

UNIVERSITE DE PROVENCE
AIX MARSEILLE 1

Thèse

Présentée à l'Université d'Aix-Marseille 1
Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Provence
Mention Sciences,

Ecole Doctorale : Sciences De L'environnement

Spécialité : **Biosciences de l'Environnement, Chimie, et Santé.**

**TRANSFERT RACINAIRE DE L'URANIUM (VI) EN
SOLUTION CHEZ UNE PLANTE SUPERIEURE :**

SPECIATION EN SOLUTION HYDROPONIQUE, PRISE EN
CHARGE PAR LA PLANTE, MICROLOCALISATION ET EFFETS
BIOLOGIQUES INDUITS

Par

LAROCHE Laëticia

Soutenue le 21 janvier 2005 devant le jury d'examen composé de :

Professeur Catherine MASSIANI, Université d'Aix-Marseille I.

Dr Yves THIRY, chercheur au SCK-CEN de Mol (Belgique).

Professeur Martine POTIN-GAUTIER, Université de Pau.

Dr Jean-Luc Montillet, HDR, chercheur CEA, Cadarache.

Dr Pascale HENNER, IRSN Cadarache, Encadrant IRSN.

Dr J. GARNIER-LAPLACE, H.D.R., IRSN Cadarache, Directrice de Thèse.

*Tant qu'elle n'est pas concrétisée, une idée de génie n'a AUCUNE valeur.
Pensez moins, agissez !*

Remerciements

A l'issue de ce travail de 3 années au sein de l'IRSN (Centre d'Etude Nucléaire de Cadarache), encore IPSN à mon arrivée, supporté financièrement aussi par la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, je tiens à remercier les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail et surtout qui m'ont soutenues.

Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur Jean Christophe Gariel (Chef de Service du SECRE, Service d'Etude sur le Comportement des Radionucléides dans les Ecosystèmes) qui m'a accueillie au sein d'un de ses Laboratoires et plus particulièrement ma directrice de thèse, le Docteur Jacqueline Garnier-Laplace (Chef du Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie) pour m'avoir guidée dans ce travail et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de cette recherche.

Je tiens également à remercier Claude Colle, Frank Denison, Rodolphe Gilbin et Pascale Henner pour leurs conseils avisés et leurs réflexions sur les questions que je me posais.

Ce travail n'aurait, par ailleurs, pas été possible sans la contribution de tout le pôle analytique. Mes remerciements les plus conséquents et reconnaissants dans ce sens vont à Virginie Camilleri, qui sous le flot parfois conséquent d'échantillons n'a jamais perdu son sourire (enfin presque !) et sa gentillesse, et a réussi à faire tenir sa barque sur ce flot, sans jamais être débordée par la vague. Qu'elle soit grandement remerciée pour sa rapidité, son efficacité et la rigueur de son travail. Je tiens également à remercier Marcel Morello (pour ses dosages en scintillation liquide) et Daniel Orjollet (dont la patience pour utiliser certains appareils récalcitrants dans leur fonctionnement a été mise à rude épreuve. Désolée d'avoir grillé tes derniers neurones... ah il paraît qu'il lui en reste encore un peu, c'est pas perdu pour les autres thésards ;-)).

Enfin, je tiens à remercier Gaëla Grasset pour son superbe travail au MET, qui peut maintenant se venter de connaître la face profonde des végétaux !

Je souhaite également remercier Simone Turina, pour sa gentillesse et sa rapidité pour me fournir parfois dans l'urgence mes articles de bibliographie.

Quant à la bonne ambiance du Laboratoire (qui va me manquer), je tiens à remercier tout le monde : les thésards (ils passent d'abord, solidarité oblige !) : les anciens : Thomas et Frank et ceux encore présents : Hélène, Elodie, avec les petits derniers, que j'ai côtoyé, et qui ont encore du pain sur la planche : Sabrina et Christophe ! Je leur souhaite bon courage ! ; ceux en poste ou post-doc (ils se reconnaîtront, la liste étant longue), les stagiaires dont 2 en particulier : Laëtitia et Névéna, et enfin les SPR, pour leur joie de vivre.

Je n'oublie en aucun cas ma petite Cloclo, qui a été, et est toujours, aux petits soins pour nous comme une vraie maman. Que ta bonne humeur, ta joie de vivre et ta gentillesse soient remerciées Claudine.

