



RÉPUBLIQUE  
FRANÇAISE

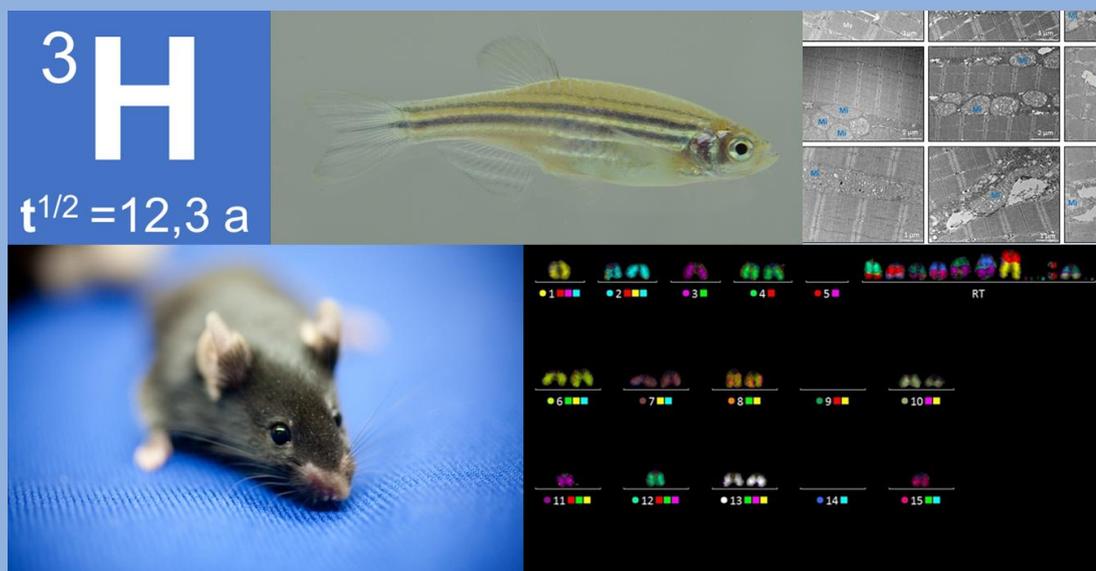
*Liberté  
Égalité  
Fraternité*

**IRSN**

INSTITUT DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

# ACTUALISATION DES CONNAISSANCES SUR LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM

## ETUDES EXPERIMENTALES EN RADIOTOXICOLOGIE HUMAINE ET ENVIRONNEMENTALE



# L'EXPERT PUBLIC DES RISQUES NUCLEAIRES ET RADIOLOGIQUES

*Expertiser, rechercher, protéger, anticiper, partager, telles sont les missions de l'IRSN au service des pouvoirs publics et de la population.*

*La singularité de l'Institut réside dans sa capacité à associer chercheurs et experts pour anticiper les questions à venir sur l'évolution et la maîtrise des risques nucléaires et radiologiques.*

*Les femmes et les hommes de l'IRSN ont à cœur de faire connaître leurs travaux et de partager leurs savoirs avec la société. Ils contribuent ainsi à améliorer l'accès à l'information et le dialogue avec les parties prenantes.*

*L'Institut concourt aux politiques publiques de sûreté et sécurité nucléaires, de santé, d'environnement et de gestion de crise.*

*Établissement Public à caractère Industriel et Commercial (EPIC), sous la tutelle conjointe du ministre chargé de l'Environnement, du ministre de la Défense, et des ministres chargés de l'Énergie, de la Recherche et de la Santé, l'IRSN inscrit pleinement son action dans les politiques de modernisation de l'État avec sa démarche de management des risques et la mise en œuvre d'une politique globale en matière de responsabilité sociétale*

L'INSTITUT  
COMPTE  
ENVIRON **1 770**  
COLLABORATEURS

parmi lesquels  
de nombreux  
ingénieurs,  
médecins,  
agronomes,  
vétérinaires,  
techniciens,  
experts  
et chercheurs.

Pour mener à bien  
ses missions,  
l'IRSN dispose  
D'UN BUDGET  
D'ENVIRON  
**275 M€**



## Table des Matières

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
1.1	GENERALITES SUR LE TRITIUM	7
1.2	FORMES ET NIVEAUX D'EXPOSITION AU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	8
1.3	OBJECTIFS ET DEMARCHES DE RECHERCHE	14
<b>2</b>	<b>ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES EFFETS DU TRITIUM</b>	<b>17</b>
2.1	CONNAISSANCES DANS LES DOMAINES DE LA BIOCINETIQUE ET DE LA DOSIMETRIE DU TRITIUM	17
2.2	CONNAISSANCES DANS LES DOMAINES DE LA RADIOBIOLOGIE ET DE LA RADIOTOXICOLOGIE DU TRITIUM	18
2.3	CONNAISSANCES DANS LE DOMAINE DE LA RADIOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE	19
2.4	CONNAISSANCES DANS LE DOMAINE DE L'EPIDEMIOLOGIE	19
<b>3</b>	<b>NOUVELLES DONNEES SUR LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM</b>	<b>21</b>
3.1	BIOCINETIQUE DU TRITIUM	21
3.2	DOMMAGES A L'ADN ET EFFETS CYTOGENETIQUES DU TRITIUM	27
3.3	MARQUEURS DE TOXICITE TISSULAIRE DU TRITIUM	34
3.4	EFFETS DU TRITIUM SUR L'EMBRYON ET LE FCETUS	44
3.5	EFFICACITE BIOLOGIQUE RELATIVE DU TRITIUM	48
<b>4</b>	<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>53</b>
4.1	RESULTATS PRINCIPAUX DU PROGRAMME DE RECHERCHE DE L'IRSN	53
4.2	DOMAINE DE VALIDITE DES DONNEES OBTENUES	54
4.3	PERSPECTIVES DE RECHERCHE SUR LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM	56
	<b>SOURCES DE FINANCEMENT</b>	<b>57</b>
	<b>ETHIQUE ET EXPERIMENTATION ANIMALE</b>	<b>57</b>
	<b>LISTE DES REFERENCES</b>	<b>58</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>62</b>
	ANNEXE 1 : APPROCHE EXPERIMENTALE EN RADIOTOXICOLOGIE HUMAINE (MODELE RONGEUR)	62
	ANNEXE 2 : APPROCHE EXPERIMENTALE EN RADIOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE (MODELE POISSON)	64
	ANNEXE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE DE CNL SUR LE RISQUE DE CANCER ASSOCIE AU TRITIUM (MODELE RONGEUR)	66

## Résumé

Ce rapport fait le point sur l'état des connaissances relatives aux effets biologiques du tritium. Il vient en complément des deux rapports précédemment publiés par l'IRSN sur les connaissances acquises sur le comportement du tritium dans l'environnement (IRSN, 2017) et sur la validité des critères de qualité radiologique appliqués au tritium dans les eaux destinées à la consommation humaine (IRSN, 2020).

Il détaille les études expérimentales menées par l'IRSN en radiotoxicologie humaine et environnementale du tritium depuis 2010 en collaboration avec CNL (Canadian Nuclear Laboratories). Ce programme de recherche sur les effets biologiques du tritium répond en particulier à certaines des recommandations émises par l'ASN et l'UNSCEAR (ASN, 2010 ; UNSCEAR, 2017) au travers de cinq axes principaux : biocinétique, dommages à l'ADN et effets cytogénétiques, marqueurs de toxicité tissulaires, effets sur l'embryon ou le fœtus, et efficacité biologique relative du tritium. Les expérimentations réalisées permettent en particulier d'améliorer les connaissances sur les effets du tritium organiquement lié (TOL), moins bien documentés que ceux du tritium libre (eau tritiée HTO). Une force du programme est le nombre et la diversité des effets biologiques mesurés, plus élevés que ce qui est couramment rencontré dans la littérature scientifique antérieure, à la fois sur des modèles biologiques de rongeurs et de poissons. Par ailleurs, le choix a été fait de considérer des conditions d'exposition *via* l'ingestion sur des durées particulièrement longues (plusieurs mois), permettant de mimer une exposition chronique. Différents niveaux de concentration ont été utilisés, dont les plus faibles permettent de refléter des situations d'exposition environnementale extrêmes chez les poissons.

Ce programme de recherche a permis de dégager les conclusions suivantes :

- Les résultats obtenus chez la souris indiquent une biocinétique du TOL similaire à celle de l'HTO. Ce résultat surprenant au regard de la littérature scientifique (la biocinétique du tritium libre est généralement considérée comme plus rapide que celle du TOL) pourrait s'expliquer par la forme particulière de TOL utilisée et par le mode d'administration utilisé ;
- A durée et concentration égale d'exposition, le TOL a produit une réponse biologique plus importante que l'HTO même si, avec les formes spécifiques de TOL considérées, la biocinétique n'est pas apparue très différente entre les deux formes de tritium ;
- Chez le rongeur, aux concentrations les plus faibles considérées (10 kBq/L) très peu des indicateurs biologiques étudiés ont montré un changement statistiquement significatif. Aucune anomalie tissulaire macroscopique et histologique n'a été mise en évidence quelles que soient la forme et la concentration de tritium étudiées ;
- Chez les poissons adultes, les réponses biologiques étudiées n'ont pas été altérées significativement à la plus faible concentration testée (12 kBq/L). Aucune altération des paramètres importants pour la dynamique des populations - survie, croissance ou développement - n'a été observée ;
- L'étude du développement embryonnaire chez les poissons n'a montré aucune malformation ou mortalité embryonnaire jusqu'à la concentration de  $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L d'HTO (dose de 180 mGy) ;
- L'Efficacité Biologique Relative (EBR) pour le TOL semble plus élevée que celle obtenue généralement pour l'HTO. Ceci est cohérent avec les données de la littérature et peut contribuer à remettre en question l'usage d'un facteur de pondération unique pour l'ensemble des émetteurs beta. Dans l'attente d'une éventuelle évolution sur ce point, l'IRSN estime que l'usage d'une EBR de 2 peut être considéré pour des évaluations de risque individuel lié au tritium ou pour une analyse de sensibilité dans une étude d'impact.

Hormis l'observation d'une biocinétique du TOL similaire à celle de l'HTO, les résultats obtenus sont globalement en phase avec la littérature scientifique, et complètent les connaissances antérieures.

## Liste des acronymes

AChE : Acétylcholinestérase  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AIEA : Agence Internationale de l'Énergie Atomique  
AOP : Adverse Outcome Pathways  
ARN : Acide RiboNucléique  
ASN : Autorité de Sûreté Nucléaire  
Bq : Becquerel  
CANDU : CANada Deuterium Uranium  
CDB/CSB : Cassures Double Brin / Cassures Simple Brin de l'ADN  
CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives  
CIPR : Commission Internationale de Protection Radiologique  
CNL : Canadian Nuclear Laboratories  
CNPE : Centrale Nucléaire de Production d'Electricité  
DCRL : Derived Consideration Reference Levels  
EBR : Efficacité Biologique Relative  
ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène  
ET : Ecart-Type  
F1, F2, F3 : 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération (pour les effets sur la descendance)  
 $\gamma$ H2AX : forme phosphorylée de l'histone H2AX  
Gy : Gray  
HTO : eau tritiée  
JPF : Jours Post Fécondation  
MET : Microscope Electronique à Transmission  
mFISH : hybridation *in situ* en fluorescence  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
RedOx : oxydo-réducteur  
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction  
SOD : SuperOxyde Dismutase  
Sv : Sievert  
TOL : Tritium Organiquement Lié (OBT pour Organically Bound Tritium)  
TRANSAT : TRANSversal Actions for Tritium  
UNSCEAR : Comité Scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants  
 $W_R$  : facteur de pondération des rayonnements

## Mots-clés

Tritium, tritium organiquement lié (TOL), eau tritiée (HTO), effets biologiques, radiotoxicologie humaine et environnementale

# 1 INTRODUCTION

Depuis 2010, plusieurs revues ont été publiées sur le tritium, dont celle coordonnée par l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) et éditée sous la forme d'un livre blanc (ASN, 2010), auquel l'IRSN a contribué. La Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) a publié un rapport décrivant les biocinétiques et la dosimétrie du tritium incorporé dans un contexte professionnel (ICRP, 2016) et le rapport du Comité Scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants (UNSCEAR) a présenté une revue détaillée des connaissances sur la biocinétique, la dosimétrie et les effets biologiques et sanitaires du tritium (UNSCEAR, 2017).

En 2017, l'IRSN a publié un rapport de synthèse sur les connaissances acquises sur le comportement du tritium dans l'environnement (IRSN, 2017). Ce rapport présentait les avancées de la recherche, en s'appuyant sur une revue de la littérature internationale ainsi que sur les travaux réalisés au sein de l'IRSN. Un rapport de l'IRSN sur la validité des critères de qualité radiologique appliqués au tritium dans les eaux destinées à la consommation humaine a également été publié en 2020 (IRSN, 2020).

Le présent rapport complète ces publications récentes de l'IRSN en s'intéressant spécifiquement aux effets biologiques du tritium. Il présente en premier lieu un état de l'art des connaissances sur les effets biologiques et sanitaires du tritium. Il détaille ensuite les études expérimentales menées par l'IRSN depuis 2010 sur la radiotoxicologie humaine et environnementale du tritium, en particulier dans le cadre d'un programme de recherche conduit en collaboration avec CNL (Canadian Nuclear Laboratories). Les résultats de ce programme sont discutés dans le contexte des connaissances scientifiques actuelles, et les enseignements principaux qui en découlent sont identifiés.

## 1.1 GENERALITES SUR LE TRITIUM

Le tritium ( $^3\text{H}$ ) est un émetteur bêta de faible énergie (énergie moyenne de 5,7 keV) ayant une période de décroissance radioactive de 12,3 ans. Il est classé dans le groupe des radionucléides ayant une faible radiotoxicité (IRSN, 2001). C'est un radionucléide d'origine naturelle et artificielle.

Le tritium est naturellement produit dans les hautes couches de l'atmosphère (radionucléide cosmogénique) et alimente continuellement la troposphère puis l'hydrosphère car il interagit rapidement avec l'oxygène de l'air pour former des molécules d'eau tritiée (HTO). La quantité à l'équilibre de tritium d'origine naturelle est, à l'échelle du globe, de l'ordre de  $10^{15}$  kBq<sup>1</sup>.

Les essais nucléaires ont introduit environ  $2 \cdot 10^{17}$  kBq de tritium dans l'atmosphère et ont conduit à augmenter de près d'un facteur 1000 les concentrations en tritium dans les eaux de pluie de l'ensemble de l'hémisphère nord, au maximum des retombées en 1963 (Miskel, 1973 ; Schell et al., 1974 ; Mitchel, 1976), conduisant à un marquage de l'ensemble des compartiments de la biosphère<sup>2</sup>. Les traces de ces retombées sont enregistrées dans la cellulose des cernes des arbres, à l'instar du césium-137, témoignant du marquage global de la biomasse terrestre (Brown, 1979 ; Kozak, 1993 ; Fuma et Inoue, 1995). De récents travaux montrent que ces stocks accumulés au sein de la matière organique ont été progressivement transférés vers les cours d'eau au gré de la dégradation de la matière organique et de

---

<sup>1</sup> Afin de faciliter la lecture du rapport et la comparaison entre les différentes sections, il a été décidé d'utiliser une notation de l'activité du tritium en kilo Becquerel (kBq) de façon homogène sur l'ensemble du rapport.

<sup>2</sup> La biosphère représente la couche géochimique de la Terre où la vie a pu se développer, se maintenir et se diversifier. Elle inclut l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère.

l'érosion des sols, conduisant à un marquage des sédiments des rivières en tritium organiquement lié pendant plusieurs décennies (Eyrolle-Boyer et al., 2015a).

Aujourd'hui, on estime qu'environ  $2,8 \cdot 10^{13}$  kBq de tritium sont rejetés chaque année par les installations nucléaires implantées dans le monde,  $1,2 \cdot 10^{13}$  kBq dans l'atmosphère et  $1,6 \cdot 10^{13}$  kBq dans les milieux aquatiques continentaux et marins (UNSCEAR, 2000, 2006, 2017). En France, le tritium est à l'heure actuelle le radionucléide prépondérant dans les rejets des industries nucléaires en termes d'activité.

Outre les rejets de l'industrie nucléaire, d'autres sources de tritium d'origine artificielle, mal identifiées car diffuses, sont également observables dans l'environnement, de l'échelle locale à régionale, et de manière sporadique. Elles sont à mettre en relation avec des effluents ou des résidus contenant des molécules marquées produites par des procédés de technologie industrielle (origine dite « technogénique »). Les molécules organiques marquées au tritium rejetées par l'industrie pharmaceutique Amersham (Baie de Cardiff, UK) en sont une illustration. Les résidus de peinture tritiée utilisée dans les ateliers d'horlogerie implantés dans les bassins versants du haut Rhône en sont une autre. Le tritium a été utilisé au milieu du siècle dernier pour ses propriétés de luminescence, en particulier au sein des ateliers d'horlogerie (Krejci et Zeller, 1979) en remplacement du radium-226 utilisé dès 1920. Le tritium est aussi utilisé dans les hôpitaux et les laboratoires de recherche, comme traceur dans l'exploration pétrolière et gazière, et en hydrogéologie et hydrologie (Thompson et al., 2011 ; Galeriu et al., 2005 ; WHO, 1983).

## 1.2 FORMES ET NIVEAUX D'EXPOSITION AU TRITIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

L'état de l'art (IRSN, 2017) montre que la forme majoritaire du tritium dans la biosphère est l'eau tritiée (HTO) et que la voie prépondérante d'exposition pour les membres du public est l'ingestion. En France, les calculs d'impact dosimétrique indiquent que les rejets de tritium émis par les Centrales Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE) ne contribuent que de manière marginale à l'exposition du public. En effet, au voisinage de ces installations, la contribution du tritium à la dose varie entre une dizaine de nano-sieverts et quelques centaines de nano-sieverts par an (Le Guen, 2008 ; Le Guen et al., 2009 ; ASN, 2010, IRSN 2017), suivant les sites et les années, mais reste toujours inférieure à 0,001 mSv par an. Pour les rejets de l'usine de la Hague, la dose due aux rejets de tritium dans les effluents liquide et gazeux ne dépasse pas 2% de la dose due aux rejets de l'ensemble des radionucléides rejetés (ASN, 2010).

### 1.2.1 Formes de tritium dans l'environnement

Le tritium est un des isotopes de l'hydrogène. A l'instar de cet élément, il est ainsi particulièrement mobile et échangeable au sein de l'environnement, que ce soit dans les composantes abiotiques et biologiques de l'environnement, ou entre les différents compartiments environnementaux, où il se retrouve sous des formes diverses (Figure 1). La forme dominante du tritium est l'HTO. Cette forme est observée dans l'ensemble des différentes composantes de l'hydrosphère : eaux de pluie, eaux naturelles de surface, eaux souterraines, eaux de mer, eaux interstitielles des sols et des sédiments, eaux d'évapotranspiration (Connan et al., 2015).

Le tritium est présent dans l'atmosphère sous la forme de vapeur d'eau (HTO), également sous la forme d'hydrogène tritié (HT), de méthane tritié ( $\text{CH}_3\text{T}$ ) ou autres gaz organiques (Torg), ainsi que sous la forme de particules d'aérosols tritiées, cette dernière forme étant très peu documentée. Dans le cas des installations nucléaires en démantèlement ou bien des centres de retraitement du combustible irradié, la forme HT est souvent prédominante dans les rejets atmosphériques (IRSN, 2017).

Si le tritium suit intimement le cycle de l'eau, il intègre également le cycle de la matière organique, lors de processus tels que la photosynthèse, ou chez les animaux, la biosynthèse des molécules constitutives des cellules (Murphy, 1993 ; Kim et al., 2013 a et b). Au sein des organismes vivants, le tritium est présent soit sous la forme d'eau tissulaire (TFWT, Tissue free Water Tritium), soit sous la forme de tritium organiquement lié (TOL) plus ou moins échangeable avec les formes libres du milieu environnant (Tritium organiquement lié Echangeable, TOL-E, et Tritium organiquement lié Non Echangeable, TOL-NE). Le TOL peut être présent dans tous les composés organiques tels que les sucres, les lipides, les protéines, les composés cellulotiques et ligneux. Dans le cas du TOL, si le tritium est lié par une liaison forte (liaison covalente) à un atome de carbone par exemple, il y restera fixé jusqu'à ce que la molécule organique soit dégradée ou métabolisée ; cette forme est alors qualifiée de lentement recyclable (TOL-SE, Slowly Exchangeable, Eyrolle et al. 2018b). En revanche, s'il est fixé à des atomes par des liaisons plus faibles (ponts hydrogène, par exemple), il sera plus rapidement recyclé (TOL-QE, Quickly Exchangeable, Eyrolle et al., 2018b).

Le temps de rétention du TOL dans l'environnement est généralement supérieur à celui de l'HTO, et dépend du type de molécules et de leur taux de renouvellement métabolique. Certains composés organiques, comme la lignine, la cellulose ou les acides humiques dans les sols constituent des résidus de dégradation de la matière organique, et perdurent ainsi plusieurs années dans l'environnement. D'autres, comme les glucides de faible poids moléculaire, sont rapidement recyclés et dégradés (IRSN, 2017). Le comportement du tritium sous sa forme liée dans l'environnement est donc en partie fonction de la nature des molécules organiques tritiées prédominantes dans les organismes. Par ailleurs, la nature de ces molécules tritiées va également gouverner la potentielle toxicité du tritium, en jouant sur la localisation cellulaire du tritium et sa rétention dans les organismes. Ainsi, la thymidine tritiée, nucléoside tritié utilisé pour marquer spécifiquement l'ADN, est théoriquement plus susceptible de causer des dommages à l'ADN. D'un autre côté, des composés tritiés qui ne sont pas proches de l'ADN, comme des lipides ou des acides aminés contenus dans des protéines non nucléaires, sont moins susceptibles d'entraîner des dommages à l'ADN (UNSCEAR, 2017). Plusieurs études sont en cours pour mieux caractériser les molécules tritiées permettant d'expliquer le comportement environnemental et l'impact sanitaire du tritium. Cependant, une telle classification est complexe car, bien qu'il soit reconnu que le tritium puisse exister dans l'environnement principalement sous forme de protéines, lipides et sucres, de nombreuses sous-catégories existent encore dans ces groupes, caractérisées par un comportement chimique différent en fonction de leur caractère oxydo-réducteur (RedOx), de leur solubilité, etc (Kim et al., 2013b).

Outre la bio-intégration du tritium au sein des molécules organiques « naturelles », caractérisant conventionnellement le TOL, des procédés industriels manipulant des molécules organiques de synthèse et différents matériaux peuvent conduire à produire du tritium dit « technogénique » (IRSN, 2017). Les sources présumées de tels composés tritiés, probablement multiples et diffuses, ne sont pas complètement identifiées, ni leur devenir dans le temps et l'espace au sein des différentes composantes environnementales. Le projet européen TRANSAT (TRANSversal Actions for Tritium, 2017-2021), coordonné par le Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) et auquel contribue l'IRSN, vise à affiner et étendre le corpus des connaissances sur le tritium – notamment sous forme de particules tritiées - au travers d'études variées et complémentaires (radioécologie, radiotoxicologie, radiobiologie et dosimétrie) (IRSN, 2017).

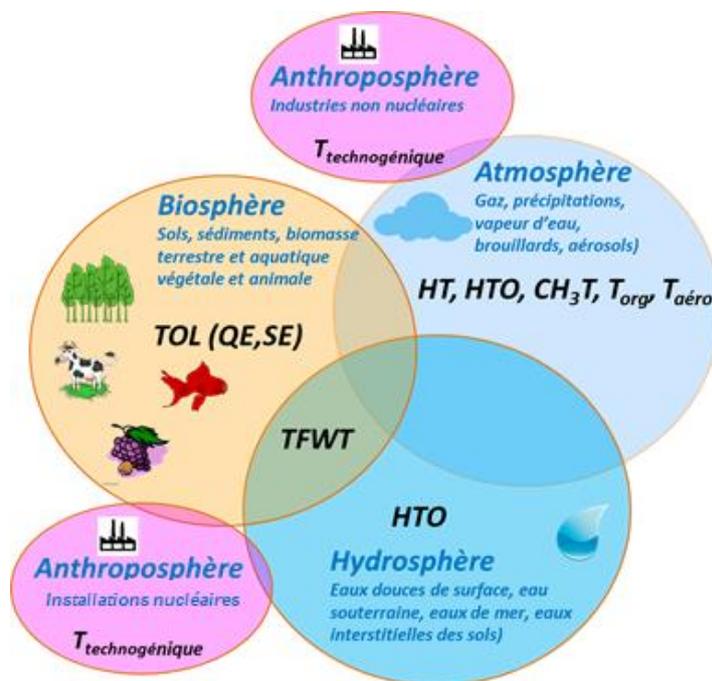


Figure 1 : Formes physico-chimiques du tritium dans l'environnement

HT (Hydrogène tritié), HTO (eau tritiée),  $CH_3T$  (Méthane tritié),  $T_{org}$  (tritium organique gazeux),  $T_{aéro}$  (Aérosols tritiés), TOL-QE (tritium organiquement lié rapidement échangeable), TFWT (Tritium Free Water Tissue, tritium de l'eau tissulaire), TOL-SE (tritium organiquement lié lentement échangeable),  $T_{technogénique}$  (tritium d'origine technogénique, i.e. issus de procédés industriels manipulant des molécules de synthèse et différents matériaux tritiés) (d'après IRSN, 2017)

## 1.2.2 Niveaux de tritium dans l'environnement Français métropolitain

### 1.2.2.1 Niveaux observés hors influence directe des installations nucléaires

Les données de la surveillance permettent d'estimer les concentrations des principales formes physico-chimiques du tritium (HT, HTO, TFWT, TOL) au sein des différents compartiments et composantes de l'environnement (IRSN, 2017).

Les concentrations en HTO dans l'environnement non soumis à l'influence directe des installations nucléaires varient en fonction d'un certain nombre de paramètres, en particulier l'origine des masses d'air, l'origine des masses d'eau, l'altitude, la superficie du bassin versant. Les niveaux de référence en HTO dans l'eau de pluie à l'échelle mondiale sont fournis par la base de données de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA) depuis 1953<sup>3</sup>. En France, les mesures réalisées sur les eaux de pluie collectées à Thonon-Les Bains fournissent une chronique de données couvrant les 60 dernières années. Sur la période 2014-2016, les concentrations en HTO enregistrées dans les eaux de pluie à Thonon-les-Bains sont comprises entre  $7 \cdot 10^{-4}$  et  $1,4 \cdot 10^{-3}$  kBq/L, avec des minimas en hiver et des maximas en été (Ducros et al., 2018). Ces teneurs sont similaires à celles mesurées en Autriche, en Allemagne ou encore en Alaska, au cours de la même période. Des valeurs sensiblement plus basses (jusqu'à un facteur 5) sont observées en particulier au Japon, en raison du caractère insulaire du pays fortement influencé par des masses d'air d'origine océanique. La variabilité des valeurs de référence en HTO dans les eaux de pluie à l'échelle du territoire français n'est pas établie. Les concentrations en HTO sont sensiblement plus faibles dans les cours d'eau ( $1 \cdot 10^{-4}$  à  $9 \cdot 10^{-4}$  kBq/L). Les concentrations en HTO dans le domaine marin sont comprises entre  $1 \cdot 10^{-5}$  kBq/L (océans)

<sup>3</sup> Global Network of Isotopes in Precipitation Database, [http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/IHS\\_resources\\_gnip.html](http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/IHS_resources_gnip.html)

et  $1 \cdot 10^{-4}$  kBq/L (mer Méditerranée) (Ducros et al., 2018). Les teneurs en HT et  $\text{CH}_3\text{T}$  dans l'atmosphère sont comprises entre  $6 \cdot 10^{-6}$  et  $1,3 \cdot 10^{-5}$  kBq/m<sup>3</sup> et inférieures à  $3 \cdot 10^{-6}$  kBq/m<sup>3</sup>, respectivement. Des mesures de tritium ont été réalisées de 2007 à 2012, en France métropolitaine, pour quelques types d'échantillons de végétaux et de denrées (feuilles d'arbres, produits maraichers, vin, viande, lait) prélevés hors de l'influence potentielle d'un rejet. Le bruit de fond en tritium déduit de ces données est en moyenne de  $1,4 \cdot 10^{-3}$  kBq/L pour l'HTO et pour le TOL (Roussel-Debet, 2014). En Méditerranée, les valeurs de référence en TOL acquises pour les poissons, crustacés et moules (de  $4 \cdot 10^{-4}$  kBq/L à  $3,3 \cdot 10^{-3}$  kBq/L, en 2013), sont supérieures aux teneurs en HTO mesurées au large ( $< 1 \cdot 10^{-4}$  kBq/L) mais s'approchent de la gamme des concentrations en HTO et en TOL mesurées dans les eaux et les matières en suspension ou sédiments du milieu côtier français (de  $1 \cdot 10^{-4}$  à  $5 \cdot 10^{-4}$  kBq/L respectivement). Le lien entre les teneurs en TOL de ces organismes et les apports terrigènes de TOL délivrés par les multiples fleuves côtiers du pourtour Méditerranéen, sources d'éléments nutritifs, n'est toutefois pas établi (IRSN, 2017).

### 1.2.2.2 Niveaux observés sous influence des installations nucléaires

A l'échelle du territoire français métropolitain, les niveaux de marquage de l'environnement en tritium par les rejets des installations nucléaires sont variables en fonction des compartiments observés et des sites. Le niveau de marquage de l'environnement s'apprécie en comparant la concentration observée à celle du bruit de fond. Cette tâche peut parfois être complexe dans la mesure où les gammes de variation des valeurs de référence (hors influence des installations) ne sont que partiellement acquises aujourd'hui au sein des différents compartiments de l'environnement (IRSN, 2017).

