de l'environnement.

4.3.3. Analyses du tritium

La mesure de l'activité en tritium d'un échantillon solide ou liquide à des niveaux environnementaux peut s'effectuer soit par scintillation liquide (après combustion de l'échantillon solide) ou soit par spectrométrie de masse (après recroissance de l'hélium-3).

- La scintillation liquide est une technique de mesure de l'activité radioactive d'un échantillon sous la forme liquide. Les échantillons solides sont préalablement traités afin d'extraire le tritium sous forme d'eau tritiée. La calcination par combustion dans un four tubulaire en quartz est une technique d'oxydation sous courant d'oxygène. L'eau de combustion ainsi formée est récupérée dans un piège à froid puis, neutralisée (à partir de composés anhydres comme du NaCO_3) et enfin distillée (CETAMA 384, 2013). Les étapes de neutralisation et de distillation permettent d'éliminer les impuretés responsables des effets d'affaiblissement lumineux pendant la mesure par scintillation liquide. La concentration en activité de l'eau de combustion mesurée est exprimée en Bq.L^{-1} (ou Bq.kg^{-1}) d'eau de combustion.
- La spectrométrie de masse est une technique d'analyse utilisée pour identifier des éléments d'intérêt par séparation en fonction de leur rapport masse sur charge. Dans une configuration spécifique à la mesure de l'hélium, les échantillons solides ou liquides sont préalablement conservés dans un récipient hermétique purgé de tout l'hélium atmosphérique. Le récipient est scellé pendant une période de 4 à 12 mois pendant lesquels l'hélium-3 est produit par désintégration du tritium. La teneur en tritium dans l'échantillon est par la suite déduite de la teneur en hélium-3 mesurée (IRSN, 2017 ; Jean-Baptiste *et al.*, 1992, 2010).

La technique de mesure par spectrométrie de masse est intéressante pour la mesure de teneurs en tritium proche de la limite de détection des compteurs à scintillation liquide mais la durée nécessaire de mise en place de plusieurs mois est bien plus importante. La technique de mesure par scintillation liquide est donc la technique de mesure privilégiée pour les activités en tritium dans l'environnement et les organismes vivants et sera la seule abordée dans la suite de ces travaux.

4.3.3.1. La mesure de la fraction TED

L'eau libre contenant la fraction TED est extraite d'un échantillon par processus de déshydratation réalisé par lyophilisation, distillation simple, distillation azéotropique, dilution ou séchage simple à l'étuve. La lyophilisation est la technique de déshydratation privilégiée car la dégradation de la matière organique qu'elle engendre est limitée (CETAMA 384, 2013). Son principe de fonctionnement repose sur la sublimation de l'eau libre de l'échantillon préalablement congelé et sa condensation dans un piège froid. Cette eau est ensuite récupérée et distillée pour la mesure de l'activité de la fraction TED de l'échantillon par scintillation liquide.

4.3.3.2. La mesure de la fraction TOL

Après déshydratation et élimination de la fraction TED, un échantillon est calciné dans un four à combustion. L'eau de combustion récupérée est neutralisée, distillée et l'activité massique de la fraction TOL de l'échantillon est mesurée par scintillation liquide.

4.3.3.3. La quantification des fractions TOL-E et TOL-NE

A partir d'un échantillon déshydraté, une séparation des formes échangeable et non-échangeable du TOL est réalisée sur la base de leurs propriétés labiles respectives.

L'échantillon est placé dans un environnement saturé en atomes d'hydrogène stables pour extraire la fraction TOL-E de l'échantillon (cf Eq. I-7). Progressivement, l'équilibre isotopique s'établit et les atomes de tritium de la fraction TOL-E sont remplacés par des atomes d'hydrogène stables dans l'échantillon. A l'équilibre, lorsque l'activité en tritium de la fraction TOL est stable, l'échantillon récupéré est considéré dépourvu de sa fraction TOL-E. L'activité résiduelle en TOL-E dans l'échantillon à l'équilibre est évaluée comme négligeable (Baglan *et al.*, 2010). La réaction finale résultante de cet équilibre est représentée par l'équation (Eq. I-10) suivante :



L'échantillon récupéré après l'échange isotopique est déshydraté par lyophilisation et ne contient que la forme non-échangeable du TOL (fraction TOL-NE). Après traitement par combustion, neutralisation et distillation, la concentration en activité du TOL-NE est mesurée dans l'eau de combustion par scintillation liquide. La concentration en activité du TOL-E peut ensuite être déterminée soit par mesure dans l'environnement d'échange, soit par calcul, par différence entre l'activité de la fraction TOL initiale et celle de la fraction TOL-NE.

La procédure globale pour la quantification des différentes fractions du tritium dans les organismes vivants est schématisée dans la Figure I-2 ci-dessous :

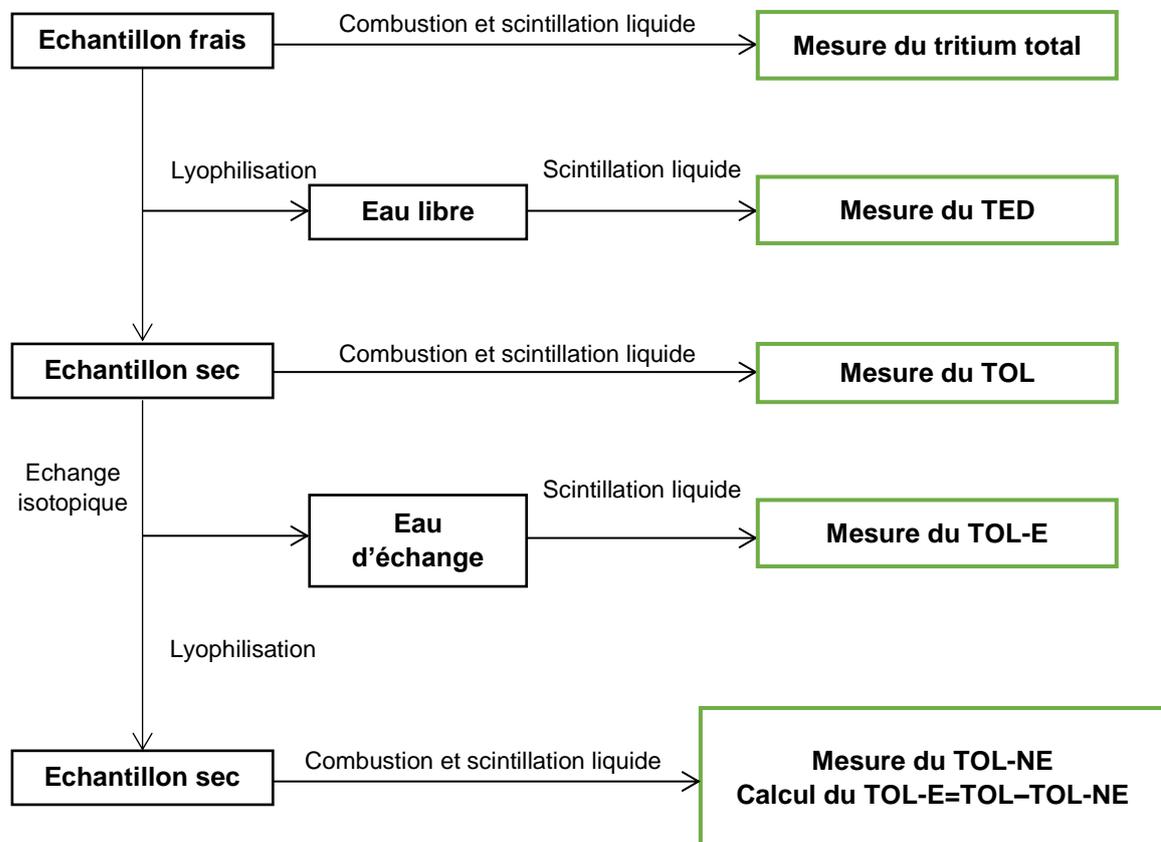


Figure I-2 : Procédure pour l'analyse des différentes fractions de tritium dans les matrices environnementales, adaptée de (ASN, 2010).

4.3.3.4. Discussion

A ce jour, les mesures du tritium dans l'eau libre (TED) et du tritium organiquement lié (TOL) sont les seules mesures du tritium dans les échantillons environnementaux solides dont la méthode est maîtrisée et utilisée en routine dans le cadre de la surveillance environnementale (AFNOR, 2020 ; CETAMA 384, 2013). Une méthode fiable pour l'analyse des fractions TOL-E et TOL-NE fait à ce jour défaut du fait de l'intrusivité des procédures actuelles. Pourtant, la forme non-échangeable du TOL retrouvée dans une matrice environnementale est directement représentative de la quantité de tritium rejetée dans l'environnement pendant la phase de croissance de l'organisme. En ce sens, la validation d'une méthode de mesure fiable des différentes formes de TOL trouve un intérêt important dans le cadre des études rétrospectives des rejets, mais également pour l'amélioration de la compréhension de la distribution du tritium dans l'environnement.

La méthode d'échange isotopique la plus répandue et utilisée pour la séparation du TOL-E et du TOL-NE, renommée ici « voie dure », est réalisée en phase aqueuse. L'échantillon déshydraté est immergé dans un excès d'eau atritiée puis récupéré à l'équilibre après 48 heures de contact. Cependant, les travaux présentés dans Bacchetta (2013) ont mis en évidence la solubilisation de certains composés organiques de l'échantillon pendant l'échange sur plusieurs types de matrices étudiées. Certaines molécules solubilisées étant porteuses de TOL-NE, celui-ci se retrouverait alors solubilisé dans l'eau d'échange et comptabilisé comme de la fraction TOL-E. Cette méthode d'échange isotopique présente donc l'inconvénient d'engendrer un potentiel biais analytique avec une estimation inadéquate des fractions TOL-E et TOL-NE dans une matrice étudiée.

En réponse à cette difficulté, des premiers essais ont été réalisés en phase vapeur, dans un système sous vide où l'eau atritiée est chauffée et séparée de l'échantillon par une cavité filtrante (Baglan *et al.*, 2008). Les paramètres de pression et de température ainsi modifiés dans le système entraînent le passage partiel en phase vapeur de l'eau atritiée liquide et sa percolation à travers l'échantillon. Pourtant, l'utilisation de cette technique en l'état provoque une dégradation partielle de l'échantillon initial pouvant également engendrer un biais analytique.

Plus récemment, une nouvelle méthode en phase vapeur, renommée ici « voie douce », a été mise au point au laboratoire Subatech à Nantes, en collaboration avec EDF et le LSCE (projet NEEDS 2013-2014). Cette nouvelle méthode est développée à partir d'un système spécifique avec des paramètres de température ($20 \pm 0,1^\circ\text{C}$) et d'humidité relative ($85 \% < \text{HR} < 88 \%$) contrôlés et stables (Péron *et al.*, 2018 ; Schimmelmänn, 1991). Le passage partiel en phase vapeur de l'eau atritiée à basse température est alors assuré par la sursaturation de la phase liquide en chlorure de potassium.

Les phénomènes de solubilisation et de dégradation de la matière organique d'un échantillon sont ainsi supposés négligeables lors de l'utilisation de la méthode d'échange isotopique « voie douce ».

Un deuxième objectif de ce présent travail de thèse est alors d'exploiter les informations obtenues par la nouvelle méthode « voie douce » afin de statuer sur la fiabilité de la méthode « voie dure » dans le cadre de l'analyse des différentes formes de TOL dans les matrices environnementales.

4.4. Le tritium sous formes technogéniques

A partir de productions industrielles, le tritium peut se retrouver dans l'environnement sous forme de composés tritiés dits technogéniques. Dans le cas de l'industrie pharmaceutique, un grand nombre de molécules organiques tritiées (MOT) parmi lesquelles des acides aminés, acides lipidiques, acides gras, précurseurs d'acides nucléiques, vitamines, stéroïdes, et autres molécules organiques de synthèse sont retrouvés dissous dans les rejets aqueux. A la différence de la classification du tritium organiquement lié (TOL), les molécules organiques tritiées (MOT) sont des précurseurs organiques dont le comportement est dépendant du métabolisme de la molécule considérée. Ainsi, le tritium introduit dans un organisme vivant à partir d'une MOT est incorporé en suivant le comportement biologique de la molécule organique porteuse.

5. CIRCULATION DU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

5.1. Le tritium dans le cycle de l'eau

Le tritium est rejeté dans l'environnement majoritairement sous forme liquide d'eau tritiée (HTO). Les rejets gazeux, minoritaires, sont sous la forme de vapeur d'eau tritiée, d'hydrogène tritié (HT) ou de méthane tritié (CH₃T). Le tritium étant un isotope de l'hydrogène, sa circulation sous sa forme liquide dans l'environnement est identique à celle de l'eau, définie par son cycle géochimique présenté en Figure I-3.

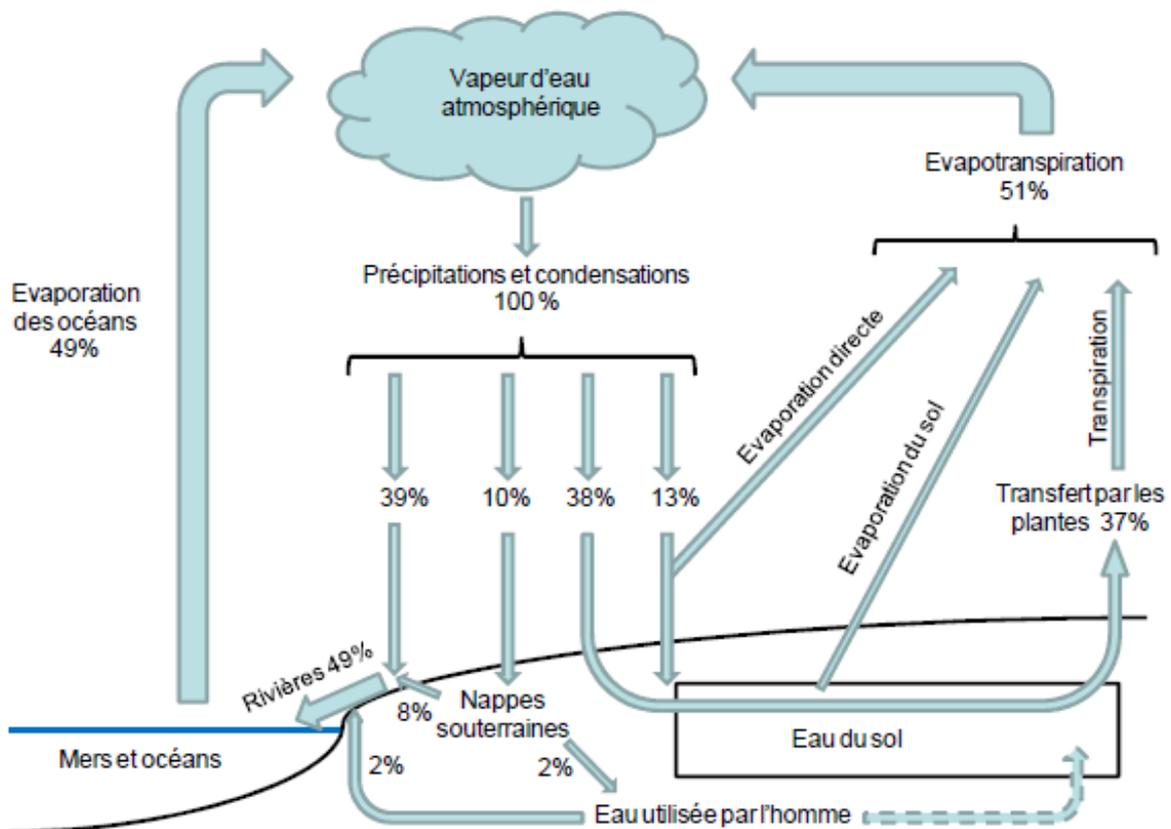


Figure I-3 : Cycle géochimique de l'eau en milieu tempéré océanique, circulation et transfert dans les compartiments terrestres (Keller, 1980).

L'eau tritiée, sous forme liquide ou gazeuse, intègre rapidement le cycle de l'eau et se dilue très vite dans les différents compartiments terrestres. Les formes gazeuses (HT) et (CH₃T) étant faiblement hydrosolubles, elles sont entraînées par dépôts secs et le tritium est dispersé par échanges avec les molécules de surface.

Les échanges entre les compartiments aquatiques et l'atmosphère sont gouvernés par les processus naturels de changement de phase de l'eau (évaporation, condensation, etc.) et de précipitations.

La concentration moyenne en tritium retrouvée dans l'environnement après rejets est drastiquement réduite à de très bas niveaux par les grandes capacités de dilution de l'atmosphère et de l'hydrosphère (McFarlane *et al.*, 1979 ; Momoshima *et al.*, 1991). Le facteur de dilution augmente alors en fonction de la distance avec le point de rejet initial.

L'activité des rejets tritiés en milieu marin de l'usine de retraitement du combustible usé de la Hague a été quantifiée entre le point de rejet et l'estuaire de la Seine. Dans cette étude, il a été montré que seulement 0,3 % de la quantité de tritium rejetée en mer était transférée dans l'atmosphère (Maro *et al.*, 2005). Dans le cas des essais nucléaires, le tritium relâché a principalement été collecté par les océans et les activités relatives ont été suivies par mesure dans les eaux de pluie. Le traité d'interdiction partielle des essais nucléaires signé en 1963 a conduit à la réalisation de ces essais uniquement en milieux souterrains à partir de cette date, jusqu'à la signature en 1996 du traité d'interdiction complète des essais nucléaires signé (TICEN ou TICE). Depuis plusieurs années, le niveau de tritium mesuré dans les eaux de pluie est similaire à celui présent avant les essais, soit inférieur à $0,6 \text{ Bq.L}^{-1}$ d'eau de pluie (Palomo *et al.*, 2007). L'évolution des activités en tritium mesurées depuis les essais est présentée en Figure I-4.

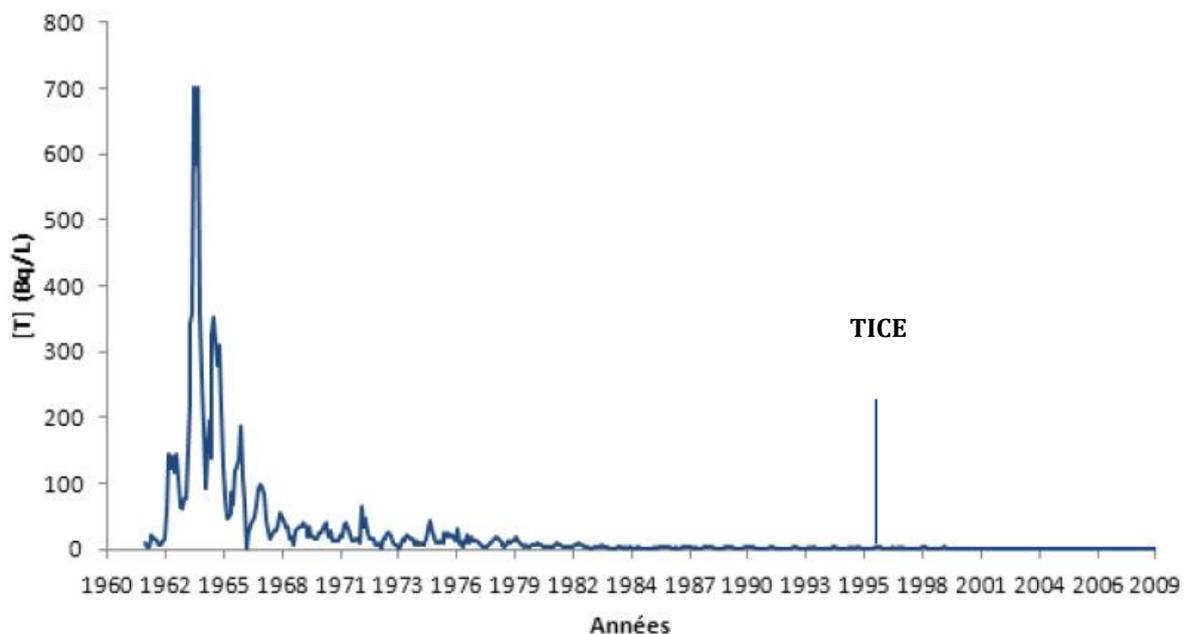


Figure I-4 : Evolution de la teneur en tritium dans l'eau de pluie de 1960 à 2009 à Vienne, d'après les données AIEA (Global Network of Isotopes in Precipitations, the GNIP database).

5.2. La circulation du tritium dans les sols

5.2.1. Les transferts sous forme d'eau tritiée

Les rejets tritiés liquides (HTO), en intégrant le cycle de l'eau, s'introduisent en partie dans les nappes phréatiques où ils se mélangent directement avec l'eau du sol.

A l'interface sol-atmosphère, les apports tritiés proviennent de dépôts de rejets sous formes principales de (HT) et d'eau tritiée (HTO) dans les précipitations ou sous forme de vapeur. Les échanges de tritium sont alors conditionnés par les processus de dépôts (de l'air vers le sol) et de réémission par évaporation (du sol vers l'air).

Au contact du sol, l'hydrogène tritié (HT) diffuse à travers les pores et est rapidement converti en eau tritiée grâce à l'action oxydante de micro-organismes. Le type de sol est un paramètre clé de la vitesse de dépôt de (HT) et de sa transformation. Ces phénomènes sont conditionnés par la température du sol et son taux d'humidité (ASN, 2010). Une fois converti en eau tritiée, l'hydrogène tritié (HT) rejoint le flux hydrique et suit les cheminements de l'eau tritiée sous forme liquide ou vapeur.

Le dépôt d'eau tritiée (HTO) peut survenir sous la forme d'un dépôt sec de vapeur ou d'un dépôt humide par précipitations. La vapeur d'eau tritiée se dépose 10 à 100 fois plus vite que l'hydrogène tritié (HT) sur les sols. Sa diffusion prend place par échange rapide avec la vapeur d'eau présente dans les pores des couches superficielles du sol (ASN, 2010 ; Belot *et al.*, 1996).

La majeure partie de l'eau tritiée ainsi déposée dans le sol est réémise dans l'atmosphère par évaporation, jusqu'à 90 % (Choi *et al.*, 2000). Un équilibre isotopique s'établit entre le sol et l'atmosphère entraînant une évaporation généralement préférentielle des molécules d'eau tritiée (Belot *et al.*, 1996). La réémission est très rapide dans les premières heures puis décroît progressivement en fonction du temps (Boyer *et al.*, 2009). L'eau tritiée restante dans les sols peut être intégrée dans les végétaux par absorption racinaire ou participe à la synthèse de la biomasse par les micro-organismes (Boyer *et al.*, 2009).

5.2.2. **Les transferts sous forme de matière organique**

La matière organique des sols est composée d'un continuum de constituants organiques en décomposition sous l'action de micro-organismes. Ces composés proviennent de la dégradation de la biomasse végétale et de ses biopolymères. Ainsi, du tritium organiquement lié (TOL) peut se retrouver intégré à la matière organique des sols par incorporation de molécules organiques d'origine végétale porteuses de TOL. Si le TOL-E est rapidement éliminé de la molécule par échange isotopique, le TOL-NE se retrouve incorporé dans les deux fractions de la matière organique des sols :

- La fraction organique du sol dite « labile », formée de biomolécules très facilement métabolisables dans les sols et se recyclant assez rapidement, comme les acides aminés, les sucres et les polysaccharides. Dans cette fraction, le TOL-NE peut soit transiter et être progressivement évacué par dégradation de la molécule porteuse, soit rejoindre d'autres molécules plus stables par incorporation de sa molécule dans un plus grand complexe moléculaire de la fraction dite « stabilisée ».
- La fraction organique du sol dite « stabilisée », formée de biomolécules stables et résistantes à l'action des micro-organismes du sol comme les substances humiques ou autres produits issus de la dégradation partielle de la lignine ou de reconfiguration moléculaire. Ces éléments ont un caractère récalcitrant principalement dû à la diversité de leurs groupements fonctionnels et au caractère aléatoire de leur conformation. Ces substances retiennent le TOL-NE dans les sols et peuvent alors persister entre 50 à 2000 ans (Campbell *et al.*, 1967 ; Dommergues et Manganot, 1970).

5.3. La circulation du tritium dans les végétaux

Les végétaux sont situés à la base de la chaîne alimentaire et sont les principaux contributeurs à la formation de tritium organiquement lié (TOL). Ainsi, la flore végétale fait partie intégrante des matrices d'intérêt pour la compréhension du comportement du tritium dans l'environnement. L'intégration et la circulation du tritium dans les végétaux sont conditionnées par le fonctionnement hydrique du végétal ainsi que par la photosynthèse et les processus métaboliques diurnes et nocturnes (ASN, 2010 ; Galeriu *et al.*, 2013).

L'ensemble du processus d'intégration et de circulation du tritium dans les végétaux est schématisé dans la Figure I-5 ci-dessous.

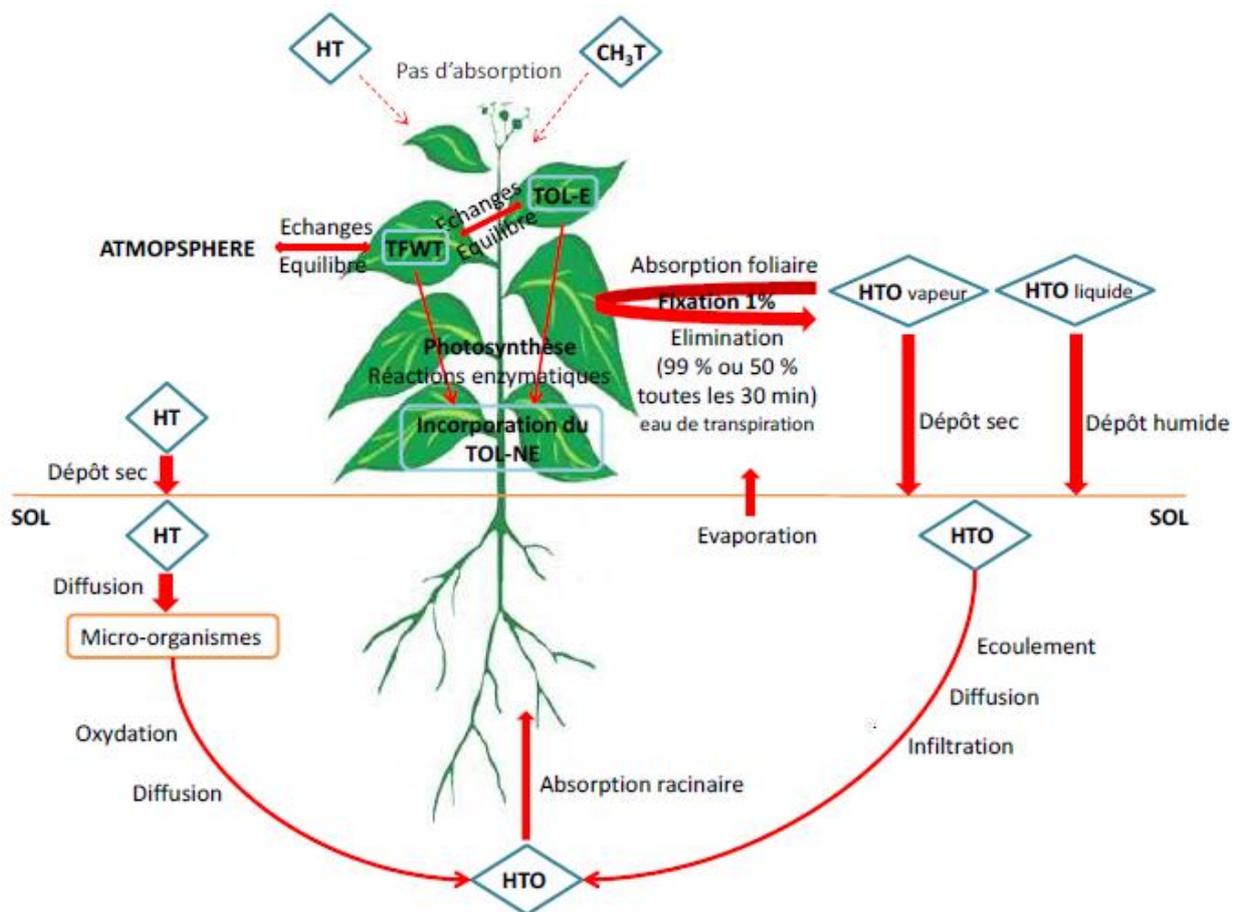


Figure I-5 : Transfert et circulation du tritium de l'environnement dans les végétaux (Bacchetta, 2013).

5.3.1. L'absorption de l'eau tritiée

Le tritium est intégré aux végétaux sous forme d'eau tritiée (HTO), liquide ou vapeur, mais ne s'absorbe que très peu sous forme d'hydrogène tritié (HT). L'intégration de l'hydrogène tritié (HT) est alors favorisée par le processus d'oxydation par certaines bactéries des sols qui permettent sa transformation en eau tritiée (Belot *et al.*, 1996 ; McFarlane *et al.*, 1979). Le méthane tritié (CH₃T) est également très peu intégré dans des conditions rares et des proportions généralement négligeables (McFarlane *et al.*, 1979).

L'absorption de l'eau par le végétal se déroule par voie racinaire avec l'eau tritiée du sol et par voie foliaire à partir d'échanges avec la vapeur d'eau tritiée de l'atmosphère.

L'eau tritiée absorbée par voie racinaire est transportée dans le végétal de façon radiale, des poils absorbants vers la stèle centrale où se trouve le xylème, en traversant la paroi ou le cytoplasme des cellules du cortex. La majorité de l'eau tritiée circule jusqu'aux feuilles et s'évapore par transpiration cuticulaire ou stomatique (McFarlane *et al.*, 1979). Le reste de l'eau tritiée rejoint la fraction eau libre intra et extracellulaire du végétal et s'équilibre rapidement avec les atomes d'hydrogène environnants (cf. Eq. I-7).

En ce sens, l'intégration du tritium dans le végétal est conditionnée par les équilibres isotopiques et les concentrations du tritium dans l'eau des racines restent sensiblement égales à celles moyennées du sol. L'absorption par voie racinaire reste ainsi très dépendante des conditions physico-chimiques de sol et des paramètres physiologiques du végétal.

L'eau tritiée atmosphérique absorbée par voie foliaire intègre les végétaux par transfert diffusif à travers les orifices stomatiques. La vitesse d'absorption est directement liée à l'indice de surface foliaire et aux variations de pressions osmotiques dans les cellules de garde, régissant l'ouverture et la fermeture des stomates. A partir de la cavité stomatale, la vapeur d'eau absorbée se mélange au flux hydrique du système végétal.

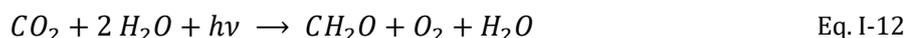
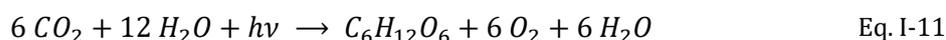
L'absorption par voie foliaire reste également très dépendante des conditions climatiques de l'atmosphère et de la physiologie du végétal (Boyer *et al.*, 2009 ; Galeriu *et al.*, 2013). La concentration en tritium de l'eau apportée par voie foliaire est généralement plus importante que celle déjà présente, provenant de l'eau du sol. Ce déséquilibre ponctuel entraîne une diminution observable du temps de résidence du tritium apporté par voie foliaire dans le végétal (Belot *et al.*, 1996).

5.3.2. L'incorporation du tritium dans la matière organique

5.3.2.1. Les processus de formation du tritium organiquement lié (TOL)

Le tritium est incorporé dans la matière organique végétale principalement par deux processus distincts : les échanges isotopiques et la photosynthèse (Guenot et Belot, 1984).

La photosynthèse est un processus de production de molécules organiques chez les végétaux à partir d'énergie lumineuse, d'eau et de dioxyde de carbone, dont l'équation bilan peut s'écrire selon l'équation (Eq. I-11) ou l'équation (Eq. I-12).



L'eau tritiée peut alors intégrer le processus de photosynthèse et participer à la synthèse de nouvelles molécules organiques selon l'équation bilan présentée par l'équation (Eq. I-13).



Les biomolécules synthétisées par photosynthèse sont principalement des glucides complexes comme la cellulose et l'amidon (80 à 85 %) (Kim *et al.*, 2012). Les autres produits formés correspondent globalement à des familles de composés variés tels que les glucides simples, les acides aminés, les acides organiques, etc.

La photosynthèse est le principal processus d'incorporation de tritium dans la matière organique et de formation du TOL. Pourtant, des études ont montré une augmentation possible des teneurs en TOL dans les végétaux sous obscurité, impliquant que sa formation peut également prendre place à la suite d'autres processus biochimiques comme des réactions enzymatiques, la respiration cellulaire ou le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) (Guenot et Belot, 1984 ; Melintescu et Galeriu, 2017 ; Moses et Calvin, 1959 ; Thompson et Nelsons, 1971).

Les réactions d'échanges isotopiques entre l'eau tissulaire et les positions hydrogènes échangeables de molécules organiques déjà synthétisées ont lieu dans le végétal afin de respecter l'équilibre isotopique défini par l'équation (Eq. I-7).

Ainsi, le tritium contenu dans l'eau libre cellulaire ou extra cellulaire s'intègre progressivement à la matière organique dans des positions disponibles à l'échange isotopique.

Ces positions sont impliquées dans des liaisons covalentes faibles et le taux d'échange dépend de leur accessibilité, comme définit précédemment.

5.3.2.2. Le fractionnement isotopique dans la matière organique

Un fractionnement isotopique en défaveur du tritium est observé dans les processus de formation du TOL basés sur la masse. En effet, le tritium est plus lourd que le protium ou le deutérium, engendrant une discrimination isotopique non négligeable pour certains processus chimiques et biologiques. Ainsi, les réactions enzymatiques peuvent conduire à la formation de molécules potentiellement appauvries en tritium par rapport aux concentrations environnantes (Belot *et al.*, 1996). Ce fractionnement peut également se retrouver dans certains processus d'évapotranspiration de l'eau tritiée des feuilles, où 9 % de tritium en plus se trouve encore dans les stomates (Garland et Ameen, 1979).

6. RADIOTOXICITE ET TRANSFERT DU TRITIUM CHEZ L'HOMME

Le tritium est un radionucléide classé parmi les moins radiotoxiques (Delacroix *et al.*, 2006). Du fait de la faible énergie d'émission de sa désintégration ($E_{\text{moyenne}} = 5,68 \pm 0,01$ keV et $E_{\text{max}} = 18,564 \pm 0,003$ keV), son parcours moyen dans l'eau et dans les tissus humains est relativement faible, de l'ordre de 6 μm . L'épaisseur de la peau variant de 0,1 à 5 mm, le risque radiologique par irradiation externe pour le tritium est considéré comme nul (Okada et Momoshima, 1993). Une exposition interne peut avoir lieu après incorporation par absorption d'air, d'eau ou d'aliment contaminé en tritium.

6.1. L'incorporation du tritium

L'incorporation du tritium dans les tissus, les fluides biologiques et les organes est observée avec une vitesse dépendante de la forme chimique initiale considérée. Les voies d'incorporation internes et externes dans l'organisme humain sont alors les suivantes (ICRP, 1989, 1993, 1995, 1996):

- L'inhalation : Avec du tritium sous forme gazeuse ou particulaire dans l'air. Dans une atmosphère tritiée, les deux tiers des absorptions se font par voie cutanée. La vapeur d'eau tritiée (HTO) est une des formes qui peut être transférée dans le sang de façon significative (à plus de 99 %).
- L'absorption cutanée : Majoritairement avec de l'eau tritiée (HTO) liquide ou gazeuse qui pénètre très facilement la peau et se transfère rapidement au sang. Du tritium sous formes technogéniques peut également être incorporé par absorption cutanée.
- L'ingestion : Avec de l'eau tritiée ou des composés organiques provenant de l'alimentation. Une partie des aliments contaminés ingérés sont dégradés par l'organisme et le tritium contenu rejoint rapidement le métabolisme de l'eau corporelle. Le reste du tritium organiquement lié intact est transféré au sang et dans divers organes (Belot *et al.*, 1996). L'ingestion est le mode d'incorporation du tritium dominant pour le public (ASN, 2010).

6.2. Les effets biologiques du tritium

6.2.1. La bio-cinétique du tritium dans l'organisme

Le comportement du tritium dans les organismes vivants dépend des composés et des formes sous lesquels il a été incorporé.

L'eau tritiée (HTO) est la forme sous laquelle le tritium est principalement intégré et se comporte dans l'organisme en suivant les différents processus métaboliques de l'eau. Le tritium organiquement lié provenant des molécules constitutives des aliments ingérés se retrouve également transformé pour moitié en eau tritiée après digestion des composés tritiés. En suivant les voies de transfert et d'épuration de l'eau dans le corps humain, l'eau tritiée ainsi incorporée est soumise au renouvellement de l'eau libre corporelle et bénéficie d'une période biologique de l'ordre d'une dizaine de jours (ASN, 2010 ; Belot *et al.*, 1996 ; Hill et Johnson, 1993 ; ICRP, 1979 ; Trivedi *et al.*, 1997).

Pour l'autre moitié du TOL ingéré et une faible proportion de l'eau tritiée (3 %), le tritium est transféré dans le sang et peut se retrouver impliqué dans les réactions métaboliques. En s'intégrant aux processus de synthèse de nouvelles molécules organiques, le tritium est alors incorporé sous la forme de tritium organiquement lié (Galeriu *et al.*, 2005 ; IRSN, 2009b).

Pour certains composés tritiés ainsi produits, le tritium peut suivre le taux de renouvellement du carbone dans le corps humain et bénéficier d'un temps de résidence approximatif de 40 jours (entre 21 et 76 jours) (ICRP, 1979).

Dans un second cas, le tritium peut se retrouver incorporé dans des composés de type collagène, lipide ou dans le cerveau et avoir une période biologique beaucoup plus étendue, entre 280 et 550 jours (Belot *et al.*, 1996 ; Galeriu *et al.*, 2005 ; Hill et Johnson, 1993 ; IRSN, 2009b ; Okada et Momoshima, 1993).

6.2.2. L'impact du tritium sur les organismes vivants

La capacité du tritium à s'échanger avec les atomes d'hydrogène labiles (i.e. les atomes d'hydrogène disponibles aux phénomènes d'échangeabilité isotopique) lui confère une très grande mobilité dans les composés organiques. Sur le plan biologique, ce comportement peut potentiellement présenter un risque lorsque le tritium se retrouve incorporé à des acides nucléiques comme l'ADN et l'ARN dans les cellules de l'organisme.

Ainsi, le tritium émet des radiations ionisantes dont l'effet à long terme est principalement observable dans le cas d'une incorporation dans l'ADN. Son action peut alors entraîner des lésions à partir de cassures doubles brins (0,1 cassure par noyau cellulaire) ou encore par sa transmutation en hélium-3 après décroissance naturelle. En comparaison, les radicaux libres formés lors de la respiration de l'oxygène génèrent de l'ordre de plusieurs dizaines de cassures doubles brins par noyau cellulaire chaque jour (Straume, 1993). Lorsque le tritium forme l'hélium-3, sa liaison faible avec le carbone subit une dissociation rapide et conduit à un carbone réactif chargé positivement, également responsable dans une moindre mesure de cassures simples brins (Belot *et al.*, 1996).

Les conséquences biologiques de la détérioration provoquée de l'ADN concernent des effets génétiques, des anomalies du développement, des effets sur la reproduction ou encore des cancers (ASN, 2010 ; Straume et Carsten, 1993). Cependant, ces effets n'ont été observés qu'en laboratoire sur des rongeurs suite à une exposition en tritium à forte dose, au-delà de 100-200 mSv (Belot *et al.*, 1996 ; Okada et Momoshima, 1993 ; Straume, 1993).

Le risque radiologique du tritium pour l'Homme a fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques sur différents types de population où aucun effet sanitaire n'a été observé chez l'Homme, à l'exception d'un effet stochastique chez des professionnels utilisant de la peinture tritiée (Boyer *et al.*, 2009). La probabilité théorique de mort par cancer provoqué à la suite d'une incorporation de tritium est alors estimée à 65×10^{-6} par mSv (Straume, 1993).

6.3. La dosimétrie du tritium

L'estimation de la dose reçue après exposition interne ou externe à un radionucléide dépend de la nature et de l'énergie des rayonnements reçus. Dans le cas du tritium, ses coefficients de doses sont les plus faibles parmi ceux des radionucléides les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement (ASN, 2010).

L'exposition au tritium sous forme d'eau tritiée est la principale source de dose reçue dans l'organisme. En suivant les flux hydriques corporels, la répartition de la dose est uniforme dans le corps et tend à se localiser lors de la métabolisation de l'eau tritiée en tritium organique. La dose correspondante à ce tritium est estimée à 10 % de la dose totale entraînée par l'eau tritiée mais peut augmenter jusqu'à 50 % dans le cas d'une exposition après rejets atmosphériques du tritium (Korolevych et Kim, 2013 ; Trivedi *et al.*, 1997). Lorsqu'il est directement ingéré sous forme organique, le tritium entraîne une dose supérieure d'un facteur 2 environ à la dose due au tritium sous forme d'eau tritiée (IRSN, 2009a). Dans ce cas, le tritium se concentre dans des cellules spécifiques et entraîne un dépôt local d'énergie pouvant amplifier les conséquences biologiques.

Les doses efficaces par unité d'incorporation (DPUI) du tritium déterminées chez l'adulte sont reportées dans le Tableau I-2.

Tableau I-2 : DPUI chez l'adulte en fonction de la forme physico-chimique du tritium et de son mode d'incorporation (ASN, 2010).

Composé / mode d'incorporation	DPUI adulte (Sv.Bq⁻¹)
HT / inhalation	$1,8 \times 10^{-15}$
HTO / inhalation	$1,8 \times 10^{-11}$
HTO / ingestion	$1,8 \times 10^{-11}$
CH ₃ T / inhalation	$1,8 \times 10^{-13}$
Tritium organique / inhalation	$4,2 \times 10^{-11}$
Tritium organique / ingestion	$4,2 \times 10^{-11}$

7. LES PRINCIPALES BIOMOLECULES DE LA BIOMASSE VEGETALE

Les matrices de la biomasse végétale sont constituées de biomolécules diverses, synthétisées et contenues dans la cellule végétale. Ces biomolécules plus ou moins complexes sont des constituants intra ou extracellulaires et peuvent présenter des liaisons avec du tritium organiquement lié (TOL) lors d'une incorporation tritiée dans les organismes. Les liaisons TOL sont générées lors des processus de synthèse des biomolécules (photosynthèse) ou par échanges isotopiques avec les biomolécules constituées. Afin de comprendre le comportement de tritium organiquement lié dans l'environnement, il est alors nécessaire d'approfondir les connaissances sur ses interactions avec les principales biomolécules constitutives de la biomasse végétale.

La cellule végétale est l'unité élémentaire qui constitue tous les organismes végétaux. Elle se compose d'une solution aqueuse, le cytosol, comportant divers organites formant ensemble la fraction cytoplasmique. Le cytoplasme est entouré d'une membrane cytoplasmique semi-perméable qui assure le rôle de barrière physique et de contrôle des échanges des substances avec l'extérieur. Cet ensemble est délimité par une paroi cellulosique qui confère rigidité et protection à la cellule. Un schéma de la structure de la cellule végétale avec tous ses organites est présenté en Figure I-6.

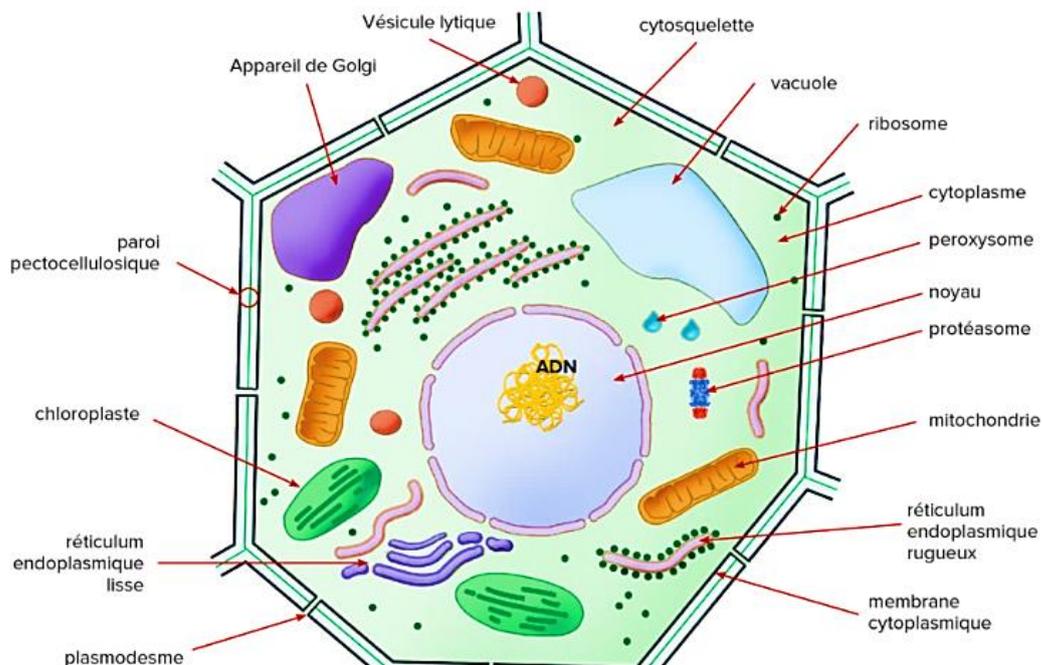


Figure I-6 : Schéma de l'organisation structurale d'une cellule végétale (GNIS, 2018).

Les constituants majoritaires de la biomasse végétale sont représentés par différentes familles de biomolécules telles que les glucides simples ou complexes, les composés pariétaux, les protéines et les lipides. Chacun des constituants peut alors se répartir en fonction de son rôle et sa fonction au sein de la cellule. Nous parlerons dans ce chapitre des constituants majoritaires de la cellule végétale et notables dans le cas de notre étude, de leur rôle et de leur structure moléculaire.

7.1. Les biomolécules de stockage

7.1.1. Les glucides simples

Les glucides simples sont synthétisés dans les végétaux au niveau des chloroplastes par processus de photosynthèse (cf. Eq. I-11). Le terme ose est indiqué pour un monosaccharide (glucose, fructose, galactose, mannose) et le terme diholoside pour un disaccharide (saccharose, lactose, maltose). Les oses présentent une molécule de base de type hexose (6 atomes de carbone) et n'existent à l'état libre que dans certains organes (fruits tel que la pomme) où ils s'y trouvent largement majoritaire (jusqu'à 95 % de la matière organique totale). Préférentiellement, ils sont transformés en diholoside et constituent l'unité de base des polysaccharides comme l'amidon et la cellulose.

Le phénomène d'incorporation du tritium dans ces sucres simples a été observé par plusieurs études après exposition d'organismes à de l'eau tritiée (Moses et Calvin, 1959 ; Thompson et Nelsons, 1971). En tant qu'unités élémentaires d'un grand nombre de biomolécules végétales glucidiques, les connaissances sur la nature de différentes formes de tritium organiquement lié dans ces glucides simples est une première étape dans la compréhension du comportement du tritium dans les matrices environnementales.

7.1.2. L'amidon

L'amidon est une macromolécule qui sert de substance de réserve dans les végétaux. Ce polysaccharide est stocké dans plusieurs organites de la cellule végétale et s'utilise dans le processus de respiration cellulaire au niveau des mitochondries (Hopkins, 2003). En tant que glucide complexe, l'amidon est composé de résidus de glucose provenant de la photosynthèse et liés entre eux par une liaison α -(1,4)-D-glucosidique. Par hydrolyse enzymatique, l'amidon est essentiellement dégradé en dextrine puis en maltose.

La structure supramoléculaire de l'amidon est semi-cristalline par sa composition en amylopectine (70 à 80 %) et en amylose (20 à 30 %). L'amylopectine est un polymère ramifié (plus de 40000 résidus de glucose) qui s'organise en feuillet et forme ainsi une fraction cristalline. L'amylose est une longue chaîne linéaire (300 à 1000 résidus de glucose) qui prend une forme spatiale hélicoïdale et forme une zone amorphe entre les différents feuillets. La structure moléculaire de l'amidon sous forme d'amylose et l'amylopectine est présentée Figure I-7.

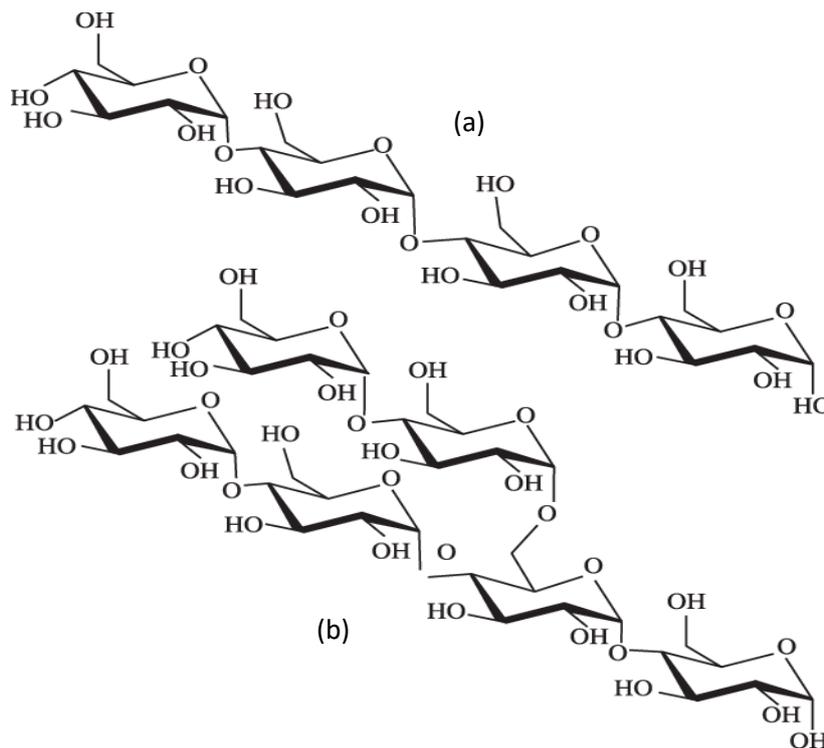


Figure I-7 : Représentation moléculaire de (a) l'amylose et (b) l'amylopectine (Thiebaud-Roux et al., 2017).

L'amidon est un glucide complexe qui constitue une source énergétique très répandue dans l'alimentation des êtres vivants et de l'Homme en particulier. Son extraction à partir de maïs, de blé, de pommes de terre ou encore de manioc est un marché ouvert pour des utilisations alimentaires et dans un large panel de domaines industriels.

7.2. Les biomolécules pariétales

La paroi cellulosique est formée d'une paroi primaire et d'une paroi secondaire qui assurent le maintien de la cellule et la protection du vivant. La paroi primaire est constituée d'un complexe pectocellulosique formé principalement de celluloses arrangées en microfibrilles et d'une matrice amorphe d'hémicelluloses et de pectines. Lors de la maturation de la cellule, la paroi primaire va progressivement dégrader sa pectine et produire la paroi secondaire. Cette paroi secondaire présente la même composition que la paroi primaire, avec un très faible taux de pectine, alors remplacée par de la lignine. Le complexe lignocellulosique ainsi formé est une matrice très robuste et rigide de la cellule végétale. Un schéma simplifié de l'organisation des différents constituants de la paroi primaire est présenté en Figure I-8.

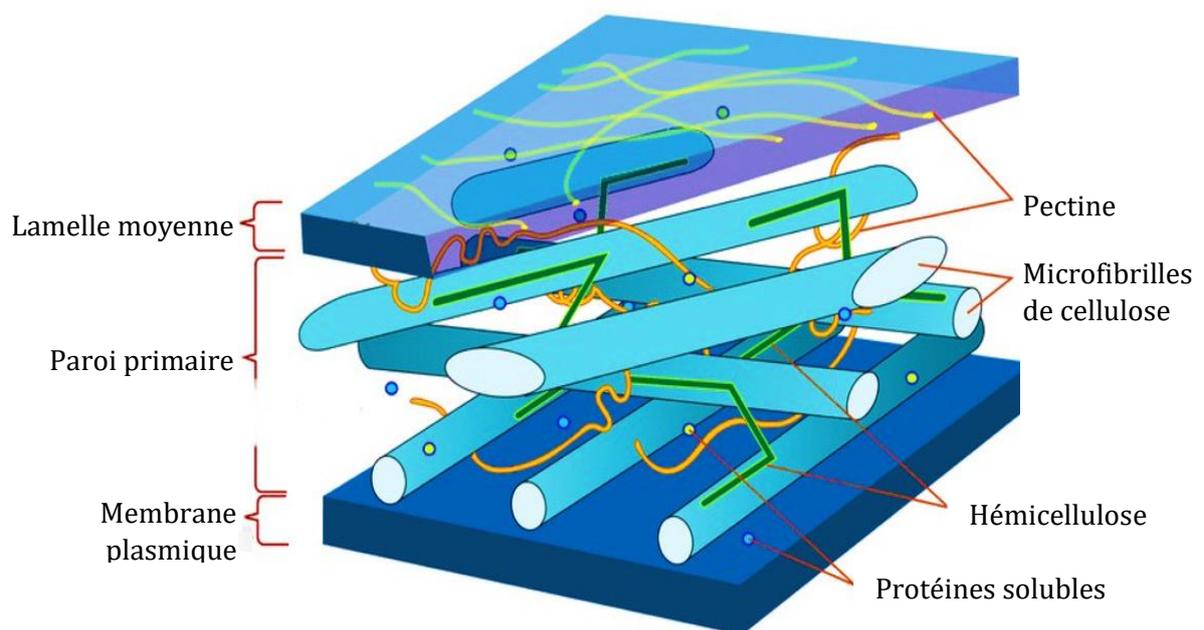


Figure I-8 : Schéma simplifié de l'organisation du complexe pectocellulosique dans la paroi primaire de la cellule végétale, adapté de (Lloyd, 1991).

7.2.1. La cellulose

La cellulose est le biopolymère le plus abondant de la biomasse végétale terrestre où il constitue 35 à 50 % de l'ensemble des biomolécules constituant les végétaux (Commission of the European Communities, 1979). La cellulose est un glucide complexe composé de résidus de glucose provenant de la photosynthèse et liés par une liaison β -(1,4)-D-glucosidique, ce qui la différencie de l'amidon. Les glucoses sont assemblés pour synthétiser les molécules de cellulose qui s'organisent en microfibrilles dans la membrane plasmique et se stabilisent par des liaisons hydrogènes. En raison de leur constitution chimique et de leur conformation spatiale, les chaînes linéaires de cellulose ont une forte tendance à s'agréger entre elles, ce qui forme un réseau de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires (Figure I-9). Cette configuration régulière en feuillet donne une structure supramoléculaire cristalline à la cellulose qui devient partie intégrante des parois cellulosiques primaire et secondaire de la cellule végétale (Hopkins, 2003).

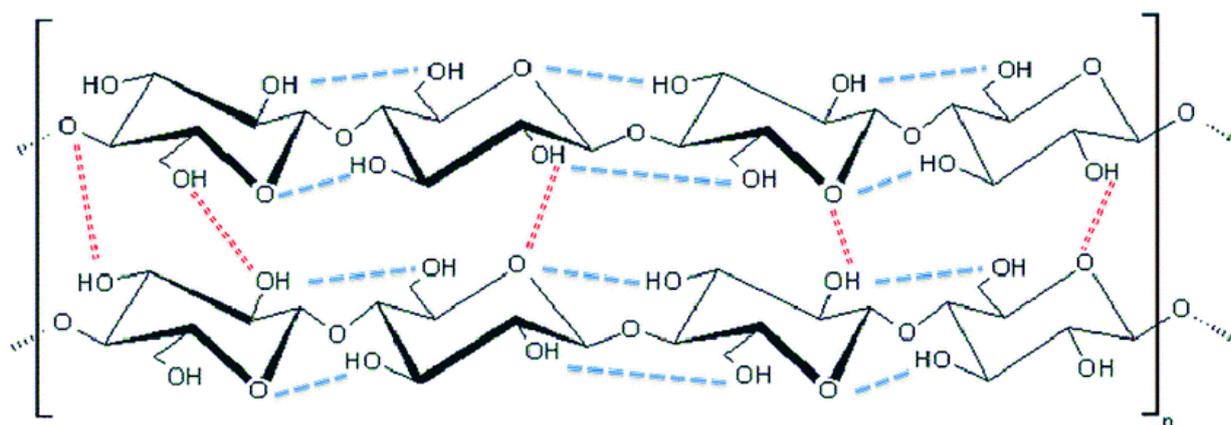


Figure I-9 : Représentation schématique des liaisons hydrogènes intramoléculaires (bleues) et intermoléculaires (rouges) des chaînes de cellulose (Reblere, 2017).

A l'état naturel, la molécule de cellulose est retrouvée dans les matrices environnementales sous l'allomorphe de cellulose I (Nishiyama *et al.*, 2008). Cette cellulose dite « native » présente une structure supramoléculaire cristalline avec des chaînes parallèles et ne subit pas de phénomène de coalition dans ses phases amorphes grâce à l'action préventive de l'hémicellulose, avec qui elle forme les complexes pectocellulosiques ou lignocellulosiques (Pönni *et al.*, 2013). Dans la suite de ce manuscrit, le terme cellulose est employé pour faire référence à la cellulose native. L'appellation « matrice environnementale cellulosique » ou « matrice cellulosique » est employée pour désigner toute matrice environnementale qui se compose d'une part non négligeable de cellulose (teneur supérieure ou égale à 10 % dans la matrice).

7.2.2. **L'hémicellulose**

L'hémicellulose est un biopolymère branché avec différents types de sucres simples, provenant également du processus de photosynthèse. A la différence de la cellulose, elle peut présenter d'autres monomères que le glucose comme du xylose, du mannose, du galactose, du rhamnose ou de l'arabinose. Après la cellulose, elle constitue la deuxième famille de biomolécules de la biomasse terrestre par ordre d'abondance, pour une part de 30 à 45 % (Commission of the European Communities, 1979). Sa structure linéaire ramifiée ne présente pas de caractère colloïdal et sert de liaison entre les microfibrilles de cellulose au niveau de la paroi cellulosique primaire et secondaire.

7.2.3. **La pectine**

La pectine est un polysaccharide galacturonate hétérogène à caractère acide. Le monomère de base de la biomolécule est l'acide galacturonique qui s'assemble en chaînes en angle droit avec des molécules de rhamnose. Les molécules constitutives ont un caractère colloïdal qui leur confère un rôle de ciment intercellulaire, principalement localisé au niveau de la lamelle moyenne de la paroi cellulosique. La pectine et l'hémicellulose forment ensemble un complexe amorphe qui englobe les microfibrilles de cellulose dans la paroi primaire (Hopkins, 2003). A la maturation de la cellule, la pectine se dégrade progressivement à l'apparition de la lignine et de la paroi secondaire dans la cellule végétale.

7.2.4. **La lignine**

La lignine est une macromolécule polymère polyphénolique constituée de monolignols. Après la cellulose et l'hémicellulose, elle forme la troisième famille de biomolécules parmi les plus abondantes dans la biomasse végétale, pour une répartition de 15 à 20 % (Commission of the European Communities, 1979). Sa formation dépend de l'environnement physico-chimique de croissance du végétal et peut entraîner des structures très variables d'une espèce à l'autre à partir de trois types de monomères : l'alcool coumarylique (unité H), l'alcool coniférylique (unité G) et l'alcool sinapylique (unité S). Elle apparaît progressivement dans la cellule végétale lors de la formation de la paroi secondaire des végétaux par le phénomène de lignification. Le complexe lignocellulosique formé est également constitué de microfibrilles de celluloses entourées par l'hémicellulose et la lignine.

Lors de la dégradation de la cellule végétale, le complexe lignocellulosique devient un précurseur de nouvelles molécules organiques dans les sols, comme les substances humiques (Fengel et Wegener, 1984 ; Senesi et Chen, 1989 ; Stevenson, 1982 ; Zepp et Schlotzhauer, 1981).

7.3. Les biomolécules membranaires et fonctionnelles

7.3.1. Les phospholipides

Les phospholipides sont des lipides amphiphiles (une part hydrophile et une part hydrophobe) qui comportent un groupe acide phosphorique (McNaught et Wilkinson, 1997). Les membranes cellulaires de la cellule végétale sont très majoritairement composées de chaînes phospholipides associées en bicouche par liaisons hydrophobes. Au-delà de la stabilité apportée, cette bicouche phospholipidique rend la cellule imperméable à la plupart des solutés polaires ou chargés, ce qui lui donne la propriété de contrôler les transferts intra et extracellulaires.

La quasi-totalité des atomes d'hydrogène dans les phospholipides sont impliqués dans des liaisons avec des atomes de carbone et donc disponibles uniquement pour une incorporation du tritium sous la forme non-échangeable de tritium organiquement lié (TOL-NE). Cependant, une étude sur des micro-algues vertes a mis en évidence un très faible marquage en TOL de la fraction lipidique par rapport aux autres constituants, suggérant une vitesse d'incorporation du TOL-NE très faible dans les composés lipidiques (Moses et Calvin, 1959).

7.3.2. Les protéines

Les protéines sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique par l'ARN et fonctionnalisées puis transférées dans la cellule à partir de l'appareil de Golgi. Leur rôle au sein de la cellule végétale est d'assurer un large panel de fonctions : structurales, hormonales, enzymatiques ou encore moteur.

Elles se retrouvent majoritairement dans le cytosol où elles s'arrangent en un réseau tridimensionnel complexe en s'assemblant par microtubules ou microfilaments, formant ainsi le cytosquelette et assurant la structure de la cellule. Une faible part de protéines est également retrouvée dans les parois primaire et secondaire sous forme de glycoprotéines. Dans la membrane cellulaire, les protéines et les acides aminés non protéiques assurent le rôle de canaux ioniques et peuvent correspondre à près de 50 % de la masse totale de la membrane (Hopkins, 2003).

Les protéines sont des macromolécules formées de peptides, eux-mêmes constitués de plusieurs acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Leurs structures secondaires et tertiaires décrivent sa structure supramoléculaire avec les phénomènes de repliements locaux et de l'intégralité de la chaîne polypeptidique dans l'espace. Ceux-ci se caractérisent alors par des conformations spécifiques des protéines avec des stabilisations résultantes de différentes interactions comme les liaisons hydrogènes et des arrangements de maintien plus complexes comme la configuration en hélice ou en feuillet (Figure I-10).