Enfin, le plus important pour la fin. Je tiens tout d'abord à remercier mes parents, pour m'avoir permis d'en arriver là, sans jamais me contraindre dans mes choix et en faisant tout pour m'aider à y parvenir. Qu'ils soient remerciés pour leur soutien et je sais qu'ils sont fiers de moi.

Une chose particulièrement importante, c'est qu'en arrivant dans cette belle région, je ne pensais pas me faire de si bons amis et même de Grands Amis dont 2 particulièrement au Labo : Brigitte Ksas et Thierry Bonhomme, mes deux grands grands (vous ne voyez pas double, je l'ai bien écrit 2 fois) amis, sans qui je n'aurai pas fini ce travail de thèse. Je les remercie de m'avoir autant soutenu dans tous les mauvais moments, moments de doute et de grande peine (heureusement il y a eu de très bons moments et de franches parties de grande rigolade). Je les remercie d'avoir tant pris sur eux et de m'avoir aidée à remonter la pente et atteindre le sommet pour ne plus le quitter.

En ce sens, je remercie aussi les autres personnes du Labo qui m'ont beaucoup soutenues : Astrid, Frank, Hélène, Daniel et surtout Chantal. Merci à vous pour votre écoute et tous vos efforts pour me soutenir et me remonter le moral, ce qui n'a pas toujours été facile, je le conçois.

Je veux aussi remercier les quelques Grands Amis que j'ai aussi à l'extérieur : Vincent (Orangina pour les intimes), Cécile (encore dans la grisaille du 93), Leila, Valéry , Philippe, Névéna et les autres personnes qui m'ont beaucoup soutenues : Dominique et Brigitte, Jacqueline Vabre, Jean-Louis et Jérôme.

J'ai lu un jour, dans un de ces nombreux mails de pensées que l'on reçoit, une phrase qui m'a beaucoup touchée et qui s'applique bien au rôle que vous avez tous tenus : « Les amis sont comme des anges qui nous remettent en position

quand nos ailes ne se souviennent plus comment voler ». Vous êtes tous mes petits anges (surtout Brigitte, Thierry et Orangina), et vous m'avez permis de redéployer mes ailes froissées pour pouvoir m'élever à nouveau et connaître d'autres horizons plus heureux. Merci à vous, vous êtes dans mon cœur et je ne l'oublierai jamais.

Et le meilleur (enfin pour moi) pour la fin : je tiens ici à remercier Gilles (merci aussi aux belles plages de Cassis pour cela et les glaces OK...) sans qui c'est certain, dans les 3 derniers mois, je n'aurais pas fini ma rédaction. Merci de m'avoir redonné de la confiance en moi, de m'avoir élevée et soutenue, de m'avoir tant apporté et bien plus que tu ne crois ou n'imagines ; et j'adhère pour des dizaines et des dizaines d'années... !

Je souhaite donc dédier ce travail à ma famille mais aussi à Gilles et à mes amis Brigitte, Thierry et Vincent Orangina.

RESUME

L'uranium est un élément naturel trace dans l'environnement. Dans la solution du sol et en condition oxydante, il est présent à l'état d'oxydation +VI et peut former un grand nombre de complexes inorganiques ou organiques.

En première approche, un ensemble d'expériences ont été mises en place de manière à appréhender les espèces d'uranium biodisponibles pour les racines des plantes. Le milieu d'exposition choisi, la solution nutritive, a été établie de manière à contrôler la spéciation de l'uranium en solution. Dans ce sens, le modèle de spéciation géochimique JCHESS a été utilisé pour déterminer les formes d'uranium en solution en fonction du pH et a permis de définir 3 domaines de pH pour lesquels une espèce dominait : le pH 4,9 avec l'ion uranyle, le pH 5,8 avec les hydroxocomplexes et le pH 7 avec les hydroxocomplexes carbonatés. Pour ces 3 pH, des expériences d'exposition ont été menées à court terme (5 heures) sur notre modèle biologique *Phaseolus vulgaris*. L'effet de cations compétiteurs (Ca^{2+}) et de ligands (phosphates et citrate) sur l'efficacité de la prise en charge de l'uranium par la racine a ainsi été testé. Les résultats ont montré que le transfert d'uranium n'était pas affecté par les cations Ca^{2+} , les phosphates ou le citrate (sauf une diminution de 60 % à pH 5,8 avec 10 μM de citrate) dans nos conditions expérimentales.