En milieu aquatique continental, dans les fleuves où s'effectue l'essentiel des rejets de tritium des CNPE, l'influence est notable (plus de 96% des rejets en tritium des CNPE en France se font par voie liquide). Les observations montrent ainsi qu'en moyenne plus de 75% du tritium présent en aval des CNPE provient des rejets liquides des installations (IRSN, 2017). Cette proportion atteint 90% dans la partie aval du Rhône (Eyrolle-Boyer et al., 2015b). Les concentrations moyennes mensuelles en HTO mesurées ces dernières années dans l'eau en aval des CNPE vont de  $1 \cdot 10^{-3}$  à  $6,1 \cdot 10^{-2}$  kBq/L dans le Rhône et le canal d'Alsace, de  $5 \cdot 10^{-3}$  à  $3,5 \cdot 10^{-2}$  kBq/L dans la Garonne, la Loire, la Vienne, la Meuse, la Moselle et la Seine. Ces valeurs sont directement liées aux rejets de chaque site, au débit du cours d'eau et donc à sa capacité à diluer les rejets, ainsi que, pour les sites situés en aval d'autres sites, à un effet de cumul. Les teneurs en tritium dans l'eau des fleuves nucléarisés augmentent ainsi le plus généralement de l'amont vers l'aval au gré des rejets successifs des installations et de l'efficacité des affluents à diluer les concentrations volumiques en transit. Les teneurs en TOL au sein des différentes matrices étudiées (sédiments de surface, mollusques, mousses, phanérogames, poissons) suivent également ces tendances. Cependant, dans le cas du Rhône, les matières en suspension et les sédiments montrent des teneurs en TOL de 10 à 10 000 fois supérieures aux teneurs en tritium libre enregistrées dans la colonne d'eau et diminuant de l'amont vers l'aval (Jean-Baptiste et al., 2007 ; Eyrolle et al., 2018a). Ces observations témoignent de la rémanence au sein du compartiment sédimentaire de l'ensemble du linéaire rhodanien de résidus de tritium technogénique issus des ateliers d'horlogerie implantés sur les bassins versants du haut Rhône (IRSN, 2017 ; Eyrolle et al., 2018a ; Eyrolle et al., 2020 ; Morereau et al., 2020). Les rejets atmosphériques tritiés sont susceptibles de marquer les composantes du compartiment terrestre. L'analyse des prélèvements réalisés dans le cadre des études radioécologiques ne met pas en évidence une influence significative des rejets atmosphériques de tritium émis par les CNPE sur le compartiment terrestre (1 ou 2 marquages faibles sur 1 ou 2 des 12 sites suivis par l'IRSN (IRSN, 2016a ; IRSN 2018)). En revanche aux alentours du centre CEA/DAM de Valduc, les niveaux en TOL dans les végétaux et denrées (herbes, lait, céréales) peuvent dépasser ponctuellement 300 Bq/kg frais, soit plus de 100 fois le bruit de fond (IRSN, 2018). Egalement, l'influence des rejets gazeux tritiés du site nucléaire de Marcoule sur le compartiment terrestre est décelée dans différentes composantes. A une distance de 2 km à l'ouest du site, sur le bassin versant en aval de la Cèze, un affluent du

Rhône, des teneurs en TOL relativement élevées ont été enregistrées dans les sols ( $5 \cdot 10^{-2}$  à  $0,5$  kBq/L d'eau de combustion<sup>4</sup>), et les plantes pérennes (thym, romarin) ou encore les feuilles de chêne vert ( $1 \cdot 10^{-2}$  à  $0,1$  kBq/L d'eau de combustion) (IRSN, 2018). Ce marquage peut être lié aux rejets contemporains de tritium par voie atmosphérique effectués par le site de Marcoule. Il peut également refléter en partie la rémanence de tritium dans la matière organique des sols et dans la biomasse locale en lien avec des rejets anciens de tritium par le site. Enfin, aux alentours du centre d'AREVA NC de La Hague, l'influence des rejets gazeux tritiés est modérée en milieu terrestre. Les concentrations en TOL mesurées dans l'herbe sont au maximum 2 fois celles du bruit de fond. Dans les légumes (carottes, oignons, persil, pommes de terre, poireaux, chou-fleurs) ainsi que dans le thym et les mûres de ronce, les concentrations en TOL ne se distinguent pas des valeurs de référence (IRSN, 2017, 2018).

Concernant le milieu marin, l'influence des rejets liquides tritiés de l'usine de retraitement de combustibles usés ORANO de La Hague mais aussi, bien que dans une moindre mesure, de l'usine britannique de Sellafield, est nette sur l'ensemble de la Manche. La concentration moyenne de l'eau de mer se situe autour de  $1,1 \cdot 10^{-2}$  kBq/L au niveau du cap de La Hague (à comparer à un bruit de fond naturel des océans  $< 1 \cdot 10^{-4}$  kBq/L) et diminue progressivement lorsque l'on s'en éloigne ; elle est de l'ordre de  $6 \cdot 10^{-3}$  kBq/L à proximité de Calais. Il faut noter que ces valeurs moyennes masquent des variations temporelles très importantes en quelques heures. Ainsi, une variation des concentrations en HTO jusqu'à un facteur 4 a été observée sur une période de 30 mn au cours d'un suivi d'une semaine à partir de prélèvements d'eau réalisés toutes les 10 minutes (IRSN, 2017).

Les teneurs en TOL dans les organismes vivants collectés dans la zone côtière du nord Cotentin (zone de rejets de l'usine d'AREVA NC de La Hague) varient de  $2 \cdot 10^{-3}$  à  $1,2 \cdot 10^{-2}$  kBq/L pour les algues, de  $4 \cdot 10^{-3}$  à  $1,4 \cdot 10^{-2}$  kBq/L pour les mollusques, de  $3 \cdot 10^{-3}$  à  $1,6 \cdot 10^{-2}$  kBq/L pour les crustacés, et de  $8 \cdot 10^{-3}$  à  $1,4 \cdot 10^{-2}$  kBq/L pour les poissons (Fievet et al., 2013). Des niveaux similaires sont observés dans les organismes collectés sur le littoral proche des CNPE de Flamanville, Paluel, Penly et Gravelines, témoignant du marquage en tritium à large échelle des organismes vivants de la Manche. Les rejets tritiés des CNPE sont faibles par rapport à ceux de l'usine AREVA NC de La Hague, et globalement ne contribuent que très peu au marquage en Manche (Fievet et al., 2013).

Dans la partie aval du Rhône (delta du Rhône), 90% du tritium proviennent des installations nucléaires (Eyrolle-Boyer et al., 2015b). Les concentrations moyennes observées au cours de ces dernières années (2010-2018) au sein d'échantillons d'eau intégrés sur une période d'un mois, varient de moins de  $2 \cdot 10^{-3}$  kBq/L à  $1,6 \cdot 10^{-2}$  kBq/L.

Au débouché du Rhône, les concentrations en HTO sont très variables, dans le temps et l'espace, et sont généralement comprises entre  $1 \cdot 10^{-4}$  et  $1 \cdot 10^{-3}$  kBq/L témoignant à la fois des rejets intermittents des industries nucléaires rhodaniennes et de la dilution stratifiée du panache du Rhône avec les eaux marines. Dans les poissons collectés en 2012 et 2013 dans le Golfe du Lion, à l'ouest du Rhône, c'est-à-dire sous la zone d'influence potentielle des apports du fleuve, les teneurs en TOL dans les différentes espèces varient de  $4 \cdot 10^{-4}$  kBq/L à  $4 \cdot 10^{-3}$  kBq/L, à 130 km et 5 km du débouché du Rhône, respectivement. Les teneurs en TOL dans les poissons diminuent lorsque l'on s'éloigne de l'embouchure du fleuve, au-delà d'une centaine de km.

### 1.2.3 Valeurs guides relatives aux niveaux de tritium dans l'eau de boisson

Cette section reprend de façon résumée les éléments détaillés dans le rapport de l'IRSN sur la qualité réglementaire relative au tritium dans les eaux destinées à la consommation humaine publié en 2020 (IRSN, 2020).

<sup>4</sup> Dans les échantillons environnementaux (végétaux et animaux), la mesure des différentes fractions de tritium nécessite l'extraction de l'eau libre, souvent par lyophilisation. L'eau extraite de la combustion de l'échantillon lyophilisé (sec) permet de mesurer le tritium à l'origine organiquement lié. En mesurant ces fractions d'eau, le tritium de l'eau tissulaire (TFWT) et la concentration de TOL peuvent être évalués (Baglan et al., 2015)

La qualité des eaux destinées à la consommation humaine est encadrée par un ensemble de dispositions réglementaires dont la plupart sont inspirées de normes établies au plan international. Depuis plusieurs décennies, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose un cadre institutionnel, des règles de gestion et des références de qualité permettant de garantir un haut niveau de qualité sanitaire pour les eaux potables, au travers du « Guidelines for Drinking Water Quality » qu'elle met à jour périodiquement (WHO, 2017). Ces règles et références de qualité sont établies en tenant compte de la nécessité absolue de garantir un accès à la ressource en eau potable (les normes de qualité ne doivent pas constituer une entrave injustifiée à un tel accès) et en hiérarchisant les principaux risques à prévenir (bactériologiques, chimiques et radiologiques).

Pour la prévention du risque radiologique, l'OMS propose un contrôle périodique de l'eau mettant en œuvre une approche graduée afin d'éviter l'engagement systématique de moyens métrologiques très importants, compte tenu de son enjeu sanitaire en situation normale : cette stratégie de contrôle commence par la mesure de deux indicateurs radiologiques réglementaires ( $\alpha_{\text{global}}$  et  $\beta_{\text{global}}$ ) dont les valeurs sont comparées à des valeurs guides (« screening levels ») de  $5 \cdot 10^{-4}$  kBq/L et  $1 \cdot 10^{-3}$  kBq/L, respectivement. Ces valeurs guides ne constituent pas des limites de potabilité : ils permettent d'établir un profil de qualité radiologique des eaux de boisson (dont la radioactivité est très majoritairement naturelle). Si les indices  $\alpha_{\text{global}}$  et  $\beta_{\text{global}}$  de l'eau contrôlée ne dépassent pas les valeurs guides, il est admis que l'exposition, résultant de l'incorporation pour un adulte de tous les radionucléides naturels et artificiels détectés dans de l'eau de distribution consommée à raison de 2 L/j sur une période d'un an, est inférieure à 0,1 mSv/an et le processus de contrôle s'achève. Si la mesure d'un de ces deux indices dans l'eau révèle un résultat supérieur à l'une des valeurs guides associées, les radionucléides susceptibles d'être à l'origine de l'activité observée sont alors recherchés et quantifiés afin de déterminer si l'exposition résultant de la consommation régulière d'une telle eau conduit à dépasser ou non la référence de dose de 0,1 mSv/an. Pour faciliter la tâche des autorités en charge du contrôle sanitaire, l'OMS publie un ensemble de valeurs guides correspondant aux concentrations des radionucléides dont l'ingestion régulière conduit à la référence de dose de 0,1 mSv/an. Pour le tritium, cette valeur est de 10 kBq/L. Sur la base de cette valeur, l'OMS laisse aux Etats le soin de définir les mesures à mettre en œuvre pour réduire autant que possible les expositions du public lorsque ce niveau est dépassé.

Pour sa part, la Commission européenne régit par voie de directive la qualité radiologique des eaux de boisson des pays de l'Union (Euratom, 2013). Elle s'inspire dans une large mesure de la stratégie proposée par l'OMS, même si elle laisse libre chaque Etat membre de passer ou non par une étape de criblage à l'aide des indicateurs  $\alpha_{\text{global}}$  et  $\beta_{\text{global}}$  pour démontrer le contrôle du respect de la référence dosimétrique de 0,1 mSv/an. Pour l'établissement de la dose totale indicative (DTI) résultant de l'ingestion régulière de l'eau contrôlée, elle calcule une série de concentrations dérivées (équivalent des valeurs guides de l'OMS) pour les principaux radionucléides mais ne calcule pas de concentration dérivée pour le tritium. En revanche, elle utilise le tritium comme paramètre de base du contrôle des eaux de boisson (en tant que traceur des activités humaines mettant en jeu de la radioactivité) et lui associe une valeur de référence de 0,1 kBq/L (« valeur paramétrique ») : en cas de dépassement de cette valeur, les radionucléides artificiels doivent être recherchés et quantifiés, afin de calculer une dose indicative. Moins encore que la valeur guide de l'OMS, la valeur paramétrique de 0,1 kBq/L pour le tritium ne peut être regardée comme une limite de potabilité.

S'inspirant des approches de l'OMS et de la Commission européenne, la France organise le contrôle de la qualité radiologique des eaux de boisson au travers d'une étape de criblage des eaux distribuées à l'aide des indicateurs radiologiques  $\alpha_{\text{global}}$  et  $\beta_{\text{global}}$  et de la teneur en tritium. Les valeurs guides et de références de qualité associées sont  $1 \cdot 10^{-4}$  kBq/L,  $1 \cdot 10^{-3}$  kBq/L et 0,1 kBq/L, respectivement. En cas de dépassement de l'une quelconque de ces valeurs dans l'eau contrôlée, les radionucléides à l'origine de cette activité (naturels et/ou artificiels) sont recherchés et une dose totale indicative (DTI) est calculée. Les actions correctrices à mettre en œuvre lorsque la dose

totale indicative calculée est supérieure à la référence de qualité de 0,1 mSv/an dépendant à la fois de l'origine de la radioactivité (naturelle ou artificielle) et/ou du niveau de dose atteint (IRSN, 2020).

## 1.3 OBJECTIFS ET DEMARCHES DE RECHERCHE

### 1.3.1 Objectifs du rapport

Le présent rapport vise à faire le point sur l'état des connaissances relatives aux effets biologiques du tritium. Il s'intègre dans le cadre général des recommandations du livre blanc du tritium (ASN, 2010). Il vient en complément au rapport publié par l'IRSN en 2017 sur les connaissances acquises sur le comportement du tritium dans l'environnement (IRSN, 2017).

La section 2 présente l'état de l'art des connaissances actuelles sur les effets biologiques et sanitaires du tritium sur l'homme et l'animal. La section 3 détaille les études expérimentales en radiotoxicologie humaine et environnementale conduites par l'IRSN en collaboration avec ses partenaires depuis 2010. Les résultats sont regroupés suivant 5 axes de recherche :

- Biocinétique du tritium ;
- Dommages à l'ADN et effets cytogénétiques du tritium ;
- Marqueurs de toxicité tissulaires du tritium ;
- Effets du tritium sur l'embryon ou le fœtus ;
- Efficacité biologique relative du tritium.

Les résultats principaux sont discutés au regard de leur apport vis-à-vis des connaissances actuelles sur les effets du tritium.

La section 4 synthétise les enseignements tirés de ces recherches, et introduit les perspectives de recherche sur les effets biologiques du tritium.

Les annexes 1 et 2 détaillent les approches, méthodes et niveaux de doses utilisés dans les expérimentations mises en place, respectivement chez le rongeur et chez le poisson. Par ailleurs, les expérimentations conduites par l'IRSN dans le cadre du programme de recherche n'ont pas porté sur l'observation des cancers, même si elles comprennent des analyses sur les dommages à l'ADN et les effets cytogénétiques dont les résultats peuvent être considérés comme pertinents pour investiguer une partie des mécanismes conduisant au cancer. D'autres expérimentations, complémentaires, ont été mises en place sur la fréquence d'apparition de cancers chez des rongeurs par le CNL. Le protocole et les résultats préliminaires de ces expérimentations sont résumés en Annexe 3.

### 1.3.2 Démarches de recherche de l'IRSN

Les études des effets biologiques du tritium décrites dans la littérature jusque dans les années 2010 ont généralement porté sur des expositions très élevées ( $>10^6$  kBq/L), de plusieurs ordres de grandeurs supérieures aux concentrations environnementales de tritium, tandis que des études considérant de faibles activités de tritium ( $<1 \cdot 10^3$  kBq/L) étaient rares. De plus, la grande majorité de ces expérimentations étaient réalisées avec de l'HTO seul, à des débits de doses élevés sur des périodes relativement courtes (de quelques jours à quelques semaines) (ASN, 2010).

Le programme de recherche collaboratif mis en place par l'IRSN et le CNL en 2010 a donc eu pour objectif de générer des résultats sur les effets biologiques d'une exposition chronique au tritium, à des niveaux d'exposition plus faibles et des durées d'expositions plus longues que ceux disponibles dans la littérature. Il visait également à comparer les effets du tritium sous forme d'HTO ou de TOL, et ceux engendrés

par une exposition aux rayonnements gamma. Etant donnée l'extrême diversité des formes de tritium existantes dans l'environnement et l'absence de connaissance sur la spéciation chimique du tritium dans l'environnement (*cf.* section 1.2.1), le choix a été fait de travailler avec des molécules tritiées disponibles commercialement plutôt qu'avec de la nourriture naturelle contaminée en tritium, afin de mieux contrôler les conditions expérimentales et d'essayer de mieux cerner les toxico-cinétiques<sup>5</sup> du TOL. Ce programme a inclus des études expérimentales en radiotoxicologie pour analyser les effets du tritium sur l'homme (avec un modèle animal rongeur) et sur l'environnement (avec un modèle animal poisson).

Les protocoles expérimentaux utilisés sont détaillés en Annexe 1 (pour les rongeurs) et en Annexe 2 (pour les poissons). Ces annexes fournissent en particulier les correspondances entre concentrations, débits de dose et doses cumulées.

Les études expérimentales sur les effets du tritium chez les rongeurs nécessitent des installations particulières, permettant de confiner ce radionucléide quelle que soit sa forme physico-chimique. Pour cela, les expériences de contamination chronique des rongeurs ont été réalisées sur le site CNL de Chalk River au Canada, qui comporte une installation dédiée aux études de contamination interne par les radionucléides et aux expositions externes chroniques à faibles doses chez le rongeur (CNSC, 2019). Les études ont été réalisées sur des souris mâles de lignée « C57BL/6J », qui est un modèle polyvalent d'analyse en expérimentation animale appliquée à l'homme. Les souris ont été exposées pendant 1 mois ou 8 mois de façon chronique *via* l'ingestion d'HTO ou de TOL dans l'eau de boisson aux activités volumiques de 10, 1 10<sup>3</sup>, 2 10<sup>4</sup> kBq/L. Ces trois niveaux d'exposition permettaient d'étudier l'effet d'une concentration de tritium correspondant à la valeur guide de l'OMS pour le tritium dans l'eau de boisson (10 kBq/L, voir section 1.2.3) ainsi que des niveaux d'exposition plus élevés considérés comme suffisants pour pouvoir analyser les mécanismes biologiques induits par le tritium. Un mélange équimolaire de trois acides aminés tritiés (alanine, proline et glycine) a été utilisé comme modèle d'exposition au TOL par ingestion *via* l'eau de boisson. L'utilisation d'acides aminés a été choisie parce qu'ils constituent une composante importante du métabolisme cellulaire (Guéguen et al., 2018 ; CNSC 2015 ; COG 2015) mais aussi pour leur très grande solubilité dans l'eau ce qui a facilité leur utilisation dans ces expérimentations.

Parallèlement aux études expérimentales portant sur les rongeurs, des études des effets du tritium ont été menées sur des poissons en collaboration entre l'IRSN et le CNL. Ces études ont principalement porté sur le poisson zèbre (*Danio rerio*), car c'est un modèle classique en biologie du développement, dont le génome est complètement séquencé. De surcroît, les poissons sont des organismes sentinelles (sensibles et abondants) pour les écosystèmes aquatiques. Les expériences avec le poisson zèbre ont été réalisées en laboratoire à des concentrations allant de 1,22 10<sup>4</sup> à 1,22 10<sup>6</sup> kBq/L. Ces concentrations sont bien plus élevées que les concentrations environnementales de tritium, mais ont été choisies afin de correspondre à des débits de dose théoriques allant de 40 à 4000 µGy/h, permettant de balayer une gamme de débits de dose allant jusqu'à un ordre de grandeur au-dessus des valeurs de référence (DCRL, Derived Consideration Reference Level)<sup>6</sup> de la CIPR (ICRP, 2007). En effet, l'objectif de ces études était de caractériser les modes d'action toxique du tritium chez les poissons afin de pouvoir identifier des biomarqueurs d'effet, sans chercher nécessairement une représentativité environnementale. Une comparaison ponctuelle avec des effets induits par de la thymidine tritiée (nucléoside tritié utilisé pour marquer spécifiquement l'ADN) a également été faite. La représentativité environnementale a été abordée à l'aide du second modèle biologique considéré qui était le poisson tête-de-boule (*Pimephales promelas*) au stade adulte. Ce dernier a été exposé sur le terrain puis en laboratoire à des niveaux de contamination reflétant l'exposition réelle des poissons en différents lieux du site Canadien de Chalk River, dont les rejets

---

<sup>5</sup> La toxicocinétique est l'étude de la toxicité potentielle des substances entrant dans le corps et de leur dispersion lorsqu'elles sont absorbées par l'organisme

<sup>6</sup> Un DCRL est défini pour chaque organisme de référence comme la gamme de débits de dose couvrant un ordre de grandeur, au sein de laquelle les premiers effets délétères sont susceptibles d'apparaître. Ainsi, pour les poissons d'eau douce, le DCRL est fixé dans la publication 108 de la CIPR (ICRP, 2007) entre 42 et 420 µGy/h, gamme qui correspond à une réduction possible du succès reproducteur.



liquides de tritium sont relativement élevés. Ainsi, les niveaux d'exposition maximaux étaient de 180 kBq/L (débit de dose maximal de 0,65  $\mu$ Gy/h). Les expositions ont été réalisées avec l'HTO et par la voie trophique *via* une nourriture marquée avec 3 acides aminés tritiés (lysine, leucine et arginine), acides aminés indispensables à la croissance et au métabolisme des poissons. L'arginine et la lysine sont des précurseurs des histones, les protéines qui servent à compacter l'ADN, et sont donc incorporées in fine dans le noyau. Ces acides aminés ont été dilués dans de l'huile puis ajoutés à de la nourriture artificielle.

## 2 ETAT DES CONNAISSANCES SUR LES EFFETS DU TRITIUM

En 2010, le livre blanc sur le tritium (ASN, 2010) soulignait la nécessité de compléter les connaissances sur les effets du tritium, et émettait plusieurs recommandations en ce sens :

- Caractériser de manière rigoureuse les formes physico-chimiques utilisées et les mécanismes biologiques en jeu, en étudiant à la fois les effets cancéreux et non cancéreux, en tenant compte des fenêtres d'exposition qui pourraient être plus sensibles à l'exposition au tritium et en étudiant les expositions accidentelles et chroniques ;
- Améliorer les connaissances sur les effets de l'exposition de l'embryon et du fœtus au tritium ;
- Évaluer l'induction possible d'effets héréditaires ;
- Analyser la faisabilité d'études épidémiologiques chez les travailleurs en France ;
- Évaluer la pertinence d'utiliser un facteur de pondération pour les rayonnements de 2 (au lieu de 1) dans les situations d'évaluation de risque individuel.

Depuis, plusieurs publications et rapports de synthèse, en particulier de la CIPR et de l'UNSCEAR, ont fourni de nouveaux éléments de connaissance sur les effets du tritium (ICRP, 2016 ; UNSCEAR, 2017). Ces nouvelles connaissances concernent les domaines de la biocinétique, de la dosimétrie, de la radiobiologie, de la radiotoxicologie humaine et environnementale, ainsi que de l'épidémiologie.

### 2.1 CONNAISSANCES DANS LES DOMAINES DE LA BIOCINETIQUE ET DE LA DOSIMETRIE DU TRITIUM

L'estimation des risques pour l'homme après une exposition aux rayonnements ionisants est fondée sur la détermination d'une dose d'exposition. Alors qu'il est relativement facile de mesurer la dose délivrée par les rayonnements photoniques externes, la détermination de la dose consécutive à l'incorporation de radionucléides est beaucoup plus difficile. Elle doit tenir compte de la biocinétique du radionucléide, c'est-à-dire des variations de sa concentration, à la fois dans le temps et dans les différents organes et tissus (absorption, distribution, métabolisme et élimination). Alors que la biocinétique et la dosimétrie du tritium sous forme d'HTO sont relativement simples en raison de sa distribution homogène dans le corps, celles du TOL sont complexes du fait de la grande variété de formes moléculaires possibles du TOL qui ont des affinités variables avec les différentes molécules qui composent les cellules et les organes.

La biocinétique et la dosimétrie du tritium font l'objet de recherches depuis plusieurs décennies, dont les résultats sont résumés dans la publication 134 de la CIPR (ICRP, 2016). Ce document décrit l'état des connaissances sur le devenir du tritium après inhalation et ingestion sous diverses formes physico-chimiques, sa rétention dans les organes et son excrétion en fonction du temps, ainsi que les différents moyens de mesure du tritium incorporé. Il donne également les coefficients de dose<sup>7</sup> du tritium pour une incorporation professionnelle sous forme d'HTO ou de TOL. Ces modèles mis à jour, alimentés par les toutes dernières données de la recherche, permettent maintenant

<sup>7</sup> Coefficient de dose : les coefficients de dose d'un radionucléide correspondent à la valeur qu'il convient de multiplier par la quantité en Bq de ce radionucléide incorporé (ingéré ou inhalé) pour obtenir la dose efficace engagée en Sv. Les coefficients de dose de tous les radionucléides dont la période physique est supérieure à 10 min sont produits et publiés par la CIPR.

de prédire la rétention et l'excrétion du tritium sous forme HTO ou TOL. Ces modèles ne s'appliquent toutefois pas à toutes les molécules tritiées précurseurs des acides nucléiques, en raison de leur diversité, de leur rétention et de leur distribution cellulaire particulières.

Comparativement aux coefficients de dose publiés précédemment dans les années 90 (ICRP, 1994, 1996), les nouveaux coefficients pour l'inhalation sont de 10% et de 25% supérieurs, et ceux pour l'ingestion de 5% supérieurs et de 16% inférieurs, respectivement, pour le tritium sous forme HTO ou TOL. Ces coefficients de dose ont été calculés en utilisant un facteur de pondération des rayonnements beta égal à 1, conformément aux dernières recommandations de la CIPR (ICRP, 2007) (cf. discussion sur la validité de ce facteur en section 3.5). Ces coefficients restent très inférieurs à ceux calculés pour d'autres radionucléides (Figure 2), traduisant une radiotoxicité relativement faible du tritium.

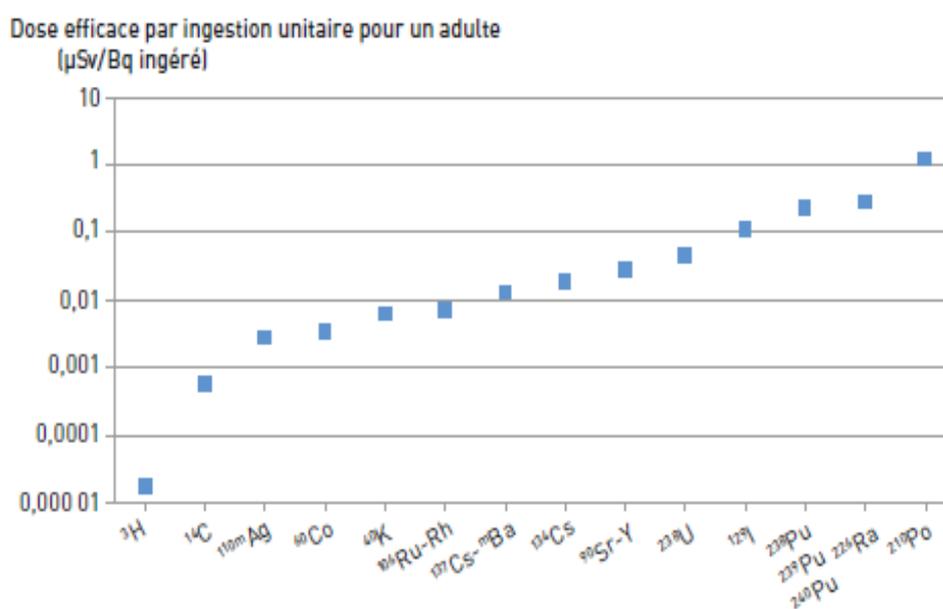


Figure 2 : Coefficients de dose efficace par ingestion pour divers radionucléides (IRSN, 2018)

## 2.2 CONNAISSANCES DANS LES DOMAINES DE LA RADIOBIOLOGIE ET DE LA RADIOTOXICOLOGIE DU TRITIUM

Une revue de la littérature relative aux effets biologiques du tritium a récemment été publiée à la fois sur les effets déterministes et stochastiques (UNSCEAR, 2017). En synthèse, concernant les effets déterministes observés après exposition chronique *via* l'eau de boisson, la concentration la plus faible à partir de laquelle est observée une augmentation de la mortalité des souris est de  $1,5 \cdot 10^8$  kBq/L, correspondant à une dose de 11 Gy. Les effets du tritium sur l'embryon et le fœtus ont été étudiés sur des animaux de laboratoire. Des effets neurologiques et sur les organes reproducteurs ont été rapportés à partir des concentrations de  $5 \cdot 10^3$  à  $1 \cdot 10^5$  kBq/L d'eau corporelle (0,4 – 0,6 Gy). Une exposition prolongée à l'HTO à des doses relativement fortes (1-8 Gy) conduit à une diminution de la réponse immunitaire des animaux qui peut ou non être réversible en fonction de la dose. Le rapport recommandait que soient réalisées d'autres études sur l'effet du tritium sur le système immunitaire après exposition aiguë et chronique à faible dose (UNSCEAR, 2017).

De nombreuses études de laboratoire sur les animaux ont démontré un effet cancérigène de l'exposition au tritium à forte dose, sous forme d'HTO, bien que l'effet cancérigène de l'exposition au tritium n'ait pas autant été étudié en profondeur que celui des rayonnements gamma et des rayons X. En raison de l'absence d'information disponible pour l'homme, les estimations des risques de cancer pour le

tritium sont dérivées des études expérimentales sur des animaux, principalement des souris. Le rapport de l'UNSCEAR conclut que les études de laboratoire sur les mammifères ont démontré que, à dose équivalente, le tritium induit des effets biologiques à la fois stochastiques et déterministes, du même type que ceux induits par d'autres types de rayonnements. Comme cela est observé avec d'autres rayonnements, la gravité des effets déterministes augmente avec l'augmentation de la dose dans les tissus (UNSCEAR, 2017).

Concernant la toxicité relative des différentes formes de tritium, le rapport souligne que les études portant spécifiquement sur les effets sur la santé dus à l'exposition à ces substances sont limitées. Des expériences menées sur des rongeurs ont montré que, pour la même activité administrée, l'efficacité biologique de certaines formes de TOL était plus élevée que celle de l'HTO, que ce soit pour l'induction d'effets déterministes ou stochastiques. Ceci est particulièrement vrai pour les formes nucléotrope de TOL (thymidine, lysine ou désoxycytidine tritiée) (UNSCEAR, 2017).

## **2.3 CONNAISSANCES DANS LE DOMAINE DE LA RADIOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE**

La publication 108 de la CIPR, décrivant la méthode élaborée pour la radioprotection de l'environnement, fait la revue des données relatives aux effets des rayonnements ionisants sur des modèles non humains (ICRP, 2008). Les études citées sur le tritium sont en faible nombre et concernent essentiellement des expositions à de l'HTO à fortes doses, chez des espèces de rongeurs ou de poissons. Les principaux effets observés sont (i) des altérations comportementales chez la progéniture de souris exposées au tritium lors de l'organogénèse du fœtus, (ii) une suppression de la réponse immunitaire chez des juvéniles de truites (iii) des effets sur la reproduction de rats (réduction du nombre d'ovocytes chez les mères et dans la première génération (F1), réduction du nombre de spermatozoïdes et de la fécondité dans les deuxièmes et troisièmes générations (F2 et F3)), et (iv) effets sur la reproduction de poissons (baisse de la fécondité et de la fertilité, malformations embryonnaires)).

## **2.4 CONNAISSANCES DANS LE DOMAINE DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE**

Comparativement aux connaissances sur les effets des expositions externes aux rayonnements ionisants, peu d'études épidémiologiques se sont intéressées aux risques sanitaires associés au tritium. La plupart de ces études ont porté sur des travailleurs du nucléaire, en Grande Bretagne, aux Etats-Unis et au Canada. Néanmoins, elles sont peu instructives sur les risques potentiels associés au tritium, principalement par manque d'information sur la dose due au tritium, et par manque de puissance statistique. En effet, quand elle existe, la dose tritium est le plus souvent intégrée dans la dose totale des travailleurs, ce qui empêche d'analyser spécifiquement les risques associés au tritium. Par ailleurs, les rares études permettant d'estimer spécifiquement la dose due au tritium indiquent que cette dose est faible, et la taille des populations considérées dans ces études est trop limitée pour permettre la détection d'un risque significatif.

Les études au sein de populations voisines de sites nucléaires ou s'intéressant aux effets potentiels liés aux retombées de tritium après les essais de bombes nucléaires des années 1950 et 60 sont généralement de qualité limitée. Elles ne disposent pas d'estimation individuelle de la dose tritium, et ne sont donc pas de nature à permettre la détection d'une éventuelle relation dose-risque.