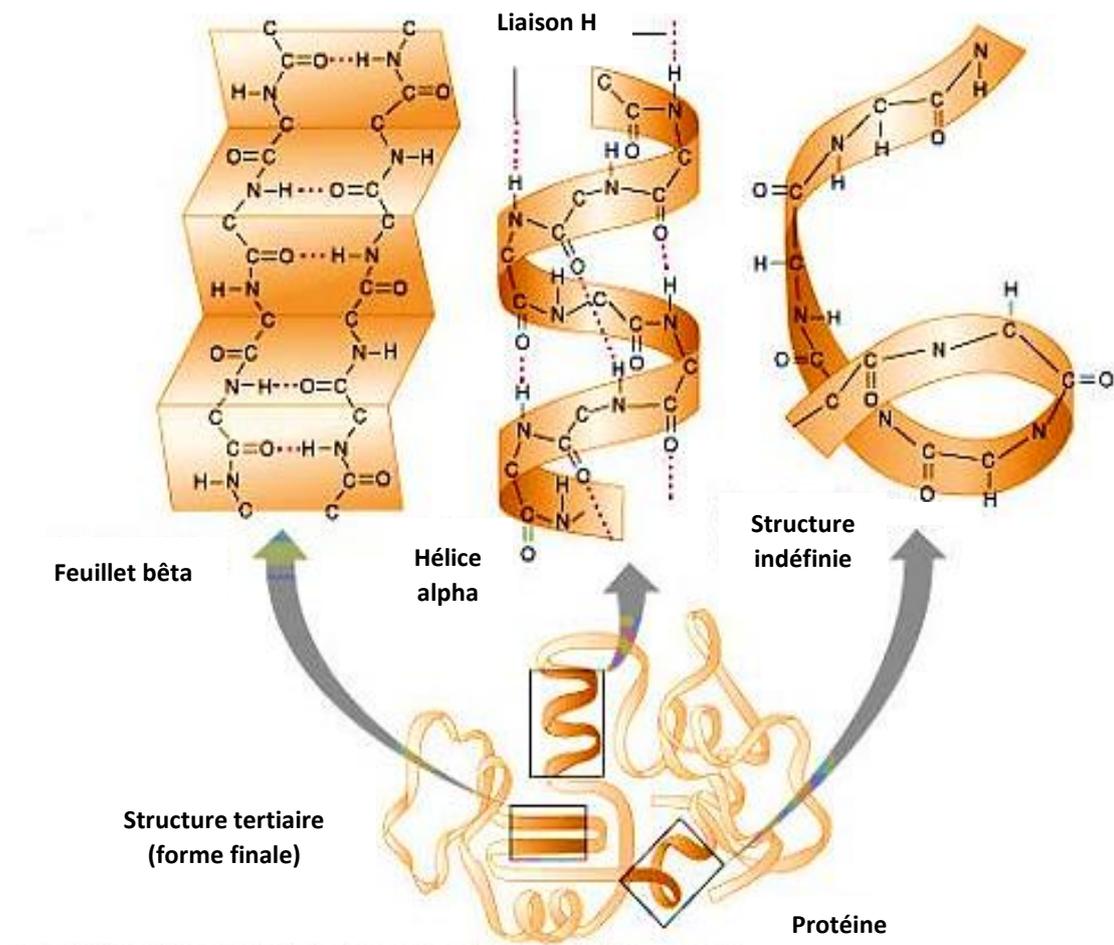


Figure I-10 : Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (Cummings, 2001)

8. CONCLUSION

Dans ce chapitre, la synthèse bibliographique a permis de présenter un état de l'art des connaissances sur le tritium dans l'environnement. En tant qu'isotope de l'hydrogène, le tritium peut se retrouver dans toute molécule hydrogénée et intégrer la matière organique des organismes vivants sous la forme de tritium organiquement lié (TOL) via des processus tels que la photosynthèse. Le tritium organiquement lié (TOL) peut alors se retrouver sous une forme dite échangeable (TOL-E), en équilibre permanent avec l'environnement proche, ou sous une forme dite non-échangeable (TOL-NE), qui persiste dans la molécule organique jusqu'à sa dégradation.

Cependant, la nature exacte de ces deux formes de TOL n'est pas totalement comprise et plusieurs approches peuvent se retrouver dans la littérature, les différenciant principalement selon un point de vue analytique ou structural. De nombreux travaux ont alors mis en lumière une potentielle implication de la structure moléculaire dans l'accessibilité de l'atome d'hydrogène mais il reste qu'une compréhension plus globale de la nature et de la répartition des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans l'ensemble des matrices de la biomasse terrestre nécessite des efforts supplémentaires.

Par ailleurs, l'absence de méthode validée pour l'analyse des fractions TOL-E et TOL-NE vient ajouter une difficulté additionnelle à l'appréhension de la distribution du tritium organiquement lié. L'intrusivité prouvée des procédures actuelles est alors jugée responsable d'un potentiel biais analytique et leur fiabilité doit encore être évaluée.

Afin d'améliorer la compréhension globale du comportement du tritium dans l'environnement, l'objectif des présents travaux de thèse est de contribuer à combler ces lacunes en approfondissant les connaissances sur la spéciation des différentes formes de TOL dans les matrices environnementales, selon deux axes d'étude :

- (1) La problématique « spéciation », où l'objectif est d'apporter des éléments de réponse supplémentaires aux questionnements soulevés sur l'implication de structures moléculaires spécifiques dans l'établissement du comportement du TOL des matrices de l'environnement.
- (2) La problématique « analytique », où l'objectif est de statuer sur la fiabilité et la robustesse des méthodes d'échange isotopique actuelles dans le cadre de l'analyse de la forme non-échangeable du TOL dans les matrices environnementales.

La stratégie adoptée pour répondre à ces deux problématiques ainsi que l'approche expérimentale associée seront détaillées dans le chapitre 2.

Chapitre 2

Démarche expérimentale

Table des matières

1. INTRODUCTION	71
2. STRATEGIE DE L'ETUDE	72
2.1. LA PROBLEMATIQUE « SPECIATION »	72
2.1.1. APPROCHE METHODOLOGIQUE	72
2.1.2. DEVELOPPEMENT	73
2.2. LA PROBLEMATIQUE « ANALYTIQUE »	76
2.2.1. APPROCHE METHODOLOGIQUE	76
2.2.2. DEVELOPPEMENT	77
2.3. CHOIX DES MATRICES D'ETUDE	80
2.3.1. LA POMME ET SES GLUCIDES SIMPLES	82
2.3.2. LE GRAIN DE BLE ET SON AMIDON	82
2.3.3. LE <i>MYRIOPHYLLUM SPICATUM</i> ET SA PAROI CELLULOSIQUE	83
2.3.4. LES CELLULOSES NATIVES ET LEURS DERIVES	84
2.3.5. LES SUBSTANCES HUMIQUES	85
2.4. BILAN	86
3. L'ECHANGE ISOTOPIQUE DE L'ATOME D'HYDROGENE	88
3.1. LA METHODE D'ECHANGE ISOTOPIQUE « VOIE DOUCE »	88
3.1.1. PROCEDURE EXPERIMENTALE	88
3.1.2. CALCUL DU PARAMETRE D'ECHANGEABILITE (α_{iso})	89
3.1.3. LA MESURE DU TOL-NE	90

3.1.4.	LE CALCUL DU TOL-NE	91
3.2.	LA METHODE D'ECHANGE ISOTOPIQUE « VOIE DURE »	92
3.2.1.	PROCEDURE EXPERIMENTALE	92
3.2.2.	LA MESURE DU TOL-NE	93
4.	LES OUTILS ANALYTIQUES	94
4.1.	L'ANALYSE DU TRITIUM ORGANIQUEMENT LIE	94
4.1.1.	LA COMBUSTION EN FOUR TUBULAIRE	94
4.1.1.1.	Principe et fonctionnement	94
4.1.1.2.	Procédure	95
4.1.2.	LA SCINTILLATION LIQUIDE	96
4.1.2.1.	Principe et fonctionnement	96
4.1.2.2.	Procédure	97
4.1.2.3.	Application à la mesure de l'activité radioactive	98
4.2.	ETUDE DES PROPRIETES LABILES DE L'ATOME D'HYDROGENE	99
4.2.1.	LA DIFFRACTOMETRIE DE RAYONS X (DRX)	99
4.2.1.1.	Principe et fonctionnement	99
4.2.1.2.	Procédure	99
4.2.1.3.	La détermination de l'Indice de Cristallinité (C_{rl})	100
4.2.1.4.	Application à la détermination du paramètre ($\alpha_{C_{rl}}$)	100
4.2.2.	LE TITRIMETRE POTENTIOMETRIQUE AUTOMATIQUE	102
4.2.2.1.	Principe et fonctionnement	102
4.2.2.2.	Procédure	102
4.2.2.3.	Application à la détermination du paramètre (α_{depro})	103
4.3.	ETUDE DU BIAIS DE LA METHODE D'ECHANGE ISOTOPIQUE « VOIE DURE »	104
4.3.1.	L'ANALYSEUR ELEMENTAIRE CHNS	104
4.3.1.1.	Principe et fonctionnement	104
4.3.1.2.	Procédure	105
4.3.1.3.	Application à la conversion d'unité de l'activité radioactive	105
4.3.2.	L'ANALYSE DU CARBONE ORGANIQUE TOTAL – COT-METRE	106
4.3.2.1.	Principe et fonctionnement	106
4.3.2.2.	Procédure	107
4.3.2.3.	Application à la détermination de la solubilisation	107
5.	CONCLUSION	109

1. INTRODUCTION

Ce chapitre présente la démarche expérimentale adoptée pour répondre aux deux problématiques définies dans le chapitre 1 et se divise en trois parties.

Dans une première partie, la stratégie mise au point pour répondre aux problématiques « spéciation » et « analytique » est détaillée. La méthodologie de l'étude ainsi que l'intérêt porté sur le choix des matrices sont également développés.

Dans une seconde partie, les deux méthodes d'échange isotopique de l'atome d'hydrogène étudiées dans le cadre des présents travaux sont présentées et les procédures respectives détaillées.

Dans une troisième et dernière partie, les outils analytiques employés pour répondre aux problématiques de l'étude, leurs spécificités et leurs applications sont également abordés.

2. STRATEGIE DE L'ETUDE

2.1. La problématique « spéciation »

2.1.1. Approche méthodologique

Afin d'approfondir les connaissances sur le comportement du tritium dans l'environnement, il est nécessaire d'apporter des informations supplémentaires à la compréhension globale de ses mécanismes d'échanges dans la matière organique. En ce sens, la nature et la répartition des formes échangeable et non-échangeable du tritium organiquement lié (TOL) dans les matrices environnementales doivent être examinées et établies.

Pour répondre à cette demande, les travaux présentés dans cette thèse traitent de l'étude du paramètre d'échangeabilité (α) de plusieurs matrices environnementales d'intérêts. Le paramètre d'échangeabilité (α) définit l'ensemble de la fraction d'atomes d'hydrogène organiquement liés échangeables dans une matrice ciblée par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène de sa matière organique.

En outre, la définition de la fraction échangeable des atomes d'hydrogène organiques dans une matrice environnementale repose sur ses propriétés labiles et ses capacités d'échange avec les atomes d'hydrogène de son environnement proche. Ainsi, un paramètre d'échangeabilité isotopique peut être déterminé pour chaque matrice étudiée à partir d'un processus d'échanges isotopiques en phase vapeur, par la méthode d'échange isotopique renommée ici « voie douce ». Cette méthode d'échange isotopique est une technique non intrusive réalisée selon des paramètres contrôlés et qui permet ainsi d'accéder à une information quantitative sur le taux d'atomes d'hydrogène échangeables dans un échantillon étudié. Le paramètre nommé (α_{iso}) ainsi déterminé peut alors être utilisé comme valeur de référence dans le cadre d'une étude comparative face à d'autres paramètres obtenus sur la base des différentes déclinaisons définissant la fraction d'atomes d'hydrogène organiquement liés échangeables dans une matrice (paramètres ($\alpha_{modèle}$), (α_{Cri}) et (α_{depro}), cf. Figure II-1). L'évaluation de la concordance entre ces différents paramètres et le paramètre (α_{iso}) doit alors permettre de vérifier la validité d'une définition donnée sur la nature des fractions TOL-E et TOL-NE dans une matrice environnementale.

Afin d'accorder un intérêt spécifique à l'impact des biomolécules à caractère complexe, cette étude est portée sur des matrices environnementales, ainsi que leur constituant majoritaire, qui présentent un critère de complexité reconnu au niveau de leur structure moléculaire.

2.1.2. **Développement**

La stratégie développée pour répondre aux questionnements liés à la problématique « spéciation » est détaillée dans la Figure II-1 suivante :

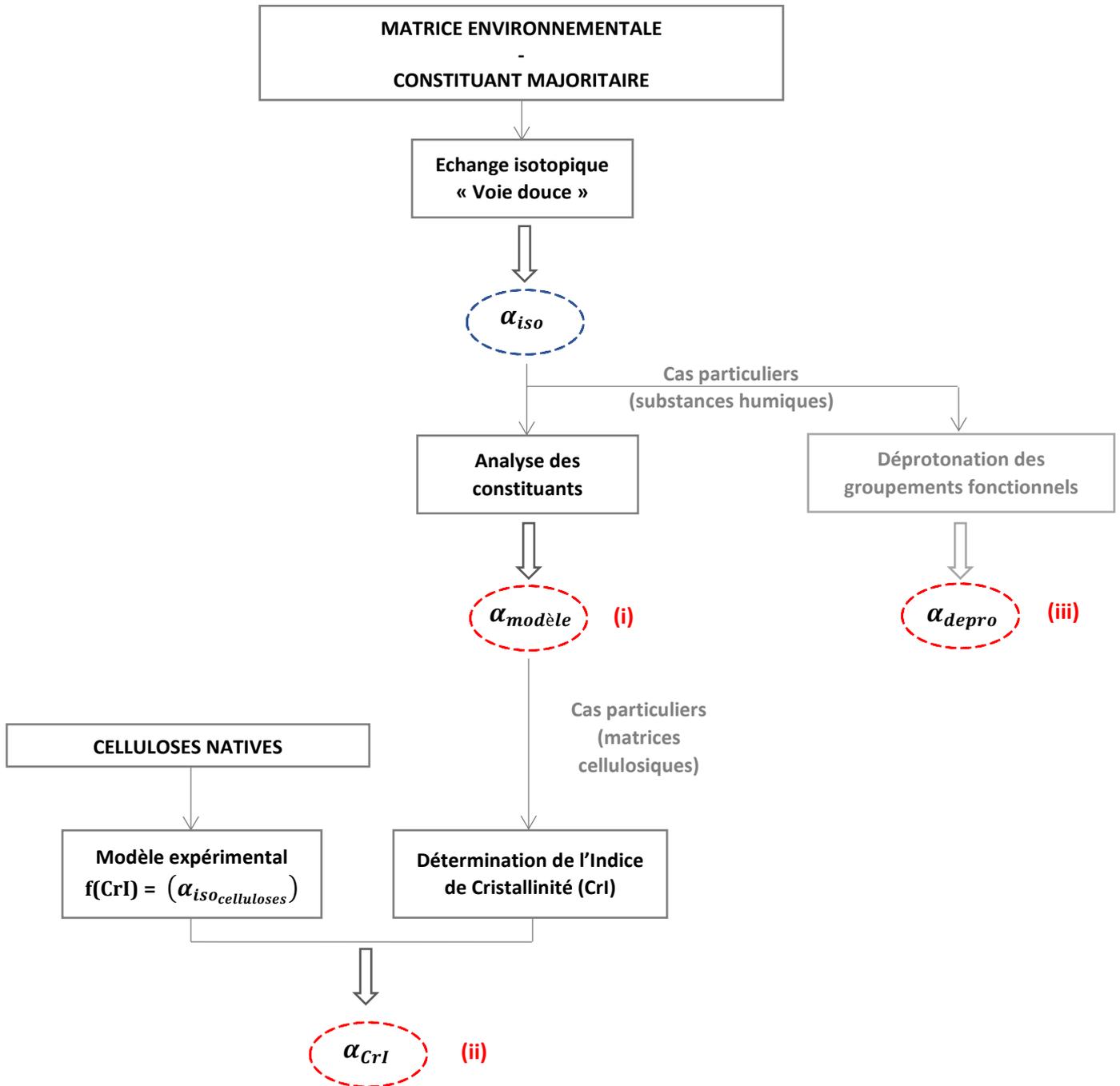


Figure II-1 : Schéma bilan de la démarche expérimentale associée à la problématique « spéciation ».

Le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) obtenu pour chaque matrice environnementale et son constituant majoritaire est alors comparé aux autres paramètres déterminés selon la démarche suivante :

(i) Le paramètre d'échangeabilité basé sur les modèles moléculaires ($\alpha_{modèle}$), qui s'établit selon la description employée dans la vision analytique.

La fraction échangeable des atomes d'hydrogène organiquement liés est alors considérée comme l'ensemble des positions hydrogènes impliquées dans des liaisons covalentes faibles. A partir des modèles moléculaires, un paramètre ($\alpha_{modèle}$) est ainsi attribué à chaque molécule organique, représentant le ratio de ces atomes d'hydrogène en liaisons faibles par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène de la molécule (cf. Eq. I-8). Par extension, la connaissance de la composition en ces molécules constituantes et de leur teneur permet d'obtenir le paramètre ($\alpha_{modèle}$) d'une matrice environnementale ciblée (cf. Eq. I-9).

Lorsque le paramètre ($\alpha_{modèle}$) est en cohérence avec le paramètre (α_{iso}), il est alors considéré que la description de la vision analytique est suffisante pour décrire le comportement des formes échangeable et non-échangeable du TOL dans la matrice étudiée. Dans le cas contraire, la définition donnée, basée uniquement sur la nature des liaisons chimiques, est insuffisante et doit être complétée.

(ii) Le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}), qui se réfère à une interprétation de la vision structurale.

Dans le cas où les paramètres (α_{iso}) et ($\alpha_{modèle}$) sont différents, l'écart observé peut être expliqué en décrivant la fraction échangeable des atomes d'hydrogène organiquement liés comme celle donnée par le point de vue analytique, mais dépourvue de l'ensemble des atomes d'hydrogène rendus inaccessibles par la complexité moléculaire de la molécule porteuse.

Dans plusieurs études consacrées à ce sujet, ce phénomène a principalement été observé dans le cas de la cellulose, une biomolécule dont la complexité est représentée par une structure supramoléculaire semi-cristalline. Pour caractériser l'étendue de ce réseau cristallin, l'Indice de Cristallinité (CrI) est un paramètre déterminé expérimentalement, selon une méthode spécifique à la cellulose, qui permet de représenter la proportion de phase cristalline par rapport à la phase amorphe dans la biomolécule.

Afin d'évaluer spécifiquement l'impact de la cristallinité de la molécule de cellulose sur son paramètre d'échangeabilité, l'évolution du paramètre (α_{iso}) de systèmes modèles, des celluloses natives à cristallinité croissante, est reportée en fonction de leur Indice de Cristallinité (CrI) respectif. Le modèle expérimental $f(\text{CrI}) = (\alpha_{iso_{celluloses}})$ établi sur des celluloses natives brutes permet alors d'assigner un paramètre (α_{CrI}) à une matrice environnementale cellulosique en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI) de sa cellulose. Pour cela, l'Indice de Cristallinité (CrI) déterminé dans une matrice cellulosique et sa teneur en cellulose sont employés afin de remonter par calcul à l'Indice de Cristallinité (CrI) relatif à cette cellulose constituante. A partir du modèle expérimental, cette valeur permet alors d'attribuer un paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) à cette cellulose. Enfin, le paramètre (α_{CrI}) de la matrice est calculé en prenant en considération ce paramètre ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) attribué à sa cellulose ainsi que l'ensemble des paramètres d'échangeabilité théoriques ($\alpha_{modèle}$) de ses autres constituants.

La comparaison entre le paramètre (α_{iso}) et le paramètre (α_{CrI}) doit permettre d'évaluer mais également de quantifier le rôle de la structure cristalline de la cellulose dans le comportement du tritium organiquement lié d'un organisme vivant. Dans le cas où la cellulose n'est pas le seul constituant responsable de la diminution de l'accessibilité des atomes d'hydrogène, un écart quantifiable entre ces deux paramètres permet alors d'accéder à une information quantitative sur l'impact des autres constituants dans l'établissement de cette échangeabilité de l'atome d'hydrogène dans la matrice étudiée.

- (iii)** Dans des cas particuliers, comme les matrices complexes du sol, la variabilité des associations et constitutions moléculaires ne permettent pas l'établissement de modèles moléculaires fixes pour une même matrice.

Dans le cas précis des substances humiques, la fraction échangeable des atomes d'hydrogène organiquement liés est alors considérée comme représentée par les atomes d'hydrogène impliqués dans les groupements fonctionnels protonés à caractère labile, comme les acides et les alcools.

Le paramètre d'échangeabilité basé sur la déprotonation (α_{depro}) représente alors le taux initial d'atomes d'hydrogène de ces groupements protonés par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène organiques de la matrice. La détermination du paramètre (α_{depro}) est réalisée à partir des méthodes classiques (titrages) de détermination de l'acidité des sols ou des teneurs en alcool qui se basent sur des réactions chimiques menant à la déprotonation de ces groupements fonctionnels protonés.

Une comparaison entre ce paramètre (α_{depro}) et le paramètre (α_{iso}) permet alors d'examiner le lien possible entre les mécanismes d'échange isotopique et ceux basés sur des réactions chimiques dans le cas de l'échangeabilité du tritium organiquement lié.

2.2. La problématique « analytique »

2.2.1. Approche méthodologique

Pour comprendre le comportement du tritium dans l'environnement et son transfert à l'Homme, il faut également pouvoir quantifier les fractions TOL-E et TOL-NE dans les matrices environnementales de façon fiable.

La méthode premièrement développée pour la quantification des fractions échangeables et non-échangeable du TOL dans une matrice environnementale est une technique d'échange isotopique réalisée en phase aqueuse et renommée ici « voie dure ». Cependant, les études menées avec cette technique ont mis en évidence des effets de solubilisation et/ou de dégradation partielle de la matière organique des échantillons au cours de l'échange isotopique. Les travaux présentés dans (Bacchetta, 2013) ont permis l'identification de familles de molécules solubilisées au sein de diverses matrices environnementales mais plusieurs questions persistent sur la perte d'informations entraînée et le biais potentiel induit sur la quantification des différentes fractions de TOL

En réponse à ces questionnements, une nouvelle méthode moins intrusive a alors été développée à partir d'un système spécifique en boîte à gants, avec des paramètres de température et d'humidité relative contrôlés et stables.

Les travaux présentés dans cette thèse proposent alors de statuer sur la fiabilité de la méthode d'échange isotopique « voie dure » en menant une étude comparative par rapport à la méthode d'échange isotopique « voie douce ». A partir d'une même série de matrices environnementales, les deux méthodes d'échange isotopique sont appliquées afin de comparer les résultats obtenus sur la quantification des formes de TOL. En associant cette démarche à des outils analytiques de contrôle (COT-mètre et analyseur élémentaire CHNS), l'impact du biais analytique entraîné par la méthode « voie dure » doit pouvoir être évalué et ainsi permettre d'examiner la validité de la méthode pour la mesure des différentes formes de TOL dans une matrice environnementale.

2.2.2. **Développement**

Dans le cadre de l'analyse des fractions TOL-E et TOL-NE, le principe du processus d'échange isotopique appliqué repose sur les propriétés labiles des atomes d'hydrogène organiquement liés échangeables et met en jeu un phénomène d'appauvrissement en tritium sous la forme TOL-E dans une matrice environnementale. Lorsque le système atteint un état d'équilibre, un traitement adéquat est appliqué à l'échantillon solide récupéré (lyophilisation, combustion, distillation) et l'activité massique mesurée dans l'eau de combustion de l'échantillon est directement attribuée à la fraction de tritium restante, le TOL-NE.

Ainsi, l'étude comparative proposée entre la méthode « voie dure » et la méthode « voie douce » est réalisée après quantification de la fraction TOL-NE sur un même ensemble de matrices environnementales. Cette stratégie développée pour répondre aux questionnements liés à la problématique « analytique » est détaillée dans la Figure II-2 suivante :

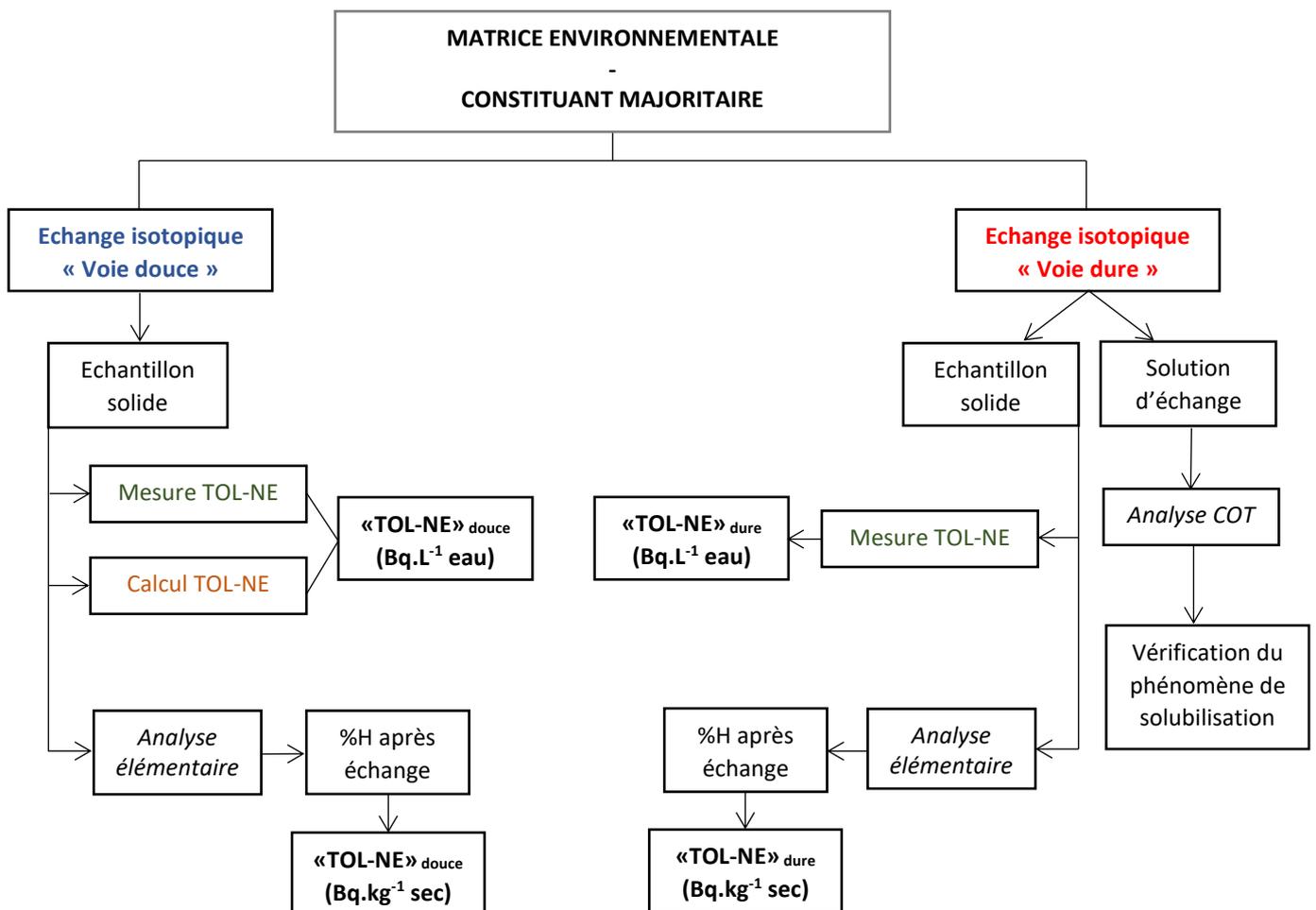


Figure II-2 : Schéma bilan de la démarche expérimentale associée à la problématique « analytique ».

Ainsi, des matrices environnementales d'intérêts présentant des activités en TOL initiales significatives ($TOL > 5 \text{ Bq.kg}^{-1}$ de matière sèche) sont étudiées dans le cadre de processus d'appauvrissement en fraction TOL-E par les deux méthodes d'échanges isotopiques, afin d'en mesurer les activités TOL-NE restantes.

La méthode d'échange isotopique « voie douce » utilisée présente l'avantage supplémentaire de fournir l'accès à une valeur du TOL-NE calculée à partir du paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) précédemment introduit. A partir des résultats obtenus, la valeur de TOL-NE présentant l'incertitude relative la plus faible entre le TOL-NE calculé et le TOL-NE mesuré par la méthode « voie douce » est alors utilisée pour une comparaison avec la valeur du TOL-NE mesurée par la méthode « voie dure ».

La stratégie analytique globale adoptée pour évaluer l'impact du biais sur la mesure du TOL-NE est alors de vérifier si (i) les résultats directement obtenus après traitement de l'échantillon et exprimés en Bq.L^{-1} d'eau de combustion sont égaux entre la méthode « voie dure » et la méthode « voie douce » et, dans le cas contraire, si (ii) la conversion des résultats en Bq.kg^{-1} d'échantillon sec à partir de la mesure du pourcentage d'hydrogène massique permet d'obtenir cette égalité.

Ainsi, l'analyse de ces deux points de contrôle repose sur la démarche suivante :

- (i)** La quantification de la concentration en activité du tritium dans un échantillon solide est réalisée par une mesure dans l'eau recueillie après combustion de l'échantillon solide. Ainsi, les résultats TOL-NE obtenus après les méthodes d'échange isotopique « voie dure » et « voie douce » sont directement exprimés en Bq.L^{-1} d'eau de combustion. Il est alors important de noter que cette valeur mesurée est entièrement dépendante de la teneur en hydrogène dans l'échantillon analysé.

Cependant, le phénomène de solubilisation partielle de l'échantillon pouvant survenir au cours de la procédure « voie dure » est dépendant de la composition (molécules solubles constituant de la matrice) et de la structure (répartition et accessibilité desdites molécules) de la matrice étudiée. Il est alors possible d'observer la solubilisation d'une partie des molécules solubles de la matrice dans des conditions qui peuvent ne pas respecter les proportions stœchiométriques initiales et entraîner une modification de la composition élémentaire de l'échantillon, dont les teneurs en hydrogène. En revanche, ces phénomènes de solubilisation sont négligeables dans la procédure de la méthode d'échange isotopique « voie douce » et sa non-intrusivité permet la conservation de la composition élémentaire initiale de l'échantillon.

En ce sens, une différence de teneur relative en hydrogène dans l'échantillon après échange isotopique peut entraîner un biais entre les valeurs mesurées et exprimées en Bq.L^{-1} d'eau de combustion en fonction de la méthode utilisée.

La solubilisation effective d'une partie de l'échantillon au cours de la procédure « voie dure » peut être validée à partir d'une analyse du carbone organique total retrouvé dans l'eau d'échange à l'équilibre, mais un écart observé entre des activités massiques mesurées en unité Bq.L^{-1} d'eau de combustion n'est pas une information suffisante pour statuer sur l'intégralité de la validité de la méthode « voie dure ».

- (ii)** Afin de prendre en compte l'évolution des teneurs en hydrogène, une analyse élémentaire est conduite sur l'échantillon étudié avant et après les deux méthodes d'échange isotopique. Le % massique d'hydrogène d'un échantillon après échange s'utilise alors dans la conversion de la concentration en activité mesurée et exprimée en unité Bq.L^{-1} d'eau de combustion vers une valeur exprimée en unité Bq.kg^{-1} d'échantillon sec, plus représentative de la composition élémentaire réelle de l'échantillon.

Néanmoins, cette correction peut s'avérer insuffisante dans le cas où le TOL-NE n'est pas réparti de façon équitable entre les différents constituants d'un échantillon par rapport à leur propre répartition en masse dans la matrice étudiée. En effet, si le TOL-NE incorporé dans un organisme vivant est réparti de façon ubiquitaire, il est cependant possible qu'il ne soit pas équitablement présent dans toutes les molécules organiques (Moses et Calvin, 1959). L'immersion prolongée de l'échantillon solide dans l'eau d'échange peut également être une source de dégradation partielle de la matière organique de la matrice et engendrer un renouvellement des atomes d'hydrogène, avec une perte potentielle de TOL-NE, mais sans variation des % massiques d'hydrogène. Dans cette situation, une absence de solubilisation ou une solubilisation partielle des molécules organiques dans des proportions stœchiométriques ou non peut être responsable d'un biais analytique.

A partir d'une comparaison entre les concentrations en activité « TOL-NE »_{dure} et « TOL-NE »_{douce} exprimées en Bq.kg^{-1} sec, il sera alors possible de statuer définitivement sur la fiabilité de la méthode d'échange isotopique « voie dure » par rapport à la méthode « voie douce » pour la quantification des différentes formes de TOL dans une matrice environnementale. Puisque cette étude comparative est réalisée entre les résultats « TOL-NE »_{dure} et « TOL-NE »_{douce} obtenus pour une même matrice, la conversion supplémentaire des valeurs exprimées en Bq.kg^{-1} sec en Bq.kg^{-1} d'échantillon frais n'a pas été réalisée.

2.3. Choix des matrices d'étude

Afin de répondre aux questionnements liés au comportement du tritium dans l'environnement et posés dans les problématiques « spéciation » et « analytique », un ensemble de matrices environnementales est étudié dans le cadre du présent travail de recherche. Ces matrices ont été choisies sur la base de leur représentativité au niveau, de leur composition en biomolécules majoritaires de la biomasse terrestre, de la variabilité de leurs propriétés hydrosolubles, mais également au niveau de la diversité des structures et arrangements moléculaires qu'elles peuvent présenter.

En effet, les molécules organiques de la biomasse terrestre peuvent présenter des structures très diversifiées et plus ou moins complexes, à partir d'agencements très simples comme les glucides simples ou encore des conformations très complexes comme les substances humiques. Les matrices environnementales d'étude ont donc été choisies pour répondre à la problématique « spéciation » sur la base de la représentativité des structures moléculaires de leur constituant majoritaire par rapport à l'ensemble des types de structure rencontrés dans l'environnement.

Afin d'évaluer spécifiquement l'implication des structures cristallines de la cellulose dans l'évolution de la capacité d'échange des atomes d'hydrogène, deux celluloses natives commerciales et trois celluloses natives dérivées ont également été ajoutées à la gamme de matrices présentement étudiées.

Dans le cadre de la problématique « analytique », le choix des matrices s'est formulé en réponse à deux exigences indispensables à la pertinence de l'étude comparative proposée. En premier lieu, les matrices d'étude ont été sélectionnées afin de présenter des activités en TOL initiales significatives ($TOL > 5 \text{ Bq.kg}^{-1}$ de matière sèche), permettant d'assurer après traitement la quantification du TOL-NE par la technique de scintillation liquide. En second lieu, ces matrices ont été choisies sur la base de leur composition en biomolécules majoritaires de la biomasse végétale et de leurs différences de solubilité dans l'eau. Leur sélection a également été orientée en fonction des types de matrices généralement suivis dans le cadre de la surveillance environnementale, de leur abondance et de leur disponibilité pour l'étude.

Pour évaluer l'implication de la structure moléculaire et l'importance des propriétés inhérentes au constituant principal dans le comportement du TOL et de sa répartition dans une matrice environnementale, les biomolécules constituantes majoritaires « filles » extraites de chaque matrice « mère » ont été ajoutées à la gamme de matrices environnementales de notre étude.

Les protocoles détaillés des procédés d'extraction des matrices « filles » sont disponibles en Annexe I. Une analyse des constituants a été conduite sur chaque matrice environnementale étudiée et les compositions détaillées sont disponibles en Annexe II. Pour chacun des constituants majoritaires analysés dans les matrices étudiées, leur structure moléculaire ainsi que leur paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) attribué sont disponibles en Annexe III. L'ensemble des acides aminés présents dans les matrices « Grain de blé » et « Myriophylle » ainsi que leur paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) attribué sont disponibles en Annexe IV.

Sur la base de ces informations, les matrices d'étude ainsi que leur constituant extrait, le cas échéant, sont répertoriés dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 : Descriptif des matrices d'étude dans le cadre des problématiques « spéciation » et « analytique ».

		Matrices	Origines	TOL (Bq.kg ⁻¹ sec) ⁽ⁱ⁾
Problématique « spéciation »	Problématique « analytique »	Pomme	5 km du CNPE de Cernavodă, Roumanie	36,2 ± 2,8
		- Glucides simples	(44°20'10.0"N 28°02'13.9"E)	8,9 ± 1,2
		Grain de blé	Circuit d'inter-comparaison OBT Working Group	31,3 ± 2,1
	- Amidon		18,4 ± 2,0	
	Myriophylle	La Loire, à 2 km en aval du CNPE de Dampierre, France (47°45'18.7"N 2°28'25.3"E)	18,6 ± 3,8	
	- Paroi		11,8 ± 1,6	
		Celluloses natives	Sigma-Aldrich (CAS : 9004-34-6)	Négligeable ⁽ⁱⁱ⁾
		Substances humiques	Aladdin Bio-Chem Technology et New Alliance Dye Chem (CAS : 1415-93-6)	Négligeable ⁽ⁱⁱ⁾

⁽ⁱ⁾ Activité initiale en TOL à la date de référence du 1^{er} juillet 2020.

⁽ⁱⁱ⁾ Activité initiale en TOL significativement inférieure à 0,5 Bq.kg⁻¹ sec.

2.3.1. **La pomme et ses glucides simples**

La pomme est le fruit le plus produit et consommé en France, avec une production totale de 1,65 million de tonnes en 2019 et près de 17 kg consommés par an et par ménage (SNP, 2019). Outre son importance dans la chaîne alimentaire, la pomme est une matrice environnementale intéressante par sa composition très riche en glucides simples comme le fructose et le glucose. En effet, leur structure moléculaire simplifiée et la variabilité de leurs arrangements structuraux avec les autres biomolécules dans une matrice complexe, comme la pomme, sont des caractéristiques d'intérêt afin d'apporter des éléments de réponse à la problématique « spéciation ».

Concernant la problématique « analytique », la pomme est une matrice composée de biomolécules fortement hydrosolubles ayant déjà fait l'objet de travaux portés sur la solubilisation de matrices environnementales atritiées lors de l'échange isotopique en « voie dure » (Bacchetta, 2013). Afin d'apporter des informations complémentaires aux conclusions proposées, il est intéressant de poursuivre l'étude sur une même matrice prélevée dans un environnement influencé par les émissions de tritium et présentant donc une activité en TOL initiale significative ($TOL > 5 \text{ Bq.kg}^{-1}$ de matière sèche).

D'un point de vue global, les glucides simples sont les premiers produits de la photosynthèse qui est la voie prépondérante de formation du TOL chez les végétaux. Dans le cas des fruits comme la pomme, les glucides simples ne sont que peu impliqués dans les réactions métaboliques et proviennent principalement de la dégradation enzymatique des biomolécules complexes comme l'amidon, elles-mêmes formées de chaînes de glucose provenant de la photosynthèse dans l'espèce végétale d'origine. Chez l'Homme, les glucides simples ingérés possèdent un rôle majeur comme moteur énergétique des cellules et se distribuent ainsi de façon ubiquitaire dans l'organisme. La spéciation du tritium dans ces glucides simples retrouvés dans une matrice comme la pomme apparaît alors comme une information importante pour la compréhension des mécanismes de transfert du TOL dans l'environnement et à l'Homme.

2.3.2. **Le grain de blé et son amidon**

Le blé fait partie des céréales les plus récoltées et consommées dans le monde. Cette matrice de la chaîne alimentaire est principalement composée d'amidon, un glucide complexe qui constitue une source énergétique très répandue dans l'alimentation des êtres vivants et de l'Homme en particulier. L'amidon est un biopolymère de D-glucose dont l'enchaînement linéaire présente une structure intéressante pour les études de spéciation du tritium organiquement lié.

En effet, des grains de blé ont déjà fait l'objet d'une étude par échange isotopique en « voie douce » (Péron *et al.*, 2018) où les similitudes entre les paramètres (α_{iso}) et ($\alpha_{modèle}$) déterminés ont permis d'affirmer que les descriptions proposées par la vision analytique sur la nature des différentes formes de TOL (i.e. basées sur la nature de la liaison chimique) étaient suffisantes pour expliquer son comportement dans ce type de matrice. Un grand intérêt est alors porté, dans le cadre de la problématique « spéciation », à l'évaluation de la concordance de ces résultats par rapport à la matrice unitaire d'amidon qui constitue majoritairement ces grains de blé.

En parallèle, l'étude de la validité de la mesure du TOL-NE par la méthode d'échange isotopique « voie dure » sur l'amidon et les grains de blé apparaît intéressante de par leurs propriétés faiblement hydrosolubles. L'évaluation du biais analytique entraîné sur ce type de matrice apparaît alors comme une information enrichissante dans le cadre de la problématique « analytique ». De plus, le grain de blé étudié dans les travaux présentés ici fait partie des échantillons du circuit de comparaison inter-laboratoires de l'OBT working group. Cette matrice est donc en cours d'évaluation depuis 2015 pour devenir un matériau de référence certifié ou non (MR ou MRC), pour des applications à la mesure des activités en TOL. Ainsi, l'évaluation de la fiabilité de la technique classique de détermination des fractions échangeable et non-échangeable du TOL dans cette matrice est une information complémentaire de grand intérêt.

Enfin, l'amidon est un biopolymère synthétisé dans la cellule végétale à partir des molécules de glucose provenant de la photosynthèse. Comme mentionné précédemment, ces molécules sont les premières exposées à l'intégration du tritium dans la matière organique du vivant. L'étude de sa répartition dans une biomolécule complexe comme l'amidon est donc également une information d'intérêt pour l'amélioration des connaissances sur le comportement du tritium dans les matrices environnementales.

2.3.3. **Le *Myriophyllum Spicatum* et sa paroi cellulosique**

Le *Myriophyllum Spicatum* est un macrophyte principalement composé d'une fraction cellulosique, constituée de cellulose, hémicellulose et lignine, et d'une fraction azotée, majoritairement représentée par des protéines. La cellulose et les protéines sont des biomolécules dont la structure est connue pour être très complexe et siège de nombreuses liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires. Ces caractéristiques font du *Myriophyllum Spicatum* une matrice très intéressante pour l'étude du paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) et un candidat de choix pour l'étude du paramètre (α_{Crl}) dans le cadre de la problématique « spéciation ».

Afin de déterminer l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose de la matrice « Myriophylle », sans modifier sa structure initiale, il a été nécessaire de procéder à une extraction de toute sa paroi cellulosique, sans purification supplémentaire pour l'isolation de la cellulose seule.

Le *Myriophyllum Spicatum* est une plante aquatique envahissante considérée comme organisme modèle dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique depuis 2014 (OECD, 2013a, 2013b). Dans le cadre de la problématique « analytique », ce bioindicateur censé présenter une très faible solubilité dans l'eau est une matrice d'intérêt pour l'évaluation de la fiabilité de la méthode « voie dure » pour la quantification de la fraction TOL-NE.

2.3.4. **Les celluloses natives et leurs dérivés**

La cellulose est le biopolymère majoritaire de toute la biomasse végétale des écosystèmes terrestres. Au niveau de la cellule végétale, il constitue en grande partie la paroi cellulosique avec l'hémicellulose et la lignine. Dans une matrice environnementale, la structure semi-cristalline de la cellulose est variable. Elle est également supposée responsable des phénomènes de diminution de l'accessibilité à une partie des atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons faibles pendant les processus basés sur les échanges isotopiques. Ainsi, le rapport phase cristalline sur phase amorphe d'une cellulose constituante est un critère fondamental pour décrire le comportement du tritium dans une matrice environnementale cellulosique.

Pour approfondir les connaissances relatives aux questionnements soulevés par la problématique « spéciation », il est proposé d'explorer l'accessibilité des atomes d'hydrogène en fonction de la structure cristalline de la cellulose. Dans ce but, une étude de l'évolution du paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) de celluloses natives est réalisée en fonction de leur Indice de Cristallinité (CrI) respectif. Le modèle expérimental $f(\text{CrI}) = (\alpha_{iso_{celluloses}})$ ainsi établi doit alors permettre de déterminer le paramètre (α_{CrI}) pour chaque matrice environnementale cellulosique.

Une série de cinq celluloses à taux de cristallinité variable a été préparée à partir de deux celluloses natives commerciales. Une technique de broyage à billes à intensité contrôlée a été employée afin de détruire partiellement le réseau cristallin des deux celluloses commerciales et ainsi conduire à la production de trois autres celluloses à cristallinité décroissante (Tableau II-2).

Tableau II-2 : Paramètres de préparation des dérivés de celluloses natives commerciales.

Nom de la matrice	Cellulose d'origine	Vitesse (rpm)	Accélération (x g)	Durée (min)
Cellulose A	C	650	142	15
Cellulose B	C	500	84	10
Cellulose C	-	-		-
Cellulose D	E	450	68	3
Cellulose E	-	-		-

Afin de vérifier les limites de validité des déterminations de l'Indice de Cristallinité (CrI) qui sont réalisées sur les matrices environnementales cellulosiques avant l'emploi du modèle expérimental, la série de cellulose native préparée est par la suite déclinée en une série d'échantillons à teneur en cellulose variable. Un composé amorphe de dioxyde de silicium SiO₂ est ainsi ajouté en différentes quantités à chaque cellulose native de la série afin de vérifier la teneur minimale de cellulose, en fonction de son Indice de Cristallinité (CrI), nécessaire dans un échantillon pour retrouver par calcul une valeur correcte de cet Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose. Cette étude des limitations sur les Indices de Cristallinité (CrI) déterminés doit ainsi permettre de définir également les limites d'applications du modèle expérimental pour déterminer le paramètre (α_{CrI}) d'une matrice environnementale cellulosique en fonction de sa teneur en cellulose et de l'Indice de Cristallinité (CrI) qu'elle présente. La liste exhaustive des échantillons préparés pour cette étude ainsi que leurs caractéristiques sont disponibles dans la publication n°2 présentée dans le chapitre 3.

2.3.5. Les substances humiques

Les substances humiques sont des matrices complexes du sol composées d'un ensemble hétérogène de biomolécules provenant de la biomasse végétale en décomposition. Les processus d'humification et de dégradation de la lignine sont à l'origine de la formation des substances humiques sous un ensemble d'associations très variables de petites molécules fortement liées entre elles par différentes forces.

Ces arrangements sont alors responsables de la structure très complexe des substances humiques qui font du sol un compartiment de stockage du tritium sous sa forme liée à la matière organique (IRSN, 2017).

Les substances humiques présentent une réactivité essentiellement liée à la présence d'une grande variété de groupements fonctionnels dont l'élément clé est l'oxygène lié à un atome d'hydrogène labile. Ce dernier leur confère un caractère poly-électrolyte de type anionique dont résultent leurs propriétés réductrices, tensioactives et surtout leur pouvoir séquestrant (adsorbant, complexant, chélatant) vis-à-vis de composés organiques et minéraux comme les métaux lourds. Ainsi, afin d'améliorer la compréhension des phénomènes de rémanence du tritium dans l'environnement mais également du potentiel réactif des substances humiques dans un contexte plus global de la pollution environnementale, la labilité de l'atome d'hydrogène dans les substances humiques est étudiée à travers deux matrices riches en matière humique : SH-Li et SH-Le.

2.4. Bilan

L'objectif global des travaux présentés dans cette thèse est d'approfondir les connaissances sur la spéciation des différentes formes de TOL dans les matrices environnementales. En réponse aux différents questionnements précédemment exposés, l'organisation de ces travaux s'articule autour de deux thématiques d'étude : (1) une problématique « spéciation » axée sur l'évaluation du lien entre structure moléculaire et comportement du TOL et (2) une problématique « analytique » axée sur la validation d'une méthode de quantification des différentes formes de TOL. Pour aborder ces travaux, une stratégie d'étude a alors été développée en visant à apporter des éléments de réponse à partir d'une méthodologie propre à chaque problématique posée :

- (1) **La problématique « spéciation »** : Un paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) est déterminé pour chaque matrice d'étude à partir d'un processus d'échange isotopique par la méthode « voie douce ». Les propriétés d'échange de l'atome d'hydrogène inhérentes aux structures moléculaires des constituants de différentes matrices sont appréhendées à travers une étude comparative du paramètre (α_{iso}) par rapport à :
 - (i) Un paramètre ($\alpha_{modèle}$) basé sur les modèles moléculaires des constituants de la matrice et correspondant à une notion de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène proposée par la vision analytique (i.e. atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons chimiques faibles),

- (ii) Un paramètre (α_{CrI}) dans le cas particulier des matrices cellulosiques, déterminé à partir de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose d'une matrice et l'application d'un modèle expérimental $f(CrI) = (\alpha_{iso_{celluloses}})$ obtenu à partir d'un système de celluloses natives,
- (iii) Un paramètre (α_{depro}) dans le cas particulier des substances humiques, représentatif du taux d'atomes d'hydrogène réactifs à la déprotonation par voie chimique.

(2) La problématique « analytique » : Les deux méthodes d'échanges isotopiques « voie dure » et « voie douce » sont appliquées à une même série de matrices environnementales et la fiabilité de la méthode « voie dure » est évaluée en fonction du biais observé lors de la comparaison des résultats sur :

- (i) Les concentrations en activité du TOL-NE directement mesurées dans l'eau de combustion et exprimées en Bq.L⁻¹ d'eau de combustion,
- (ii) Les concentrations en activité du TOL-NE converties en Bq.kg⁻¹ d'échantillon sec après détermination du % massique d'hydrogène.

Ainsi, les travaux ont été réalisés sur un ensemble de matrices environnementales mais également, dans certains cas, sur leur constituant majoritaire extrait. Les matrices d'étude ont alors été choisies principalement sur la base de leur représentativité au niveau de leur composition en biomolécules majoritaires de la biomasse terrestre et de la diversité des structures et arrangements moléculaires qu'elles peuvent présenter.

3. L'ÉCHANGE ISOTOPIQUE DE L'ATOME D'HYDROGENE

Les échanges isotopiques sont des phénomènes de substitutions atomiques qui reposent sur le principe d'équilibre isotopique des différents isotopes d'un même élément chimique dans un système défini. Ainsi, pour l'élément hydrogène, les ratios $\left(\frac{^1\text{H}}{\text{H}}\right)$, $\left(\frac{^2\text{H}}{\text{H}}\right)$ et $\left(\frac{^3\text{H}}{\text{H}}\right)$ sont respectés dans un même environnement et en perpétuel équilibre entre les différents compartiments du système. Dans les travaux présentés ici, deux méthodes d'échanges isotopiques sont étudiées et appliquées à une gamme de matrices environnementales afin d'obtenir des éléments de réponse aux questionnements soulevés dans les problématiques « spéciation » et « analytique » précédemment exposées. De façon générale, les propriétés labiles de l'atome d'hydrogène sont ici exploitées dans le but d'appauvrir ou de marquer une matrice cible en tritium organiquement lié échangeable (TOL-E).

3.1. La méthode d'échange isotopique « voie douce »

3.1.1. Procédure expérimentale

La méthode d'échange isotopique intitulée « voie douce » est une technique réalisée dans un système hermétiquement clos où la réaction d'équilibre isotopique se déroule en phase vapeur avec des paramètres de température ($20 \pm 0,1^\circ\text{C}$) et d'humidité relative ($85 \% < \text{HR} < 88 \%$) contrôlés et stables (Péron *et al.*, 2018).

Dans une boîte à gants, une solution saturée en chlorure de potassium avec un ratio $\left(\frac{\text{T}}{\text{H}}\right)$ défini est introduite et placée au contact de l'atmosphère du système. A une température fixée à $20 \pm 0,1^\circ\text{C}$ et une pression atmosphérique standard estimée à 1013,25 hPa, la pression de vapeur saturante est atteinte dans le système et le chlorure de potassium fixe l'humidité relative (cf. Annexe V). La solution saline est alors partiellement entraînée en phase vapeur : un premier équilibre isotopique s'établit entre la phase liquide $\left(\frac{\text{T}}{\text{H}}\right)_{\text{liq}}$ et la phase vapeur $\left(\frac{\text{T}}{\text{H}}\right)_{\text{vap}}$ de la solution saturée. Des échantillons de la matrice étudiée sont préalablement déshydratés par lyophilisation et dépourvus de leur fraction TED. Les échantillons sont ensuite placés au contact de la phase vapeur : un deuxième équilibre isotopique s'établit entre la phase vapeur $\left(\frac{\text{T}}{\text{H}}\right)_{\text{vap}}$ de la solution saturée et l'eau libre de l'échantillon $\left(\frac{\text{T}}{\text{H}}\right)_{\text{TED}}$ provenant de sa réhydratation. Enfin, un troisième

équilibre s'établit entre cette eau libre $\left(\frac{T}{H}\right)_{TED}$ et les positions hydrogènes échangeables de la matrice $\left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-E}$ (Eq. II-1).

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{liq} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{vap} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{TED} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-E} \quad \text{Eq. II-1}$$

La matrice étudiée peut ainsi être soumise à différentes atmosphères avec des concentrations en activité du tritium variables. L'équilibre isotopique défini par l'équation (Eq. II-1) est atteint après une durée observée moyennée à 48 heures de contact entre l'échantillon et la phase vapeur. Afin de vérifier l'obtention effective de l'équilibre et la répétabilité des résultats, les échantillons sont récupérés pour chaque échange isotopique sous forme de réplicas après trois temps de contact différents, supérieurs ou égaux à 48 heures.

Afin d'interrompre les échanges avec l'atmosphère, les échantillons récupérés à l'équilibre sont immédiatement immergés dans de l'azote liquide et déshydratés par lyophilisation. Les échantillons sont par la suite traités par combustion dans un four tubulaire et l'eau de combustion ainsi obtenue est neutralisée et distillée. A la sortie du dernier échantillon solide du système, des aliquots de la solution saturée en phase liquide sont également prélevés et distillés sous forme de triplicats pour déterminer la concentration en activité de la solution saline à l'équilibre.

Les concentrations en activité de tritium des eaux de combustion des échantillons et de la solution d'échange à l'équilibre sont mesurées par scintillation liquide.

3.1.2. Calcul du paramètre d'échangeabilité (α_{iso})

Le paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) obtenu par échanges isotopiques représente l'ensemble de la fraction d'atomes d'hydrogène organiquement liés échangeables dans une matrice par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène de sa matière organique. L'obtention de ce paramètre est l'étape clé de la problématique « spéciation » et se positionne au commencement de l'étude comparative pour la détermination de la nature des fractions TOL-E et TOL-NE dans l'environnement.

Dans le cadre de notre étude, le paramètre (α_{iso}) est obtenu pour chaque matrice étudiée à partir des données d'une série d'échanges isotopiques par la méthode « voie douce ». Pour chaque matrice étudiée, quatre échanges isotopiques avec des activités croissantes en tritium dans la solution saline saturée d'échange sont réalisés.

Selon l'équilibre isotopique décrit dans l'équation (Eq. II-1), la fraction d'atomes d'hydrogène organiquement liés échangeables des échantillons est appauvrie ou enrichie en tritium en fonction de la concentration en activité présente dans l'atmosphère d'échange. Dans le cas des matrices présentant une activité en TOL initiale significative ($TOL > 5 \text{ Bq.kg}^{-1}$ de matière sèche), le premier processus d'échange est un appauvrissement réalisé avec une solution saline saturée atritiée préparée avec une eau commerciale « Eau des Abatilles » ($HTO < 0,2 \text{ Bq.L}^{-1}$) (Fourré *et al.*, 2014). Les trois autres processus d'échange pour ces matrices sont des marquages en tritium réalisés avec des concentrations en activité du tritium théoriques approximatives dans les solutions d'échanges de 120 Bq.L^{-1} , 300 Bq.L^{-1} et 500 Bq.L^{-1} . Dans le cas des matrices prélevées en dehors des zones d'influence des rejets de tritium dans l'environnement, soit avec une activité initiale en TOL faible ($TOL \ll 5 \text{ Bq.kg}^{-1}$ de matière sèche), les quatre processus d'échange sont des marquages en tritium réalisés avec des concentrations en activité du tritium théoriques approximatives dans les solutions d'échanges de 120 Bq.L^{-1} , 300 Bq.L^{-1} , 500 Bq.L^{-1} et 700 Bq.L^{-1} .

A l'équilibre et après l'étape de traitements détaillée précédemment, les activités massiques en tritium des eaux de combustion des échantillons et de la solution d'échange sont obtenues pour chaque processus de marquage ou d'appauvrissement isotopique. A partir de ces données, une courbe à tendance linéaire des valeurs $\left(\frac{T}{H}\right)_{TOL}$ mesurées dans les matrices à l'équilibre par rapport aux valeurs $\left(\frac{T}{H}\right)_{liq}$ mesurées dans la solution d'échange à l'équilibre est représentée et l'équation de droite associée est obtenue par régression linéaire. Le paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) représente alors la pente de cette droite et se détermine selon l'équation (Eq. II-2).

$$(\alpha_{iso}) = \frac{\Delta \left(\frac{T}{H}\right)_{TOL}}{\Delta \left(\frac{T}{H}\right)_{liq}} \quad \text{Eq. II-2}$$

3.1.3. La mesure du TOL-NE

Pour apporter des réponses à la problématique « analytique », la détermination de la fraction non-échangeable du tritium organiquement lié (TOL-NE) doit être réalisée à partir des deux méthodes d'échange isotopique. Le TOL-NE a été précédemment défini comme la fraction du TOL qui ne se soumet pas au processus d'équilibre isotopique et ne participe donc pas aux échanges basés sur la labilité de l'atome d'hydrogène. Afin de mesurer la fraction TOL-NE de la matrice étudiée, la fraction TOL-E doit être éliminée par échange isotopique.

Lorsque la méthode d'échange isotopique « voie douce » est employée, un processus d'appauvrissement est réalisé avec une solution saline saturée atritiée préparée avec une eau commerciale « Eau des Abatilles » ($\text{HTO} < 0,2 \text{ Bq.L}^{-1}$) (Fourré *et al.*, 2014). La solution saline saturée atritiée en phase liquide est partiellement entraînée en phase vapeur, produisant une atmosphère atritiée au contact des échantillons déshydratés.

Ainsi, l'équilibre isotopique décrit par l'équation (Eq. II-1) s'établit progressivement entre les échantillons solides et la phase vapeur atritiée : les atomes de tritium en position organiquement lié échangeable accessibles dans l'échantillon s'échangent avec les atomes d'hydrogène stables en excès dans l'atmosphère. A l'équilibre, les échantillons de la matrice étudiée ne comportent plus que de la fraction TOL-NE. Après l'étape de traitements post-échanges isotopiques précédemment décrits, l'activité massique restante est mesurée dans l'eau de combustion de l'échantillon et est directement attribuée à l'activité massique de la fraction TOL-NE.

De façon générale, le volume conséquent de la solution d'échange (approx. 0,8 L) entraîne un rapport de dilution qui ne permet pas de mesurer directement l'activité en fraction TOL-E extraite de la matrice. Celle-ci est alors obtenue par calcul après mesure de l'activité en fraction TOL initiale dans la matrice d'étude et par soustraction de l'activité en fraction TOL-NE mesurée après appauvrissement.

3.1.4. **Le calcul du TOL-NE**

La méthode d'échange isotopique « voie douce » est une technique qui repose sur des relations entre les différentes fractions du TOL et dont les informations peuvent s'obtenir à partir des séries d'échanges isotopiques. Après obtention du paramètre (α_{iso}) comme détaillé précédemment, la relation établie entre les fractions TOL, TOL-E et TOL-NE est décrite par l'équation (Eq. II-3) (Feng *et al.*, 1993).

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{TOL} = \alpha_{iso} \times \left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-E} + (1 - \alpha_{iso}) \times \left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-NE} \quad \text{Eq. II-3}$$

Ainsi, la fraction non-échangeable du tritium organiquement lié (TOL-NE) peut également être calculée dans une matrice environnementale dans le cadre de la problématique « analytique » à partir du paramètre d'échangeabilité (α_{iso}) selon la relation donnée par l'équation (Eq. II-4).

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-NE} = \frac{\left[\left(\frac{T}{H}\right)_{TOL} - \alpha_{iso} \times \left(\frac{T}{H}\right)_{liq}\right]}{(1 - \alpha_{iso})} \quad \text{Eq. II-4}$$

3.2. La méthode d'échange isotopique « voie dure »

3.2.1. Procédure expérimentale

La méthode d'échange isotopique intitulée « voie dure » est une technique réalisée dans un système clos où la réaction d'équilibre isotopique se déroule en phase aqueuse. Cette méthode est susceptible d'entraîner des phénomènes de solubilisation et dégradation de la matière qui l'entachent de questionnements sur sa fiabilité analytique. Ainsi, cette méthode est utilisée pour réaliser des processus d'appauvrissements isotopiques en tritium dans le cadre de la problématique « analytique ».

Des échantillons de la matrice étudiée sont préalablement déshydratés par lyophilisation et dépourvus de leur fraction TED. Les échantillons sont ensuite placés en immersion dans un large volume d'une solution d'eau atritiée (facteur 10 env.), préparée avec une eau de forage ($\text{HTO} < 0,01 \text{ Bq.L}^{-1}$), puis conservés sous agitation. Un équilibre isotopique s'établit alors entre les différents atomes d'hydrogène de la solution atritiée, de l'eau libre provenant de la réhydratation des échantillons et de la fraction organiquement liée échangeable (Eq. II-5).

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{liq} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{TED} \rightleftharpoons \left(\frac{T}{H}\right)_{TOL-E} \quad \text{Eq. II-5}$$

L'équilibre isotopique défini par l'équation (Eq. II-5) est supposé atteint après une durée observée moyennée à 48 heures de contact entre l'échantillon et la phase aqueuse. Afin de vérifier la reproductibilité, le processus d'appauvrissement par « voie dure » est reproduit en triplicats pour chaque matrice étudiée. Les échantillons sont récupérés à l'équilibre après 48h de contact par filtration et centrifugation.

Afin d'interrompre les échanges, les échantillons filtrés et centrifugés sont immédiatement placés en congélation (température de $-18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) dans des sacs hermétiques pendant 48 heures puis déshydratés par lyophilisation. Les échantillons sont par la suite traités par combustion dans un four tubulaire et l'eau de combustion ainsi obtenue est neutralisée et distillée. Des aliquots de la solution d'eau atritiée sont également prélevés à l'équilibre et distillés.

Les activités massiques en tritium des eaux de combustion des échantillons et de la solution d'échange à l'équilibre sont mesurées par scintillation liquide.

3.2.2. La mesure du TOL-NE

Pour répondre à la problématique « analytique », la méthode d'échange isotopique « voie dure » est une méthode utilisée pour isoler la fraction TOL-NE dans une matrice environnementale. La quantification du TOL-NE peut être réalisée après extraction de la fraction échangeable du tritium organiquement lié (TOL-E) d'un échantillon.