Par ailleurs, les observations microscopiques (MET-EDAX) ont révélé l'association de l'uranium avec des granules riches en phosphore dans les cellules et la présence d'anomalies des chloroplastes. Enfin, la présence d'uranium affecte la CEC racinaire en la réduisant et provoque une stimulation de l'élongation racinaire à faible concentration (100 nM, 400 nM et 2 μM aux pH 4,9, 5,8 et 7 respectivement) et une inhibition à plus forte concentration.

Mots clés : uranium, spéciation, transfert, modèle

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Spécialité : Biosciences de l'environnement, Chimie et Santé.

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Département Environnement et Intervention (DEI)

Service d'Etude sur le Comportement des Radionucléides dans les Ecosystèmes (SECRE)

Laboratoire de Radioécologie et d'Ecotoxicologie (LRE)

Centre de Cadarache, Bât 186 – BP 3

13 115 Saint - Paul - Lez - Durance cedex

Root uptake of uranium by a higher plant – Bioavailability, microlocalisation and biological effects induced

ABSTRACT

Uranium exists naturally in the environment, usually present in trace quantities. In soil solution and oxic conditions, uranium is present in the +VI oxidation state and forms a large number of inorganic and organic complexes. The exposure medium, an artificial soil solution, was designed in such a way as to control the uranium species in solution. The geochemical speciation code JCHESS was used to calculate the uranium aqueous species concentrations and to define three domains of interest, each of them characterized by a limited number of dominant U species. These domains were defined as follows: pH 4.9 with uranyl ions as dominant species, pH 5.8 with hydroxyl complexes and pH 7 where carbonates play a major role. For each pH, short-duration (5 hours of exposure) well-defined laboratory experiments were carried out with *Phaseolus vulgaris* as plant model. The effect of competitive ions such as Ca^{2+} or the presence of ligands such as phosphate or citrate on root assimilation efficiency was explored. Results have shown that uranium transfer was not affected by the presence of calcium, phosphate or citrate (but was decreased of 60 % with citrate (10 μM) at pH 5.8) in our experimental conditions.

Moreover, observations in Transmission Electronic Microscopy (TEM), equipped with an EDAX probe, have shown that uranium was associated with granules rich in phosphorus and that there were some chloroplastic anomalies. Finally, the presence of uranium affects root CEC by reducing it and stimulates root elongation at low uranium concentrations (100 nM, 400 nM and 2 μM at pHs 4.9, 5.8 et 7 respectively) and inhibits it at high uranium concentrations.

Keywords : uranium, speciation, transfer, model

Table des matières

Remerciements	I
Resumé	V
Abstract	VI
Table des matières	VII
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XV
Liste des planches	XVIII
Liste des annexes	XVIII
Liste des abréviations	XIX
Glossaire	XX
Introduction générale	XXIII
Objectif général et articulation du mémoire	XXV
<u>Chapitre 1</u>	
Revue bibliographique et stratégie expérimentale retenue.....	1
Spéciation, biodisponibilité et toxicité de l'uranium dans un système sol – plante	1
1.1. Généralités sur les sols	1
1.2. Voie de contamination des végétaux par les racines et entrée des polluants dans les chaînes alimentaires	4
1.2.1. Morphologie du système racinaire et capacité d'absorption des éléments nutritifs.....	4
1.2.2. Absorption racinaire et solution du sol	5
1.2.2.1. <i>Micro-environnement rhizosphérique</i>	5
1.2.2.2. <i>Absorption racinaire</i>	6
1.2.3. Transport des éléments dans la plante.....	8
1.2.3.1. <i>Flux de sèves</i>	8
1.2.3.2. <i>Mécanismes d'exsudation</i>	10
1.2.4. Conclusion : facteurs contrôlant l'absorption d'éléments nutritifs et de métaux traces	10