Le rapport de l'UNSCEAR de 2017 a conclu que l'ensemble des données épidémiologiques disponibles ne permettait pas de montrer une relation entre l'exposition au tritium et un risque accru de cancer. Néanmoins, ce rapport soulignait que les études réalisées présentaient



des limites importantes rendant difficile l'interprétation des résultats (UNSCEAR, 2017). Les travaux épidémiologiques publiés depuis le rapport de l'UNSCEAR ne modifient pas ce constat.

L'une des recommandations du livre blanc de 2010 sur le tritium (ASN, 2010) était d'analyser la faisabilité d'études épidémiologiques chez les travailleurs en France en considérant l'opportunité d'acquérir des données relatives à l'exposition au tritium et de traiter ces données de manière harmonisée avec les autres études initiées sur le plan international. En France, les données de la cohorte nationale des travailleurs de l'industrie nucléaire conduite par l'IRSN ne permettent pas d'identifier les travailleurs exposés au tritium (Leuraud et al., 2017 ; Samson et al., 2018). Néanmoins, une étude sur des travailleurs du CEA potentiellement exposés au tritium vient d'être publiée (Martin et Ségala, 2021). Cette étude est limitée du fait de la faible taille de la population considérée, mais son intégration dans une analyse conjointe internationale de grande ampleur, avec une reconstruction des doses et une prise en compte précise de l'exposition individuelle au tritium, permettrait d'apporter des éléments de réponse aux questions sur les risques associés à l'exposition au tritium chez l'homme.

# 3 NOUVELLES DONNEES SUR LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM

Cette section détaille les études expérimentales en radiotoxicologie humaine et environnementale conduites dans le cadre du programme de recherche mis en place par l'IRSN en collaboration avec CNL depuis 2010. Pour chacun des cinq axes de recherche considérés, le contexte scientifique est rappelé, et les résultats principaux sont discutés en regard de leur apport vis-à-vis des connaissances actuelles sur les effets du tritium.

## 3.1 BIOCINETIQUE DU TRITIUM

### 3.1.1 Contexte

L'absorption, la rétention et la clairance du tritium ont été étudiées chez l'homme depuis les années 1950 et, par la suite, chez les espèces non humaines. La CIPR a utilisé ces connaissances pour construire des modèles biocinétiques du tritium pour l'homme afin de déterminer, pour des besoins de radioprotection, les doses aux organes et la dose efficace. En outre, la CIPR surveille régulièrement la littérature scientifique pertinente et, lorsque des éléments justifient des changements, met à jour ses modèles biocinétiques. La dernière mise à jour sur le tritium a eu lieu en 2016 (ICRP, 2016). Néanmoins, des incertitudes subsistent encore sur les paramètres des nouveaux modèles, principalement en raison de la complexité du métabolisme des différentes formes de TOL. Ces particularités modifient les doses délivrées au niveau des organes et des tissus mais également au niveau des cellules, notamment dans le cas de l'incorporation de précurseurs d'acides nucléiques marqués, qui s'intègrent directement dans l'ADN. Eu égard au très faible parcours des électrons émis par la désintégration du tritium, l'énergie déposée dans l'ADN, et donc les effets attendus, seront bien plus importants pour du tritium incorporé sous cette forme organique que pour du HTO, qui sera distribué de façon homogène dans les cellules et dans les tissus. Ces différences sont partiellement prises en compte dans les modèles de la CIPR qui distinguent le tritium administré sous forme d'eau tritiée de celui administré sous forme de tritium « biogénique » ou TOL, comprenant le tritium inclus naturellement dans les chaînes alimentaires mais excluant les molécules marquées artificiellement en laboratoire tels que les acides nucléiques. Pour ces deux formes, HTO et TOL, la CIPR distingue différents temps de transfert, conduisant à des coefficients de dose plus importants pour le tritium organique. Elle ne donne aucune indication pour les formes particulières de TOL telles que les acides aminés ou les acides nucléiques marqués, et recommande juste l'utilisation de paramètres spécifiques, non fournis par ailleurs.

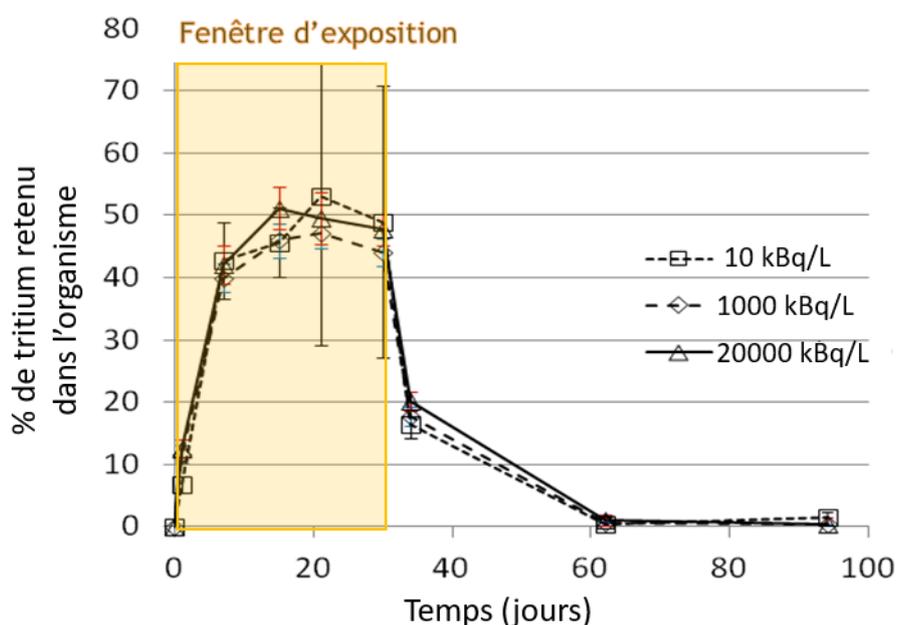
Les études menées par l'IRSN et CNL ont pour ambition de combler une partie des lacunes de connaissances sur les formes organiques de tritium, en fournissant des paramètres biocinétiques pour le calcul des doses mais également pour l'interprétation des effets observés.

### 3.1.2 Résultats expérimentaux sur les rongeurs

Les études développées en collaboration entre l'IRSN et le CNL ont porté sur la mesure de l'absorption, de la rétention et de la clairance du tritium dans les tissus de souris lors de l'ingestion chronique expérimentale de trois concentrations de HTO ou de TOL dans l'eau ou de boisson. Des souris mâles ont été utilisées pour déterminer la biocinétique du tritium après 30 jours d'ingestion continue de HTO ou de

TOL, à des concentrations de 10 kBq/L, 1 10<sup>3</sup> kBq/L ou 2 10<sup>4</sup> kBq/L dans l'eau de boisson fournie *ad libitum*. Un mélange de trois acides aminés tritiés (alanine, proline et glycine) a été utilisé comme modèle d'exposition au TOL. Le protocole expérimental est détaillé en Annexe 1.

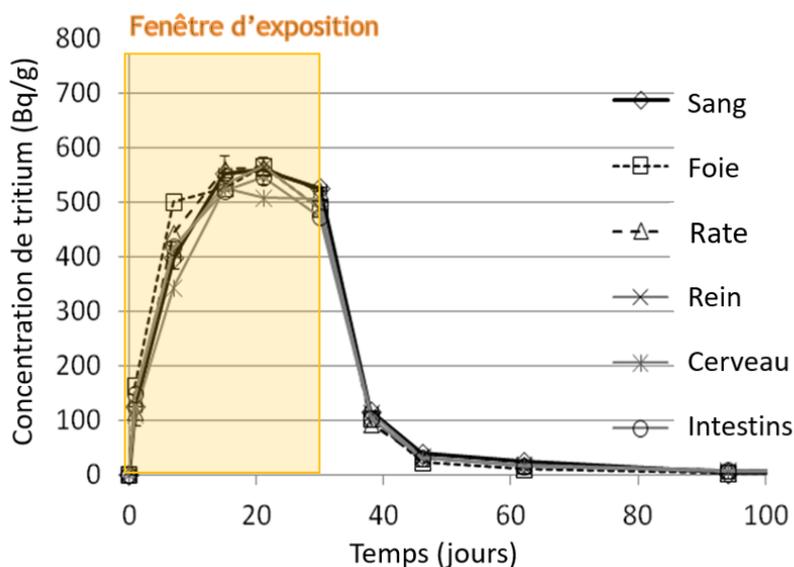
La Figure 3 montre les niveaux de tritium dans le corps entier des souris en fonction du temps après ingestion d'HTO. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la concentration de tritium dans l'eau de boisson. Comme attendu, la concentration d'équilibre dans le corps a été atteinte après environ 10 jours d'exposition. La concentration de tritium dans l'eau de boisson n'a pas affecté le pourcentage de tritium retenu dans le corps, qui était d'environ 50%. Après l'arrêt de l'ingestion de HTO, les niveaux de tritium dans le corps ont rapidement diminué, et 32 jours après l'exposition, ils étaient proches de la limite de détection de 5 10<sup>-2</sup> kBq/L.



**Figure 3 : Biocinétique du tritium dans le corps entier de la souris pendant et après ingestion d'HTO dans l'eau de boisson pendant 30 jours (adapté de Priest et al., 2017).**

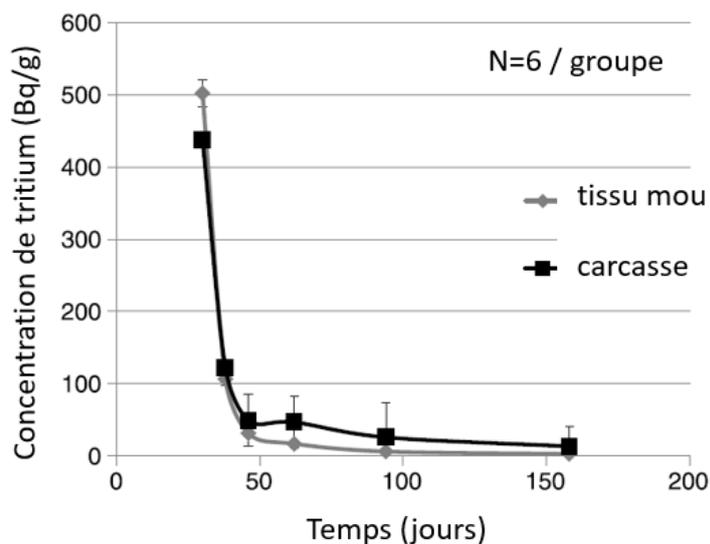
*Les résultats sont présentés en pourcentage de la concentration de tritium dans l'eau ingérée*

Pour les expérimentations d'ingestion de TOL sous forme d'un mélange d'acides aminés tritiés, les tissus ont été examinés séparément de façon à mettre en évidence une éventuelle absorption et distribution différentielle de tritium selon les organes. La Figure 4 présente les résultats pour la concentration de 1 10<sup>3</sup> kBq/L. Aucune différence majeure de la teneur en tritium dans les tissus examinés n'a été constatée, ni pendant l'ingestion de TOL, ni après la fin de l'exposition au TOL. Des résultats similaires ont été obtenus pour les concentrations de 10 kBq/L et 2 10<sup>4</sup> kBq/L. Étonnamment, la rétention de tritium observée avec le TOL différait peu de celle observée pour l'HTO, et la concentration revenait aux valeurs limites de détection dans les 32 à 64 jours suivant la fin de l'ingestion.



**Figure 4 : Biocinétique du tritium dans divers tissus de souris pendant et après ingestion de  $1 \cdot 10^3$  kBq/L de TOL dans l'eau de boisson pendant 30 jours (adapté de Priest et al., 2017)**

Les expositions à l'HTO et au TOL ont abouti à des concentrations similaires de tritium dans les différents organes et tissus mous considérés (sang, rate, foie, reins, intestin, cerveau), autour de 50 % de la concentration de tritium dans l'eau de boisson. Il était donc intéressant de comparer les concentrations de tritium après exposition au TOL entre ces organes et tissus mous et le reste de la carcasse (os, peau, muscles, tissu conjonctif). La rétention de tritium apparaît légèrement, mais pas de manière significative, plus élevée dans le reste de la carcasse que dans les tissus mous (Figure 5). Cependant, les doses globales résultantes au corps entier n'étaient pas différentes (voir Tableau A1.1 de l'Annexe 1).



**Figure 5 : Rétention du tritium dans les tissus mous (sang, rate, foie, reins, intestin, cerveau) par rapport à la carcasse restante (os, peau, muscle, tissu conjonctif) de souris après ingestion de TOL dans l'eau de boisson pendant 30 jours (adapté de de Priest et al., 2017)**

### 3.1.3 Résultats sur les poissons

#### 3.1.3.1 Biocinétiques du tritium sous forme HTO chez les embryons de poissons zèbres en laboratoire

Le transfert de tritium à partir d'une eau contaminée en HTO a été évalué pour différents stades larvaires du poisson zèbre, le *Danio rerio*. Pour ce modèle biologique de petite taille, un protocole spécifique a été mis au point afin d'évaluer le plus précisément possible les activités en tritium dans les tissus et ainsi calculer les doses absorbées (Arcanjo et al. 2019). Il a été possible de mesurer l'HTO et le TOL dans les œufs de 1 jour post fécondation (jpf) et les larves de 4 jpf, 7 jpf et 10 jpf, exposés soit à 410  $\mu\text{Gy/h}$  ( $1,22 \cdot 10^5$  kBq/L) soit à 3800  $\mu\text{Gy/h}$  ( $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L). La vitesse du processus d'internalisation a également été évaluée. Le protocole détaillé est présenté en Annexe 2.

Les résultats ont montré que l'internalisation d'HTO est un processus rapide et que l'équilibre est atteint 24 h après le début de la contamination (Figure 6). Cette étude a également montré que la formation de TOL est un processus limité, avec seulement 8% de tritium présents dans les tissus sous la forme TOL après 1 ou 4 jours de contamination, quel que soit le stade considéré.

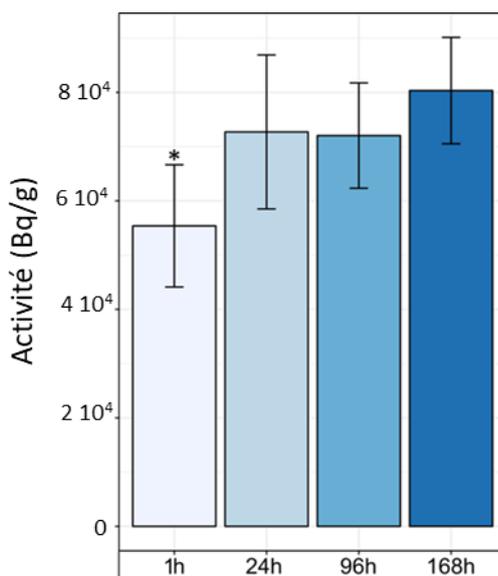


Figure 6 : Activité en tritium (Bq/g poids frais) chez le poisson zèbre 168 h après le début de la contamination (au stade 2-3 heures post fécondation) à  $1,22 \cdot 10^5$  kBq/L d'HTO (d'après Arcanjo et al., 2019)

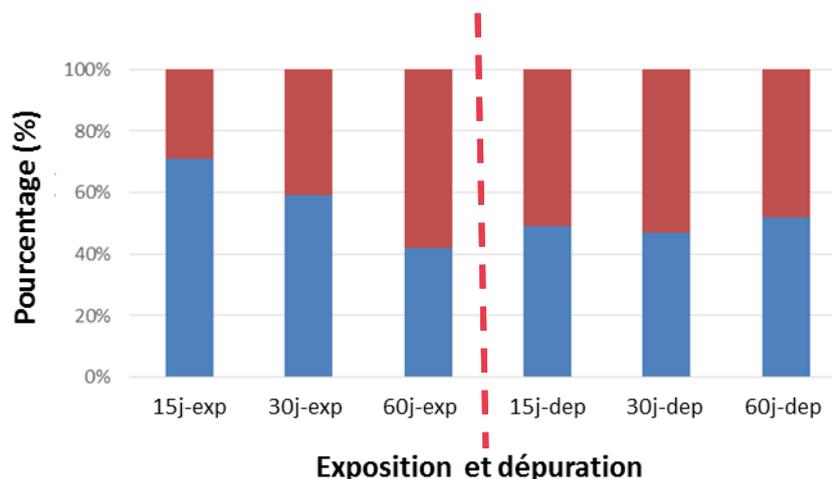
Les moyennes et l'écart-type sont présentés. \* indique une différence significative entre les groupes

#### 3.1.3.2 Biocinétiques du tritium administré sous forme HTO et TOL chez le poisson tête-de-boule adulte, en conditions contrôlées de laboratoire et sur le terrain

Les cinétiques d'accumulation du tritium ont également été étudiées chez le poisson tête-de-boule adulte. Les poissons ont été exposés en laboratoire pendant 60 jours (suivis d'une dépuración de 60 jours) à différentes concentrations en HTO (0, 12, 25, 180 kBq/L), à de la nourriture enrichie en un mélange de 3 acides aminés (lysine, leucine et arginine) (TOL, 21 kBq/kg) et à une condition réunissant une

exposition directe (HTO, 25 kBq/L) et trophique (TOL, 21 kBq/kg) (Gagnaire et al., 2020a). Il a été ainsi montré qu'après 60 jours de contamination, l'augmentation de tritium total dans les tissus des poissons était corrélée à celle de l'HTO dans l'eau, avec un facteur de concentration de l'ordre de 0,8. Pendant la dépuración, la concentration tissulaire en HTO a diminué très rapidement. Les concentrations tissulaires en TOL étaient cependant toujours mesurables à la fin de la dépuración (données non présentées). Ces résultats corroborent ceux de la littérature, qui rapportent que l'accumulation et la dépuración de TOL dans les tissus des poissons est un processus complexe et long (Kim et al., 2015).

L'origine du TOL accumulé dans les tissus des poissons semble varier au cours du temps. Au début de la période de contamination, le contributeur majoritaire était l'HTO de l'eau, transformé en TOL, alors qu'à la fin de la contamination le TOL provenant directement de la nourriture s'est avéré être le contributeur majoritaire (Figure 7; Gagnaire et al., 2020a). Lors de la dépuración, le TOL présent dans les tissus provenait à parts égales de la transformation de l'HTO de l'eau et du TOL de la nourriture. Ces résultats confortent des résultats antérieurs obtenus sur la truite (Kim et al., 2013a, 2015) et montrent que le tritium organique provenant de la nourriture joue un rôle prédominant dans l'internalisation du TOL dans les tissus.



**Figure 7 : Contribution (en %) du TOL originaire de la transformation de l'HTO de l'eau et de l'ingestion directe à partir de la nourriture dans le TOL mesuré dans les tissus des poissons (Gagnaire et al., 2020a)**

*conditions d'exposition : HTO 25 kBq/L (en bleu), TOL seul (en rouge). exp : périodes d'exposition ; dep : périodes de dépuración*

L'expérience de laboratoire a été reproduite sur la même espèce de poisson engagée le long d'un gradient de contamination sur le site de Chalk River, dans des conditions d'exposition similaires (HTO seul, TOL seul et HTO/TOL combinés) (Gagnaire et al., 2017). L'équilibre entre le tritium (HTO) dans l'eau et les tissus (HTO+TOL) était atteint dès le premier temps de prélèvement (15 jours). Dès le premier temps de dépuración (15 jours après l'arrêt de la contamination), la concentration tissulaire d'HTO était déjà négligeable, tandis que le TOL était dépuré beaucoup plus lentement. En fin de dépuración (60 jours après la fin d'exposition), la concentration de TOL tissulaire était toujours élevée et représentait environ 35 à 70 % de la concentration de TOL présente au début de cette phase de dépuración. Le facteur de concentration estimé pour le tritium (rapport tritium dans l'eau libre/HTO dans le milieu) variait entre 0,23 et 0,75.

L'accumulation de tritium (HTO plus TOL) chez les poissons engagés sur le terrain est plus élevée qu'en conditions contrôlées de laboratoire, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que les poissons engagés ont pu accéder à de la nourriture naturellement contaminée

(insectes, algues) qui n'était pas accessible aux poissons en laboratoire. L'origine du tritium ingéré semble donc influencer sur sa biodisponibilité, l'incorporation du tritium dans des matrices naturelles semblant augmenter cette dernière (Beaton et al., 2019).

En résumé, l'accumulation du tritium (HTO + TOL) dans les tissus des poissons est très rapide, puisqu'un équilibre est atteint dès 24 h après le début de la contamination chez les embryons de poisson zèbre, et au plus tard après 15 jours chez les poissons tête-de-boule adultes. Bien qu'il soit accumulé plus lentement que l'HTO, le TOL semble plus concentré que l'HTO dans les tissus après dépuración. La raison tient en une période biologique d'élimination plus élevée des formes organiques utilisées par rapport à l'eau tritiée.

### 3.1.4 Discussion

Les expérimentations sur souris menées dans le cadre du projet de recherche IRSN-CNL avaient pour objectif de décrire la biocinétique du tritium au niveau tissulaire après ingestion chronique de deux formes, HTO et TOL dans l'eau de boisson. Pour l'HTO, les résultats ont confirmé l'atteinte rapide d'un équilibre 10 jours après le début de l'exposition et la disparition tout aussi rapide ( $Tb_{1/2}$  de 3j<sup>8</sup>) du tritium dans le corps après la cessation de l'ingestion d'HTO, atteignant des niveaux non détectables 32 jours après la fin de l'exposition. L'activité à l'équilibre représentait environ 50 % de l'activité administrée, pour toutes les concentrations de HTO utilisées. Les expérimentations utilisant le TOL sous forme d'acides aminés tritiés, ont montré une biocinétique proche de celle de l'HTO et des concentrations de tritium assez homogènes entre les différents tissus examinés. La seule différence entre l'HTO et le TOL a été observée au niveau de la carcasse avec une rétention plus longue, pas suffisamment importante cependant pour contribuer à une différence globale au niveau du corps entier.

Ces résultats sont en contradiction avec la plupart des données de la littérature qui décrivent une rétention plus longue du TOL par rapport à l'HTO (ICRP 2016). Plusieurs facteurs peuvent avoir contribué à une biocinétique similaire de l'HTO et du TOL dans ces expériences, dont en premier lieu l'utilisation d'acides aminés marqués dans de l'eau en lieu et place de la nourriture contaminée utilisée dans la plupart des autres expériences qui peuvent être plus pertinentes pour mimer l'exposition humaine (Broer et Broer, 2017 ; Hisamatsu et al., 1992). Par conséquent, ces résultats, s'ils apportent des données nouvelles permettant de décrire le devenir des acides aminés marqués, ne peuvent constituer une preuve suffisante pour remettre en question les connaissances actuelles pour le TOL.

Au niveau environnemental, les expérimentations menées sur les poissons confirment que les cinétiques de dépuración des formes de TOL sont plus longues que celles de la forme HTO, conformément aux résultats produits dans la littérature scientifique.

### 3.1.5 Conclusions

Les travaux menés sur les biocinétiques du tritium ont permis de mesurer les cinétiques d'accumulation et de dépuración des formes HTO et TOL du tritium chez la souris et chez deux espèces de poissons. Ces données de laboratoire, complétées dans le cas des poissons par des données de terrain, ont confirmé que les vitesses d'absorption, de distribution puis de dépuración du HTO étaient extrêmement rapides, indépendantes des niveaux d'activité dans l'eau et ce, quelles que soient les espèces ou les conditions testées. Le cas du TOL apparaît plus complexe. Chez le poisson, il a été confirmé que le TOL corporel pouvait provenir soit de son ingestion directe soit de sa transformation après ingestion sous forme d'HTO. Les concentrations du TOL et sa vitesse d'élimination sont respectivement supérieures et inférieure à celles de l'HTO. Ces données sont conformes à ce qui est rapporté par la majorité des auteurs.

Dans le cas de la souris, les biocinétiques du tritium administré sous forme d'acides aminés marqués artificiellement ne semblent pas significativement différentes de celles observées pour l'HTO. Ces résultats surprenants peuvent interroger sur les mécanismes

---

<sup>8</sup>  $Tb_{1/2}$  : période biologique d'élimination. Cette valeur correspond au temps nécessaire pour que la concentration corporelle diminue d'un facteur 2.

d'incorporation et de transformation des différentes formes chimiques du tritium. A ce stade, ils ne sont pas suffisants pour remettre en cause les connaissances actuelles sur la biocinétique des TOL, fondées sur de nombreuses données animales et humaines.

## 3.2 DOMMAGES A L'ADN ET EFFETS CYTOGENETIQUES DU TRITIUM

### 3.2.1 Contexte

Des études théoriques et expérimentales ont montré que les particules bêta émises par le tritium sont particulièrement efficaces pour produire des cassures double brin (CDB) dans l'ADN (Goodhead, 2006, 2009 ; Alloni et al., 2014 ; Chen, 2012). La plupart des études ont été réalisées pour des doses de l'ordre du Gy et seules de rares études *in vitro* se sont intéressées à l'induction de CDB après exposition à des doses inférieures à 100 mGy en particulier afin d'identifier un possible seuil en dessous duquel les cellules n'activeraient pas leur système de réparation. Ainsi, une variation de la cinétique de réparation des CDB en fonction de la dose est suspectée (Quan et al., 2019). Le tritium induirait des cassures de l'ADN complexes qui prennent plus de temps à être réparées que les cassures induites par les rayonnements gamma. Une augmentation dose-dépendante des cassures simple brin (CSB), plus facilement réparables que les CDB, a également été observée chez de nombreux organismes aquatiques (Adam-Guillermin et al., 2012).

Ces CDB, lorsqu'elles ne sont pas réparées ou mal réparées, peuvent entraîner des lésions chromosomiques, une instabilité génomique et potentiellement conduire au cancer (Hoeijmakers, 2001 ; Van Gent et al., 2001 ; Jackson, 2002). C'est pourquoi il est également important d'étudier l'efficacité des mécanismes de réparation.

Ainsi, comme avec d'autres radionucléides, une augmentation dose-dépendante de la fréquence de chromosomes dicentriques, de translocations et de micronoyaux a été observée après exposition *in vitro* à du tritium. L'induction des aberrations chromosomiques de type dicentrique et translocation a également été utilisée pour évaluer la dose reçue par des travailleurs exposés accidentellement au tritium (doses de l'ordre de 0,5 Gy) (Little et Lambert, 2008 ; Lloyd et al., 1998). Tant les études *in vitro* que *in vivo* se sont intéressées à des expositions relativement courtes (aiguës ou au maximum de 80h) et à des niveaux de dose de l'ordre de 0,2 Gy. A notre connaissance, les seules études portant sur l'induction d'aberrations chromosomiques à faibles doses ont été réalisées chez plusieurs espèces aquatiques, comme des poissons (à partir de 1000 µGy/h jusqu'à un cumul de 90 mGy) ou des larves de mollusques (à partir de 12,5 µGy/h jusqu'à un cumul de 0,3 mGy) où une augmentation dose dépendante des aberrations chromosomiques (ponts chromosomiques, micronoyaux, échanges de chromatides sœurs) a été observée (Adam-Guillermin et al., 2012). Toutefois, ces expériences portaient sur des expositions de courte durée.

Ainsi, la génotoxicité des expositions prolongées à des faibles concentrations telles que celles observées dans l'environnement n'a été que peu étudiée et plus particulièrement après exposition au TOL.

Dans le cadre du programme de recherche IRSN-CNL, la mesure de la génotoxicité a été abordée à trois niveaux différents :

- La mesure des cassures de l'ADN : dommages à l'ADN mesurés par l'essai des comètes (CSB, CDB, sites alcali-labile et cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation) ou CDB mesurées par l'analyse des foci de  $\gamma$ H2AX ;
- La mesure de l'activation des systèmes de réparation ;
- La quantification des aberrations chromosomiques de type micronoyaux, inversions et translocations qui résultent de défauts de réparation.

### 3.2.2 Résultats expérimentaux sur les rongeurs

Les effets au niveau de l'ADN ont été mesurés pour les souris après 1 mois et 8 mois de contamination chronique à travers l'ingestion d'eau de boisson comprenant soit de l'HTO soit du TOL (acides aminés marqués au <sup>3</sup>H) à des concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L (correspondant à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40 µGy/h). Les détails expérimentaux sont donnés en Annexe 1. La synthèse des résultats obtenus sur le rongeur est présentée dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : Synthèse des résultats de la mesure des dommages à l'ADN chez le rongeur après contamination à l'HTO et au TOL durant 1 mois et 8 mois à trois concentrations différentes**

Paramètre étudié	1 mois d'exposition						8 mois d'exposition					
	HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)			HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)		
	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Dommages à l'ADN	-	-	-	-	↓	↓	-	-	↓	-	-	-
Gènes de la réparation	10/3	1/2	9/3	14/5	10/8	0/2	1/3	6/3	1/2	2/51	2/51	2/58
CDB après ré-irradiation	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑	-
Aberrations	-	↑	↑	-	↑	↑	-	-	-	-	↑	↑

Concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, correspondant respectivement à des débits de dose de l'ordre de 0,02, 2 et 40 µGy/h. ↑ : augmentation significative par rapport au groupe non exposé, ↓ : diminution significative par rapport au groupe non exposé ; - : pas de différence significative. Sur les 84 gènes mesurés, les valeurs en vert et rouge indiquent respectivement le nombre de gènes régulés à la hausse ou à la baisse dans chaque condition.

#### 3.2.2.1 Dommages à l'ADN

Les niveaux de base en termes de dommages à l'ADN ont été évalués en mesurant par cytométrie en flux le nombre de foci de γH2AX, marqueur classique mais indirect des CDB, dans les splénocytes (cellules de la rate). Une exposition d'un mois aux trois niveaux de concentrations de HTO et de TOL n'a pas entraîné d'augmentation des taux de dommage à l'ADN. Une diminution significative de l'ordre de 16 % et 24 % (p<0,01) des niveaux de dommages à l'ADN par rapport aux témoins a néanmoins été observée pour les expositions au TOL à 1 10<sup>3</sup> kBq/L et 2 10<sup>4</sup> kBq/L (soit 2 et 40 µGy/h). Après 8 mois une diminution des taux d'endommagement de l'ADN au-dessous du niveau des groupes contrôles a également été observée pour tous les groupes. Bien que les diminutions soient de l'ordre de 23 % par rapport au contrôle, elles ne sont statistiquement significatives que pour l'HTO à la concentration de 2 10<sup>4</sup> kBq/L (soit 40 µGy/h).

#### 3.2.2.2 Réparation de l'ADN

Deux approches ont été mises en œuvre pour évaluer si l'exposition prolongée au tritium pouvait avoir un effet sur les mécanismes de réparation : 1/ la mesure de l'expression des gènes liés aux mécanismes de réparation de l'ADN et 2/ le suivi de la cinétique de réparation des cassures induites après une seconde irradiation *ex vivo*.

La première approche consiste à mesurer l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN à l'aide du test d'amplification des acides ribonucléiques (ARN) en temps réel (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). Au total, 84 gènes cibles, tous impliqués dans diverses voies de réparation de l'ADN, ont été mesurés pour chaque échantillon. A un mois, selon les groupes, entre 3 et 13 gènes ont été modifiés dans les groupes exposés en comparaison aux groupes non exposés. Après un mois et 8 mois d'exposition, les groupes exposés à l'HTO sont caractérisés par une activation des gènes de réparation de l'ADN mais de façon plus marquée à un mois qu'à 8 mois. Cependant, une réponse très différente a été observée pour tous les groupes exposés au TOL. En particulier, un très grand

nombre de gènes (entre 51 et 57 en fonction des doses sur 84 étudiés) se sont avérés être régulés à la baisse dans les cellules de souris exposées au TOL ce qui suggère une inhibition des mécanismes de réparation.