Tout comme l'appauvrissement par la méthode d'échange isotopique « voie douce » précédemment décrit, la solution d'échange pour la méthode « voie dure » est atritiée et préparée avec une eau de forage ($\text{HTO} < 0,01 \text{ Bq.L}^{-1}$). Les échantillons déshydratés immergés dans cette solution pendant 48 heures sont appauvris en fraction TOL-E : les atomes de tritium en position organiquement lié échangeable dans la matrice vont s'échanger avec les atomes d'hydrogène stables en excès dans la solution d'échange. A l'équilibre, la matrice étudiée ne comporte plus que de la fraction TOL-NE, dont l'activité massique est mesurée dans l'eau de combustion.

Le volume de la solution d'échange est ajusté pour chaque matrice afin d'assurer l'immersion complète de l'échantillon en cours de traitement par échange isotopique. Dans la majorité des cas et contrairement à la méthode d'échange isotopique « voie douce », la fraction TOL-E extraite de l'échantillon peut être directement quantifiée par mesure de l'activité massique de la solution d'échange à l'équilibre. Dans le cas où le facteur de dilution est trop important, la fraction TOL-E est obtenue par calcul à partir des fractions TOL et TOL-NE quantifiées.

4. LES OUTILS ANALYTIQUES

4.1. L'analyse du tritium organiquement lié

La mesure du tritium est réalisée par la technique de scintillation liquide dans un échantillon sous forme liquide. Dans le cas des échantillons solides des matrices environnementales avant et après échange, une étape préliminaire de transformation par combustion est nécessaire pour obtenir un échantillon liquide, contenant le tritium de l'échantillon traité.

4.1.1. La combustion en four tubulaire

4.1.1.1. Principe et fonctionnement

La combustion dans un four tubulaire est une technique qui permet de convertir la matière organique d'un échantillon en gaz de combustion. Ces derniers sont par la suite transformés par oxydation catalytique en eau de combustion contenant le tritium de l'échantillon traité. Un schéma détaillant le principe de la combustion dans un four tubulaire est disponible en Figure II-3 (Baglan *et al.*, 2010).

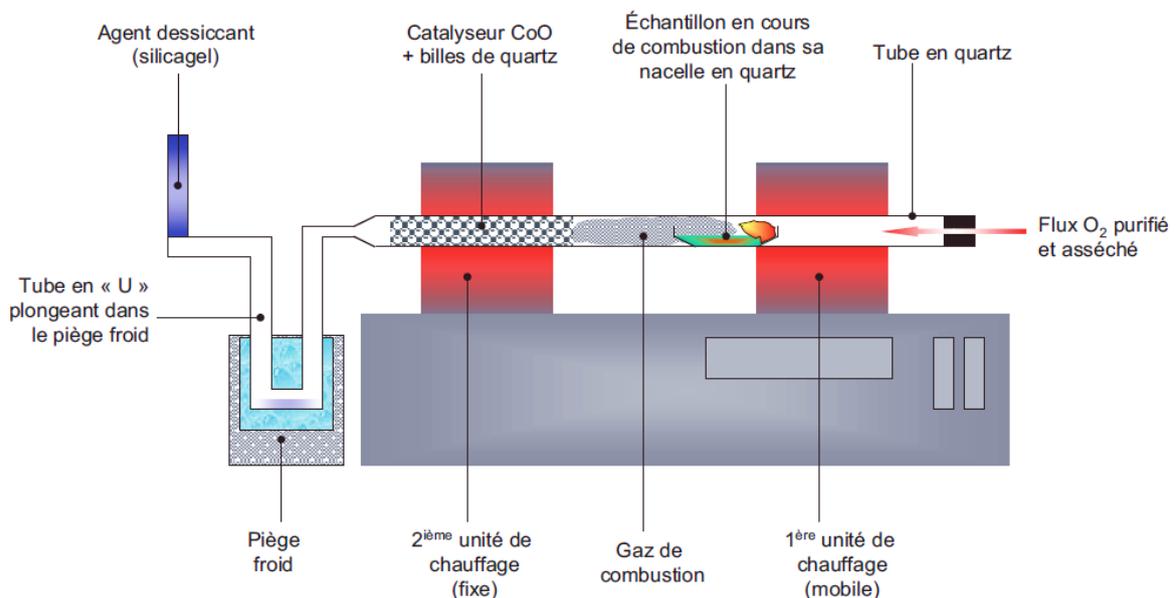


Figure II-3 : Schéma du principe de la combustion d'échantillons tritiés dans un four tubulaire (Baglan *et al.*, 2010).

Le four tubulaire est composé d'un tube en quartz inséré dans deux unités chauffantes, balayé par un flux constant d'oxygène pur et sec. La première unité chauffante (450°C) permet la combustion de l'échantillon placé dans une nacelle en quartz, qui est réduit en cendres et en gaz. Cette unité est mobile afin d'optimiser l'allure de la combustion en fonction de la matrice traitée. La deuxième unité chauffante (850°C) contient un mélange catalyseur à base d'oxyde de platine et de billes de quartz qui permet l'oxydation catalytique des gaz de combustion pour produire l'eau de combustion. Un piège à froid est placé en sortie du tube en quartz afin de recueillir l'eau de combustion tritiée ainsi formée.

4.1.1.2. Procédure

Les échantillons des matrices environnementales d'étude sont traités par combustion dans le four tubulaire afin de récupérer l'eau de combustion contenant le tritium. Cette technique est utilisée dans le cadre des mesures des activités massiques en tritium organiquement lié (TOL) avant et après traitements par échanges isotopiques selon les méthodes « voie dure » et « voie douce ». Dans le cas des appauvrissements isotopiques, les activités massiques en TOL mesurées font références à celles du TOL-NE restant dans l'échantillon. Les échantillons à traiter sont préalablement déshydratés par lyophilisation afin d'en retirer l'eau libre et par conséquent la fraction tritium de l'eau de déshydratation (TED).

La masse d'échantillon introduite dans la nacelle pour la combustion est conditionnée pour l'obtention d'une masse d'eau de combustion suffisante pour une mesure optimale par scintillation liquide (Baglan *et al.*, 2005 ; Pointurier *et al.*, 2004). Elle est alors dépendante de la teneur en hydrogène dans la matrice et se détermine à partir de l'équation (Eq. II-6).

$$m_{ech} = \frac{V_{SL} \times \left(\frac{M_{(H)}}{M_{H_2O}} \right)}{\% H} \quad \text{Eq. II-6}$$

Avec :

m_{ech} : la masse d'échantillon pour obtenir le volume V_{SL} après combustion,

V_{SL} : le volume d'eau de combustion à obtenir,

$\left(\frac{M_{(H)}}{M_{H_2O}} \right)$: la masse molaire de l'hydrogène dans une molécule d'eau,

$\% H$: le pourcentage massique d'hydrogène contenu dans la matrice d'étude.

Une étape de combustion avec une eau de référence est réalisée entre chaque combustion d'échantillons tritiés afin de limiter le risque de contaminations croisées. Cette eau de lavage (blanc de combustion) est ensuite traitée et mesurée comme une eau de combustion.

L'eau de combustion recueillie en sortie du système est généralement acide. Elle est neutralisée par ajout de peroxyde de sodium puis distillée avant la mesure par scintillation liquide, afin d'éviter les effets d'affaiblissement lumineux. Pour chaque série de distillation, un blanc de distillation est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales avec une eau de référence. Le blanc de distillation permet de vérifier les contaminations atmosphériques tritiées potentielles durant le processus de distillation des échantillons liquides.

4.1.2. **La scintillation liquide**

4.1.2.1. Principe et fonctionnement

La scintillation liquide est une technique de mesure de la radioactivité dans des échantillons liquides. Son principe consiste à mélanger la solution radioactive à mesurer à un cocktail, le liquide scintillant, contenant un solvant avec une ou plusieurs substances fluorescentes. Les molécules organiques présentes dans le cocktail sont alors excitées par un rayonnement β^- produit par désintégration radioactive. Les photons proportionnellement émis après une cascade de transfert d'énergie sont alors captés par un photomultiplicateur, transformés en signal et mesurés par le compteur. Le système intègre deux photodétecteurs fonctionnant en coïncidence pour discriminer le bruit de fond des signaux résultant de la désintégration radioactive, observés alors simultanément sur un laps de temps court. Le fonctionnement de la double coïncidence est présenté en Figure II-4 (Cassette, 2004).

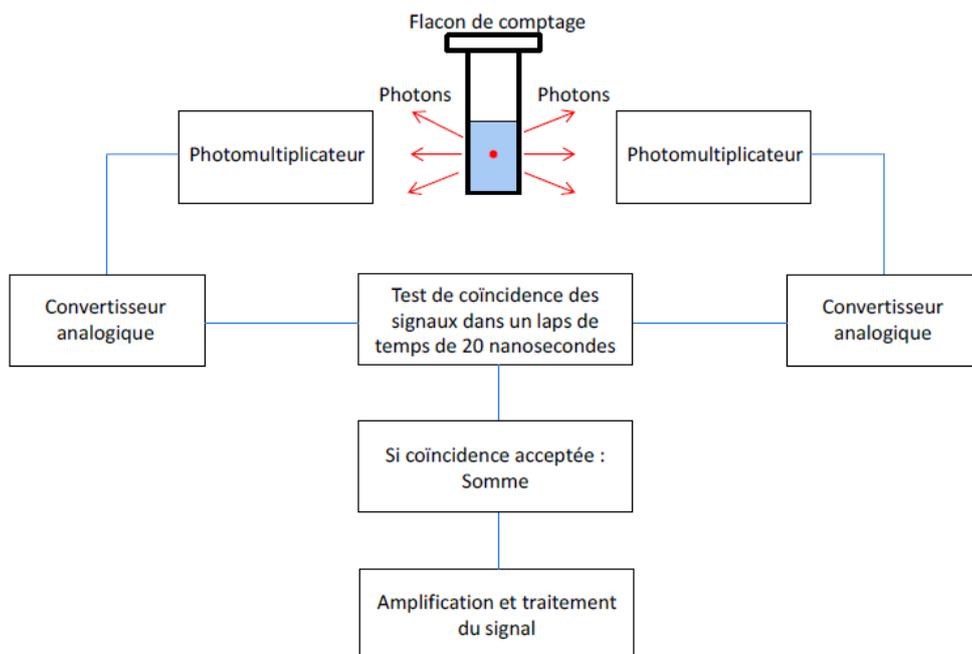


Figure II-4 : Chaîne de détection des photons en double coïncidence (Cassette, 2004).

Cette technique est soumise au phénomène d'affaiblissement lumineux, qui définit les interférences provenant de toutes manifestations physico-chimiques provoquant un affaiblissement du signal lumineux. Le rendement de détection variable d'une mesure à l'autre est déterminé à partir de la courbe d'affaiblissement lumineux, relative à l'efficacité de comptage et propre à chaque condition de mesure.

4.1.2.2. Procédure

La scintillation liquide est utilisée pour la mesure des teneurs en tritium des solutions d'échanges isotopiques à l'équilibre et des eaux de combustion des échantillons avant et après traitements par échanges isotopiques selon les méthodes « voie dure » et « voie douce ».

Les échantillons liquides à analyser sont introduits dans des flacons antistatiques en polyéthylène teflonné. Un liquide scintillant Ultima Gold LLT (Packard) est ajouté dans des proportions définies pour établir la courbe d'affaiblissement lumineux.

Pour chaque série de comptage et de préparation à la mise au compteur, deux échantillons témoins sont préparés dans les mêmes conditions expérimentales avec de l'eau de référence et placés en début et fin de série de comptage. Les témoins permettent de vérifier la contamination potentielle en tritium pendant la préparation des échantillons mais également de mesurer le bruit de fond pendant l'analyse par scintillation liquide.

Deux types de compteurs à scintillation liquide sont utilisés dans le cadre de notre étude : un Packard modèle Tri-Carb 3170 TR/SL (PerkinElmer) et un Wallac Quantulus modèle 1220 (PerkinElmer). Le temps de comptage est défini en fonction de l'activité en tritium présente dans l'échantillon liquide, de l'équipement utilisé et de la limite de détection visée (cf. Annexe VI).

4.1.2.3. Application à la mesure de l'activité radioactive

Les résultats des comptages par scintillation liquide sont exprimés en nombre de coups ou coups par minutes (cpm). A partir du temps de comptage, le taux de comptage (cpm) est converti en nombre de coup et la concentration en activité (A_{comb}^{HTO}) exprimée en Bq.L⁻¹ d'eau de combustion est déterminée à partir de la relation donnée par l'équation (Eq. II-7) (Baglan *et al.*, 2010).

$$A_{comb}^{HTO} = \frac{(N - N_0)}{t \times \eta} \times \frac{1}{m} \quad \text{Eq. II-7}$$

Avec :

N : le nombre de coups de l'échantillon,

N_0 : le nombre de coups moyenné des témoins,

t : le temps de comptage en secondes,

η : l'efficacité de comptage (nombre sans dimension compris entre 0 et 1),

m : la masse d'eau de combustion introduite pour le comptage.

4.2. Etude des propriétés labiles de l'atome d'hydrogène

Pour répondre à la problématique « spéciation », des outils analytiques usuels sont employés afin d'étudier les propriétés labiles de l'atome d'hydrogène. A partir des procédures établies, chaque technique permet d'accéder à différents paramètres (α) recherchés pour évaluer les déclinaisons définissant la fraction échangeable des atomes d'hydrogène organiques.

4.2.1. La Diffractométrie de Rayons X (DRX)

4.2.1.1. Principe et fonctionnement

La technique de diffraction des rayons X est une méthode d'analyse physico-chimique de la matière cristallisée. Son principe repose sur l'utilisation d'un faisceau de rayons X sur la matière, qui est renvoyé dans des directions spécifiques en fonction de la longueur d'onde et des dimensions et orientations du réseau cristallin (Hannawalt *et al.*, 1938). La mesure des angles et de l'intensité des rayons diffractés permet alors d'obtenir des informations sur la maille cristalline de la matière : ses dimensions, ses symétries structurales et sa densité électronique. A partir de ces renseignements, il est possible de déterminer la position moyenne et la nature des atomes du motif cristallin, leur agitation thermique, leurs liaisons chimiques et d'autres informations sur la structure cristalline (Jenkins et Snyder, 1996).

4.2.1.2. Procédure

Les analyses de diffractométrie de rayons X sont réalisées sur un équipement modèle D5000 (Brucker).

Les échantillons déshydratés par lyophilisation sont réduits en poudre par broyage simple afin d'éviter les interactions avec la structure cristalline initiale. La poudre est aplanie dans une coupelle et introduite dans la chambre de diffraction.

La longueur d'onde de la source de rayonnement Cu/K α utilisée est de 0,154 nm et les spectres sont obtenus à 30 mA avec une tension d'accélération de 40 kV. La mesure est réalisée à des angles 2θ de 0 à 50° avec un pas de 1° par minute. Ces paramètres d'analyse ont été choisis sur la base des paramètres usuellement employés et mentionnés dans la littérature pour l'analyse de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose.

4.2.1.3. La détermination de l'Indice de Cristallinité (CrI)

L'Indice de Cristallinité (CrI) représente la proportion de phase cristalline dans la matrice étudiée par rapport à sa phase amorphe. Sa détermination dans une molécule de cellulose peut notamment être réalisée par calcul, à partir des diagrammes de diffraction, d'après la méthode développée par (Segal *et al.*, 1959) et largement reprise pour la détermination de la cristallinité de la cellulose (Johar *et al.*, 2012 ; Luzi *et al.*, 2019 ; Melikoğlu *et al.*, 2019 ; Trache *et al.*, 2016).

Le calcul de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose selon cette méthode est représenté par l'équation (Eq. II-8).

$$CrI (\%) = \frac{(I_{002} - I_{am})}{I_{002}} \times 100 \quad \text{Eq. II-8}$$

Avec :

I_{002} : l'intensité maximale du pic de diffraction à l'angle $2\theta = 22^\circ$ d'indices de Miller (200)

I_{am} : l'intensité minimale de la phase amorphe à l'angle $2\theta = 18^\circ$

Cette méthode repose sur l'identification d'un pic au niveau de l'indice de Miller (200) et l'usage de son intensité maximale dans l'échantillon analysé comme relative à la cristallinité de sa cellulose. La fiabilité de cette technique repose alors essentiellement sur les paramètres analytiques employés lors de l'analyse DRX mais peut également être limitée par la composition de l'ensemble d'un échantillon non exclusivement cellulosique analysé. Les limites de détermination de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose dans un échantillon non exclusivement cellulosique par cette méthode, et dans les conditions analytiques employées, sont alors évaluées à partir d'une étude de séries d'échantillons de celluloses natives à Indice de Cristallinité (CrI) et teneurs variables dans un composé amorphe de SiO_2 . Les caractéristiques et résultats associés à cette étude sont présentés dans la publication n°2 du chapitre 3.

4.2.1.4. Application à la détermination du paramètre (α_{CrI})

Dans le cadre de la problématique « spéciation », l'évaluation de l'impact de la structure cristalline de la cellulose, par rapport à l'accessibilité des atomes d'hydrogène organiquement liés dans une matrice environnementale cellulosique, est réalisée par une étude comparative entre le paramètre (α_{iso}) et le paramètre (α_{CrI}).

Un modèle expérimental est alors développé à partir de celluloses natives afin de déterminer la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène propre à une cellulose en fonction de son Indice de Cristallinité (CrI). L'Indice de Cristallinité (CrI) de chaque cellulose native de la série étudiée est tout d'abord déterminé par une analyse DRX et la méthode de calcul précédemment exposée. Une étude par la méthode d'échange isotopique « voie douce » est par la suite réalisée sur chaque cellulose native afin de déterminer leur paramètre d'échangeabilité (α_{iso}). L'évolution de ce paramètre en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose native est alors décrite par une fonction $f(\text{CrI}) = (\alpha_{iso_{celluloses}})$.

La détermination du paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) dans une matrice environnementale peut ainsi être réalisée à partir d'une analyse DRX d'un échantillon de cette matrice, de la connaissance de la teneur en cellulose dans la matrice et de l'application du modèle expérimental établi. Pour cela, l'Indice de Cristallinité (CrI) d'une cellulose constituante d'une matrice environnementale est calculé à partir d'une mesure par technique DRX d'un échantillon de la matrice et déduit de sa teneur massique dans la matrice. La connaissance du paramètre (CrI) de cette cellulose permet alors d'en déduire son paramètre d'échangeabilité basé sur son Indice de Cristallinité ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) à partir d'une application du modèle expérimental précédemment établi. Ainsi, le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) de la matrice peut se déterminer en considérant les paramètres d'échangeabilité théoriques ($\alpha_{modèle}$) de l'ensemble de ses constituants non-cellulosiques et le remplacement de ce paramètre ($\alpha_{modèle}$) associé à la cellulose par son paramètre d'échangeabilité ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) nouvellement attribué à partir du modèle, selon l'équation (Eq. II-9).

$$(\alpha_{CrI}) = \frac{\left[\sum_{i=1}^n (\alpha_{modèle_{autre}})_i \times (t_{autre})_i \right] + \left[(\alpha_{CrI_{cellulose}}) \times (t_{cellulose}) \right]}{\left[\sum_{i=1}^n (t_{autre})_i \right] + (t_{cellulose})} \quad \text{Eq. II-9}$$

Avec :

$(\alpha_{modèle_{autre}})_i$: le paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) de chaque autre constituant « i » dans la matrice,

$(t_{autre})_i$: la teneur en chaque autre constituant « i » dans la matrice.

$(t_{cellulose})$: la teneur en cellulose dans la matrice,

Pour pouvoir déterminer le paramètre (α_{CrI}) selon cette méthode, la matrice environnementale doit alors présenter une teneur suffisante en cellulose en fonction de son Indice de Cristallinité (CrI) pour permettre une exploitation correcte des résultats de l'analyse DRX réalisée sur la matrice. Une limite d'application du modèle expérimental aux matrices environnementales est alors considérée en fonction des limites de détermination de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose dans les conditions analytiques employées.

4.2.2. Le titrimètre potentiométrique automatique

4.2.2.1. Principe et fonctionnement

L'appareil titrimètre Titrino DMS 716 (Metrohm) est un équipement permettant de réaliser des dosages potentiométriques automatiques grâce au logiciel Tiamo™ 1.2. La création de méthodes de dosage automatique avec des paramètres et des conditions adaptés est réalisable selon deux modes :

- Le mode DET (Dynamic Equivalence point Titration) : La solution titrante est ajoutée jusqu'à l'obtention d'un pH fixé dans la solution titrée. La quantité de solution titrante injectée est automatiquement ajustée en fonction de l'amplitude de variation du pH.
- Le mode MET (Monotonic Equivalence point Titration) : La solution titrante est ajoutée dans des quantités fixes jusqu'à l'obtention d'un pH fixé dans la solution titrée.

Le mode MET est privilégié dans le cas de dosage de solutions inconnues où le système peut réagir à chaque ajout de solution titrante et l'équilibre influencé de façon imprévisible. Ce mode est donc choisi pour toute l'étude présentée ici.

4.2.2.2. Procédure

Les solutions à titrer sont conditionnées sous atmosphère inerte dans le récipient de dosage et isolées de l'atmosphère avec un film spécifique pour le transfert. Le contenant est ajusté à l'appareillage et balayé par un flux d'argon en continu pendant toute la durée du dosage. Cette précaution permet d'éviter tout contact avec les espèces chimiques atmosphériques pouvant interagir avec la solution pendant la procédure et biaiser le dosage potentiométrique. La séquence est initiée par la mesure de pH initial jusqu'à stabilisation à ± 1 mV. La configuration de la séquence est développée pour une incrémentation de maximale de $0,001 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et une attente de stabilisation du pH à ± 1 mV pendant 180 secondes.

La séquence de dosage se termine lorsque la solution à titrer atteint le pH de la solution titrante pour une solution inconnue ou le point d'équivalence recherché pour une solution connue, à l'incertitude près.

4.2.2.3. Application à la détermination du paramètre (α_{depro})

Dans le cadre de la problématique « spéciation », le paramètre d'échangeabilité déterminé par échange isotopique (α_{iso}) est comparé au paramètre d'échangeabilité basé sur le déprotonation (α_{depro}) pour les matrices de type sol. En effet, dans ces matrices à structure trop complexe pour l'établissement d'un modèle moléculaire représentatif, les atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons covalentes faibles, supposés représenter l'ensemble ou une partie de la fraction d'atomes d'hydrogène échangeables, sont rassemblés au niveau groupements fonctionnels à caractère acide ou alcoolique. Les dosages réalisés pour la détermination du taux de protonation de ces groupements sur les matrices étudiées sont basés sur des méthodes classiques de caractérisation de la matière humique des sols (Eyheraguibel, 2004 ; Gossard, 2001 ; Malm *et al.*, 1942 ; Marks et Morrell, 1931 ; Ogg *et al.*, 1945 ; Peterson et West, 1927 ; Schnitzer et Gupta, 1965 ; Schnitzer et Skinner, 1964 ; West *et al.*, 1934).

- **L'acidité totale** (groupes carboxyles et phénols) est déterminée par deux méthodes de dosage : le dosage direct et le dosage indirect. Le dosage direct est réalisé par contact de l'échantillon solide dans une solution d'eau (Milli-Q, 18,2 M Ω cm) décarbonatée avec une solution titrante d'hydroxyde de sodium. Le dosage indirect est réalisé par dosage retour de l'hydroxyde de baryum avec une solution titrante d'acide chlorhydrique.
- La teneur en **groupes phénols protonés** est déterminée par différence entre l'acidité totale et la teneur en groupes carboxyles. **L'acidité carboxylique** est alors déterminée à partir d'un dosage indirect par dosage retour de l'acide acétique produit par contact de l'échantillon avec une solution d'acétate de calcium avec une solution titrante d'hydroxyde de sodium.
- La teneur en **fonctions alcools** protonées est déterminée par différence entre les groupements OH totaux et les groupes phénols protonés. La teneur en **groupement OH totaux** est déterminée à partir d'un dosage indirect par dosage retour de l'acide acétique produit par réaction d'acétylation avec une solution titrante d'hydroxyde de sodium.

Les procédés de déprotonation détaillés ainsi que l'ensemble des équations réactionnelles sont disponibles en Annexe VII. Pour chaque type de groupements fonctionnels étudié (x), un paramètre de déprotonation (α_x) est déterminé en fonction du taux d'atomes d'hydrogène réactifs à la déprotonation par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène de la matrice. Le paramètre d'échangeabilité basé sur la déprotonation (α_{depro}) est alors déterminé à la suite de ces informations selon les équations (Eq. II-10) et (Eq. II-11).

$$(\alpha_{depro}) = (\alpha_{acidité\ totale}) + (\alpha_{alcool}) \quad \text{Eq. II-10}$$

$$\begin{aligned} (\alpha_{alcool}) &= [(\alpha_{OH\ totaux}) - (\alpha_{phénol})] \quad \text{Eq. II-11} \\ &= [(\alpha_{OH\ totaux}) - [(\alpha_{acidité\ totale}) - (\alpha_{carboxyle})]] \end{aligned}$$

Les protocoles d'isolations des fractions des substances humiques employés pour analyser la composition des matrices « SH-Li » et « SH-Le » étudiées sont disponibles en Annexe VIII.

4.3. Etude du biais de la méthode d'échange isotopique « voie dure »

Afin de répondre aux questionnements posés dans la problématique « analytique », des outils et techniques sont utilisés pour apporter des informations complémentaires nécessaires à l'évaluation du biais entrainé par la méthode d'échange isotopique « voie dure ».

4.3.1. L'analyseur élémentaire CHNS

4.3.1.1. Principe et fonctionnement

L'analyse élémentaire est développée pour permettre la détermination simultanée des teneurs (en % massique) en carbone, hydrogène, azote et soufre dans un échantillon solide ou liquide. Son principe repose sur la combustion dynamique « flash » (900°C) de l'échantillon dans un environnement riche en oxygène. Les éléments C, H, N et S (après addition de V_2O_5 comme catalyseur) sont transformés en gaz sous forme de dioxyde de carbone, d'eau, d'oxyde nitrique et d'oxyde de soufre. Ces produits de combustion sont entraînés par un gaz d'hélium vecteur et subissent une conversion catalytique par réactions d'oxydation et de réduction. Les oxydes d'azote sont réduits en N_2 et les oxydes de soufre en SO_2 .

Les gaz sont séparés par chromatographie en phase gazeuse dans une colonne placée dans un four (75°C) et un détecteur à conductivité thermique (TCD) permet alors la quantification des éléments d'intérêts par rapport aux flux de chaleur sortants.

4.3.1.2. Procédure

Les analyses élémentaires sont réalisées sur un équipement analyseur FlashEA® 1112 (ThermoFisher Scientific), sur la chaîne analytique CHNS.

La séquence d'analyse est conditionnée au démarrage par l'analyse d'un matériau de référence certifié (MRC), d'un blanc de mesure et d'un étalon. La première injection du MRC a pour objectifs de conditionner la chaîne analytique et de vérifier son bon fonctionnement. Le blanc est injecté pour déterminer le bruit de fond relatif à la mesure. L'étalonnage est réalisé par la méthode du k-factor avec un seul point d'étalonnage obtenu à partir de la pesée d'un étalon. Cet étalonnage est renouvelé à chaque nouvelle séquence d'analyse afin de considérer l'état des catalyseurs du réacteur, impactant le signal reçu par le détecteur.

Les échantillons solides déshydratés par lyophilisation sont conditionnés dans des nacelles en étain pour favoriser la combustion « flash » de l'analyseur. Les séries d'échantillons sont encadrées par des contrôles de MRC afin de valider les mesures expérimentales.

4.3.1.3. Application à la conversion d'unité de l'activité radioactive

L'analyse élémentaire C, H, N et S est réalisée sur les matrices environnementales étudiées avant et après le processus d'échange isotopique par la méthode « voie dure ». La méthode d'échange isotopique « voie douce » n'étant pas intrusive, il est considéré qu'elle n'entraîne pas de modifications au niveau des teneurs en éléments chimiques.

La variation de la composition élémentaire des échantillons peut alors permettre de mettre en évidence le phénomène de solubilisation d'une partie de l'échantillon pendant l'échange isotopique en « voie dure » mais peut également être utilisée afin d'identifier l'origine du biais analytique potentiel qu'elle engendre.

Le pourcentage massique d'hydrogène est le paramètre utilisé afin de convertir l'unité de la concentration en activité (A_{comb}^{HTO}) exprimée en Bq.L⁻¹ d'eau de combustion en activité massique (A_{ms}^{HTO}) exprimée en Bq.kg⁻¹ d'échantillon sec à partir de l'équation (Eq. II-12).

$$A_{ms}^{HTO} = A_{comb}^{HTO} \times \frac{\%H_{ech}}{\%H_{eau}} \quad \text{Eq. II-12}$$

Avec :

$\%H_{ech}$: le pourcentage massique d'hydrogène dans l'échantillon,

$\%H_{eau}$: le pourcentage massique d'hydrogène dans l'eau.

4.3.2. **L'analyse du Carbone Organique Total – COT-mètre**

4.3.2.1. Principe et fonctionnement

Le COT-mètre est un appareillage qui permet de déterminer le carbone organique total (COT) par plusieurs techniques dans un échantillon solide ou liquide. Dans cette étude, le COT est déterminé par différence des mesures du carbone total (CT) et du carbone inorganique (CI) d'après l'équation (Eq. II-13) (Bisutti *et al.*, 2004).

$$COT = CT - CI \quad \text{Eq. II-13}$$

Le carbone total est déterminé par la méthode d'oxydation thermique basée sur la combustion de l'échantillon en présence d'un catalyseur. Le four contenant un catalyseur de platine est chauffé à 680°C et transforme le carbone organique en CO₂. A la fin de la combustion, le gaz de CO₂ produit est dirigé par un flux d'oxygène vers le détecteur infrarouge où l'aire du pic formé est proportionnelle à la quantité de carbone détectée.

Le carbone inorganique est déterminé par transformation en CO₂ par réaction avec de l'acide phosphorique. Le gaz ainsi produit suit le même circuit vers le détecteur infrarouge.

4.3.2.2. Procédure

Les analyses COT sont réalisées avec un équipement modèle Multi N/C 2100S (Analytik Jena). La séquence analytique est conditionnée par le passage d'un blanc de mesure et de trois étalons. Tout comme l'analyseur élémentaire CHNS, le blanc est mesuré afin de connaître les valeurs de bruits de fond tandis que les étalons valident la linéarité de la mesure.

Les solutions à analyser sont diluées d'un facteur adapté pour permettre d'obtenir des valeurs de CT et IC dans la gamme d'étalonnage précédemment établie et de garantir un résultat fiable.

4.3.2.3. Application à la détermination de la solubilisation

La méthode d'échange isotopique « voie dure » est une technique classique pour la quantification des teneurs en TOL-E et TOL-NE dans les matrices environnementales. La question de l'impact de la solubilisation partielle de l'échantillon qu'elle entraîne sur ces mesures est le centre de la problématique « analytique ».

L'analyse du carbone organique total (COT) dans la solution d'échange à l'équilibre permet alors de rendre compte de la solubilisation effective de l'échantillon et d'évaluer son étendue. Le résultat COT est obtenu par différence entre les valeurs de la solution d'échange à l'équilibre et un blanc de la solution avant échange. La concentration en carbone solubilisé à partir de l'échantillon sec pendant l'échange isotopique « voie dure » dans la solution d'échange analysé est obtenue en milligramme de carbone par gramme de solution $[COT]_{mgC/g_s}$. A partir de ce résultat, la relation présentée par l'équation (Eq. II-14) est établie.

$$[COT]_{mgC/g_{ech}} = \frac{[COT]_{mgC/g_s} \times m_s}{m_{ech}} = \frac{m_C \text{ solubilisé}}{m_{ech}} \quad \text{Eq. II-14}$$

Avec :

$[COT]_{mgC/g_{ech}}$: la concentration de COT en milligramme de carbone par gramme d'échantillon,

m_s : la masse de solution d'échange,

m_{ech} : la masse d'échantillon sec initial,

$m_C \text{ solubilisé}$: la masse de carbone solubilisé dans la solution d'échange.

La fraction solubilisée de carbone de l'échantillon est finalement déterminée par rapport à la quantité de carbone initiale dans l'échantillon, obtenue par analyse élémentaire, selon la relation présentée dans l'équation (Eq. II-15).

$$\% C_{solubilisé} = \frac{m_C \text{ solubilisé}}{m_C \text{ échantillon}} \quad \text{Eq. II-15}$$

Avec :

$\% C_{solubilisé}$: le pourcentage de carbone de l'échantillon solubilisé,

$m_C \text{ échantillon}$: la masse de carbone initiale dans l'échantillon.

5. CONCLUSION

Dans ce chapitre, la stratégie adoptée pour répondre aux problématiques « spéciation » et « analytique » a été détaillée et les méthodes d'échange isotopique ainsi que les outils analytiques associés ont été présentés.

Afin d'évaluer l'implication de diverses structures moléculaires dans l'établissement du paramètre d'échangeabilité et *in fine* la spéciation du TOL dans les matrices environnementales, la méthode d'échange isotopique « voie douce » est employée sur l'ensemble des matrices d'étude. Enfin, une étude comparative est proposée entre le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) obtenu pour chaque matrice par rapport à différents paramètres établis en fonction des diverses natures proposées des formes TOL-E et TOL-NE. Ceux-ci sont alors déterminés à partir de l'exploitation de certains outils analytiques comme l'équipement de diffraction des rayons X ou bien encore des réactions de dosages à l'aide du titrimètre automatique. Les résultats associés à cette stratégie sont présentés dans le chapitre 3.

Pour statuer sur la fiabilité des méthodes actuelles de quantification du TOL-NE et ainsi améliorer la compréhension de la distribution de tritium dans l'environnement, une étude comparative entre les résultats obtenus par les deux méthodes d'échange isotopique est menée sur l'ensemble des matrices d'étude. Les outils d'analyse élémentaire CHNS et de détermination de carbone organique COT-mètre sont alors combinés afin d'étudier l'origine et l'impact des biais potentiels engendrés sur la mesure exacte du TOL-NE en fonction de la matrice. Pour cette stratégie, les résultats sont présentés dans le chapitre 4.

Chapitre 3

Echangeabilité de l'atome d'hydrogène et spéciation du tritium organiquement lié

Table des matières

1.INTRODUCTION	113
2.LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR LES MODELES MOLECULAIRES FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE	114
2.1.RESUME DE LA PUBLICATION N°1 : « CELLULOSE, PROTEINS, STARCH AND SIMPLE CARBOHYDRATES MOLECULES CONTROL THE HYDROGEN EXCHANGE CAPACITY IN BIO-INDICATORS AND FOODSTUFFS. »	114
2.2.PUBLICATION N°1 : « CELLULOSE, PROTEINS, STARCH AND SIMPLE CARBOHYDRATES MOLECULES CONTROL THE HYDROGEN EXCHANGE CAPACITY IN BIO-INDICATORS AND FOODSTUFFS. »	118
3.LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR L'INDICE DE CRISTALLINITE FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE	133
3.1.LE MODELE EXPERIMENTAL D'ECHANGEABILITE DES CELLULOSES NATIVES EN FONCTION DE L'INDICE DE CRISTALLINITE (CRI)	133
3.1.1.RESUME DE LA PUBLICATION N°2 : « NEW INSIGHTS INTO THE ACCESSIBILITY OF NATIVE CELLULOSE TO ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS THROUGH AN EFFICIENT ANALYTICAL PROCESS. »	133
3.1.2.PUBLICATION N°2 : « NEW INSIGHTS INTO THE ACCESSIBILITY OF NATIVE CELLULOSE TO ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS THROUGH AN EFFICIENT ANALYTICAL PROCESS. »	136
3.2.APPLICATIONS AUX MATRICES ENVIRONNEMENTALES : LE CAS DU <i>MYRIOPHYLLUM SPICATUM</i>	146

3.2.1. RESULTATS	148
3.2.2. DISCUSSION	149

4.LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR LA DEPROTONATION FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE **152**

4.1.RESUME DE LA PUBLICATION N°3 : « AN OVERLOOKED POOL OF HYDROGEN STORED IN HUMIC MATTER REVEALED BY ISOTOPIC EXCHANGE: IMPLICATION FOR RADIOACTIVE ³H CONTAMINATION. » **152**

4.2.PUBLICATION N°3 : « AN OVERLOOKED POOL OF HYDROGEN STORED IN HUMIC MATTER REVEALED BY ISOTOPIC EXCHANGE: IMPLICATION FOR RADIOACTIVE 3H CONTAMINATION. » **154**

5.CONCLUSION **164**

1. INTRODUCTION

Dans ce chapitre sont présentés les résultats relatifs aux questionnements soulevés par la problématique « spéciation ». L'organisation de ce chapitre s'articule en trois parties : une première partie relative à l'étude du paramètre d'échangeabilité basé sur les modèles moléculaires, une deuxième partie sur le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (CrI), et enfin une troisième partie relative à l'étude du paramètre d'échangeabilité basé sur la déprotonation. Pour chacune des parties annoncées, les résultats obtenus et leurs interprétations sont principalement proposés sous la forme de publications.

Dans la première partie du chapitre, la publication n°1 traite des résultats obtenus sur les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène dans l'ensemble des matrices environnementales étudiées (hormis les substances humiques et les celluloses natives qui seront traitées dans les parties suivantes du chapitre). Cette étude propose de comparer les résultats ainsi obtenus aux paramètres d'échangeabilité théoriques, basés sur les modèles moléculaires de chaque constituant, afin d'appréhender la présence de la forme tritium enfoui dans les matrices étudiées. Pour approfondir la compréhension du rôle des constituants majoritaires, leur capacité propre d'échange de l'atome d'hydrogène est par la suite mise en perspective par rapport à celle de leur matrice mère. Les différents impacts de leurs propriétés sur la spéciation ainsi que la distribution du TOL dans l'intégralité d'une matrice sont par la suite discutés.

Dans la deuxième partie du chapitre, la publication n°2 propose un modèle expérimental linéaire, basé sur des celluloses natives, qui permet de mettre en relation l'Indice de Cristallinité (CrI) d'une cellulose et son paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}). Afin de pouvoir appliquer ce modèle aux matrices environnementales et ainsi comprendre le rôle de la cellulose dans l'établissement de la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène d'une matrice, les limites d'application du modèle sont explorées. Dans cet objectif, la teneur minimale de cellulose requise dans une matrice par rapport à sa cristallinité est établie pour des conditions analytiques usuelles à l'étude de la cristallinité de la cellulose. L'impact de la cellulose et des protéines du *Myriophyllum Spicatum* sur sa capacité d'échange globale de l'atome d'hydrogène est par la suite examiné par rapport au modèle linéaire.

Dans la troisième et dernière partie de ce chapitre, la publication n°3 présente une étude comparative entre l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène obtenu par la méthode d'échange isotopique « voie douce », sur deux matrices riches en matière humique, par rapport à un taux de déprotonation de ces atomes déduit de méthodes classiques de détermination de l'acidité et des fonctions alcools des sols.

2. LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR LES MODELES MOLECULAIRES FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE

2.1. Résumé de la publication n°1 : « Cellulose, proteins, starch and simple carbohydrates molecules control the hydrogen exchange capacity in bio-indicators and foodstuffs. »

Afin de comprendre la spéciation du tritium organiquement lié (TOL) dans l'environnement et la matière organique, une étude de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène a été menée dans diverses matrices environnementales, constituées de biomolécules usuelles de la biomasse végétale. Ces matrices d'étude ont alors été choisies en lien avec les spécificités structurales de leurs biomolécules constitutives majoritaires dans le but d'explorer la relation entre complexité moléculaire et accessibilité de l'atome d'hydrogène. Afin d'évaluer de façon spécifique leur impact individuel sur la capacité d'échange globale de l'atome d'hydrogène dans une matrice environnementale, les constituants majoritaires de chaque matrice d'étude ont été extraits et soumis au même processus d'étude. Les matrices d'étude font alors références ici aux matrices « Grain de blé », « Myriophylle » et « Pomme », avec les constituants majoritaires extraits respectifs « Blé-Amidon », « Myriophylle-Paroi cellulosique » et « Pomme-Glucides simples ».

Ainsi, un paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) a été déterminé pour chaque biomolécule constitutive des matrices à partir de leur modèle moléculaire respectif (cf. Eq. I-8). Pour rappel, ce paramètre définit le taux d'atomes d'hydrogène théoriquement échangeables dans une molécule, comme décrit par la vision analytique (i.e. en fonction de la liaison chimique), par rapport à l'ensemble de ses atomes d'hydrogène. Un paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) a par la suite été attribué à chaque matrice d'étude à partir d'un calcul des paramètres ($\alpha_{modèle}$) de leurs divers constituants et par pondération de leur teneur dans la matrice (cf. Eq. I-9). La méthode d'échange isotopique « voie douce » a par la suite été employée sur l'ensemble des échantillons d'étude afin d'accéder à leur paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}). En employant une méthode d'échange isotopique non-intrusive, ce paramètre ainsi obtenu permet d'évaluer le taux d'atomes d'hydrogène échangeables en phase vapeur, avec des paramètres de température et d'humidité relative contrôlés, par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène dans un échantillon. Les résultats des échanges isotopiques réalisés par la méthode « voie douce » sur l'ensemble des matrices étudiées sont disponibles en Annexe IX.

Une étude comparative entre ces deux paramètres ($\alpha_{modèle}$) et (α_{iso}) a alors été réalisée sur l'ensemble de la gamme de matrices et constituants extraits.

Dans le cas du grain de blé et de son amidon, la concordance entre les deux paramètres obtenus a permis d'affirmer que la description proposée par l'analyste pour décrire l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène était suffisante pour représenter le comportement du TOL dans ce type de matrice. Cette propriété a alors été attribuée à la particularité de la conformation hélicoïdale de la structure de la molécule d'amidon, rendant accessible et donc labile l'ensemble des atomes d'hydrogène en positions théoriques échangeables.

Dans le cas du *Myriophyllum Spicatum* et de la pomme, un écart significatif entre ces deux paramètres a permis de mettre en lumière la présence de la forme tritium enfoui. Pour ces matrices, la description proposée par la vision analytique est insuffisante pour décrire le comportement du TOL dans ces matrices. La structure cristalline de la cellulose et le caractère complexe des protéines présentes dans la paroi cellulosique extraite ont alors été jugés responsables de la diminution de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène dans le *Myriophyllum Spicatum*, tandis que les arrangements structuraux complexes et ramifiés des associations de glucides simples ont été désignés pour la pomme.

La teneur en tritium enfoui retrouvée dans une matrice environnementale a alors été directement mise en corrélation avec les spécificités et le niveau de complexité de la structure moléculaire des constituants majoritaires.

Les résultats obtenus sur l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène ont également permis d'apporter des informations supplémentaires sur la relation entre ces matrices environnementales et leur constituant majoritaire. Ainsi, le rôle clé du constituant majoritaire dans le contrôle et l'établissement du paramètre d'échangeabilité d'une matrice environnementale a été démontré dans nos matrices d'étude. En considérant le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) du constituant majoritaire et les paramètres d'échangeabilité théoriques ($\alpha_{modèle}$) du reste des constituants, il a ainsi été possible d'obtenir un paramètre d'échangeabilité calculé ($\alpha_{iso_{calculated}}$) pour la matrice proche du paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) directement déterminé dans la matrice environnementale. Ceci permet de démontrer que la capacité d'échange globale des atomes d'hydrogène dans une matrice est alors bien représentée par l'ensemble de ses constituants, mais que le constituant majoritaire peut engendrer un impact significatif lorsqu'il présente des complexités moléculaires responsables de la diminution de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène.

Un autre impact lié à ces aspects structuraux a également pu être observé sur la distribution de la fraction non-échangeable du TOL mesurée dans les matrices environnementales. Dans certains cas, le TOL-NE retrouvé dans les constituants extraits a semblé afficher une tendance proportionnelle à la répartition en masse des composés concernés dans la matrice mais a également semblé subir une influence de leur paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}). Les différences de paramètres d'échangeabilité entre les différents constituants d'une même matrice semblent alors pouvoir engendrer une répartition potentiellement non équitable du TOL-NE dans la matrice. Ces observations peuvent ainsi donner accès à des informations complémentaires cruciales sur le temps de résidence du tritium dans la matière organique et sa distribution dans l'environnement.

2.2. Publication n°1 : « Cellulose, proteins, starch and simple carbohydrates molecules control the hydrogen exchange capacity in bio-indicators and foodstuffs. »

Cette publication est acceptée dans le journal Chemosphere (Elsevier).

Cellulose, proteins, starch and simple carbohydrates molecules control the hydrogen exchange capacity of bio-indicators and foodstuffs

A-L. Nivesse^{1,2}, N. Baglan³, G. Montavon¹, G. Granger¹, O. Péron^{1*}

¹SUBATECH, UMR 6457, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes Cedex 3, France

²CEA, DAM, DIF, F-91297 Arpajon, France

³CEA, DIF, DRF, JACOB, IRCM, SREIT, LRT, F-91297 Arpajon, France

*olivier.peron@subatech.in2p3.fr

Chemosphere (Elsevier) - <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128676>

Highlights

- The buried tritium form was detected in both a bio-indicator (water-milfoil) and a food chain sample (apple).
- The content of buried tritium was correlated with the 3D structure level of starch, cellulose, proteins and simple carbohydrates molecules associations.
- The key role of the main constituents (starch, cellulose and protein, simple carbohydrates) in influencing hydrogen exchange capacity was experimentally demonstrated.
- The impact of hydrogen exchangeability on the NE-OBT distribution on environmental matrix constituents was determined.

Keywords:

Organically bound tritium
Hydrogen exchangeability
Isotopic exchange
Buried tritium

Abstract

Over the past several years, it has become increasingly acknowledged that Organically Bound Tritium (OBT) is the most pertinent tritium form for understanding its behavior and distribution within the biosphere. The fate of tritium actually depends on the accessibility and exchangeability of hydrogen atoms for isotopic exchanges in natural organic matter, especially in widespread biomass biomolecules like carbohydrates or proteins. The present work is therefore aimed at providing a means for improving the knowledge of tritium speciation and distribution on environmental matrices by evaluating the impact of molecular structure of various carbohydrate molecules on OBT behavior. We are thus proposing to assess the exchange capacities of hydrogen from a gas-solid isotopic exchange methodology in wheat grains, water-milfoil and apple environmental matrices using starch, cellulose/proteins and simple carbohydrates as their respective main constituents. For wheat grains, a good agreement was obtained between experimental and theoretical values as a result of the predominantly simple molecular structure of starch. For both water-milfoil and apple, the disparities between experimental and theoretical values showed the occurrence of the buried form of tritium, correlated with the 3D molecular complexity of their main constituents. The key role played by these determinant constituents on hydrogen exchange capacity could thus be experimentally demonstrated on several environmental matrices. These distinct hydrogen exchange capacities were then proven to exert an influence on the NE-OBT distribution on environmental matrix constituents, in yielding critical information to better the understanding of tritium distribution and behavior in the environment.

1. Introduction

At the present time, tritium is one of the main radionuclides released into the environment at nuclear installations. According to current forecasts, these release rates are expected to rise due to the planned development of nuclear power plants and their fuel management methods, as well as to new tritium emitting facilities, such as the International Thermonuclear Experimental Reactor (ITER) and the Evolutionary Power Reactor (EPR). Understanding the behavior of tritium in the environment is therefore an ongoing societal issue, in recognizing this behavior to be directly related to the chemical forms of tritium, i.e. tritium speciation (ASN, 2010; IRSN, 2017). In environmental matrices, tritium is found in the form of Tissue-Free Water Tritium (TFWT) and Organically Bound Tritium (OBT) after the integration of tritiated water (HTO) during photosynthesis and metabolic processes (Diabaté and Strack, 1993; Pointurier *et al.*, 2003). Over the last decade, a focus on monitoring OBT has become a major concern in many countries for both public and regulatory assurance (Kim *et al.*, 2013; Péron *et al.*, 2016; Baglan *et al.*, 2018). OBT is typically differentiated into two pools: the exchangeable pool (E-OBT), which equilibrates with the surrounding atmosphere; and the non-exchangeable pool (NE-OBT), which is experimentally inert and remains in organic matter until its degradation (Sepall and Mason, 1961; Kim *et al.*, 2013). The latter is directly representative of the amount of tritium released into the environment during growth of the biological organism; the interest of its study lies in the ability to conduct retrospective studies of tritium release into the environment.

From an analytical standpoint, it is widely assumed that the E-OBT fraction corresponds to the tritium bound to heteroatoms, while the NE-OBT fraction corresponds to the tritium covalently bound to carbon (Mann, 1971; Kim *et al.*, 2013). Based on the molecular model, it is then possible to assign to each organic molecule a theoretical exchangeable parameter (α_{model}) from the hydrogen bound to the heteroatom pool versus total hydrogen atoms.

However, this description has been challenged since previous studies highlighted major limitations of E-OBT accessibility in environmental matrices (Sepall and Mason, 1961; Baumgartner and Donhaerl, 2004; Péron *et al.*, 2018) when comparing the theoretical (α_{model}) parameter to an experimentally determined (α_{iso}) parameter (Feng *et al.*, 1993; Péron *et al.*, 2018).

Molecular conformation is thus supposedly responsible for the loss of exchange capacities from a part of the theoretically exchangeable hydrogen positions, hence the designation buried tritium (BT) (Baumgartner and Donhaerl, 2004). The IAEA (International Atomic Energy Agency) has therefore suggested in its EMRAS program (EMRAS, 2010) that the NE-OBT fraction must be defined as both covalently carbon bound tritium atoms and buried tritium atoms (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013). This issue is still undergoing heated debate and requires further investigation.

The present work is therefore aimed at providing insight into tritium speciation and distribution on environmental matrices by means of evaluating the impact of molecular composition and arrangement on OBT behavior. To this end, it is being proposed herein to: (i) compare (α_{model}) and (α_{iso}) parameters and, through reliance on the knowledge of molecular structures, grasp the origin of the buried tritium form, (ii) define the exchangeable capacity of environmental matrices compared to their main constituent, and (iii) assess the NE-OBT distribution with respect to both structural and exchangeable aspects.

Starch, cellulose, proteins and simple carbohydrates are among the most widespread biomolecules of the biomass on earth and may be found under diverse molecular structures in environmental matrices (Sun and Cheng, 2002; Hopkins, 2003; Sakintuna *et al.*, 2003). Two food chain matrices, i.e. wheat grains and apples, plus a bio-indicator, water-milfoil, presenting initial anthropogenic OBT activities, have been selected while their main constituents were effectively extracted in order to represent the corresponding biomolecule types and undergo exchangeability assessments.

To access the exchangeable (α_{iso}) parameter, an original methodology based on isotopic exchange under a soft path regime has been previously developed (Péron *et al.*, 2018) and subsequently validated for exchange capacity investigations in carbohydrate molecules. Knowledge of this parameter thus yields insight into the true nature of the exchangeable hydrogen pool within a studied environmental matrix and serves to improve our understanding of OBT speciation (Nivesse *et al.*, 2020).

2. Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

Tritium solutions were prepared at the Subatech Laboratory using a certified and calibrated source and a low-level tritium water source “Eau des Abatilles” (whose HTO activity lies significantly below 0.2 Bq.L⁻¹ (Fourré *et al.*, 2014)).

All reagents were purchased from Fisher Scientific International and met at least ACS reagent grade (i.e. match or exceed the specifications established by the American Chemical Society). Ultrapure water (18.2 MΩ·cm resistivity at 25° and < 5 µg.L⁻¹ TOC) obtained from a Milli-Q Advantage A10® system (Merck Millipore, France) was used. The tritium contaminations from reagents were considered to be negligible since the initial tritium activities of the studied matrices were significantly higher, thus suggesting only tritium depletion could be observed.

2.2 Sample preparation

The tritium contents of environmental matrices and extracted constituents were adjusted to the same reference date of July 1, 2020 by only considering the tritium radioactive decay impact.

The initial contents in organically bound tritium (OBT) within environmental matrices and extracted constituents are recorded in Table 1.

2.1.1. Wheat grains and starch

Wheat grains (Matrix A-1) from the Organically Bound Tritium (OBT) working group were previously studied as part of the work presented in Péron *et al.* (2018).

Starch (Matrix A-2) is the main component of wheat grains (Matrix A-1) and was extracted according to a procedure adapted from Verwimp *et al.* (2004), Xie *et al.* (2008) and Liu and Ng (2015). Briefly summarized, wheat flour was obtained from ground and sieved wheat grains passing through a 74-µm size sieve. Wheat flour (4 g) was suspended in 28 mL of 0.25% (v/v) NaOH, followed by 1 h of stirring prior to 10 min of centrifugation at 3900 x g. The sediment was then washed three times with deionized water by stirring for 30, 15 and 10 min respectively until final neutralization with 1 M HCl prior to 10 min of centrifugation at 3900 x g for each step. The brown fraction was removed and the white fraction was first suspended in 15 mL of deionized water then passed through a 75-µm nylon screen; approx. 20 mL of deionized water was used to wash the overs. The white extracted starch filtrate was freeze-dried for 1 week and stored under vacuum prior to further use.

2.1.2. Water-milfoil and the cellulosic wall

Water-milfoil (Matrix B-1) samples were taken from the Loire River (47°45'18.7"N, 2°28'25.3"E) 2 km downstream of the Dampierre Nuclear Power Plant (NPP) (France). The fresh samples were immediately transferred into sealed plastic bags and stored frozen. After 48 h of freezing, the samples were dehydrated by oven drying at 90°C for 2 weeks. Freeze-drying was performed for 48 h to ensure complete removal of the free water fraction, and lastly the samples were stored under vacuum.

	(A-1)	(A-2)	(B-1)	(B-2)	(C-1)	(C-2)
OBT (Bq.L⁻¹)	52.5 (±2.8)	32.7 (±2.5)	45.4 (±2.4)	25.6 (±1.9)	63.8 (±3.9)	14.2 (±1.9)
OBT (Bq.kg⁻¹)	31.3 (±2.1)	18.4 (±2.0)	18.6 (±3.8)	11.8 (±1.6)	36.2 (±2.8)	8.9 (±1.2)

Table 1: Initial contents of organically bound tritium (OBT) in wheat grains (A-1), starch (A-2), water-milfoil (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1) and simple carbohydrates (C-2) matrices.

The cellulosic wall (Matrix B-2) of water-milfoil (Matrix B-1) was recovered by extraction and elimination of the cytoplasmic fraction following a procedure adapted from Sun *et al.* (2004) and Mochochoko *et al.* (2013). Briefly summarized, freeze-dried water-milfoil were ground to pass a 1-mm size sieve, and the resultant powder (100 g) was dewaxed with toluene-ethanol (2:1 v/v) in a Soxhlet apparatus at 80°C for 6 h, followed by filtration at 63 µm and washing with ethanol (96% v/v) for 24 h. Extra washing steps with water and ethanol (96% v/v) were carried out to ensure a high degree of purification. The gradual loss of green coloration was due to chloroplast leak and representative of the effective removal of the cytoplasmic fraction.

The purified powder was then allowed to dry in an oven at 90°C for 48 h, freeze-dried for 48 h and stored under vacuum.

2.1.3. Apples and simple carbohydrates

Apples (Matrix C-1) were sampled at a distance 2 km from the Cernavodă Nuclear Power Plant (NPP) (Romania, 44°20'10.0"N 28°02'13.9"E). Fresh samples were roughly cut and stored frozen for 48 h, then freeze-dried for 2 weeks, ground to pass a 1-mm size sieve and stored under vacuum.

Simple carbohydrates (Matrix C-2) were extracted from the apples (Matrix C-1) according to the procedure described in Besle and Pitiot (1976). Briefly summarized, apples were cut into thin strips, and the resultant sample (20g) was extracted with 1 L ethanol (85% v/v) under reflux and stirring at 80°C for 1 h. After successive filtrations at 63, 20 and 0.45 µm with manufactured filters, the extracted solution was reduced using Rotavapor concentration and then freeze-dried for 1 week, homogenized under dried atmosphere (RH < 10%) and stored under vacuum.

2.3 Sample characterization

The samples were characterized on each studied matrix, and the composition in % by weight was recorded. A broad range of common components was investigated, with certain components being examined more closely by virtue of representing the specific constituents of selected matrices. The common components tested were: starch, cellulose, sucrose, proteins, and fat contents.

For starch-type matrices, i.e. A-1 and A-2, the main essential amino acids of the former were described in Péron *et al.* (2018), while the maltose and glucose contents were determined in the latter by applying the AACC 76-13.01 Standard method with the Total StarchKit Assay (Megazyme International Ireland Ltd. Co., Wicklow, Ireland). For cellulose-type matrices, i.e. B-1 and B-2, the proportions in parietal constituents of cellulose, hemicellulose and lignin were analyzed using NDF (neutral detergent fiber), ADF (acid detergent fiber) and ADL (acid detergent lignin) analyses, as stated in Van Soest (1963). For simple carbohydrate-type matrices, i.e. C-1 and C-2, the fructose and glucose contents were also recorded.

For each previously analyzed component, a theoretical exchangeable parameter (α_{model}) was calculated from their respective literature-based and well-known molecular formula according to the analytical definition of E-OBT, i.e. hydrogen bound heteroatoms are exchangeable hydrogen.

On this basis, a theoretical exchangeable parameter (α_{model}) could then be calculated for each matrix according to its composition in % by weight in each component and its assigned unitary (α_{model}). The contribution of the mineral fraction was considered to be negligible due to the low hydrogen content found in the mineral fractions of living organic matrices.

2.4 Isotopic exchange procedure

The gas-solid isotopic exchange process, as described in Péron *et al.* (2018), is based on the isotopic steady state between a bath of KCl-saturated solution ($(\frac{T}{H})_{l, bath}$), a vapor phase confined in a glove box ($(\frac{T}{H})_{g, vapor}$), the water condensed at the sample surface ($(\frac{T}{H})_{l, cond}$) and the exchangeable organically bound tritium of the sample ($(\frac{T}{H})_{s, E-OBT}$), as set forth in Eq. (1):

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath} = \left(\frac{T}{H}\right)_{g, vapor} = \left(\frac{T}{H}\right)_{l, cond} = \left(\frac{T}{H}\right)_{s, E-OBT} \quad (1)$$

As part of this description, a vapor phase has been produced from a bath containing saturated KCl solutions with controlled tritium activities, for the purpose of equilibration with the atmosphere contained in a glove box (RH = 85.11 ± 0.89% at T = 20°C, Plas-Labs 890-THC) (see Péron *et al.* (2018) for further details).

Isotopic exchanges were separately conducted on each studied matrix following both one tritium-depletion experiment with a low-level tritium bath (HTO < 0.2 Bq.L⁻¹) and three tritium-enrichment experiments with tritium-rich baths (HTO = 120, 300 and 500 Bq.L⁻¹). Three aliquots were extracted from each bath during the isotopic exchange step to quantify the exact HTO activity. Samples were recovered from the confined glove box at days 2, 3 and 4 to ensure that steady state had been reached.

After liquid nitrogen immersion and freeze-drying, the samples were heat-treated in a tubular furnace (Eraly, France), where the organic matter was transformed into carbon dioxide and combustion water (Cossonnet *et al.*, 2009; CETAMA, 2013; Péron *et al.*, 2016).

Bath aliquots and combustion water from the samples were distilled and neutralized for pH correction, if needed, while tritium activities were measured by means of liquid scintillation counting (PerkinElmer Tri-carb 3170 TR/SL) using an Ultima Gold LLT cocktail. The detection limit was estimated at 3 Bq.L⁻¹ for a counting time of 180 minutes and a blank value of 2 counts per minute. The relative uncertainty was calculated based on a calibration step, according to the quench curve and systematic uncertainties; this relative uncertainty typically reached 10%.

At each steady state, a mean value of the combustion water from each matrix sample $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT}$ was obtained by averaging the sample values forming the plateau. A mean value of each saline solution $\left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath}$ was also derived by averaging the three bath aliquot values once steady state had been reached.

3. Results

3.1 Molecular model-based theoretical exchangeable parameter (α_{model})

For each studied matrix, a theoretical exchangeable parameter (α_{model}) was calculated from the molecular model of its main components and respective experimentally determined composition in % by weight. The main essential components analyzed along with their associated (α_{model}) and distributions in % by weight in the A-1, A-2, B-1, B-2, C-1 and C-2 matrices are listed in Table 2.

The distribution in % by weight of starch (A-2) in wheat grains (A-1) was directly measured at 75.3 ± 3.7% of organic matter. Towards the cellulosic wall (B-2) in water-milfoil, this distribution was estimated at 56 ± 27% of organic matter by assuming that the entire cellulose, hemicellulose and lignin parts were recovered (40.6 ± 7.3% in water-milfoil) and moreover that the protein fraction found in the cellulosic wall was correlated with the structural proteins part without the cytoplasmic proteins part (calculated at 15.2 ± 6.8% and 22.1 ± 9.6% in water-milfoil, respectively).

	α_{model}	(A-1)	(A-2)	(B-1)	(B-2)	(C-1)	(C-2)
Starch	30%	75.3 (±3.7)	85.1 (±2.1)	18.1 (±1.9)	7.6 (±0.9)	0.8 (±0.1)	-
Maltose	36.4%	-	14.9 (±2.1)	-	-	-	-
Glucose	41.7%	-	0.8 (±0.2)	-	-	17.3 (±0.9)	19.0 (±2.3)
Fructose	41.7%	-	-	-	-	51.0 (±1.5)	59 (±7.1)
Sucrose	36.4%	3.6 (±0.4)	-	0.8 (±0.8)	0.1 (±0.6)	19.9 (±0.6)	22.5 (±2.7)
Cellulose	30%	4.2 (±0.9)	-	16.5 (±1.5)	21.7 (±2.3)	3.7 (±1.6)	-
Lignin	17%	-	-	13.7 (±1.8)	26.2 (±3.0)	2.6 (±0.4)	-
Hemicellulose	27.1%	-	-	10.3 (±2.5)	19 (±7)	1.6 (±4.0)	-
Protein⁽ⁱ⁾	37%	13.9 (±1.1)	-	-	-	-	-
Protein⁽ⁱⁱ⁾	42%	-	-	37.3 (±2.7)	25.1 (±2.7)	-	-
Fat	< 0.1%	3.0 (±0.9)	-	3.2 (±1.3)	0.2 (±0.9)	0.9 (±0.9)	-

Table 2: The main essential components analyzed along with their associated theoretical (α_{model}), and measured/analyzed distribution in % by weight in wheat grains (A-1), starch (A-2), water-milfoil (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1) and simple carbohydrates (C-2) matrices. ⁽ⁱ⁾ and ⁽ⁱⁱ⁾ are representative of wheat grains and water-milfoil protein types, respectively.