Table des matières

1.3. Comportement de l'uranium dans les sols.....	12
1.3.1. Origine et teneur en uranium dans les sols et dans les roches.....	12
1.3.2. Mobilité de l'uranium dans les sols	14
1.3.3. Caractérisation du transfert sol – plante	16
1.4. Spéciation de l'uranium dans les sols	21
1.4.1. Evaluation de l'aptitude d'un sol à fixer l'uranium	21
1.4.1.1. Coefficient de distribution (<i>K_d</i>).....	21
1.4.1.2. Spéciation chimique.....	22
1.4.2. Effet des constituants physiques du sol (spéciation physique).....	23
1.4.2.1. Relations avec les complexants organiques.....	24
1.4.2.2. Relations avec les oxydes et hydroxydes de fer et d'aluminium.....	25
1.4.2.3. Relations avec les argiles.....	25
1.4.2.4. Relations avec les carbonates.....	25
1.4.3. Effet des micro-organismes du sol.....	26
1.4.4. Spéciation de l'uranium en solution	26
1.5. L'uranium dans les végétaux.....	28
1.5.1. Facteurs influençant l'absorption d'uranium	28
1.5.1.1. Facteurs environnementaux	28
1.5.1.2. Facteurs physiologiques.....	29
1.5.2. Teneur en uranium dans les végétaux.....	31
1.5.3. Flux d'uranium dans les végétaux	34
1.5.4. Spéciation et localisation de l'uranium dans les végétaux.....	35
1.6. Théorie de la biodisponibilité des métaux.....	39
1.6.1. Notion de biodisponibilité.....	39
1.6.2. Modèles de l'ion libre (FIAM) et du ligand biotique (BLM)	39
1.6.3. Application à l'uranium.....	42
1.6.3.1. Effet des ions complexants.....	42
1.6.3.2. Effet des ions compétiteurs	48
1.7. Toxicité de l'uranium chez les végétaux.....	51
1.7.1. Effet stimulant des faibles teneurs en uranium	51
1.7.2. Toxicité de l'uranium : test d'élongation racinaire	54
1.7.3. Autres effets toxiques de l'uranium sur les végétaux.....	56
1.8. Conclusions sur l'état de l'art et questions restant posées	60
1.8.1. Conclusions	60
1.8.2. Questions restant posées	62
1.9. Démarche expérimentale entreprise.....	63
1.9.1. Choix stratégiques.....	63
1.9.1.1. Choix du radionucléide	63
1.9.1.2. Choix du modèle biologique	64
1.9.1.3. Milieu de culture.....	64
1.9.2. Relation uranium - végétal.....	65
1.9.2.1. Etudes préliminaires	65
1.9.2.2. Etude du lien spéciation U(VI) - transfert.....	66
1.9.3. Microlocalisation de l'uranium et effets biologiques induits.....	66
1.9.3.1. Microlocalisation dans les organes.....	66
1.9.3.2. Effets biologiques induits.....	67

Chapitre 2

Materiels et methodes	69
2.1. Choix du modèle biologique végétal.....	69
2.2. Choix du type de milieu de culture	70
2.2.1. Composition de la solution nutritive	71
2.2.2. Spéciation de l'uranium dans la solution nutritive	73
2.3. Conditions de culture des plantes	74
2.4. Etude de la relation spéciation de l'uranium (VI) et transfert dans le végétal.....	76
2.4.1. Dispositifs expérimentaux	77
2.4.2. Protocoles expérimentaux détaillés des expériences spéciation U (VI) - transfert.....	85
2.4.3. Caractérisation du transfert : Facteurs de Transfert	91
2.5. Test de toxicité : effet de l'uranium sur l'élongation racinaire	92
2.6. Effet de l'uranium sur la Capacité d'Echange Cationique des racines (CECR)	93
2.7. Détermination de la localisation cellulaire de l'uranium : Microscopie Electronique à Transmission	96
2.8. Préparations des échantillons et mesures analytiques	99
2.8.1. Quantification de la teneur en uranium dans les végétaux	99
2.8.2. Caractérisations physico-chimiques	100
2.9. Analyse statistique	101
2.9.1. Validité des données	101
2.9.2. Expression de la toxicité	101

Chapitre 3

Relation entre le transfert d'uranium à la plante et sa spéciation dans le milieu d'exposition.....	103
---	-----