La deuxième approche complémentaire consiste à évaluer si la contamination interne au tritium durant 1 mois ou 8 mois a un impact sur la capacité des cellules à réparer les dommages induits par l'ajout d'une irradiation gamma externe. Pour cela, des splénocytes issus des souris contaminées durant un mois ou huit mois ont été irradiés *ex-vivo* à 2 Gy (Flegel et al., 2013). Ce protocole de ré-irradiation est classiquement utilisé pour mettre en évidence une réponse adaptative des cellules ; une exposition chronique préalable à une irradiation aigue étant décrite comme réduisant l'effet de l'exposition aigue seule (Guéguen et al., 2019). Après contamination par de l'HTO, la cinétique de réparation des CDB mesurées 1 h et 24 h après exposition à la dose de 2 Gy n'est pas modifiée par rapport au groupe témoin, que la contamination au tritium ait duré 1 mois ou 8 mois.

Cependant, pour certains groupes exposés au TOL, une heure après irradiation à 2 Gy, en comparaison avec les souris non contaminées, le taux de CDB est plus élevé dans les splénocytes de souris contaminées avec du TOL à  $1 \cdot 10^3$  kBq/L pendant 1 mois et  $2 \cdot 10^4$  kBq/L pendant 8 mois. Ce taux élevé de CDB observé 1 h après exposition n'est pas observé pour les autres concentrations de TOL et ne se maintient pas dans le temps puisque 24h après, un taux non significativement différent de CDB entre les groupes contaminés et non contaminés est mesuré. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence de différence dans la capacité des cellules à réparer les dommages contrairement à ce que suggèrent les résultats de la mesure de l'expression des gènes.

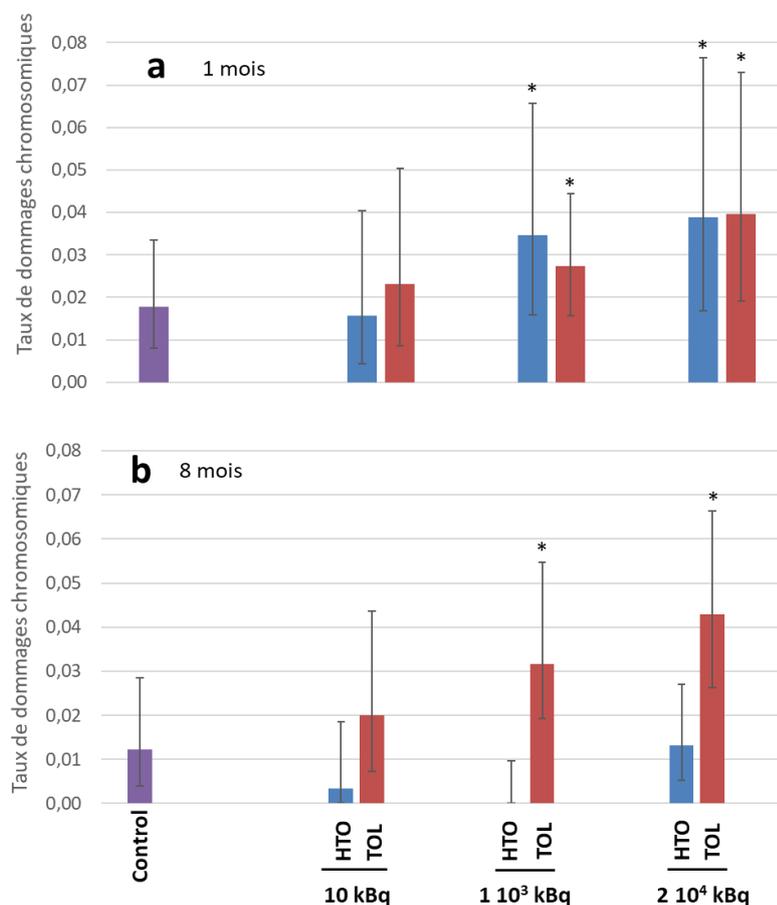
### 3.2.2.3 Dommages cytogénétiques

Quelles que soient les concentrations étudiées, le taux d'érythrocytes polychromatiques avec micronoyaux (Hayashi et al., 2000) chez les souris exposées à l'HTO et au TOL pendant 1 mois et 8 mois ne diffère pas statistiquement des valeurs obtenues pour les témoins (Roch-Lefèvre et al., 2018) bien que la moelle osseuse soit l'un des tissus les plus radiosensibles en raison des processus actifs d'hématopoïèse et de lymphopoïèse (Heylmann et al., 2014).

De façon identique, aucune inversion intrachromosomique n'a été observée au niveau des cellules de la rate après exposition à l'HTO pendant une durée d'un mois et de huit mois chez un modèle de souris génétiquement modifiée fréquemment utilisé pour étudier les inversions chromosomiques après exposition radiologique aigue (Bannister et al., 2016).

Quelle soit la durée d'exposition, tous les groupes exposés au débit de dose le plus faible (10 kBq/L, soit 0,02 µGy/h), à la fois pour l'HTO et pour le TOL, ne présentent pas plus d'aberrations chromosomiques mesurées par hybridation *in situ* en fluorescence (technique mFISH) que le groupe témoin.

En revanche, après un mois d'exposition aux concentrations de  $1 \cdot 10^3$  et  $2 \cdot 10^4$  kBq/L de HTO et de TOL (soit 2 et 40 µGy/h) une augmentation statistiquement significative du niveau de dommages à l'ADN a été observée. Après 8 mois d'exposition, cette augmentation significative des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes n'est observée que dans le groupe TOL par rapport au groupe témoin (Figure 8).



**Figure 8 : Relation entre le taux de dommages chromosomiques et la concentration de tritium (HTO ou TOL) dans l'eau de boisson, a) après une exposition de 1 mois et b) après une exposition de 8 mois (Roch-Lefèvre et al., 2018)**

*\*différence entre les groupes exposés et les groupes contrôles  $p < 0,05$*

### 3.2.3 Résultats de radiotoxicologie environnementale sur les poissons

Pour les poissons, la mesure des effets génotoxiques a été faite sur les stades embryo-larvaires du poisson zèbre exposés jusqu'à 10 jpf à des concentrations d'HTO allant de  $1,22 \cdot 10^4$  à  $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L (correspondant à des débits de dose moyens pour tous les stades de développement étudiés, allant de 110 à 3800  $\mu\text{Gy/h}^9$ ). Ces expériences à visée mécanistique, réalisées avec des concentrations relativement élevées, ont été complétées par des expérimentations sur les poissons tête-de-boule, menées sur le terrain ou en laboratoire, avec des concentrations représentatives d'un environnement contaminé (au Canada). Ces poissons ont été exposés pendant 2 mois à de l'HTO seul (concentration maximale de 180 kBq/L soit 0,65  $\mu\text{Gy/h}$ ) ou en mélange avec du TOL. Cette exposition a été suivie d'une phase de dépuración de deux mois également (voir protocole détaillé en Annexe 2).

<sup>9</sup> Ces débits de dose peuvent varier en fonction de la morphologie du stade de développement, voir les calculs en Annexe 2

Chez les stades précoces de poisson zèbres exposés à l'HTO, des modifications des niveaux d'endommagement de l'ADN ne sont observées qu'au stade larvaire de 4 jpf, avec des changements différents selon le débit de dose étudié. Le Tableau 2 présente les résultats sur les dommages à l'ADN analysés par test comète qui permet la détection des cassures simple et double brin, des sites alcali-labiles et des cassures transitoires liées à des mécanismes de réparation, via la mesure du tail moment<sup>10</sup>. Une diminution des dommages à l'ADN est observée lors de l'exposition au plus faible débit de dose (110 µGy/h correspondant à une exposition à une activité de 1,22 10<sup>4</sup> kBq/L), alors que leur augmentation est observée pour les deux débits de dose les plus forts (410 et 3800 µGy/h) (Gagnaire et al., 2020b). Ces dommages à l'ADN étant globalement facilement réparables, les CDB dont la réparation est moins facile et plus sujette à des erreurs de réparation, ont été spécifiquement mesurées grâce à la visualisation de la protéine γH2AX sur l'organisme entier. Cependant, aucune augmentation des CDB n'a été observée par rapport au témoin (Arcanjo et al., 2018).

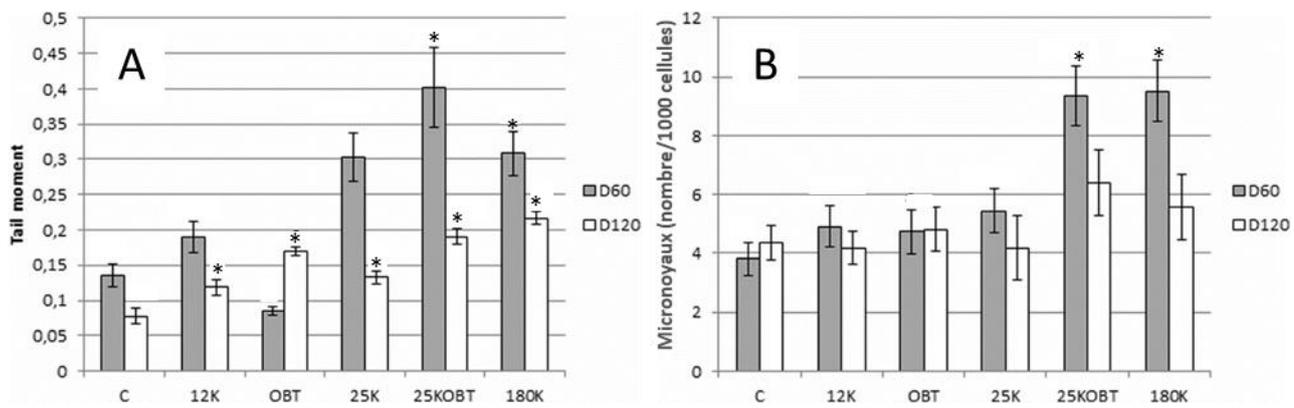
**Tableau 2 : Dommages à l'ADN (tail moment) chez des embryons de poissons zèbres de 1 jpf (n = 3 pools de 10), et chez des larves de 4, 7 et 10 jpf (n = 10) témoins et exposés à de l'HTO (Gagnaire et al., 2020b)**

Activité volumique (kBq/L)	Débit de dose* (µGy/h)	1 jpf	4 jpf	7 jpf	10 jpf
Témoin	Témoin**	4,80 ± 0,31	<b>3,68 ± 0,14 B</b>	0.87 ± 0.06	0.42 ± 0.03
10 <sup>4</sup>	110	4,93 ± 0,21	<b>1,39 ± 0,06 A</b>	1.47 ± 0.10	0.39 ± 0.03
Témoin	Témoin	1,82 ± 0,09	<b>0,84 ± 0,04 A</b>	2.20 ± 0.11	n.d.
10 <sup>5</sup>	410	1,87 ± 0,09	<b>1,30 ± 0,07 B</b>	2.47 ± 0.13	n.d.
Témoin	Témoin	1,46 ± 0,06	<b>0,86 ± 0,04 A</b>	1.15 ± 0.08	0.78 ± 0.06
10 <sup>6</sup>	3800	1,78 ± 0,13	<b>2,09 ± 0,13 B</b>	1.47 ± 0.09	0.83 ± 0.07

*Les valeurs en gras indiquent une différence significative entre les conditions (A<B) ; n.d. = non déterminé ; \* : ces valeurs correspondent au débit de dose moyen pour tous les stades de développement \*\* bruit de fond de 0,1 µGy/h*

Chez des poissons tête-de-boule adultes, exposés sur le terrain ou en laboratoire pendant 2 mois à des concentrations de tritium allant jusqu'à 180 kBq/L (débit de dose estimé pour les poissons de 0,65 µGy/h – dose cumulée allant jusqu'à ~ 1 mGy), une augmentation dose-dépendante des dommages à l'ADN (dans les gonades) et des micronoyaux (dans le sang) est observée après 2 mois d'exposition (Gagnaire et al., 2017, 2020a) (Figure 9). De façon intéressante, les groupes exposés au mélange HTO et TOL, présentent généralement des dommages à l'ADN plus élevés que les groupes exposés seulement à l'HTO. Après deux mois de dépuración, seuls les dommages à l'ADN persistent dans tous les groupes exposés tandis que les fréquences de micronoyaux sont revenues au niveau des témoins. Ceci dénote de la persistance des dommages à l'ADN facilement réparables tandis que les dommages plus importants exprimés *via* les micronoyaux ne sont plus observés. Ces dommages à l'ADN demeurant pendant 2 mois sont à mettre en relation avec la persistance d'une contamination en TOL dans les tissus durant toute la phase de dépuración.

<sup>10</sup> Produit de la longueur de la queue de la comète par le pourcentage d'ADN contenu dans la queue



**Figure 9 : Dommages à l'ADN (A) et fréquence de micronoyaux (B) mesurés respectivement dans les gonades et dans le sang de poissons tête-de-boule après 60 jours (D60) d'exposition à différents traitements de tritium et après 60 jours de dépuración (D120) (Gagnaire et al., 2020a)**

C : contrôle ; 12K : exposition à 12 kBq/L d'HTO ; OBT : exposition à du TOL seul (1% de nourriture contaminée à hauteur de 21 kBq/kg) ; 25K : exposition à 25 kBq/L d'HTO ; 25KOBT : combinaison des conditions « OBT » et 25K ; 180K : exposition à 180 kBq/L d'HTO. \* : différence significative avec le groupe témoin au même temps.

### 3.2.4 Discussion

Une augmentation des dommages à l'ADN est classiquement attendue après exposition à un agent génotoxique (Anses, 2017). Dans le cas des rayonnements ionisants et plus particulièrement du tritium, le rayonnement bêta émis peut interagir avec l'ADN pour créer des lésions. La question est donc de savoir dans quelle mesure de telles lésions sont induites après exposition chronique à des niveaux plus faibles que ce qui a été décrit auparavant dans la littérature. Les études décrites ici visent également à évaluer l'impact respectif des différentes formes de tritium. Même si des cassures sont créées au niveau de l'ADN, c'est leur devenir qui est à prendre en considération pour évaluer le potentiel effet cancérogène d'une substance. Cela nécessite d'évaluer l'efficacité des mécanismes de réparation et les aberrations chromosomiques qui pourraient être générées par la mauvaise réparation de ces lésions.

Dans nos études, les cassures de l'ADN ont été mesurées dans les splénocytes de souris (CDB), dans les embryons de poissons zèbres (CSB et CDB), et chez les poissons tête-de-boule adultes (CSB et CDB). Les résultats varient en fonction des espèces et des conditions d'exposition étudiées, néanmoins de façon surprenante une réduction du nombre de CDB a été observée chez la souris dans certains groupes en particulier après exposition au TOL (Tableau 1) ainsi que chez des embryons de poissons zèbres à 4 jpf (Tableau 2). Cette même tendance à la moindre induction de cassures après exposition chronique a aussi été observée pour des souris exposées en externe à un rayonnement gamma de débits de dose équivalents (données générées dans les mêmes conditions expérimentales mais non présentées). Dans une étude indépendante, Osipov et al. (2013) observent également chez la souris une baisse du nombre de cassures à partir de 4 mois d'exposition chronique à un débit de dose de 150 µGy/h. Cette diminution n'est retrouvée qu'après exposition chronique. Chez les larves de poisson zèbre, une réponse réversible dépendante de la dose est observée, avec des fréquences de micronoyaux plus élevées pour les deux concentrations de tritium les plus fortes. Néanmoins, ce résultat ne conduit à aucun impact observable sur l'occurrence de malformations ou sur la mortalité (section 3.4). Un résultat identique a été observé à la suite d'une irradiation gamma externe, indiquant que les micronoyaux, liés à la mort cellulaire, pourraient éliminer les conséquences des dommages importants à l'ADN, permettant la survie des embryons (Pereira et al., 2011).

Deux approches classiques ont été utilisées pour mesurer l'efficacité des mécanismes de réparation chez la souris (expression des gènes et ré-irradiation). La ré-irradiation est classiquement utilisée pour évaluer si une exposition chronique ou à faible dose conduit à

l'activation de mécanismes d'adaptation. Le résultat le plus marquant est une régulation à la baisse de l'expression des gènes de réparation pour tous les groupes TOL exposés durant 8 mois, laissant supposer une modification de leur efficacité. Cela peut expliquer pourquoi 1h après ré-irradiation une augmentation du nombre de cassures est observée (significative ou non). Cette augmentation ne reste pas stable dans le temps et un retour à la normale est observé 24h après la ré-irradiation. Toutefois, une inhibition globale et massive de l'expression des gènes de réparation a déjà été montrée chez d'autres vertébrés exposés aux rayonnements ionisants et pourrait indiquer une réponse protectrice contre les rayonnements *via* la compaction de la chromatine (Hurem et al., 2018). Une absence de réparation de l'ADN peut dans des cellules fonctionnant normalement conduire à la mort des cellules et donc à l'élimination des dommages ce qui réduit le risque de développer des cancers.

Lorsque les mécanismes de réparation sont activés, les réparations peuvent alors être fidèles et les lésions produites sont alors sans conséquence. Dans le cas où les réparations ne seraient pas fidèles, des aberrations chromosomiques peuvent être générées. L'approche utilisée a consisté à mesurer l'ensemble des dommages qu'il s'agisse de translocations, de dicentriques, de fragments (approche mFISH chez le rongeur) ou de micronoyaux (poisson). L'avantage de la technique mFISH est de mesurer le cumul des erreurs de réparation qui ont pu se produire durant l'exposition. Bien qu'aucune augmentation des micronoyaux n'ait été détectée dans la moelle osseuse, organe particulièrement sensible, le groupe exposé au TOL présente une augmentation significative des dommages chromosomiques aussi bien après un mois qu'après 8 mois d'exposition ; l'augmentation est également observée après exposition à l'HTO durant un mois mais n'est pas retrouvée après une exposition de 8 mois. L'augmentation des aberrations chromosomiques et des micronoyaux est observée alors qu'à ces niveaux de dose il n'est pas mis en évidence d'augmentation significative après exposition aiguë à l'HTO ou exposition gamma chronique. Cette augmentation est à moduler car le nombre de dommages reste relativement faible mais traduit une possible hétérogénéité des dépôts d'énergie particulièrement marquée pour le TOL.

### 3.2.5 Conclusions

L'impact de la contamination interne au tritium a été évalué à différents niveaux de réponse, en partant de l'induction de cassures doubles brins de l'ADN puis en analysant l'impact du tritium sur les mécanismes de réparation (au niveau de l'expression des gènes et de la réparation des cassures) et enfin l'induction d'aberrations chromosomiques induites par la mauvaise réparation des cassures (micronoyaux et aberrations chromosomiques).

Les résultats des expérimentations indiquent que, dans les conditions d'exposition mises en œuvre, le tritium: i) n'entraîne pas d'augmentation notable du taux de CDB de l'ADN dans les splénocytes, ii) peut induire un taux de cassure de l'ADN inférieur aux témoins pour certains temps et certaines concentrations (1 mois TOL  $1 \cdot 10^3$  et  $2 \cdot 10^4$  kBq/l et 8 mois HTO à  $2 \cdot 10^4$  kBq/L chez le rongeur, et 4 jpf chez le poisson à  $1,22 \cdot 10^4$  kBq/L), iii) a un impact à court terme sur les mécanismes de réparation, iv) conduit à une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques après exposition au TOL chez le rongeur et dans certaines conditions chez le poisson.

Une spécificité du programme de recherche est d'avoir exposé les souris sur plusieurs mois et avec des débits de dose de l'ordre du  $\mu\text{Gy/h}$  beaucoup plus proches des niveaux potentiellement rencontrés dans l'environnement que les débits de dose et doses classiquement étudiés dans la littérature. De telles études *in vivo* ont plus de poids pour évaluer la toxicité d'un produit que des études *in vitro*. Une seconde spécificité du programme de recherche est d'avoir étudié plusieurs niveaux de réponse, incluant en particulier la mesure des aberrations chromosomiques qui sont plus prédictives du développement potentiel d'un cancer que la seule mesure des dommages initiaux à l'ADN. Les différents paramètres étudiés ne répondent pas de la même façon dans les différentes conditions d'exposition et n'apparaissent pas corrélés à la concentration utilisée. Ces résultats illustrent la difficulté de décrire exhaustivement les dommages créés après exposition et leur conséquence.

Les inductions d'aberrations chromosomiques sont observées en majorité pour les groupes de souris exposés au TOL (sauf pour les plus faibles concentrations) et quelques groupes exposés à l'HTO (aux deux plus fortes concentrations après un mois d'exposition). Cette augmentation n'est pas visible pour les groupes exposés aux concentrations de tritium les plus faibles. L'augmentation des aberrations chromosomiques reste de faible amplitude et ne présage pas des conséquences phénotypiques qui peuvent en découler. On peut par ailleurs souligner l'absence de malformations observée chez les stades précoces de poissons zèbres (voir section 3.4). L'étude de la fréquence des cancers chez les souris actuellement conduite par CNL devrait permettre d'apporter des éléments d'information complémentaires utiles à l'interprétation de ces données (voir Annexe 3).

### 3.3 MARQUEURS DE TOXICITE TISSULAIRE DU TRITIUM

#### 3.3.1 Contexte

De nombreuses études montrent le rôle potentiel des modifications moléculaires, cellulaires et tissulaires après une exposition aux rayonnements ionisants dans la survenue d'effets autres que l'induction de cancers, aux fortes comme aux faibles doses (Little, 2013). Ces phénomènes seraient principalement liés à des mécanismes pro-inflammatoires induits par un métabolisme RedOx déséquilibré (Little et al., 2008 ; Baiocco et al., 2020), et peuvent, à long terme, entraîner des pathologies variées au niveau cardiovasculaires, neurologiques, néphrologiques, hématologiques ou encore métaboliques.

Des effets non cancérogènes liés à une exposition au tritium ont été observés sur le système hématopoïétique de rongeurs, mais à des concentrations généralement très élevées de l'ordre de  $10^6$  kBq/L, ce qui rend difficile l'extrapolation aux faibles concentrations (Little et Lambert, 2008 ; Yamamoto et al., 1990). De façon similaire, chez les poissons, des effets fonctionnels délétères commencent à apparaître à partir de concentrations d'HTO de l'ordre de  $10^6$  kBq/L (Adam-Guillermin et al., 2012). Les effets observés sont principalement une altération de la fonction reproductrice, qui survient suite à une exposition des stades précoces (Hyodo-Taguchi et Etoh, 1986) ou des adultes (Hyodo-Taguchi et Egami, 1977). Une altération du comportement de reproduction (Erickson, 1971) ainsi que des effets développementaux ont également été reportés (voir section 3.4.1). Outre ces effets sur la reproduction, une perturbation de la réponse immunitaire et des mécanismes anti-inflammatoires a également été rapportée (Strand et al., 1982).

Néanmoins, pour le tritium, les mécanismes impliqués dans ces différentes altérations fonctionnelles des organismes ont été très peu investigués, et les effets biologiques du tritium restent mal connus à faible dose.

Dans ce contexte, le programme de recherche IRSN-CNLS a cherché à examiner divers marqueurs de toxicité dans une série de tissus et d'organes de souris et de poissons, notamment le cerveau, les vaisseaux, le rein, le foie, l'intestin, la rate et le sang. Les paramètres considérés incluent les modifications macroscopiques et microscopiques des tissus (poids, morphologie, anatomopathologie, caractéristiques cellulaires), les modifications de l'équilibre RedOx, la réponse inflammatoire, les changements fonctionnels/métaboliques et la toxicité pour l'organe.

#### 3.3.2 Résultats expérimentaux sur les rongeurs

Les effets tissulaires chez les souris ont été mesurés après 1 mois et 8 mois de contamination chronique à travers l'ingestion d'eau de boisson comprenant soit de l'HTO soit du TOL (sous forme d'acides aminés) à des concentrations de 10,  $1 \cdot 10^3$  et  $2 \cdot 10^4$  kBq/L (correspondant à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40  $\mu$ Gy/h). Le protocole expérimental est détaillé en Annexe 1 (Guéguen et al., 2018).

Les sections suivantes synthétisent, par tissu/organe, les principales observations issues de ce programme de recherche, sélectionnées en fonction de l'ampleur des modifications observées et de leur pertinence pour la santé. L'ensemble des résultats sont disponibles dans les articles spécifiques (Bertho et al., 2019 ; Flegal et al., 2013 ; Guéguen et al., 2018) ou les rapports (CNSC, 2015 ; COG, 2015) publiés par ailleurs. D'autres publications sont en cours de préparation.

### 3.3.2.1 Cerveau

Deux compartiments du cerveau ont été analysés séparément, le cortex entorhinal et l'hippocampe. L'état RedOx a été évalué en mesurant l'expression des gènes impliqués dans la détoxification des espèces réactives à l'oxygène : SOD1, GS, GPx, CAT, HO-1. L'évaluation des changements fonctionnels potentiels a été faite en mesurant l'expression des gènes du système cholinergique impliqués dans l'apprentissage et la mémoire (m1AChR, nAChRbeta2, nAChRalpha5, ChAT, acétylcholinestérase (AChE), BuChE, VACHRT) et des gènes d'enzymes (cytochrome P450) et de facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme cérébral du cholestérol, des xénobiotiques et de la vitamine D (CYP 27A1, CYP46A1, CYP1A1, CYP2R1, CYP27B1, LXR  $\beta$ , VDR et RXR).

Le Tableau 3 présente un résumé des résultats observés au niveau du cerveau. Des anomalies macroscopiques des tissus (poids et morphologie) n'ont pas été détectées, quelle que soit la forme (HTO ou TOL) et la concentration de tritium. Au niveau du statut RedOx, un mois d'ingestion de tritium avec de l'eau de boisson (HTO et TOL) n'a entraîné aucun changement détectable. Cependant, des changements significatifs de niveaux d'expressions géniques ont été observés essentiellement pour différents marqueurs des métabolismes du cholestérol (gènes des CYP27A1, CYP46A, LXRb, RXRa) et de la vitamine D (gènes des CYP2R1, CYP27B1, RXRa) dès un mois de contamination, présentés dans le Tableau 3 dans la ligne « Fonction/métabolisme ».

Les changements observés au niveau des métabolismes cérébraux surviennent dès la dose de 10 KBq et semblent être plus prononcés avec la forme TOL de tritium. Il est intéressant aussi de noter que ces changements de niveaux d'expressions géniques étaient moins prononcés dans le cerveau des animaux exposés au HTO pendant 8 mois qu'après un mois d'exposition, contrairement à ceux exposés à la forme TOL. Le nombre de gènes dysrégulés semble aussi varier avec la dose de tritium. Sur une période longue de 8 mois, la forme TOL semble affecter plus fortement les niveaux d'expressions géniques que la forme HTO. Ce résultat montre que les propriétés physico-chimiques du tritium jouent un rôle important sur son niveau d'effet biologique.

Dans le cas du TOL, cet effet s'est accompagné d'une diminution de l'expression des enzymes antioxydantes. Ce résultat suggère que le statut RedOx pourrait aussi jouer un rôle dans la modification de l'expression des marqueurs fonctionnels/métaboliques.

**Tableau 3 : Synthèse des effets cellulaires et tissulaires observés sur le cerveau (Guéguen et al, 2018)**

Paramètre étudié	1 mois d'exposition						8 mois d'exposition					
	HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)			HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)		
	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Macroscopique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RedOx *	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓	-
Fonction/métabolisme *	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	-	↓	↑↓	↓

Concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, correspondant respectivement à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40 µGy/h. Les changements ajustés sur l'âge par rapport au groupe contrôle sont indiqués comme suit : - pas de changement ; ↓ diminution du statut ; ↑ augmentation du statut ; ↑↓ diminution ou augmentation du statut observée suivant différents marqueurs. \* Les changements observés étaient très modérés et se retrouvaient dans un ou deux marqueurs sur les nombreux examinés ; voir le texte pour plus d'informations.

### 3.3.2.2 Système vasculaire

Les marqueurs biologiques considérés pour le système vasculaire ont été examinés à travers l'analyse d'échantillons d'aorte thoracique et abdominale. La dysfonction endothéliale est un mécanisme physiopathologique majeur qui peut contribuer à différentes maladies cardiovasculaires. Un ensemble de marqueurs spécifiques de la balance RedOx endothéliale et de l'état inflammatoire, ainsi que de la fonction cellulaire, a été analysé. Il s'agit de GPX, CAT, SOD2, NRF2, HO-1, ONOO comme marqueurs RedOx, MCP1, ICAM, IL6, TNF, IL18, CRP, IL4, IL13, TGF comme marqueurs d'inflammation, et NOS1, NOS2, NOS3, AT1R, AT2R, AGT, ACE2, EDN comme marqueurs de la fonction endothéliale cellulaire. Ces marqueurs ont été évalués en mesurant les niveaux d'Acide RiboNucléique (ARN) messenger des gènes correspondants. En outre, l'expression protéique de VCAM-1 et ICAM-1 (molécules d'adhésion inflammatoire vasculaire) a été mesurée in situ dans les préparations immunohistochimiques de l'aorte afin de détecter les éventuels changements fonctionnels.

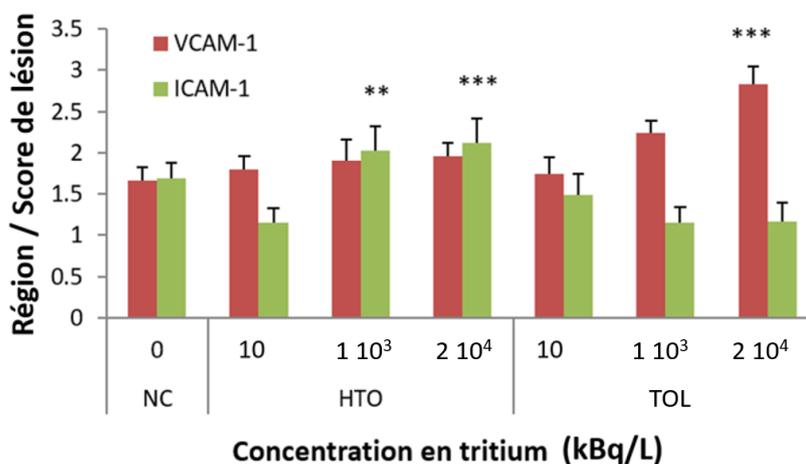
Le Tableau 4 récapitule les résultats observés au niveau du système vasculaire. Aucune modification du statut RedOx n'a été observée chez les animaux exposés au tritium (HTO et TOL) pendant un mois. De légers changements ont été observés au niveau des marqueurs d'inflammation dans les groupes exposés à 2 10<sup>4</sup> kBq/L de HTO et 10 et 1 10<sup>3</sup> kBq/L de TOL pendant 1 mois. Ces changements étaient à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, et aucune dépendance à la dose n'a été observée. Cependant, aucun changement dans les marqueurs fonctionnels n'a été observé chez ces animaux.

**Tableau 4 : Synthèse des effets cellulaires et tissulaires observés sur le système vasculaire (Guéguen et al, 2018)**

Paramètre étudié	1 mois d'exposition						8 mois d'exposition					
	HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)			HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)		
	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Macroscopique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RedOx	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-
Inflammatoire **	-	-	↑↓	↓	↑	-	-	-	↓	↑↓	↑↓	↑↓
Fonction/métabolisme **	-	-	-	-	-	-	-	↓*	↓*	-	↓*	↓*

Concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, correspondant respectivement à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40 µGy/h. Les changements ajustés sur l'âge par rapport au groupe contrôle sont indiqués comme suit : - pas de changement ; ↓ diminution du statut ; ↑ augmentation du statut ; ↑↓ diminution ou augmentation du statut observée suivant différents marqueurs ; \* changements significatifs illustrés Figure 10. \*\* Les changements observés étaient très modérés et se retrouvaient dans un ou deux marqueurs sur les nombreux examinés ; voir le texte pour plus d'informations.