For simple carbohydrates (C-2), their distribution in % by weight of organic matter was calculated at $88.2 \pm 5.9\%$ in apple (C-2) due to the addition of its respective content in glucose, sucrose and fructose. The resultant calculated (α_{model}) parameters on each studied matrix are given in Table 3.

Starch and cellulose are two of the most abundant bio-macromolecules of terrestrial ecosystems. They are carbohydrate molecules of glucose monomer ($(C_6H_{10}O_5)_n$) with 3/10 hydrogen atoms bound to hydroxyl groups, hence an assigned (α_{model}) equal to 30% was adopted for these polysaccharides. Glucose and fructose are simple carbohydrate monomer molecules ($C_6H_{12}O_6$) with 5/12 hydrogen atoms bound to hydroxyl groups, explaining the assigned (α_{model}) value of 41.7%. Maltose, composed of two glucose molecules, and sucrose, comprising one molecule of glucose and one of fructose, are simple carbohydrates with an assigned (α_{model}) value of 36.4%.

Lignin is a macromolecule composed of variable polyphenolic polymer biomolecules, whose structure and organization depend on the environmental physicochemical conditions of formation. Lignin is mainly found with an association of proportional coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols (Kratzl *et al.*, 1976) with (α_{model}) equal to 20, 18.2 and 15.4%, respectively. Considering that the loss in hydrogen atoms bound to carbon and those bound to hydrogen compensates for each unit bond, as identified in several theoretical molecular structures and conformations of this biomolecule (Hopkins, 2003), the (α_{model}) value assigned to lignin was estimated at 17%.

Hemicellulose is a cellulose-like macromolecule predominantly represented in the dual form of xyloglucan ($(\alpha_{model}) = 29.2\%$) and arabinoxylan ($(\alpha_{model}) = 25\%$) (Hopkins, 2003) in primary and secondary plant cell walls. In order to maintain the representativeness of these two biomolecules, the (α_{model}) value assigned to hemicellulose was estimated at 27.1% for our study.

Protein content was determined by means of total nitrogenous content quantification. Proteins are made up of amino acids whose (α_{model}) values lie within a range of 23 to 58%. The essential amino acids were therefore analyzed in each matrix separately.

For matrix A-1, the composition in % by weight is available in Péron *et al.* (2018) and the (α_{model}) for proteins was calculated at 37%. For matrices B-1 and B-2, the amino acid composition was determined by data available in the literature (Muztar *et al.*, 1978) and an assigned (α_{model}) for proteins of 42% was estimated. For the A-2, C-1 and C-2 matrices, the protein content was considered to be negligible.

Fat molecules primarily consist of carbon and hydrogen atoms with a highly negligible amount of hydrogen atoms bound to the heteroatom representation (Péron *et al.*, 2018).

The (α_{model}) assigned to fat molecules is thus less than 0.1% but must still be considered when performing calculations.

3.2 Isotopic exchange-based exchangeable parameter (α_{iso})

Isotopic exchanges were conducted on each studied matrix with various T/H ratios in order to evaluate the isotopic exchangeable parameter (α_{iso}), as described in Péron *et al.* (2018).

For each steady state achieved, the mean value of the combustion water from each matrix sample $(\frac{T}{H})_{s, OBT}$ was plotted versus the mean value of each saline solution $(\frac{T}{H})_{l, bath}$, as presented for each matrix in Figure 1.

The slope of the linear regression obtained was therefore considered as (α_{iso}) and calculated according to Eq. (2):

$$\alpha_{iso} = \frac{\Delta(\frac{T}{H})_{s, OBT}}{\Delta(\frac{T}{H})_{l, bath}} \quad (2)$$

From this set-up, a wide range of isotopic exchangeable parameters (α_{iso}) was obtained on the studied environmental matrices, i.e. from $16.1 \pm 0.6\%$ to $39.6 \pm 1.3\%$, and compared to the (α_{model}) listed in Table 3. The standard uncertainties on (α_{iso}) parameters were calculated using the least squares method with a coverage factor k equal to 2.

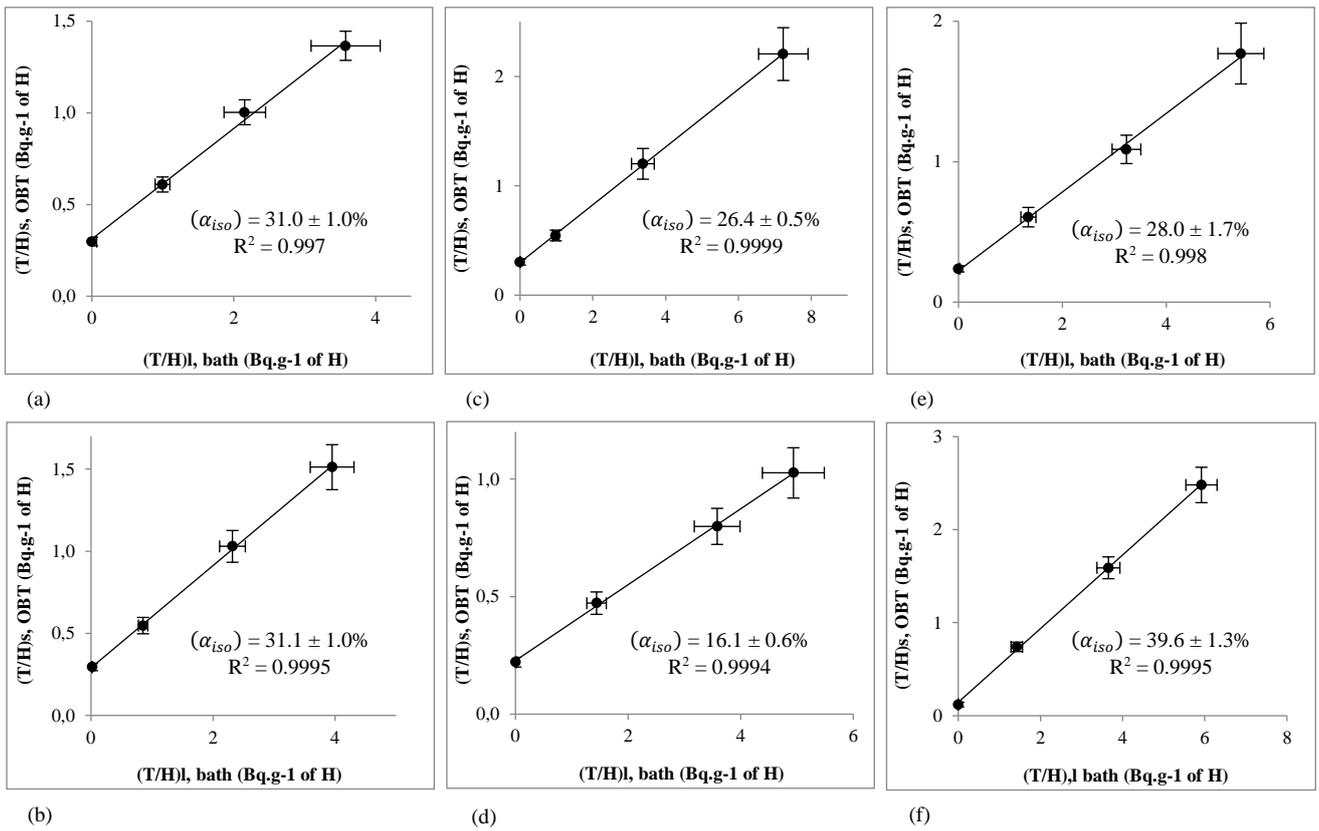


Fig. 1: (T/H) OBT at the steady state after freeze-drying vs. measured set (T/H) of saline solutions with the associated exchangeable hydrogen pool α_{iso} parameter for: (a) wheat grains (A-1) (results from Péron *et al.* (2018)), (b) starch (A-2), (c) water-milfoil (B-1), (d) cellulosic wall (B-2), (e) apples (C-1), and (f) simple carbohydrates (C-2)

3.3 Determination of the non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT)

Following the isotopic depletion exchange experiment, which was conducted separately on each studied matrix with a low-level tritium bath ($HTO < 0.2 \text{ Bq.L}^{-1}$), the samples were devoid of exchangeable organically bound tritium (E-OBT) atoms. The remaining tritium fraction at steady state thus relates to the non-exchangeable organically bound fraction (NE-OBT). After an adequate post-treatment, as previously described, the activities measured in the combustion waters of the three solid sample replicates were averaged to obtain a mean NE-OBT value in each analyzed matrix.

Furthermore, supplementary information provided by the gas-solid isotopic exchange process served to calculate $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, NE-OBT}$ by using Eq. (3) (Péron *et al.*, 2018) obtained below:

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{s, NE-OBT} = \frac{\left[\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT} - \alpha_{iso} \times \left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath}\right]}{(1 - \alpha_{iso})} \quad (3)$$

The results produced, expressed in Bq.L^{-1} of combustion water (NE-OBT (Bq.L^{-1})), were converted into Bq.kg^{-1} of dry matter (NE-OBT (Bq.kg^{-1})) using the content in % by weight of hydrogen in each matrix ($\%H_{ech}$) as well as that in water ($\%H_{water}$) by applying Eq. (4) below:

$$NE - OBT (\text{Bq.kg}^{-1}) = NE - OBT (\text{Bq.L}^{-1}) \times \frac{\%H_{sample}}{\%H_{water}} \quad (4)$$

The measured and calculated values of NE-OBT for each studied matrix are presented in Table 4. The uncertainties associated with the results obtained were determined by calculating the average uncertainty and the propagation of uncertainties squared using a coverage factor k equal to 2. For each matrix, these two values were similar and displayed consistent assigned values of relative uncertainties. Accordingly, only the measured values will be mentioned in the Discussion section.

	(A-1)	(A-2)	(B-1)	(B-2)	(C-1)	(C-2)
α_{model}	30.0%	31.0%	31.5%	29.0%	38.7%	40.4%
α_{iso}	31.0 ± 1.0%	31.1 ± 1.0%	26.4 ± 0.5%	16.1 ± 0.6%	28.0 ± 1.7%	39.6 ± 1.3%
$\alpha_{iso\ calculated}$	31.1 ± 0.8%	-	24 ± 15%	-	38 ± 10%	-
Deviation	0.4 ± 0.1%	-	8.2 ± 5.1%	-	26 ± 7%	-

Table 3: Results of the molecular model-based theoretical exchangeable parameters (α_{model}), isotopic exchange based exchangeable parameter (α_{iso}) on wheat grains (A-1), starch (A-2), water-milfoil (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1) and simple carbohydrates (C-2) matrices, along with associated ($\alpha_{iso\ calculated}$) parameters from extracted matrix results and the ($\alpha_{iso\ calculated}$) deviation compared to actual (α_{iso}) parameters

4. Discussion

4.1 The impact of molecular structure on hydrogen exchangeability

Among all the matrices studied, only wheat grains (Matrix A-1) and their extracted starch (Matrix A-2) presented both isotopic exchangeable parameter results (α_{iso}) = 31.0 ± 1.0% and (α_{iso}) = 31.1 ± 1.0%, respectively) similar to their calculated theoretical exchangeable parameters (α_{model}) = 30.0% and (α_{model}) = 31.6%, respectively).

Wheat grains are mainly composed of starch, a macromolecule comprising 25% amylose ($\alpha(1\rightarrow4)$ bound glucose molecules) and 75% amylopectin ($\alpha(1\rightarrow4)$ bound glucose molecules branched with $\alpha(1\rightarrow6)$ bound glucose molecules) (Sakintuna *et al.*, 2003).

These glucose polymers exhibit well-known linear and helical molecular structures with a predominantly weak crystalline area and only a few intermolecular hydrogen bonds (Tester *et al.*, 2004).

It can then be assumed that the analytical point of view (i.e. based on chemical bond type) is well suited and adequate to describe OBT speciation and behavior for this specific type of environmental matrix molecular structure.

In contrast, results obtained on the other matrices studied (B-1 and C-1) showed disparities between the calculated exchangeable parameter (α_{model}) and the isotopic exchangeable parameter (α_{iso}) obtained from the vapor phase (T/H) isotopic exchange experiment. According to the state-of-the-art, the first hypothesis implies that this difference is correlated with the presence of buried tritium due to the explanation of the exchangeability phenomenon inertia derived from the local 3D structure. For this reason, such compounds are particularly prized.

Water-milfoil (Matrix B-1) yielded an isotopic exchangeable parameter (α_{iso}) = 26.4 ± 0.5% below the calculated theoretical exchangeable parameter (α_{model}) = 31.5%). This matrix is mainly composed of starch, proteins and cellulosic compounds (cellulose, hemicellulose and lignin), but only the last two are capable of presenting complex 3D molecular structures.

	NE-OBT ^(a) (Bq.L ⁻¹)	NE-OBT ^(b) (Bq.L ⁻¹)	NE-OBT ^(b) (Bq.kg ⁻¹)	NE-OBT ^(b) distribution (%)	Distribution (% by weight)
(A-1)	33.1 (±3.6) ⁽ⁱ⁾	33.1 (±2.6) ⁽ⁱ⁾	19.7 (±1.6)	-	
(A-2)	32.2 (±1.5)	32.7 (±2.5)	18.6 (±1.4)	71.0 (±8.7)	75.3 (±3.7)
(B-1)	33.2 (±1.2)	33.7 (±3.1)	14.4 (±1.4)	-	
(B-2)	25.3 (±1.0)	24.6 (±2.3)	11.4 (±1.1)	44 (±22)	56 (±27)
(C-1)	24.9 (±3.3)	26.4 (±2.4)	15.8 (±1.5)	-	
(C-2)	16.0 (±2.6)	13.3 (±2.8)	8.4 (±1.8)	47 (±11)	88.2 (±5.9)

Table 4: Results obtained from (a) calculated and (b) NE-OBT concentration activities on the reference date of July 1, 2020 in wheat grains (A-1), starch (A-2), water-milfoil (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1) and simple carbohydrates (C-2) matrices, plus the calculated resulting distribution of NE-OBT vs. the distribution in % by weight of the constituents. (i)Results adapted from Péron *et al.* (2018).

Let's start out discussion with cellulose since it contains a long linear unbranched chain of D-glucose units linked through $\beta(1\rightarrow4)$ -glycosidic bonds with monomer arrangements oriented at 180° , thus promoting the formation of both intra and intermolecular hydrogen bonds and allowing for the distinction of amorphous and crystalline regions (Zugenmaier, 2001; Klemm *et al.*, 2005; Wuestenberg, 2014).

This specific structural stabilization corresponds to a three-dimensional network (Nishiyama *et al.*, 2003, 2002; Jarvis, 2003), whose involvement in decreasing hydrogen exchangeability has already been discussed in Péron *et al.* (2018). In this 2018 investigative work, isotopic exchangeable parameters (α_{iso}) were observed at $13.0 \pm 1.0\%$ and $21.0 \pm 1.0\%$ in commercial celluloses with various crystalline ratios (with respect to (α_{model}) = 30%).

The hydrogen bond phenomenon present in the crystalline regions of celluloses therefore justifies that a portion of hydrogen atoms in the theoretical exchangeable position could behave as if they were placed in non-exchangeable positions.

Such a phenomenon can also be expected with proteins possessing a three-dimensional structure. Proteins are in fact polypeptides of amino acids linked by peptide bonds occurring between a carboxyl group and an amine function (Richardson, 1981; Makhatadze and Privalov, 1995; Kim *et al.*, 2008). Each peptide bond formation thus leads to the elimination of two theoretically exchangeable hydrogen atoms from the initial molecule of two amino acid units. The three-dimensional protein structures are then defined by a pattern of hydrogen bonds between these primary chain peptide groups, with a regular geometry of mostly α -helix and β -sheet saturating all the hydrogen bond donors and acceptors in the peptide backbone (Richards, 1977; Branden and Tooze, 2012; Shulz and Schirmer, 2013). These aspects of the protein structure are then more likely to induce a drastic impact on the exchangeable parameter of the entire protein chain, depending on the sequence length and nature of the amino acid units involved.

As such, the cellulosic wall (Matrix B-2) containing all the resultant cellulosic compounds along with a portion of the proteins (the structural proteins part) were recovered from the water-milfoil.

After the compositional analyses and isotopic exchange process, a considerable gap was observed between this cellulosic wall theoretical exchangeable parameter ($(\alpha_{model}) = 29.0\%$) and its corresponding isotopic exchangeable parameter ($(\alpha_{iso}) = 16.1 \pm 0.6\%$). These elements therefore enable corroborating the hypothesis of a massive impact of the cellulose and protein compounds found in environmental matrix structures on hydrogen exchangeability, i.e. the presence of crystalline parts and then three-dimensional local structures yields buried tritium.

The apples (Matrix C-1) also presented an isotopic exchangeable parameter ($(\alpha_{iso}) = 28.0 \pm 1.7\%$) significantly below the corresponding calculated theoretical exchangeable parameter ($(\alpha_{model}) = 38.7\%$). This matrix is basically composed of simple carbohydrates displaying a very high theoretical exchangeability rate, with an assigned (α_{model}) value of up to 41.7% (see Table 2). However, simple carbohydrates are known to partially adopt a specific conformation in complex environmental matrices and form compact aggregates with crystal or ramified arrangements (Beevers *et al.*, 1952; Kanters *et al.*, 1977).

As previously noted for water-milfoil (Matrix B-1), these crystalline regions, which are typically characterized by a hydrogen bond, may supposedly be responsible for the observed decrease of hydrogen exchangeability in apples.

Ramified arrangements of sugars in environmental matrices are also assumed to contain a hydrogen bond and favor a structure hindering phenomenon that could explain the loss in hydrogen exchangeability as well.

To confirm this hypothesis, simple carbohydrates (Matrix C-2) were extracted from apples and underwent partial destruction of their initial complex 3D structure due to solubilization during the extraction process. The polar nature of simple carbohydrate molecules does indeed provide them with both a property of very high solubility in water; moreover, access to a substantial amount of water during the extraction process was assumed to allow for their entire solubilization and dissociation from other simple carbohydrate associations (Lee *et al.*, 2011).

It is important to note that, as opposed to other previously extracted component matrices (i.e. A-2 and B-2 from A-1 and B-1) with a preserved initial structure, the simple carbohydrate matrix (C-2) extraction process from Matrix C-1 was intended to trigger destruction of the initial sugar structure arrangements due to solubilization. After compositional analyses and the isotopic exchange process, the extracted matrix (C-2) presented theoretical and experimental values closely bunched together as compared to the raw (C-1) matrix, i.e. (α_{model}) = 40.4%) versus (α_{iso}) = $39.6 \pm 1.3\%$). These results have shown that the molecular conformation destruction of sugars leads to the opening of their initial ramified structure, thus allowing the entire pool of theoretically exchangeable hydrogen atoms to be accessible for isotopic exchange with the surrounding atmosphere. As such, it can be assumed that the initial complex 3D structure of simple carbohydrates (Matrix C-2) in apples (Matrix C-1) is responsible for the hindering phenomenon and hence for the inaccessibility of a portion of the theoretically exchangeable hydrogen atoms in sugar-like environmental matrices.

Whenever environmental matrices are composed of various compounds with an array of complex 3D molecular conformations, such as a crystalline structure or ramified arrangement, it then becomes possible to ensure that the analytical point of view (i.e. based on chemical bond type) is insufficient to describe OBT speciation and behavior.

In contrast, the molecules displaying a simple molecular conformation and arrangement like starch do not appear to cause buried tritium forms in wheat grains, which allows confirming that the analytical point of view is indeed sufficient to describe the NE-OBT and E-OBT forms on starch-like environmental matrices. The inferiority or equality observed between the isotopic exchangeable parameter (α_{iso}) and the theoretical parameter (α_{model}) have therefore highlighted the relatively substantial presence or total absence of the buried tritium (BT) form depending on the molecular structure specificities and complexity of the studied environmental matrices and their main component.

4.2 Exchangeable capacity of environmental matrices and impact of NE-OBT distribution

The isotopic exchange results on extracted matrices A-2, B-2 and C-2 revealed that the structure of their constituents has exerted an influence on the global behavior of hydrogen in environmental matrices A-1, B-1 and C-1. Considering the distribution of starch (A-2) in % by weight in wheat grains (A-1) (i.e. $75.3 \pm 3.7\%$) and the distribution of the cellulosic wall (B-2) in % by weight in water-milfoil (B-1) (i.e. $56 \pm 27\%$), as provided in Table 4, it then appears that the isotopic exchangeable parameters (α_{iso}) of the extracted matrices directly predetermine that of the environmental matrices being studied (Table 3). The result obtained on the B-2 matrix (α_{iso}) = $16.1 \pm 0.6\%$ and the (α_{model}) of the other constituents associated with their weight distribution in B-1 would actually lead to results calculated on the exchangeability parameter ($\alpha_{iso_{calculated}}$) for the B-1 matrix very close to the results obtained by isotopic exchange (approx. $24.2 \pm 14.9\%$ vs. an actual of $26.4 \pm 0.5\%$). From this finding, a slight relative difference ($\alpha_{iso_{calculated}}$ deviation) of $8 \pm 5\%$ was recorded from this calculated exchangeability parameter ($\alpha_{iso_{calculated}}$) compared to the experimental (α_{iso}) parameter on the B-1 matrix.

In the case of matrices A-1 and A-2, both (α_{iso}) results were also basically equal, which exhibits the exchangeability rate control from the extracted main components. The relative difference of (α_{iso}) vs. a calculated exchangeability parameter ($\alpha_{iso_{calculated}}$) (approx. $31.1 \pm 0.8\%$) was then determined to equal $0.4 \pm 0.1\%$.

Regarding the apple (C-1) and simple carbohydrate (C-2) matrices, the significant difference ($\alpha_{iso_{calculated}}$ deviation) of $26 \pm 7\%$ between the two parameters was directly explained by the inherent partial degradation and modification of the initial structure of simple carbohydrates during the extraction process. The extracted simple carbohydrate (C-2) molecular structure was indeed no longer representative of the initial structure inside the apple (C-1) matrix, thus preventing any establishment of a direct link between the two matrices and their respective exchangeability parameters.

From the results with starch (A-2) and cellulosic wall (B-2) as the major and determinant constituents for hydrogen exchangeability in wheat grains (A-1) and water-milfoil (B-1) respectively, an exchangeable capacity model of hydrogen in environmental matrices can then be expressed by the following formula:

$$(\alpha_{iso_{calculated}_x}) = \sum r_{x_{i-det}} \times (\alpha_{iso})_{x_{i-det}} + r_{x_i} \times (\alpha_{model})_{x_i} \quad (5)$$

where:

$(\alpha_{iso_{calculated}})$ = the calculated isotopic exchangeable parameter of environmental matrix "X",

$r_{x_{i-det}}$ = the distribution in % by weight of the determinant constituent " x_{i-det} " of the matrix,

$(\alpha_{iso})_{x_{i-det}}$ = its isotopic exchangeable parameter,

r_{x_i} = the distribution in % by weight of every other "x" constituent of matrix "X",

$(\alpha_{model})_{x_i}$ = the theoretical exchangeable parameter of every other "x" constituent of matrix "X".

The deviations between calculated ($\alpha_{iso_{calculated}}$) parameters and experimental (α_{iso}) parameters for each of the studied environmental matrices are reported in Table 3.

The determinant constituent x_{i-det} of an environmental matrix is then designated not only as one of the main constituents but also with specific structural arrangements in the particular environmental matrix.

Furthermore, the calculated distributions of the initial NE-OBT matrix on the determinant extracted matrix in our present study (Table 4) would seem to display a relative trend proportional to the mass distribution of the given compounds while also undergoing influence from their isotopic exchangeable parameter (α_{iso}).

A NE-OBT recovery rate on the cellulosic wall (B-2) from water-milfoil (B-1) of $44 \pm 22\%$ was thus observed with a slight downward trend for its own mass distribution in the initial matrix, i.e. $56 \pm 27\%$, thus suggesting the hypothesis that a smaller portion of the non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT) might be located in this area rather than other compounds. In displaying the lowest (α_{iso}) parameter value due to crystalline and local three-dimensional structures of cellulose and proteins, the cellulosic wall (B-2) is potentially subjected to a slight tritium distribution deprivation during molecular synthesis and sample growth as a result of the 3D molecular complexity of these compounds. On the other hand, the NE-OBT recovery rate on A-2 from A-1 of $71.0 \pm 8.7\%$ appears to conform to the mass distribution of the constituent ($75.3 \pm 3.7\%$), demonstrating that the exchangeability rate concordance of these two matrices leads to a proportional mass distribution of the NE-OBT on the raw matrix (A-1). Concerning apples (C-1) and their simple carbohydrates (C-2), the structural modification of sugars during the extraction step was assumed to be responsible for opening the ramified structure, hence leading to the accessibility of a pool of theoretically hindered exchangeable hydrogen atoms, as translated by a higher value obtained for the (α_{iso}) parameter. This phenomenon has been confirmed by the extremely low NE-OBT recovery rate onto C-2 from C-1 (i.e. $47 \pm 11\%$ of recovery rate vs. a weight distribution of $88.2 \pm 5.9\%$), since part of the measured NE-OBT on apple (C-1) was actually buried tritium (hindered tritium form) and freed during the molecular structure modification of simple carbohydrates (C-2).

Consequently, this freed buried tritium recovered its exchangeability capacities and behaved like E-OBT, thus ultimately leading to a lower value of NE-OBT measured after isotopic exchange depletion in simple carbohydrates (C-2) compared to their mass distribution in C-1.

It is therefore possible to affirm that the hydrogen exchangeability behavior of an environmental matrix is controlled and established by one of its determinant constituents, which implies a proven influence on the OBT distribution on environmental matrices.

5. Conclusion

The impact of molecular structure and conformation on tritium behavior has been highlighted and evaluated in both food chain and bio-indicator matrices, as well as in widespread biomolecules contained in the Earth's biomass. Theoretical (α_{model}) parameters were compared to experimentally determined (α_{iso}) parameters to understand OBT speciation of studied matrices in respect to their molecular constituent. Complex 3D molecular structures of cellulose, proteins and simple carbohydrates have been identified as responsible for the hydrogen exchangeability decrease in the water-milfoil and apple matrices. The presence of the buried tritium form was thus detected for environmental matrices containing main constituents with crystalline structures or ramified molecular arrangements, while its non-appearance was concluded in wheat grains and correlated with the simpler structure of the starch molecule. It has thus been shown that determinant constituents with specific molecular conformation have total control over the hydrogen transfer mechanisms in environmental matrices and directly establish their associated exchangeable hydrogen capacity. OBT speciation in a matrix was then found to be entirely correlated to OBT speciation in its determinant constituent. A significant influence of these structural aspects was observed on the NE-OBT distribution in environmental matrix constituents, hence providing access to critical information on remnant tritium in organic matter and tritium transfer in the environment.

Acknowledgments

This work was financed by the CEA Research Center, Subatech Laboratory, France's Loire Valley Regional Council (under the POLLUSOLS OSUNA Project) and the EDF utility company. The authors would also like to thank the members of the Environmental Laboratory at the Cernavodă Nuclear Power Plant for providing the apple matrix and Gurvan Rousseau from SMART Nantes laboratories for supervising water-milfoil matrix sampling.

References

- ASN, 2010. Le livre blanc du tritium, groupes de réflexion menés de mai 2008 à avril 2010 sous l'égide de l'ASN.
- Baglan, N., Cossonnet, C., Roche, E., Kim, S.B., Croudace, I., Warwick, P., 2018. Feedback of the third interlaboratory exercise organised on wheat in the framework of the OBT working group. *J. Environ. Radioact.* Vol. 181(1), 52–61.
- Baumgartner, F., Donhaerl, W., 2004. Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature. *Anal. Bioanal. Chem.* Vol. 379(2), 204–209.
- Beevers, C.A., McDonald, T.R.R., Robertson, J.T., Stern, F., 1952. The crystal structure of sucrose. *Acta Crystallogr.* Vol. 5(5), 689–690.
- Besle, J.M., Pitiot, M., 1976. Extraction et purification des glucides: application à divers aliments dérivés du soja. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* Vol. 16(5), 753–772.
- Branden, C.I., Tooze, J., 2012. Introduction to protein structure. Garland Sci.
- CETAMA, 2013. Analyse des radionucléides dans l'environnement - Analyse du tritium dans les matrices, méthode 384. Note Tech. CETAMA.
- Cossonnet, C., Neiva Marques, A.M., Gurriaran, R., 2009. Experience acquired on environmental sample combustion for organically bound tritium measurement. *Appl. Radiat. Isot.* Vol. 67(5), 809–811.
- Diabaté, S., Strack, S., 1993. Organically bound tritium. *Health Phys.* Vol. 65(6), 698–712.
- EMRAS, 2010. EMRAS (Environmental Modelling of Radiological Safety) Program, Modelling the Environmental Transfer of Tritium and Carbon-14 to Biota and Man. Final Report. Tritium and Carbon-14 Working Group. IAEA Vienna Austria.
- Feng, X., Krishnamurthy, R.V., Epstein, S., 1993. Determination of D/H ratios of nonexchangeable hydrogen in cellulose: a method based on the cellulose-water exchange reaction. *Geochem Cosmochim Acta* Vol. 57, 4249–4256.
- Fourré, E., Jean-Baptiste, P., Dapoigny, A., Ansoborlo, E., & Baglan, N. 2014. "Reference waters" in French laboratories involved in tritium monitoring: how tritium-free are they?. *Radioprotection*, Vol. 49(2), 143-145.
- Hopkins, W.G., 2003. *Physiologie végétale*. Ed. Boeck Supér.
- IRSN, 2017. Rapport d'actualisation des connaissances acquises sur le tritium dans l'environnement. Editor : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN).
- Jarvis, M., 2003. Chemistry: cellulose stacks up. *Nature* Vol. 426, 611–612.
- Kanters, J.A., Roelofsen, G., Alblas, B.P., Meinders, I., 1977. The crystal and molecular structure of β -D-fructose, with emphasis on anomeric effect and hydrogen-bond interactions. *Acta Crystallogr. B* Vol. 33(3), 665–672.
- Kim, S.B., Baglan, N., Davis, P.A., 2013. Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *J. Environ. Radioact.* Vol. 126(1), 83–91.
- Kim, S.B., Workman, W.J.G., Davis, P.A. (2008) Experimental investigation of buried tritium in plant and animal tissues, *Fusion Science and Technology*, Vol. 54, 257-260.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.* Vol. 44(22), 3358–3393.

- Kratzl, K., Claus, P., Reichel, G., 1976. Reactions of lignin and lignin model compounds with ozone. *Tappi* Vol. 59(11), 86–87.
- Lee, J.W., Thomas, L.C., Schmidt, S.J., 2011. Investigation of the Heating Rate Dependency Associated with the Loss of Crystalline Structure in Sucrose, Glucose, and Fructose Using a Thermal Analysis Approach. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 59(2), 684–701.
- Liu, Y., Ng, P.K.W., 2015. Isolation and characterization of wheat bran starch and endosperm starch of selected soft wheats grown in Michigan and comparison of their physicochemical properties. *Food Chem.* Vol. 176, 137–144.
- Makhatadze, G.I., Privalov, P.L., 1995. Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* Vol. 47, 307–425.
- Mann, J., 1971. Deuteration and titration. *Cellul. Cellul. Deriv.* Vol. 5(4).
- Mochochoko, T., Oluwafemi, O.S., Jumbam, D.N., Songca, S.P., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth. *Carbohydr. Polym.* Vol. 98(1), 290–294.
- Muztar, A.J., Slinger, S.J., Burton, J.H., 1978. The chemical composition of aquatic macrophytes. II. Amino acid composition of the protein and non-protein fractions. *Can. J. Plant Sci.* Vol. 58(3), 843–849.
- Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H., 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose II-beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc* Vol. 124, 9074–9082.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., Langan, P., 2003. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose II-alpha from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Am Chem Soc* Vol. 125, 14300–14306.
- Nivisse, A.-L., Thibault de Chanvalon, A., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G., Péron, O., 2020. An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive 3H contamination. *Environ. Chem. Lett.* Vol. 18(2), 475–481.
- Péron, O., Fourné, E., Pastor, L., Gégout, C., Reeves, B., Lethi, H.H., Rousseau, G., Baglan, N., Landesman, C., Siclet, F., Montavon, G., 2018. Towards speciation of organically bound tritium and deuterium: Quantification of non-exchangeable forms in carbohydrate molecules. *Chemosphere* Vol. 196(1), 120–128.
- Péron, O., Gégout, C., Reeves, B., Rousseau, G., Montavon, G., Landesman, C., 2016. Anthropogenic tritium in the Loire River estuary, France. *J. Sea Res.* Vol. 118, 69–76.
- Pointurier, F., Baglan, N., Alanic, G., Chiappini, R., 2003. Determination of organically bound tritium background level in biological samples from a wide area in the south-west of France. *J. Environ. Radioact.* Vol. 68(2), 171–189.
- Richards, F.M., 1977. Areas, volumes, packing, and protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* Vol. 6(1), 151–176.
- Richardson, J.S., 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Acad. Press* Vol. 34, 167–339.
- Sakintuna, B., Budak, O., Dik, T., Yöndem-makascioglu, F., Kincal, N., 2003. Hydrolysis of freshly prepared wheat starch fractions and commercial wheat starch using α -amylase. *Chem Eng Commun* Vol. 190, 883–897.
- Sepall, O., Mason, S.G., 1961. Hydrogen exchange between cellulose and water: II. Interconversion of accessible and inaccessible regions. *Can. J. Chem.* Vol. 39(10), 1944–1955.
- Shulz, G.E., Schirmer, R.H., 2013. Principles of protein structure. Springer Sci. Bus. Media.
- Sun, X.-F., Sun, R.-C., Su, Y., Sun, J.-X., 2004. Comparative Study of Crude and Purified Cellulose from Wheat Straw. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 52(4), 839–847.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* Vol. 83, 1–11.
- Tester, R.F., Karkalas, J., Qi, X., 2004. Starch composition, fine structure and architecture. *J Cereal Sci* Vol. 39, 151–165.
- Van Soest, P.V., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* Vol. 46, 829–835.
- Verwimp, T., Vandeputte, G.E., Marrant, K., Delcour, J.A., 2004. Isolation and characterisation of rye starch. *J. Cereal Sci.* Vol. 39(1), 85–90.
- Wuestenberg, T., 2014. Cellulose and Cellulose Derivatives. John Wiley Sons.
- Xie, X. (Sherry), Cui, S.W., Li, W., Tsao, R., 2008. Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Res. Int.* Vol. 41(9), 882–887.
- Zugenmaier, P., 2001. Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Prog Polym Sci* 1341–1417.

3. LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR L'INDICE DE CRISTALLINITE FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE

3.1. Le modèle expérimental d'échangeabilité des celluloses natives en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI)

3.1.1. Résumé de la publication n°2 : « New insights into the accessibility of native cellulose to environmental contaminants through an efficient analytical process. »

Parmi toutes les molécules à structures complexes dont le rôle dans la diminution de la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène a été démontré expérimentalement, la cellulose est une biomolécule dont l'interaction avec le tritium est d'intérêt majeur. En effet, la cellulose est le constituant majoritaire de toute la biomasse terrestre et présente une structure semi-cristalline caractérisée par un ensemble de liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires. Cette structure supramoléculaire arrangée en feuillet est alors supposée responsable de la diminution de l'accessibilité et de la labilité des sites hydrogènes, par leur engagement dans ces liaisons, mais est également soupçonnée de favoriser le phénomène d'entrave des atomes d'hydrogène dans la structure. Ces caractéristiques de la molécule de cellulose permettent alors d'expliquer la présence de la forme tritium enfoui (par liaison ou par entrave) dans une matrice cellulosique.

Le taux de cristallinité d'une cellulose est classiquement déterminé par analyse DRX et exprimé par l'Indice de Cristallinité (CrI), un paramètre calculé selon une méthode spécifique à la cellulose. A la suite des travaux présentés par (Péron et al., 2018), une série de celluloses natives à Indice de Cristallinité (CrI) croissant (de 13 à 62 %) a été préparée par broyage. La série a par la suite été soumise au processus d'échange isotopique par la méthode « voie douce » afin d'étudier l'évolution du paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose. Les résultats des échanges isotopiques réalisés par la méthode « voie douce » sur l'ensemble des celluloses natives étudiées sont disponibles en Annexe IX.

Une relation linéaire a ainsi pu être établie entre l'accessibilité des groupements OH, porteurs d'atomes d'hydrogène théoriquement échangeables dans la cellulose, et l'Indice de Cristallinité (CrI) exprimé pour chaque cellulose de la série. A partir de ce modèle expérimental, il devient ainsi possible d'accéder à une information quantitative sur le taux d'atomes d'hydrogène échangeables dans la cellulose étudiée, directement à partir de la connaissance de son Indice de

Cristallinité (CrI), lui-même déterminé via un calcul simplifié à partir de l'intensité d'un pic spécifique provenant des résultats d'une analyse DRX rapide.

Afin de pouvoir utiliser les informations fournies par ce modèle expérimental directement à partir d'une analyse DRX sur une matrice environnementale cellulosique, une étude des limites d'application du modèle expérimental pour les matrices non exclusivement cellulosiques a été menée. Dans les matrices environnementales, la cellulose native peut présenter un taux de cristallinité variable et se trouve toujours en combinaison avec d'autres composés amorphes à semi-amorphes. Ainsi, l'analyse DRX sur l'ensemble de l'échantillon environnemental peut permettre la détection du pic de la cellulose exploité pour le calcul de l'Indice de Cristallinité (CrI), mais peut également présenter une réduction significative de son intensité, proportionnellement à la teneur en composés amorphes. Dans ce cas, la connaissance de la teneur en cellulose dans l'échantillon est utilisée afin de corriger la valeur de l'Indice de Cristallinité (CrI) calculé. Pourtant, la présence de cette phase amorphe apportée par les autres constituants peut également devenir trop importante par rapport à la phase cristalline de la cellulose et rendre le pic de la cellulose indétectable et/ou inexploitable par une analyse DRX dans les conditions analytiques employées.

Afin d'évaluer la plage d'application du modèle expérimental à partir d'analyses DRX directes dans des matrices environnementales, une étude des limites de la détermination de l'Indice de Cristallinité (CrI) à partir de paramètres analytiques classiquement employés pour l'analyse DRX sur des celluloses a alors été réalisée. Ainsi, une valeur minimale d'Indice de Cristallinité (CrI) de 12 % a été établie comme acceptable, dans ces conditions, pour une détermination exacte de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose dans un échantillon d'une matrice. Afin de déduire l'accessibilité des atomes d'hydrogène de la cellulose constituante d'une matrice de façon fiable à partir du modèle expérimental, cette cellulose doit alors présenter un certain Indice de Cristallinité (CrI) par rapport à sa teneur dans la matrice pour permettre l'obtention de cette valeur minimale. Néanmoins, il reste important de considérer le très faible impact que pourrait engendrer une cellulose constitutive dont la teneur massique pour une cristallinité donnée ne permet pas de dépasser l'Indice de Cristallinité (CrI) minimum de 12 % dans une matrice. En ce sens, cette valeur est tout à fait acceptable au regard des matrices environnementales cellulosiques pour lesquelles l'application du modèle expérimental peut s'avérer pertinente et enrichissante en informations sur la capacité d'échange globale de l'atome d'hydrogène.

Ces résultats permettent alors de déterminer l'accessibilité de l'ensemble des atomes d'hydrogène dans une cellulose constituante d'une matrice par une analyse DRX rapide. Ces informations peuvent ainsi être employées afin d'évaluer l'impact de la cellulose et de sa cristallinité dans l'établissement de la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène dans une matrice environnementale cellulosique.

Concernant les aspects appliqués au TOL, l'accessibilité aux groupes OH de la cellulose est d'un grand intérêt pour l'approfondissement des connaissances sur les capacités de rétention du tritium sous forme de tritium organiquement lié dans les matrices environnementales cellulosiques.

Dans un autre contexte, ces informations peuvent également être utilisées afin d'estimer les capacités complexantes de la cellulose avec les métaux de transitions et actinides à son état naturel dans des échantillons environnementaux, mais aussi permettre d'évaluer le rendement de production de nanomatériaux fonctionnalisés à partir de composés cellulosiques à des fins environnementales ou médicales.

3.1.2. **Publication n°2 : « New insights into the accessibility of native cellulose to environmental contaminants through an efficient analytical process. »**

Cette publication est soumise au journal Carbohydrate Polymers (Elsevier) et en cours d'examen.

New insights into the accessibility of native cellulose to environmental contaminants through an efficient analytical process

A-L. Nivesse^{1,2}, N. Baglan³, G. Montavon¹, O. Péron^{1*}

¹SUBATECH, UMR 6457, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes Cedex 3, France

²CEA, DAM, DIF, F-91297 Arpajon, France

³CEA, DIF, DRF, JACOB, IRCM, SREIT, LRT, F-91297 Arpajon, France

*olivier.peron@subatech.in2p3.fr

Soumis - Carbohydrate Polymers (Elsevier)

Highlights

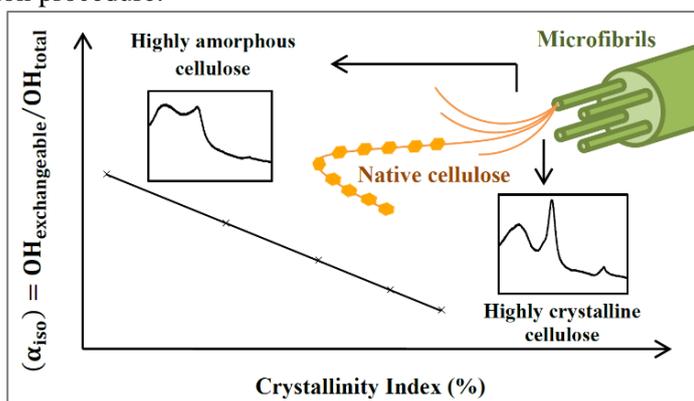
- Hydroxyl reactivity of native cellulose is correlated to its crystallinity.
- A linear relationship describes OH group accessibility versus Crystallinity Index.
- Fast XRD analysis gives access to hydroxyl reactivity of native cellulose.
- The model is applicable to environmental matrices depending on cellulose parameters.

Abstract

Native cellulose hydroxyl reactivity directly influences the behavior of contaminants (heavy metals, tritium) and the binding properties present in the environment, in addition to being of great interest in the development of functionalized nanomaterials for environmental or medicinal purposes. In this paper, a robust and reliable T/H gas-solid isotopic exchange procedure has been implemented to assess the OH group accessibility of a series of native celluloses with an increasing degree of crystallinity. A linear relationship was found between hydroxyl reactivity and the Crystallinity Index (CrI) of native celluloses, as determined by the analysis of their crystalline structure from XRD characterization. The application of the obtained linear experimental model to cellulosic materials from direct XRD measurements in environmental matrices was then evaluated from studying the significant limits of the CrI parameter determination. An acceptable minimum value of 12% for the CrI parameter on environmental matrices could thus be established for an accurate cellulose CrI and direct OH accessibility deduction. The authors have therefore proposed an environmental matrices relevant and efficient analytical process in order to determine the accessibility of native cellulose hydroxyl groups to metals or hydrogen isotopes bound in the environment from a single and quick sample characterization procedure.

Keywords :

Diffraction
Cellulose
Pollutants
Tritium
Heavy metals
Isotopic exchange



1. Introduction

As one of the simplest and most unique polysaccharide molecules, cellulose provides industry with a critical raw material featuring unique properties and offering broad economic potential. In recent years, much focus has been placed on seeking a more sustainable and environmentally-friendly substitute for oil-based materials, with special emphasis on cellulose [1,2]. The polymer derives most of its functional properties from its hydroxyl groups since its chemical reactivity is mainly a function of the high donor reactivity of its OH groups [3,4]. The accessibility of cellulose hydroxyl groups is therefore key to many processing steps that require chemical or enzymatic reactions as well as cellulose dissolution [5]. The hydrogen exchange properties of these OH groups are then heavily involved in the binding processes of metal ions into cellulose fibers, from sorption supported by a hydrated shell exchange with OH groups or electrostatic interactions with carboxyl groups [6,7]. The sorption of heavy metals such as copper or manganese thus proves to be relevant in the processing of cellulose fibers, e.g. bleach operations, yet the incorporation of metal ions is also of great significance for dietary fibers, nanomaterial production or for colored fibers with a high fastness level. These exchange capacities of OH group hydrogen atoms are also important in hydrogen isotope-related topics, such as investigations on cellulosic material origins within protium and deuterium ratios, to the same extent as in the field of nuclear forensics and retrospective studies on tritium releases. Indeed, tritium is the natural radioactive isotope of hydrogen and one of the main radionuclides released into the environment by nuclear installations [8,9].

Tritium can thus integrate organic matter in the form of organically bound tritium (OBT) by replacing stable hydrogen isotopes and taking up exchangeable positions (exchangeable OBT) or else remaining in the molecule until its degradation (non-exchangeable OBT) [10-12]. In cellulose molecules, exchangeable OBT directly relies on accessible OH groups and their hydrogen exchangeability properties.

As the most abundant biopolymer on earth and the main structural component of cell walls in plants, cellulose reactivity to tritium binding is thus key to understanding tritium behavior in the environment and its transfer into food chain samples.

On the supramolecular level, cellulose is composed of linear chains of D-glucose units linked together by (1→4)-beta-D-glycosidic bonds subjected to aggregation into microfibrils with sheet organization and a two-phase morphology of crystalline and amorphous regions. The crystalline structure of cellulose is highly ordered and originates from extensive intra-molecular and intra-strand hydrogen bonding between OH groups. As a result, the accessibility of cellulose hydroxyl groups undergoes a drastic reduction, as has been widely demonstrated in the literature during crystalline structure investigations of various cellulose compounds in hydrogen-deuterium exchange experiments [13,14]. This characteristic of cellulose accessibility has also been observed during tritium speciation investigations and was found to be responsible for the decrease in tritium exchangeability rates within various cellulosic environmental matrices [15,16]. Nevertheless, no clear analytical relationship has ever been derived between hydrogen exchangeability and degree of crystallinity in native cellulose. To a global extent, several characterizations methods (SEM, TEM, FTIR, XRD, TGA ...) are usually combined to assess the link between the crystalline morphology of cellulose and applications related to its OH group's reactivity [17-19]. However, simplified calculation method could also be fit for purpose in given conditions. For example, the Crystallinity Index (CrI) determined after a single X-ray diffraction (XRD) analysis is commonly used for quantifying the crystallinity rate of native cellulose [2, 17-22]. The present work therefore aims to provide a simple and environmental matrices relevant linear model to describe OH group accessibility with respect to the Crystallinity Index (CrI) from a series of five native celluloses. While CrI is determined by means of X-ray diffraction (XRD), OH group accessibility is investigated by a robust and reliable T/H gas-solid isotopic exchange procedure [15,16,23,24].

By virtue of being extracted or investigated from environmental sources, the application potential of the linear model obtained for the cellulose accessibility determination can then be established for cellulosic materials and from direct measurements conducted on environmental matrices.

2. Materials and methods

2.1. Sample preparation and characterization

Alpha (cellulose-C) and microcrystalline (cellulose-E) native celluloses (CAS number: 9004-34-6) were purchased from Sigma-Aldrich. The crystalline structures of these celluloses were modified by partial destruction using ball-milling processes. A series of five native celluloses with increasing crystalline ratios was produced from ball-milling with the following parameters: cellulose-A (142 x g, 15 min) and B (84 x g, 10 min) from cellulose-C (alpha cellulose); and cellulose-D (68 x g, 3 min) from cellulose-E (microcrystalline cellulose). Cellulose-E refers to the microcrystalline cellulose previously studied in Péron *et al.* (2018) [15].

An amorphous compound of silica SiO₂ (CAS number: 7631-86-9) was purchased from Sigma-Aldrich and added in different ratios to each cellulose of the series (A through E) in order to obtain a modified sequence of increasing cellulose content samples (from 5% to 95% by weight) for each native cellulose of the series (Table 1).

2.2. Experimental procedure

2.2.1. X-ray diffraction analysis

X-ray diffraction was employed to determine the crystallinity of the series of five native celluloses and the modified sequences of increasing cellulose content samples. Each milled powder material was placed on the sample holder and leveled to obtain total and uniform X-ray exposure. Analyses were performed at room temperature using a D5000 Bruker X-ray diffractometer (Cu/K α radiation = 0.154 nm at 40 kV and 30 mA). The XRD patterns were collected within the range of $2\theta = 0^\circ - 50^\circ$ with a scan step of $2\theta = 1^\circ$ and a measurement time per step of 4 s.

The Crystallinity Index (CrI) was determined based on the reflected intensity data, according to the method developed by Segal *et al.* (1959) [20], using the following Equation 1:

$$(\text{CrI}) (\%) = \frac{(I_{002} - I_{\text{am}})}{I_{002}} \times 100 \quad (1)$$

where I_{002} is the maximum diffracted intensity by the (002) plane at a 2θ angle of around 22° , while I_{am} is the minimum diffracted intensity at a 2θ angle of around 18° , representing the intensity scattered by the amorphous region of the sample.

2.2.2. Isotopic exchanges

The (α_{iso}) parameter describes the isotopic exchangeable hydrogen pool versus total hydrogen atoms in a specific matrix and is typically determined by a gas-solid isotopic exchange procedure. The gas-solid isotopic exchange process has already been developed and described in previous publications [15,24]; it is based on a sample set-up vapor phase experiment performed in a confined glove box (Plas-Labs 890-THC) with controlled and stable temperature ($20.0^\circ \pm 0.1^\circ\text{C}$) and relative humidity ($85\% < \text{RH} < 88\%$) parameters. An isotopic steady state with a defined (T/H) ratio is established between a bath of KCl-saturated solution ($(\frac{T}{H})_{l, \text{ bath}}$) with controlled tritium activities, a vapor phase confined in a glove box ($(\frac{T}{H})_{g, \text{ vapor}}$), the water condensed at the sample surface ($(\frac{T}{H})_{l, \text{ cond}}$) and the exchangeable organically bound tritium of the sample ($(\frac{T}{H})_{s, \text{ E-OBT}}$), which can be described by Equation 2:

$$(\frac{T}{H})_{l, \text{ bath}} = (\frac{T}{H})_{g, \text{ vapor}} = (\frac{T}{H})_{l, \text{ cond}} = (\frac{T}{H})_{s, \text{ E-OBT}} \quad (2)$$

Isotopic exchanges were conducted on native celluloses following four tritium-enrichment experiments with tritium-rich baths (HTO = 120, 300, 500 and 700 Bq.L⁻¹). After 2 days of solid-gas contact time, the steady state was assumed to be reached, and solid samples were recovered at Days 2, 3 and 4 to ensure the reproducibility and steady state of the system. Three baths aliquots were also collected at the steady state and kept at a temperature below 5°C prior to distillation. After liquid nitrogen immersion and freeze-drying, the solid samples were heat-treated in a tubular furnace (Eraly, France), where the organic matter was transformed into carbon dioxide and combustion water.

Liquid samples (combustion waters and baths aliquots) were purified by distillation under atmospheric pressure after pH adjustment with sodium peroxide (Na_2O_2) as needed.

The tritium activities were measured by means of liquid scintillation counting (PerkinElmer Wallac Quantulus 1220 model) using an Ultima Gold LLT cocktail. The detection limit was estimated at below 1 Bq.L^{-1} for a counting time of 24 hours and a blank value of 0.7 counts per minute. A quench correction was applied for each measurement according to a quenching curve calculated after calibration with laboratory-prepared quenched standards.

At each steady state, a mean value of the combustion water from each matrix sample $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT}$ was obtained by averaging the measured sample values forming the plateau. A mean value of each saline solution $\left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath}$ was also obtained by averaging the three measured bath aliquot values. The (α_{iso}) parameter could thus be determined as the slope of the plot of $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT}$ versus $\left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath}$, in accordance with the description provided in Equation 3:

$$\alpha_{iso} = \frac{\Delta \left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT}}{\Delta \left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath}} \quad (3)$$

3. Results and discussion

3.1. Crystallinity Index (CrI) determination

The XRD patterns for the series of native celluloses are shown in Figure 1. All celluloses in the series exhibited crystalline peaks attributed to the typical structure of cellulose I at: $2\theta = 16.1^\circ$ (110), 22° (200) and 34.7° (004). Cellulose I is one of the four allomorphic forms of crystalline cellulose (I to IV) and the most common form in a natural source [25,26]. CrI values for celluloses A, B, C, D and E were calculated at 13, 34, 46, 55 and 62%, respectively. From celluloses E and C, the crystallinity ratio decreases as expected due to the partial destruction of crystalline regions during the ball-milling process [27].

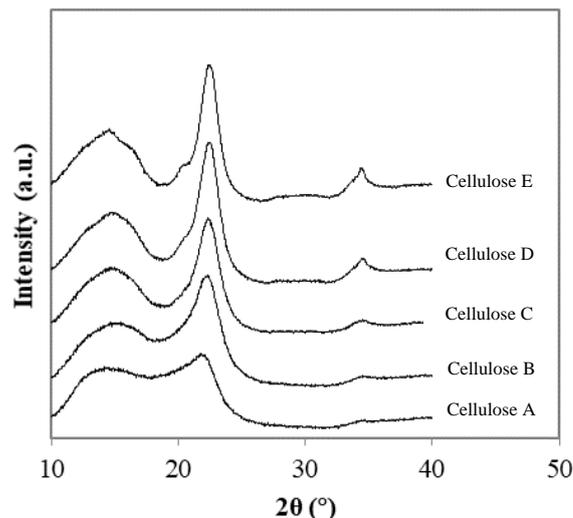


Fig. 1: XRD patterns for the series of five native celluloses from cellulose A through cellulose E

3.2. Linear experimental model for the cellulose accessibility determination

Isotopic exchanges were conducted on native celluloses to assess their exchangeable parameter (α_{iso}). Accurate values of (α_{iso}) equal to $23.8 \pm 1.2\%$ ($R^2 = 0.999$), $19.8 \pm 1.6\%$ ($R^2 = 0.997$), $17.4 \pm 2.1\%$ ($R^2 = 0.993$), $14.4 \pm 0.7\%$ ($R^2 = 0.999$) and $13 \pm 1\%$ ($R^2 = 0.990$) were obtained for celluloses A through E, respectively (Fig. 2). The results on cellulose E exchangeable parameter (α_{iso}) were previously presented in Péron *et al.* (2018) [15].

From these findings, an experimental model based on (α_{iso}) vs. CrI was obtained for the series of native celluloses (Fig. 2). A decrease in the exchangeability parameter (α_{iso}) can be observed as the degree of crystallinity in the cellulose molecule increases. The crystalline structure of cellulose is represented by an orderly arrangement of D-glucose chains generated by hydrogen bonds. The (1→4)-beta-D-glycosidic bonds and monomer arrangements oriented at 180° are thus responsible for a three-dimensional network (see SI-1). Hence, hydroxyl groups of D-glucose units behave like hydrogen-bond donors at both the intra-molecular and intra-strand levels to provide a stabilized structure to cellulose [28-30].

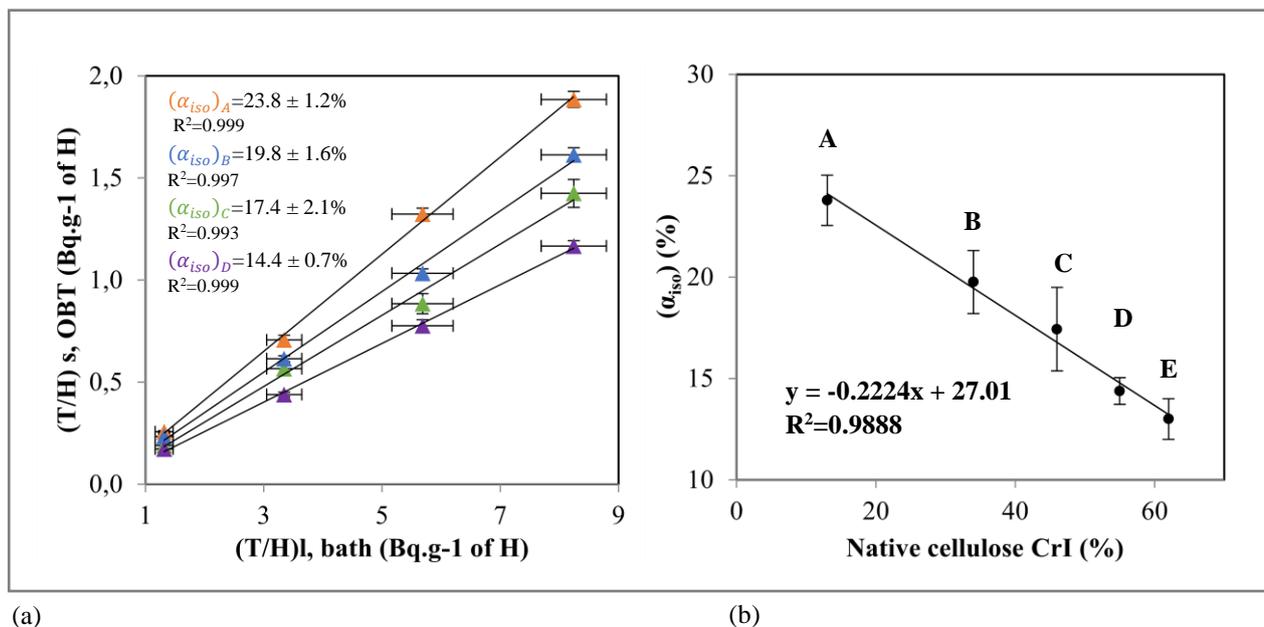


Fig. 2: (a) (T/H) of celluloses A through D in the steady state after freeze-drying vs. measured set (T/H) of saline solutions and their associated exchangeable parameter (α_{iso}). (b) Exchangeable parameter (α_{iso}) vs. Crystallinity Index (CrI) for the series of five native celluloses from A through E.

As such, a larger proportion of the hydrogen atoms is made inaccessible for isotopic exchange and behaves as non-exchangeable hydrogen, while the degree of crystallinity in the cellulose is increasing.

The experimental model constructed with the series of native celluloses exhibits a linear tendency, with a correlation coefficient equal to 0.9888. Hence, the suggestion of a proportionality ratio is entirely noticeable between the decreases in hydrogen atom accessibility and the extent of the crystalline phase in native cellulose. This dependency can therefore be described as linear (Equation 4):

$$(\alpha_{iso_{celluloses}}) = -0.2224 \times (CrI) + 27.01 \quad (4)$$

where ($\alpha_{iso_{celluloses}}$) is the exchangeable hydrogen atom ratio of the native celluloses series in %, and (CrI) the crystallinity index from 13 to 62 %.

Equation 4 can thus serve to deduce the ratio of exchangeable hydrogen atoms in native cellulose molecules merely from information on the degree of crystallinity.

3.3. Environmental matrices applications and limits

The cellulosic materials involved in metal complexation processes, for nanoparticles or depollution adsorbent preparation, are extracted from natural sources [21,31-34]. Similarly, investigations on organically bound tritium distribution and speciation towards cellulose pertain to environmental cellulosic organic matter [15,16]. Consequently, the linear model method to determine cellulose accessibility requires applicability to cellulosic materials from direct environmental matrices CrI measurements. In environmental matrices, native cellulose may display a wide range of crystallinity rates and is always found in combination with other amorphous to semi-amorphous compounds. An XRD analysis on the entire environmental sample might therefore detect the attributed peak at 22° for the cellulose needed for a CrI calculation, yet with a significant impact lowering its intensity in proportion with the amorphous compound content.

At some point, the presence of this amorphous phase, provided by the other constituents, may become too great compared to the crystalline phase of the cellulose, making the cellulose peak at 22° undetectable by means of XRD analysis.

In order to assess the applicability of the linear experimental model to cellulosic materials from direct measurements in environmental matrices, a study of the significant limits of the CrI parameter determination from XRD analysis was carried out. For this purpose, each native cellulose of the series was mixed in different ratios with SiO₂ amorphous compounds to simulate other non-crystalline fractions of environmental matrices and then analyzed by XRD. CrI (%) values for the modified sequences of increasing cellulose content samples are presented in Table 1. From these results and the cellulose content (in % by weight) of each sample, theoretical CrI values could be calculated and attributed to each of the studied native celluloses (calculated native cellulose CrI (%)) and compared to their actual CrI values (actual native cellulose CrI (%)) (Table 1). For each modified sequence, the cellulose contents were adapted in each sample to achieve the minimum content of cellulose needed to reach the actual calculated CrI value.

Native cellulose sequence	Sample	Native cellulose ratio (in % by weight)	Sample CrI (%)	Calculated native cellulose CrI (%)	Actual native cellulose CrI (%)
Cellulose A	A-1	60,3	-	-	13
	A-2	70,2	-	-	
	A-3	80,0	4	5	
	A-4	90,4	8	10	
	A-5	94,8	12	13	
Cellulose B	B-1	20,2	4	18	34
	B-2	30,0	9	30	
	B-3	35,6	12	34	
	B-4	40,1	14	34	
	B-5	50,1	17	34	
Cellulose C	C-1	15,5	4	26	46
	C-2	20,3	8	40	
	C-3	26,1	12	46	
	C-4	30,3	14	46	
	C-5	40,1	18	46	
Cellulose D	D-1	15,0	8	50	55
	D-2	19,6	11	54	
	D-3	23,2	13	55	
	D-4	30,3	17	55	
	D-5	40,3	22	55	
Cellulose E	E-1	10,2	6	56	62
	E-2	14,5	9	60	
	E-3	20,4	13	62	
	E-4	25,3	16	62	
	E-5	30,1	19	62	

Table 1: Results on modified sequences of increasing cellulose content samples from celluloses A through E, along with their respective native cellulose ratio (% by weight), obtained sample CrI (%) and the resulting calculated native cellulose CrI (%) compared to the actual native cellulose CrI (%).

Results obtained on the minimum content in % by weight of native celluloses A through E needed to effectively reach an XRD analysis peak at 22° for the correct calculation of their respective CrI values are presented in Figure 3. For medium to highly crystalline cellulose (i.e. celluloses B through E), the minimum cellulose content needed in samples was found to lie around 20% to 35% by weight. These values are by far lower than the minimum content of cellulose in natural cellulosic sources like trees or cotton, yet which does approximately correspond to that found in green cellulosic plants like grass or tree leaves [27]. For very weak crystalline cellulose (cellulose A), only a very high cellulose content was found to be acceptable for an accurate cellulose CrI determination from XRD analysis.