3.1. Expériences préliminaires	103
3.1.1. Cinétique de transfert sur l'organisme entier (stade floraison).....	104
3.1.2. Influence du stade de développement	109
3.1.3. Conclusions générales	113
3.2. Etude des interactions U (VI) – racine chez <i>P. vulgaris</i> – Flux de prise en charge à court terme, en fonction de la spéciation de l'uranium en solution.....	114
3.2.1. Cinétique de prise en charge aux 3 pH (à court terme)	114
3.2.2. Effet de la concentration en uranium dans la solution d'exposition et effet du pH. ...	120
3.2.3. Estimation des flux de prise en charge maximaux au pH 4,9 – Influence de l'âge des racines.....	125
3.2.4. Effet des ions H ⁺ (pH).....	130
3.2.5. Effet des cations compétiteurs : Ca ²⁺	131
3.2.6. Effet de la complexation par les phosphates	135
3.2.6.1. Effet des phosphates sur la spéciation	135
3.2.6.2. Effet des phosphates sur la prise en charge de l'uranium par la racine.....	137
3.2.7. Effet de la complexation par un ligand organique : le citrate.	140
3.2.7.1. Effet du citrate de sodium sur la spéciation	140

3.2.7.2. Effet du citrate sur le transfert.....	143
3.3. Synthèse des résultats expérimentaux et discussion.....	148

Chapitre 4

Microlocalisation de l'uranium et effets biologiques induits - Résultats et discussion.....	155
---	-----

4.1. Microlocalisation de l'uranium dans les organes du haricot.....	155
4.1.1. Localisation dans la racine	155
4.1.2. Localisation dans les parties aériennes	158
4.2. Effets biologiques induits suite à l'exposition à l'uranium.....	159
4.2.1. Effet cellulaire	159
4.2.2. Influence de l'uranium sur la Capacité d'Echange Cationique Racinaire (CECR) ...	162
4.2.3. Influence de l'uranium sur l'élongation racinaire	164
4.2.3.1. Elongation racinaire	164
4.2.3.2. Détermination de la CE_{50}	171
4.3. Résumé des principaux résultats et discussion	173

Chapitre 5

Synthèse des résultats et perspectives de recherche.....	177
--	-----

Annexes.....	181
---------------------	------------

Bibliographie.....	191
---------------------------	------------

Liste des figures

- Figure 1.** Interaction racine – solution du sol : mouvements d'eau et d'ions. Le « mass flow » est le flux d'eau dû à l'absorption par la plante et la « diffusion d'eau », le flux d'eau dû au gradient de concentrations créé par la racine qui absorbe les ions dans son voisinage proche. 7
- Figure 2.** Trajet radial de l'eau et des solutés de la surface de la racine aux vaisseaux de xylème *via* la voie symplasmique figurée en rouge (passage au travers de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme puis de cellules à cellules par des pores de la paroi pecto-cellulosique, les plasmodesmes) ou la voie apoplasmique figurée en bleu (passage dans les parois pecto-cellulosiques et les espaces intercellulaires (Touraine, 2000))...... 9
- Figure 3.** Trajet des sèves brutes et élaborées au travers des plantes (d'après Delrot, 2000). 9
- Figure 4.** Principaux facteurs contrôlant l'absorption d'un métal dans un système sol-plante (d'après Lombi *et al.*, 2001). 11
- Figure 5.** Fraction d'uranium sorbé sur un sol sableux en fonction de la concentration en ions carbonates (solution de carbonate de potassium) dans la solution pour une concentration en U (nitrate d'uranyle) de 50 µg/mL (de Yamamoto *et al.*, 1973). 15
- Figure 6.** Effet du type d'amendement du sol sur la solubilité de l'uranium dans un sol de pH 6,8 provenant d'un site contaminé près d'Ashtabulah (d'après Ebbs *et al.*, 1998). 16
- Figure 7.** Diagramme Eh – pH simplifié de l'uranium pour une activité en $[UO_2]_T$ de 10^{-6} M à 25°C, en milieu fermé. Les domaines des états de valence des espèces sont caractérisés en rouge pour la forme U(VI), en jaune pour la forme U(IV) et en bleu pour la forme U(III) (Modélisation JCHESS), la zone Eh (-300 mV - +600 mV) – pH (5 – 9) des sols étant figurée par le rectangle noir. 24
- Figure 8.** Concentration en uranium dans les branches d'épicéas en fonction de leur âge (de Dunn, 1981). 35
- Figure 9.** Schéma de migration et d'évolution d'un radionucléide présent dans un sol jusqu'à la plante. 38
- Figure 10.** Processus impliqués dans la bioaccumulation de l'uranium par les organismes. 41
- Figure 11.** Courbe de dose-réponse la plus commune montrant le phénomène d'hormesis, la courbe-β. 53
- Figure 12.** Diagramme simplifié de spéciation de l'uranium dans la solution nutritive de travail, $[U] = 500$ nM, sans phosphates, en équilibre avec l'atmosphère. La gamme