L'exposition durant huit mois a entraîné des changements plus notables. Il est intéressant de noter que ceux-ci étaient mineurs pour le statut RedOx (observé seulement pour l'HTO 1 10<sup>3</sup> kBq/L) et plus prononcés en ce qui concerne le niveau d'inflammation et la fonction endothéliale. Ainsi, les marqueurs d'expression génique et immunohistochimique in situ de l'inflammation ont été modifiés par les concentrations d'HTO 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L et par le TOL à 2 10<sup>4</sup> kBq/L (Figure 10). Ces altérations étaient de nature à la fois pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Cependant, une décroissance des marqueurs fonctionnels était observée dans les groupes 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L pour l'HTO et le TOL. Ces résultats suggèrent que la fonction endothéliale est diminuée à la suite d'une exposition à long terme au tritium sous forme d'HTO et de TOL à des concentrations de 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, mais pas de 10 kBq/L. Cette altération pourrait être causée par un déséquilibre de l'état inflammatoire des tissus. Cependant, le statut RedOx, du moins en utilisant l'ensemble des marqueurs utilisés dans cette étude, ne semble pas contribuer à la dysfonction endothéliale. L'ensemble des modifications moléculaires observées n'engendre pas d'atteinte histologique tissulaire au niveau aortique (rapport intima-média). Des analyses supplémentaires de la fonction vasculaire seraient nécessaires pour compléter ces études.



**Figure 10 : Modifications tissulaires pro-inflammatoires de l'endothélium vasculaire après exposition au tritium pendant 8 mois**

NC : non contaminés. Les aortes ont été analysées par immunohistochimie pour détecter la présence de VCAM-1 et d'ICAM-1. Les marqueurs ont ensuite été notés par analyse d'image. \*\* P<0,01 \*\*\* 0,001

### 3.3.2.3 Rein

Les changements fonctionnels ont été évalués en examinant la composition biochimique urinaire standard (urée, créatinine, protéines totales, acide urique, ions de chlore, ions sodium, ions potassium, calcium), ainsi que les marqueurs protéiques spécifiques de l'insuffisance rénale et des lésions rénales (Figure 11). Ces biomarqueurs sont utilisés pour étudier de façon précoce les atteintes tubulaires (KIM-1 et clusterine), et les atteintes glomérulaires ou les altérations tubulaires engendrant un défaut de réabsorption (Cys-C et  $\beta$ 2-MG). L'OPN et NGAL sont également utilisés pour évaluer la néphrotoxicité, pour une atteinte du tubule proximal et pour une atteinte du tubule distal et proximal respectivement. En outre, l'expression des gènes d'enzymes associées aux cytochromes P450 et facteurs de transcription, régulant le métabolisme de la vitamine D (CYP27B1, CYP24A1, VDR, RXRa), du cholestérol (CYP27A1/LXRb, RXRa) et des xénobiotiques (CYP1A1, PXR, RXRa) dans les cellules rénales a aussi été mesurée. L'état fonctionnel des tissus a été évalué en examinant l'anatomopathologie par histologie colorimétrique (HES, hématoxylin-eosine-safran), le statut inflammatoire rénal par mesure génique et protéique de cytokines, le niveau d'apoptose dans le rein par expression génique (Bax, Bcl 2 et Caspase 3) et immunohistochimie (méthode TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) qui permet de révéler la fragmentation de l'ADN caractéristique des premières étapes de l'apoptose. Une analyse plus poussée des cellules prolifératives dans le rein serait nécessaire pour évaluer l'équilibre entre l'apoptose et la prolifération.

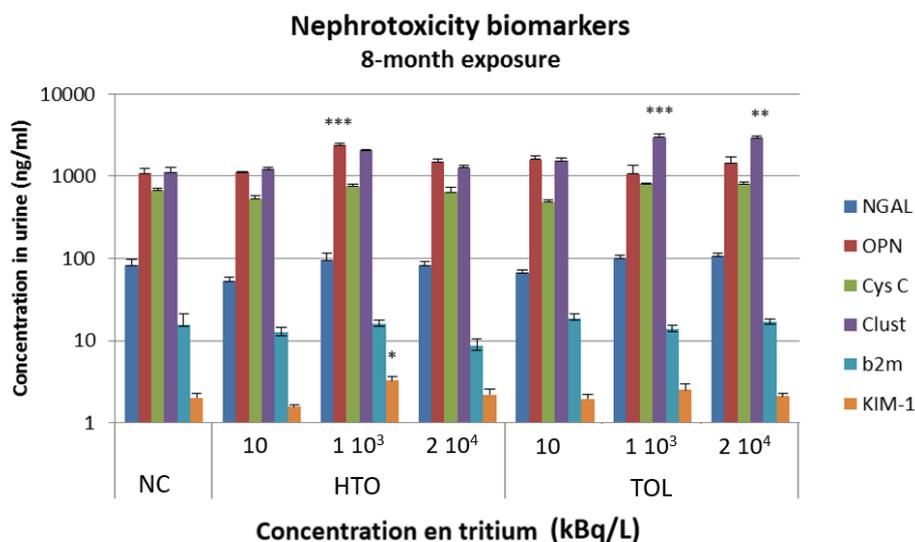


Figure 11 : Biomarqueurs de néphrotoxicité dans l'urine de souris exposées à l'HTO ou au TOL pendant 8 mois

NC : non contaminés. 1MBq=103 kBq. \*, \*\* et \*\*\* indiquent une différence statistiquement significative par rapport au contrôle à  $p < 0,01$  et  $0,001$  respectivement.

Le Tableau 5 synthétise les résultats observés au niveau du rein. Une légère réduction du poids des reins a été observée chez les souris traitées par le TOL à  $1 \cdot 10^3$  et  $2 \cdot 10^4$  kBq/L pendant un mois, mais aucun changement de poids des reins n'était observé après 8 mois d'exposition. Globalement, les résultats fonctionnels et métaboliques n'indiquent aucune altération après exposition d'un mois au tritium, à l'exception d'une perturbation de gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine D par le TOL à  $2 \cdot 10^4$  kBq/L. Des modifications plus importantes de marqueurs de néphrotoxicité ou d'inflammation ont été observées dans l'urine et les reins des souris traitées pendant 8 mois, avec une réponse globale plus élevée pour le TOL que pour l'HTO. Le dosage de cytokines inflammatoires dans les homogénats de reins confirme la modification de la balance pro-/ anti-inflammatoire pour les groupes contaminés au TOL par rapport aux groupes contaminés à l'HTO, par l'induction de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et RANTES) et d'une seule cytokine anti-inflammatoire (IL-10).

**Tableau 5 : Synthèse des effets cellulaires et tissulaires observés sur le rein (Guéguen et al, 2018)**

Paramètre étudié	1 mois d'exposition						8 mois d'exposition					
	HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)			HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)		
	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Macroscopique	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-
RedOx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
Inflammatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓
Fonction/métabolisme	-	-	-	-	-	↓	-	↓	-	-	↓	↓

Concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, correspondant respectivement à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40 µGy/h. Les changements ajustés sur l'âge par rapport au groupe contrôle sont indiqués comme suit : - pas de changement ; ↓ diminution du statut.

De même, l'état oxydatif ne serait pas modifié par une exposition d'un mois au TOL ou à l'HTO, alors qu'une exposition de 8 mois au TOL a entraîné la détérioration de l'expression d'enzymes antioxydantes dans le tissu rénal. Ceci s'est traduit par une multiplication par un facteur 40 à 100 des marqueurs d'inflammation dans les tissus des souris contaminées avec du TOL à 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L pendant 8 mois. Néanmoins, ces modifications moléculaires antioxydantes et inflammatoires n'ont pas entraîné d'augmentation observable de la mort cellulaire ou de modifications de la morphologie microscopique (histologie HES) des reins. Dans l'ensemble, le TOL a produit une détérioration sensiblement plus importante des paramètres rénaux et urinaires examinés que l'HTO, l'ampleur des modifications étant associée avec la durée de l'exposition et la concentration de tritium ingéré.

### 3.3.2.4 Foie

Le Tableau 6 synthétise les résultats observés au niveau du foie. Sur le plan macroscopique et microscopique (histologie HES), aucune modification n'a été constatée dans tous les groupes de traitement examinés. La morphologie et l'intégrité des tissus ont été étudiées par examen anatomopathologique (histologie) et mesure du marqueur moléculaire de toxicité hépatique HMGB1. Aucune altération n'a été constatée pour aucune des formes, concentrations ou durées d'exposition au tritium. L'absence d'effet du tritium sur les marqueurs fonctionnels hépatiques à un mois d'exposition a également été confirmée par la mesure de marqueurs moléculaires du stress oxydatif (HO-1, NQO1) et de l'inflammation (IL6, KRT8). Ce n'est que lorsque l'exposition a été prolongée à 8 mois que des changements de faible ampleur ont été observés sporadiquement (sans dépendance avec la dose) pour certains des marqueurs de statut RedOx et d'inflammation. Les marqueurs métaboliques (CYP27A1, LXRa, LXRb, CYP1A1, PXR, CYP2R, CYP24A1 et RXRa) n'ont été modifiés dans aucun des groupes.

**Tableau 6 : Synthèse des effets cellulaires et tissulaires observés sur le foie**

Paramètre étudié	1 mois d'exposition						8 mois d'exposition					
	HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)			HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)		
	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Macroscopique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RedOx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓
Inflammatoire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↓	↓
Fonction/métabolisme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, correspondant respectivement à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40 µGy/h. Les changements ajustés sur l'âge par rapport au groupe contrôle sont indiqués comme suit : - pas de changement ; ↓ diminution du statut.

### 3.3.2.5 Système hématologique

Les effets de l'ingestion de tritium sur le système hématologique et sur des facteurs de biochimie sanguine ont été examinés en dénombrant le nombre de cellules sanguines, les propriétés biochimiques et les niveaux plasmatiques de divers facteurs clés, tels que le fer, la ferritine, la transferrine et l'hepcidine.

Le Tableau 7 synthétise les résultats observés au niveau du système hématologique. Aucune altération de la numération des globules blancs et des plaquettes n'a été observée après 1 et 8 mois d'exposition dans tous les groupes de contamination Le TOL, mais pas le HTO, a induit une diminution faible mais statistiquement significative du nombre de globules rouges qui a été constatée après 1 mois d'exposition, ou quelle que soit la concentration de TOL. Ce déclin a été défini comme une anémie légère (diminution de 4 à 6 % du nombre de globules rouges). Cette altération a toutefois disparue après 8 mois d'exposition, ce qui suggère une adaptation à une ingestion prolongée de TOL. Les perturbations du nombre de globules rouges étaient accompagnées d'une baisse de l'hémoglobine et de l'hématocrite, indiquant un déclin fonctionnel chez les souris ingérant du TOL à 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L.

Pour déterminer si cet effet pouvait être dû à une altération de l'hématopoïèse, ou à la rétention des globules rouges dans la rate, les niveaux de 10 cytokines, d'ARNm de gènes et de marqueurs histologiques associés à la régulation de l'homéostasie des globules rouges et de leur fonction dans la moelle osseuse et la rate ont été mesurés. Les résultats suggèrent que la régulation des globules rouges dans la rate, mais pas l'hématopoïèse, est liée à une légère anémie. Le métabolisme du fer pourrait également être lié au développement de l'anémie. Par conséquent, le fer et les protéines associées à son métabolisme ont été mesurés dans le plasma sanguin, notamment la ferritine, la transferrine et la céruloplasmine. Il a été constaté une forte diminution de leurs niveaux d'expression génique chez les animaux exposés au TOL pendant 8 mois, ce qui suggère une altération du métabolisme du fer liée à la légère anémie en conséquence de l'exposition au TOL, mais pas à l'HTO (Tableau 7).

**Tableau 7 : Synthèse des effets cellulaires et tissulaires observés sur le système hématopoïétique (Bertho et al., 2019)**

Paramètre étudié	1 mois d'exposition						8 mois d'exposition					
	HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)			HTO (kBq/L)			TOL (kBq/L)		
	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>	10	1 10 <sup>3</sup>	2 10 <sup>4</sup>
Macroscopique (nombre de cellules) *	-	-	↓	↓	↓	↓	-	-	↓ <sup>#</sup>	-	-	↓ <sup>#</sup>
Fonction (fer plasmatique, ferritine, hémoglobine, etc.)	-	-	-	-	↓	-	-@	-@	-@	↓	↓	↓

Concentrations de 10, 1 10<sup>3</sup> et 2 10<sup>4</sup> kBq/L, correspondant respectivement à des débits de dose de l'ordre de 0,02 ; 2 et 40 µGy/h. Les changements ajustés sur l'âge par rapport au groupe contrôle sont indiqués comme suit : - pas de changement ; ↓ diminution du statut. \*, les changements n'ont été observés que dans le nombre de globules rouges, et non dans les autres types de globules sanguins ; #, des indications de légers changements macroscopiques ont été observées au niveau du volume corpusculaire des globules rouges ; @, des changements aléatoires ont été détectés dans un ou deux paramètres sur les nombreux mesurés, ce qui, globalement, n'a pas été qualifié de changement de fonction (voir (Bertho et al., 2019) pour plus de détails).

Comme la régulation du métabolisme du fer est un processus systémique complexe impliquant de multiples organes, tels que la rate, la moelle osseuse, les reins et l'intestin, divers tests ont été effectués dans ces tissus avec une motivation spécifique pour évaluer diverses hypothèses de mécanisme d'altération de la fonction des globules rouges (Bertho et al., 2019). Diverses modifications moléculaires, mais non histologiques, ont été détectées dans l'intestin, mais pas dans le foie, ce qui suggère qu'il existe un lien entre l'altération du métabolisme du fer dans l'intestin et une légère anémie détectée chez les souris exposées au TOL. L'augmentation du volume globulaire moyen pourrait donc représenter un mécanisme compensatoire. Il est possible que la non-observation de ces effets chez les animaux exposés au HTO soit due à des différences dans la distribution subcellulaire des événements d'ionisation dans les cellules épithéliales intestinales, malgré les niveaux globalement similaires d'activité du tritium dans l'ensemble des tissus.

### 3.3.2.6 Autres tissus

Aucun changement macroscopique n'a été observé dans la rate et l'intestin. De légères augmentations de l'expression des gènes apoptotiques, mais sans observation d'apoptose, ont été observées dans l'intestin après des expositions à l'HTO et au TOL. Les changements observés dans l'état RedOx de la rate indiquent une augmentation du potentiel antioxydant. Enfin, aucune des expositions pendant 1 et 8 mois n'a entraîné de perturbation de l'expression génétique des hormones stéroïdiennes mesurées dans les testicules ; toutefois, aucune mesure directe des niveaux d'hormones n'a été effectuée.

## 3.3.3 Résultats de radiotoxicologie environnementale sur les poissons

Des poissons tête-de-boule adultes ont été exposés à une gamme de concentrations de tritium (HTO et TOL) dans différents endroits du site de Chalk River (Gagnaire et al., 2017 ; Beaton et al., 2019) ainsi qu'en laboratoire (Gagnaire et al., 2020a ; Beaton et al., 2019) afin de s'affranchir des facteurs confondants du terrain (concentration maximale de 180 kBq/L en laboratoire, avec pour certaines concentrations un apport de TOL sous la forme de mélange de 3 acides aminés tritiés, lysine, leucine et arginine, apportés en parts égales à un niveau permettant de reproduire la contamination des proies dans le milieu naturel). Différents paramètres biologiques (réponse immunitaire, stress oxydant, neurotransmission) ont été analysés après 2 mois de contamination, puis après 2 mois de dépuración afin d'évaluer la persistance des réponses biologiques. Le protocole expérimental est détaillé en Annexe 2. Le Tableau 8 synthétise les résultats obtenus, en termes de corrélation avec le débit de dose.

Aucun des paramètres biologiques généraux (survie, croissance et indices somatiques des organes) étudiés en laboratoire ou sur le terrain n'a été affecté par l'exposition au tritium, indépendamment de la forme ou de la concentration utilisée. En lien avec l'absence d'effet sur la croissance, aucun effet n'a été observé sur les biomarqueurs liés au métabolisme (ratios ARN/ADN, protéines/ADN dans le rein et le foie).

Par contre, la fonction lysosomale et l'activité de phagocytose (mesurées dans la rate) montrent une réponse monotone positive avec l'augmentation des niveaux de débit de dose, indiquant une stimulation de la réponse immunitaire. L'indice de production des espèces réactives de l'oxygène (EROs) dans la rate est corrélé positivement au débit de dose en fin de phase de dépuración, mais cependant, aucune des enzymes de défense anti-oxydante mesurées dans le cerveau et le foie n'est modifiée, ce qui dénote de l'absence de stress oxydant notable lors de l'exposition au tritium. L'ACHé est une enzyme jouant un rôle essentiel dans la transmission du flux nerveux, dans le système nerveux central (mémoire et apprentissage), ainsi que dans le système nerveux périphérique. La mesure de son activité dans le cerveau montre qu'elle est corrélée positivement au débit de dose de tritium mais seulement en fin de phase de dépuración (Tableau 8).

De manière très intéressante, les résultats obtenus sont similaires pour plusieurs biomarqueurs immunitaires (phagocytose, production d'EROs, fonction lysosomale et dommages à l'ADN) qui ont été positivement corrélés au débit de dose interne en tritium, soit pour des expositions en laboratoire soit pour des expositions sur le terrain (Beaton et al., 2019 ; Gagnaire et al., 2017).

**Tableau 8 : Interactions entre les réponses biologiques et le débit de dose de tritium chez les poissons tête-de-boule exposés sur le terrain (Gagnaire et al., 2017) ou en laboratoire (Gagnaire et al., 2020a)**

Paramètre étudié	2 mois d'exposition		2 mois de dépuración	
	Terrain	Laboratoire	Terrain	Laboratoire
Effets macroscopiques	-	-	-	-
Dommages à l'ADN *	↑	↑	↓	↑
Production d'EROs, rate	-	-	-	↑
Réponse immunitaire, rate	↑	-	-	↑
Activité AChE	↓**	-	-	↑***

- : absence d'effet significatif ; ↑ : interaction positive ; ↓ : interaction négative (interactions mises en évidence par l'utilisation d'un modèle général linéaire, permettant d'expliquer l'évolution des réponses biologiques en fonction du débit de dose interne en tritium) ; \* les dommages à l'ADN sont présentés en section 3.2. Concentrations et débits de dose maximums testés : 23 kBq/L (débit de dose équivalent  $1,5 \cdot 10^{-1} \mu\text{Gy/h}$ ) sur le terrain et 180 kBq/L (débit de dose équivalent  $6,5 \cdot 10^{-1} \mu\text{Gy/h}$ ) en laboratoire (voir Annexe 2), \*\* : effet significatif dans le muscle des femelles seulement ; \*\*\* : effet significatif dans le cerveau, mâles et femelles

### 3.3.4 Discussion

On dispose de peu de données sur l'impact du tritium sur les marqueurs de toxicité tissulaire qui ne sont pas directement associés à la génotoxicité et au cancer. Bien que le cancer ait longtemps été considéré comme le risque sanitaire prédominant associé à l'exposition aux rayonnements ionisants, des études récentes ont révélé un risque accru de pathologies non cancéreuses chez les populations exposées à des doses professionnelles et environnementales (Little, 2013). Ces pathologies sont principalement liées au système cardiovasculaire, au cerveau et aux yeux (Little, 2013 ; Picano et al., 2012). Cependant, si ces associations ont été observées pour des expositions aux rayonnements ionisants non liés au tritium l'augmentation de la mortalité non cancéreuse n'a pas été observée dans les

cohortes humaines ayant été exposées au tritium (UNSCEAR, 2017). Dans ce contexte, le programme de recherche IRSN/CNL fournit de nouvelles informations qui peuvent aider à comprendre les effets du tritium sur le risque de pathologies non cancéreuses. La sélection exceptionnellement large de tissus et d'organes qui ont été considérés dans ce programme permet de constater que les tissus diffèrent dans leur réactivité au tritium ingéré.

Chez les souris, les changements globaux observés dans le foie, la rate et l'intestin étaient les plus faibles, tandis que le cerveau, le système vasculaire et les reins présentaient des réponses tissulaires plus fortes. Il convient de souligner que si la plupart des tissus ont été étudiés de manière très détaillée à l'aide de divers tests, par exemple sur le système vasculaire et les reins, seuls des tests limités ont été effectués sur le cerveau. L'étendue des divers marqueurs et tests utilisés permet de comprendre plus en détail la nature biologique des changements. Par exemple, les changements de niveaux d'expressions géniques associés à certains métabolismes majeurs (cholestérol et vitamine D) pourraient être des acteurs de la réponse biologique dans le cerveau, alors que le statut RedOx n'a été affecté que dans une bien moindre mesure. C'est également le cas pour le modèle poisson, chez qui un stress oxydant très modéré a été observé. Dans l'endothélium aortique, les changements étaient substantiels ; bien que globalement les changements puissent être caractérisés comme pro-inflammatoires, certains d'entre eux peuvent être interprétés comme une amélioration, par exemple l'induction de molécules anti-inflammatoires. Il est intéressant de noter qu'une stimulation anti-inflammatoire similaire a été observée pour le modèle poisson, où diverses autres réponses stimulantes ont été notées. Ces modifications ont été observées chez les poissons en laboratoire et sur le terrain, pour des concentrations environnementales correspondant au niveau de la station la plus contaminée du site de Chalk River et à un niveau de débit de dose de 0,65 µGy/h jusqu'à une dose totale de ~1 mGy, soulignant la sensibilité de ces biomarqueurs immunologiques lors d'une exposition au tritium. Les réponses moléculaires et biochimiques chez les poissons, y compris l'AChE, étaient plus prononcées après 2 mois de dépuraction qu'immédiatement après une exposition au tritium. Cela indique des mécanismes complexes non complètement élucidés et milite pour des expérimentations menées sur du long terme. Il convient de noter que les réponses moléculaires et biochimiques décrites ne se sont pas transformées en anomalies anatomiques des tissus ou des organismes dans les modèles de souris et de poissons.

Enfin, l'examen de divers paramètres dans le sang, la rate et l'intestin chez la souris a permis de révéler des changements dans le métabolisme du fer déclenchés par l'ingestion de TOL (Bertho et al., 2019).

Globalement sur l'ensemble des résultats ci-dessus, on peut noter que, à dose équivalente, le nombre de changements observés dans les divers tissus et organes étudiés est plus élevé avec le TOL qu'avec l'HTO. Par ailleurs, il est important de noter qu'à la plus faible concentration de tritium considérée dans cette étude chez la souris (10 kBq/L), seules quelques modifications de faible ampleur ont été observées pour certains paramètres dans le cerveau et le sang, alors que les autres tissus n'ont pas montré de réponse (Guéguen et al, 2018).

### 3.3.5 Conclusions

Le programme de recherche décrit dans cette section fournit une large couverture des tissus et des paramètres biologiques pour examiner les effets du HTO et du TOL au sein des mêmes expérimentations sur des souris. Un plan expérimental d'une telle ampleur sur les effets tissulaires du tritium n'avait jamais été mis en place auparavant.

Les résultats montrent que les réponses varient selon le type de tissu. Cela peut être dû à la nature chronique de l'exposition qui peut laisser s'exprimer des réponses différentes au cours du temps en fonction des spécificités tissulaires (métabolisme, taux de prolifération cellulaire, etc.).

En ce qui concerne les mécanismes de réponse à une exposition au tritium, ceux mis en évidence comprennent l'interaction entre les processus moléculaires RedOx et les changements inflammatoires, qui peuvent ensuite se transformer en changements fonctionnels tissulaires. Il est important de noter que, chez la souris, ces changements sont presque exclusivement observés à partir de la deuxième dose la plus élevée, soit  $1 \cdot 10^3$  kBq/L et au-delà. Ces changements sont également plus fréquemment observés pour le TOL que pour l'HTO. À la plus faible concentration d'HTO utilisée (10 kBq/L), seuls quelques marqueurs moléculaires ont été significativement modifiés. En outre, aucune anomalie macroscopique ou microscopique n'a été observée, même à la plus forte concentration de tritium.

## 3.4 EFFETS DU TRITIUM SUR L'EMBRYON ET LE FŒTUS

### 3.4.1 Contexte

Il est largement reconnu qu'une exposition prénatale aux rayonnements ionisants peut interférer avec le développement embryonnaire et fœtal, selon la dose et l'âge gestationnel auxquels l'exposition a lieu. Sur la base de nombreuses études, menées principalement sur des modèles animaux, il est possible de distinguer différents effets tératogènes selon les stades de développement. La CIPR a défini la sensibilité de ces stades de développement en fonction de seuils caractéristiques d'effets, tel que résumé dans le paragraphe ci-après (De Santis et al., 2007; ICRP, 2007).

Une irradiation pendant la période de pré-implantation peut mener à des effets létaux sur l'embryon, qui seraient toutefois très peu fréquents en dessous de 0,1 Gy. L'organogénèse constitue également une période très sensible. En effet, sur la base des études menées sur des animaux, il est considéré qu'il y a une augmentation de l'induction de malformations à partir d'un seuil de 0,1 Gy. Chez l'homme, la revue des données sur les survivants des bombardements atomiques de Hiroshima et Nagasaki indique l'induction de retards mentaux après irradiation dans la période de 8 à 15 semaines post-conception, avec un seuil de 0,3 Gy.

Les effets sur le développement de l'homme ou du rongeur d'expositions in utero par le tritium ont fait l'objet de revues (Straume & Carsten, 1993; UNSCEAR, 2017). Pour les rongeurs, les principaux effets induits chez l'embryon et le fœtus lors d'expositions chroniques multigénérationnelles impliquent une diminution du poids du cerveau, que ce soit chez les individus exposés ou chez leur descendance (jusqu'à 5 générations de rats ont été exposées). Ces effets commencent à apparaître à partir d'une ingestion chronique d'HTO à des débits de dose allant de 0,1 à 0,3 mGy/h (soit de  $\sim 3 \cdot 10^4$  à  $1 \cdot 10^5$  kBq/L).

Par ailleurs, les effets du tritium ont également fait l'objet de revues, en particulier chez quelques espèces aquatiques (Adam-Guillermin et al., 2012; ICRP, 2008). Des effets développementaux (malformations, mortalité larvaire) ont été observés chez des invertébrés à partir de quelques dizaines de  $\mu\text{Gy/h}$  ( $\sim 3 \cdot 10^3$  kBq/L) et chez les vertébrés aquatiques, à partir de dizaines ou centaines de mGy/h (soit de  $\sim 10^7$  à  $10^8$  kBq/L).

Au bilan, les études existantes quant aux effets du tritium sur le développement sont relativement anciennes et ont souvent été réalisées à des concentrations de tritium très élevées. De surcroît, les études ont été réalisées à l'échelle macroscopique, sans aborder l'analyse des mécanismes sous-tendant ces effets.

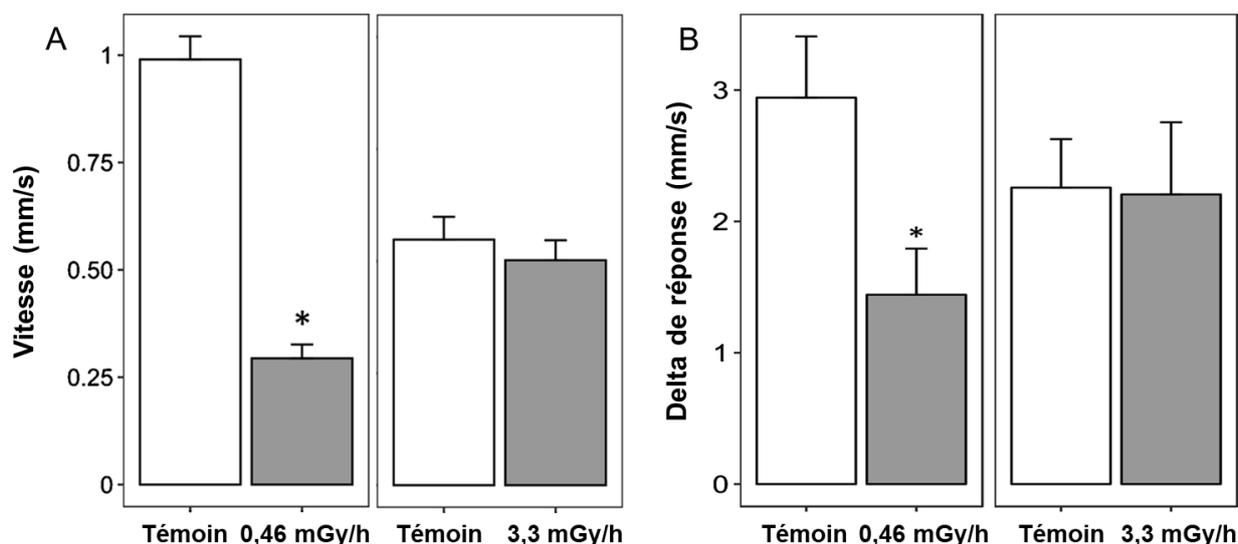
### 3.4.2 Résultats de radiotoxicologie environnementale sur les poissons

Des études ont été lancées à l'IRSN pour mieux appréhender les mécanismes d'action toxique du tritium et ainsi, identifier des biomarqueurs potentiels du tritium sur les stades embryon-larvaires du poisson zèbre (*Danio rerio*). Les études ont été réalisées depuis

une échelle moléculaire jusqu'à une échelle fonctionnelle (étude du développement et du comportement), chez des œufs exposés jusqu'à 10 jours post fécondation, à des concentrations d'HTO de  $1,22 \cdot 10^4$ ,  $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L (les débits de dose équivalents moyens sur 10 jours sont de 110, 410 et 3800  $\mu\text{Gy/h}$  mais ces débits de dose peuvent varier en fonction de la morphologie du stade de développement, donc du temps d'exposition –voir les calculs en Annexe 2 -).

L'exposition des larves de poisson zèbre à de l'HTO n'a induit aucune mortalité, malformation, ou modification de l'activité cardiaque, des mouvements spontanés de la queue de l'embryon à l'intérieur de l'œuf ou de l'âge moyen d'éclosion, quel que soit le débit de dose testé (Arcanjo et al., 2020; Gagnaire et al., 2020b).

Cependant, des modifications de paramètres du développement ont été observées, comme une diminution transitoire de la longueur des larves ou une taille accrue de la réserve vitelline, ces différences disparaissant pour le débit de dose le plus faible après 7 jours d'exposition. Par ailleurs, le comportement de nage a été analysé après 4 jours d'exposition, montrant une baisse de la vitesse de nage pour une exposition à 460  $\mu\text{Gy/h}$ , en conditions basales (*i.e.* de nage spontanée) et suite à un stimulus tactile (tape sur le côté de l'aquarium) (Figure 12) (Arcanjo et al., 2020).