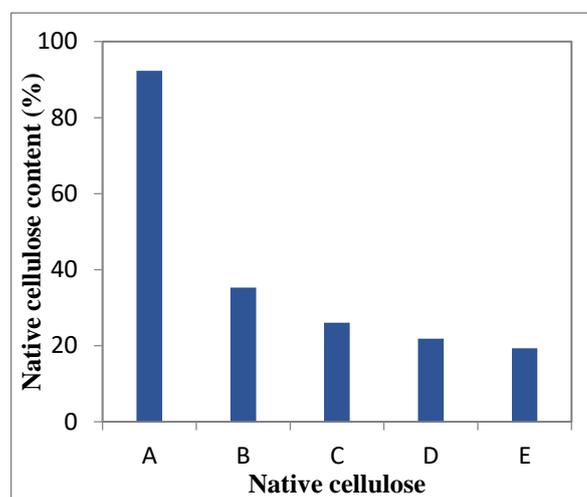


Fig. 3: Minimum content (% by weight) of native celluloses A through E needed to effectively reach an XRD analysis peak at 22° for the accurate calculation of their respective CrI (%)

For each of the native cellulose results, it was then estimated that the minimum CrI value calculated from XRD analysis was acceptable as of 12% in an environmental sample to produce an accurate cellulose CrI deduction. Nevertheless, this value remains dependent on the typical internal parameters used in a cellulose analysis of the XRD equipment and could thus be further improved, as needed. Similarly, this information proves to be relevant when cellulose is the only constituent of the studied matrix whose crystallinity is directly related to the XRD analysis peak at 22°.

The linear model is therefore applicable to environmental matrices for cellulose accessibility determination under this condition whenever the CrI value obtained from the matrix sample XRD analysis exceeds 12%.

A complementary analysis of the sample composition in cellulose is then needed to deduce the CrI and, hence, the accessibility of the studied cellulose.

4. Conclusion

Hydroxyl reactivity has been investigated in a series of native celluloses with an increasing degree of crystallinity using a robust and reliable T/H gas-solid isotopic exchange procedure. A linear relationship was derived between OH group accessibility and the Crystallinity Index (CrI) of native celluloses. Since the purpose of this study relies on natural cellulose sources, the applicability of the linear model from direct measurements on environmental matrices was investigated with samples of increasing cellulose content at various crystallinity rates. An acceptable minimum value of 12% for the CrI parameter on environmental matrices could thus be established for the direct deduction of an accurate cellulose content CrI and OH accessibility. These findings then make it possible to determine efficiently, by means of a single and fast XRD analysis, the accessibility of the entire cellulose hydroxyl group pool to metals, deuterium or tritium bound into environmental matrices. This information can subsequently be used not only to estimate the complexing capacities of cellulose with metals in its natural state in environmental samples, but also to evaluate the production yield of functionalized nanomaterials from cellulosic compounds for environmental or medicinal purposes. As regards the implications for hydrogen isotopes, cellulose OH group accessibility is of major benefit for the state of knowledge on deuterium and tritium storage capacities in the form of remaining organically bound deuterium and tritium in cellulosic environmental matrices. Applications to investigations on cellulosic material origins could emerge, to the same extent as retrospective studies of tritium releases and nuclear forensics.

In a more fundamental manner, this method of determining hydroxyl group accessibility on cellulose also provides much relevance in understanding the involvement of cellulose in environmental matrices accessibility to deuterium and tritium, as well as in grasping the contribution of other complex compounds involved with structures difficult to characterize, like proteins.

References

- [1] Fortunati, E., Puglia, D., Monti, M., Peponi, L., Santulli, C., Kenny, J.M., Torre, L., 2013. Extraction of Cellulose Nanocrystals from Phormium tenax Fibres. *Journal of Polymers and the Environment* Vol. 21(2), 319–328.
- [2] Johar, N., Ahmad, I., Dufresne, A., 2012. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products* Vol. 37(1), 93–99.
- [3] Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A., 2005. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* Vol. 44(22), 3358–3393.
- [4] O'Connell, D.W., Birkinshaw, C., O'Dwyer, T.F., 2008. Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology* Vol. 99(15), 6709–6724.
- [5] Pönni, R., Kontturi, E., Vuorinen, T., 2013. Accessibility of cellulose: Structural changes and their reversibility in aqueous media. *BioResources* Vol. 93(2), 424–429.
- [6] Kongdee, A., Bechtold, T., 2009. Influence of ligand type and solution pH on heavy metal ion complexation in cellulosic fibre: model calculations and experimental results. *Cellulose* Vol. 16(1), 53–63.
- [7] Öztürk, H.B., Vu-Manh, H., Bechtold, T., 2009. Interaction of cellulose with alkali metal ions and complexed heavy metals. *Lenzinger Berichte*, Vol. 87, 142-150.
- [8] ASN, 2010. Le livre blanc du tritium, groupes de réflexion menés de mai 2008 à avril 2010 sous l'égide de l'ASN.
- [9] IRSN, 2017. Rapport d'actualisation des connaissances acquises sur le tritium dans l'environnement. Editor: Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).
- [10] Diabaté, S., Strack, S., 1993. Organically bound tritium. *Health Physics*, Vol. 65(6), 698–712.
- [11] Kim, S.B., Baglan, N., Davis, P.A., 2013. Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *Journal of Environmental Radioactivity* Vol. 126(1), 83–91.
- [12] Sepall, O., Mason, S.G., 1961. Hydrogen exchange between cellulose and water: II. Interconversion of accessible and inaccessible regions. *Canadian Journal of Chemistry* Vol. 39(10), 1944–1955.
- [13] Lindh, E.L., Salmén, L., 2017. Surface accessibility of cellulose fibrils studied by hydrogen–deuterium exchange with water. *Cellulose* Vol. 24(1), 21–33.
- [14] Reishofer, D., Spirk, S., 2015. Deuterium and Cellulose: A Comprehensive Review. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials* Vol. 271, 93–114.

- [15] Péron, O., Fourré, E., Pastor, L., Gégout, C., Reeves, B., Lethi, H.H., Rousseau, G., Baglan, N., Landesman, C., Siclet, F., Montavon, G., 2018. Towards speciation of organically bound tritium and deuterium: Quantification of non-exchangeable forms in carbohydrate molecules. *Chemosphere* Vol. 196(1), 120–128.
- [16] Nivesse, A.-L., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G., Péron, O., (2021). Cellulose, proteins, starch and simple carbohydrates molecules control the hydrogen exchange capacity of bio-indicators and foodstuffs. *Chemosphere*.
- [17] Luzzi, F., Puglia, D., Sarasini, F., Tirillò, J., Maffei, G., Zuorro, A., ... Torre, L., 2019. Valorization and extraction of cellulose nanocrystals from North African grass: *Ampelodesmos mauritanicus* (Diss). *Carbohydrate polymers*, Vol. 209, 328–337.
- [18] Melikoğlu, A. Y., Bilek, S. E., Cesur, S., 2019. Optimum alkaline treatment parameters for the extraction of cellulose and production of cellulose nanocrystals from apple pomace. *Carbohydrate polymers*, Vol. 215, 330–337.
- [19] Trache, D., Hussin, M. H., Chuin, C. T. H., Sabar, S., Fazita, M. N., Taiwo, O. F., ... Haafiz, M. M., 2016. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 93, 789–804.
- [20] Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal* Vol. 29(10), 786–794.
- [21] Hashem, M. A., Elnagar, M. M., Kenawy, I. M., Ismail, M. A., 2020. Synthesis and application of hydrazono-imidazoline modified cellulose for selective separation of precious metals from geological samples. *Carbohydrate Polymers*, 116–177.
- [22] Madivoli, E., Kareru, P., Gachanja, A., Mugo, S., Murigi, M., Kairigo, P. K., ... Njonge, F., 2016. Adsorption of selected heavy metals on modified nano cellulose. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, Vol. 12(3), 1-9.
- [23] Nivesse, A.-L., Thibault de Chanvalon, A., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G., Péron, O., 2020. An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive ^3H contamination. *Environmental Chemistry Letters* Vol. 18(2), 475–481.
- [24] Nivesse, A.-L., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G., Péron, O., (2021). Non-intrusive and reliable speciation of organically bound tritium in environmental matrices. *Talanta*.
- [25] Chen, W., Yu, H., Liu, Y., Chen, P., Zhang, M., Hai, Y., 2011. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. *Carbohydrate Polymers* Vol. 83(4), 1804–1811.
- [26] Lu, H., Gui, Y., Zheng, L., Liu, X., 2013. Morphological, crystalline, thermal and physicochemical properties of cellulose nanocrystals obtained from sweet potato residue. *Food Research International* Vol. 50(1), 121–128.
- [27] Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* Vol. 83, 1–11.
- [28] Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H., 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose II-beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 124, 9074–9082.
- [29] Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., Langan, P., 2003. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose II-alpha from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Am. Chem. Soc.* Vol. 125, 14300–14306.
- [30] Jarvis, M., 2003. Chemistry: cellulose stacks up. *Nature* Vol. 426, 611–612.
- [31] Biliuta, G., Coseri, S., 2019. Cellulose: A ubiquitous platform for ecofriendly metal nanoparticles preparation. *Coordination Chemistry Reviews* Vol. 383, 155–173.
- [32] Monier, M., Akl, M.A., Ali, W.M., 2014. Modification and characterization of cellulose cotton fibers for fast extraction of some precious metal ions. *International Journal of Biological Macromolecules* Vol. 66, 125–134.
- [33] Li, C., Ma, H., Venkaterswaran, S., Hsiao, B.S., 2020. Highly efficient and sustainable carboxylated cellulose filters for removal of cationic dyes/heavy metals ions. *Chemical Engineering Journal* Vol. 389.
- [34] Garba, Z.N., Lawan, I., Zhou, W., Zhang, M., Wang, L., Yuan, Z., 2020. Microcrystalline cellulose (MCC) based materials as emerging absorbents for the removal of dyes and heavy metals - A review. *Science of the Total Environment* Vol. 717.

3.2. Applications aux matrices environnementales : le cas du *Myriophyllum Spicatum*

Le modèle expérimental précédemment développé à partir de celluloses natives est destiné à être employé sur des matrices environnementales. En effet, ce modèle permet de décrire le taux d'atomes d'hydrogène échangeables dans une cellulose native en fonction de son Indice de Cristallinité (CrI), déterminé à partir d'une analyse DRX et un calcul par une méthode spécifique à la cellulose. En considérant que l'intensité du pic spécifique à la cellulose obtenue par l'analyse DRX rend uniquement compte de la cristallinité de la cellulose, l'analyse DRX et le calcul de l'Indice de Cristallinité (CrI) peuvent être directement réalisés à partir d'un échantillon d'une matrice environnementale cellulosique. Ainsi, la connaissance de l'Indice de Cristallinité (CrI) de l'échantillon et de la teneur en cellulose dans l'échantillon permettent de remonter au taux de positions hydrogènes échangeables dans la cellulose constitutive ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$), puis de déterminer le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) de la matrice (cf. Eq. II-9).

La comparaison entre le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) et le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) d'une matrice cellulosique permet alors d'évaluer l'impact de la cellulose sur les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène dans l'intégralité de la matrice. Lorsqu'une égalité entre ces deux paramètres n'est pas observable, il est possible d'établir que la cellulose n'est pas le seul constituant responsable de la diminution de la labilité des atomes d'hydrogène dans la matrice. Aussi, l'impact engendré par les autres constituants peut être déduit d'un écart quantitatif entre les paramètres (α_{iso}) et (α_{CrI}) de la matrice.

Dans ces travaux, nous nous sommes intéressés au *Myriophyllum Spicatum*, un macrophyte dont les constituants responsables de la diminution de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène dans la matrice sont la cellulose et les protéines (cf. publication n°1). Dans la partie précédente de ce chapitre, l'impact clé et exclusif de ces deux constituants a été démontré sur le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) de la matrice « Myriophylle » au cours de l'étude de sa paroi cellulosique extraite, « Myriophylle-Paroi cellulosique », contenant l'intégralité de la fraction cellulosique (cellulose, hémicellulose, lignine) ainsi qu'une partie des protéines (protéines de structure). Dans cette partie, il est proposé d'évaluer l'impact spécifique de chacun de ces deux constituants séparément (cellulose et protéines) en menant une étude comparative entre le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) et le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) dans les matrices « Myriophylle » et « Myriophylle-Paroi cellulosique ».

En ce sens, une analyse DRX doit être réalisée sur ces matrices pour déterminer, dans un premier temps, le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité attribué à leur cellulose ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$). A partir de ces informations, les paramètres d'échangeabilité (α) de ces matrices peuvent être considérés en prenant en compte le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité attribué à leur cellulose ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$), le paramètre d'échangeabilité attribué à leurs protéines (α_{prot}) et les paramètres d'échangeabilité théoriques ($\alpha_{modèle_{autre}}$) pour l'ensemble de leurs autres constituants, selon la relation présentée dans l'équation (Eq. III-1).

$$(\alpha) = \frac{\left[\sum_{i=1}^n (\alpha_{modèle_{autre}})_i \times (t_{autre})_i \right] + [(\alpha_{CrI_{cellulose}}) \times (t_{cellulose})] + [(\alpha_{prot}) \times (t_{prot})]}{\left[\sum_{i=1}^n (t_{autre})_i \right] + (t_{cellulose}) + (t_{prot})} \quad \text{Eq. III-1}$$

Avec :

(t_{prot}): la teneur en protéines dans la matrice.

Dans le cas où les paramètres (α_{iso}) et (α_{CrI}) déterminés ne concordent pas, l'information sur le paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité attribué à la cellulose ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) permet finalement d'en déduire la valeur du paramètre d'échangeabilité (α_{prot}) à attribuer nécessairement aux protéines pour obtenir une égalité entre le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) présenté dans la publication n°1 et le paramètre d'échangeabilité (α) décrit par la relation de l'équation (Eq. III-1) dans la matrice, selon l'équation (Eq. III-2) suivante :

$$(\alpha_{prot}) = (\alpha_{iso}) + \frac{1}{(t_{prot})} \times \left[(t_{cellulose}) \times ((\alpha_{iso}) - (\alpha_{CrI_{cellulose}})) + \sum_{i=1}^n (t_{autre})_i \times \left((\alpha_{iso}) - \sum_{i=1}^n (\alpha_{modèle_{autre}})_i \right) \right] \quad \text{Eq. III-2}$$

Pour rappel, l'étude d'échantillons de la cellulose seule de ces matrices n'a pas été envisageable car l'intrusivité des procédés d'extraction usuels de la cellulose entraîne systématiquement la modification de sa structure cristalline initiale. Ce phénomène engendre alors un biais ne permettant pas un calcul de l'Indice de Cristallinité (CrI) fidèle à l'état initial de la cellulose dans la matrice environnementale. Ainsi, l'étude de la cristallinité de la cellulose constitutive et du paramètre (α_{CrI}) a été réalisée sur l'ensemble de la matrice « Myriophylle » ainsi que la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique », sans purification supplémentaire pour l'isolation de la cellulose.

3.2.1. Résultats

Une analyse DRX a été réalisée sur une série d'échantillons de la matrice « Myriophylle » et de sa matrice fille extraite « Myriophylle-Paroi cellulosique ». Les diffractogrammes obtenus pour chacune des matrices sont présentés dans la Figure III-1 :

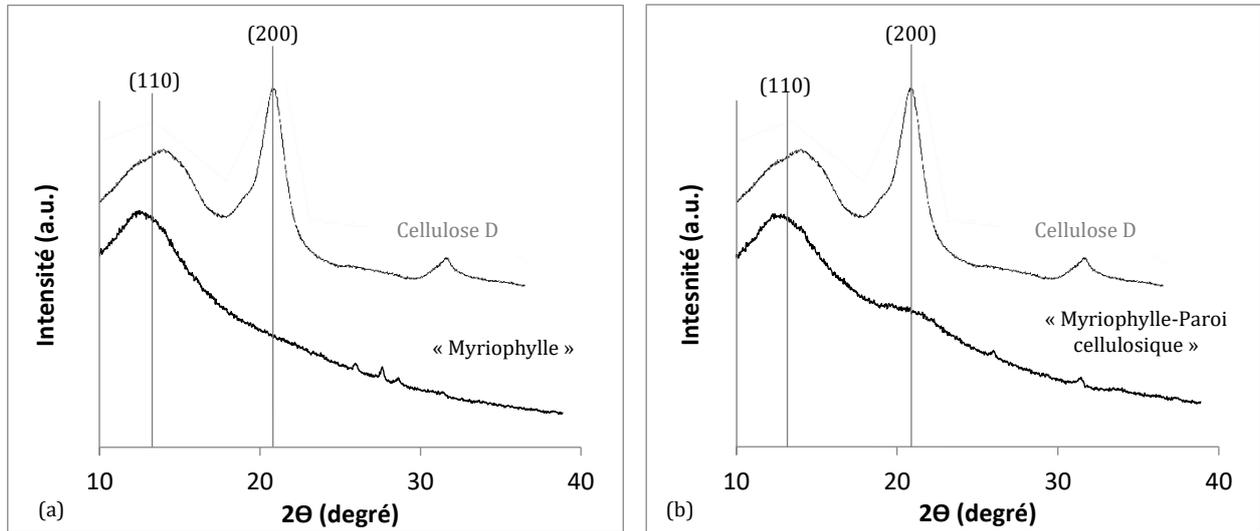


Figure III-1 : Diffractogrammes des analyses DRX sur les matrices (a) « Myriophylle » et (b) « Myriophylle-Paroi cellulosique » comparés aux résultats obtenus sur la cellulose D.

Pour chacune des deux matrices, un pic spécifique à l'allomorphe de la cellulose I, la cellulose dite « native » retrouvée à l'état naturel dans les matrices environnementales, apparaît sur le diffractogramme de leur analyse DRX au niveau de l'Indice de Miller (110).

Concernant le pic relatif à la cristallinité de la cellulose et exploité pour le calcul de l'Indice de Cristallinité (CrI) au niveau de l'Indice de Miller (200), celui-ci n'est pas visible sur le diffractogramme présenté de la matrice « Myriophylle » et apparaît légèrement sur le diffractogramme de la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique ».

Sur les deux diffractogrammes, de légers pics semblent également se distinguer entre 25° et 30° et peuvent potentiellement être représentatifs de certains arrangements cristallins présents dans les protéines ou provenir d'impuretés minérales dans l'échantillon.

3.2.2. Discussion

Dans le cas de la matrice « Myriophylle », le pic du diffractogramme de l'analyse DRX représentatif de la cristallinité de la cellulose n'a pas pu être identifié. D'après l'analyse de la composition de la matrice, la cellulose représente $16,5 \pm 1,5$ % de la matière organique de la matrice (cf. publication n°1) et $10,7 \pm 0,6$ % de l'intégralité de la matrice (cf. Annexe II). D'après la publication n°2, la teneur minimale en cellulose nécessaire dans une matrice amorphe, même fortement cristalline, est bien supérieure à ces valeurs pour une analyse fiable et un calcul correct de l'Indice de Cristallinité (CrI), avec les paramètres usuels de la méthode DRX employée. Ainsi, il est possible de confirmer que le pic de la cristallinité de la cellulose au niveau de l'Indice de Miller (200) n'est pas détectable par l'analyse DRX d'un échantillon de la matrice « Myriophylle » car sa teneur en cellulose est insuffisante, indépendamment de sa cristallinité.

Concernant la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique », le pic légèrement identifiable sur le diffractogramme de l'analyse DRX permet de calculer un Indice de Cristallinité (CrI) relatif à l'intégralité de la matrice de 5 %. D'après la publication n°2, l'Indice de Cristallinité (CrI) d'une matrice cellulosique doit présenter une valeur minimale calculée de 12 % pour pouvoir être considérée comme fiable. Ainsi, la méthode de détermination de l'Indice de Cristallinité (CrI) développée à partir des paramètres usuels de l'analyse DRX ne peut pas être employée pour déterminer l'Indice de Cristallinité (CrI) de ces deux matrices de façon fiable. En ce sens, il est possible d'affirmer que l'impact de la cellulose sur la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène dans les matrices « Myriophylle » et « Myriophylle-Paroi cellulosique » ne peut pas être directement déduit d'une exploitation du modèle expérimental précédemment établi avec les celluloses natives.

Plusieurs informations supplémentaires peuvent néanmoins être apportées par ces observations sur la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique », en lien avec les résultats présentés dans la publication n°1 et la publication n°2. Tout d'abord, l'analyse de la composition de la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » montre que la cellulose représente $21,7 \pm 2,3$ % de la matière organique de la matrice (cf. publication n°1) et $19,4 \pm 0,2$ % de l'intégralité de la matrice (cf. Annexe II). Cette teneur se rapproche alors de la teneur minimale exigée pour une estimation correcte de l'Indice de Cristallinité (CrI) de celluloses moyennement à fortement cristallines, présentant un Indice de Cristallinité (CrI) compris entre 46 et 62 % (avec respectivement 26,1 et 20,4 % de teneur minimale en cellulose). Dans le cas d'une cellulose à faible cristallinité, avec un Indice de Cristallinité (CrI) avoisinant les 34 %, la teneur minimale de cellulose nécessaire augmente jusqu'à 35,6 % en masse, puis jusqu'à 94,8 % en masse pour les très faibles Indices de Cristallinité (CrI) de cellulose d'environ 13 %.

Pourtant, en dépit d'une teneur en cellulose (env. 20 % en masse) dont la cristallinité serait suffisante dans la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » pour une estimation correcte de son Indice de Cristallinité (CrI), une première identification du pic spécifique d'Indice de Miller (200) a pu être réalisée sur le diffractogramme de l'analyse DRX de la matrice. Pour une telle teneur en cellulose retrouvée dans cette matrice, l'apparition de ce pic lors d'une l'analyse DRX avec les paramètres analytiques employés ne s'observe qu'à partir d'un certain Indice de Cristallinité (CrI) de cellulose, pour une cristallinité considérée comme faible à moyenne. En considérant un critère d'observation de ce pic, l'hypothèse selon laquelle la cellulose constitutive de la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » présente un Indice de Cristallinité (CrI) supérieur à 34 % (faible cristallinité) peut être faite. De même, cette teneur en cellulose dans la matrice est très proche de celle nécessaire pour un calcul correct de l'Indice de Cristallinité (CrI) d'une cellulose fortement à très fortement cristalline. Par conséquent, et pour considérer une large gamme de possibilités, il est possible de supposer que la cellulose de la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » retrouvée également dans la matrice « Myriophylle » présente un Indice de Cristallinité (CrI) estimé entre 34 et 100 %.

En considérant cette hypothèse, il est possible d'employer le modèle expérimental linéaire présenté dans la publication n°2 pour déterminer le paramètre d'échangeabilité ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) de cette cellulose en fonction de son potentiel Indice de Cristallinité (CrI). Enfin, en prenant en compte cette information sur la cellulose et en gardant les paramètres d'échangeabilité théoriques ($\alpha_{modèle}$) des autres constituants, il est possible de calculer le paramètre d'échangeabilité (α_{CrI}) associé à la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » (cf. Eq. II-9).

Selon ces éléments, les contributions potentielles des protéines dans l'établissement du paramètre d'échangeabilité dans la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI) de sa cellulose (cf. Eq. III-2) sont présentées dans le Tableau III-1 ci-dessous :

Tableau III-1 : Détermination des paramètres d'échangeabilité basés sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}) de la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » (B-2) en fonction de l'Indice de Cristallinité (CrI) de la cellulose et application à la détermination du paramètre (α_{prot}) pour les protéines. ⁽¹⁾ résultats obtenus en considérant le paramètre ($\alpha_{modèle}$) des protéines et ⁽²⁾ résultats obtenus en considérant le paramètre (α_{prot}) des protéines.

(α_{iso}) (B-2) (%)	(CrI) cellulose (%)	$(\alpha_{CrI_{cellulose}})$ (%)	$(\alpha_{modèle})$ (autres) ⁽¹⁾ (%)	(α_{CrI}) (B-2) ⁽¹⁾ (%)	(α_{prot}) (%)	$(\alpha_{modèle})$ (autres) ⁽²⁾ (%)	(α) (B-2) ⁽²⁾ (%)
16,1	34	19,4	28,7	26,7	>0	22,4	16,1
	40	18,1		26,4	0,9		
	50	15,9		25,9	2,8		
	60	13,7		25,5	4,8		
	70	11,4		25,0	6,7		
	80	9,2		24,5	8,6		
	90	7,0		24,0	10,5		
	100	4,8		23,5	12,4		

A partir de ces informations, il est possible de remarquer que la cellulose seule ne peut pas engendrer un impact sur l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène suffisant pour expliquer la diminution de l'échangeabilité observé dans la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique ». En revanche, la prise en compte d'un impact supplémentaire provoqué par les protéines permet d'attribuer un paramètre d'échangeabilité (α) en accord avec le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) à la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique ».

En ce sens, la présence de la cellulose et des protéines peut être clairement identifiée comme l'origine de la diminution de la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène observée dans la publication n°1 pour les matrices « Myriophylle » et « Myriophylle-Paroi cellulosique ». Si une quantification exacte de leur impact individuel ne peut pas être clairement établie, il est néanmoins possible d'estimer un paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) attribué à la cellulose compris entre 19,4 et 4,8 % pour un Indice de Cristallinité (CrI) de 34 à 100 %, avec un paramètre d'échangeabilité calculé et attribué aux protéines (α_{prot}) compris entre 0 et 12,4 %.

Ainsi, les protéines semblent jouer un rôle bien plus important que la cellulose dans la diminution de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène dans le cas des matrices « Myriophylle » et « Myriophylle-Paroi cellulosique ».

4. LE PARAMETRE D'ECHANGEABILITE BASE SUR LA DEPROTONATION FACE A L'ECHANGE ISOTOPIQUE

4.1. Résumé de la publication n°3 : « An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive ³H contamination. »

Les substances humiques sont des matrices complexes du sol, formées à partir des processus d'humification et de dégradation de la lignine et de biomolécules provenant de la biomasse végétale en décomposition. La structure moléculaire des substances humiques est représentée par un ensemble d'arrangements complexes, connus pour favoriser les phénomènes de « stockage » du tritium sous forme organique dans les sols.

Bien que la structure et la nature des molécules constitutives des substances humiques ne soient pas bien établies à ce jour, il est admis que les atomes d'hydrogène en positions théoriques échangeables sont représentés par les atomes d'hydrogène impliqués dans les groupements fonctionnels protonés à caractère labile, comme les acides et les alcools. A l'état naturel, ces groupements peuvent être protonés ou déprotonés en fonction des conditions physico-chimiques du sol et leur accessibilité peut varier en fonction des arrangements structuraux de leurs molécules constitutives. Des procédés de titrages sont alors classiquement réalisés afin de déterminer l'acidité totale et la teneur en alcool de ces substances humiques, et permettent ainsi d'accéder au taux de d'atomes d'hydrogène réactifs à une déprotonation chimique retrouvé dans ces composés du sol.

Afin de comparer ces méthodes de détermination classiques du taux de déprotonation de ces groupements à notre méthode d'échange isotopique « voie douce », les procédés classiques de titrages ont été menés sur deux matrices riches en matière humique, « SH-Li » et « SH-Le », dans le but d'accéder à leur paramètre d'échangeabilité basé sur la déprotonation (α_{depro}) respectif.

Dans un second temps, un processus d'échange isotopique par la méthode « voie douce » a été réalisé sur les deux matrices dans le but d'accéder à leur paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) respectif. Les résultats des échanges isotopiques réalisés par la méthode « voie douce » sur ces deux matrices sont disponibles en Annexe IX.

Ces deux matrices ont alors présenté des résultats de capacité d'échange très proches entre-elles et légèrement supérieures à la majorité de matrices environnementales précédemment étudiées dans la littérature et ces travaux. L'écart observé entre les résultats obtenus par échanges isotopiques et par titrages a alors permis de mettre en évidence l'impact des biais analytiques et cinétiques des méthodes de caractérisations classiques de groupements fonctionnels ciblés et la fiabilité de la méthode d'échange isotopique « voie douce » pour la spéciation de l'hydrogène dans les matrices de type sol.

Dans un contexte plus global, les résultats ont permis de mettre en lumière l'existence d'un ensemble d'atomes d'hydrogène labiles négligé par les méthodes classiques de titration, susceptible de jouer un rôle clé dans la complexation des métaux lourds ou polluants radioactifs avec la matière organique du sol.

4.2. Publication n°3 : « An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive ^3H contamination. »

Cette publication est acceptée et publiée dans le journal Environmental Chemistry Letters (Springer).

An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive ^3H contamination

A.-L. Nivesse^{1,2}, A. Thibault de Chanvalon¹, N. Baglan³, G. Montavon¹, G. Granger¹, O. Péron^{1*}

¹SUBATECH, UMR 6457, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes Cedex 3, France

²CEA, DAM, DIF, F-91297 Arpajon, France

³CEA, DIF, DRF, JACOB, IRCM, SREIT, LRT, F-91297 Arpajon, France

*olivier.peron@subatech.in2p3.fr

Environmental Chemistry Letters (Springer) - <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00946-1>

Keywords:

Humic substances
Soils
Isotopic exchanges
Deprotonation
Organically bound tritium

Abstract

Tritium (^3H), the radioactive isotope of hydrogen, is a contaminant occurring in most nuclear liquid releases from nuclear industries. The behavior of tritium in the environment is an ongoing societal concern, notably the storage of tritium in organic compounds in waters, soils and sediments. In particular, the fate of tritium depends on the availability of hydrogen for isotopic exchanges in natural organic matter, especially in lignin-like molecules. Therefore, we studied here H exchangeability using natural lignite and leonardite humic matter samples. We compared results from gas–solid isotopic exchanges (α_{iso}) with those from widely used methods of functional group characterization by means of deprotonation ($\alpha_{depro} = (\alpha_{carboxyl}) + (\alpha_{phenol}) + (\alpha_{alcohol})$). Since standard methods for titrating total acidity and determining protonated carboxyl groups are limited by the unconstrained slow deprotonation of humic material, we have modified methods to maximize exchangeable hydrogen reactivity by extending the reaction time in reagent solutions out to 3 weeks, while total OH groups are investigated by the standard acetylation method for alcohol group determination. Results show that more than two times less hydrogen remains available for deprotonation than for isotopic exchanges with an average of $\alpha_{iso} = 35.9\%$ versus $\alpha_{depro} = 15.5\%$. This finding reveals the existence of a neglected pool of hydrogen likely to play a key role in processes based on hydrogen exchange, such as metal complexation by natural ligands. Results also show the reliability of the isotopic exchange method for hydrogen speciation in soil-type matrices.

1. Introduction

The foreseeable increase in tritium production in upcoming facilities, such as International Thermonuclear Experimental Reactor (ITER) and Evolutionary Power Reactor (EPR), as well as the evolution of fuel management methods, underlines the need to provide more documented answers about tritium speciation and distribution in the environment.

Besides, the importance of hydrogen bound to organic matter has recently been demonstrated by the imbalance of tritium (^3H) in aquatic environments (Hunt et al. 2010; Masson et al. 2005; McCubbin et al. 2001; Williams et al. 2001). Observations of the apparent enrichment of organically bound tritium (OBT) (Kim et al. 2013) compared to water tritium (HTO) mainly originate from the contamination of terrestrial biomass by atmospheric nuclear testing (IAEA), which has recently been transferred to rivers as degraded organic matter (Eyrolle-Boyer et al. 2014; Eyrolle et al. 2018). The organic matter of soils can roughly be described as a mix of cellulose and lignin (Fengel and Wegener 1984; Flaig 1988; Showalter 1993; Stevenson 1982) in proportions that depend on the initial vegetation and of a quality that varies according to its degree of degradation. The prediction of transfer efficiency to aquatic environments can thus be improved through a better description of OBT in cellulose and lignin-type molecules.

Two organically-bound tritium (OBT) pools are typically defined: the exchangeable pool (E-OBT), which equilibrates with the surrounding atmosphere, and the non-exchangeable pool (NE-OBT) that is experimentally inert. It is widely assumed that the E-OBT corresponds to tritium bound to heteroatoms (Kim et al. 2013) that is rapidly exchanged with the surrounding hydrogen isotopes. In contrast, NE-OBT would correspond to tritium covalently bound to carbon atoms, i.e., incorporated into organic matter during molecular genesis, and only be released during its degradation (Mann 1971). This paradigm has been questioned, however, since many studies (Baumgartner and Donhaerl 2004; Péron et al. 2018; Sepall and Mason 1961) point out a major limitation in E-OBT accessibility due to molecular conformation, which slows hydrogen exchanges and ultimately leads to an overestimation of the non-exchangeable hydrogen pool. This pool of tritium, previously referred to as “buried tritium” (Baumgartner and Donhaerl 2004), is experiment-dependent and should be more appropriately named.

The specific accessibility of OBT for isotopic exchanges is a well-known property of hydrogen and used to investigate protein (Engen and Wales 2015; Marcsisin and Engen 2010) or cellulose (Frilette et al. 1948; Lindh and Salmén 2017; Péron et al. 2018; Reishofer and Spirk 2015) conformation. However, its utility at the global scale as a supplementary stock of tritium in the environment has never been investigated and, moreover, is now required in order to extend research efforts to other relevant, yet overlooked, environmental matrices. A major gap in this work has started to be filled through an understanding of OBT speciation in lignin-based molecules, such as humic substances. The approach adopted here is to compare the proportion of exchangeable hydrogen (α) from two different sources (Fig. 1): (1) based on chemical deprotonating measurements (α_{depro}) and (2) based on gas–solid isotopic exchange measurements (α_{iso}).

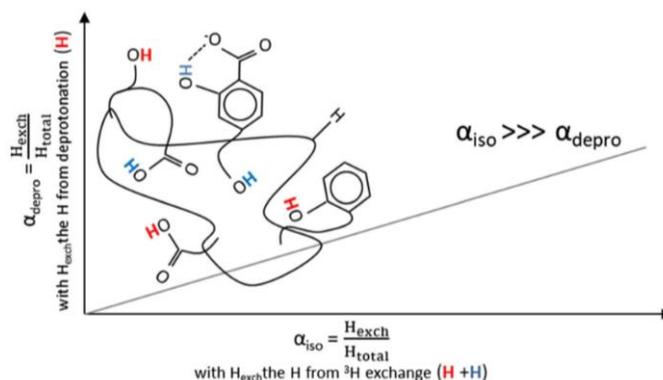


Fig. 1: Schematic representation of a molecule with accessible hydrogens (in red) by both deprotonation and isotopic exchange and accessible hydrogens (in blue) by sole isotopic exchange. Note that $(\alpha_{iso}) \gg (\alpha_{depro})$.

2. Materials and methods

2.1 Samples and sample characterizations

Let's begin by noting that our interest here lies in characterizing the exchangeable fraction of hydrogen on the raw material, i.e., the matter with impurities and protons already exchanged, given the pH of the environmental conditions. Two samples rich in terrestrial humic substances (HS) were used, one extracted from lignite provided by Aladdin BioChem Technology Co. Ltd., referred to as humic substanceLi (HS-Li), the other extracted from leonardite provided by New Alliance Dye Chem Pvt. Ltd., referred to as humic substance-Le (HS-Le). The compositions of the raw samples are listed in Table 1. Lignite is a sedimentary rock originating from the degradation of lignin and may evolve into leonardite shale clay by oxidation. CHNS analyses were performed on an elemental analyzer (FlashEA 1112, ThermoFisher), and the contents (% weight) of humin, humic and fulvic matter were all determined semiquantitatively in accordance with the International Humic Substances Society (IHSS) recommendation (Lamar et al. 2014). More specifically, the humic and fulvic fractions were first solubilized from the humin fraction in a basic medium (0.1 M NaOH for 16 h); next, the humic fraction was precipitated under acidic conditions (1 M HCl for 12 h), and lastly, the fulvic fraction was purified on a resin column (DAX-8 Supelite) eluted with 0.1 M NaOH. All solid fractions were recovered by centrifugation and then freeze-dried and weighed. The organic matter content was determined by calcination at 700 °C in a tubular furnace (Eraly, France) for 1 h with subtraction of the mass of residual ash from the initial mass of HS-Li and HS-Le.

2.2 Hydrogen speciation (α_{depro}): deprotonation

The fraction of hydrogen assumed to be available for isotopic exchanges corresponds to the hydrogen bound to heteroatoms (Kim et al. 2013). In natural humic matter, most of this hydrogen is bound to an oxygen atom in one of the three groups, i.e., carboxyl (pKa ~ 4.8), phenol (pKa ~ 10) or alcohol (pKa > 16), whose sum would correspond to the quantity of hydrogen available for deprotonation (α_{depro}).

In our raw samples, the actual degree of protonation of these functional groups of interest was determined by standard methods for analyzing soils and humic matter, as widely described in the literature (Eyheraguibel 2004; Gossard 2001; Malm et al. 1942; Marks and Morrell 1931; Ogg et al. 1945; Peterson and West 1927; Schnitzer and Gupta 1965; Schnitzer and Skinner 1964; West et al. 1934). First, the total acidity (carboxyl and phenol groups) was measured from either direct or indirect titration. Put succinctly, 500 mg of samples were conditioned under an argon atmosphere in 50 mL of water (Milli-Q, 18.2 M Ω cm) for direct titration and in 100 mL of 0.4 N Ba(OH)₂ solution for indirect titration. In the latter case, a contact time of 24 h was respected, and an extra 3-week contact time experiment was studied to ensure that the steady state had been reached (pH stability controlled for 24 h), followed by filtration prior to titration of the filtrate with standard 0.2 N HCl against a blank down to pH 8.4. For direct titration, the water-sample solution was titrated with standards 10⁻³ N to 1 N NaOH for 2 h against a blank down to pH 11–12; the steady state was considered reached once pH had stabilized for 180 s. Second, the protonated phenol group content was calculated from the difference between total acidity and protonated carboxyl group content, which was measured with a similar indirect titration process while using 100 mL of a 0.4 N Ca(OAc)₂ solution as a reagent and standard 0.2 N

	Elemental composition (%) (SD = ± 0.4 and LD = ± 0.06)				Organic matter content % (SD = ± 1)	Semi quantitative humic composition (SD = ± 10)		
	C	H	N	S		Humin (%)	Humic (%)	Fulvic (%)
HS-Li	43.25	3.03	1.05	< LD	61	40	60	0
HS-Le	42.26	2.60	0.83	< LD	63	50	50	0

Table 1: Elemental composition (C,H,N,S) and fractions of humin, humic and fulvic matter of both HS-Li and HS-Le samples (results are given in % by weight). LD = limit of detection. SD = standard deviation.

NaOH for titration against a blank down to pH 9.8. Lastly, the protonated alcohol group content was determined by the difference between the total OH group content and the protonated phenol group content, with the total OH group content being determined by acetylation. Thus, 100 mg of samples were reacting with 3 mL of acetic anhydride–pyridine solution (1 to 3), exposed to 45 min of steam bath heating; the reaction was then halted by adding 5 mL of deionized water and 10 mL of n-butanol. Titration of the acetic acid formed was carried out with standard 0.5 N NaOH against a blank of acetic anhydride–pyridine reagent solution and a blank of the sample in pyridine solely for residual free acid contribution deduction, down to pH 9.8. Once again, the steady state was considered reached once pH had stabilized for 180 s.

2.3 Hydrogen speciation (α_{iso}) : isotopic exchanges

The (α_{iso}) parameter describes the exchangeable hydrogen pool versus total hydrogen atoms and moreover may quantify the distribution of exchangeable/non-exchangeable OBT (Feng et al. 1993). (α_{iso}) is investigated by means of gas–solid isotopic exchanges, as described by (Péron et al. 2018) (Fig. 2). In this aim, a vapor phase has been produced from a bath containing saturated KCl solutions with known tritium activities, for equilibration with the atmosphere contained in a glove box (RH = 85.11 ± 0.89% at T = 20 °C, Plas-Labs 890THC) (see Péron et al. 2018 for further details). For each soil sample, three enrichment experiments were conducted with very low-level tritium samples (OBT < 0.2 Bq.L⁻¹ of combustion water) and tritium-rich baths (HTO = 120, 300 and 500 Bq.L⁻¹). Two depletion experiments were performed using freeze-dried tritium-rich samples (previously equilibrated with baths at 120 and 500 Bq.L⁻¹) and a low-level tritium bath (HTO < 0.2 Bq.L⁻¹). The samples were recovered from the confined glove box at days 2, 3 and 4 for the enrichment experiments and at days 7 and 10 for the depletion experiments. At each steady state, a mean value of the combustion water from each humic substance sample (OBT level) was obtained by averaging the sample values forming the plateau. A mean value of each saline solution was also obtained by averaging the three bath aliquot values once equilibrium had been reached. The desaturation of hydrogen sites with 3H on the matrix molecules and the depletion of tritium in saline solutions were both verified.

The tritium activities of the bath aliquots ($\frac{T}{H}$)_{l, bath} and combustion water of samples ($\frac{T}{H}$)_{s, OBT} were distilled and measured by liquid scintillation counting (PerkinElmer Tri-carb 3170 TR/SL) using an Ultima Gold LLT cocktail. The limit of detection was estimated at 3 Bq.L⁻¹ for a counting time of 180 min and a blank value of 2 counts per minute. The relative uncertainty was calculated based on a calibration step according to the quench curve and systematic uncertainties; this uncertainty typically reached 10%.

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{s,OBT} = \alpha_{iso} \times \left(\frac{T}{H}\right)_{s,E-OBT} + (1 - \alpha_{iso}) \times \left(\frac{T}{H}\right)_{s,NE-OBT} \quad (1)$$

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{l,bath} = \left(\frac{T}{H}\right)_{g,vapor} = \left(\frac{T}{H}\right)_{l,cond} = \left(\frac{T}{H}\right)_{s,E-OBT} \quad (2)$$

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{s,OBT} = \alpha_{iso} \times \left(\frac{T}{H}\right)_{l,bath} + (1 - \alpha_{iso}) \times \left(\frac{T}{H}\right)_{s,NE-OBT} \quad (3)$$

Fig. 2: Distribution of exchangeable/non-exchangeable OBT according to Eq.(1) where: $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,NE-OBT}$ = the T/H ratio between non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT) and non-exchangeable organically bound hydrogen, $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,E-OBT}$ = the T/H ratio between exchangeable organically bound tritium (E-OBT) and exchangeable organically bound hydrogen and $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,OBT}$ = the T/H ratio between organically bound tritium (OBT) and organically bound hydrogen. Gas-solid isotopic exchanges are based on the isotopic equilibrium between a bath of KCl-saturated solution $\left(\frac{T}{H}\right)_{l,bath}$, a vapor phase confined in a glove box $\left(\frac{T}{H}\right)_{g,vapor}$, the water condensed at the sample surface $\left(\frac{T}{H}\right)_{l,cond}$ and the exchangeable organically bound tritium of the sample $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,E-OBT}$, all of which can be synthesized into Eq.(2). By inserting Eq.(2) into Eq.(1), Eq.(3) is obtained with (α_{iso}) being the slope of the plot of $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,OBT}$ versus $\left(\frac{T}{H}\right)_{l,bath}$. To determine (α_{iso}) and $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,NE-OBT}$, it is thus required to measure $\left(\frac{T}{H}\right)_{s,OBT}$ and $\left(\frac{T}{H}\right)_{l,bath}$ at different tritium activity concentrations.

3. Results and discussion

3.1 Sample characterization

The characterizations of HS-Li and HS-Le samples are displayed in Table 1 (see Sect. 2.1). The humin fraction, defined as the insoluble part at any pH of humic matter, is known to also contain significant impurities (Fleury 2019; Ndira 2006; Som 2002). The high humin portion (approx. 40%) is consistent with the organic matter (OM) content of our samples (approx. 60%, Table 1), indicating that 40% of the HS-Li and HS-Le samples is composed of minerals. No fulvic fraction was quantified, and the amine and sulfur group contributions, based on CHNS measurements, appear to be negligible.

3.2 Hydrogen speciation (α_{depro}): deprotonation

Detailed results of the deprotonation experiments are shown in Table 2. The total acidity (carboxyl and phenol groups) contribution to the (α_{depro}) parameter of HS-Li and HS-Le is estimated at $0.52 \pm 0.03\%$ and $0.35 \pm 0.06\%$, respectively, by direct titration and at $0.97 \pm 0.89\%$ and $0.92 \pm 0.32\%$ by the standard indirect titration method. In contrast, the total acidity obtained by the additional 3 weeks of reaction time experiment, as per the indirect titration method, yielded a proportion of α_{depro} parameter equal to $14.3 \pm 2.0\%$ for HS-Li and $14.5 \pm 1.3\%$ for HS-Le.

This disparity may in theory be attributed to the associated flaws, as previously reported on the direct titration method (Borggaard 1974; Davis and Mott 1981; Paxéus and Wedborg 1985; Sposito et al. 1977) and highlights the effects of latent reactions and gradual proton releases on both the direct and indirect standard methods of total acidity determination. Therefore, the sharp increase in exchanged protons observed after an additional contact time of 3 weeks demonstrates the slow reactivity of these protons in soils organic matter and so the partial efficiency of the standard methods for determining the total acidity of a soil. The values obtained with the method introducing 3 weeks of reaction time were thus selected for the comparative study. From the theoretical models of humic substances widely cited in the literature (Andreux and Munier-Lamy 1994; Richard 2002; Schulten and Schnitzer 1992; Stevenson 1982), these total acidity values that appear to be low yet remain within the range and are justified by the fact that carboxylic groups are mainly deprotonated at environmental pH values in soils.

The poor contribution of carboxyl groups to the (α_{depro}) parameter has been confirmed by the weak content in carboxylic groups determined by the standard and the 3-week reactions time indirect titration methods. The values were consistent; hence, only the latter with the lowest uncertainty was considered.

		Method	SH-Li	SH-Le
Deprotonation	$\alpha_{total\ acidity}$	Direct titration – H ₂ O*	$0.52 \pm 0.03 \%$	$0.35 \pm 0.06 \%$
		Indirect titration (24h) – Ba(OH) ₂ *	$0.97 \pm 0.89 \%$	$0.92 \pm 0.32 \%$
		Indirect titration (3 weeks) – Ba(OH) ₂	$14.3 \pm 2.0 \%$	$14.5 \pm 1.3 \%$
	$\alpha_{carboxyl}$	Indirect titration (24h) – Ca(OAc) ₂ *	$0.12 \pm 0.25 \%$	$0.49 \pm 0.017 \%$
		Indirect titration (3 weeks) – Ca(OAc) ₂	$0.14 \pm 0.07 \%$	$0.56 \pm 0.03 \%$
	α_{phenol}	Calculated as $\alpha_{total\ acidity} - \alpha_{carboxyl}$	$14 \pm 8 \%$	$13.9 \pm 1.4 \%$
	$\alpha_{total\ OH}$	Indirect titration – Acetylation	$15 \pm 7 \%$	$15 \pm 6 \%$
	$\alpha_{alcohol}$	Calculated as $\alpha_{total\ OH} - \alpha_{phenol}$	$0.9 \pm 0.7 \%$	$1.5 \pm 0.6 \%$
		Calculated as $\alpha_{carboxyl} + \alpha_{phenol} + \alpha_{alcohol}$	$15 \pm 11 \%$	$16 \pm 7 \%$
	Isotopic exchange	α_{iso}	Isotopic exchange	$36.8 \pm 3.5 \%$

Table 2: Details on the associated exchangeable parameter α by means of deprotonation and isotopic exchange. Note the measured (α_{iso}) parameters are more than two times greater than (α_{depro}) with $36.8 \pm 3.5\%$ versus $15 \pm 11\%$ and $35.0 \pm 1.3\%$ versus $16 \pm 07\%$ for HS-Li and HS-Le, respectively.

Nevertheless, the cross-linking effect of Ca^{2+} , whereby the divalent cation restricts access to non-exchanged sites by neutralizing carboxyl groups from different molecular strands as well as from different regions, has been reported as a common drawback of the standard acetate calcium method (Clapp et al. 1993; Sierra 2004). Therefore, the protonated carboxyl group determination has possibly resulted in an underestimation. Based on the selected results, the calculated phenol group contribution can be estimated at $14 \pm 8\%$ and $13.9 \pm 1.4\%$ for HS-Li and HS-Le, respectively. The reactivity of mineral hydroxyl groups during the total acidity determination must then be considered as a potential bias for this given calculation of protonated phenol groups. At this stage, let's add to the above total acidity values those OH group contributions that had not been titrated. The standard total OH group determination results are close to the considered total acidity results, thus leading to a very small calculated amount of protonated alcohol groups of: $0.9 \pm 0.7\%$ and $1.5 \pm 0.6\%$ for HS-Li and HS-Le, respectively. Still, these values depend on the aforementioned phenol determination issues and high associated uncertainties, mainly caused by experimental difficulties during the titration step of the standard total OH determination, generated by the residual protonated carboxyl and mineral hydroxyl groups. The final calculated α_{depro} parameters are then considered at a value of $15 \pm 11\%$ and $16 \pm 7\%$ for HS-Li and HS-Le, respectively, though this value is subject to ambiguities in certain definitions.

3.3 Hydrogen speciation (α_{iso}) : isotopic exchanges

For the study on gas–solid isotopic exchanges, accurate values of the (α_{iso}) parameter of 36.8 and 35.0 (SD = 3.5% and 1.3%, $R^2 = 0.993$ and 0.999, respectively) are obtained for HS-Li and HS-Le, respectively (Fig. 3). The measured (α_{iso}) parameters are more than two times greater than (α_{depro}) which indicates that a large number of functional groups with acidic and alcoholic functions are participating in the isotopic exchanges yet are inhibited for chemical deprotonation even after a 3-week reaction time. Hydration in solution and the likely partial dissolution of the samples during (α_{depro}) measurements are negligible since the effects would have increased the exchangeable pool of hydrogen and ultimately acted oppositely to the observations.

Overall, the major differences observed between (α_{iso}) and (α_{depro}) suggest unambiguously the existence of a natural stock pool of hydrogen insensitive to the standard methods of hydrogen deprotonation; moreover, this pool could play a key role in processes based on hydrogen exchanges like metal complexation. Such a hydrogen stock pool could correspond to the latent versus titrable definition of acid groups in humic matter proposed by (Ritchie and Perdue 2008) based on kinetic considerations, though keeping in mind that isotopic measurements comprise the sum of all latent groups, including those reacting too slowly to be estimated from kinetic measurements. The gas–solid isotopic exchange offers the advantage of not impairing the structure and molecular conformation and allows obtaining the most representative information regarding exchangeable hydrogen accessibility on a matrix in its environmental state. The behavior of HS-Li and HS-Le during gas–solid isotopic exchanges indicates the extent of the analytical bias induced by current deprotonation methods and underscores the limitations of these standard characterization methods, which are also hampered by up to ten times greater uncertainty.

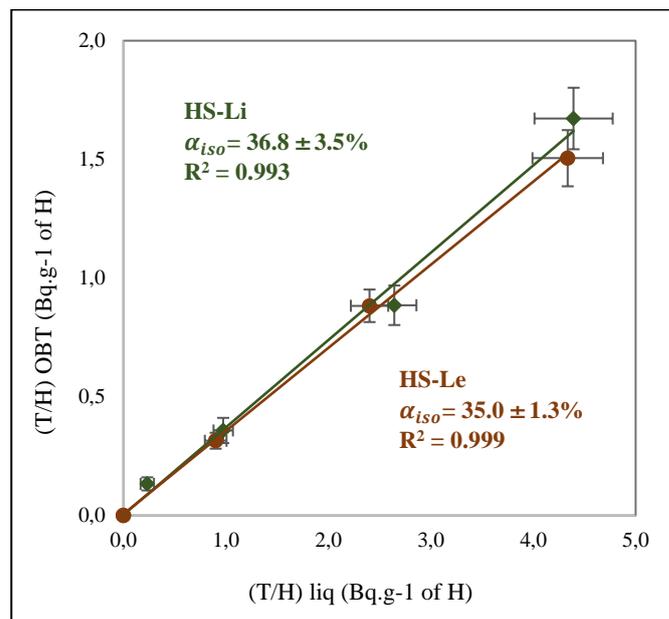


Fig. 3: (T/H) of HS-Li and HS-Le at the steady state after freeze-drying versus measured set (T/H) of saline solutions with the associated exchangeable hydrogen pool (α_{iso}) parameter. Note the accurate values of the (α_{iso}) parameter of 36.8 and 35.0 (SD = 3.5% and 1.3%, $R^2 = 0.993$ and 0.999, respectively) are obtained for HS-Li and HS-Le, respectively. SD = standard deviation.

3.4 Implications

This is an innovative methodology with a strong potential, which allows to determine the fraction of exchangeable hydrogen in solid humic matter as well as in organic matter following environmental conditions. The global impact is in providing a more direct access to quantitative tritium speciation with strong potential for practical applications. The determination of the exchangeable fraction of hydrogen in the matrices of interest aims to enhance the secure knowledge of tritium transfer mechanisms in the environment. These findings highlight not only the reliability of the isotopic exchange method for hydrogen speciation in soil type matrices, but also the existence of a neglected pool of hydrogen likely to play a key role in processes based on hydrogen exchange. These phenomena such as metal complexation, pesticides or plant nutrient precursor sequestration and progressive releases by natural ligands are part of today's main concerns in the field of soils interactions comprehension (Lichtfouse et al. 1998; Zhu et al. 2019; Zolfaghari et al. 2017). The significance of this information also involved applications to further development of theoretical models and quantitative interpretations of tritium speciation and incorporation in the environment for nuclear safety predictive studies accuracy.

4. Conclusion

Our work has highlighted not only the reliability and pertinence of the isotopic exchange method for OBT speciation in natural organic matter and soils, but also its relevance as a potential complement to the procedure of evaluating hydrogen site reactivity applied to metal binding properties. We demonstrate that the isotopic exchangeable hydrogen pool is more than two times greater than values derived by means of classical chemical deprotonation, with up to ten times lower uncertainties and more relevance for predictability purposes.

Acknowledgements

This work was financed by CEA and Subatech, by France's Pays de la Loire Regional Council (under the POLLUSOLSOSUNA Project) and by EDF.

References

- Andreux F, Munier-Lamy C (1994) Genèse et propriétés des molécules humiques. In: Bonneau M, Souchier B (eds) *Pédologie 2: constituants et propriétés du sol*. Editions Masson, Paris
- Baumgartner F, Donhaerl W (2004) Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature. *Anal Bioanal Chem* 379(2):204–209. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2520-6>
- Borggaard OK (1974) Experimental conditions concerning potentiometric titration of humic acid. *J Soil Sci* 25(2):189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1974.tb01115.x>
- Clapp CE, Hayes MHB, Swift RS (1993) Isolation, fractionation, functionalities, and concepts of structures of soil organic macromolecules. In: Beck AJ et al (eds) *Organic substances in Soil and Water: natural constituents and their influences on contaminant behaviour*. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Davis H, Mott CJB (1981) Titrations of fulvic acid fractions I: interactions influencing the dissociation/reprotonation equilibria. *J Soil Sci* 32(3):379–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1981.tb01713.x>
- Engen JR, Wales TE (2015) Analytical aspects of hydrogen exchange mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem* 8(1):127–148. <https://doi.org/10.1146/annurev-anal-062011-143113>
- Eyheraguibel B (2004) Caractérisation des substances humiques biomimétiques—effets sur les végétaux. Ph.D. Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse
- Eyrolle F, Ducros L, Le Dizès S, Beaugelin-Seiller K, Charmasson S, Boyer P, Cossonnet C (2018) An updated review on tritium in the environment. *J Environ Radioact* 181:128–137. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2017.11.001>
- Eyrolle-Boyer F, Boyer P, Claval D, Charmasson S, Cossonnet C (2014) Apparent enrichment of organically bound tritium in rivers explained by the heritage of our past. *J Environ Radioact* 136:162–168. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2014.05.019>
- Feng X, Krishnamurthy RV, Epstein S (1993) Determination of DH ratios of nonexchangeable hydrogen in cellulose: a method based on the cellulose–water exchange reaction. *Geochim Cosmochim Acta* 57(17):4249–4256. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(93\)90320-V](https://doi.org/10.1016/0016-7037(93)90320-V)
- Fengel D, Wegener G (1984) *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*, vol 1. Walter de Gruyter, Berlin
- Flaig W (1988) Generation of model chemical precursors. In: Frimmel FH, Christman RF (eds) *Humic substances and their role in the environment*, vol 16. Wiley, New York
- Fleury G (2019) Identification des molécules des acides fulviques impliquées dans la sorption des métaux lourds dans les sols. Ph.D. Thesis, Université de Strasbourg: Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien—UMR CNRS 7178
- Frilette VJ, Hanle J, Mark H (1948) Rate of exchange of cellulose with heavy water. *J Am Chem Soc* 70(3):1107–1113
- Gossard P (2001) Contribution à l'étude des interactions de la matière organique des sols avec les métaux lourds: Etude structurale et analytique de molécules modèles. Ph.D. Thesis, Université des Sciences et Technologies de Lille
- Hunt GJ, Bailey TA, Jenkinson SB, Leonard KS (2010) Enhancement of tritium concentrations on uptake by marine biota: experience from UK coastal waters. *J Radiol Prot* 30(1):73–83. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/30/1/N01>
- IAEA-GNIP-database. Global network of isotopes in precipitations. http://www-naweb.iaea.org/naweb/ih/IHS_resouces_gnip.html

- Kim SB, Baglan N, Davis PA (2013) Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *J Environ Radioact* 126:83–91. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.07.011>
- Lamar RT, Olk DC, Mayhew L, Bloom PRA (2014) New standardized method for quantification of humic and fulvic acids in humic ores and commercial products. *J AOAC Int* 97(3):721–730. <https://doi.org/10.5740/jaoac.int.13-393>
- Lichtfouse E, Wehrung P, Albrecht P (1998) Plant wax n-alkanes trapped in soil humin by non-covalent bonds. *Die Naturwissenschaften* 85(9):449–452. <https://doi.org/10.1007/s001140050529>
- Lindh EL, Salmén L (2017) Surface accessibility of cellulose fibrils studied by hydrogen–deuterium exchange with water. *Cellulose* 24(1):21–33. <https://doi.org/10.1007/s10570-016-1122-8>
- Malm C, Nadeau G, Genung L (1942) Analysis of cellulose derivatives. Analysis of cellulose mixed esters by the partition method. *Ind Eng Chem Anal Ed* 14(4):292–297. <https://doi.org/10.1021/i560104a004>
- Mann J (1971) Deuteration and Tritiation. *Cellul Cellul Deriv* 5(4):89
- Marcisin SR, Engen JR (2010) Hydrogen exchange mass spectrometry: what is it and what can it tell us? *Anal Bioanal Chem* 397(3):967–972. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3556-4>
- Marks L, Morrell RS (1931) Determination of the carbonyl and aldehyde content of organic compounds: estimation of phenylhydrazine. *Analyst* 56(665):508. <https://doi.org/10.1039/an9315600508>
- Masson M, Siclet F, Fournier M, Gontier G, Bailly du Bois P, Fournier M, Maigret A, Gontier G, Bois PB (2005) Tritium along the French Coast of the English Channel. *Radioprotection* 40(S1):S621–S627. <https://doi.org/10.1051/radiopro:2005s1-091>
- McCubbin D, Leonard KS, Bailey TA, Williams J, Tossell P (2001) Incorporation of organic tritium (³H) by marine organisms and sediment in the Severn Estuary/Bristol channel (UK). *Mar Pollut Bull* 42(10):852–863. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00039-X)
- Ndira V (2006) Substances humiques du sol et du compost analyse elementaire et groupements atomiques fictifs : vers une approche thermodynamique. Ph.D. Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse
- Ogg CL, Porter WL, Willits CO (1945) Determining the hydroxyl content of certain organic compounds. *Macro-and Semimicromethods. Ind Eng Chem Anal Ed* 17(6):394–397. <https://doi.org/10.1021/i560142a018>
- Paxéus N, Wedborg M (1985) Acid-base properties of aquatic fulvic acid. *Anal Chim Acta* 169:87–98. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)86210-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)86210-8)
- Péron O, Fourré E, Pastor L, Gégout C, Reeves B, Lethi HH, Rousseau G, Baglan N, Landesman C, Siclet F, Montavon G (2018) Towards speciation of organically bound tritium and deuterium: quantification of non-exchangeable forms in carbohydrate molecules. *Chemosphere* 196:120–128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.136>
- Peterson VL, West ES (1927) The volumetric estimation of hydroxyl groups in sugars and other organic compounds. *J Biol Chem* 74(1):379–383
- Reishofer D, Spirk S (2015) Deuterium and cellulose: a comprehensive review. In: Rojas OJ (ed) *Cellulose chemistry and properties: fibers, nanocelluloses and advanced materials*, vol 271. Springer, Cham, pp 93–114. https://doi.org/10.1007/12_2015_321
- Richard JF (2002) Caractérisation de substances humiques like-comparison avec des substances humiques naturelles. Ph.D. Thesis., Institut National Polytechnique de Toulouse
- Ritchie JD, Perdue EM (2008) Analytical constraints on acidic functional groups in humic substances. *Org Geochem* 39(6):783–799. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.03.003>
- Schnitzer M, Gupta UC (1965) Determination of acidity in soil organic matter 1. *Soil Sci Soc Am J* 29(3):274. <https://doi.org/10.2136/sssaj1965.03615995002900030016x>
- Schnitzer M, Skinner IM (1964) Organo-metallic interactions in soils: 4. Carboxyl and hydroxyl groups in organic matter and metal retention. *Soil Sci* 99(4):278–284
- Schulten HR, Schnitzer M (1992) Structural studies on soil humic acids by curie-point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Soil Sci* 153(3):29–30
- Sepall O, Mason SG (1961) Hydrogen exchange between cellulose and water: II. Interconversion of accessible and inaccessible regions. *Can J Chem* 39(10):1944–1955. <https://doi.org/10.1139/v61-261>
- Showalter M (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Am Soc Plant Physiol* 5(1):9–23
- Sierra M (2004) Influence of amide linkages on acidity determinations of humic substances testing with model-mixtures. *Talanta* 62(4):687–693. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2003.09.021>
- Som M-P (2002) Étude moléculaire des composés organiques de compostformation, transformation dans les solsaction sur les propriétés des sols. 263
- Sposito G, Holtzclaw KM, Keech DA (1977) Proton binding in fulvic acid extracted from sewage sludge-soil mixtures 1. *Soil Sci Soc Am J* 41(6):1119. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100060021x>
- Stevenson FJ (1982) *Humus chemistry, genesis, composition, reactions*, vol 2. Wiley, New York
- West ES, Hoagland CL, Curtis GH (1934) An improved method for the determination of acetyl values of lipids applicable to hydroxylated fatty acids. *J Biol Chem* 104(1):627–634
- Williams JL, Russ RM, McCubbin D, Knowles JF (2001) An overview of tritium behaviour in the Severn Estuary (UK). *J Radiol Prot* 21(4):337–344. <https://doi.org/10.1088/0952-4746/21/4/301>
- Zhu J, Fu Q, Qiu G, Liu Y, Hu H, Huang Q, Violante A (2019) Influence of low molecular weight anionic ligands on the sorption of heavy metals by soil constituents: a review. *Environ Chem Lett* 17(3):1–10. <https://doi.org/10.1007/s10311019008811>
- Zolfaghari M, Drogui P, Brar SK, Buelna G, Dubé R (2017) Unwanted metals and hydrophobic contaminants in bioreactor effluents are associated with the presence of humic substances. *Environ Chem Lett* 15(3):489–494. <https://doi.org/10.1007/s1031101605987>

5. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons pu apporter des éléments de réponse aux différents questionnements soulevés par la problématique « spéciation ».