de pH tolérés par <i>Phaseolus vulgaris</i> et le domaine de l'optimum de croissance sont également représentés.....	73
Figure 13. Schéma général des différentes phases de culture (germination, croissance et acclimatation) avant exposition à l'uranium des végétaux.	75
Figure 14. Schéma général des divers prélèvements destinés à la détermination de la concentration en uranium dans la solution nutritive.	77
Figure 15. Dispositif expérimental, en circuit ouvert, utilisé pour les expériences préliminaires d'étude du transfert solution contaminée – plante, durée d'exposition de 6 jours.	79
Figure 16. Dispositif expérimental, en circuit fermé, utilisé pour les expériences spéciation (VI) – transfert focalisées sur la racine, exposition dur quelques heures.	81
Figure 17. Dispositif expérimental, en circuit ouvert, utilisé pour les expériences d'étude des mécanismes d'interaction avec la paroi à court terme.	84
Figure 18. Evolution de l'indice de saturation à pH 7,0 en fonction de la concentration en phosphates dans le milieu, $[U_T] = 300$ nM.	88
Figure 19. Programme de calcination par paliers (200 et 550 °C), dans un four ventilé pour des échantillons végétaux.....	99
Figure 20. Quantité moyenne en uranium dans les plantes entières (chaque point représentant la somme des 4 réplicats, en μ mole) aux pH 4,9 et 5,8 et évolution en parallèle de sa quantité dans le milieu d'exposition (moyenne de 3 prélèvements, en μ mole).....	105
Figure 21. Teneur en uranium dans les feuilles du haricot en fonction du temps d'exposition, aux pH 4,9 et 5,8 ($P < 0,05$).....	109
Figure 22. Teneur en uranium dans les organes de <i>Phaseolus vulgaris</i> en fonction du pH et du stade de développement.....	112
Figure 23. Facteurs de Transfert racinaire pour deux stades de développement du haricot en fonction du pH ; t = 3 jours.	113
Figure 24. A. Evolution de la teneur en uranium dans les racines de <i>P. vulgaris</i> et B. des flux d'uranium à la racine en fonction du temps de contamination et du pH, $[U_T] = 600$ nM (nominale en solution).	117
Figure 25. Facteurs de Transfert racinaires moyens, calculés à partir des cinétiques, sur une période de 9 heures d'exposition, en fonction du pH	119
Figure 26. Relation entre la concentration en uranium dans les racines de <i>P. vulgaris</i> (moyenne sur 4 réplicats) et la concentration en uranium total dans la solution nutritive en fonction du pH (t = 5 heures d'exposition).	121
Figure 27. Relation entre la concentration en uranium dans les racines de <i>P. vulgaris</i> et la concentration en uranium total dans la solution nutritive au pH 4,9 (t = 5 heures d'exposition).....	121
Figure 28. Relation entre les Flux d'uranium à la racine (μ molU/gMS/h) moyens et la concentration en uranium (μ mol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH. ...	122
Figure 29. Relation entre les Flux d'uranium à la racine (μ molU/gMS/h) moyens et la concentration en ions uranyles (μ mol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH.	122