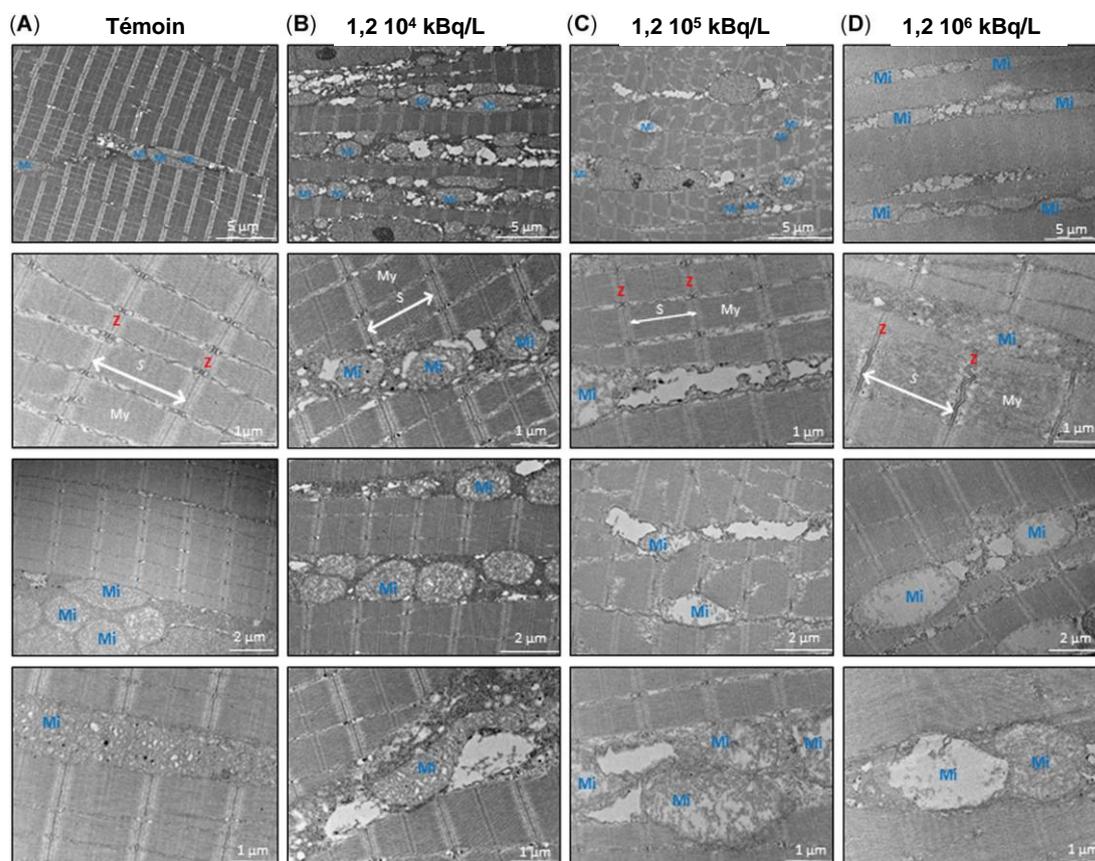


**Figure 12 : Vitesse de nage chez les larves de poisson zèbre exposées à 0,46 et 3,3 mGy/h ( $1,22 \cdot 10^5$  et  $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L) d'HTO pendant 4 jpf. A l'état basal (A) et après un stimulus tactile (B) (d'après Arcanjo et al., 2020)**

*Le delta de réponse représente la différence de vitesse de nage avant et après un stimulus tactile*

Afin de comprendre et d'identifier les mécanismes sous-tendant ces effets macroscopiques, plusieurs analyses complémentaires ont été entreprises. Des atteintes histologiques du muscle et des yeux, susceptibles d'altérer le comportement de nage, ont été recherchées par microscopie électronique à transmission (MET). Les analyses montrent que l'exposition à l'HTO induit une dégradation des myofibrilles, constituant des fibres musculaires, avec une altération des structures de base (sarcomères, bandes Z), dès le premier niveau d'exposition (Gagnaire et al., 2020b). Une augmentation du nombre de mitochondries avec le débit de dose est aussi observée pour les temps d'exposition précoces, tandis qu'à partir de 7 jpf, une dégradation importante de ces dernières est observée (désorganisation ou disparition des crêtes mitochondriales) (Figure 13).

Par ailleurs, l'analyse des yeux par MET ne fait apparaître aucune altération, que ce soit en termes de transparence de la lentille ou de développement de la rétine (Arcanjo et al., 2020).



**Figure 13 : Tissu musculaire de larves de 7 jpf observé en microscopie électronique à transmission dans le groupe témoin (A) et les groupes contaminés à  $1,22 \cdot 10^4$  (B),  $1,22 \cdot 10^5$  (C) et  $1,22 \cdot 10^6$  (D) kBq/L d'HTO, soit 95 (B), 280 (C) et 4700 (D)  $\mu\text{Gy/h}$  (Gagnaire et al., 2020b)**

*Mi = mitochondrie ; My = myofibrille ; S = sarcomère ; Z = bande Z*

Le séquençage de l'ARN par RNAseq permet d'identifier et de quantifier l'expression des gènes. L'analyse des réponses transcriptomiques a été réalisée chez les larves à 1 jpf et 4 jpf afin d'approfondir les connaissances des voies de toxicité de l'HTO (Arcanjo et al., 2018). L'ensemble des résultats met en évidence des modifications d'expression des gènes impliqués dans les processus de contraction du muscle squelettique et cardiaque, d'assemblage des sarcomères et myofibrilles, de l'apprentissage visuel, du transport de neurotransmetteurs et d'ions, de la réponse au stress oxydant, du développement embryonnaire et du système nerveux périphérique, de la différenciation cellulaire, du rythme circadien, de l'assemblage du nucléosome<sup>11</sup> et de la méthylation de l'ADN. Les gènes dérégulés dans toutes les conditions (*i.e.* pour tous les groupes exposés et tous les stades de développement), sont relatifs à la contraction musculaire, l'assemblage des myofibrilles, le transport ionique, la réponse à  $\text{H}_2\text{O}_2$  (une des espèces réactives de l'oxygène (EROs)) et l'entraînement du cycle circadien. Un nombre important de gènes liés au développement de l'œil, en particulier des gènes codant pour des protéines du cristallin et de la lentille, est également dérégulé de façon commune entre les différents groupes exposés à l'HTO. Des analyses biochimiques et d'expression de gènes plus ciblées mettent également en évidence un stress oxydant (production d'EROs), et la perturbation de gènes impliqués dans la détoxification et la neurotransmission (AChE) (Gagnaire et al., 2020b).

<sup>11</sup> Unité de base de l'organisation de la chromatine, qui est la structure au sein de laquelle l'ADN est compacté

### 3.4.3 Discussion

Au bilan, aucune malformation ou mortalité embryonnaire n'a été observée chez les embryons exposés jusqu'à 4700  $\mu\text{Gy/h}$  d'HTO, seule une augmentation globale de la taille de la vésicule vitelline et une baisse transitoire de la longueur des larves étant notées. Ces résultats sont cohérents avec les données obtenues après irradiation gamma de stades embryo-larvaires du poisson zèbre, ne montrant aucune altération à l'échelle macroscopique lors d'une irradiation gamma jusqu'à 50 000  $\mu\text{Gy/h}$  (Murat el Houdigui et al., 2019). Cette absence de malformation suite à une exposition avec de l'HTO à un débit de dose maximal de 4700  $\mu\text{Gy/h}$  est cohérente avec les résultats de la littérature ne montrant une augmentation des malformations chez les poissons qu'à partir de quelques dizaines voire centaines de  $\text{mGy/h}$ . En revanche, un nombre important d'anomalies du développement embryonnaire et un retard d'éclosion significatif ont été observés à 4jpf chez des larves exposées à de la thymidine tritiée aux débits de doses de 1300 et 7200  $\mu\text{Gy/h}$  (Gagnaire et al., 2021), indiquant comme attendu une toxicité plus importante de la thymidine tritiée que de l'HTO. Ces résultats obtenus avec la thymidine tritiée soulignent l'importance de la forme chimique, cette dernière conduisant à un dépôt de dose élevé sur l'ADN. Ils montrent que des calculs de microdosimétrie sont nécessaires pour comprendre les effets induits par les différentes formes de tritium ; par ailleurs, ils confirment qu'un dépôt de dose élevé à l'ADN peut conduire à des malformations embryo-larvaires.

Le comportement de nage est affecté à 460  $\mu\text{Gy/h}$  chez les larves de 4 jours exposées à l'HTO, que ce soit à l'état basal ou suite à un stimulus tactile, mais de façon surprenante, il n'est pas modifié à 3300  $\mu\text{Gy/h}$ . Il est probable que des mécanismes compensatoires se soient mis en place au débit de dose le plus élevé. Une altération du comportement a déjà été observée chez des larves de poisson zèbre irradiées avec un rayonnement gamma, un test visuo-moteur ayant montré une baisse de la motilité à partir d'un débit de dose de 500  $\mu\text{Gy/h}$ , accompagnée d'une altération de l'ultrastructure musculaire et des jonctions neuro-musculaires (Murat El Houdigui et al., 2019).

La désorganisation du tissu musculaire a été observée pour tous les débits de dose testés, et est confirmée par les réponses transcriptomiques qui mettent en évidence la dérégulation de nombreux gènes liés à la contraction musculaire et à l'assemblage des myofibrilles. En particulier, une altération importante du tissu musculaire est observée à 4700  $\mu\text{Gy/h}$ , parallèlement à la répression de gènes jouant un rôle essentiel dans l'organisation du muscle ; aux débits de dose plus faibles, ces gènes sont sur-exprimés, indiquant la compensation en partie de l'atteinte histologique. Nos résultats sur la structure du muscle sont en accord avec les observations antérieures d'altération des myofibrilles et des jonctions neuromusculaires observées chez des larves de poissons zèbre exposées à 5000 et 50 000  $\mu\text{Gy/h}$  de rayonnement gamma (Murat El Houdigui et al., 2019). De telles altérations musculaires induites par une exposition au tritium n'avaient à notre connaissance jamais été montrées auparavant, mais elles pourraient éventuellement expliquer les malformations vertébrales observées chez le poisson medaka exposé à l'HTO (Hyodo-Taguchi & Etoh, 1993).

Les mouvements spontanés de la queue de l'embryon ont été analysés à 1 jpf. Ces mouvements spontanés proviennent de la moelle épinière et sont dépendants de l'innervation des motoneurons fonctionnels (Brustein et al., 2003) et des contractions musculaires. Bien que les tests réalisés ne mettent pas en évidence de modification de ces mouvements spontanés, l'expression des gènes codant pour des protéines de transport du  $\text{Ca}^{2+}$  et des neurotransmetteurs est modifiée après l'exposition à 520 et 3800  $\mu\text{Gy/h}$  (Arcanjo et al., 2018). Chez les embryons de 1 jpf exposés à 3800  $\mu\text{Gy/h}$ , une sur-expression est observée pour le gène codant pour l'ACHE (Gagnaire et al., 2020b), qui joue un rôle dans la relaxation musculaire, et le développement musculaire et neuronal (Behra et al., 2002).

Aucun effet notable n'a été observé sur l'ultrastructure de l'œil (transparence de la lentille et développement de la rétine) chez des larves de 2, 3 et 4 jpf exposées à l'HTO, ne permettant donc pas de conclure à un impact du tritium sur le développement de l'œil et l'induction de la cataracte aux stades précoces, ce qui est cohérent avec les données de la littérature montrant un seuil d'effet sur l'œil autour de

quelques centaines de mGy/h. Toutefois, l'expression d'un nombre très important de gènes impliqués dans le fonctionnement des yeux a été modifiée lors de l'exposition à l'HTO, et notamment ceux liés à la transparence de l'œil pour les débits de dose de 520 et 3800  $\mu\text{Gy/h}$ .

Les analyses transcriptomiques montrent que la réponse au stress oxydant est fortement impactée par le tritium, ce qui n'est pas le cas chez les poissons adultes (cf. section 3.3.3). Ceci pourrait indiquer une sensibilité plus importante des stades précoces au stress oxydant. Ainsi certains gènes liés au stress oxydant (*gpx*, *sod2*, *mpx*, gènes impliqués dans la réponse à  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et aux réparations des dommages à l'ADN ainsi qu'à la compaction de la chromatine (*h2afx* et *ddb2*), ont été surexprimés chez les organismes exposés par rapport aux témoins (Arcanjo et al., 2018). Par ailleurs, des gènes liés à l'entraînement du cycle circadien ont également été affectés (*cry&aa*, *cry5*, *per2* et *per1a*), ce qui pourrait être en lien avec la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hirayama et al., 2007).

### 3.4.4 Conclusions

Les travaux réalisés ont montré que l'exposition à des concentrations croissantes de HTO n'engendre pas d'augmentation de la mortalité ou de malformations chez les stades embryo-larvaires des poissons jusqu'à une concentration de  $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L, soit un débit de dose maximal de 4700  $\mu\text{Gy/h}$  et une dose cumulée à la fin de l'organogénèse (2 jpf) de 180 mGy. Cette concentration est bien supérieure aux concentrations observées dans l'environnement, ce qui suggère que le tritium à des concentrations environnementales, n'affecte pas la survie embryonnaire et n'induit pas de malformations chez les poissons. Ceci est cohérent avec le seuil reporté dans la littérature pour les effets tératogènes lors d'expositions à court terme des stades embryonnaires de vertébrés au tritium (de l'ordre de la dizaine de mGy/h) (Straume & Carsten, 1993). Les données obtenues confirment également les gammes de débit de dose de référence de la CIPR (DCRL allant de 42 à 420  $\mu\text{Gy/h}$  pour les poissons, ICRP, 2008) ou la valeur benchmark de 10  $\mu\text{Gy/h}$  (Garnier-Laplace et al., 2010), recommandées pour la radioprotection des écosystèmes.

Une perturbation du développement des larves de 7 jpf (altération du tissu musculaire et modifications métaboliques) est toutefois observée à partir de  $1,22 \cdot 10^4$  kBq/L (soit 170  $\mu\text{Gy/h}$  et 16 mGy de dose totale). Il est à souligner que de telles modifications du tissu musculaire n'avaient jamais été observées dans le cas d'une exposition au tritium. Le comportement de nage est également affecté à la concentration de  $1,22 \cdot 10^5$  kBq/L (soit 460  $\mu\text{Gy/h}$  et 44 mGy de dose totale), l'analyse génétique pointant vers des mécanismes liés aux fonctions neuro-musculaires et à la vision. Cette altération comportementale n'est néanmoins pas observée à la dose la plus élevée.

## 3.5 EFFICACITE BIOLOGIQUE RELATIVE DU TRITIUM

### 3.5.1 Contexte

Les effets comparés des différents rayonnements sur les organismes s'expriment par le biais de données sur leur efficacité biologique relative (EBR). L'EBR est une valeur expérimentale établie, soit à partir de données épidémiologiques, soit à partir d'expériences *in vivo* sur l'animal ou *in vitro* sur des tissus et des cellules, en comparant la dose qu'il faut délivrer avec un rayonnement donné (électron, particule, proton, neutron, muon...) pour obtenir un effet biologique ou sanitaire, avec celle nécessaire pour obtenir le même effet avec des photons (rayons X ou gamma de référence. Il n'existe pas une seule valeur d'EBR par type de rayonnement, mais un ensemble d'EBR dépendant chacune des effets biologiques ou sanitaires étudiés, des modèles animaux, des tissus ou cellules étudiés, des doses et débits de doses utilisés et, de façon générale, de l'ensemble des conditions expérimentales déployées dans les études. Afin d'intégrer ces données diverses dans un système simple de gestion, la CIPR a souhaité ne retenir qu'une valeur par type de rayonnement, le facteur de pondération des rayonnements ( $w_R$ ), représentant l'efficacité biologique « probable » de chaque type de rayonnement, dans le cas de

l'induction de cancers ou d'effets héréditaires. Ce faisant, la CIPR rappelle que ces facteurs de pondération ne doivent être utilisés que pour le calcul de la dose efficace, elle-même conçue à des fins de gestion des expositions (optimisation et limitation) et non pas à des fins d'évaluation individuelle de risque.

Le facteur de pondération du rayonnement beta retenu par la CIPR pour l'homme est de 1, indiquant donc que les électrons auraient la même efficacité biologique que les photons. Toutefois, certaines expériences de laboratoire menées durant les années 1990, principalement avec de la thymidine tritiée, ont conclu que les EBR des électrons du tritium étaient largement supérieures à cette valeur unitaire, et donc que le facteur de pondération du tritium était sous-estimé. Dans son rapport de 2016, l'UNSCEAR conclut que sur l'ensemble des études référencées et rapportant des expositions prolongées, l'EBR moyenne du tritium est plutôt comprise entre 1 et 5 (et centrée autour de 2-2,5) pour une référence aux rayons gamma et entre 0,4 et 2,3 (centrée sur 1,2) pour une référence aux rayons X (UNSCEAR, 2017).

Pour les organismes non-humains représentatifs de l'environnement, la CIPR a récemment passé en revue les études d'EBR s'y rapportant (ICRP, 2020). Ce travail montre que les valeurs d'EBR obtenues sont centrées autour de 1,5 à 2 par rapport au rayonnement X et autour de 2 à 2,5 par rapport au rayonnement gamma. A des fins de radioprotection de l'environnement, la CIPR propose de pondérer les doses absorbées résultant de l'exposition du biota aux rayonnements à faible transfert linéique d'énergie (dont le rayonnement beta du tritium), par une EBR égale à 1. Cette proposition est cohérente avec l'approche retenue pour l'homme. Néanmoins, lorsque le niveau d'exposition au tritium est proche des DCRL, l'utilisation d'une EBR plus élevée peut être envisagée (ICRP, 2020).

L'ASN, dans son livre blanc, recommandait « d'utiliser un facteur de pondération pour les rayonnements ( $w_R$ ) de 2 (au lieu de 1) dans les situations d'évaluation de risque individuel » (ASN, 2010). Les études présentées ci-après se sont donc focalisées sur les EBR du tritium établis dans plusieurs conditions expérimentales, aussi bien pour la protection de l'homme que celle de l'environnement.

### 3.5.2 Etudes expérimentales menées sur les rongeurs

Lors des expositions réalisées dans le cadre de la collaboration IRSN/CNL, les différentes concentrations de tritium mises en œuvre (10, 1  $10^3$  et 2  $10^4$  kBq/L) correspondent à trois débits de dose différents d'irradiation beta (0,016, 1,66 et 33,7  $\mu$ Gy/h, respectivement). En raison de l'absence d'effets détectables après une irradiation  $\gamma$  chronique, aucune courbe dose-réponse, pour les dommages chromosomiques n'a pu être générée dans cette étude. Le calcul de l'EBR en utilisant comme référence une irradiation gamma chronique *in vivo* n'a donc pas pu être réalisé. A défaut, une courbe dose-réponse générée précédemment lors de l'irradiation gamma aiguë *ex vivo* de lymphocytes périphériques sanguins a été utilisée comme référence dans le calcul de l'EBR (Roch-Lefèvre et al., 2016).

Parmi les analyses de l'effet du tritium sur les cellules, seuls les dommages chromosomiques présentant pour certaines doses et certains points de mesure des résultats significatifs permettent de comparer deux rayonnements et d'évaluer un EBR. De ce fait, il n'a pas été possible d'évaluer l'EBR de l'HTO dans la mesure où il n'y a pas de claire augmentation de la fréquence des dommages chromosomiques avec la dose.

La Figure 14 montre la courbe dose-réponse pour la dose totale accumulée au cours d'une exposition au TOL de 1 ou 8 mois et pour une irradiation gamma aiguë. Ces deux courbes ont été utilisées pour estimer les plages de valeurs d'EBR pour le TOL. La plage d'estimation possible de l'EBR débute dans la zone où l'augmentation des dommages chromosomiques est significativement plus élevée que dans les souris non exposées (Figure 14, zone bleue). Cependant, à mesure que la dose augmente, l'EBR diminue pour devenir non significativement supérieure à 1 pour un taux d'aberrations chromosomiques de 0,033 correspondant à des doses cumulées de TOL supérieures à 5 mGy. Les valeurs de l'EBR pour les très faibles doses de TOL produites dans cette étude peuvent sembler inhabituellement

élevées. Cette augmentation d'EBR à mesure que la dose diminue est un phénomène cohérent avec ce qui a déjà été observé (Snigireva et al., 2010 ; IAEA, 2008).

Toutefois ces résultats sont à interpréter avec précaution :

- La courbe obtenue pour le TOL présente une augmentation des dommages chromosomiques qui reste faible en comparaison du contrôle. Par ailleurs, elle est constituée d'un mélange de données générées après des durées d'expositions très différentes (1 mois et 8 mois), même si le débit de dose est constant pour tous les points de mesure ;
- La courbe obtenue pour les rayonnements gamma, comme indiqué précédemment n'a pas été réalisée avec les mêmes débits de dose que pour le TOL, ce qui n'est pas recommandé pour calculer une EBR. En outre, dans la gamme de dose étudiée, le nombre de dommages chromosomiques n'a été évalué que pour la dose de 100 mGy et 200 mGy. Il n'y a pas de mesures réalisées pour des doses inférieures à 100 mGy, ce qui rend incertaine l'interprétation d'une EBR dans cette gamme de dose.

Contrairement à l'HTO, le TOL est probablement distribué de manière hétérogène dans les cellules et les tissus (CNSC, 2011, AGIR, 2007), suite à son incorporation dans des molécules organiques (acides aminés, sucres, protéines, etc.) dont le taux de renouvellement est plus lent. De plus, le tritium sous forme de TOL peut être incorporé dans l'ADN génomique, causant des dommages hautement localisés au matériel génétique (CNSC, 2011 ; AGIR, 2007 ; Chao et al., 2012). De telles différences dans les caractéristiques biochimiques du HTO et du TOL, ainsi que l'incapacité de suivre facilement ces deux formes de tritium et de déterminer leur distribution cellulaire et subcellulaire, contribuent grandement aux incertitudes liées à l'efficacité biologique de l'irradiation des particules beta du tritium.

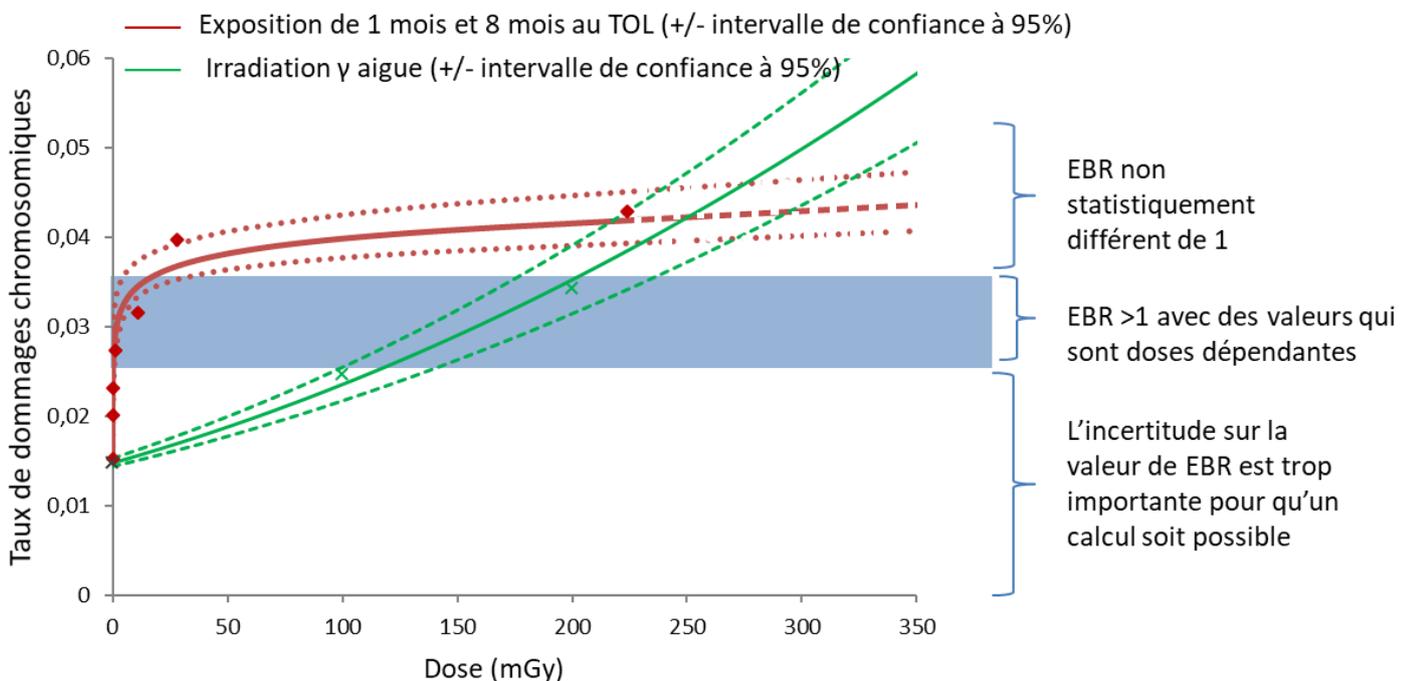


Figure 14 : Variations des taux d'aberrations chromosomiques induites dans les lymphocytes de souris en fonction de la dose (adapté de Roch-Lefèvre et al., 2018)

### 3.5.3 Etudes menées sur l'environnement

Les EBR relatives aux effets des rayonnements sur l'environnement sont en général déterminées pour des effets cellulaires ou tissulaires influant la survie, la croissance ou la reproduction de plantes et d'animaux de diverses espèces. De nombreuses études ont été publiées dans le passé et ont fait l'objet de revues discutées dans le paragraphe suivant.

Des expérimentations menées à l'IRSN sur des poissons exposés à des rayonnements gamma ou à de l'eau tritiée ont tenté de définir des EBR pour divers effets moléculaires (Gagnaire et al., 2020b). Ces expériences ne sont pas concluantes à ce stade des recherches, car fondées seulement sur deux doses de tritium, difficilement comparables avec des données d'irradiation par des photons.

### 3.5.4 Discussion

Les études menées sur les EBR du tritium ont eu pour objectif de déterminer si le facteur de pondération de 1 utilisé dans le calcul de la dose efficace rend compte de la toxicité de cet élément. La difficulté pour répondre à cette question est liée au fait que les EBR obtenues dans le cadre de travaux de recherche sont des valeurs expérimentales et ne sont représentatives que d'une situation particulière d'exposition. Plusieurs éléments rappelés ci-après doivent être pris en considération avant de conclure sur la valeur du facteur de pondération qui pourrait être recommandée.

- Les EBR sont déterminées par rapport à des rayonnements de référence, qui ne sont pour autant pas définis de manière univoque. Dans la publication 60 de la CIPR (ICRP, 1990), les rayonnements de référence répertoriés sont soit des rayons gamma générés par le césium-137 ou le cobalt-60, soit des rayons X émis avec une différence de potentiel de 200 kV (ICRP, 1991). Ce point influe fortement sur la valeur de l'EBR déterminée expérimentalement car les résultats des études expérimentales suggèrent que les rayons X à 250 kV sont plus efficaces, par dose unitaire, pour produire des effets biologiques que les rayons gamma du cobalt 60 (Straume, 1995), bien qu'il n'y ait pas de consensus sur l'ampleur de cette différence. Avant même d'aborder le sujet de l'EBR du tritium, une distinction doit donc être établie entre les effets obtenus en référence aux rayons X et ceux obtenus en référence aux rayons gamma du cobalt ou du césium.
- L'EBR des radionucléides varie en fonction de la dose, du débit de dose utilisé et du temps d'exposition (Rossi et Zaider, 1990 ; Ujeno, 1983 ; Edwards, 1999). Les valeurs d'EBR croissent en général lorsque la dose décroît. Par ailleurs, dans de nombreuses études expérimentales, les EBR du tritium incorporé dans les organismes vivants et donc produisant des doses chroniques, ont été calculées par comparaison avec des rayons X ou des rayons gamma administrés de manière aiguë. Ces données doivent donc être utilisées avec beaucoup de précaution.
- Les EBR dépendent des systèmes biologiques étudiés, des conditions d'expérimentation et surtout des effets envisagés. Il n'est donc pas possible de combiner tous les EBR déterminés pour le tritium. A des fins spécifiques de radioprotection et de détermination des facteurs de pondération des rayonnements, il convient de se limiter aux EBR obtenus pour l'apparition de cancers ou, à défaut, à ceux déterminés pour la survenue de phénomènes initiaux pouvant entraîner l'apparition d'effets stochastiques, dont certaines mutations cellulaires et aberrations chromosomiques. Ces données doivent cependant être utilisées avec une extrême prudence, car ces effets ne constituent qu'une des étapes pouvant conduire au développement d'un cancer et ne tiennent pas compte de tous les phénomènes intermédiaires, tels que la régulation cellulaire et l'homéostasie (Barcellos-Hoff et Brooks, 2001).

- Enfin, l'EBR du tritium dépend de sa forme chimique, qui va conditionner sa distribution dans les tissus et dans les cellules. Il est admis que le tritium qui est fixé à des précurseurs d'ADN (par exemple la thymidine, la désoxycytidine, etc.) au moment de la contamination peut délivrer des doses beaucoup plus élevées à l'ADN que lorsque le tritium est incorporé sous forme d'eau tritiée (Streffer et al., 1978). Il serait donc logique de définir des EBR pour chacune de ces différentes formes physico-chimiques.

Les travaux rapportés dans ce document se sont focalisés sur le cas du TOL, dont certaines formes présentent de fortes affinités pour le matériel génétique et sont donc suspectées de causer des dommages significatifs aux cellules et aux tissus. Les EBR mesurées dans les expérimentations décroissent lorsque la dose augmente, conformément à ce qui est observé dans la littérature. Ces études, comme de nombreuses autres études expérimentales, doivent cependant être interprétées avec précaution, en raison notamment des conditions expérimentales spécifiques appliquées au tritium et au rayonnement de référence (exposition chronique contre exposition aiguë).

Cette étude participe malgré tout au débat en amenant de nouvelles données expérimentales. Environ 200 études de ce type ont été menées au cours des 30 dernières années, s'efforçant de déterminer l'EBR de ce radionucléide dans un nombre élevé de configurations, et pour l'apparition d'effets très nombreux et différents, comprenant les aberrations chromosomiques, la production de micronoyaux, les mutations cellulaires, la survie des spermatoocytes et des ovocytes et les effets tératogènes. Ces études ont été examinées et résumées à plusieurs reprises (Straume et Carsten, 1993 ; ICRP, 2007 ; Little et Lambert, 2008 ; Paquet et Métivier, 2009). Pour dériver un facteur de pondération des rayonnements pour le calcul de la dose efficace, les seules études utilisables sont celles qui se concentrent sur l'apparition de tumeurs, et qui ont été menées en relation avec une exposition chronique à faible dose aux rayons gamma ou aux rayons X.

Les auteurs des synthèses citées ont montré que l'EBR de l'HTO pour l'apparition des tumeurs était centrée sur environ 2,5 par rapport au rayonnement gamma, et environ 1,2 par rapport aux rayons X administrés de manière chronique (Little et Lambert, 2008). La CIPR - dans sa dernière publication - a préféré exploiter toutes les données publiées et estimer la gamme des EBR prédominants. Elle a conclu que la majorité des EBR pour l'HTO, tous effets confondus, se situent de façon prédominante entre 1 et 3 par rapport aux rayons gamma et entre environ 1 et 1,5 par rapport aux rayons X (ICRP, 2007).

### 3.5.5 Conclusions

Les valeurs d'EBR du tritium varient considérablement en fonction des effets étudiés et des conditions expérimentales. Il semble clair que les EBR pour le TOL sont significativement supérieures aux EBR déterminées pour l'eau tritiée. Ces EBR sont encore supérieures dans le cas d'une contamination avec de la thymidine tritiée, même si ce cas de figure peut être considéré comme exceptionnel. Quoi qu'il en soit, le facteur de pondération ( $w_R$ ) des rayonnements beta et donc du tritium sous toutes ses formes est fixé par la CIPR à 1.