Pour chaque matrice environnementale, une étude comparative entre le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) et les différents paramètres obtenus sur la base de diverses natures proposées de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène a permis d'accéder à des informations cruciales sur la spéciation du tritium organiquement lié.

Dans le cas de matrices présentant un constituant majoritaire dont la structure supramoléculaire est supposée simple et non ramifiée, comme le grain de blé avec son amidon, la nature de la fraction échangeable proposée par la vision analytique (i.e. basée sur le type de liaison chimique) a été démontrée suffisante pour décrire la spéciation du TOL au sein de ce type de matrice. Inversement, cette définition a été jugée insuffisante pour des matrices présentant des constituants dont les arrangements structuraux sont plus complexes, comme le *Myriophyllum Spicatum* avec sa cellulose et ses protéines, ainsi que la pomme avec ses associations de glucides simples. Dans ce cas, la présence de la forme tritium enfoui a été mise en lumière et sa teneur retrouvée dans une matrice environnementale a été directement corrélée avec le niveau de complexité structurale des molécules constitutives de la matrice. Ainsi, le rôle clé du constituant majoritaire a été clairement identifié pour expliquer les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées dans une matrice environnementale. Ces spécificités de diminution de l'échangeabilité propres à certaines structures moléculaires ont par la suite pu être détectées comme sources d'influence sur la distribution de la forme non-échangeable du TOL entre les différents constituants d'une même matrice environnementale.

Afin de comprendre plus spécifiquement le rôle de la cellulose et de sa cristallinité dans l'établissement du paramètre d'échangeabilité dans une matrice environnementale cellulosique, un modèle expérimental linéaire a été construit pour définir le paramètre d'échangeabilité d'une série de cellulose native en fonction de leur Indice de Cristallinité (CrI). Une étude des limites d'application du modèle a par la suite permis d'établir une teneur de cellulose minimale requise dans une matrice environnementale en fonction de sa cristallinité. Ainsi, une valeur minimale d'Indice de Cristallinité (CrI) de 12 % est requise dans un échantillon analysé pour être considérée comme fiable après une analyse DRX avec les paramètres analytiques usuels employés. Le modèle linéaire peut alors être exploité et fournir des informations relatives au paramètre (α_{CrI}) d'une matrice lorsque sa teneur en cellulose cristalline est suffisante pour obtenir un Indice de Cristallinité (CrI) au-delà de cette valeur limite.

Le *Myriophyllum Spicatum* et sa paroi cellulosique extraite ne remplissant pas ces conditions, il n'a pas été possible d'appliquer directement le modèle linéaire sur ces matrices environnementales. Néanmoins, il a été possible d'estimer un Indice de Cristallinité (CrI) de leur cellulose constitutive aux alentours des 34 à 100 % et d'apprécier ainsi son impact potentiel sur le paramètre d'échangeabilité de l'atome d'hydrogène dans la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique ». A la lumière de ces informations, l'impact propre aux protéines a pu être déduit de l'impact attribué à la molécule de cellulose par rapport à son Indice de Cristallinité (CrI). Pour un paramètre d'échangeabilité de la cellulose estimé entre 19,4 et 4,8 %, le paramètre d'échangeabilité à attribuer aux protéines doit alors se situer entre 0 et 12,4 % pour expliquer le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) observé dans la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique ». Ainsi, il a été démontré que les protéines engendrent un impact bien plus important que la cellulose sur la diminution de l'échangeabilité des atomes d'hydrogène dans le cas des matrices « Myriophylle » et « Myriophylle-Paroi cellulosique ».

Cette spéciation du tritium organiquement lié a également été explorée à travers deux matrices riches en substances humiques, reconnues comme zones de stockage et de rétention du tritium organique dans les compartiments du sol. Ces matrices ont alors présenté des paramètres d'échangeabilité isotopique légèrement supérieurs à la majorité de matrices environnementales précédemment étudiées, montrant un taux plus faible de capacité d'accueil du TOL sous sa forme non-échangeable. Pour évaluer la pertinence de la méthode d'échange isotopique « voie douce » sur ce type de matrice, une étude comparative avec des méthodes de titrage usuelles a permis de mettre en évidence l'impact des biais analytiques et cinétiques des méthodes de caractérisations classiques de groupements fonctionnels ciblés. Ainsi, la fiabilité de la méthode d'échange isotopique « voie douce » a été confirmée pour la spéciation de l'hydrogène dans les matrices de type sol.

Chapitre 4

La quantification du TOL-NE dans les matrices environnementales

Table des matières

1.INTRODUCTION	168
2.ETUDE COMPARATIVE DES METHODES D'ECHANGE ISOTOPIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE LA FRACTION TOL-NE DANS UN ECHANTILLON	169
2.1.RESUME DE LA PUBLICATION N°4 : « NON-INTRUSIVE AND RELIABLE SPECIATION OF ORGANICALLY BOUND TRITIUM IN ENVIRONMENTAL MATRICES. »	169
2.2.PUBLICATION N°4 : « NON-INTRUSIVE AND RELIABLE SPECIATION OF ORGANICALLY BOUND TRITIUM IN ENVIRONMENTAL MATRICES. »	172
3.CONCLUSION	185

1. INTRODUCTION

Ce chapitre présente les résultats relatifs à la problématique « analytique » proposée dans ces présents travaux.

Les mesures du tritium dans les échantillons environnementaux solides comportent aujourd'hui des méthodes maîtrisées pour les mesures du tritium dans l'eau libre (TED) et du tritium organiquement lié (TOL), tandis que l'analyse des fractions TOL-E et TOL-NE est toujours soumise à certaines difficultés. Afin de valider une méthode de mesure fiable des différentes formes de TOL, une étude comparative de deux méthodes d'échange isotopique « voie dure » et « voie douce » a alors été menée et leur pertinence pour la quantification de la fraction TOL-NE a été évaluée.

Pour répondre aux questionnements précédemment soulevés, les résultats de cette étude comparative sont présentés sous la forme d'une publication.

2. ETUDE COMPARATIVE DES METHODES D'ECHANGE ISOTOPIQUE POUR LA QUANTIFICATION DE LA FRACTION TOL-NE DANS UN ECHANTILLON

2.1. Résumé de la publication n°4 : « Non-intrusive and reliable speciation of organically bound tritium in environmental matrices. »

La validation d'une méthode de mesure des différentes formes de TOL trouve un intérêt important dans le cadre des études rétrospectives des rejets mais également pour améliorer la compréhension de la distribution du tritium dans l'environnement. Ainsi, la fiabilité des méthodes d'échange isotopique actuelles pour la quantification des différentes formes du TOL a été évaluée à partir d'une étude comparative sur un ensemble de matrices environnementales de la biomasse végétale. Un processus d'appauvrissement isotopique a alors été réalisé sur chaque matrice d'étude par la méthode « voie dure » ainsi que par la méthode « voie douce », et les résultats sur la quantification de la fraction TOL-NE restante dans l'échantillon après échange ont été comparés.

Dans la présente publication, les méthodes d'échange isotopique « voie dure » et « voie douce » ont été dénommées respectivement « intrusive method » et « non-intrusive method », en lien avec leur degré d'intrusivité respectif. Les matrices d'étude font alors références ici aux matrices « Grain de blé », « Myriophylle » et « Pomme », avec les constituants majoritaires extraits respectifs « Blé-Amidon », « Myriophylle-Paroi cellulosique » et « Pomme-Glucides simples ».

La robustesse de la méthode « voie douce » a préalablement été validée à partir d'une analyse statistique comparative par un test-t de Student entre les résultats TOL-NE directement mesurés (exprimés en Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) et les résultats TOL-NE obtenus par une méthode fiable de calcul à partir du paramètre (α_{iso}) (cf. Eq. II-3).

Une première analyse comparative a alors été menée entre les résultats TOL-NE directement mesurés (exprimés en Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) entre la méthode « voie dure » et la méthode « voie douce ». L'étendue du phénomène de solubilisation de l'échantillon au cours de la procédure de la méthode « voie dure » a été estimée à partir d'une analyse du carbone organique total dissout dans l'eau d'échange. Un écart entre ces deux valeurs TOL-NE a ainsi été observé pour chaque matrice environnementale, indépendamment de l'étendue de la solubilisation de l'échantillon durant l'échange.

Afin de prendre en compte l'évolution de la composition de l'échantillon avant et après échange, une série d'analyses élémentaires C, H, N et S a été réalisée sur les échantillons et la teneur en hydrogène après échange a été employée comme facteur de conversion de l'activité exprimée en Bq.L⁻¹ d'eau de combustion pour l'obtention d'une valeur de TOL-NE exprimée en Bq.kg⁻¹ d'échantillon sec.

Une deuxième analyse comparative a alors été menée entre ces valeurs corrigées et les écarts de résultats ont été réduits de façon significative sur la matrice « Myriophylle-Paroi cellulosique » (B-2) uniquement. Ainsi, il a été montré expérimentalement que des biais engendrés par la possible répartition non homogène en masse du TOL-NE dans les constituants de la matrice ou encore des effets de la dégradation de la matière provoqués par l'immersion prolongée dans l'eau s'imposent sur la méthode « voie dure » et ne permettent pas d'accéder dans l'absolu à une valeur fiable, avec ou sans correction, de la fraction TOL-NE dans une matrice environnementale.

Dans le cadre de la surveillance environnementale, les incertitudes relatives généralement retrouvées lors des mesures de tritium organiquement lié dans l'environnement sont de l'ordre de 10 %. Ainsi, des écarts engendrés par la méthode « voie dure » assimilables à ces incertitudes, comme retrouvés dans le cas des matrices de type céréales, peuvent être considérés comme acceptables pour ces applications. La méthode « voie dure » n'est donc pas une technique d'analyse universelle du TOL-NE puisqu'elle conserve des faiblesses non négligeables pour l'analyse dans toute matrice à forte teneur en constituants hydrosolubles, mais elle reste une technique d'analyse pertinente dans le cadre du suivi des teneurs en tritium dans certains types d'échantillons.

Au contraire, la robustesse de la méthode « voie douce » a pu être appréciée pour plusieurs types de matrices environnementales et son optimisation a permis de lui conférer un temps de réalisation comparable à la méthode « voie dure » (3 jours pour la méthode « voie douce » contre 2 jours pour la méthode « voie dure », dont 2 jours pour l'obtention de l'équilibre isotopique). Cette technique nécessite une mise en œuvre plus conséquente que la méthode « voie dure » et pourra être privilégiée pour des applications aux études sur la spéciation du TOL dans l'ensemble des matrices de l'environnement.

2.2. Publication n°4 : « Non-intrusive and reliable speciation of organically bound tritium in environmental matrices. »

Cette publication est acceptée dans le journal Talanta (Elsevier).

Non-intrusive and reliable speciation of organically bound tritium in environmental matrices

A-L. Nivresse^{1,2}, N. Baglan³, G. Montavon¹, G. Granger¹, O. Péron^{1*}

¹SUBATECH, UMR 6457, 4, rue Alfred Kastler, BP 20722, 44307 Nantes Cedex 3, France

²CEA, DAM, DIF, F-91297 Arpajon, France

³CEA, DIF, DRF, JACOB, IRCM, SREIT, LRT, F-91297 Arpajon, France

*olivier.peron@subatech.in2p3.fr

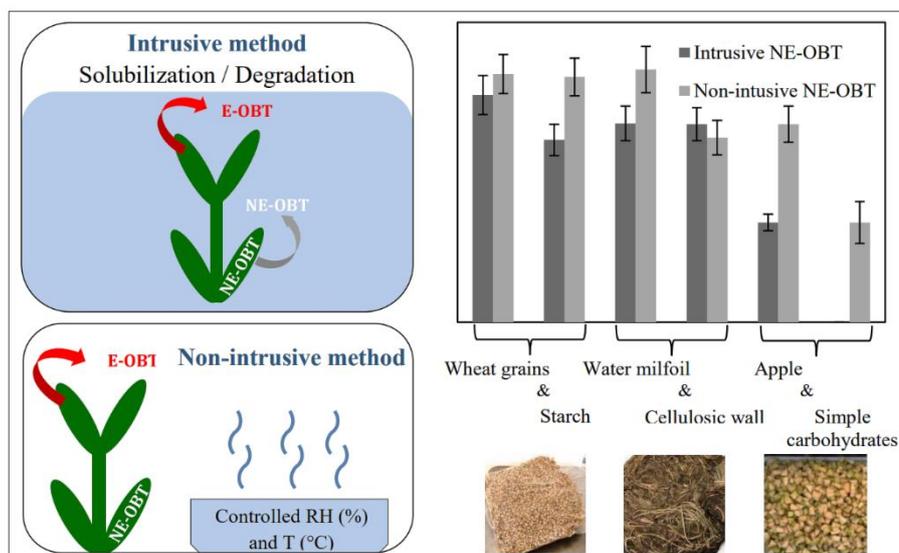
Talanta (Elsevier) - <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121803>

Abstract

Keywords :

Organically bound tritium
Tritium speciation
Tritium analysis
Standard method

Measurements of tritium in its various forms within the environment and especially in organic matter are keys to improving the current understanding of its environmental behavior and distribution. Validated or standardized analytical procedures for tritium determination methods have now been developed for several forms of tritium in environmental samples, yet an analytical lack remains regarding the quantifications of exchangeable and non-exchangeable forms of organically bound tritium (OBT) fractions. The present work therefore aims to provide a means of developing a standardized method for OBT fraction determination by evaluating the robustness and relevance of two methods (intrusive and non-intrusive methods) developed for non-exchangeable OBT quantification on a broad panel of pertinent environmental matrices. The validity and reliability of a non-intrusive method has thus been confirmed through a robust comparative study. Moreover, its relevance for standardization purposes is discussed, while the fundamental weakness of the conventional and most widespread method is highlighted and directly quantified for the first time in relying on many demonstrated biases.



1. Introduction

In many countries, the fate of tritium (^3H) in the environment has become a growing concern since the release rates of this radionuclide are expected to rise significantly over the upcoming decades. Changes in fuel management methods along with new tritium-emitting facilities, such as the International Thermonuclear Experimental Reactor (ITER) and Evolutionary Power Reactor (EPR), are thus expected to generate increasing discharges of tritium into the environment [1,2]. Tritium can be found in several forms within the environment, e.g. gaseous, liquid or integrated into living organisms as Tissue Free Water Tritium (TFWT) or Organically Bound Tritium (OBT) [[3-5]]. OBT is typically subdivided into exchangeable OBT (E-OBT), which rapidly equilibrates with the surrounding atmosphere, and non-exchangeable OBT (NE-OBT) that remains in the organic matter until its degradation [6,7]. At the present time, only TFWT and OBT quantifications have yielded validated or standardized analytical procedures [8,9] serving as tritium determination methods in environmental samples, yet without considering the exchangeable and non-exchangeable fractions. However, the NE-OBT fraction is directly representative of the amount of tritium released into the environment during growth of the biological organism and, consequently, considered to be a reliable environmental marker [[6,10-12]].

The validation of a reliable and robust determination method for the various forms of OBT should therefore be of great benefit in the context of retrospective studies of tritium releases, as well as a necessity in assessing tritium distribution and behavior in the environment.

The conventional and most widespread method for quantifying exchangeable and non-exchangeable OBT fractions in an environmental matrix is carried out in the aqueous liquid phase [[5,11,13,14]]. The E-OBT fraction is then eliminated from the sample by means of isotopic exchange, and the remaining tritium activity measured in the sample after treatment is directly attributed to the NE-OBT fraction.

Some possible drawbacks of this intrusive method have nonetheless been pointed out, including the potential solubilization effect and a partial degradation of organic matter occurring during sample immersion in water.

Investigations have made it possible to identify families of solubilized molecules on specific environmental matrices [15], yet several questions still persist on the resulting loss of information and potential induced bias on the quantification of the various OBT fractions. To overcome these complications, initial tests were previously conducted under the vapor phase by steam percolation, though sample degradation remained an ongoing issue [13]. Most recently, a new method has been developed from a custom designed system with controlled and stable temperature ($20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) and relative humidity ($85\% < \text{RH} < 88\%$) parameters [16]. This non-intrusive method has since been introduced in other works to study the exchangeability parameter of targeted environmental matrices [16,17]. The exchangeability parameter is thus able to quantify the distribution of exchangeable / non-exchangeable hydrogen positions, in offering access to a calculated value of the NE-OBT fraction in a sample [18,19]. Therefore, this non-intrusive method allows for not only direct NE-OBT measurement in a sample, after E-OBT removal by depletion, without any demonstrated bias, but also a means of confirming the validity and reliability of the obtained value through an exchangeable capacity study on the targeted matrix.

In order to provide a means of developing a standardized method for OBT sub fractions determination, this work proposes assessing the robustness of both intrusive and non-intrusive methods for NE-OBT fraction determination on a large panel of previously studied environmental matrices [20]. The two main objectives of the present study are: (i) to confirm the validity of the non-intrusive direct measurement method by means of verification with calculated results, and (ii) to evaluate the bias impact on the reliability of the intrusive method by comparing results as regards their correlation with the non-intrusive method.

2. Materials and methods

2.1. Materials

2.1.1. Sample preparation

Samples of various matrices were collected around areas of known tritium releases into the environment. For each studied environmental matrix, the major constituent was extracted according to Nivesse *et al.* [20] and subsequently added to the present study to explore several degrees of sample solubility. In order to be free from any sample composition bias, the comparative study was carried out on a set of environmental matrices and the comparison step was executed through the different results obtained from the intrusive or the non-intrusive method for a same initial matrix.

Wheat grains (matrix A-1) were sampled as part of the Organically Bound Tritium (OBT) working group activities [21], and their starch (matrix A-2) was extracted according to a procedure adapted from Liu and Ng [22], Verwimp *et al.* [23] and Xie *et al.* [24]. Water milfoils (matrix B-1) were sampled from the Loire River (47°45'18.7"N 2°28'25.3"E) 2 km downstream of the Dampierre Nuclear Power Plant (NPP) (France), and their cellulosic wall (matrix B-2) was recovered by extraction and elimination of the cytoplasmic fraction according to a procedure adapted from Mochochoko *et al.* [25] and Sun *et al.* [26]. Apples (matrix C-1) were sampled 2 km from the Cernavodă Nuclear Power Plant (NPP) (Romania) (44°20'10.0"N 28°02'13.9"E), and their simple carbohydrates (matrix C-2) were extracted according to the procedure described in Besle and Pitiot [27].

All samples analyzed were dehydrated by freeze-drying and then stored under vacuum until testing. The organic matter compositions of all studied matrices and their initial OBT activity are presented in Table 1.

2.1.2. Sample post-treatment and 3H activity determination

In order to determine OBT and NE-OBT levels in solid samples before and after the isotopic exchange procedure, the solid samples were dehydrated by freeze-drying and then heat-treated in a tubular furnace (Eraly, France). The organic matter was thus transformed into carbon dioxide and combustion water containing the tritium fraction of the sample. The sample mass m_{sample} needed to obtain a sufficient mass of combustion water m_{comb} (both of which expressed in kilograms) for an optimal measurement by liquid scintillation has been estimated from the combustion efficiency ϵ_{comb} , expressed in %, according to the following Equation 1:

$$\epsilon_{comb} = \frac{m_{comb} \times \%H_{water}}{m_{sample} \times \%H_{sample}} \quad (1)$$

where $\%H_{water}$ and $\%H_{sample}$ denote the % by weight of hydrogen respectively in water and in the sample.

Combustion water was purified by a single distillation under atmospheric pressure after pH adjustment with sodium peroxide (Na_2O_2). The isotopic exchange water aliquots were also purified by one or more distillations under atmospheric pressure in order to eliminate organic residues or remaining salt.

	(A-1)	(A-2)	(B-1)	(B-2)	(C-1)	(C-2)
Starch	75.3 (±3.7)	85.1 (±2.1)	18.1 (±1.9)	7.6 (±0.9)	0.8 (±0.1)	-
Maltose	-	14.9 (±2.1)	-	-	-	-
Glucose	-	0.8 (±0.2)	-	-	17.3 (±0.9)	19.0 (±2.3)
Fructose	-	-	-	-	51.0 (±1.5)	58.5 (±7.1)
Sucrose	3.6 (±0.4)	-	0.8 (±0.8)	0.1 (±0.6)	19.9 (±0.6)	22.5 (±2.7)
Cellulose	4.2 (±0.9)	-	16.5 (±1.5)	21.7 (±2.3)	3.7 (±1.6)	-
Lignin	-	-	13.7 (±1.8)	26.2 (±3.0)	2.6 (±0.4)	-
Hemicellulose	-	-	10.3 (±2.5)	19 (±7)	1.6 (±4.0)	-
Protein⁽ⁱ⁾	13.9 (±1.1)	-	-	-	-	-
Protein⁽ⁱⁱ⁾	-	-	37.3 (±2.7)	25.1 (±2.7)	-	-
Fat	3.0 (±0.9)	-	3.2 (±1.3)	0.2 (±0.9)	0.9 (±0.9)	-
OBT	31.3 (±2.1)	18.4 (±2.0)	18.6 (±3.8)	11.8 (±1.6)	36.2 (±2.8)	8.9 (±1.2)

Table 1: Analytical compositions in % by weight and initial OBT activity in $Bq.kg^{-1}$ of dry matter (reference date: July 1, 2020) for: wheat grains (A-1), starch (A-2), water milfoils (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1), and simple carbohydrates (C-2). ⁽ⁱ⁾ and ⁽ⁱⁱ⁾ denote wheat grain protein type and water milfoil protein type, respectively.

The tritium activities of purified liquid samples (combustion water and isotopic exchange water aliquots) were measured by liquid scintillation counting using an Ultima Gold LLT cocktail and two types of equipment, i.e.: a Tri-Carb 3170 TR/SL model (PerkinElmer) with a detection limit estimated at 3 Bq.kg⁻¹ of water for a counting time of 180 minutes and a blank value of 2 counts per minute, and a Wallac Quantulus 1220 model (PerkinElmer) with a detection limit of approx. 1 Bq.kg⁻¹ of water for a counting time of 24 hours and a blank value of 0.7 counts per minute. A quench consideration was applied for each measurement according to a quenching curve calculated after calibration using laboratory-prepared quenched standards.

The tritium activity concentrations (A^{HTO}) of the combustion water (A_{comb}^{HTO}) and isotopic exchange water aliquots ($A_{iso-liq}^{HTO}$), expressed in Bq.kg⁻¹ of water, were determined using the formula presented in Equation 2:

$$A^{HTO} = \frac{(N - N_0)}{t \times \eta} \times \frac{1}{m} = \frac{(n - n_0)}{m \times \eta} \quad (2)$$

where N and N_0 denote the sample count number and blank number, n and n_0 the sample and blank counting rates expressed in counts per second, t the counting time expressed in seconds, η the counting efficiency of the counter (dimensionless number between 0 and 1), and m the mass of water expressed in kilograms.

To improve the accuracy of results on each sample, n aliquots of the same sample (combustion water and exchange water) were typically measured ($n \geq 3$), and the statistical uncertainty of the experimental mean value $U_{A^{HTO}}$ was determined with a coverage factor k equal to 2, according to Equation 3:

$$U_{A^{HTO}} = 2 \times \sqrt{\frac{s^2}{n} + \left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_\eta}{\eta}\right)^2 + \left(\frac{u_{\epsilon_{comb}}}{\epsilon_{comb}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\%H_{water}}}{\%H_{water}}\right)^2} \quad (3)$$

where s is the standard deviation between the n values, and u_m , u_η , $u_{\epsilon_{comb}}$ and $u_{\%H_{water}}$ are the uncertainties on the mass m , counting efficiency η , combustion efficiency ϵ_{comb} and % by weight of hydrogen in water $\%H_{water}$, respectively.

2.1.3. Elemental analysis (C, H, N, S)

Elemental analyses were conducted on each studied matrix using a FlashEA® 1112 apparatus (ThermoFisher Scientific) in order to determine the % content by weight of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur elements. The result obtained on the proportion of an element x , expressed in %, was calculated from a calibration line according to Equation 4:

$$x = \frac{m_x}{m_{sample}} = \left(\frac{A_x - b_{0,x}}{b_{1,x} \times m_{sample}} \right) \quad (4)$$

where m_x and m_{sample} denote respectively the mass of element x and the mass of the introduced sample, and A_x the area of the peak identified on the chromatogram; moreover, $b_{0,x}$ and $b_{1,x}$ relate to the calibration line parameters.

To improve the accuracy of results on each sample, n aliquots of the same sample were typically measured ($n \geq 5$), and the statistical uncertainty of the experimental mean value $U_{\bar{x}}$ was determined with a coverage factor k equal to 2, according to Equation 5:

$$U_{\bar{x}} = 2 \times \sqrt{\frac{s^2}{n} + \left(\frac{u_{cal}}{m_x}\right)^2 + \left(\frac{u_{m_{sample}}}{m_{sample}}\right)^2} \quad (5)$$

where s is the standard deviation between the n values, u_{cal} the calibration uncertainty according to Neuilly and CETAMA [28], and $u_{m_{sample}}$ the uncertainty on the mass of the introduced sample.

The elemental compositions of each matrix, both before and after isotopic exchange in non-tritiated water, are reported in Table 2.

	C (%)		H (%)		N (%)		% C _{solubilized}
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	
(A-1)	45.1	44.8	6.6	6.4	2.3	2.9	1.1 (± 0.1)%
(A-2)	42.6	43.6	6.3	6.3	0.0	0.0	5.4 (± 0.8)%
(B-1)	37.4	35.2	4.7	4.5	3.3	4.1	17.3 (± 1.4)%
(B-2)	40.5	40.1	5.1	5.1	3.7	3.7	1.0 (± 0.4)%
(C-1)	40.4	42.9	6.6	6.2	0.4	0.7	77.1 (± 4.3)%
(C-2)	40.2	-	6.9	-	0.3	-	100.3 (± 17.1)%

Table 2: Elemental composition in % by weight on (1) before and (2) after intrusive isotopic exchange procedure and resulting solubilized carbon from samples on: wheat grains (A-1), starch (A-2), water milfoils (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1), and simple carbohydrates (C-2). The relative uncertainties of these elemental compositions were all calculated at less than 0.4%.

2.1.4. Conversion of the tritium activity concentration

The % content by weight of hydrogen was then used to convert the tritium activity concentration from Bq.kg⁻¹ of water (A_{comb}^{HTO}) to Bq.kg⁻¹ of dry matter (A_{ms}^{HTO}) using the formula presented in Equation 6:

$$A_{ms}^{HTO} = A_{comb}^{HTO} \times \frac{\%H_{sample}}{\%H_{water}} \quad (6)$$

To improve the accuracy of results on each sample, n aliquots of the same sample were typically measured ($n \geq 3$), and the statistical uncertainty of the experimental mean value $U_{A_{ms}^{HTO}}$ was determined with a coverage factor k equal to 2, according to Equation 7:

$$U_{A_{ms}^{HTO}} = 2 \times \sqrt{\left(\frac{u_{A_{comb}^{HTO}}}{A_{comb}^{HTO}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\%H_{sample}}}{\%H_{sample}}\right)^2 + \left(\frac{u_{\%H_{water}}}{\%H_{water}}\right)^2} \quad (7)$$

where $u_{A_{comb}^{HTO}}$ is the uncertainty of the tritium activity concentration (A_{comb}^{HTO}), $u_{\%H_{sample}}$ the uncertainty of $\%H_{sample}$, and $u_{\%H_{water}}$ the uncertainty of $\%H_{water}$.

2.1.5. Total Organic Carbon (TOC)

Total organic carbon (TOC) analyses were carried out using an Multi N/C 2100S model TOC-meter apparatus (Analytik Jena). The TOC content was determined in the isotopic exchange waters from the intrusive method in order to evaluate the partial sample solubilization phenomenon occurring during the isotopic exchange procedure. Since the NE-OBT is widely assumed to be principally involved in carbon binding, the loss in carbon atoms during the intrusive method is also information of great utility in grasping method bias and weaknesses. The TOC content was calculated from the difference between the total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) measurements in the liquid sample. The concentration of solubilized carbon from the dry sample during the isotopic exchange was derived in milligrams of carbon per gram of solution $[TOC]_{mgC/g_s}$, yielding relation presented in Equation (8) below:

$$[TOC]_{mgC/g_{sample}} = \frac{[TOC]_{mgC/g_s} \times m_s}{m_{sample}} = \frac{m_{C_{solub}}}{m_{sample}} \quad (8)$$

where $[TOC]_{mgC/g_{sample}}$ expresses the TOC concentration in milligrams of carbon per gram of solid sample, while m_s , m_{sample} and $m_{C_{solub}}$ represent the masses of analyzed solution, solid sample and solubilized carbon respectively in the exchange water solution analyzed.

The solubilized fraction of carbon from the sample could thus be determined according to the initial amount of carbon in the sample, as obtained by elemental analysis using the formula presented in Equation (9) below:

$$\% C_{solub} = \frac{m_{C_{solub}}}{m_{C_{sample}}} \quad (9)$$

where $\% C_{solub}$ is the proportion of the solubilized fraction of carbon from the sample, and $m_{C_{sample}}$ the initial mass of carbon in the solid sample.

To improve the accuracy of results on each sample, n aliquots of the same sample (analyzed solutions) were typically measured ($n \geq 5$), and the statistical uncertainty of the experimental mean value $U_{\%C_{solub}}$ was determined with a coverage factor k equal to 2, according to Equation 10:

$$U_{\%C_{solub}} = 2 \times \sqrt{\frac{s^2}{n} + \left(\frac{u_{m_{sample}}}{m_{sample}}\right)^2 + \left(\frac{u_{m_s}}{m_s}\right)^2 + (\Delta TOC)^2} \quad (10)$$

where s is the standard deviation between the n values, $u_{m_{sample}}$ the uncertainty of the solid sample mass m_{sample} , u_{m_s} the uncertainty of the analyzed solution mass m_s , and ΔTOC the uncertainty related to the TOC-meter efficiency determined from experimental calibrations.

3. Methods

3.1. Intrusive isotopic exchange method

i) Depletion procedure to access the (NE-OBT) fraction

The intrusive isotopic exchange procedure is a technique performed in a closed system, where the isotopic equilibrium reaction is carried out under the aqueous liquid phase [5,29].

Briefly described, freeze-dried samples are immersed in a large volume (around factor 10) of very low-level tritium drilling water from the CEA Bruyères-le-Châtel site ($\text{HTO} < 0.01 \text{ Bq.kg}^{-1}$ of water) (Fourré *et al.*, 2014) and kept under magnetic stirring for 2 days at room temperature.

Each sample is then placed in an individual container closed with a special waterproof plastic film in order to avoid atmospheric tritium contamination, as recommended in Pointurier *et al.* [5]. Isotopic exchanges occur between the exchangeable organically bound tritium (E-OBT) fraction in the sample and the excess of stable hydrogen atoms in the exchange water solution. At the end of the solid-liquid contact time, it is assumed that an isotopic equilibrium has been reached between the tritium content of the exchangeable part of the organically bound hydrogen in the sample and that of the water bath. Next, the exchangeable organically bound tritium (E-OBT) fraction is completely removed from the sample, and the remaining activity measured in the sample is directly attributed to the non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT) fraction.

For each matrix, this procedure was applied to three to five aliquots in order to confirm reproducibility. The samples were then recovered by means of filtration and centrifugation, freeze-dried and kept under vacuum until subsequent use. The isotopic exchange water aliquots were also sampled at equilibrium and held at a temperature below 5°C prior to distillation.

3.2. Non-intrusive isotopic exchange method

ii) Depletion procedure to access the (NE-OBT) fraction

The non-intrusive isotopic exchange procedure is a technique carried out under an aqueous vapor phase with controlled and stable parameters: temperature ($20^\circ \pm 0.1^\circ\text{C}$) and relative humidity ($85\% < \text{RH} < 88\%$), as ensured by a KCl-saturated solution in a closed system (Péron *et al.*, 2018). Briefly described, a specific atmosphere with a defined T/H ratio is set up in a glove box (Plas-Labs 890-THC) from the KCl-saturated solution prepared with a very low-level tritium commercial water, i.e. “Eau des Abatilles” ($\text{HTO} < 0.2 \text{ Bq.kg}^{-1}$ of water).

An initial isotopic equilibrium is established between the liquid and vapor phases of the saline solution. Next, freeze-dried samples are exposed to the specific atmosphere, and a second isotopic equilibrium is reached with both the exchangeable organically bound hydrogen positions of the matrix and the water condensed at the sample surface, which can be described by the following Equation (11):

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath} = \left(\frac{T}{H}\right)_{g, vapor} = \left(\frac{T}{H}\right)_{l, cond} = \left(\frac{T}{H}\right)_{s, E-OBT} \quad (11)$$

where $\left(\frac{T}{H}\right)_{l, bath}$ is the T/H ratio in the KCl-saturated bath, $\left(\frac{T}{H}\right)_{g, vapor}$ the T/H ratio in the vapor phase, $\left(\frac{T}{H}\right)_{l, rehyd}$ the T/H ratio in the free water fraction of the sample, and $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, E-OBT}$ the T/H ratio of the exchangeable organically bound hydrogen fraction of the sample.

When the isotopic equilibrium described by Equation (11) is reached, the exchangeable organically bound tritium (E-OBT) fraction is then completely removed from the sample, and all remaining activity measured in the sample is directly attributed to the non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT) fraction.

For each matrix, this procedure was applied to three aliquots with three different contact times (2, 3 and 4 days) to confirm both the reproducibility and effective achievement of equilibrium within the system. The transfer airlock of the glove box was then used to ensure sample removal without disrupting the atmospheric system set-up. For this purpose, a process of purging with dried air and a (T/H) vapor pressure ratio reset from a custom “module” filled with the same KCl-saturated solution used in the glove box was employed (see Péron *et al.* [16] for further details).

The samples were then recovered outside the glove box, immediately immersed in liquid nitrogen, freeze-dried and kept under vacuum until subsequent use. The isotopic exchange bath aliquots were also sampled at equilibrium and held at a temperature below 5°C prior to distillation.

iii) Calculation of the non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT)

In previous studies [20], the non-intrusive isotopic exchange procedure was conducted on each matrix of our present study using different (T/H) ratios in the vapor phase for the enrichment experiments (tritium baths with HTO activities = 120, 300 and 500 Bq.kg⁻¹ of water). From these experiments along with the present depletion experiment, the isotopic exchangeable (α_{iso}) parameter was determined for each studied matrix; the details of the set-up procedure and results obtained are presented in Nivresse *et al.* [20].

As stated in Péron *et al.* [16], the (α_{iso}) parameter describes the isotopic exchangeable hydrogen pool versus total hydrogen atoms in a specific matrix and moreover may quantify the distribution of exchangeable to non-exchangeable OBT according to the following Equation (12):

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT} = (\alpha_{iso}) \times \left(\frac{T}{H}\right)_{s, E-OBT} + (1 - (\alpha_{iso})) \times \left(\frac{T}{H}\right)_{s, NE-OBT} \quad (12)$$

where $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT}$ is the T/H ratio of the organically bound hydrogen fraction of the sample and $\left(\frac{T}{H}\right)_{s, NE-OBT}$ the T/H ratio its non-exchangeable organically bound hydrogen fraction.

The non-exchangeable organically bound tritium (NE-OBT) fraction of the sample has been calculated from Equations 11 and 12, in addition to Equation 13 below:

$$\left(\frac{T}{H}\right)_{s, NE-OBT} = \frac{\left[\left(\frac{T}{H}\right)_{s, OBT} - \alpha_{iso} \times \left(\frac{T}{H}\right)_{l,bath}\right]}{(1 - \alpha_{iso})} \quad (13)$$

This value was automatically calculated from each of the four steady-state results, and the statistical uncertainty of the experimental mean value $U_{A^{NE-OBT}}$ was determined with a coverage factor k equal to 2, according to Equation 14:

$$U_{A^{NE-OBT}} = 2 \times \sqrt{\frac{s^2}{n} + \left(U_{(\alpha_{iso})} \times (1 - \alpha_{iso}) \times \left(\frac{T}{H}\right)_{s, NE-OBT}\right)^2} \quad (14)$$

where s is the standard deviation between the n values and $U_{(\alpha_{iso})}$ the uncertainty on the isotopic exchangeable (α_{iso}) parameter.

4. Results and discussion

4.1. Evaluation of solubilization events during application of the intrusive method

Solubilization phenomena occurring during application of the intrusive method procedure were monitored by samples and exchange waters analysis. Slight variations in elemental compositions before and after the intrusive method procedure could be observed on samples depending on their matrix type (see Table 2).

However, these relative values are insufficient to invalidate the occurrence of partial solubilization events since the absence of variation could simply be related to a solubilization that respects the stoichiometric distributions of the initial sample. Effective solubilization events of partial samples during the immersion step of the intrusive procedure were demonstrated by increasing TOC levels in exchange water before and after isotopic exchange.

The proportion of the solubilized carbon fraction in the exchange water for each sample, % $C_{solubilized}$, is reported in Table 2. The extent of the solubilization phenomenon was therefore observed in proportion to the rate of water-soluble compounds in each studied matrix, which remains completely dependent on the preparation step for the extracted major constituent matrices (A-2), (B-2) and (C-2). From those results, the largest impact was recorded for the simple carbohydrate matrix types (C-1) and (C-2). For the latter, a complete solubilization of the solid sample was observed, thus resulting in an infeasible use of the matrix for quantifying the NE-OBT via the intrusive method. To a lesser but still noticeable extent, results on water milfoils (B-1) and starch (A-2) showed significant solubilization phenomena during the intrusive method procedure, while expected minor impacts were observed on the cellulosic wall (B-2). In the case of wheat grains (A-1), a minor solubilization seems to have taken place despite the presence of water-soluble compounds in the matrix, leading to the assumption that they were mostly preserved from external water contact interaction by the grain hull.

4.2. Validation of the non-intrusive method reliability

The tritium activity concentrations measured in the samples after contact times of 2 days, 3 days and 4 days of depletion experiment by the non-intrusive method were observed to be repeatable results for each matrix, thus confirming that isotopic equilibrium had been reached within the system with at least 2 days of contact time, exactly as previously suggested in Nivesse *et al.* [17] and Péron *et al.* [16]. A comparison of results between the NE-OBT fractions of studied matrices obtained by measurement and calculation from the non-intrusive method is presented in Figure 1.

For each matrix, the results on NE-OBT quantifications from both sources are very similar, and the statistical differences between each value has been invalidated by a comparative statistical test (Student t-test). From these assessments, very small deviations have been observed on each of the six studied matrices, with a maximum of $0.17 \pm 0.04\%$ for simple carbohydrates (matrix C-2).

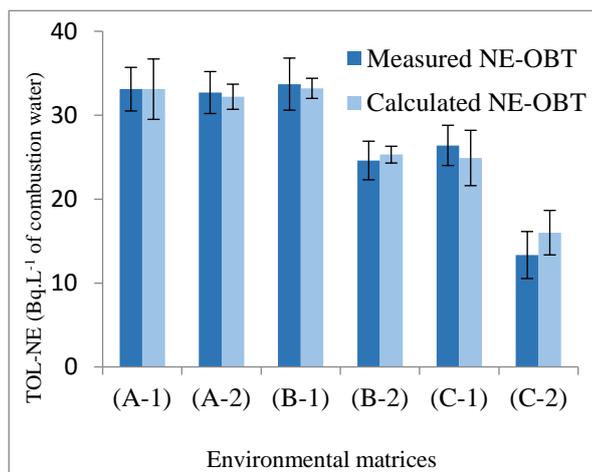


Figure 1: Comparison of non-intrusive method results on NE-OBT quantifications, as expressed in Bq.kg^{-1} of combustion water, by measurements after depletion experiment (in blue) and calculation from the exchangeable parameter (α_{iso}) results presented in Nivesse *et al.* [20] (in orange) on: wheat grains (A-1), starch (A-2), water milfoils (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1), and simple carbohydrates (C-2)

As previously described in Section 2.2.2, the calculated NE-OBT is obtained from a series of isotopic exchanges via the non-intrusive method, which then yields access to a reliable value of the non-exchangeable fraction in a sample.

As such, the robustness of the non-intrusive isotopic exchange method for an effective tritium depletion and reliable quantification of NE-OBT by means of direct measurement after sample treatment could be agreed. When considering the associated relative uncertainties, only the measured value of each of the studied matrices has been introduced in the following comparative study.

4.3. Comparative study: Shortcomings of the intrusive method

Results on the NE-OBT fractions of studied matrices obtained by measurement from both the intrusive and non-intrusive method procedures are described in Table 3. A complete depletion process of the exchangeable fraction of tritium (E-OBT) in samples and the absence of external contamination during procedures were both verified by measuring the tritium activities in exchange water. The quantification of tritium activity concentration in a solid sample was carried out by measurements in the combustion water of the treated solid sample.

The NE-OBT results obtained after both isotopic exchange methods could thus be directly expressed in terms of Bq.kg^{-1} of combustion water. Among all matrices studied, a significant deviation was observed between the intrusive and non-intrusive method results on NE-OBT values after direct measurement, i.e. from $6.9 \pm 0.9\%$ up to $49.8 \pm 6.2\%$ deviation. The statistical difference between each value was verified and validated by means of a comparative statistical test (Student t-test).

The solubilization phenomena of the sample during the intrusive method procedure are undoubtedly at the origin of a bias on the measurement of the NE-OBT fraction in a given matrix.

Nevertheless, the concentration activities measured in combustion water are entirely dependent on the hydrogen yield of the combustion (Equation 1) and thus directly associated with the hydrogen content of the sample. Yet, the solubilization caused by the intrusive method procedure could lead to a hydrogen content modification of the initial sample, while the non-intrusive method procedure is intended to preserve the elemental composition.

	(A-1)	(A-2)	(B-1)	(B-2)	(C-1)	(C-2)
NE-OBT ^(a) (Bq.kg ⁻¹)*	30.3 (±2.6)	24.3 (±2.1)	26.5 (±2.3)	26.4 (±2.2)	13.3 (±1.1)	-
NE-OBT ^(b) (Bq.kg ⁻¹)*	33.1 (±2.6)	32.7 (±2.5)	33.7 (±3.1)	24.6 (±2.3)	26.4 (±2.4)	13.3 (±2.8)
Deviation NE-OBT ^(a) (Bq.kg ⁻¹)* / NE-OBT ^(b) (Bq.kg ⁻¹)* in %	8.5 (±1.0)	25.8 (±2.9)	21.3 (±2.7)	6.9 (±0.9)	49.8 (±6.2)	-
NE-OBT ^(a) (Bq.kg ⁻¹)**	17.8 (±1.6)	13.8 (±1.2)	10.8 (±1.0)	12.2 (±1.1)	7.5 (±0.7)	-
NE-OBT ^(b) (Bq.kg ⁻¹)**	19.7 (±1.6)	18.6 (±1.4)	14.4 (±1.4)	11.4 (±1.1)	15.8 (±1.5)	8.4 (±1.8)
Deviation NE-OBT ^(a) (Bq.kg ⁻¹)** / NE-OBT ^(b) (Bq.kg ⁻¹)** in %	9.9 (±1.4)	25.8 (±3.0)	25.1 (±3.2)	6.4 (±0.8)	52.4.5 (±6.7)	-
% C _{solubilized}	1.1 (± 0.1)	5.4 (± 0.8)	17.3 (± 1.4)	1.0 (± 0.4)	77.1 (± 4.3)	100.3 (± 17.1)

Table 3: Isotopic exchanges in NE-OBT quantification results and deviation from (a) the intrusive method and (b) the non-intrusive method, as expressed in Bq.kg⁻¹ of combustion water* and Bq.kg⁻¹ of dry matter**, along with the resulting solubilized carbon from samples of: wheat grains (A-1), starch (A-2), water milfoils (B-1), cellulosic wall (B-2), apples (C-1), and simple carbohydrates (C-2)

To allow for a comparison of values in taking into account the evolution of hydrogen contents in each sample, results expressed in Bq.kg⁻¹ of combustion water were converted into Bq.kg⁻¹ of dry matter (Table 3). Reductions in deviations between both quantified values of NE-OBT from the two methods were observed in the case of cellulosic wall (B-2) matrix. However, significant deviations of up to 52.4 ± 6.7% in the case of apple (matrix C-1) still remained for the majority of matrices studied, thereby suggesting that the % by weight of hydrogen information is not a satisfactory correction to the intrusive method bias. Along with the other results, the statistical difference between each value was verified and validated by means of a comparative statistical test (Student t-test). This situation is likely to occur whenever the NE-OBT is not distributed evenly across the matrix constituents.

According to Nivesse *et al.* [20], an imbalance between exchangeable capacities of hydrogen from one biomolecule to another in the same matrix could be at the origin of an NE-OBT distribution that fails to respect the mass distribution of the biomolecules themselves. Deviations on NE-OBT quantifications were observed in closed relation with the extent of solubilization events of the sample during the intrusive method procedure. Furthermore, although a trend was obvious, the extent of the solubilization phenomenon did not seem to cause a proportional loss of sample NE-OBT in the exchange water.

Hence, the starch matrix (A-2) showed a deviation in NE-OBT results between the intrusive and non-intrusive method procedures of the same order of magnitude as that of water milfoils (B-1) (i.e. approx. 25% deviation); whereas the extent of its solubilization events was much lower (5.4 ± 0.8% for starch vs. 17.3 ± 1.4% for water milfoils).

In addition to solubilization, prolonged contact with water is assumed to alter molecular compound evolution by the partial degradation of the organic matter of environmental matrices. During these processes, the biochemical reactions of organic matter maturation could lead to the simultaneous consumption and renewal of hydrogen atoms. As such, the loss in non-exchangeable OBT originally found in the sample is likely to undergo significant expansion during the intrusive method procedure, without any evolution in either solubilization events or hydrogen content.

After disturbing the initial nature of a sample, no further correction based on simple parameters from solubilization events, such as carbon loss or hydrogen content evolution, can guarantee a viable quantification of the NE-OBT fraction in the final sample. Consequently, the intrusive method fails to offer a reliable solution for accurate quantification of the NE-OBT fraction in environmental matrices.

Nevertheless, measured OBT concentration activities from combustion waters of samples from environmental monitoring purpose present commonly relative uncertainties of about 10%. In the case of matrix (A-1), the deviation between NE-OBT results from the intrusive and the non-intrusive method was obtained at $8.5 \pm 1.0\%$, without any results correction with the hydrogen content of the sample. On this sample type, the deviation between the two methods results is then found to be of the same order of magnitude as the commonly encountered uncertainty on OBT value measurement for environmental monitoring. Hence, the NE-OBT value quantified by the intrusive method on this matrix can be considered acceptable for NE-OBT quantification to the environmental monitoring purpose. In the case of matrices (B-1) and (C-1) however, larger deviations between NE-OBT results obtained around 20 to 50% remains problematic aspect to approve and allow the validation of the intrusive method results within the monitoring context.

As part of environmental monitoring, the intrusive method is therefore relevant and acceptable for NE-OBT quantifications in samples with a very low content in water soluble compounds or a very effective protective structure like cereals samples. Yet, the non-intrusive method still can't be recommended for others matrices with medium to high content in water soluble compounds such as proteins and more especially simple carbohydrates in fruit or vegetables samples.

5. Conclusion

A comparative study has been carried out on NE-OBT quantification results obtained by means of intrusive and non-intrusive method procedures on a large panel of environmental matrices. The impact of the intrusive method drawbacks has been highlighted, and the lack of a possible correction to the observed biases has been confirmed. If the intrusive method reliability to strongly accurate NE-OBT quantification has been refuted, its relevance for NE-OBT measurements as part of environmental monitoring was yet evaluated in environmental samples according to their content in water soluble compounds and validated for cereals matrices types.

In stark contrast, the non-intrusive method robustness has been demonstrated by a strong validation method over the wide range of studied matrices. Despite requiring a larger set-up than that of the intrusive protocol, this method still offers a similar depletion time (equilibrium reached after 2 days) and moreover provides a reliable NE-OBT measurement in environmental matrices.

Acknowledgments

This work was financed by the CEA and Subatech institutes, as well as by France's Loire Valley Regional Council (under the aegis of the POLLUSOLS OSUNA Project) and by the EDF energy company. The authors would also like to thank the members of the Environmental Laboratory at the Cernavodă Nuclear Power Plant for providing the apple matrix and Dr. Gurvan Rousseau from SMART Nantes laboratories for supervising water-milfoil matrix sampling.

References

- [1] ASN. Le livre blanc du tritium, groupes de réflexion menés de mai 2008 à avril 2010 sous l'égide de l'ASN (2010).
- [2] IRSN. Rapport d'actualisation des connaissances acquises sur le tritium dans l'environnement. Editor : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN) (2017).
- [3] S. Diabaté, S. Strack. Organically bound tritium. *Health Physics*, 65 (6) (1993), pp. 698–712, 10.1097/00004032-199312000-00008
- [4] J. Guenot, Y. Belot. Assimilation of ³H in photosynthesing leaves exposed to HTO. *Health Physics*, 47 (1) (1984), pp. 849–855.
- [5] F. Pointurier, N. Baglan, G. Alanic, R. Chiappini. 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 (2) (2003), pp. 171–189, 10.1016/S0265-931X(03)00053-5
- [6] S.B. Kim, N. Baglan, P.A. Davis. Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *Journal of Environmental Radioactivity*, 126 (1) (2013), pp. 83–91, 10.1016/j.jenvrad.2013.07.011
- [7] O. Sepall, S.G. Mason. Hydrogen exchange between cellulose and water: II. Interconversion of accessible and inaccessible regions. *Canadian Journal of Chemistry*, 39 (10) (1961), pp. 1944–1955, 10.1139/v61-261
- [8] AFNOR. PR NF M60-824 Janvier 2020, Énergie nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Méthode d'essai pour l'analyse du tritium de l'eau libre et du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales (2020).
- [9] CETAMA 384. Analyse du tritium dans les matrices environnementales. Commission d'établissement des méthodes d'analyse DEN/DRCP/CETAMA/NT/2013/03 (2013).
- [10] N. Baglan, S.B. Kim, C. Cossonnet, I.W. Croudace, M. Fournier, D. Galeriu, P.E. Warwick, N. Momoshima, E. Ansoborlo. Organically bound tritium (OBT) behaviour and analysis: outcomes of the seminar held in Balaruc-les-Bains in May 2012. *Radioprotection*, 48 (1) (2013), pp. 127–144.
- [11] N. Baglan, G. Alanic, R. Le Meignen, F. Pointurier. 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 (7) (2011), pp. 695–702, 10.1016/j.jenvrad.2011.03.014
- [12] C. Boyer, L. Vichot, M. Fromm, Y. Losset, F. Tatin-Froux, P. Guétat, P.M. Badot. Tritium in plants: A review of current knowledge. *Environmental and Experimental Botany*, 67 (1) (2009), pp. 34–51, 10.1016/j.envexpbot.2009.06.008
- [13] N. Baglan, R. Le Meignen, G. Alanic, F. Pointurier. 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 (1) (2008), pp. 243–247, 10.13182/FST08-A1804
- [14] N. Baglan, G. Alanic, F. Pointurier. Tritium Determination at Trace Level: Which Strategy to Determine Accurately HTO and OBT in Environmental Samples? *Fusion Science and Technology*, 48 (1) (2005), pp. 749–754, 10.13182/FST05-A1029
- [15] A. Bacchetta. Analyse et spéciation du tritium dans des matrices environnementales. Université Pierre et Marie Curie (2013).
- [16] O. Péron, E. Fourré, L. Pastor, C. Gégout, B. Reeves, H.H. Lethi, G. Rousseau, N. Baglan, C. Landesman, F. Siclet, G. Montavon. Towards speciation of organically bound tritium and deuterium: Quantification of non-exchangeable forms in carbohydrate molecules. *Chemosphere*, 196 (1) (2018), pp. 120–128, 10.1016/j.chemosphere.2017.12.136
- [17] A-L. Nivesse, A. Thibault de Chanvalon, N. Baglan, G. Montavon, G. Granger, O. Péron. An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive ³H contamination. *Environmental Chemistry Letters*, 18 (2) (2020), pp. 475–481, 10.1007/s10311-019-00946-1
- [18] X. Feng, R.V. Krishnamurthy, S. Epstein. Determination of D/H ratios of nonexchangeable hydrogen in cellulose: a method based on the cellulose-water exchange reaction. *Geochem. Cosmochim. Acta*, 57 (1993), pp. 4249–4256, 10.1016/0016-7037(93)90320-V
- [19] A. Schimmelmann. Determination of the concentration and stable isotopic composition of nonexchangeable hydrogen in organic matter. *Analytical Chemistry*, 63 (1991), pp. 2456–2459.
- [20] A-L. Nivesse, N. Baglan, G. Montavon, G. Granger, O. Péron. Cellulose, proteins, starch and simple carbohydrates molecules control the hydrogen exchange capacity of bio-indicators and foodstuffs, *Chemosphere*, (in press), 10.1016/j.chemosphere.2020.128676.
- [21] N. Baglan, C. Cossonnet, E. Roche, S.B. Kim, I. Croudace, P. Warwick. Feedback of the third interlaboratory exercise organised on wheat in the framework of the OBT working group. *Journal of Environmental Radioactivity*, 181 (1) (2018), pp. 52–61, 10.1016/j.jenvrad.2017.09.009
- [22] Y. Liu, P.K.W. Ng. Isolation and characterization of wheat bran starch and endosperm starch of selected soft wheats grown in Michigan and comparison of their physicochemical properties. *Food Chemistry*, 176 (2015), pp. 137–144, 10.1016/j.foodchem.2014.12.023
- [23] T. Verwimp, G.E. Vandeputte, K. Marrant, J.A. Delcour. Isolation and characterisation of rye starch. *Journal of Cereal Science*, 39 (1) (2004), pp. 85–90, 10.1016/S0733-5210(03)00068-7
- [24] X.S. Xie, S.W. Cui, W. Li, R. Tsao. Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Research International*, 41 (9) (2008), pp. 882–887, 10.1016/j.foodres.2008.07.016
- [25] T. Mochochoko, O.S. Oluwafemi, D.N. Jumbam, S.P. Songca. Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth. *Carbohydrate Polymers*, 98 (1) (2013), pp. 290–294, 10.1016/j.carbpol.2013.05.038
- [26] X-F. Sun, R-C. Sun, Y. Su, J-X. Sun. Comparative Study of Crude and Purified Cellulose from Wheat Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4) (2004), pp. 839–847, 10.1021/jf0349230
- [27] J.M. Besle, M. Pitiot. Extraction et purification des glucides: application à divers aliments dérivés du soja. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 16 (5) (1976), pp. 753–772.
- [28] M. Neuilly, CETAMA. Modélisation et estimation des erreurs de mesure. Ed. Technique et documentation-Lavoisier (1993).
- [29] N. Baglan, E. Ansoborlo, C. Cossonnet, L. Fouhal, I. Deniau, M. Mokili, A. Henry, E. Fourré, A. Olivier. Métrologie du tritium dans différentes matrices : cas du tritium organiquement lié (TOL). *Radioprotection*, 45 (3) (2010), pp. 369–390, 10.1051/radiopro/2010029
- [30] E. Fourré, P. Jean-Baptiste, A. Dapoigny, E. Ansoborlo, N. Baglan. "Reference waters" in French laboratories involved in tritium monitoring: how tritium-free are they? *Radioprotection*, 49 (2) (2014), pp. 143–145, 10.1051/radiopro/2014003

3. CONCLUSION

Dans ce chapitre, la fiabilité et la pertinence de deux méthodes d'échange isotopique ont été évaluées pour la quantification de la fraction TOL-NE. Pour cela, une étude comparative a été menée entre les résultats obtenus après un appauvrissement isotopique réalisé par la méthode « voie dure » et la méthode « voie douce », sur un ensemble de matrices environnementales de la biomasse végétale ainsi que leur constituant majoritaire extrait.

La principale difficulté connue de la méthode « voie dure » repose sur la solubilisation partielle de l'échantillon traité qu'elle entraîne et déjà précédemment identifiée comme source potentielle d'un biais analytique pour la mesure fiable de la fraction TOL-NE dans un échantillon.

Pour chaque matrice étudiée, la valeur TOL-NE de la concentration en activité restante dans l'échantillon après l'appauvrissement isotopique réalisé par la méthode « voie dure » et directement mesurée dans l'eau de combustion (exprimée en Bq.L^{-1} d'eau de combustion) a ainsi été convertie et corrigée avec la teneur en hydrogène retrouvé dans l'échantillon après échange. La valeur TOL-NE alors exprimée en Bq.kg^{-1} sec d'échantillon permet ainsi de prendre en compte l'évolution potentielle de l'élément hydrogène dans l'échantillon lors de l'échange et d'empêcher un biais engendré par le rendement de combustion lors du traitement de l'échantillon solide avant la mesure par scintillation liquide.

Pourtant, la répartition potentiellement non homogène du TOL-NE dans les divers constituants plus ou moins hydrosolubles de la matrice, ainsi que les effets de la dégradation de la matière provoqués par l'immersion prolongée dans l'eau, semblent entraîner des écarts analytiques qui nécessitent des corrections plus importantes que la prise en compte de l'évolution de % massique de l'hydrogène ou l'étendue des phénomènes de solubilisation. Ces biais s'imposent alors sur la méthode « voie dure » et ne permettent pas d'accéder dans l'absolu à une valeur fiable du TOL-NE dans une matrice environnementale. Cette méthode reste ainsi pertinente sous certaines conditions dans le cadre de la surveillance environnementale mais présente toujours des faiblesses non négligeables pour l'étude de matrices à fortes teneurs en composés hydrosolubles.

Au contraire, la robustesse et la fiabilité de la méthode « voie douce » ont été confirmées au cours de l'étude comparative sur l'ensemble des matrices environnementales étudiées. Ainsi, conjointement avec son optimisation temporelle de mise en œuvre, la pertinence de la méthode « voie douce » a été démontrée pour l'étude de la spéciation du TOL dans plusieurs types d'échantillons environnementaux.

Chapitre 5

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de cette thèse étaient (i) de comprendre l'implication de structures moléculaires spécifiques dans l'établissement du comportement et de la spéciation du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales et (ii) de statuer sur la fiabilité et la pertinence des méthodes d'échange isotopique actuelles pour l'analyse de la forme non-échangeable du TOL.

Le manque de consensus actuel pour définir la répartition des différentes formes de TOL dans une molécule organique est engendré par l'existence d'une multitude d'arrangements structuraux plus ou moins complexes parmi les molécules de la biomasse terrestre. La présence d'une forme de tritium dite enfouie peut ainsi s'observer dans plusieurs matrices environnementales et se retrouve directement liée aux paramètres structuraux de leurs molécules constitutives. Une première description des formes échangeable et non-échangeable du TOL basée uniquement sur le caractère de la liaison chimique dans laquelle le tritium est impliqué peut alors s'avérer insuffisante pour prédire le comportement du TOL dans la biomolécule porteuse. Au sein d'une matrice environnementale, le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) permet de définir la fraction d'atomes d'hydrogène organiques échangeables par rapport à l'ensemble des atomes d'hydrogène d'un échantillon. L'étude de ce paramètre permet de rendre compte du taux d'hydrogènes échangeables et par conséquent de la capacité de la matrice étudiée à porter du tritium organiquement lié sous ses formes échangeable et non-échangeable. Afin de comprendre la nature exacte des différentes formes du TOL, et *in fine* son comportement dans les matrices environnementales, il était alors nécessaire d'étudier le rôle des aspects structuraux des biomolécules constitutives dans l'établissement du paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}).

A partir d'une étude comparative entre le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) et le paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$), une vue d'ensemble sur les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées dans plusieurs matrices environnementales et leur constituant majoritaire est obtenue. Pour des matrices comme le grain de blé, présentant majoritairement des biomolécules constitutives dont la structure est semblable à celle de l'amidon, il a été démontré que la vision analytique (i.e. basée sur le caractère de la liaison chimique) est suffisante pour décrire le comportement du tritium organiquement lié. La conformation hélicoïdale de la molécule d'amidon est une particularité structurale qui rend accessible l'ensemble des atomes d'hydrogène en positions théoriques échangeables et permet ainsi de décrire la répartition des formes échangeable et non-échangeable du TOL selon la nature de la liaison chimique au sein de la matrice.

Dans le cas de matrices comme le *Myriophyllum Spicatum*, qui présentent d'autres constituants majoritaires dont la structure est plus complexe, à l'instar de la molécule de cellulose et de diverses protéines, la vision analytique est insuffisante et la présence de la forme de tritium dite enfouie a été confirmée. Cette particularité se retrouve également dans la pomme qui, bien que présentant majoritairement des constituants dont la structure unitaire est très simplifiée, se retrouve porteuse d'associations ramifiées de glucides simples adoptant des arrangements structuraux très complexes au sein de la matrice.

A partir de cette étude globale de l'échangeabilité de l'atome d'hydrogène, l'existence des phénomènes d'enfouissement au sein d'une matrice environnementale peut être directement mise en corrélation avec les spécificités de la structure moléculaire des molécules constitutives principales. Le rôle clé du constituant majoritaire est ainsi mis en lumière pour définir les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène au sein d'une matrice environnementale et *in fine* sur la spéciation du tritium organiquement lié.

Parmi toutes les molécules à structures complexes dont le rôle dans la diminution de la labilité de l'atome d'hydrogène a été démontré expérimentalement, il a été choisi d'approfondir la suite de cette étude sur le constituant majoritaire de toute la biomasse terrestre, la cellulose. L'impact de sa structure semi-cristalline sur les capacités d'échange de ses atomes d'hydrogène a ainsi été évalué et une relation linéaire a pu être établie entre l'accessibilité des groupements OH et l'Indice de Cristallinité (CrI) retrouvé dans une molécule de cellulose. Lorsque le taux de cristallinité de la cellulose native augmente, la présence de la forme tritium enfoui s'intensifie et la fraction d'atomes d'hydrogène échangeable diminue en conséquent. Ce modèle expérimental rend alors possible d'accéder au taux d'hydrogènes échangeables d'une cellulose native ($\alpha_{CrI_{cellulose}}$) à partir de la seule connaissance de son Indice de Cristallinité (CrI).

Afin d'être transposable aux matrices environnementales, une étude des limites d'application du modèle a permis d'établir une valeur minimum de l'Indice de Cristallinité (CrI) pour une matrice entière égale à 12 %. Cette valeur est alors suffisante pour obtenir des informations pertinentes sur l'accessibilité des atomes d'hydrogène dans une matrice cellulosique.