- Figure 30.** Evolution au cours du temps de la concentration en uranium en solution ($\mu\text{molU/L}$), dans le bac nourrice, le bac contenant les plantes et le bac de sortie (trop plein des plantes), $t = 5$ heures d'exposition. 127
- Figure 31.** Teneur en uranium (μmol) dans les parties jeunes (couleur claire) et les parties anciennes des racines des 4 réplicats de *P. vulgaris*, (milieu ouvert, $[\text{U}_T] = 19,7 \mu\text{M}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition, $\text{pH} = 4,9$). 129
- Figure 32.** Teneur en uranium ($\mu\text{mol/gMS}$) dans les parties jeunes (couleur claire) et les parties anciennes des racines des 4 réplicats de *P. vulgaris*, en rapport avec la masse de matière sèche qu'elles représentent (milieu ouvert, $[\text{U}_T] = 19,7 \mu\text{M}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition, $\text{pH} = 4,9$)..... 129
- Figure 33.** Facteurs de Transfert racinaires moyens, calculés à partir de gammes croissantes en uranium, en fonction du pH. 131
- Figure 34.** Relation entre les Flux d'uranium à la racine ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moyens et la concentration en calcium (mmol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition)..... 134
- Figure 35.** Relation entre les Facteurs de Transfert racinaires moyens et la concentration en ions uranyles dans la solution nutritive, en fonction de la concentration en calcium dans le milieu et du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition). 134
- Figure 36.** Spéciation de l'uranium en solution en fonction de la teneur en phosphates et du pH, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$ 136
- Figure 37.** Relation entre les Flux d'uranium à la racine ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moyens et la concentration en phosphates ($\mu\text{mol/L}$) dans la solution nutritive, en fonction du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition). 139
- Figure 38.** Relation entre les Facteurs de Transfert racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$) et la concentration en ions uranyles ($\mu\text{mol/L}$) dans la solution nutritive, en fonction de la concentration en phosphates dans le milieu et du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition). 139
- Figure 39.** Relation entre la concentration en ions uranyles (mol/L) et la concentration en citrate de sodium (mol/L) dans la solution nutritive aux pH 4,9 ; 5,8 et 7, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, modélisation JCHESS. 141
- Figure 40.** Spéciation de l'uranium en solution en fonction de la concentration en citrate et du pH, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$ 144
- Figure 41.** Relation entre les Flux d'uranium à la racine ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moyens et la concentration en citrate ($\mu\text{mol/L}$) dans la solution nutritive, en fonction du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition). 147
- Figure 42.** Relation entre les Facteurs de Transfert racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$) et la concentration en ions uranyles ($\mu\text{mol/L}$) dans la solution nutritive, en fonction de la concentration en citrate dans le milieu et du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition)..... 147
- Figure 43.** Comparaison des FT racinaires pour chacun des « témoins » des expériences avec ajout de phosphates, de calcium ou de citrate aux 3 pHs d'étude. 150

Figure 44. Localisation de l'uranium dans les cellules de la racine (partie jeune) de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A. vacuole et B. cytoplasme) et diagramme des éléments qui lui sont associés dans ces granules, après contamination au nitrate d'uranyle (4,5 µM ; pH 4,9 ; t = 48h).....	157
Figure 45. Localisation de l'uranium dans la vacuole des cellules corticales de la tige de <i>Phaseolus vulgaris</i> et diagramme des éléments qui lui sont associés dans ces granules, après contamination au nitrate d'uranyle ([U _T] = 4,5 µM ; pH 4,9 ; t = 48h).	159
Figure 46. Chloroplastes des cellules corticales de la tige chez les plantes exposées à l'uranium (48h ; pH 4,9 ; 4,5 µM d'uranium).	160
Figure 47. Chloroplastes des cellules corticales de la tige chez les plantes témoins non exposées à l'uranium (48h ; pH 4,9).	161
Figure 48. Influence de la présence d'uranium dans le milieu d'exposition sur l'élongation racinaire des graines germées de <i>P. vulgaris</i> , en fonction du temps d'exposition et du pH du milieu.	168
Figure 49. Influence de la présence d'ions uranyles dans le milieu d'exposition sur l'élongation racinaire des graines germées de <i>P. vulgaris</i> , en fonction du temps d'exposition et du pH du milieu.	169
Figure 50. Détermination de la CE ₅₀ à l'aide de la macro REGTOX et utilisation du modèle de Hill aux pH 4,9, 5,8 (exploitation de la partie monotone de la courbe). .	172
Figure 51. A. Photographie de cellules de feuilles de <i>P. vulgaris</i> , exposés à une solution de sulfate de zinc, montrant les granules denses d'environ 1 µm de diamètre près de la membrane et dans les chloroplastes (observations au MET). B. Spectre des éléments contenus dans ces granules denses (d'après Sarret <i>et al.</i> , 2001).	174
Figure 52. Evolution au cours du temps (24h et 72h) du % d'élongation racinaire en fonction du pH du milieu d'exposition.	176