Par-delà le simple cas du tritium dont les EBR varient considérablement, l'opportunité de fixer une valeur unique pour le facteur de pondération de tous les rayonnements beta dont le transfert linéique d'énergie (et par extension le parcours dans la matière) varie de plus de deux ordres de grandeurs peut être questionnée. L'IRSN considère que fixer une simple valeur de référence pour l'ensemble de ces rayonnements beta peut être très réducteur et conduire à une sous-estimation de la dose et donc du risque pour les électrons de très faible énergie. L'IRSN estime souhaitable que la CIPR prenne en compte le résultat des études récentes pour ré-examiner la question du  $w_R$  lié au rayonnement beta de faible énergie. Dans l'attente d'une éventuelle évolution sur ce point, l'IRSN estime que l'usage d'une EBR de 2 peut être considéré pour les évaluations de risque individuel lié au tritium ou pour les études de sensibilité de ce paramètre dans une étude d'impact.

## 4 DISCUSSION GENERALE

### 4.1 RESULTATS PRINCIPAUX DU PROGRAMME DE RECHERCHE DE L'IRSN

Le programme de recherche conduit par l'IRSN en collaboration avec le CNL fournit de nouvelles connaissances, notamment à faible dose de tritium, et répond en particulier à certaines des recommandations de recherche émises par l'ASN et l'UNSCEAR (ASN, 2010 ; UNSCEAR, 2017). Au total, ce programme a abouti à 17 publications scientifiques. Globalement, hormis les résultats sur la biocinétique du TOL, les résultats obtenus sont en phase avec la littérature scientifique, et complètent les connaissances antérieures. Une spécificité des études réalisées est le nombre et la diversité des effets biologiques mesurés, plus large que ce qui est couramment rencontré dans la littérature scientifique antérieure, et s'appuyant sur des modèles biologiques de rongeurs et de poissons. Par ailleurs, le choix a été fait de considérer des conditions d'exposition *via* l'ingestion sur des durées particulièrement longues (plusieurs mois), permettant de mimer une exposition chronique. Différents niveaux de concentration ont été utilisés, dont les plus faibles permettent de refléter des situations d'exposition environnementale chez les poissons.

Les travaux menés sur la biocinétique du tritium confirment que les vitesses d'accumulation et de dépuración de l'HTO sont extrêmement rapides, indépendamment du niveau d'activité dans l'eau. Chez le poisson, les résultats sur le TOL sous forme d'acides aminés montrent une accumulation plus rapide et une vitesse d'élimination plus faible que pour l'HTO, conformément à la littérature. Chez la souris, la biocinétique du TOL n'apparaît pas différente de celle de l'HTO. Ce résultat surprenant par rapport à la littérature scientifique pourrait s'expliquer par la forme particulière de TOL utilisée et le mode d'administration. Ces résultats complètent les connaissances sur la biocinétique du tritium, mais ne remettent pas en cause les modèles biocinétiques établis qui reposent sur la compilation de nombreuses données animales et humaines (voir section 3.1).

Les travaux menés sur les dommages à l'ADN et sur les effets cytogénétiques du tritium chez les rongeurs se sont intéressés à 3 niveaux de réponse : l'induction de cassures de l'ADN, la modification des mécanismes de réparation et l'induction d'aberrations chromosomiques. Les résultats ne montrent pas d'augmentation du taux de CDB de l'ADN alors qu'un accroissement du nombre d'aberrations chromosomiques aux doses élevées est observé. Chez les poissons, une augmentation de la fréquence des CSB de l'ADN et des micronoyaux est observée dans certaines conditions d'expositions. Néanmoins, aucune augmentation des indicateurs de dommage à l'ADN considérés n'est observée au plus faible niveau de contamination (voir section 3.2).

Les travaux menés sur la toxicité tissulaire du tritium ont couvert un large nombre de tissus et organes (cerveau, système vasculaire, rein, foie, sang...) et de paramètres biologiques (modifications macroscopiques, équilibre RedOx, réponse inflammatoire, changements fonctionnels...). Les résultats font ressortir des degrés de réactivité au tritium variables entre les divers tissus considérés, certains organes apparaissant plus réactifs (reins, sang, système vasculaire) et d'autres moins réactifs (foie, rate). Néanmoins, on peut noter que seule une légère réponse a été parfois observée pour le plus faible niveau de concentration par HTO considéré, et qu'aucune anomalie macroscopique ou anatomopathologique n'a été observée, même à la plus forte concentration de tritium. De façon similaire, chez le poisson, aucune anomalie macroscopique n'a été observée. Seuls quelques paramètres biologiques ont montré une altération transitoire en fonction de la dose de tritium mais très peu d'entre eux sont affectés à la dose la plus faible (voir section 3.3).

Les travaux menés chez le poisson sur les effets du tritium sur l'embryon ou le fœtus ne montrent pas de malformations ou de mortalité embryonnaire pour des doses inférieures à 180 mGy ( $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L, 2 jours d'exposition). Ces résultats confortent ceux de la littérature

et les valeurs de DCRL recommandées pour la radioprotection des écosystèmes. Par ailleurs, les résultats montrent une altération du comportement de nage des larves de poisson à une dose de l'ordre de 44 mGy ( $1,22 \cdot 10^5$  kBq/L, 4 jours d'exposition).

Les travaux menés chez la souris sur l'efficacité biologique relative du tritium font ressortir des valeurs d'EBR élevées pour les faibles doses de TOL sous forme d'acides aminés. Cette variation d'EBR en fonction de la dose a déjà été rapportée dans la littérature. Néanmoins, étant donné le cadre très spécifique des expérimentations réalisées, l'IRSN recommande la plus grande prudence dans l'interprétation de ces résultats, et considère qu'ils ne permettent pas d'influencer le choix de la valeur d'EBR à retenir en radioprotection (voir section 3.5).

Globalement, ces études ont permis de dégager les conclusions suivantes :

- A durée et concentration égale d'exposition, le TOL a produit une réponse biologique plus importante que l'HTO même si, avec les formes spécifiques de TOL considérées, la biocinétique n'est pas apparue très différente entre les deux formes de tritium ;
- Chez le rongeur, aux concentrations les plus faibles considérées (10 kBq/L), la plupart des indicateurs biologiques étudiés n'ont pas montré de changement statistiquement significatif. Aucune anomalie tissulaire macroscopique et histologique n'a été mise en évidence quelles que soient la forme et la concentration de tritium étudiées ;
- Chez les poissons adultes, très peu de réponses biologiques ont été altérées significativement à la plus faible concentration testée (12 kBq/L). Aucune altération des paramètres importants pour la dynamique des populations - survie, croissance ou développement - n'a été observée ;
- L'étude du développement embryonnaire chez les poissons n'a montré aucune malformation ou mortalité embryonnaire jusqu'à la concentration de  $1,22 \cdot 10^6$  kBq/L d'HTO (dose de 180 mGy) ;
- Les EBR calculées pour le TOL semblent plus élevées que celles obtenues généralement pour l'HTO. Ceci est cohérent avec les données de la littérature et peut contribuer à remettre en question l'usage d'un unique facteur de pondération pour l'ensemble des émetteurs beta. Dans l'attente d'une éventuelle évolution sur ce point, l'IRSN estime que l'usage d'une EBR de 2 peut être considéré pour les évaluations de risque individuel lié au tritium ou pour les études de sensibilité de ce paramètre dans une étude d'impact.

## 4.2 DOMAINE DE VALIDITE DES DONNEES OBTENUES

Les résultats obtenus doivent être interprétés en gardant à l'esprit les caractéristiques des expérimentations dont ils sont issus. En effet, le programme de recherche mis en place par l'IRSN en collaboration avec CNL a suivi un protocole de recherche et des objectifs précis (voir détails en section 1.3.2 et annexes 1 et 2). En particulier, 4 points doivent être soulignés :

- Objectifs : les expérimentations mises en place sur la souris visaient essentiellement à comprendre les mécanismes et à caractériser les effets biologiques d'une exposition au tritium. En radiotoxicologie environnementale, les expérimentations sur le poisson zèbre avaient pour objectif d'étudier les modes d'action toxique du tritium, de confirmer les gammes de débit de dose des DCRL et de consolider la valeur de référence recommandée pour la radioprotection des écosystèmes. En conséquence, les résultats ne doivent pas être interprétés dans l'optique d'évaluer les risques sanitaires attribuables au tritium en situation d'exposition environnementale usuelle, ce qui n'était pas l'objectif des expérimentations. Par ailleurs, l'IRSN ayant fait le choix en 2010 de focaliser ses activités de recherche sur les effets non-cancérogènes des rayonnements ionisants, l'analyse du risque de survenue de cancer n'a pas été inclus dans les objectifs du programme de recherche mis en place, même si certains résultats sur les dommages à l'ADN et les effets cytogénétiques rapportés dans ce rapport peuvent être considérés comme pertinents pour investiguer une partie des mécanismes conduisant au cancer. Néanmoins, des expérimentations complémentaires ont été

mises en place par le CNL sur le risque de cancer chez des rongeurs sur l'ensemble de la durée de vie. Les résultats préliminaires sont résumés en Annexe 3, et les publications correspondantes sont attendues prochainement.

- Modèles animaux : les résultats obtenus dans ces études sur des souris et des poissons ne sont pas directement transposables à l'Homme. Dans le domaine de la toxicologie sur les produits chimiques, l'utilisation des données animales est conditionnée à la confrontation de nombreuses études indépendantes les unes des autres et à l'ajustement des paramètres toxicologiques en tenant compte des conditions d'expérimentation (chronique, aiguë, voie d'intoxication, niveau de dose, espèce animale utilisée) et des incertitudes associées aux exercices de transposition. Les études présentées ici pourraient contribuer à cet exercice, à condition d'être utilisées comme une source additionnelle de données par rapport à celles déjà publiées.
- Niveaux d'exposition : les expérimentations mises en place visaient à fournir des résultats à des niveaux d'exposition plus faibles et des durées d'expositions plus longues que ceux généralement disponibles dans la littérature en 2010. Les expérimentations sur la souris ont considéré des expositions sur 1 ou 8 mois *via* l'ingestion de tritium dans l'eau de boisson aux activités volumiques de 10, 1 10<sup>3</sup>, 2 10<sup>4</sup> kBq/L. La concentration la plus basse correspond à la valeur guide de l'OMS (10 kBq/L) pour les eaux de boisson. Les autres concentrations, plus élevées, étaient sélectionnées afin de pouvoir analyser les mécanismes biologiques induits par le tritium. Les expérimentations sur les embryons de poisson zèbre ont été réalisées à des niveaux de débit de dose élevés correspondant aux gammes de débit de dose des DCRL pour lesquels des effets sur la reproduction ou sur les poissons juvéniles étaient attendus (40 à 4000 µGy/h avec des activités volumiques de l'ordre de 10<sup>4</sup> à 10<sup>6</sup> kBq/L). Les études conduites sur le poisson tête-de-boule au stade adulte ont considéré des niveaux de contamination reflétant l'exposition observée en rivière sur le site de Chalk River (maximum 180 kBq/L). Donc, même si l'ensemble du programme de recherche était clairement orienté vers les faibles doses, les niveaux d'exposition considérés restent très supérieurs à ceux généralement rencontrés dans l'environnement.
- Type de TOL : les expérimentations mises en place visaient à améliorer les connaissances sur les effets du tritium sous forme de TOL, moins bien documentés que ceux de l'HTO. Le TOL peut être incorporé *via* des molécules organiques diverses (acides aminés, sucres, protéines, etc.). Selon la forme de TOL, la distribution dans les cellules et les tissus peut varier. Par ailleurs, sous certaines formes de TOL, le tritium peut être incorporé dans l'ADN et causer des dommages hautement localisés au matériel génétique. Dans le programme de recherche de l'IRSN, le choix a été fait d'utiliser un mélange d'acides aminés tritiés (alanine, proline, glycine pour la souris ; lysine, leucine et arginine pour le poisson) comme modèle d'exposition au TOL. Scientifiquement, ce choix a été fait parce que peu de données existaient sur le TOL sous forme d'acides aminés et que ceux-ci constituent un composant important du métabolisme cellulaire. Même si ce choix ne tient pas compte des autres formes de TOL potentiellement disponibles dans l'environnement (e.g. lipides ou sucres), il constitue une première étape. D'un point de vue pratique, dans le cas des souris, les expérimentations ont été réalisées par ingestion du TOL *via* l'eau de boisson, ce qui a été facilité par la grande solubilité de ces acides aminés dans l'eau. Cette caractéristique doit aussi être soulignée, car la plupart des expérimentations sur le TOL dans la littérature ont été réalisées *via* l'alimentation de nourriture solide, et non par l'eau de boisson, ce qui peut changer la cinétique d'incorporation. Chez le poisson, certaines expérimentations ont utilisé de la thymidine, qui a une très forte affinité pour l'ADN ou un mélange d'acides aminés essentiels incorporés dans de la nourriture. Une accumulation et une rétention du tritium dans ces organismes plus importante qu'après administration *via* l'eau de boisson peut alors s'expliquer. Les différences dans le choix des acides aminés considérés et dans la voie d'administration rendent délicate la comparaison entre les résultats obtenus chez le rongeur et chez le poisson. Du fait de ces formes spécifiques de TOL, les résultats doivent être interprétés avec prudence, et ne doivent pas être extrapolés à l'ensemble des formes possibles de TOL.

### 4.3 PERSPECTIVES DE RECHERCHE SUR LES EFFETS BIOLOGIQUES DU TRITIUM

Certains des travaux présentés ci-dessus n'ont pas encore fait l'objet de publications scientifiques, et plusieurs articles sont en cours de finalisation. Par ailleurs, certaines recherches sont toujours en cours à l'IRSN (par exemple, une thèse est en cours sur la relation entre la distribution cellulaire du dépôt d'énergie produite par la désintégration du tritium sous différentes formes chimiques et les capacités reproductives du poisson zèbre). En dehors de ces activités, l'IRSN n'envisage pas en l'état actuel de relancer de programme expérimental de grande ampleur sur les effets biologiques du tritium, qui globalement ne se manifestent qu'à des concentrations élevées, ou pour des formes chimiques particulières de tritium telles que la thymidine tritiée, très éloignées de celles retrouvées classiquement dans l'environnement. L'IRSN n'envisage pas non plus d'études complémentaires sur la détermination des EBR, qui ne produiraient que des valeurs additionnelles par rapport à un ensemble déjà très fourni de valeurs.

L'IRSN maintiendra néanmoins une veille de la littérature scientifique sur les effets du tritium, en particulier les résultats sur le risque de cancer associé au tritium qui devraient être publiés prochainement, les résultats en biocinétique, microdosimétrie et toxicologie du tritium attendus en 2021 dans le cadre du projet européen Transat, et les résultats épidémiologiques sur les travailleurs exposés au tritium. Par ailleurs, des contacts étroits sont maintenus entre des chercheurs de l'IRSN et du CNL, permettant en particulier de contribuer conjointement à l'interprétation des résultats de l'étude sur les risques de cancer et aux conclusions pouvant en être dérivées. En fonction de ces conclusions, des travaux communs pourraient être conduits sur la base des tissus fixés et stockés.

Au-delà de ces perspectives, plusieurs questions de recherche persistent sur les effets du tritium ou plus largement sur les effets des rayonnements ionisants, pouvant intéresser diverses équipes de recherche de par le monde :

- Approfondir la biocinétique de types spécifiques de TOL, et estimer les doses engendrées par le dépôt d'énergie local par des approches micro-dosimétriques ;
- Revisiter le facteur de pondération  $w_R$  pour les rayonnements beta, en distinguant les rayonnements de faible et de forte énergie ;
- Réévaluer les connaissances actuelles sur les effets potentiel des rayonnements ionisants sur la descendance des individus exposés (effets héréditaires) ;
- Développer l'approche « Adverse Outcome Pathways » (AOP). Cette approche est activement développée par les communautés de recherche internationales et européennes. Une perspective pourrait être la construction d'AOP prenant en compte les spécificités des dépôts d'énergie entre l'HTO ou le TOL et les expositions externes aux rayons gamma ;
- Développer, pour l'homme et pour l'environnement, des études de toxicologie permettant la détermination de valeurs seuils sans effet (en Bq), à l'instar de ce qui est réalisé pour de nombreuses substances chimiques. Ces études permettraient en outre de s'affranchir du calcul de dose radioactive, objet dans le cas du tritium d'incertitudes et de critiques, et d'évaluer le potentiel toxique d'une ration alimentaire ou d'un environnement à partir de la simple connaissance des concentrations de tritium organique ou inorganique.

## SOURCES DE FINANCEMENT

Le programme collaboratif de recherches entre l'IRSN et CNL dont les résultats sont présentés dans ce rapport a été cofinancé par l'IRSN et le CNL, la Commission Canadienne de Sécurité Nucléaire (CNSC) et le CANDU Owners Group (COG). Certaines expérimentations conduites sur les poissons ont également fait l'objet d'un cofinancement par Electricité de France (EDF), dans le cadre de l'action GGP-Environnement.

## ETHIQUE ET EXPERIMENTATION ANIMALE

Les expérimentations animales qui ont été réalisées dans le cadre du programme de recherche présenté dans ce rapport ont été évaluées et validées par les comités d'éthique en expérimentation animale de l'IRSN et de CNL.

Les recherches menées sur l'animal, modèle rongeurs ou poissons, sont très encadrées par des réglementations nationale et européenne en vigueur, auxquelles s'ajoutent des lignes directrices de bonnes pratiques et des principes éthiques établis au sein de la communauté scientifique. Toutes les expérimentations menées sur l'animal sont soumises à l'approbation d'un comité d'éthique en expérimentation animale, qui juge du caractère éthique et nécessaire des projets avant leur mise en œuvre. Le respect du principe des 3 R's (Remplacement, Réduction et Raffinement) est au cœur de cette démarche éthique. Les études sur animal conduites à l'IRSN sont réalisées au sein de laboratoires et d'animaleries répondant aux exigences réglementaires et sont conduites par des personnes formées et compétentes.

L'IRSN est signataire de la Charte de transparence du Groupe interprofessionnel de réflexion et de communication sur la recherche (Gircor) sur le recours aux animaux à des fins scientifiques et réglementaires en France. Par la signature de cette Charte de transparence, l'IRSN s'engage à apporter une information complète, claire et exacte sur les raisons et les conditions de l'utilisation des modèles animaux, sur le cadre réglementaire de cette utilisation ainsi que sur les progrès scientifiques et médicaux qui en découlent.

## LISTE DES REFERENCES <sup>12</sup>

- Adam-Guillermin C, Pereira S, Della-Vedova C, Hinton T, Garnier-Laplace J (2012). *Genotoxic and Reprotoxic Effects of Tritium and External Gamma Irradiation on Aquatic Animals*. *Rev Environ Contamin Toxicol*. 220: 67-103
- AGIR (2007). Review of Risks from Tritium. Report of the independent Advisory Group on Ionising Radiation (AGIR). RCE-4. Chilton: Health Protection Agency.
- Alloni D, Cutaia C, Mariotti L, Friedland W, Ottolenghi A (2014). Modeling dose deposition and DNA damage due to low-energy beta(-) emitters. *Radiat Res*. 182: 322–30. <https://doi.org/10.1667/RR13664.1>.
- Anses (2017). Valeurs toxicologiques de référence Guide d'élaboration de l'Anses. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBSTANCES2017SA0016Ra.pdf>.
- Arcanjo C, Armant O, Floriani M, Cavalie I, Camilleri V, Simon O, Orjollet D, Adam-Guillermin C, Gagnaire B (2018). *Tritiated water exposure disrupts myofibril structure and induces mis-regulation of eye opacity and DNA repair genes in zebrafish early life stages*. *Aquatic Toxicol*. 200: 114-26.
- Arcanjo C, Maro D, Simon O, Beaugelin-Seiller K, Cavalie I, Camilleri V, Carasco L, Orjollet D, Adam-Guillermin C, Gagnaire B (2019). *Assessing tritium internalization and absorbed dose rate in zebrafish early life stages: importance of rapid isotopic exchange*. *J Environ Radioact*. 203: 30-8.
- Arcanjo C, Adam-Guillermin C, Murat El Houdigui S, Loro G, Della-Vedova C, Cavalie I, Camilleri V, Floriani M, Gagnaire B (2020). *Effects of tritiated water on locomotion of zebrafish larvae: a new insight in tritium toxic effects on a vertebrate model species*. *Aquatic Toxicol*. 219: 105384. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105384>
- ASN (2010). Livre blanc du tritium - The tritium white paper. <http://www.asn.fr/sites/tritium>.
- Baiocco G, George I, Garcia-Argote S, Guardamagna I, Lonati L, Lamartinière Y, Orsière T, Rousseau B, Ottolenghi A, Jha A, Lebaron-Jacobs L, Grisolia C, Malard V (2020). A 3D In Vitro Model of the Human Airway Epithelium Exposed to Tritiated Water: Dosimetric Estimate and Cytotoxic Effects. *Radiat Res*. 2020 Dec 30. doi: 10.1667/RADE-20-00208.1.
- Baglan N, Kim SB, Cossonnet C, Croudace W, Fournier M, Galariu D, Warwick PE, Momoshima N, Ansoborlo E (2015). Organically bound tritium analysis in environmental samples, *Fusion Science Technol*. 67(2): 250-3.
- Barcellos-Hoff MH, Brooks AL (2001). Extracellular signaling through the microenvironment: a hypothesis relating carcinogenesis, bystander effects, and genomic instability. *Radiat Res*. 156: 618-27.
- Bannister L, Serran M, Bertrand L, Klokov D, Wyatt H, Blimkie M, Guéguen Y, Priest N, Jourdain JR, Sykes P (2016). *Environmentally Relevant Chronic Low-Dose Tritium and Gamma Exposures do not Increase Somatic Intrachromosomal Recombination in pKZ1 Mouse Spleen*, *Radiat Res*. 186: 539-48. Doi: 10.1667/RR14564.1.
- Beaton D, Gosselin I, Festarini A, Gagnaire B, Farrow F, Cavalie I, Schultz C, Kim SB, Walsh S, Ikert H, Chen HQ, Adam-Guillermin C, Stuart M (2019). *Correlated Biomarker Responses for DNA Damage and Innate Immunity Revealed in a Comparison between Field and Laboratory Studies: Fathead Minnow Exposed to Tritium*. *Sci Total Environ*. 662: 990-1002.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strähle U (2002). Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience* 5(2): 111–8. <https://doi.org/10.1038/nn788>.
- Bertho JM, Kereselidze D, Manens L, Culeux C, Magneron V, Surette J, Blimkie M, Bertrand L, Wyatt H, Souidi M, Dublineau I, Priest N, Jourdain JR (2019). *Hto, Tritiated Amino Acid Exposure and External Exposure Induce Differential Effects on Hematopoiesis and Iron Metabolism*. *Sci Reports* 27; 9(1):19919. doi: 10.1038/s41598-019-56453-4.
- Broer S, Broer A (2017). Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochem J*. 474(12): 1935-1963).
- Brown R (1979). Environmental tritium in trees. Proceedings of the Symposium on Behaviour of Tritium in the Environment (16-20 October, 1978) jointly organised by IAEA and NEA, San Francisco, pp. 405–17.
- Brown JE, Alfonso B, Avila R, Beresford NA, Copplestone D, Pröhl G, Ulanovski A (2008). The ERICA tool. *J Environ Radioact*. 99: 1371-83.
- Brustein E, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Drapeau P. (2003). Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *Journal of Physiology-Paris*, 97(1), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2003.10.009>
- Chao TC, Wang CC, Li J, Li C, Tung CJ (2012) Cellular- and micro-dosimetry of heterogeneously distributed tritium. *Int J Radiat Biol*. 88:151–7. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.595876>.
- Chen J (2012). Estimated yield of double-strand breaks from internal exposure to tritium. *Radiat Environ Biophys*. 51:295–302. <https://doi.org/10.1007/s00411-012-0424-y>.
- CNSC (2011). Tritium Studies Project Synthesis Report. Canadian Nuclear Safety Commission. INFO-0800. Revision 1.
- CNSC (2015). Studies on the Toxicity of Tritium: Effects of Low Dose Tritium and Gamma Radiations. CNSC Progress reports (2012-14) and Final Report.
- CNSC (2019). Implementation of Recommendations from the Tritium Studies Synthesis Report. 2019:30.
- COG (2015). Studies on the Toxicity of Tritium: Report on physiological markers of toxicity of low dose tritium and organically bound tritium in wild type mice. CANDU Owner Group, Report COG-16-3006.
- Connan O, Maro D, Hébert D, Solier L, Caldeira Ideas P, Laguionie P, St-Amant N (2015). In situ measurements of tritium evapotranspiration (3H-ET) flux over grass and soil using the gradient and eddy covariance experimental methods and the FAO-56 model, *J Environ Radioact*. 148: 1-9.
- De Santis M, Cesari E, Nobili E, Straface G, Cavaliere AF, Caruso A (2007). Radiation effects on development. *Birth Defects Research Part C – Embryo Today: Reviews* 81(3): 177–82. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20099>
- Ducros L., Eyrolle F., Della Vedova C., Charmasson S., LEBLANC M., Mayer A., Babic M., Antonelli C., Mourier D., Giner F. (2018). Tritium in river waters from French Mediterranean catchments: background levels and variability, *Sci Total Environ*. 612, 672-82.
- Edwards AA (1999). Neutron RBE values and their relationship to judgements in radiological protection. *J Radiol Prot*. 19: 93-105.
- Erickson RC (1971). Effects of chronic irradiation by tritiated water on *Poecilia reticulata*, the guppy. In: Nelson DJ (ed) *Radionuclides in ecosystems*, vol 2. National Technical Information Service, US Department of Commerce, Springfield, VA, pp 1091–9.

<sup>12</sup> En gras et italique : publications de l'IRSN ou du CNL issues du programme de recherche sur les effets biologiques du tritium

- Euratom (2013). Directive 2013/51/Euratom du Conseil du 22 octobre 2013 fixant des exigences pour la protection de la santé de la population en ce qui concerne les substances radioactives dans les eaux destinées à la consommation humaine. JOUE du 7/11/2013, L296/12.
- Eyrolle-Boyer F, Claval D, Charmasson S, Boyer P, Cossonnet C (2015a) Apparent enrichment of organically bound tritium in rivers explained by the heritage of our past. *J Environ Radioact.* 136: 162-8.
- Eyrolle-Boyer F, Renaud Ph, Tournieux D, Antonelli C, Le Doré F, Blanchet JF (2015b) Origins and trend of radionuclides within the Rhône River over the last decades, *Radioprotection* 50, 1: 27-34.
- Eyrolle F, Lepage H, Copard Y, Ducros L, Claval D, Saey L, Cossonnet C, Giner F, Mourier D. (2018a) A brief history of origins and contents of Organically Bound Tritium (OBT) and  $^{14}\text{C}$  in the sediments of the Rhône watershed. *STOTEN* 643: 40-51.
- Eyrolle F, Ducros L, Le Dizes S, Beaugelin-Seiller K, Charmasson S, Boyer P, Cossonnet C (2018b). An updated review on tritium in the environment. *J Environ Radioact.* 181: 128-137.
- Eyrolle F, Antonelli C, Lepage H, Cossonnet C, Gurriaran R (2020). Radionuclide in waters and suspended sediments in the Rhone river (France) - current contents, anthropic pressures and trajectories. *STOTEN*, 723: 137873.
- Fiévet B, Pommier J, Voiseux C, Bailly du Bois P, Laguionie P, Cossonnet C, Solier L (2013). Transfer of tritium released into the marine environment by French nuclear facilities bordering the English Channel. *Environ Sci Technol.* 47 (12): 696-703.
- Flegal M, Blimkie M, Roch-Lefevre S, Gregoire E, Klokov D (2013). The lack of cytotoxic effect and radioadaptive response in splenocytes of mice exposed to low level internal beta-particle irradiation through tritiated drinking water in vivo. *Int J Mol Sci.* 14: 23791–800. <https://doi.org/10.3390/ijms141223791>.**
- Fuma S, Inoue Y (1995). Simplified and sensitive analysis of Organically Bound Tritium in tree rings to retrospect environmental tritium levels. *Applied Radiat Isotopes* 46: 991-7.
- Gagnaire B, Adam-Guillermín C, Festarini A, Cavalié I, Della-Vedova C, Shultz C, Kim SB, Ikert H, Dubois C, Walsh S, Farrow F, Beaton D, Tan E, Wen K, Stuart M (2017). Effects of in situ exposure to tritiated natural environments: A multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Sci Total Environ.* 599–600, 597–611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.210>**
- Gagnaire B, Gosselin I, Festarini A, Walsh S, Cavalié I, Adam-Guillermín C, Della-Vedova C, Farrow F, Kim S, Shkarupin A, Chen H, Beaton D, Stuart M (2020a). Effects of in vivo exposure to tritium: a multi-biomarker approach using the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environ Sci Pollution Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3781-5>**
- Gagnaire B, Arcanjo C, Cavalié I, Camilleri V, Simon O, Floriani M, Orjollet D, Adam-Guillermín C (2020b). Tritiated Water Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*): Effects on the Early-Life Stages. *Environ Toxicol Chemistr.* 39(3): 648–58. <https://doi.org/10.1002/etc.4650>.**
- Gagnaire B, Arcanjo C, Cavalié I, Camilleri V, Simon O, Dubourg N, Floriani M, Adam-Guillermín C (2021). Effects of gamma ionizing radiation exposure on *Danio rerio* embryo-larval stages - comparison with tritium exposure. *J Hazard Mater.* 408: 124866, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124866>.**
- Galeriu D, Heling R, Melintescu A (2005). The dynamics of tritium including OBT in the aquatic food chain. *Fusion Sci Technol.* 48: 779-82.
- Garnier-Laplace J, Della-Vedova C, Andersson P, Copplestone D, Cailles C, Beresford NA, Howard BJ, Howe P, Whitehouse P (2010). A multi-criteria weight of evidence approach for deriving ecological benchmarks for radioactive substances. *J Radiol Prot.* 30: 215-233
- Goodhead DT (2006). Energy deposition stochastics and track structure: what about the target? *Radiat Prot Dosimetry* 122: 3–15. <https://doi.org/10.1093/rpd/ncl498>.
- Goodhead DT (2009). Fifth Warren K. Sinclair Keynote Address: Issues in quantifying the effects of low-level radiation. *Health Phys.* 97: 394–406. <https://doi.org/10.1097/HP.0b013e3181ae8acf>.
- Guéguen Y, Priest ND, Dublineau I, Bannister L, Benderitter M, Durand C, Ebrahimian TG, Gregoire E, Grison S, Ibanez C, Legendre A, Lestaevel P, Roch-Lefevre S, Roy L, Tack K, Wyatt H, Leblanc J, Jourdain JR, Klokov D (2018). In vivo animal studies help achieve international consensus on standards and guidelines for health risk estimates for chronic exposure to low levels of tritium in drinking water. *Environ Mol Mutagen.* 59(7): 586-94.**
- Guéguen Y, Bontemps A, Ebrahimian TG (2019). Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 76(7): 1255-73.**
- Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutou S (2000). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen.* 35: 234–52.
- Heylmann D, Rodel F, Kindler T, Kaina B (2014). Radiation sensitivity of human and murine peripheral blood lymphocytes, stem and progenitor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1846:121–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.009>.
- Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P (2007). Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 15747-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705614104>
- Hisamatsu S, Katsumata T, Takizawa Y (1992). Tritium concentration in Akita City diet. *Health Phys.* 63(4): 393-7. doi: 10.1097/00004032-199210000-00002.
- Hoeijmakers JH (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366–74. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hurem S, Martín LM, Lindeman L, Brede DA, Salbu B, Lyche JL, et al. (2018). Parental exposure to gamma radiation causes progressively altered transcriptomes linked to adverse effects in zebrafish offspring. *Environ Pollution* 234: 855-63.
- Hyodo-Taguchi Y, Egami N (1977). Damage to spermatogenic cells in fish kept in tritiated water. *Radiat Res.* 71: 641–52
- Hyodo-Taguchi Y, Etoh H (1986). Effects of Tritiated Water on Germ Cells in Medaka: II. Diminished Reproductive Capacity Following Embryonic Exposure. *Radiat Res.* 106(3): 321. <https://doi.org/10.2307/3576740>
- Hyodo-Taguchi Y, Etoh H (1993). Vertebral malformations in medaka (teleost fish) after exposure to tritiated water in the embryonic stage. *Radiat Res.* 135(3): 400–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8378533>
- IAEA (2008). Relative Biological Effectiveness in Ion Beam Therapy. Technical Reports Series. Vienna: IAEA.
- ICRP (1990). Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 1. ICRP Publication 56. *Annals of the ICRP* 20(2). International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1991). 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Publication 60. *Annals of the ICRP* 21(1-3). International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (1994). Dose coefficients for intakes of radionuclides by workers. ICRP Publication 68. *Annals of the ICRP* 24(4). International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford.