La légitimité du modèle expérimental établie, il reste à confirmer sa congruence sur une matrice environnementale réelle. Une étude complémentaire devra donc être réalisée à partir d'une matrice environnementale cellulosique, qui devra nécessairement répondre aux trois critères suivants :

(1) comporter de la cellulose comme unique constituant responsable d'une diminution de la labilité de l'atome d'hydrogène, (2) contenir une forte teneur en cellulose avec une cristallinité élevée pour être aisément au-dessus de la limite d'application du modèle expérimental et (3) présenter une teneur massique en hydrogène suffisante pour l'obtention d'un volume d'eau de combustion adapté à la mesure par scintillation liquide.

Pour cette validation, il s'agira alors d'obtenir le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) de la matrice cellulosique par la méthode d'échange isotopique « voie douce » et de confirmer sa concordance avec son paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CrI}). Si la conformité du modèle expérimental pour les matrices environnementales est ainsi approuvée, son recours sur une matrice cellulosique, dans les limites d'application du modèle, pourra alors permettre :

- (i) De quantifier de façon directe le paramètre d'échangeabilité isotopique (α_{iso}) par une analyse simple et rapide d'une faible masse d'échantillon par la méthode DRX, dans le cas des matrices environnementales dont la cellulose est le seul constituant impliqué dans la diminution potentielle de la labilité de l'atome d'hydrogène.

Cette détermination simplifiée de la capacité d'échange mais également de rétention du TOL dans une matrice environnementale cellulosique est alors intéressante pour la compréhension du comportement du TOL dans l'environnement et pourrait également trouver une application pertinente aux études rétrospectives des rejets tritiés ou encore aux investigations sur la non-prolifération nucléaire.

- (ii) D'évaluer séparément l'implication de la cellulose et ainsi en déduire de façon quantitative celle des autres constituants dans la diminution de la labilité de l'atome d'hydrogène d'une matrice qui comporte plusieurs constituants responsables de la diminution de la labilité de l'atome d'hydrogène.

Ce point présente un aspect fondamental pour des applications au développement de la recherche concernant la spéciation du TOL mais aussi l'accessibilité des atomes d'hydrogène dans des biomolécules dont la structure est très complexe, comme les chaînes polypeptidiques des protéines.

- (iii) Dans un autre contexte, d'estimer l'aptitude à la complexation de la cellulose native envers les métaux de transitions et les actinides dans l'environnement ou encore d'évaluer le rendement de production de nanomatériaux fonctionnalisés à partir de composés cellulosiques à des fins environnementales ou médicales.

Le *Myriophyllum Spicatum*, composé en partie de cellulose et de protéines, a été choisi pour étudier ce deuxième point d'intérêt du modèle expérimental. Les caractéristiques de sa cellulose ne répondant pas aux critères d'application du modèle expérimental, il a pu être estimé que les protéines présentaient un impact significativement plus important sur la diminution de la fraction labile des atomes d'hydrogène dans la matrice « Myriophylle ». Les protéines de cette matrice se retrouvent alors attribuées un paramètre d'échangeabilité très largement inférieur à l'ensemble des biomolécules étudiées jusqu'à présent. La structure supramoléculaire des protéines est globalement caractérisée par des repliements locaux ainsi que de l'intégralité de la chaîne polypeptidique. Ces caractéristiques de stabilisation moléculaire permettent alors d'expliquer la très faible accessibilité des atomes d'hydrogène retrouvée dans ces biomolécules.

Ces propriétés étaient également attendues pour les substances humiques, des matrices complexes du sol dont les arrangements structuraux sont supposés en faire un compartiment de « stockage » connu du tritium organiquement lié. Pourtant, les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées au sein de ces matrices sont très proches voir légèrement supérieures à la majorité des matrices environnementales précédemment étudiées. La structure exacte des substances humiques n'étant pas bien établie à ce jour, il n'a pas été possible de conclure sur la présence ou l'absence de la forme tritium enfoui au sein de ces matrices. Pour cela, il faudra attendre des avancées importantes des techniques analytiques de caractérisations de ces biomolécules très hétérogènes, de leurs associations et de leurs divers groupements fonctionnels. En revanche, il est d'ores et déjà possible d'affirmer que ces substances humiques présentent des capacités d'échange de l'atome d'hydrogène relativement importantes et potentiellement susceptibles de jouer un rôle clé dans la complexation des métaux de transition et des radionucléides. Les méthodes classiques de détermination de ces capacités dites de déprotonation des atomes d'hydrogène ayant montré des biais analytiques et cinétiques critiques pour les matrices étudiées, il pourrait également être intéressant d'évaluer la pertinence des informations apportées par la méthode d'échange isotopique « voie douce » pour l'amélioration des modèles de prédiction des phénomènes de complexation des polluants avec les différents constituants du sol.

En conclusion, les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées dans l'ensemble des matrices environnementales de cette étude dépendent de la matrice et sont directement liées aux caractéristiques de leurs constituants majoritaires. Le comportement de l'hydrogène dans la biosphère est ainsi soumis à une forte influence de ses propriétés d'échange, résultantes elles-mêmes des caractéristiques structurales des biomolécules porteuses. Plus la capacité d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvée dans un composé est faible, plus le taux de positions hydrogènes non-échangeables est important.

Dans une matrice environnementale, les protéines et les associations de glucides simples sont ainsi des composés proportionnellement plus susceptibles de contenir et de stocker à long terme du tritium organiquement lié. En faisant partie des familles de constituants majoritaires retrouvés dans les produits susceptibles d'être directement ingérés par l'Homme (fruits, légumineuses, viandes, ...), les protéines et les glucides simples ont également un rôle majeur au sein des organismes vivants. Après ingestion, les acides aminés participent alors à la synthèse de nouvelles protéines tandis que les glucides simples sont employés comme moteur énergétique des cellules humaines. De ce fait, ces biomolécules se répartissent de façon ubiquitaire dans l'organisme et peuvent être consommées instantanément pour former de nouveaux composés ou persister dans le corps humain. Ces premières observations permettent ainsi d'ouvrir l'accès à des informations importantes sur le comportement du tritium dans la biosphère mais également pertinentes pour la compréhension de son transfert dans l'environnement et à l'Homme. Par conséquent, il apparaît crucial d'approfondir les connaissances sur les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées dans ces deux biomolécules qui se retrouvent une des clés de la spéciation du TOL.

Concernant les glucides simples, leurs associations complexes au sein d'une matrice sont directement responsables des phénomènes d'enfouissement et de la diminution de la labilité de leurs atomes d'hydrogène. Cette conformation moléculaire adoptée est pourtant sujette à une évolution permanente au cours des phénomènes de maturation de la matrice, pouvant ainsi entraîner des changements fréquents dans l'accessibilité de leurs atomes d'hydrogène. Afin d'évaluer la significativité de ces propriétés évolutives, il pourrait être intéressant d'étudier l'évolution du paramètre d'échangeabilité isotopique de matrices environnementales riches en glucides simples en fonction de leur nature et de leur état de maturation.

En ce qui concerne les protéines, leurs chaînes polypeptidiques sont formées d'un agencement prédéfini d'acides aminés et adoptent des conformations structurales de stabilisation en conséquent. En tant que composé ayant démontré le plus d'impact sur la diminution des propriétés labiles des atomes d'hydrogène, il semble alors particulièrement pertinent de poursuivre les études de spéciation du tritium organiquement lié sur des matrices présentant majoritairement ce type de biomolécule. Pour cela, une étude approfondie des caractéristiques structurales en parallèle des propriétés d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées dans certaines protéines principales de la biomasse végétale et animale pourra être envisagée.

Dans le but d'améliorer la compréhension globale du comportement et de la spéciation du tritium dans l'environnement, il fallait également pouvoir assurer une quantification fiable des fractions TOL-E et TOL-NE dans les matrices environnementales. L'intrusivité des procédures actuelles est supposée responsable d'un biais analytique à l'origine d'une incertitude sur la nature réelle des fractions de tritium analysées.

La deuxième partie de ces travaux était donc consacrée à l'évaluation de la fiabilité et de la pertinence de deux méthodes d'échange isotopique pour la quantification des différentes fractions du tritium organiquement lié, et plus particulièrement du TOL-NE, dans plusieurs types de matrices environnementales.

Dans un premier temps, la robustesse d'une méthode récemment développée, dite « voie douce », a été validée pour la quantification de la fraction TOL-NE dans l'ensemble des matrices environnementales de cette étude. La non-intrusivité avérée de cette méthode a alors permis d'obtenir des valeurs de concentrations en activité du TOL-NE sans biais analytique observable pour les matrices étudiées. La méthode « voie douce » peut donc être considérée comme une méthode fiable de quantification de la fraction non-échangeable du TOL mais reste une technique contraignante à utiliser dans l'ensemble des laboratoires.

Dans un second temps, une étude comparative entre les concentrations en activité déterminées par la méthode conventionnelle dite « voie dure » par rapport à ceux provenant de la méthode « voie douce » a permis de statuer sur la significativité des biais engendrés par la méthode conventionnelle. Des écarts significatifs ont été observés pour l'ensemble des matrices de l'étude, confirmant ainsi l'impact non négligeable de l'intrusivité de la méthode « voie dure ».

En conclusion, les biais observés par la méthode « voie dure » (solubilisation, dégradation, ...) ne permettent pas d'accéder, dans l'absolu, à une valeur fiable du TOL-NE dans une matrice environnementale. Néanmoins, dans le cadre de la surveillance environnementale, les faibles écarts de la méthode « voie dure » observés dans les matrices de type céréales peuvent être considérés comme acceptables par rapport aux incertitudes généralement retrouvées pour les mesures du tritium organiquement lié dans les échantillons environnementaux. En revanche, les écarts analytiques observés sur les autres matrices de cette étude restent non négligeables et se retrouvent en lien direct avec la présence de constituants hydrosolubles dans la matrice.

La méthode « voie dure », bien qu'intrusive et génératrice de biais analytiques, reste alors pertinente pour certaines applications et sous conditions d'une étude de certains groupes de matrices. En dehors de ces limites, l'utilisation de la méthode « voie douce » reste à privilégier mais ses contraintes (matériel, investissement, ...) doivent être considérées. En ce sens, il pourrait finalement être intéressant de vérifier la significativité des écarts entre la méthode intrusive « voie dure » et la méthode non-intrusive « voie douce » sur un plus large panel d'échantillons généralement étudiés dans le cadre de la surveillance environnementale.

En résumé, ces travaux ont permis la mise en évidence de plusieurs points importants concernant la spéciation et la compréhension du comportement du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales :

- Les spécificités des structures moléculaires des constituants majoritaires contrôlent les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène dans une matrice environnementale et peuvent avoir une influence relative sur la répartition du TOL-NE. Les propriétés d'échange de l'atome d'hydrogène sont donc directement liées aux caractéristiques structurales des biomolécules porteuses et se rapportent à une question d'accessibilité moléculaire,
- La labilité des atomes d'hydrogène d'une cellulose native peut directement être déduite de l'étendue de sa cristallinité. Un taux de cristallinité élevé dans une cellulose traduit d'une complexité supramoléculaire importante et engendre des phénomènes d'enfouissement prévisibles de ces atomes. Un modèle expérimental de détermination simple et rapide du paramètre d'échangeabilité basé sur l'Indice de Cristallinité (α_{CRI}) a ainsi été mis au point et reste à valider pour les matrices environnementales cellulosiques,
- Les protéines et les associations de glucides simples retrouvées dans les matrices environnementales sont des biomolécules ayant un impact majeur sur la diminution des capacités d'échange de l'atome d'hydrogène dans les matrices environnementales. L'étude de l'influence de ces biomolécules est alors primordiale pour la poursuite des études sur la spéciation du TOL,
- La méthode d'échange isotopique « voie douce » est adaptée à la détermination des propriétés d'échanges des atomes d'hydrogène des matrices de type sol. Son utilisation pourrait fournir des informations complémentaires à la compréhension du stockage du tritium mais également d'autres polluants dans ce compartiment terrestre et,
- La méthode d'échange isotopique intrusive « voie dure » n'est pas adaptée pour une mesure exacte de la fraction TOL-NE présente dans une matrice environnementale. Elle reste néanmoins pertinente, dans certaines conditions, pour des applications à la surveillance environnementale.

Références bibliographiques

- AFNOR. (2020).** PR NF M60-824 Janvier 2020, Énergie nucléaire - Mesure de la radioactivité dans l'environnement - Méthode d'essai pour l'analyse du tritium de l'eau libre et du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales.
- AGIR. (2007).** Review of Risks from Tritium. In: (AGIR) RotiAGoIR, editor. Health Protection Agency, Radiation, Chemical and Environmental Hazards (United Kingdom).
- Alvarez, L. W. et Cornog, R. (1939a).** He3 in helium. *Physical Review*, Vol. 56(4), 379.
- Alvarez, L. W. et Cornog, R. (1939b).** Helium and Hydrogen of Mass 3. *Physical Review*, Vol. 56(6), 613.
- Andreux, F. et Munier-Lamy, C. (1994).** Genèse et propriétés des molécules humiques. In: Bonneau M, Souchier B (eds) *Pédologie 2: constituants et propriétés du sol*. Editions Masson, Paris.
- ASN. (2010).** 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.
- Bacchetta, A. (2013).** Analyse et spéciation du tritium dans des matrices environnementales. Université Pierre et Marie Curie.
- Baglan, N., Alanic, G., Le Meignen, R. et Pointurier, F. (2011).** 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*, Vol. 102(7), 695-702.
- Baglan, N., Alanic, G. et Pointurier, F. (2005).** Tritium Determination at Trace Level: Which Strategy to Determine Accurately HTO and OBT in Environmental Samples? *Fusion Science and Technology*, Vol. 48(1), 749-754.
- Baglan, N., Ansoberlo, E., Cossonnet, C., Fouhal, L., Deniau, I., Mokili, M., ... et Olivier, A. (2010).** Métrologie du tritium dans différentes matrices: cas du tritium organiquement lié (TOL). *Radioprotection*, Vol. 45(3), 369-390.
- Baglan, N., Cossonnet, C., Roche, E., Kim, S. B., Croudace, I. et Warwick, P. (2018).** Feedback of the third interlaboratory exercise organised on wheat in the framework of the OBT working group. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 181(1), 52-61.
- Baglan, N., Kim, S. B., Cossonnet, C., Croudace, I. W., Fournier, M., Galeriu, D., Warwick, P. E., Momoshima, N. et Ansoberlo, E. (2013).** Organically bound tritium (OBT) behaviour and analysis: outcomes of the seminar held in Balaruc-les-Bains in May 2012. *Radioprotection*, Vol. 48(1), 127-144.
- Baglan, N., Le Meignen, R., Alanic, G. et Pointurier, F. (2008).** 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*, Vol. 54(1), 243-247.
- Baumgaertner, F., Yankovich, T. L. et Kim, S. B. (2009).** Logistic analysis of OBT dynamics. *Health Physics*, Vol. 97(6), 572-580.
- Baumgartner, F. et Donhaerl, W. (2004).** Non-exchangeable organically bound tritium (OBT): its real nature. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 379(2), 204-209.

- Bé, M.-M., Chisté, V., Dulieu, C., Browne, E., Baglin, C., Chechev, V., ... et Lee, K. B. (2006).** Table of radionuclides 3. Edition BIPM.
- Beevers, C. A., McDonald, T. R. R., Robertson, J. T. et Stern, F. (1952).** The crystal structure of sucrose. *Acta Crystallographica*, Vol. 5(5), 689-690.
- Belot, Y., Roy, M. et Métivier, H. (1996).** Le tritium, de l'environnement à l'Homme, IPSN. Les éditions de physique.
- Bernhard, M., Brinckman, F. E. et Irgolic, K. J. (1986).** The Importance of Chemical 'Speciation' in Environmental Processes. Springer-Verlag, Berlin, 7-14.
- Besle, J. M. et Pitiot, M. (1976).** Extraction et purification des glucides: application à divers aliments dérivés du soja. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. Vol. 16(5), 753-772.
- Biliuta, G. et Coseri, S. (2019).** Cellulose: A ubiquitous platform for ecofriendly metal nanoparticles preparation. *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 383, 155-173.
- Bisutti, I., Hilke, I. et Raessler, M. (2004).** Determination of total organic carbon – an overview of current methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23(10), 716-726.
- Borggaard, O. K. (1974).** Experimental conditions concerning potentiometric titration of humic acid. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, Vol. 25(2), 189-195.
- Boyer, C., Vichot, L., Fromm, M., Losset, Y., Tatin-Froux, F., Guétat, P. et Badot, P. M. (2009).** Tritium in plants: A review of current knowledge. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 67(1), 34-51.
- Branden, C. I. et Tooze, J. (2012).** Introduction to protein structure. Garland Science.
- Browne, E. et Firestone, R. (1986).** Table of radioactive isotopes. Shirley Wiley Interscience Publication.
- Campbell, C. A., Paul, E. A., Rennie, D. A. et McCallum, K. J. (1967).** Applicability of the carbon-dating method of analysis to soil humus studies. *Soil Science*, Vol. 104(3), 217-224.
- Cassette, P. (2004).** Mesure de radioactivité par scintillation liquide. *Techniques de l'ingénieur, dossier P2552*, 1-19.
- CETAMA 384. (2013).** Analyse du tritium dans les matrices environnementales. Commission d'établissement des méthodes d'analyse DEN/DRCP/CETAMA/NT/2013/03.
- Chen, W., Yu, H., Liu, Y., Chen, P., Zhang, M. et Hai, Y. (2011).** Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 83(4), 1804-1811.
- Choi, Y. H., Kim, S. B., Lim, K. M., Park, H. K. et Lee, W. Y. (2000).** Incorporation into organically bound tritium and the underground distribution of HTO applied to a simulated rice field. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 47(1), 279-290.
- Clapp C. E., Hayes M. H. B. et Swift R. S. (1993).** Isolation, fractionation, functionalities, and concepts of structures of soil organic macromolecules. In: Beck AJ et al (eds) *Organic substances in Soil and Water: natural constituents and their influences on contaminant behaviour*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Commission of the European Communities. (1979).** Biomass for energy. UK Section of the International Solar Energy Society.

- Cossonnet, C., Neiva Marques, A. M. et Gurriaran, R. (2009).** Experience acquired on environmental sample combustion for organically bound tritium measurement. *Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 67(5), 809–811.
- Coyle, P. E. (1978).** Laser Fusion: status, future, and tritium control. Lawrence Livermore Lab. California University, Livermore (USA).
- Crowson, D. L. (1973).** Man-made tritium. *Tritium*.
- Cummings, B. (2001).** An imprint of Addison Wesley Longman. Inc, Vol. 2, 416-434.
- Davis H. et Mott C. J. B. (1981).** Titrations of fulvic acid fractions I: interactions influencing the dissociation/reprotonation equilibria. *Journal of Soil Science*, Vol. 32(3), 379-391.
- Delacroix, D., Leblanc, P. et Guerre, J. (2006).** Guide pratique radionucléides et radioprotection. Editions EDP Sciences.
- Diabaté, S. et Strack, S. (1993).** Organically bound tritium. *Health Physics*, Vol. 65(6), 698-712.
- Dommergues, Y. et Mangenot, F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. Editions Masson.
- Ducros, L. (2018).** Origine et devenir du tritium au sein des hydrosystèmes continentaux méditerranéens français non nucléarisés. Université d'Aix-Marseille.
- EMRAS (2010).** EMRAS (Environmental Modelling of Radiological Safety) Program, Modelling the Environmental Transfer of Tritium and Carbon-14 to Biota and Man. Final Report. Tritium and Carbon-14 Working Group. IAEA Vienna Austria.
- Engen, J. R. et Wales, T. E. (2015).** Analytical aspects of hydrogen exchange mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol. 8(1), 127-148.
- Eyheraguibel, B. (2004).** Caractérisation des substances humiques biomimétiques - Effets sur les végétaux. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Eyrolle-Boyer, F., Boyer, P., Claval, D., Charmasson, S. et Cossonnet, C. (2014).** Apparent enrichment of organically bound tritium in rivers explained by the heritage of our past. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol 136, 162-168.
- Eyrolle, F., Ducros, L., Le Dizès, S., Beaugelin-Seiller, K., Charmasson, S., Boyer, P. et Cossonnet C (2018).** An updated review on tritium in the environment. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 181, 128-137.
- Feng, X., Krishnamurty, R. V. et Epstein, S. (1993).** Determination of D/H ratios of nonexchangeable hydrogen in cellulose: a method based on the cellulose-water exchange reaction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 57, 4249-4256.
- Fengel, D. et Wegener, G. (1984).** Wood : Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Editions Walter de Gruyter, 143-151.
- Flaig, W. (1988).** Generation of model chemical precursors. In: Frimmel FH, Christman RF (Eds) *Humic substances and their role in the environment*, Vol 16, Wiley, New York
- Fleury, G. (2019).** Identification des molécules des acides fulviques impliquées dans la sorption des métaux lourds dans les sols. Université de Strasbourg: Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien — UMR CNRS 7178.

- Fortunati, E., Puglia, D., Monti, M., Peponi, L., Santulli, C., Kenny, J. M. et Torre, L. (2013).** Extraction of Cellulose Nanocrystals from Phormium tenax Fibres. *Journal of Polymers and the Environment*, Vol. 21(2), 319-328.
- Fourré, E., Jean-Baptiste, P., Dapoigny, A., Ansoberlo, E. et Baglan, N. (2014).** "Reference waters" in French laboratories involved in tritium monitoring: how tritium-free are they? *Radioprotection*, Vol. 49(2), 143-145.
- Frilette, V. J., Hanle, J. et Mark, H. (1948).** Rate of exchange of cellulose with heavy water. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 70(3), 1107-1113.
- Fuma, S. et Inoue, Y. (1995).** Simplified and sensitive analysis of organically bound tritium in tree rings to retrospect environmental tritium levels. *Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 46(10), 991-997.
- Galeriu, D., Melintescu, A., Strack, S., Atarashi-Andoh, M. et Kim, S. B. (2013).** An overview of organically bound tritium experiments in plants following a short atmospheric HTO exposure. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 118(1), 40-56.
- Galeriu, D., Takeda, H., Melintescu, A. et Trivedi, A. (2005).** Energy Metabolism and Human Dosimetry of Tritium. *Fusion Science and Technology*, Vol. 48(1), 795-798.
- Garba, Z. N., Lawan, I., Zhou, W., Zhang, M., Wang, L. et Yuan, Z. (2020).** Microcrystalline cellulose (MCC) based materials as emerging absorbents for the removal of dyes and heavy metals - A review. *Science of the Total Environment*, Vol. 717.
- Garland, J. A. et Ameen, M. (1979).** Incorporation of Tritium in Grain Plants: *Health Physics*, Vol. 36(1), 35-38.
- GNIS. (2018).** La cellule végétale. Dans *GNIS-Pédagogie.org*.
- Gossard, P. (2001).** Contribution à l'étude des interactions de la matière organique des sols avec les métaux lourds: Etude structurale et analytique de molécules modèles. Université des Sciences et Technologies de Lille.
- Greenspan, L. (1977).** Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, Vol. 81A(1), 89-96.
- Grosse, A. V., Johnston, W. M., Wolfgang, R. L. et Libby, W. F. (1951).** Tritium in nature. *Science*, Vol. 113(1), 1-2.
- Guenot, J. et Belot, Y. (1984).** Assimilation of ^3H in photosynthesing leaves exposed to HTO. *Health Physics*, Vol. 47(1), 849-855.
- Guétat, P., Douche, C. et Hubinois, J. C. (2008).** Le tritium et l'environnement: sources, mesures et transferts. *Radioprotection*, Vol. 43(4), 547-569.
- Häfele, W., Holdren, J. P., Kessler, G. et Kulcinski, G. (1977).** Fusion and fast breeder reactors. International Institute for Applied System Analysis.
- Hannawalt, J. D., Rinn, H. W. et Fevel, L. K. (1938).** Chemical Analysis by X-Ray Diffraction. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, Vol. 10(9), 457-512.
- Hashem, M. A., Elnagar, M. M., Kenawy, I. M. et Ismail, M. A. (2020).** Synthesis and application of hydrazono-imidazoline modified cellulose for selective preparation of precious metals from geological samples. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 237.

- Hill, R. L. et Johnson, J. R. (1993).** Metabolism and Dosimetry of Tritium: Health Physics, Vol. 65(6), 628-647.
- Hopkins, W. G. (2003).** Physiologie végétale. Edition De Boeck Supérieur.
- Hunt, G. J., Bailey, T. A., Jenkinson, S. B. et Leonard, K. S. (2010).** Enhancement of tritium concentrations on uptake by marine biota: experience from UK coastal waters. Journal of the American Chemical Society, Vol. 30(1), 73-83.
- IAEA-GNIP-database.** Global network of isotopes in precipitations.
- ICRP. (1979).** Limits for intakes of radionuclides by man. Annals of the ICRP, ICRP Publication 30, Elsevier Science Ltd, Oxford, Vol. 2(3).
- ICRP. (1983).** Radionuclide transformations, Energy and intensity of emissions. Annals of the ICRP, ICRP Publication, Elsevier Science Ltd, Oxford.
- ICRP. (1989).** Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 1 : Inhalation dose coefficients. Annals of the ICRP, ICRP Publication 56, Elsevier Science Ltd, Oxford.
- ICRP. (1993).** Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 2 : Inhalation dose coefficients. Annals of the ICRP, ICRP Publication 65, Elsevier Science Ltd, Oxford, Vol. 23(3).
- ICRP. (1995).** Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 4 : Inhalation dose coefficients. Annals of the ICRP, ICRP Publication 71, Elsevier Science Ltd, Oxford, Vol. 25(3).
- ICRP. (1996).** Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 5 : Compilation of ingestion and inhalation dose coefficients. Annals of the ICRP, ICRP Publication 72, Elsevier science Ltd, Oxford, Vol. 26(1).
- IRSN. (2009a).** Eléments de réflexion sur le risque sanitaire posé par le tritium. Editor : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).
- IRSN. (2009b).** Le tritium dans l'environnement - Synthèse des connaissances. Editor : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).
- IRSN. (2017).** Rapport Actualisation des connaissances Tritium Environnement. Editor : Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN).
- Jacobs, D. G. (1968).** Sources of tritium and its behaviour upon release to the environment. AEC Critical Review Series.
- Jarvis, M. (2003).** Chemistry: cellulose stacks up. Nature, Vol. 426, 611-612.
- Jean-Baptiste, P., Fourré, E., Dapoigny, A., Baumier, D., Baglan, N. et Alanic, G. (2010).** ^3He mass spectrometry for very low-level measurement of organic tritium in environmental samples. Journal of Environmental Radioactivity, Vol. 101(2), 185-190.
- Jean-Baptiste, P., Mantsi, F., Dapoigny, A. et Stievenard, M. (1992).** Design and performance of a mass spectrometric facility for measuring helium isotopes in natural waters and for low-level tritium determination by the ^3He ingrowth method. International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes, Vol. 43(7), 881-891.
- Jenkins, R. et Snyder, R. L. (1996).** Introduction to X-ray powder diffractometry. New York : Wiley, Vol. 138(1), 1-25.

- Jiang, S. et He, M. (2008).** Evidence for tritium production in the Earth's interior. *Chinese science bulletin*, Vol. 53(1), 540-547.
- Johar, N., Ahmad, I. et Dufresne, A. (2012).** Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, Vol. 37(1), 93-99.
- Kanters, J. A., Roelofsen, G., Alblas, B. P., Meinders, I. (1977).** The crystal and molecular structure of β -d-fructose, with emphasis on anomeric effect and hydrogen-bond interactions. *Acta Crystallographica Section B*, Vol. 33(3), 665-672.
- Kaufman, S. et Libby, W. F. (1954).** The Natural Distribution of Tritium. *Physical Review*, Vol. 93(6), 1337-1344.
- Keller, R. (1980).** Water-balance in the Federal-Republic of Germany. Geographical Institute, University of Freiburg, Eir.
- Kim, S. B., Baglan, N. et Davis, P. A. (2013).** Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 126(1), 83-91.
- Kim, S. B. et Korolevych, V. (2013).** Quantification of exchangeable and non-exchangeable organically bound tritium (OBT) in vegetation. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 118(1), 9-14.
- Kim, S. B., Workman, W.J.G. et Davis, P. A. (2008).** Experimental investigation of buried tritium in plant and animal tissues. *Fusion Science and Technology*, Vol. 54, 257-260.
- Kim, S. B., Workman, W. G., Korolevych, V. et Davis, P. A. (2012).** Field measurements of key parameters associated with nocturnal OBT formation in vegetables grown under Canadian conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 104(1), 94-100.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A. (2005).** Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 44(22), 3358-3393.
- Kongdee, A., Bechtold, T. (2009).** Influence of ligand type and solution pH on heavy metal ion complexation in cellulosic fibre: model calculations and experimental results. *Cellulose*, Vol. 16(1), 53-63.
- Korolevych, V. Y. et Kim, S. B. (2013).** Relation between the tritium in continuous atmospheric release and the tritium contents of fruits and tubers. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 118(1), 113-120.
- Kratzl, K., Claus, P. et Reichel, G. (1976).** Reactions of lignin and lignin model compounds with ozone. *Tappi*, Vol. 59(11), 86-87.
- Lamar, R. T., Olk, D. C., Mayhew, L., Bloom, P. R. A. (2014).** New standardized method for quantification of humic and fulvic acids in humic ores and commercial products. *Journal of AOAC International*, Vol. 97(3), 721-730
- Lang, A. R. G. et Mason, S. G. (1960).** Tritium exchange between cellulose and water: accessibility measurements and effects of cyclic drying. *Canadian Journal of Chemistry*, Vol. 38(3), 373-387.
- Lee, J. W., Thomas, L. C. et Schmidt, S. J. (2011).** Investigation of the Heating Rate Dependency Associated with the Loss of Crystalline Structure in Sucrose, Glucose, and Fructose Using a Thermal Analysis Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 59(2), 684-701.
- Le Guen, B. (2008).** Impact du tritium autour des centrales nucléaires EDF. *Radioprotection*, Vol. 43(2), 177-191.

- Li, C., Ma, H., Venkaterswaran, S. et Hsiao, B. S. (2020).** Highly efficient and sustainable carboxylated cellulose filters for removal of cationic dyes/heavy metals ions. *Chemical Engineering Journal*, Vol. 389.
- Lichtfouse, E., Wehrung, P. et Albrecht, P. (1998).** Plant wax n-alkanes trapped in soil humin by non-covalent bonds. *Die Naturwissenschaften*, Vol. 85(9), 449-452.
- Lindh, E. L. et Salmén, L. (2017).** Surface accessibility of cellulose fibrils studied by hydrogen–deuterium exchange with water. *Cellulose*, Vol. 24(1), 21-33.
- Liu, Y. et Ng, P. K. W. (2015).** Isolation and characterization of wheat bran starch and endosperm starch of selected soft wheats grown in Michigan and comparison of their physicochemical properties. *Food Chemistry*, Vol. 176, 137-144.
- Lloyd, C. W. (1991).** Cytoskeletal basis of plant growth and form. Academic Press.
- LNE-LNHB/CEA. (2006).** Table de radionucléides.
- Lu, H., Gui, Y., Zheng, L. et Liu, X. (2013).** Morphological, crystalline, thermal and physicochemical properties of cellulose nanocrystals obtained from sweet potato residue. *Food Research International*, Vol. 50(1), 121-128.
- Luzi, F., Puglia, D., Sarasini, F., Tirillò, J., Maffei, G., Zuerro, A., ... et Torre, L. (2019).** Valorization and extraction of cellulose nanocrystals from North African grass: *Ampelodesmos mauritanicus* (Diss). *Carbohydrate Polymers*, Vol. 209(1), 328-337.
- Madivoli, E., Kareru, P., Gachanja, A., Mugo, S., Murigi, M., Kairigo, P. K., ... Njonge, F. (2016).** Adsorption of selected heavy metals on modified nano cellulose. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, Vol.12(3), 1-9.
- Makhatadze, G. I. et Privalov, P. L. (1995).** Energetics of protein structure. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 47, 307-425.
- Malm, C., Nadeau, G. et Genung, L. (1942).** Analysis of Cellulose Derivatives. *Analysis of Cellulose Mixed Esters by the Partition Method*. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, Vol. 14(4), 292-297.
- Mann, J. (1971).** Deuteration and titration. *Cellulose and Cellulose Derivatives*, Vol. 5(4).
- Marcisin, S. R., Engen, J. R. (2010).** Hydrogen exchange mass spectrometry: what is it and what can it tell us? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 397(3), 967– 972.
- Marks, L. et Morrell, R. S. (1931).** Determination of the carbonyl and aldehyde content of organic compounds: estimation of phenylhydrazine. *The Analyst*, Vol. 56, 508-514.
- Maro, D., Tenailleau, L., Fontugne, M., Germain, P., Hébert, D. et Rozet, M. (2005).** Tritium transfer between sea and atmosphere in the English Channel (North Cotentin and Bay of Seine). *Radioprotection*, Vol. 40(1), 589-594.
- Masson, M., Siclet, F., Fournier, M., Gontier, G., Bailly du Bois, P., Fournier, M., Maigret, A., Gontier, G., Bois, P. B. (2005).** Tritium along the French Coast of the English Channel. *Radioprotection*, Vol. 40(1), 621-627.
- McCubbin, D., Leonard, K. S., Bailey, T.A., Williams, J. et Tossell, P. (2001).** Incorporation of organic tritium (³H) by marine organisms and sediment in the Severn Estuary/Bristol channel (UK). *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 42(10), 852-863.

- McFarlane, J. C., Beckert, J. C. et Brown, K. F. (1979).** Tritium in plants. *Journal of environmental quality*, Vol. 8(1), 270-276.
- McNaught, A. et Wilkinson, A. (1997).** *Compendium of chemical terminology*. Oxford: Blackwell Science, Vol. 1669(1).
- Melikoğlu, A. Y., Bilek, S. E. et Cesur, S. (2019).** Optimum alkaline treatment parameters for the extraction of cellulose and production of cellulose nanocrystals from apple pomace. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 215(1), 330-337.
- Melintescu, A. et Galeriu, D. (2017).** Uncertainty of current understanding regarding OBT formation in plants. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 167(1), 134-149.
- Mochochoko, T., Oluwafemi, O. S., Jumbam, D. N. et Songca, S. P. (2013).** Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 98(1), 290-294.
- Momoshima, N., Okai, T., Kaji, T. et Takashima, Y. (1991).** Distribution and Transformation of Various Chemical Forms of Tritium in the Environment. *Radiochimica Acta*, Vol. 54(3).
- Monier, M., Akl, M. A., Ali et W. M. (2014).** Modification and characterization of cellulose cotton fibers for fast extraction of some precious metal ions. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 66, 125-134.
- Moses, V. et Calvin, M. (1959).** Photosynthesis studies with tritiated water. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 33(2), 297-312.
- Muztar, A. J., Slinger, S. J., Burton, J. H. (1978).** The chemical composition of aquatic macrophytes. II. Amino acid composition of the protein and non-protein fractions. *Canadian Journal of Plant Science*, Vol. 58(3), 843-849.
- Ndira, V. (2006).** Substances humiques du sol et du compost analyse élémentaire et groupements atomiques fictifs : vers une approche thermodynamique. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Neuilly, M., CETAMA (1993).** Modélisation et estimation des erreurs de mesure. Ed. Technique et documentation-Lavoisier.
- Nishiyama, Y., Johnson, G. P., French, A. D., Forsyth, V. T. et Langan, P. (2008).** Neutron crystallography, molecular dynamics, and quantum mechanics studies of the nature of hydrogen bonding in cellulose I β . *Biomacromolecules*, Vol. 9(11), 3133-3140.
- Nishiyama, Y., Langan, P. et Chanzy, H. (2002).** Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose II-beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 124, 9074-9082.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H. et Langan, P. (2003).** Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose II-alpha from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 125, 14300-14306.
- Nivesse, A-L., Thibault de Chanvalon, A., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G. et Péron, O. (2020).** An overlooked pool of hydrogen stored in humic matter revealed by isotopic exchange: implication for radioactive ^3H contamination. *Environmental Chemistry Letters*, Vol. 18(2), 475-481.

- Nivesse, A-L., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G. et Péron, O. (2021).** Cellulose, proteins, starch and simple carbohydrates molecules control the hydrogen exchange capacity of bioindicators and foodstuffs. *Chemosphere*.
- Nivesse, A-L., Baglan, N., Montavon, G., Granger, G. et Péron, O. (2021).** Non-intrusive and reliable speciation of organically bound tritium in environmental matrices. *Talanta*.
- Nivesse, A-L., Baglan, N., Montavon, G. et Péron, O. (under review).** New insights into the accessibility of native cellulose to environmental contaminants through an efficient analytical process. *Carbohydrate Polymers*.
- Nordberg, M., Duffus, J. et Templeton, D. M. (2004).** Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 76(5), 1033.
- O'Connell, D. W., Birkinshaw, C. et O'Dwyer, T. F. (2008).** Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review. *Bioresource Technology*, Vol. 99(15), 6709-6724.
- OECD. (2013a).** Draft test guideline: water-sediment *Myriophyllum spicatum* toxicity test. 22nd July 2013.
- OECD. (2013b).** Draft test guideline: water-sediment *Myriophyllum spicatum* toxicity test. 30th November 2013.
- Ogg, C. L., Porter, W. L. et Willits, C. O. (1945).** Determining the Hydroxyl Content of Certain Organic Compounds. *Macro-and Semimicromethods. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, Vol. 17(6), 394-397.
- Okada, S. et Momoshima, N. (1993).** Overview of Tritium: Characteristics, Sources, and Problems. *Health Physics*, Vol. 65(6), 595-609.
- Öztürk, H. B., Vu-Manh, H., Bechtold, T. (2009).** Interaction of cellulose with alkali metal ions and complexed heavy metals. *Lenzinger Berichte*, Vol. 87, 142-150.
- Palomo, M., Peñalver, A., Aguilar, C. et Borrull, F. (2007).** Tritium activity levels in environmental water samples from different origins. *Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 65(9), 1048-1056.
- Paxéus, N. et Wedborg, M. (1985).** Acid-base properties of aquatic fulvic acid. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 169, 87-98.
- Péron, O., Fourné, E., Pastor, L., Gégout, C., Reeves, B., Lethi, H. H., ... et Montavon, G. (2018).** Towards speciation of organically bound tritium and deuterium: Quantification of non-exchangeable forms in carbohydrate molecules. *Chemosphere*, Vol. 196(1), 120-128.
- Péron, O., Gégout, C., Reeves, B., Rousseau, G., Montavon, G. et Landesman, C. (2016).** Anthropogenic tritium in the Loire River estuary, France. *Journal of Sea Research*, Vol. 118, 69-76.
- Peterson, V. L. et West, E. S. (1927).** The volumetric estimation of hydroxyl groups in sugars and other organic compounds. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 74(1), 379-383.
- Pointurier, F., Baglan, N. et Alanic, G. (2004).** A method for the determination of low-level organic-bound tritium activities in environmental samples. *Applied Radiation and Isotopes*, Vol. 61(2), 293-298.
- Pointurier, F., Baglan, N., Alanic, G. et Chiappini, R. (2003).** Determination of organically bound tritium background level in biological samples from a wide area in the south-west of France. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 68(2), 171-189.
- Pönni, R., Kontturi, E. et Vuorinen, T. (2013).** Accessibility of cellulose: Structural changes and their reversibility in aqueous media. *BioResources*, Vol. 93(2), 424-429.

- Reblere, J. (2017).** Nouvelle méthodologie pour la caractérisation de distribution de masses molaires d'échantillons cellulosiques complexes. Université de Toulouse.
- Reishofer, D. et Spirk, S. (2015).** Deuterium and Cellulose: A Comprehensive Review. *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials*, Vol. 271, 93-114.
- Richard, J. F. (2002).** Caractérisation de substances humiques like- comparaison avec des substances humiques naturelles. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Richards, F. M. (1977).** Areas, volumes, packing, and protein structure. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, Vol. 6(1), 151-176.
- Richardson, J. S. (1981).** The anatomy and taxonomy of protein structure. Academic Press, Vol. 34, 167-339.
- RIFE. (2005).** Radioactivity in food and the environment. Report. 11. Scottish Environment Protection Agency (SEPA) - United kingdom.
- Ritchie, J. D. et Perdue, E. M. (2008).** Analytical constraints on acidic functional groups in humic substances. *Organic Geochemistry*, Vol. 39(6), 783-799.
- Sakintuna, B., Budak, O., Dik, T., Yöndem-makascioglu, F. et Kincal, N. (2003).** Hydrolysis of freshly prepared wheat starch fractions and commercial wheat starch using α -amylase. *Chemical Engineering Communications*, Vol. 190, 883-897.
- Schimmelmann, A. (1991).** Determination of the concentration and stable isotopic composition of nonexchangeable hydrogen in organic matter. *Analytical Chemistry*, Vol. 63, 2456-2459.
- Schnitzer, M. et Gupta, U. C. (1965).** Determination of Acidity in Soil Organic Matter. *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 29(3).
- Schnitzer, M. et Skinner, I. M. (1964).** Organo-metallic interactions in soils: 4. Carboxyl and hydroxyl groups in organic matter and metal retention. *Soil Science*, Vol. 99(4), 278-284.
- Schulten, H. R. et Schnitzer, M. (1992).** Structural studies on soil humic acids by curie-point pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Soil Science*, Vol. 153(3), 29-30.
- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E. et Conrad, C. M. (1959).** An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, Vol. 29(10), 786-794.
- Senesi, N. et Chen, Y. (1989).** Interactions of Toxic Organic Chemicals with Humic Substances. Springer Berlin Heidelberg, Vol. 73(1), 37-90.
- Sepall, O. et Mason, S. G. (1961).** Hydrogen exchange between cellulose and water: II. Interconversion of accessible and inaccessible regions. *Canadian Journal of Chemistry*, Vol. 39(10), 1944-1955.
- Showalter, M. (1993).** Structure and function of plant cell wall proteins. *American Society of Plant Biologists*, Vol 5(1), 9-23.
- Shulz, G. E. et Schirmer, R. H. (2013).** Principles of protein structure. Springer Science+Business Media.
- SNP. (2019).** Site internet de la Section Nationale Pomme (SNP). <http://lapomme.org>.
- Sierra, M. (2004).** Influence of amide linkages on acidity determinations of humic substances testing with model mixtures. *Talanta*, Vol. 62(4), 687-693.

- Som, M-P. (2002).** Étude moléculaire des composés organiques de compost : formation, transformation dans les solsaction sur les propriétés des sols.
- Sposito, G., Holtzclaw, K. M. et Keech, D. A. (1977).** Proton binding in fulvic acid extracted from sewage sludge-soil mixtures. *Soil Science Society of America Journal*, Vol. 41(6), 1119.
- Stevenson, F. J. (1982).** *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions.* Edition John Wiley and Sons, Vol. 2(1).
- Straume, T. (1993).** Tritium Risk Assessment. *Health Physics*, Vol. 65(6), 673-682.
- Straume, T. et Carsten, A. L. (1993).** Tritium Radiobiology and Relative Biological Effectiveness: *Health Physics*, Vol. 65(6), 657-672.
- Sun, X.-F., Sun, R.-C., Su, Y. et Sun, J.-X. (2004).** Comparative Study of Crude and Purified Cellulose from Wheat Straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52(4), 839-847.
- Sun, Y. et Cheng, J. (2002).** Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, Vol. 83, 1-11.
- Templeton, D. M. et Fujishiro, H. (2017).** Terminology of elemental speciation – An IUPAC perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, Vol. 352, 424-431.
- Tester, R. F., Karkalas, J. et Qi, X. (2004).** Starch composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, Vol. 39, 151-165.
- Thiebaud-Roux, S., Chalamet, Y., Chenal, J.-M., Joly, N., Delaunay, T. et Descamps, N. (2017).** Etude de dérivés d'amidon : relation entre la structure et le comportement thermomécanique. Université de Lille.
- Thompson, P., Kwamena, N.-O., Ilin, M., Wilk, M. et Clark, I. (2015).** Levels of tritium in soils and vegetation near Canadian nuclear facilities releasing tritium to the atmosphere: implications for environmental models. *Journal of Environmental Radioactivity*, Vol. 140, 105-113.
- Thompson, R. G. et Nelsons, C. D. (1971).** Photosynthetic assimilation and translocation of ³H- and ¹⁴C-organic compounds after ³HHO and ¹⁴CO₂ were simultaneously offered to a primary leaf of soybean. *Canadian Journal of Botany*, Vol. 49(5), 757-766.
- Trache, D., Hussin, M. H., Hui Chuin, C. T., Sabar, S., Fazita, M. R. N., Taiwo, O. F. A., ... et Haafiz, M. K. M. (2016).** Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 93(1), 789-804.
- Trivedi, A., Galeriu, D. et Richardson, R. B. (1997).** Dose Contribution from Metabolized Organically Bound Tritium after Acute Tritiated Water Intakes in Humans. *Health Physics*, Vol. 73(4), 579-586.
- UNSCEAR. (2000).** Sources and effects of ionizing radiation, Exposures to the pulic from a man-made sources of radiation, Annexe C. Comité scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants 1 - Sources. Editor : UNSCEAR.
- UNSCEAR. (2016).** Report to the General Assembly : Sources, effects and risks of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Editor : UNSCEAR.
- Van Soest, P. V. (1963).** Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, Vol. 46, 829-835.

- Verwimp, T., Vandeputte, G. E., Marrant, K. et Delcour, J. A. (2004).** Isolation and characterisation of rye starch. *Journal of Cereal Science*, Vol. 39(1), 85-90.
- West, E. S., Hoagland, C. L. et Curtis, G. H. (1934).** An improved method for the determination of acetyl values of lipids applicable to hydroxylated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 104(1), 627-634.
- Williams, J. L., Russ, R. M., McCubbin, D. et Knowles, J. F. (2001).** An overview of tritium behaviour in the severn Estuary (UK). *Journal of Radiological Protection*, Vol. 21(4), 337-344.
- Wuestenberg, T. (2014).** *Cellulose and Cellulose Derivatives*. John Wiley Sons.
- Xie, X. (Sherry), Cui, S. W., Li, W. et Tsao, R. (2008).** Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Research International*, Vol. 41(9), 882-887.
- Yamada, Y., Itoh, M., Egawa, K., Kiriyama, N., Komura, K. et Ueno, K. (1992).** Effect of labile hydrogens on measurement of tritium preserved in hydrogens of cellulose. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Letters*, Vol. 164(1), 47-57.
- Zepp, R. G. et Schlotzhauer, P. F. (1981).** Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water. *Chemosphere*, Vol. 10(5), 479-486.
- Zerriffi, H. (1996).** Tritium: The environmental, health, budgetary, and strategic effects of the Department of Energy's decision to produce tritium. IEER.
- Zhu, J., Fu, Q., Qiu, G., Liu, Y., Hu, H., Huang, Q. et Violante, A. (2019).** Influence of low molecular weight anionic ligands on the sorption of heavy metals by soil constituents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, Vol. 17(3), 1-10.
- Zolfaghari, M., Drogui, P., Brar, S. K., Buelna, G. et Dubé, R. (2017).** Unwanted metals and hydrophobic contaminants in bioreactor effluents are associated with the presence of humic substances. *Environmental Chemistry Letters*, Vol. 15(3), 489-494.
- Zugmaier, P. (2001).** Conformation and packing of various crystalline cellulose fibers. *Progress in Polymer Science*, 1341-1417.

Annexes

Table des matières

ANNEXE I : PROTOCOLES DE PREPARATION DES MATRICES FILLES EXTRAITES DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES D'ETUDE	212
I.1. EXTRACTION DES GLUCIDES SIMPLES DES POMMES	212
I.2. EXTRACTION DE L'AMIDON DES GRAINS DE BLE	214
I.3. PURIFICATION DE LA PAROI CELLULOSIQUE DU <i>MYRIOPHYLLUM SPICATUM</i>	215
ANNEXE II : COMPOSITIONS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES	218
ANNEXE III : STRUCTURE MOLECULAIRE DES CONSTITUANTS USUELS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES	219
ANNEXE IV : LISTE DES ACIDES AMINES DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES D'ETUDE	222
ANNEXE V : HYGROSCOPICITES DE SELS USUELS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE	223
ANNEXE VI : PARAMETRES DE COMPTAGE POUR LA SCINTILLATION LIQUIDE	224
ANNEXE VII : PROTOCOLES DE DEPROTONATION DES SUBSTANCES HUMIQUES	225
VII.1. L'ACIDITE TOTALE	225
VII.2. LES GROUPES PHENOLS ET CARBOXYLES	226
VII.3. LES GROUPES ALCOOLS ET OH TOTAUX	227
ANNEXE VIII : PROTOCOLE D'ISOLATION DES DIFFERENTES FRACTIONS CONSTITUTIVES DES SUBSTANCES HUMIQUES	228
ANNEXE IX : ETATS D'EQUILIBRE DES ECHANGES ISOTOPIQUES 3H/1H PAR LA METHODE « VOIE DOUCE » SUR L'ENSEMBLE DES MATRICES D'ETUDE	230

ANNEXE I : PROTOCOLES DE PREPARATION DES MATRICES FILLES EXTRAITES DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES D'ETUDE

I.1. EXTRACTION DES GLUCIDES SIMPLES DES POMMES

Les pommes sont très majoritairement constituées de sucres simples (fructose, saccharose et glucose) à forte solubilité dans l'eau, qui augmente en fonction de la température. Pour les pommes, l'eau peut être utilisée comme un extractant simple des sucres solubles mais peut également entraîner la solubilisation de la pectine en grande quantité (impureté principale des sucres extraits de fruits) et procéder à une activation enzymatique entraînant potentiellement la dégradation des sucres initiaux. La température d'extraction employée est également un facteur de modification et/ou de dégradation des protéines des pommes qui peuvent alors directement impacter les paramètres de solubilité et de stabilité des autres constituants. A partir de ces informations, il est possible d'affirmer que l'eau n'est pas un extractant privilégié pour une extraction propre et conservatrice des sucres des pommes.

L'éthanol est un solvant simple avec des affinités connues pour certains composés. La solubilité des sucres simples dans ce solvant est réduite par rapport à l'eau et peut être augmentée en fonction de la température. Pour les pommes, l'utilisation de ce solvant à température ambiante (20°C) jusqu'à sa température d'ébullition (80°C) permet l'insolubilité quasi-totale de la pectine, la désactivation enzymatique et une interaction faible avec les protéines. En ce sens, le protocole d'extraction développé pour les glucides simples des pommes se base sur une extraction à partir d'une solution d'éthanol.

Le protocole observé pour l'extraction des glucides simples de la pomme (matrice « Pomme-Glucides simples ») est détaillé dans la Figure A-1 ci-dessous :

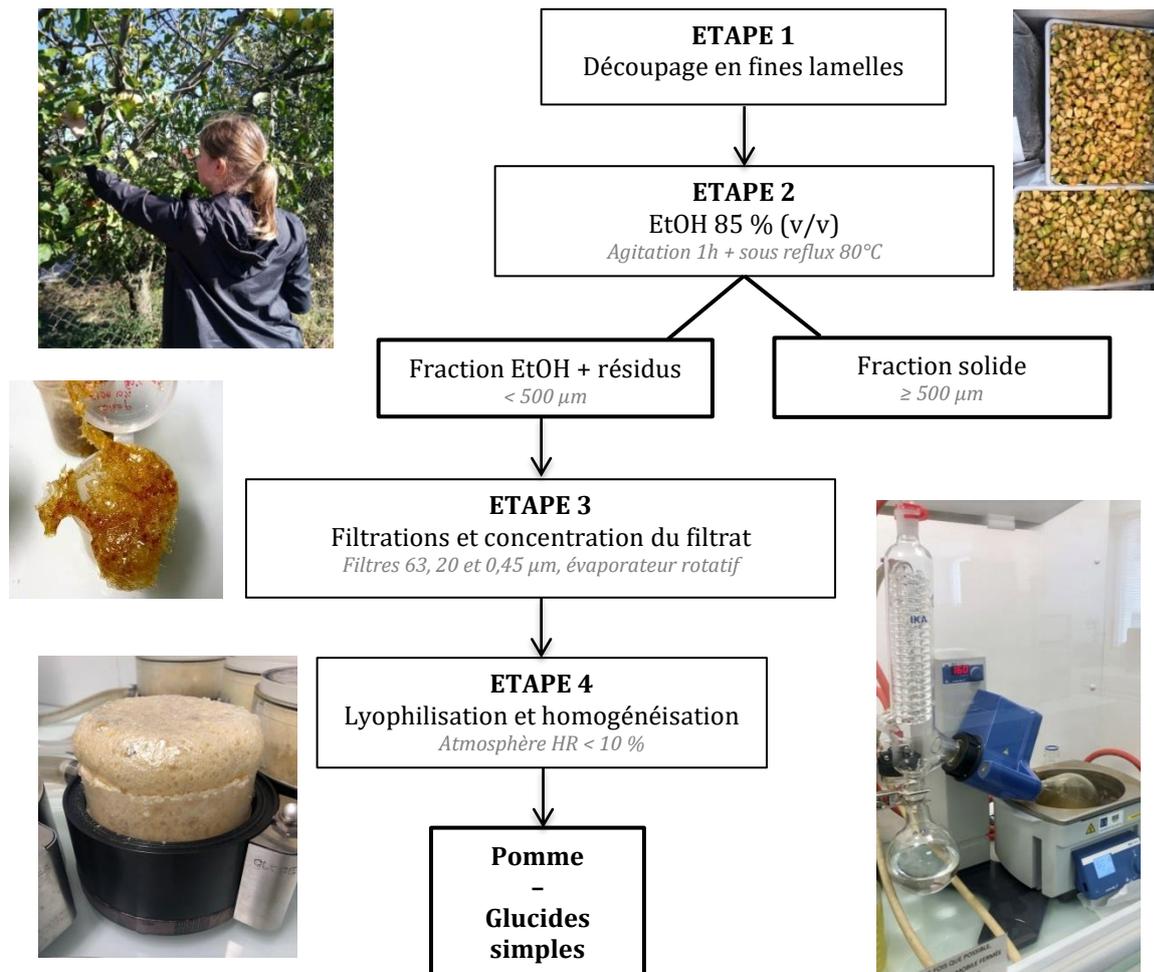


Figure A-1 : Schéma du procédé d'extraction des glucides simples de la pomme.

- Etape 1 : Les pommes sont découpées en fines lamelles afin d'augmenter la surface d'extraction du solide tout en évitant l'ouverture cellulaire et ainsi diminuer le risque de libération de la pectine au cours de l'extraction.
- Etape 2 : Les lamelles sont mises au contact d'une solution d'éthanol 85% (v/v). La solution est placée sous agitation dans un montage à reflux chauffé à 80°C pendant 1 heure.
- Etape 3 : La solution est filtrée successivement à 63, 20 puis 0,45 µm. Le résidu est lavé à l'éthanol puis le filtrat est récupéré et concentré sur un évaporateur rotatif. La concentration du sirop est suspendue avant l'initiation du processus de cristallisation des sucres présents.
- Etape 4 : Le sirop concentré est déshydraté par lyophilisation et la poudre obtenue est homogénéisée sous atmosphère déshumidifiée (HR < 10 %) puis conservée sous vide jusqu'à son utilisation.

I.2. EXTRACTION DE L'AMIDON DES GRAINS DE BLE

Les grains de blé sont majoritairement constitués d'amidon, stocké dans l'albumen du grain entouré par l'enveloppe et constitué essentiellement de fibres et de protéines. L'amidon est une macromolécule à fort degré de polymérisation, insoluble dans la majorité des solvants aqueux. Dans les grains de blé, l'utilisation successive d'une solution faiblement alcaline sur un grain broyé et d'eau ultra pure dans des processus de lavages à répétition permet la séparation progressive des fibres, matières grasses, sucres, protéines et autres impuretés de l'amidon à plus fort poids moléculaire.

Le protocole observé pour l'extraction de l'amidon des grains de blé (matrice « Blé-Amidon ») est détaillé dans la Figure A-2 ci-dessous :

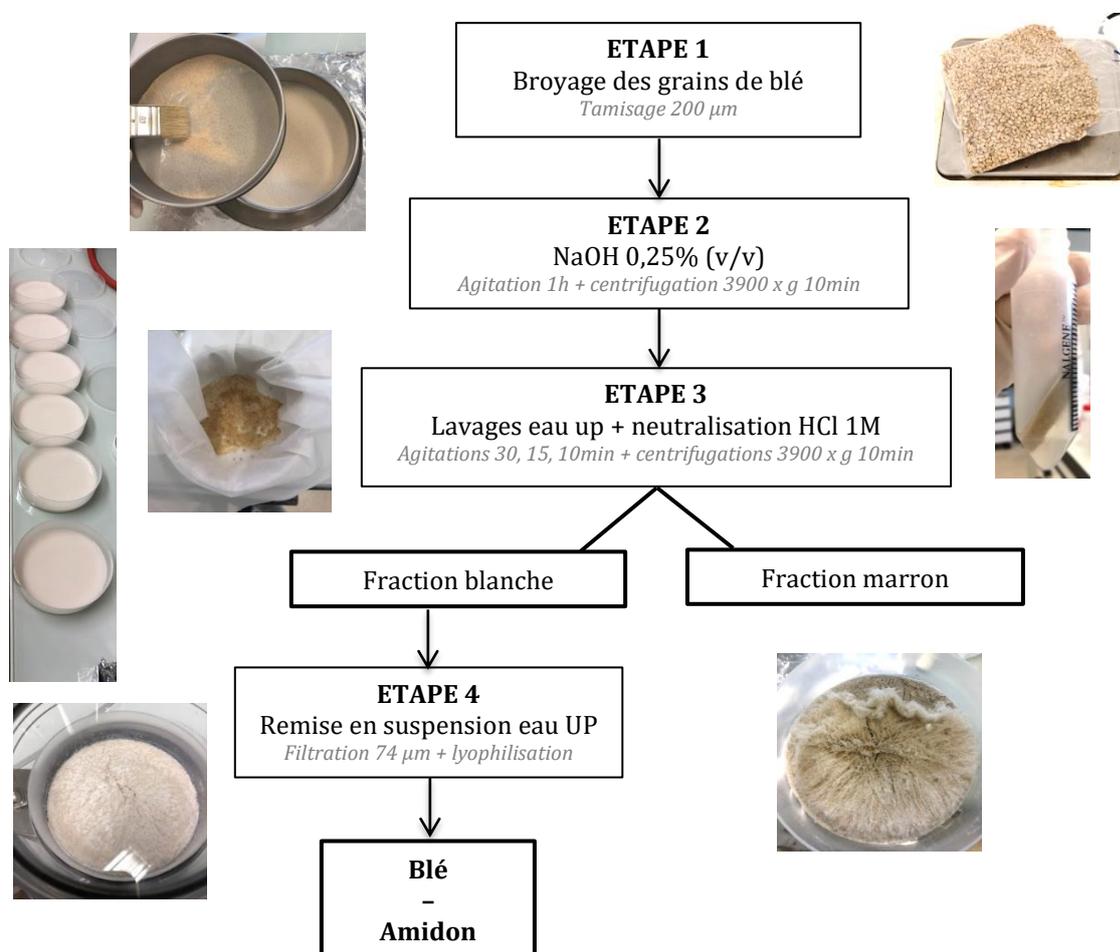


Figure A-2 : Schéma du procédé d'extraction de l'amidon du grain de blé.

- Etape 1 : Les grains de blé sont broyés et tamisés à 200 µm afin d'augmenter la surface de contact pour l'extraction de l'amidon sans modifier sa structure et faciliter le retrait d'une partie du son de blé, constitué essentiellement de fibres.
- Etape 2 : La poudre obtenue est mise au contact d'une solution alcaline NaOH 0,25% (v/v), placée sous agitation pendant 1 heure, suivi d'une centrifugation 3900 x g pendant 10 min. L'alcalinité permet une meilleure mise en solution de la poudre de blé et une préparation à la séparation plus effective des constituants.
- Etape 3 : Le résidu solide suit un processus de trois lavages à l'eau ultra pure avec des agitations respectives de 30, 15 et 10 min, terminés par une neutralisation acide. Chaque étape est suivie d'une centrifugation 3900 x g pendant 10min. Les composés solubles sont éliminés avec la phase liquide et les composés insolubles à plus faible poids moléculaires sont progressivement séparés de l'amidon par la centrifugation.
- Etape 4 : La phase marron supérieure du solide, composée de fibres et de protéines insolubles, est retirée. La phase blanche inférieure du solide, composée d'amidon et de fibres à fort poids moléculaire, est remise en solution dans de l'eau ultra pure, puis filtrée à 74 µm. Les fibres restantes sont retenues et le lait d'amidon obtenu est déshydraté par lyophilisation puis conservé sous vide jusqu'à utilisation.

I.3. PURIFICATION DE LA PAROI CELLULOSIQUE DU *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

Le *Myriophyllum Spicatum* est principalement composé d'une fraction cellulosique, constituée de cellulose, hémicellulose et lignine, et d'une fraction azotée, majoritairement représentée par des protéines. Dans les cellules végétales, le complexe lignocellulosique formant la paroi cellulaire ou paroi cellulosique entoure la fraction cytoplasmique contenant la grande majorité des composés non-cellulosiques. Après utilisation sur ces cellules, l'éthanol est en solvant agissant comme détergent sur la barrière phospholipidique, entraînant la dégradation et la perméabilité de la membrane et l'élimination progressive de la fraction cytoplasmique.

Le protocole observé pour l'extraction de la paroi cellulosique du *Myriophyllum Spicatum* est détaillé dans la Figure A-3 ci-dessous :

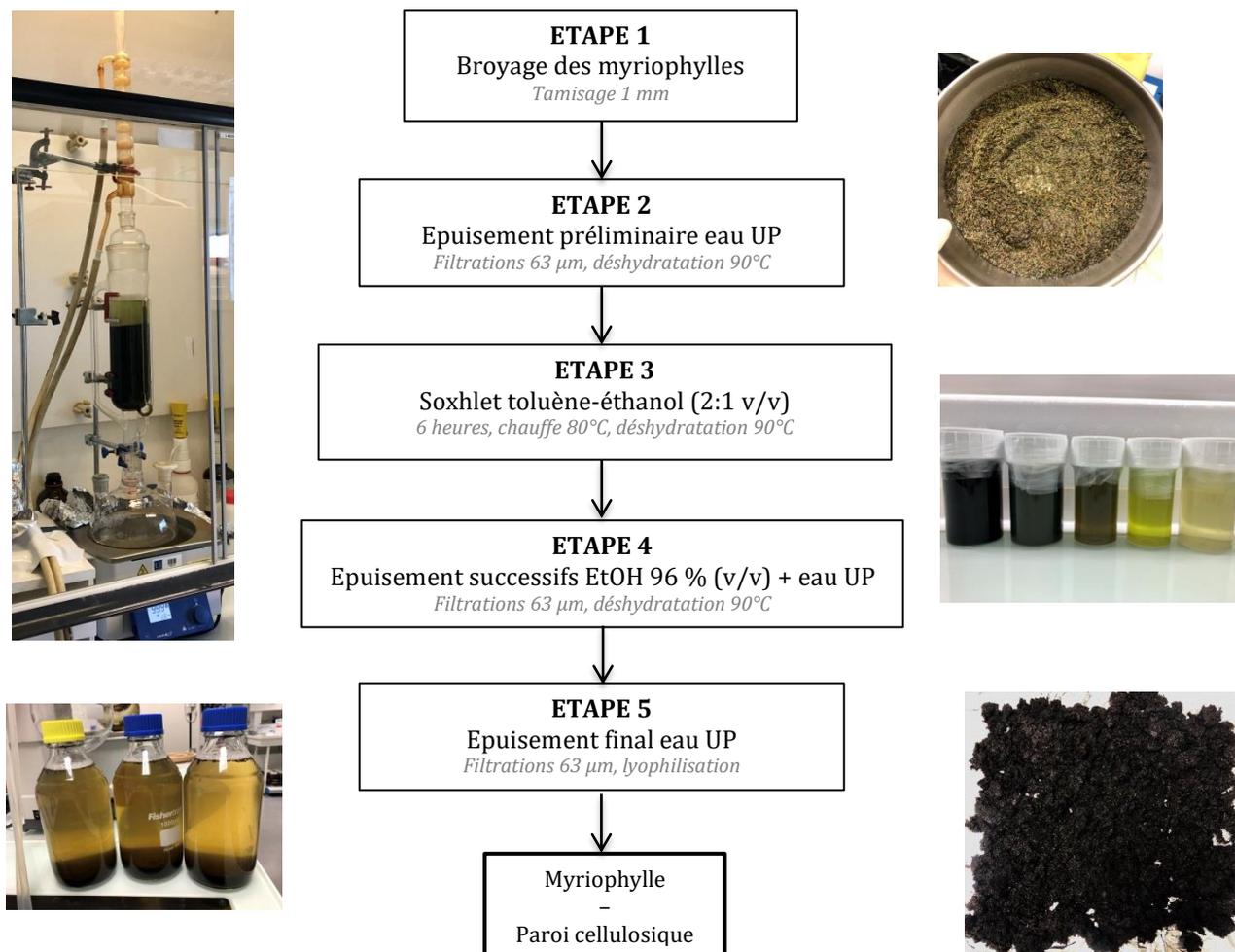


Figure A-3 : Schéma du procédé de purification de la paroi cellulosique du *Myriophyllum Spicatum*.

- **Etape 1** : Les myriophylles sont broyées et tamisées à 1 mm afin d'augmenter la surface de contact pour la purification.
- **Etape 2** : Un épuisement préliminaire à l'eau ultra pure est mené par lavages successifs et filtrations 63 µm. Le solide obtenu est déshydraté en étuve à 90°C et remis en épuisement préliminaire à l'eau jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore. Les constituants solubles dans l'eau sont rendus partiellement accessibles par le broyage et s'éliminent progressivement.
- **Etape 3** : Le solide déshydraté est ensuite traité pendant 6 heures dans un montage Soxhlet avec un mélange toluène-éthanol (2:1 v/v) chauffé à 80°C. A cette température, l'éthanol passe à l'état gazeux et se recondense au niveau du compartiment du solide dans lequel il conduit son action détergente et entraîne l'extraction progressive de la fraction cytoplasmique. Lorsque l'éthanol recondensé atteint un volume critique dans le

compartiment, la solution d'éthanol chargée en fraction cytoplasmique ainsi extraite s'évacue et rejoint le ballon en chauffe. Cette fraction extraite est alors conservée dans le ballon et l'éthanol récupéré peut de nouveau s'évaporer sous l'action de la température et rejoindre le solide sous une forme purifiée. En fonctionnant en circuit fermé, le traitement par Soxhlet permet de traiter un large volume de solide en réutilisant un minimum de solvant extractant. Le solide ainsi appauvri en fraction cytoplasmique est récupéré et déshydraté en étuve à 90°C.

- *Etape 4* : Un épuisement direct à l'éthanol est par la suite mené sur le solide par lavages alternants éthanol 96% (v/v) et eau ultra pure, suivis d'une filtration 63 µm jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore. La diminution de la coloration verte observée dans la solution extractante correspond à l'épuisement en chloroplaste dans la fraction cytoplasmique et permet d'être utilisée comme indicateur coloré de fin effective de l'épuisement.
- *Etape 5* : Un épuisement final à l'eau ultra pure est mené de la même façon que l'épuisement préliminaire. Le solide purifié obtenu est déshydraté par lyophilisation puis conservé sous vide jusqu'à son utilisation.

ANNEXE II : COMPOSITIONS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES

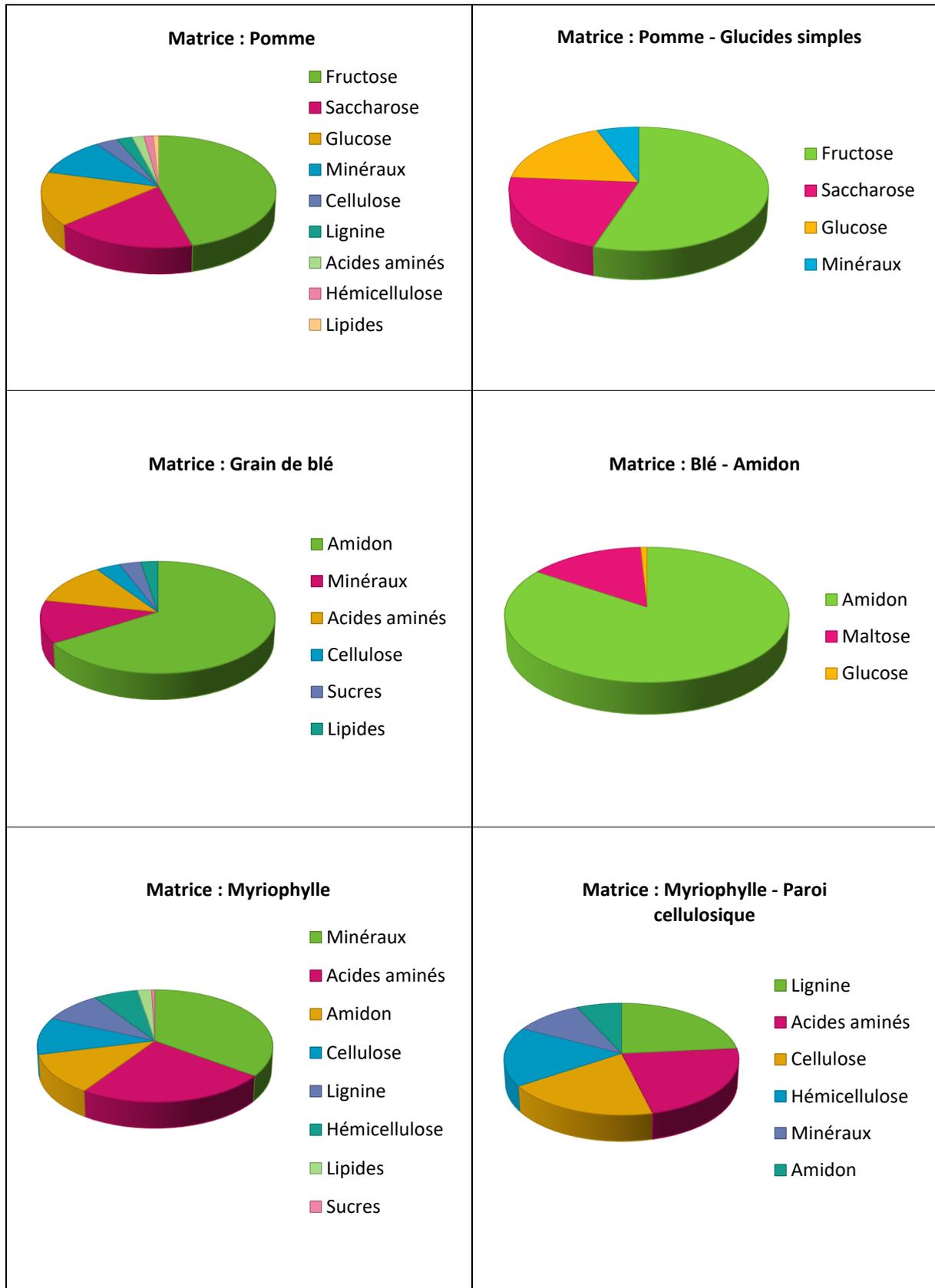
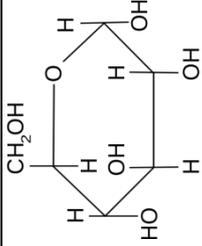
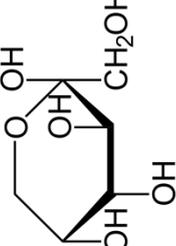
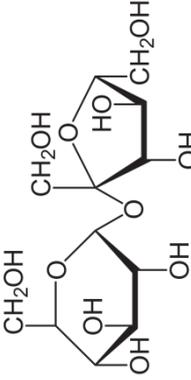
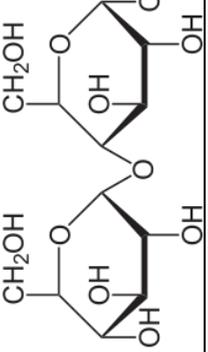
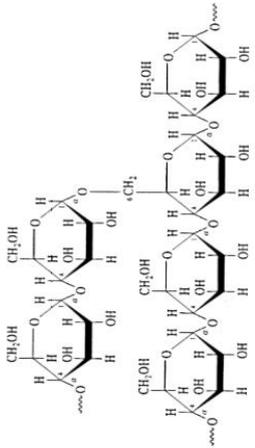
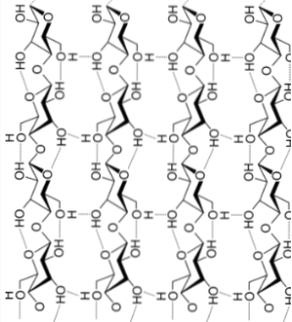
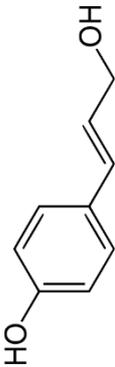
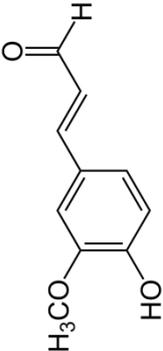
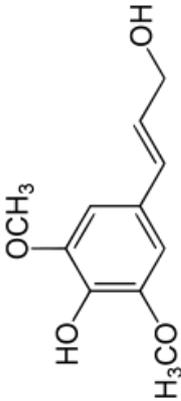


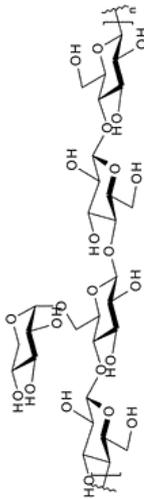
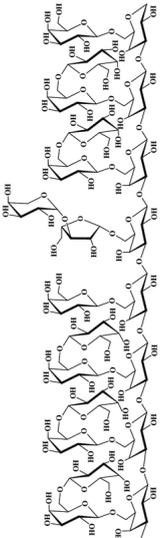
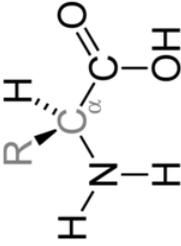
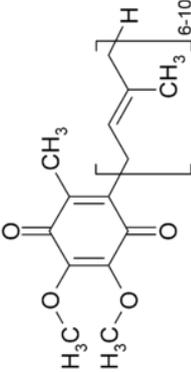
Figure A-4 : Compositions des différentes matrices d'étude.

ANNEXE III : STRUCTURE MOLECULAIRE DES CONSTITUANTS USUELS DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES

Tableau A-1 : Liste des composés analysés dans les matrices environnementales d'étude, leur formule brute, leur structure moléculaire et leur paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{\text{modèle}}$) associé.

Composé	Formule brute	Structure moléculaire	($\alpha_{\text{modèle}}$)
Glucose	(C ₆ H ₁₂ O ₆)		41,7 %
Fructose	(C ₆ H ₁₂ O ₆)		41,7 %
Saccharose	(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)		36,4 %
Maltose	(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)		36,4 %
Amidon	((C ₆ H ₁₀ O ₅) _n)		30 %

Composé	Formule brute	Structure moléculaire	($\alpha_{\text{modèle}}$)
Cellulose	$((C_6H_{10}O_5)_n)$		30 %
Lignine	Coumaryle		20 %
	Coniféryle		16,7 %
	Sinapyle		14,3 %

Composé	Formule brute	Structure moléculaire	$(\alpha_{\text{modèle}})$
Hémicellulose	Xyloglucane $((C_6H_{10}O_5)_n)-$ $((C_5H_{10}O_5)_n)$		29,2 %
	Arabinoglucane $((C_6H_{10}O_5)_n)-$ $((C_5H_{10}O_5)_n)$		25 %
Protéines	$(-NH-C_{\alpha}HR_{\gamma}-CO-)_n$		23 – 58 %
Lipides	$(C_nH_{2n}O_2)$		< 0,1 %

ANNEXE IV : LISTE DES ACIDES AMINES DES MATRICES ENVIRONNEMENTALES D'ETUDE

Tableau A-2 : Liste des acides aminés présents dans les matrices environnementales d'étude, leur formule brute, leur paramètre d'échangeabilité théorique ($\alpha_{modèle}$) associé et leur répartition dans le grain de blé (selon les travaux présentés dans (Péron et al., 2018)) et le *Myriophyllum Spicatum* (selon les travaux présentés dans (Muztar et al., 1978)).

Acide aminé	Formule brute	($\alpha_{modèle}$)	Répartition dans le grain de blé (% en masse)	Répartition dans le myriophylle (% en masse)
Acide glutamique	(C ₅ H ₉ NO ₄)	44 %	3,59 (±0,29)	11,77 (±0,85)
Proline	(C ₅ H ₉ NO ₂)	22 %	1,19 (±0,10)	6,30 (±0,83)
Leucine	(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	23 %	0,85 (±0,07)	8,50 (±1,82)
Acide aspartique	(C ₄ H ₇ NO ₄)	57 %	0,63 (±0,05)	12,17 (±1,73)
Arginine	(C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂)	50 %	0,61 (±0,05)	5,27 (±1,84)
Sérine	(C ₃ H ₇ NO ₃)	57 %	0,62 (±0,05)	4,75 (±0,70)
Phénylalanine	(C ₉ H ₁₁ NO ₂)	27 %	0,54 (±0,04)	5,72 (±1,98)
Valine	(C ₅ H ₁₁ NO ₂)	27 %	0,56 (±0,04)	6,47 (±1,10)
Glycine	(C ₂ H ₅ NO ₂)	6 %	0,53 (±0,04)	5,84 (±0,79)
Alanine	(C ₃ H ₇ NO ₂)	43 %	0,46 (±0,04)	6,00 (±1,05)
Isoleucine	(C ₆ H ₁₃ NO ₂)	23 %	0,44 (±0,04)	4,97 (±0,94)
Lysine	(C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂)	35 %	0,35 (±0,03)	4,34 (±4,09)
Thréonine	(C ₄ H ₉ NO ₃)	44 %	0,39 (±0,03)	4,48 (±0,37)
Tyrosine	(C ₉ H ₁₁ NO ₃)	36 %	0,39 (±0,03)	3,48 (±0,58)
Histidine	(C ₆ H ₉ N ₃ O ₂)	44 %	0,28 (±0,03)	1,63 (±0,32)
Cystéine	(C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂)	50 %	0,30 (±0,03)	0,41 (±0,13)
Méthionine	(C ₅ H ₁₁ NO ₂ S)	27 %	0,20 (±0,03)	1,58 (±0,58)
Tryptophane	(C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂)	33 %	0,16 (±0,03)	1,69 (±1,56)
Ammonium	NH ₄	100 %	-	1,94 (±0,84)

ANNEXE V : HYGROSCOPICITES DE SELS USUELS EN FONCTION DE LA TEMPERATURE

Le caractère hygroscopique des cristaux de sel résulte des interactions positives entre les molécules de vapeur d'eau de l'atmosphère et les espèces ioniques. Dans un système fermé, un équilibre s'établit entre un solvant et sa phase vapeur. Dans ce système clos, une solution saline saturée influence ainsi directement l'humidité relative du volume d'air considéré. En fonction du sel employé, l'humidité relative de l'air peut alors être fixée en considérant le paramètre de température dans le système clos, selon le Tableau A-3 ci-dessous :

Tableau A-3 : Humidité relative de l'air (%) au contact de solutions salines saturées dans un milieu clos et en fonction de la température (°C), d'après (Greenspan, 1977).

Température Sel (°C)	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
LiCl	11,3 ± 0,4 %	11,3 ± 0,4 %	11,3 ± 0,3 %	11,3 ± 0,3 %
MgCl ₂	33,5 ± 0,2 %	33,3 ± 0,2 %	33,1 ± 0,2 %	32,8 ± 0,3 %
MgNO ₃	57,4 ± 0,3 %	55,9 ± 0,3 %	54,4 ± 0,2 %	52,9 ± 0,2 %
NaCl	75,7 ± 0,2 %	75,6 ± 0,1 %	75,5 ± 0,1 %	75,3 ± 0,1 %
KCl	86,8 ± 0,4 %	85,9 ± 0,3 %	85,1 ± 0,3 %	84,3 ± 0,3 %
K ₂ SO ₄	98,2 ± 0,8 %	97,9 ± 0,6 %	97,6 ± 0,5 %	97,3 ± 0,5 %

Température Sel (°C)	30 °C	35 °C	40 °C
LiCl	11,3 ± 0,2 %	11,3 ± 0,2 %	11,2 ± 0,2 %
MgCl ₂	32,4 ± 0,1 %	32,1 ± 0,1 %	31,6 ± 0,1 %
MgNO ₃	51,4 ± 0,2 %	49,9 ± 0,3 %	48,4 ± 0,4 %
NaCl	75,1 ± 0,1 %	74,9 ± 0,1 %	74,7 ± 0,1 %
KCl	83,6 ± 0,3 %	83,0 ± 0,3 %	82,3 ± 0,3 %
K ₂ SO ₄	97,0 ± 0,4 %	96,7 ± 0,4 %	96,4 ± 0,5 %

ANNEXE VI : PARAMETRES DE COMPTAGE POUR LA SCINTILLATION LIQUIDE

Tableau A-4 : Exemples de paramètres de temps de comptage (minutes) par scintillation liquide en fonction de la gamme de concentration en activité du tritium dans l'échantillon (Bq.L^{-1}) et de l'équipement utilisé (Packard modèle Tri-Carb 3170 TR/SL ou Wallac Quantulus modèle 1220) par rapport à une incertitude relative ciblée inférieure ou égale à 10 % et temps de comptage (minutes) optimisé pour l'équipement Wallac Quantulus modèle 1220 avec l'incertitude relative associée.

Activité (Bq.L^{-1})	Temps de comptage Tricarb (min)	Temps de comptage Quantulus (min)	Incertitude relative ciblée (%)	Temps de comptage Quantulus (min)	Incertitude relative (%)
[10 - 30]	$\geq 1\ 500$	≥ 900	≤ 10	1440	8,8
[30 - 50]	$\geq 1\ 000$	≥ 300			6,2
[50 - 70]	≥ 800	≥ 170			5,7
[70 - 90]	≥ 600	≥ 100			5,5
[90 - 110]	≥ 360	≥ 80			5,4
[110 - 130]	≥ 240	≥ 60			5,3
[130 - 150]	≥ 180	≥ 60			5,3

ANNEXE VII : PROTOCOLES DE DEPROTONATION DES SUBSTANCES HUMIQUES

Les matrices environnementales complexes, comme les matrices de type sol, sont composées d'un ensemble hétérogène de biomolécules provenant de la biomasse végétale en décomposition. La grande variabilité de leurs constituants moléculaires et de leurs arrangements structuraux rend difficile leur caractérisation et l'établissement de modèles moléculaires associés. Ainsi, le paramètre ($\alpha_{\text{modèle}}$) basé sur les modèles moléculaires et les liaisons chimiques connues ne peut pas être directement déterminé pour ces matrices complexes.

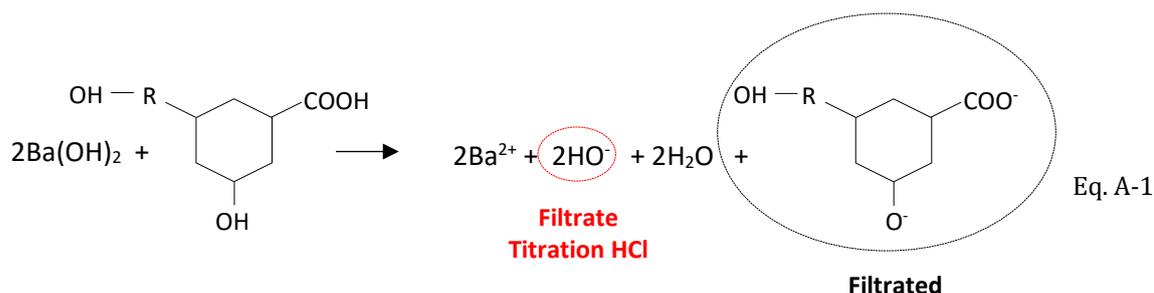
D'après ce qui a précédemment été établi, la fraction hydrogène organiquement lié échangeable dans une matrice environnementale est représentée par l'ensemble des atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons covalentes faibles (vision analytique) dont une partie peut être entravée et rendue indisponible aux échanges par la complexité moléculaire (vision structurale). Dans le cas des substances humiques, il est admis que la grande majorité des atomes d'hydrogène impliqués dans des liaisons covalentes faibles est représentée par les groupements fonctionnels à caractère acide ou alcoolique. La détermination par dosage de ces groupements fonctionnels protonés permet alors d'accéder au paramètre d'échangeabilité basé sur la déprotonation (α_{depro}).

VII.1. L'ACIDITE TOTALE

L'acidité totale représente les groupes carboxyles et phénols protonés et est déterminée par deux méthodes de dosage : le dosage direct et le dosage indirect.

- Pour le dosage direct, l'échantillon à traiter est déshydraté par lyophilisation et placé au contact d'une solution d'eau (Milli-Q, 18,2 M Ω cm) préalablement décarbonatée par élimination du CO₂ dissout. La solution à titrer contenant l'échantillon est dosée par rapport à un blanc avec une solution d'hydroxyde de sodium jusqu'à l'obtention du pH de la solution titrante, compris entre 11 et 12 en fonction de la concentration fixée. Ce dosage est réalisé en deux heures et permet d'obtenir une réponse réactionnelle directe des groupements acides par une déprotonation réalisée en dynamique. Le taux d'hydrogène provenant de l'acidité totale est ainsi directement associé au taux d'ions hydroxydes de la solution titrante ajoutée.

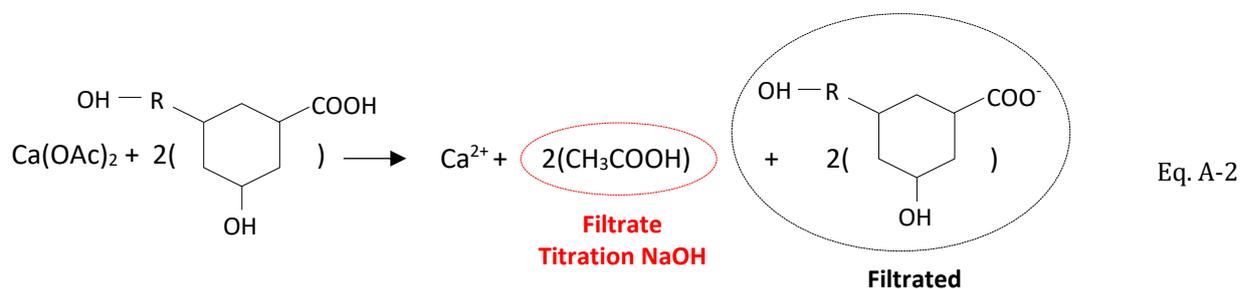
- Pour le dosage indirect, l'échantillon conditionné est placé pendant 24 heures au contact d'une solution saturée d'hydroxyde de baryum décarbonatée et sous atmosphère inerte. Les groupements acides réactifs (i.e. protonés) de l'échantillon vont réagir avec les ions hydroxydes en excès. Après filtration, les ions hydroxydes restants sont dosés par rapport à un blanc avec une solution d'acide chlorhydrique jusqu'à l'obtention d'un pH de 8,4. Ce dosage retour à l'hydroxyde de baryum permet d'obtenir une réponse réactionnelle de l'échantillon sur une période plus étendue que le dosage direct. Pour une information complète, la méthode indirecte est également réalisée avec un temps de contact échantillon-solution alcaline élargi à trois semaines. Le taux d'hydrogène provenant de l'acidité totale est ainsi directement associé au taux d'ions hydroxydes ayant réagi durant le temps de contact solution-échantillon, déterminé par différence entre le blanc titré (ions hydroxydes initialement présents en solution) et la solution (ions hydroxydes restants en solution). La réaction correspondante à cette technique de titrage est présentée selon l'équation (Eq. A-1) suivante :



VII.2. LES GROUPES PHENOLS ET CARBOXYLES

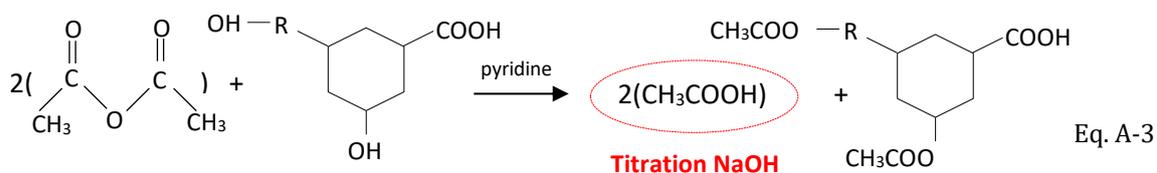
La teneur en **groupes phénols protonés** est déterminée par différence entre l'acidité totale et la teneur en groupes carboxyles. **L'acidité carboxylique** est alors déterminée à partir d'un dosage indirect dans les mêmes conditions que l'acidité totale, avec une solution d'acétate de calcium. Les groupements carboxyles réactifs (i.e. protonés) de l'échantillon vont réagir avec l'acétate entraînant la formation proportionnelle d'acide acétique. Le dosage de l'acide acétique ainsi formé est réalisé sur la solution après filtration par rapport à un blanc, avec une solution d'hydroxyde de sodium, jusqu'à l'obtention d'un pH de 9,8. Le taux d'hydrogène provenant des groupes carboxyles est ainsi directement associé au taux d'acide acétique formé, déterminé à

partir du taux d'ions hydroxydes de la solution titrante ajoutée. La réaction correspondante à cette technique de titrage est présentée selon l'équation (Eq. A-2) suivante :



VII.3. LES GROUPES ALCOOLS ET OH TOTAUX

La teneur en **fonctions alcools** protonées est déterminée par différence entre les groupements OH totaux et les groupes phénols protonés. La teneur en **groupement OH totaux** est déterminée par dosage indirect après une étape d'acétylation. L'échantillon est placé au contact d'une solution de pyridine et d'anhydride acétique et chauffé dans un bain de vapeur. La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution d'eau et de n-butanol. La réaction d'acétylation permet la formation d'acide acétique proportionnellement à la présence de groupements OH protonés. Comme précédemment, le dosage de l'acide acétique ainsi produit est réalisé sur la solution après filtration par rapport à un blanc, avec une solution d'hydroxyde de sodium, jusqu'à l'obtention d'un pH de 9,8. Pour évaluer la contribution des acides libres résiduels, un blanc d'une solution de pyridine est également dosé. Le taux d'hydrogène provenant des groupements OH totaux est ainsi directement associé au taux d'acide acétique formé, déterminé à partir du taux d'ions hydroxydes de la solution titrante ajoutée. La réaction correspondante à cette technique de titrage est présentée selon l'équation (Eq. A-3) suivante :



ANNEXE VIII : PROTOCOLE D'ISOLATION DES DIFFERENTES FRACTIONS CONSTITUTIVES DES SUBSTANCES HUMIQUES

Les substances humiques sont séparées en trois sous-groupes en fonction de leurs caractéristiques de solubilité :

- Les acides fulviques : Solubles à tout pH.
- Les acides humiques : Insolubles en milieu acide.
- Les humines : Insolubles en milieu basique.

Les procédés d'isolation des différentes fractions se basent alors sur ces propriétés de solubilité selon le protocole détaillé en Figure A-5 ci-dessous :

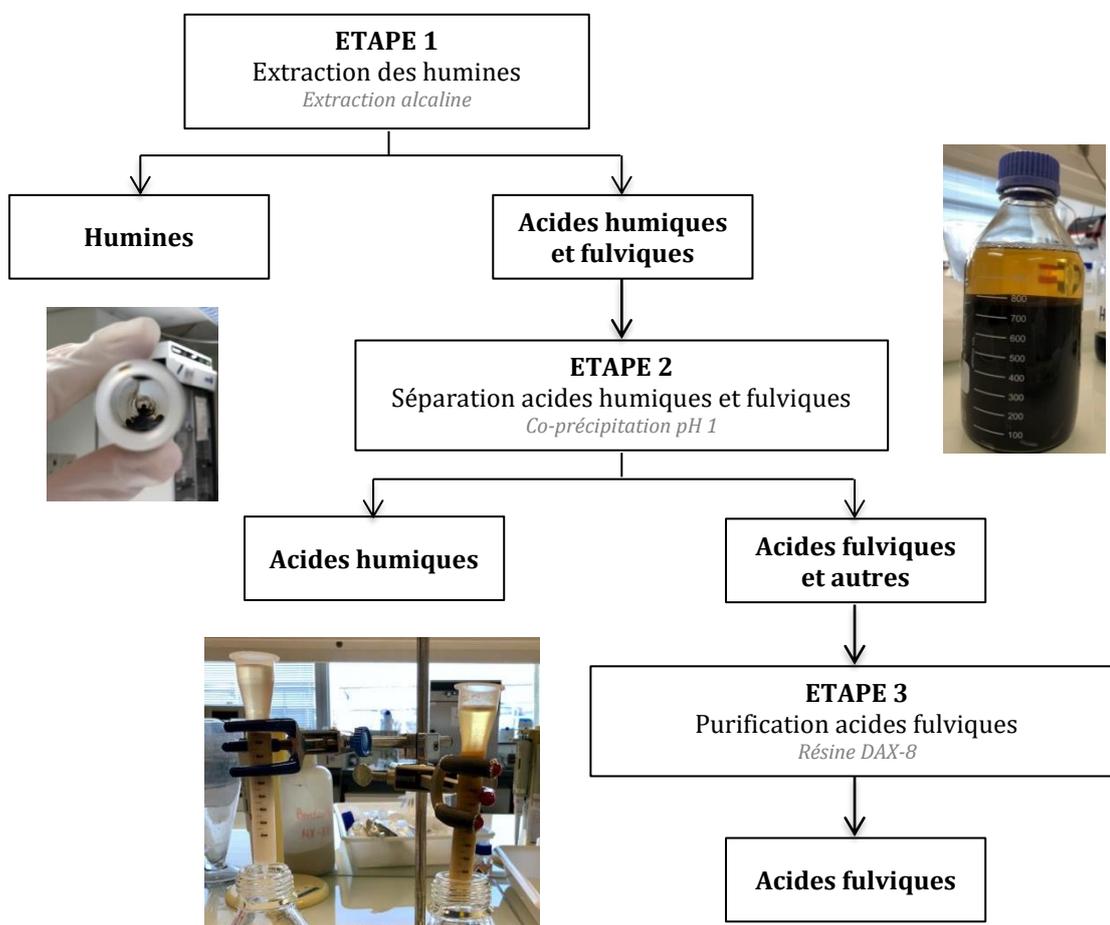


Figure A-5 :Schéma du procédé d'isolation des différentes fractions des substances humiques.

- Etape 1 : Extraction des humines
 - Un échantillon de substance humique déshydraté par lyophilisation est placé au contact d'une solution alcaline de NaOH 0,1 M décarbonatée pendant 24 heures sous agitation. Les acides humiques et fulviques vont se solubiliser dans la solution alcaline tandis que les humines vont rester insolubles.
 - La solution est centrifugée pendant 10 min à 3900 x g et la fraction liquide séparée est mise de côté. La fraction solide est récupérée, déshydratée par lyophilisation et pesée. Le solide ainsi récupéré correspond à la fraction humine.

- Etape 2 : Séparation des acides humiques et des acides fulviques
 - La fraction liquide récupérée après centrifugation est acidifiée avec une solution de HCl concentré jusqu'à l'obtention d'un pH égal à 1. La solution acide est placée sous agitation pendant 24 heures. Les acides humiques vont se solubiliser dans la solution tandis que les acides fulviques vont rester insolubles.
 - La solution est centrifugée pendant 10 min à 3900 x g et la fraction liquide séparée est mise de côté. La fraction solide est récupérée, déshydratée par lyophilisation et pesée. Le solide ainsi récupéré correspond à la fraction acide humique.

- Etape 3 : Purification des acides fulviques
 - La fraction liquide récupérée après centrifugation est traitée sur une colonne contenant une résine hydrophobe DAX 8. Les acides fulviques sont retenus par la résine tandis que les autres acides organiques sont éliminés.
 - Les acides fulviques sont récupérés par élution avec une solution alcaline de NaOH 0,1 M. La fraction liquide ainsi récupérée est déshydratée par lyophilisation et pesée. Le solide ainsi récupéré correspond à la fraction acide fulvique.

Note : Le procédé d'isolation des différentes fractions des substances humiques ne permet pas d'éviter des pertes importantes de matières pendant les différents transferts de solution et les étapes de centrifugation. La quantification possible des différentes fractions récupérées doit être ainsi considérée comme semi-quantitative.

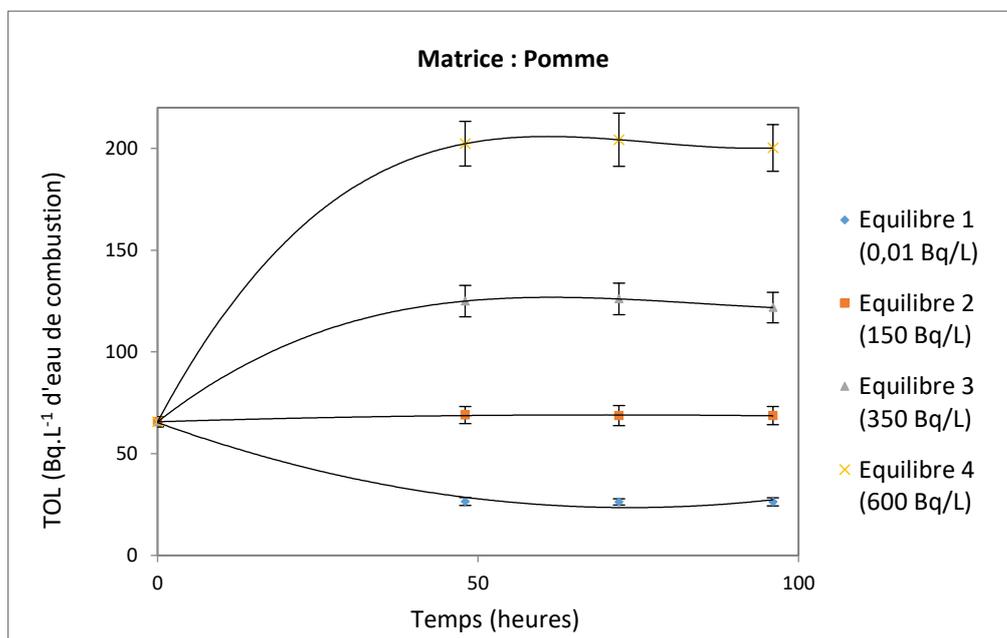
ANNEXE IX : ETATS D'EQUILIBRE DES ECHANGES ISOTOPIQUES 3H/1H PAR LA METHODE « VOIE DOUCE » SUR L'ENSEMBLE DES MATRICES D'ETUDE

Figure A-6 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Pomme » après marquages et appauvrissement en tritium.

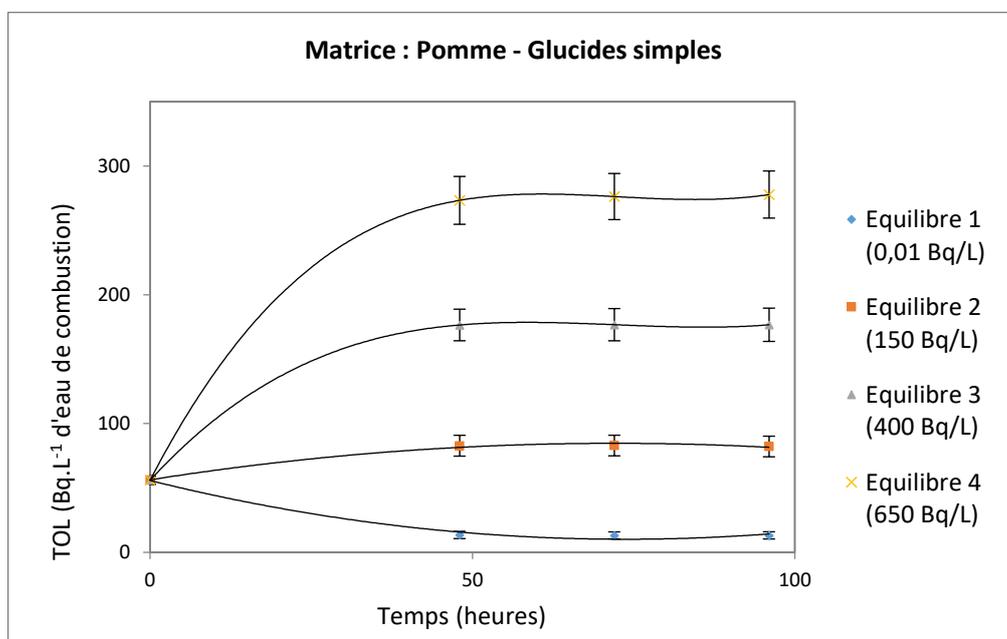


Figure A-7 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Pomme - Glucides simples » après marquages et appauvrissement en tritium.

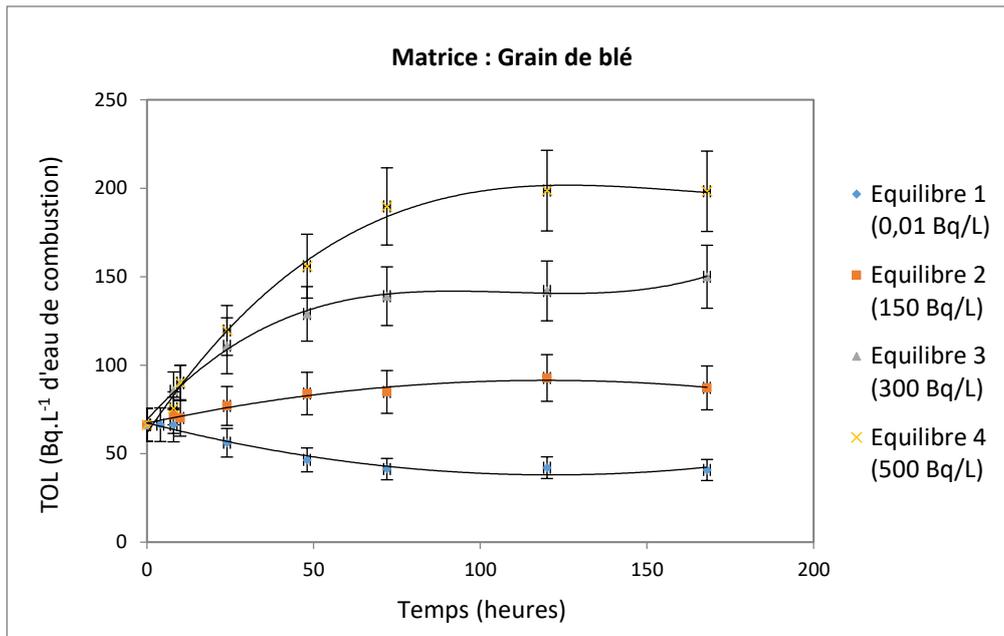


Figure A-8 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Grain de blé » après marquages et appauvrissement en tritium, d'après les travaux présentés dans (Péron et al., 2018).

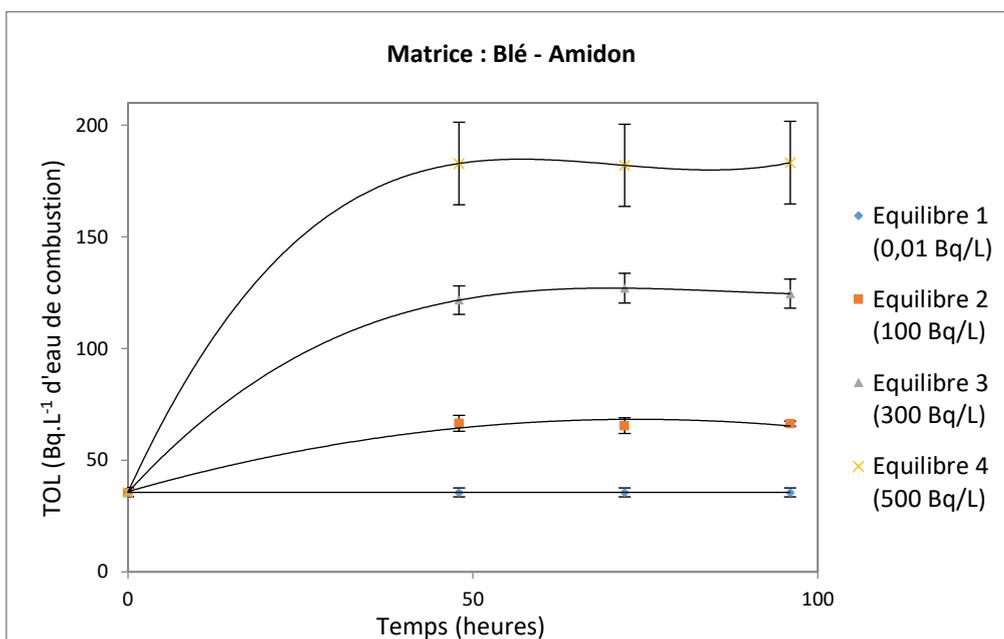


Figure A-9 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Blé - Amidon » après marquages et appauvrissement en tritium.

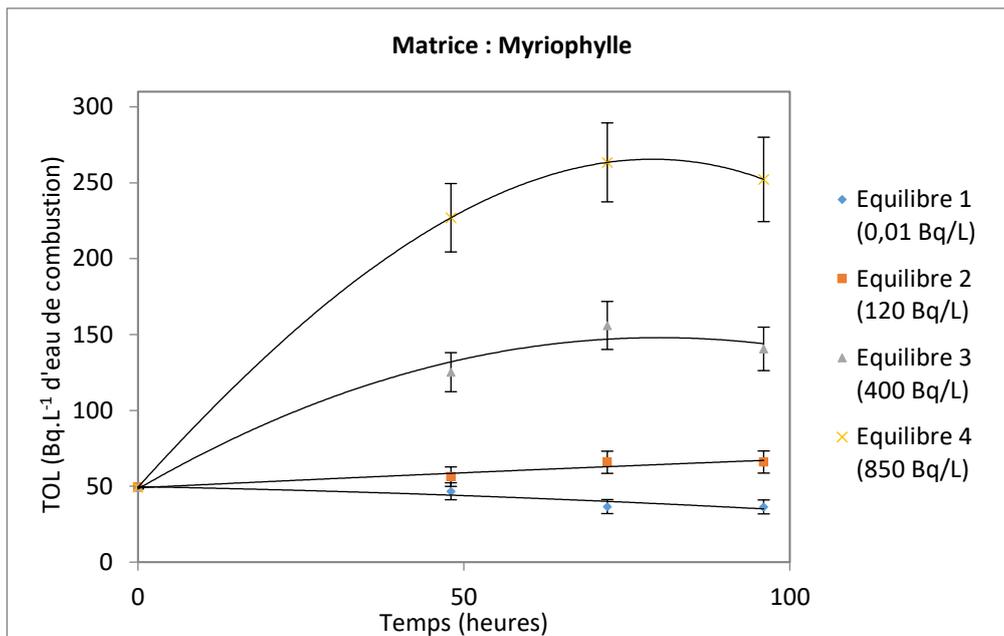


Figure A-10 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Myriophylle » après marquages et appauvrissement en tritium.

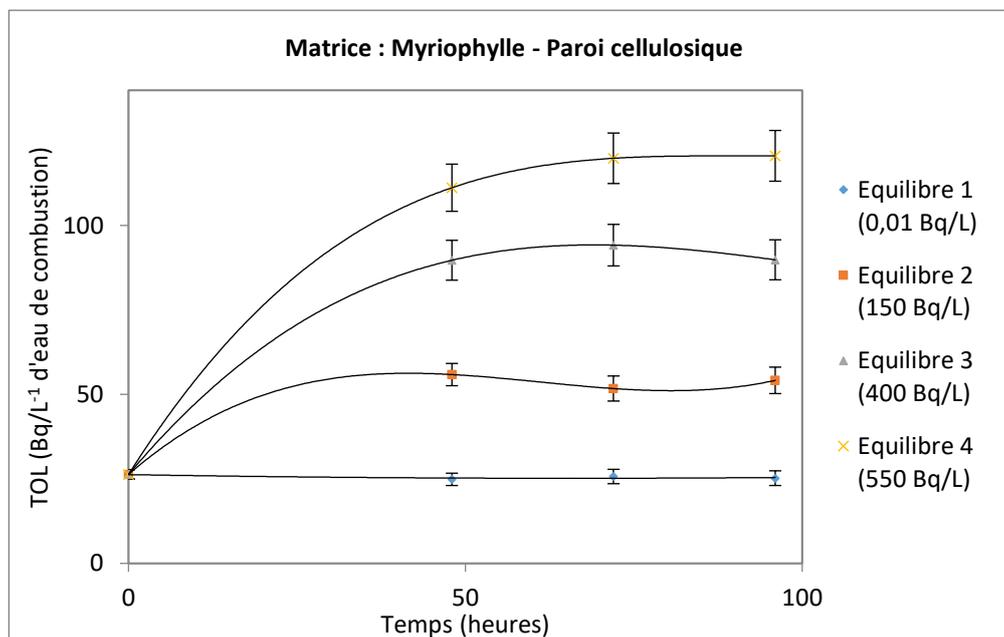


Figure A-11 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Myriophylle - Paroi cellulosique » après marquages et appauvrissement en tritium.

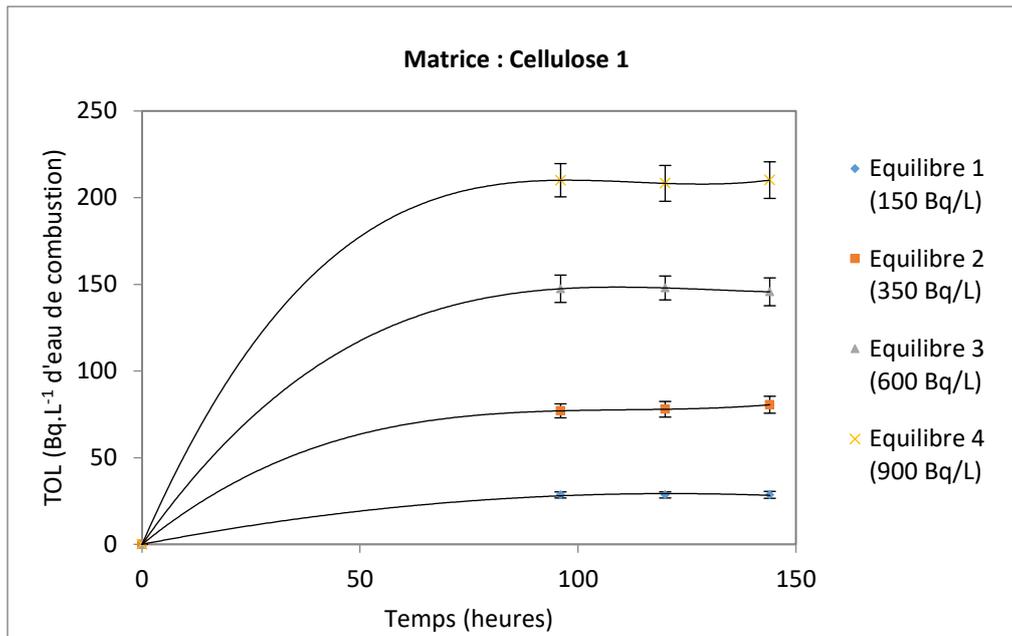


Figure A-12 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 1 » après marquages en tritium.

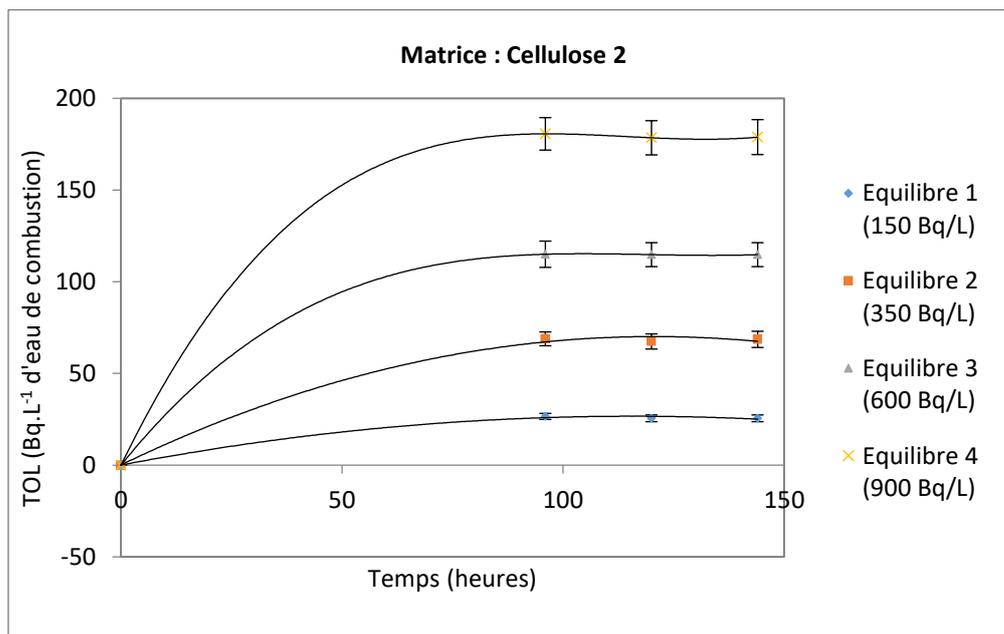


Figure A-13 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 2 » après marquages en tritium.

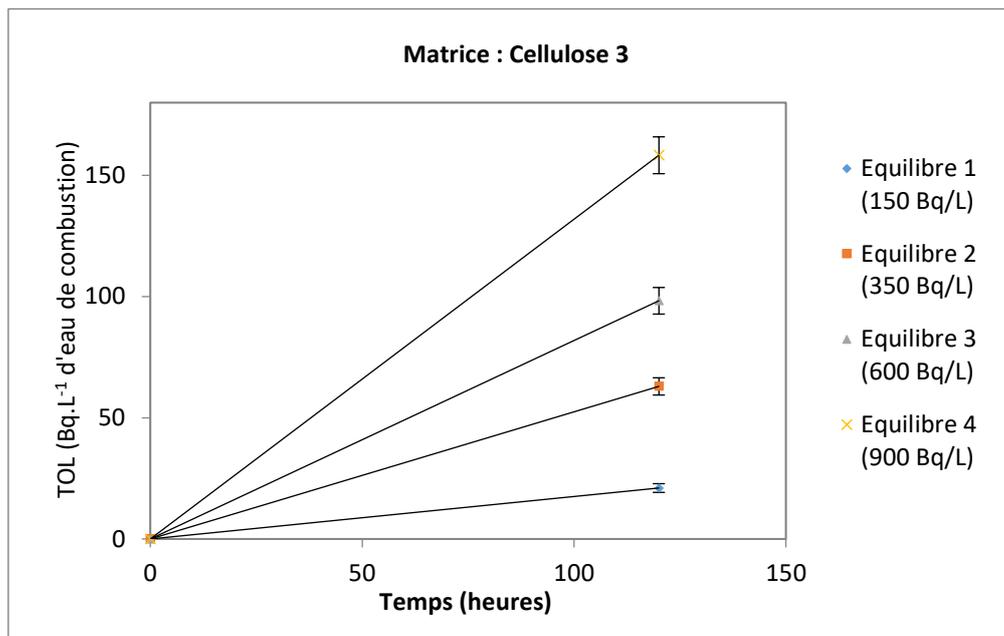


Figure A-14 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 3 » après marquages en tritium.

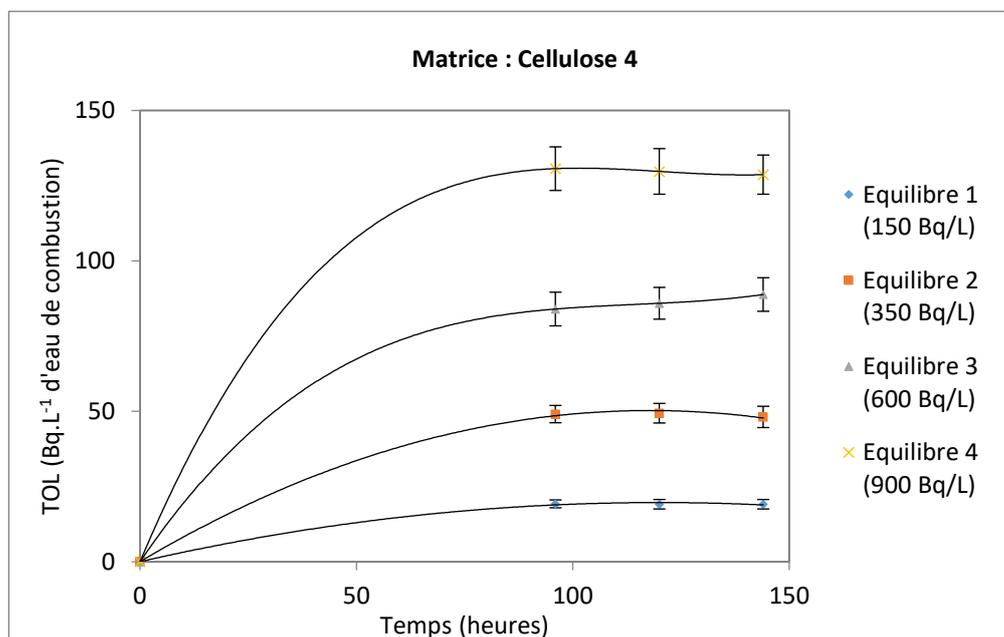


Figure A-15 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « Cellulose 4 » après marquages en tritium.

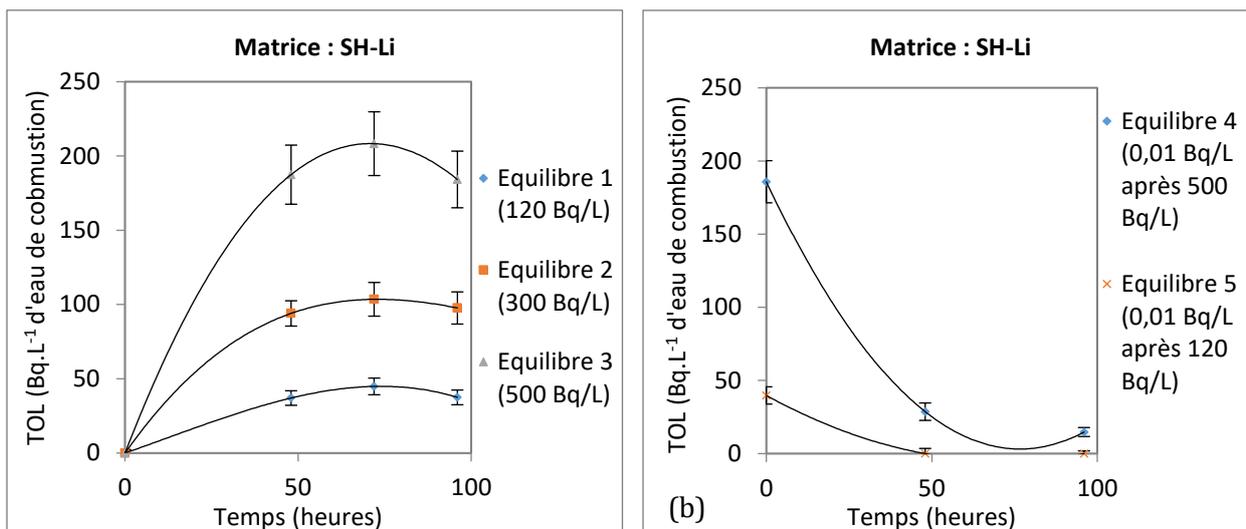


Figure A-16 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « SH-Li » après (a) marquages en tritium et (b) appauvrissements d'échantillons préalablement marqués en tritium.

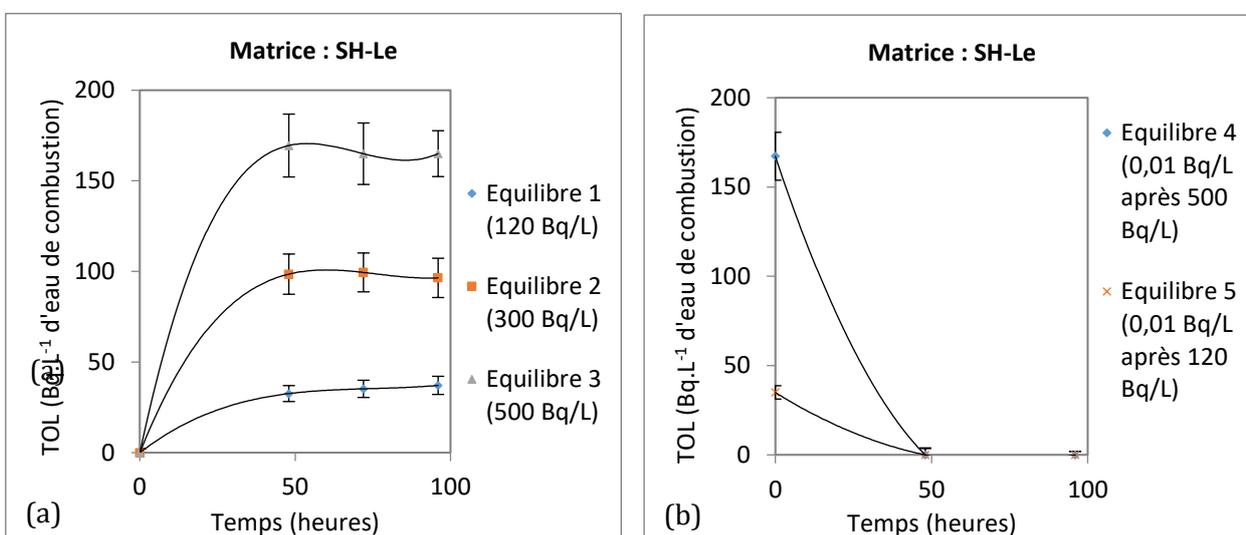


Figure A-17 : Résultats des concentrations en activité du TOL (Bq.L⁻¹ d'eau de combustion) dans les échantillons de la matrice « SH-Le » après (a) marquages en tritium et (b) appauvrissements d'échantillons préalablement marqués en tritium.

Titre : Spéciation du tritium organiquement lié dans les matrices environnementales.

Mots clés : tritium, tritium organiquement lié, spéciation, échange isotopique, hydrogène

Résumé : Le tritium est l'isotope radioactif de l'hydrogène et peut ainsi intégrer les molécules organiques d'un organisme vivant en suivant le cycle de l'eau et former la fraction tritium organiquement lié (TOL). L'existence de deux formes de TOL est communément admise : une fraction dite « échangeable » (TOL-E) et une fraction dite « non-échangeable » (TOL-NE). Cependant, un consensus scientifique fait à ce jour défaut pour décrire la répartition exacte de ces deux formes dans une molécule organique, ce qui engendre des controverses et un manque de clarté sur le comportement du tritium dans l'environnement. Cette étude consiste alors dans un premier temps à établir et comprendre l'implication de structures moléculaires spécifiques des biomolécules usuelles de la biomasse végétale sur la spéciation du TOL dans les matrices environnementales.

Une vue d'ensemble est obtenue sur les capacités d'échange de l'atome d'hydrogène retrouvées dans un ensemble de matrices environnementales et leur constituant majoritaire. Un intérêt majeur est accordé à la molécule de cellulose avec sa structure semi-cristalline et les capacités de stockage du tritium dans les sols sont explorées à travers une étude des capacités d'échange et de déprotonation des atomes d'hydrogène dans la matière riche en substances humiques. Dans un second temps, une étude comparative est proposée entre deux méthodes d'échange isotopique pour l'analyse de la forme TOL-NE et leur fiabilité est évaluée dans le cadre de la surveillance environnementale, mais également pour l'appréhension de la distribution du TOL dans les matrices environnementales

Title : Organically bound tritium speciation in environmental matrices.

Keywords : tritium, organically bound tritium, speciation, isotopic exchange, hydrogen

Abstract : Tritium is the radioactive isotope of hydrogen and can thus integrate the organic molecules of a living organism following the water cycle and form the organically bound tritium fraction (OBT). The existence of two forms of OBT is commonly accepted: an exchangeable fraction (E-OBT) and a non-exchangeable fraction (NE-OBT). However, a scientific consensus to date is lacking to describe the exact distribution of these two forms in an organic molecule, which generates controversies and a lack of clarity on the behavior of tritium in the environment. Therefore, this study consists first of all in establishing and understanding the involvement of specific molecular structures of the usual biomolecules of plant biomass on the speciation of OBT in environmental matrices.

An overview is obtained on the exchange capacities of the hydrogen atom found in a set of environmental matrices and their main constituent. A major interest is focused on the cellulose molecule with its semi-crystalline structure and the storage capacities of tritium in soils are explored through a study of the exchange and deprotonation capacities of hydrogen atoms in matter rich in humic substances. Secondly, a comparative study is proposed between two isotopic exchange methods for the analysis of the NE-OBT fraction and their reliability is evaluated within the environmental monitoring scope, but also for the apprehension of the distribution of OBT in environmental matrices.