- ICRP (1996). Age-dependant doses to members of the public from intakes of radionuclides: Part 5. Compilation of ingestion and inhalation doses coefficients. ICRP Publication 72. Annals of the ICRP 26(1). International Commission on Radiological Protection, Pergamon Press, Oxford.
- ICRP (2007). The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. Publication 103. Ann. ICRP 37 (2-4).
- ICRP (2008). Environmental protection: the concept and use of reference animals and plants. ICRP Publication 108.
- ICRP (2016). Occupational Intakes of Radionuclides: Part 2. ICRP Publication 134. Ann. ICRP 45(3/4), 1–352.
- ICRP (2020). Radiation Weighting for Reference Animals and Plants. Approved for publication.
- IRSN (2001). Fiche radionucléide Tritium. <https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/fiches-radionucleides/>.
- IRSN (2016a). Bilan de l'état radiologique de l'environnement français de juin 2011 à décembre 2014. IRSN Rapport de mission.
- IRSN (2016b). Radiation protection of the environment. State of the art and IRSN recommendations. IRSN Report 2016-03.
- IRSN (2017). Actualisation des connaissances acquises sur le tritium dans l'environnement. PRP-ENV-SERIS-2017-00004.
- IRSN (2018). Bilan de l'état radiologique de l'environnement français de 2015 à 2017. Rapport IRSN DG/2018-00006
- IRSN (2020). Référence de qualité réglementaire relative au tritium dans les eaux destinées à la consommation humaine – Analyse de la critique faite par la CRIIRAD des références de 10 000 Bq/L et 100 Bq/L pour le tritium dans l'eau de boisson. Rapport d'expertise n°FT/AV/PSE/2020-00002.
- Jackson SP (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23: 687–96
- Jean-Baptiste Ph, Baumier D, Clavel B (2007). The distribution of tritium in the terrestrial and aquatic environments of the Crey-Malville nuclear power plant (2002-2005). *J Environ Radioact.* 94, 2: 107-18.
- Kim SB, Shultz C, Stuart M, McNamara E, Festarini A, Bureau DP (2013a). Organically bound tritium (OBT) formation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked food exposure experiments. *Applied Radiat Isotopes* 72: 114-22.
- Kim SB, Baglan N, Davis PA (2013b). Current understanding of organically bound tritium (OBT) in the environment. *J Environ Radioact.* 126: 83–91.
- Kim SB, Shultz C, Stuart M, Festarini A (2015): Tritium uptake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): HTO and OBT-spiked feed exposures simultaneously. *Applied Radiat Isotopes* 98: 96-102.
- Kozak K, Rank D, Biro T, Rajner V, Golder F, Staudner F (1993). Retrospective evaluation of tritium fallout by tree-ring analysis. *J Environ Radioact.* 19: 67-77.
- Krejci K, Zeller A (1979). Tritium pollution in the Swiss luminous compound industry. In: Behaviour of Tritium in the Environment, IAEA Proceedings Series, IAEA-232/11, Vienna, pp. 65-77.
- Le Guen B (2008). Impact du tritium autour des centrales nucléaires EDF, *Radioprotection* 43, 2: 177-91.
- Le Guen B, Chrétien V, Hémidy PY, Sagot MJ (2009). Rejets de tritium et impact autour des Centres nucléaires de production électricité d'EDF. *Journées SFRP sur le tritium*, Sept 2009.
- Leuraud K, Fournier L, Samson E, Caër-Lorho S, Laurier D (2017). Mortality in the French cohort of nuclear workers. *Radioprotection* 52(3): 199-210. doi: 10.1051/radiopro/2017015.
- Little MP (2013). A review of non-cancer effects, especially circulatory and ocular diseases. *Radiat Environ Biophys.* 52(4): 435-49.
- Little MP, Lambert BE (2008). Systematic review of experimental studies on the relative biological effectiveness of tritium. *Radiat Environ Biophys.* 47: 71–93.
- Little MP, Tawn EJ, Tzoulaki I, Wakeford R, Hildebrandt G, Paris F, Tapio S, Elliott P (2008). A systematic review of epidemiological associations between low and moderate doses of ionizing radiation and late cardiovascular effects, and their possible mechanisms. *Radiat Res.* 169(1): 99-109.
- Lloyd DC, Moquet JE, Oram S, Edwards AA, Lucas JN (1998). Accidental intake of tritiated water: a cytogenetic follow-up case on translocation stability and dose reconstruction. *Int J Radiat Biol.* 73(5): 543-7. doi: 10.1080/095530098142095.
- Martin S, Ségala C. Epidemiological Study of Mortality Among Workers Exposed to Tritium in France. *Radiat Res.* 2021 Jan 7. doi: 10.1667/RR5353.1.
- McGeoghegan D, Binks K, et al. (2008). The non-cancer mortality experience of male workers at British Nuclear Fuels plc, 1946–2005. *Int J Epidemiol.* 37(3): 506-18.
- Miskel JA (1973). Production of tritium by nuclear weapons. In: Moghissi, A.A., Carter, M.W. (Eds.), Tritium. Messenger Graphics. Phoenix et Las Vegas: 79-85.
- Mitchel L (1976). Tritium inventories of the world oceans and their implications, *Nature* 263: 103-6.
- Morereau A, Lepage H, Claval D, Cossonnet C, Ambrosi JP, Mourier B, Winiarski T, Copard Y, Eyrolle F (2020). Trajectories of technogenic tritium in the Rhône River (France). *J Environ Radioact.* 223-224, 106370.
- Murat El Houdigui S, Adam-Guillermin C, Loro G, Arcanjo C, Frelon S, Floriani M, Dubourg N, Baudelet E, Audebert S, Camoin L, Armant O (2019). A systems biology approach reveals neuronal and muscle developmental defects after chronic exposure to ionising radiation in zebrafish. *Sci Reports* 9(1): 20241. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56590-w>
- Murphy Jr C (1993). Tritium transport and cycling in the environment. *Health Phys.* 65: 683-97.
- Osipov AN, Buleeva G, Arkhangelskaya E, Klokov D (2013). In vivo gamma-irradiation low dose threshold for suppression of DNA double strand breaks below the spontaneous level in mouse blood and spleen cells. *Mutat Res.* 756: 141-5.
- Paquet F, Métivier H (2009). Are the risks from tritium exposures being underestimated? *J Radiol Prot.* 29(2): 175-81. doi: 10.1088/0952-4746/29/2/005.
- Pereira S, Bourrachot S, Cavalie I, Plaire D, Dutilleul M, Gilbin R, Adam-Guillermin C (2011). Genotoxicity of acute and chronic gamma-irradiation on zebrafish cells and consequences for embryo development. *Environ Toxicol Chemistr.* 30: 2831-7.
- Picano E, Vano E, et al. (2012). Cancer and non-cancer brain and eye effects of chronic low-dose ionizing radiation exposure. *BMC Cancer* 12(1): 157.
- Priest ND, Blimkie MS, Wyatt H, Bugden M, Bannister LA, Guéguen Y, Jourdain JR, Klokov D (2017). Tritium (3 H) retention in mice: Administered as HTO, DTO or as 3 H-labeled amino-acids. *Health Phys.* 112: 439–44.**
- Quan Y, Zhou C, Deng B, Lin J (2019). The low dose effects of human mammary epithelial cells induced by internal exposure to low radioactive tritiated water. *Toxicol in Vitro* 61: 104608. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104608>.
- Roch-Lefevre S, Martin-Bodiot C, Gregoire E, Desbree A, Roy L, Barquinero JF (2016). A mouse model of cytogenetic analysis to evaluate caesium137 radiation dose exposure and contamination level in lymphocytes. *Radiat Environ Biophys.* 55: 61–70.**
- Roch-Lefèvre S, Grégoire E, Martin-Bodiot C, Flegal M, Fréneau A, Blimkie M, Bannister L, Wyatt H, Barquinero JF, Roy L, Benadjaoud M, Priest N, Jourdain JR, Klokov D (2018). Cytogenetic damage analysis in mice chronically exposed to low-dose internal tritium beta-particle radiation. *Oncotarget* 9(44): 27397-411.**
- Roussel-Debet (2014). Bruit de fond du tritium en milieu terrestre. *Radioprotection* 49(2): 139-142.
- Rossi HH, Zaider M (1990). Contribution of neutrons to the biological effects in Hiroshima. *Health Phys.* 58: 645-7.

- Samson E, Leuraud K, Rage E, Caër-Lorho S, Ancelet S, Cléro E, Bouet S, Hoffmann S, Fournier L, Belloni M, Jovanovic I, Bah T, Davesne E, Blanchardon E, Challeton de Vathaire C, Laurier D, Laurent O (2018). Bilan de la surveillance épidémiologique des travailleurs du cycle électronucléaire en France. *Radioprotection* 53(3): 175–84.
- Schell WR, Sauzay S, Payne BR (1974). World distribution of environmental tritium. In: *Physical Behaviour of Radioactive Contaminants in the Atmosphere*. IAEA, Vienne, pp. 374-385. IAEA/STI/PUBI3451.
- Snigireva GP, Khaïmovich TI, Nagiba VI (2010). Assessment of relative biological effectiveness of tritium using chromosome aberration frequency in human blood lymphocytes. [Article in Russian] *Radiat Biol Radioecol*. 50: 663–71.
- Strand JA, Fujihara MP, Poston TM, Abernethy CS (1982). Permanence of Suppression of the Primary Immune Response in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*, Sublethally Exposed to Tritiated Water during Embryogenesis. *Radiat Res*. 91: 533-41.
- Straume T (1995). High-energy Gamma Rays in Hiroshima and Nagasaki: Implications for Risk and  $W_R$  *Health Phys*. 69(6): 954-6. doi: 10.1097/00004032-199512000-00010.
- Straume T, Carsten AL (1993). Tritium Radiobiology and Relative Biological Effectiveness. *Health Phys*. 65(6): 657–2.
- Streffer C, van Beuningen D, Elias S (1978). Comparative Effects of Tritiated Water and Thymidine on the Preimplanted Mouse Embryo. *In Vitro Curr Top Radiat Res Q*. 12(1-4): 182-93.
- Thompson PA, Hamlat MS, Lane R, Mihok S, Reinhardt P, Bundy K (2011). Revue de l'état des connaissances des effets du tritium sur la santé et l'environnement au Canada – un outil pour orienter la surveillance réglementaire, *Radioprotection* 46, 4: 511-31.
- Ujeno Y (1983). Relative biological effectiveness (RBE) of tritium beta rays in relation to dose rate. *Health Phys*. 45: 789-91.
- UNSCEAR (2000). Sources and effects of ionizing radiation, Annex C - Exposures to the public from man-made sources of radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. United Nations, New York.
- UNSCEAR (2006). Sources, effects and risks of ionizing radiation. UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. United Nations, New York.
- UNSCEAR (2017). Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. UNSCEAR 2016. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex C, Biological effects of selected internal emitters— tritium. United Nations, New York.
- Van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. 2: 196–206. <https://doi.org/10.1038/35056049>
- WHO (1983). Environmental Health Criteria 25. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO (2017). Guidelines for Drinking-water Quality, fourth edition incorporating the first addendum. World Health Organization, ISBN 978-92-4-154995-0.
- Yamamoto O, et al. (1990). HTO oral administration in mice. I: Threshold dose rate for haematopoietic death. *Int J Radiat Biol*. 57(3): 543-9.

# ANNEXES

## ANNEXE 1 : APPROCHE EXPERIMENTALE EN RADIOTOXICOLOGIE HUMAINE (MODELE RONGEUR)

Pour les expositions à l'HTO, l'eau tritiée a été diluée dans l'eau de boisson des souris aux concentrations souhaitées. Pour les expositions au TOL, des acides aminés marqués au  $^3\text{H}$  (Woodbridge, ON, Canada ; alanine, 2,45-3,15  $10^9$  kBq/mmol ; proline, 0,93-2,03  $10^9$  kBq/mmol ; glycine, 1,11-2,22  $10^9$  kBq/mmol) ont été dilués en parts égales afin d'atteindre la concentration cible de tritium. La concentration finale de tritium dans les préparations d'eau, pour l'HTO et le TOL, a été confirmée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (LSC, Tricarb 1900, Perkin-Elmer). Bien qu'il existe une grande variété de molécules de TOL (Kim et al., 2013a, b et c), les acides aminés ont été choisis parce qu'ils constituent un composant important du métabolisme cellulaire et ne sont pas fixés de manière préférentielle à l'ADN (Guéguen et al., 2018 ; CNSC 2015 ; COG 2015) mais aussi pour leur très grande solubilité dans l'eau ce qui a facilité leur utilisation dans ces expérimentations. Le choix des trois acides aminés spécifiques, l'alanine, la glycine et la proline, se justifie en outre par le fait qu'il s'agit des acides aminés les plus courants, qu'ils ne sont pas essentiels et qu'ils n'ont aucun rôle dans les voies de signalisation/régulation (sauf pour la proline). Enfin, la quantité ajoutée d'acides aminés tritiés était négligeable par rapport à la concentration consommée avec les aliments (< 100 fois moins) (Bertho et al., 2019).

Le protocole expérimental des études biocinétiques est schématisé Figure A1.1. Des souris mâles de souche C57Bl/6J âgées de 6 semaines ont été utilisées pour déterminer la rétention du tritium après 30 jours d'ingestion continue de HTO ou de TOL à des concentrations de 10, 1  $10^3$  ou 2  $10^4$  kBq/L chacun dans l'eau de boisson fournie ad libitum. Six souris ont été réparties dans chaque groupe de traitement. Pendant la période d'exposition par ingestion, à 1, 7, 15 et 30 jours, et après l'arrêt de l'ingestion à 2, 4, 8, 16, 32, 64 et 128 jours après la fin de l'exposition, les souris ont été euthanasiées et les tissus ont été prélevés pour mesurer les concentrations de tritium.

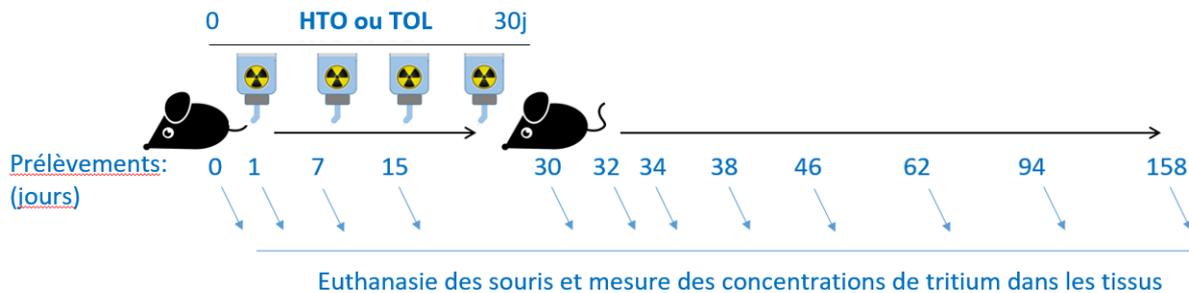


Figure A1.1 : Protocole d'exposition des souris pour les études de biocinétiques (d'après Priest et al, 2017)

Pour étudier les effets biologiques associés, des souris de la même souche (mâles C57Bl/6J) ont été exposées pendant 1 ou 8 mois de façon chronique *via* l'ingestion d'HTO ou de TOL (mélange de trois acides aminés tritiés : glycine, proline et alanine) dans l'eau de boisson aux activités volumiques de 10, 1  $10^3$  et 2  $10^4$  kBq/L correspondant respectivement à une exposition subchronique et chronique. Ces trois doses permettent d'étudier la valeur de l'OMS mais de couvrir également des valeurs guides existantes dans le monde. Elles ont été étudiées à la fois pour l'HTO et pour le TOL (Tableau A1.1). Au total 180 souris ont été exposées pour évaluer l'impact du tritium sur l'ADN. Les souris ont été réparties au hasard dans des groupes de traitement (10 souris par groupe) et exposées à l'âge de 8 semaines. À la fin

de l'exposition (1 ou 8 mois), les souris ont été sacrifiées par euthanasie et ponction intracardiaque. Le sang, les tissus et organes d'intérêt (rate, foie, reins, intestin, cerveau), et le reste de la carcasse (os, peau, muscles, tissu conjonctif) ont été prélevés pour être soit fixés soit congelés selon le test.

Plusieurs marqueurs des dommages à l'ADN et des effets cytogénétiques en résultant ont été étudiés :

- Les niveaux de base en termes de dommages à l'ADN ont été évalués en mesurant le nombre de foci de  $\gamma$ H2AX, marqueur classique des CDBs, dans les splénocytes en utilisant une coloration immunofluorescente et une détection par cytométrie en flux
- La capacité de réparation de l'ADN dans les splénocytes a été évaluée en exposant des cellules ex vivo à un rayonnement gamma aigu à 2Gy et en mesurant la formation de  $\gamma$ H2AX à une heure et 24 heures post-irradiation, indiquant la complétude de réparation de l'ADN.
- L'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN a été mesurée à l'aide de la technologie PCR. Au total, 84 gènes cibles, tous impliqués dans diverses voies de réparation de l'ADN, ont été mesurés pour chaque échantillon en une seule réaction par échantillon/souris.
- Les taux d'érythrocytes polychromatiques avec micronoyaux dans la moelle osseuse ont été mesurés. La moelle osseuse est l'un des tissus les plus radiosensibles en raison des processus actifs d'hématopoïèse et de lymphopoïèse. Les micronoyaux sont formés à la suite d'une rupture chromosomique ou d'une perte de chromosomes au cours de la dernière mitose des érythroblastes et sont couramment utilisées pour évaluer la génotoxicité *in vivo* (Hayashi et al., 2000).
- Les dommages cytogénétiques ont été évalués dans les lymphocytes sanguins périphériques en utilisant la technique mFISH. Cette méthode permet de détecter des aberrations chromosomiques stables, telles que des insertions et des translocations, en stimulant avec un mitogène la prolifération des lymphocytes sanguins. Les aberrations chromosomiques stables sont converties en cassures doubles brins initiales nécessaires pour les produire (Roch-Lefèvre et al., 2018).

La dose a été évaluée selon la formule suivante (Roch-Lefevre et al., 2018) :  $Xt = D \times P \times b \times E \times T$

avec Xt : dose en Gy pour la période de temps t considérée ; D : concentration en tritium dans l'eau de boisson (Bq/L) ; P : pourcentage de tritium dans les tissus relativement à sa concentration dans l'eau sur la période de temps t ; b : énergie moyenne d'une particule beta (5,7  $10^{-3}$  MeV) ; E : facteur de conversion des MeV en Joules : 1,6021  $10^{-13}$  J/MeV ; T : nombre de secondes dans la période de temps t.

**Tableau A1.1 : Doses et débits de doses pour 1 et 8 mois d'exposition (d'après Roch-Lefevre et al., 2018 ; Guéguen et al., 2018)**

Groupe	Débit de dose ( $\mu$ Gy/h)	Dose cumulée pour une exposition de 1 mois (mGy)	Dose cumulée pour une exposition de 8 mois (mGy)
Témoin	0	0	0
HTO 10 kBq/L	0,016	0,011	0,088
HTO 1 $10^3$ kBq/L	1,6	1,1	8,8
HTO 2 $10^4$ kBq/L	32,7	22,0	176
TOL 10 kBq/L	0,021	0,014	0,112
TOL 1 $10^3$ kBq/L	2,1	1,4	11,2
TOL 2 $10^4$ kBq/L	41,6	28,0	224

## ANNEXE 2 : APPROCHE EXPERIMENTALE EN RADIOTOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE (MODELE POISSON)

Les temps d'exposition choisis ont été adaptés au stade de vie étudié. Les expériences sur les stades embryo-larvaires du poisson zèbre ont été menées jusqu'à 10 jours post fécondation (jpf), tandis que les poissons tête-de-boule adultes ont été exposés pendant 2 mois, suivis d'une phase de dépuración de deux mois (Tableaux A2.1 et A2.2).

Les niveaux d'exposition adoptés pour les expériences en laboratoire sur le stade embryo-larvaire (poisson zèbre) correspondaient aux bornes du DCRL (42 - 420  $\mu\text{Gy}/\text{h}$ ) et à un débit de dose dix fois plus élevé ( $4 \cdot 10^3 \mu\text{Gy}/\text{h}$ ). Dans la gamme du DCRL, de possibles effets sont attendus sur la reproduction, alors qu'entre 0,4 et  $4 \cdot 10^3 \mu\text{Gy}/\text{h}$ , des effets sur les poissons juvéniles sont attendus. Des expériences ponctuelles ont également été réalisées avec de la thymidine tritiée. Ce nucléoside tritié, utilisé couramment pour marquer spécifiquement l'ADN, permet de cibler la dose déposée sur l'ADN.

Pour le poisson tête-de-boule au stade adulte, les poissons ont été encagés sur le terrain (Gagnaire et al., 2017), dans des sites de concentration croissante de tritium :  $1,6 \cdot 10^{-3}$ , 0,4, 1,1, 6,3 et 12,4 kBq d'HTO/L ; pour évaluer l'effet du TOL, la moitié des poissons ont été nourris avec un mélange de 3 acides aminés tritiés, lysine, leucine et arginine, incorporés à parts égales dans de l'huile puis dans de la nourriture artificielle, à un niveau permettant de reproduire la contamination des proies dans le milieu naturel (concentration de TOL correspondante :  $0,3 \cdot 10^{-4}$ ,  $1,9 \cdot 10^{-3}$ ,  $5,3 \cdot 10^{-3}$  et  $3,2 \cdot 10^{-2}$  kBq/g de nourriture). Ces 3 acides aminés font partie des acides aminés indispensables à la croissance et au métabolisme des poissons. Il est à noter que l'arginine et la lysine sont des précurseurs des histones, les protéines qui servent à compacter l'ADN, et sont donc *in fine* incorporées dans le noyau. Dans une seconde étude menée en laboratoire (Gagnaire et al., 2018), les niveaux de contamination ont été choisis pour simuler l'exposition des poissons sur différents endroits du site de Chalk River, jusqu'à un niveau d'exposition de 180 kBq/L qui est la concentration maximale observée dans la station la plus contaminée du site. Les poissons ont donc été exposés aux concentrations de 12, 25 et 180 kBq/L HTO. La contamination par la voie trophique (apport *via* l'alimentation) a été simulée par une seule concentration (25 kBq/L), où la contamination trophique a été faite de la même façon que pour l'expérimentation précédente *via* de la nourriture marquée avec 3 acides aminés tritiés, à un niveau permettant de reproduire la contamination des proies dans le milieu naturel (21 kBq/kg TOL, taux d'alimentation de 1 %).

Les débits de dose ont été déterminés en multipliant les activités en tritium dans l'eau et les tissus par un coefficient de dose, calculé à l'aide du logiciel EDEN v3. Un facteur de pondération de 3 a été appliqué pour prendre en compte l'efficacité biologique relative du rayonnement bêta, dédié à l'évaluation des risques radiologiques aux écosystèmes (Brown et al., 2008).

**Tableau A2.1 : Résumé des conditions expérimentales relatives aux expositions des poissons au tritium, sous forme d'HTO, de TOL (mélange des trois acides aminés tritiés, lysine, leucine et arginine, apportés en parts égales à un niveau permettant de reproduire la contamination des proies dans le milieu naturel (28 kBq/L TOL) ou de thymidine tritiée**

Radionucléide	Espèce	Stade/durée d'exposition	Concentration dans l'eau (kBq/L)	Débit de dose ( $\mu\text{Gy/h}$ )	Dose totale (mGy)
HTO	<i>Danio rerio</i>	1 jpf	$1,22 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^1$	2,2
HTO	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	7 jpf	$1,22 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	10 jpf	$1,22 \cdot 10^4$	$8,5 \cdot 10^1$	$2,0 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	1 jpf	$1,22 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^5$	$4,6 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	7 jpf	$1,22 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^2$	$4,7 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	10 jpf	$1,22 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^2$	$8,9 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	1 jpf	$1,22 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^3$	$9,1 \cdot 10^1$
HTO	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^2$
HTO	<i>Danio rerio</i>	7 jpf	$1,22 \cdot 10^6$	$4,7 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^2$
HTO	<i>Danio rerio</i>	10 jpf	$1,22 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^2$
Thymidine tritiée	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^1$
Thymidine tritiée	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^2$	$5,1 \cdot 10^1$
Thymidine tritiée	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^2$
Thymidine tritiée	<i>Danio rerio</i>	4 jpf	$1,22 \cdot 10^6$	$7,2 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^2$
HTO et/ou TOL	<i>Pimephales promelas</i>	60 jours (terrain)	Max 23	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$2,2 \cdot 10^{-1}$
HTO et/ou TOL	<i>Pimephales promelas</i>	60 jours (labo)	Max 180	$6,5 \cdot 10^{-1}$	$9,4 \cdot 10^{-1}$

**Tableau A2.2 : Débits de dose moyens ( $\mu\text{Gy/h}$ ) calculés chez les stades embryon larvaires de poisson zèbre exposés à de l'HTO jusqu'à 10 jpf (Gagnaire et al., 2019)**

Radionucléide	Concentration dans l'eau (kBq/L)	Débit de dose ( $\mu\text{Gy/h}$ )
HTO	$1,22 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^2 \pm 5,2 \cdot 10^1$
HTO	$1,22 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^2 \pm 1,1 \cdot 10^1$
HTO	$1,22 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^3 \pm 8,5 \cdot 10^2$

### **ANNEXE 3 : ETUDE EXPERIMENTALE DE CNL SUR LE RISQUE DE CANCER ASSOCIE AU TRITIUM (MODELE RONGEUR)**

Dans le cadre du programme de recherche mis en place par l'IRSN et CNL, un axe de recherche était consacré à l'étude de l'effet relatif du HTO dans l'eau de boisson et du rayonnement gamma externe sur la durée de vie et la survenue de cancers chez les souris. Cette tâche, dénommée "étude vie entière", a été mise en place et réalisée par CNL sans la participation directe de l'IRSN, car les études liées au cancer ne faisaient pas partie des sujets prioritaires de recherche de l'IRSN à l'époque. Cette étude a été soutenue par CNL, la CNSC et le COG, les principales parties prenantes et les organismes de réglementation des questions liées aux effets des rayonnements sur la santé au Canada. Comme cette étude était conduite de façon indépendante du reste des tâches de la collaboration IRSN-CNL, la conception expérimentale présentait quelques différences. En particulier, des concentrations plus élevées de HTO ont été utilisées –  $1,5 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $1,2 \cdot 10^6$  et  $3,0 \cdot 10^6$  kBq/L - administrées dans l'eau de boisson pendant une période de 14 jours. Pour des raisons de puissance statistique, 300 animaux par groupe de traitement et 600 animaux dans le groupe de contrôle ont été utilisés. En raison de problèmes logistiques et d'une charge de travail importante associée à un si grand nombre de souris, l'étude a été initialement limitée à la contamination par HTO. Quelques années après le début de l'étude, deux groupes de contamination par TOL ( $1,5 \cdot 10^5$  et  $1,2 \cdot 10^6$  kBq/L) ont été ajoutés. En parallèle, des irradiations gamma externes ont été réalisées avec des doses cumulées identiques à celles obtenues avec le tritium (sur 14 jours, doses de 66, 221, 530 et 1326 mGy). Une fois l'exposition terminée, les souris ont été suivies dans des conditions normales, sous le contrôle régulier d'un zootechnicien et d'un vétérinaire qualifiés, jusqu'à l'apparition d'un état de santé incompatible avec la vie (suivi « vie entière »). Les souris ont alors été soumises à une euthanasie, à une analyse post-mortem et tous les tissus ont été préparés pour une analyse histopathologique effectuée en aveugle de l'exposition. Actuellement, la grande majorité des souris ont été euthanasiées et l'histopathologie a été réalisée. Le suivi des groupes exposés au TOL est en cours. Un résumé des résultats préliminaires est présenté ci-dessous.

La durée de vie des souris exposées à l'HTO n'a pas été affectée par l'exposition au tritium aux concentrations  $1,5 \cdot 10^5$  et  $5 \cdot 10^5$  kBq/L. Seules les expositions à  $1,2 \cdot 10^6$  et  $3,0 \cdot 10^6$  kBq/L de HTO ont réduit de manière significative la durée de vie moyenne. L'exposition au rayonnement gamma à des doses cumulées de 66, 221 et 530 mGy n'a pas réduit la durée de vie. Les doses équivalentes délivrées par l'HTO à la concentration de  $1,2 \cdot 10^6$  kBq/L et par le rayonnement gamma externe à une dose de 1326 mGy ont entraîné une réduction statistiquement significative de la durée de vie, la réduction observée avec l'HTO étant plus marquée que celle observée avec le rayonnement gamma. Par ailleurs, pour une même dose, l'augmentation du nombre des tumeurs par souris était plus élevée avec l'HTO qu'avec le rayonnement gamma externe. Cependant, le nombre des tumeurs par souris dans le groupe exposé à la concentration de  $1,5 \cdot 10^5$  kBq/L d'HTO n'était pas statistiquement augmentée par rapport au groupe contrôle non-irradié. Bien que les résultats concernant le TOL soient encore incomplets, les observations préliminaires disponibles suggèrent, à dose équivalente, que la réduction de la durée de vie serait plus forte dans les groupes exposés au TOL que dans ceux exposés à l'HTO. Les résultats du TOL sur le nombre des tumeurs par souris ne sont actuellement pas disponibles. Les résultats disponibles sont globalement cohérents avec ceux des autres axes du programme de recherche collaboratif IRSN-CNL, qui indiquent généralement des effets biologiques plus importants avec le TOL qu'avec l'HTO. Par ailleurs, on peut noter qu'ils ne conduisent pas à observer une réduction de la durée de vie ni une augmentation du nombre des tumeurs par souris pour des concentrations d'HTO inférieures à  $5 \cdot 10^5$  kBq/L.

**IRSN**  
**Pôle Santé Environnement**

**E-mail**  
contact@irsn.fr

**N° du rapport**  
Rapport IRSN 2021-00206  
Tous droits réservés IRSN  
Avril 2021

**Crédits photos :**  
Photos de couverture : C Bodiou, M Floriani, A Starrlight, O Seignette / M Lafontan  
Figure 13 : M Floriani



31, avenue de la division Leclerc  
92260 Fontenay-aux-Roses  
RCS Nanterre B 440 546 018

**COURRIER**

B.P 17  
92260 Fontenay-aux-Roses Cedex

**TÉLÉPHONE**

+33 (0)1 58 35 88 88

**SITE INTERNET**

[www.irsn.fr](http://www.irsn.fr)

**Email**

[contact@irsn.fr](mailto:contact@irsn.fr)

 [@IRSNFrance](https://twitter.com/IRSNFrance)