Liste des tableaux

Tableau 1. Période radioactive et activité spécifique des principaux isotopes de l'uranium	12
Tableau 2. Concentrations des éléments radioactifs naturels dans différents types de roches (Paulin, 1997).	13
Tableau 3. Facteurs de Transfert sol-plante ($Bq.kg^{-1}MS/ Bq.kg^{-1}_{sol\ sec}$) pour différentes catégories de végétaux pour une valeur standard de $5\ \mu gU/gsol$ (d'après Sheppard et Evenden, 1988).	18
Tableau 4. Facteurs de Transfert sol-plante ($Bq.kg^{-1}MS/ Bq.kg^{-1}_{sol\ sec}$) pour différents types de végétaux (d'après AIEA, 1994).	19
Tableau 5. Quelques valeurs de K_d de l'uranium dans un système sols agricoles – solution du sol (L/kg) (d'après AIEA, 1994).	22
Tableau 6. Capacité d'Echange Cationique Racinaire (CECR) de différents segments de racines chez des clones de plants de thé de 7 mois (moyenne de 4 réplicats) (d'après Chamuah et Dey, 1982).	31
Tableau 7. Teneurs en Uranium (ppm) relevées dans des sols et dans les différentes parties des plantes considérées qui ont poussé sur ces sols (d'après Choudhury et Goswami, 1990).	33
Tableau 8. Rendement du blé et des plants de tomates (g/pot) pour différentes teneurs en uranium appliquées et sous différents niveaux d'irrigation (d'après Gulati <i>et al.</i> , 1980).	52
Tableau 9. Composition chimique de la solution nutritive modélisée et utilisée pour les contaminations, en équilibre avec l'atmosphère ($CO_2(g) = 3,2.10^{-4}$). La solution de départ (Johnson modifiée), base pour la modélisation, est donnée pour référence, tout comme la solution de Hoagland.	72
Tableau 10. Caractéristiques générales de la vermiculite.	74
Tableau 11. Synthèse des différentes conditions testées pour l'étude de la relation spéciation U (VI) - transfert.	90
Tableau 12. Proportion et concentration en uranium dans chaque organe de <i>Phaseolus vulgaris</i> au pH 4,9 et au stade floraison, en fonction du temps d'exposition, le bruit de fond en uranium pour les plantes non contaminées étant nul. $[U_T]$ représente la concentration en U total dans la solution (en nM), ($P < 0,05$). La masse des organes étant donnée en annexe 2.	107
Tableau 13. Proportion et concentration en uranium dans chaque organe de <i>Phaseolus vulgaris</i> au pH 5,8 et au stade floraison, en fonction du temps d'exposition, le bruit de fond en uranium pour les plantes non contaminées étant nul. $[U_T]$ représente la	

concentration en U total dans la solution (en nM). La masse des organes étant donnée en annexe 2.....	107
Tableau 14. Teneur en uranium total dans les organes de <i>P. vulgaris</i> pour divers pH du milieu d'exposition, aux stades plantule et floraison après 3 jours d'exposition ($[U_T] = 250$ nM). Les biomasses sèches des racines étant données en annexe 3.	111
Tableau 15. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin, <i>i.e.</i> au temps de prélèvements des plantes) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de <i>P. vulgaris</i> , Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{MU}$) et Flux normalisés ($\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après un temps d'exposition variable, $[U_T] = 600$ nM, (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 4.....	116
Tableau 16. Facteurs de transfert racinaires de l'uranium calculés en fonction du pH et du temps d'exposition, $n = 4$	119
Tableau 17. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de <i>P. vulgaris</i> , Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et Flux normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après une exposition de 5 h, pour une gamme croissante en uranium ($\mu\text{mol/L}$), (le terme moy désignant le calcul de la moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 5.....	123
Tableau 18. Teneur en μmol d'uranium et $\mu\text{mol/gMS}$ dans les racines jeunes et âgées des 4 réplicats de <i>P. vulgaris</i> , Flux d'uranium moyens ($\mu\text{molU/gMS/h}$) et normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), soumis à une exposition de 5h à environ $19,7 (\pm 0,44)$ $\mu\text{mol/L}$ d'uranium en continu (dans le bac nourrice et une moyenne de $17,6 (\pm 0,26)$ $\mu\text{mol/L}$ dans le pot contenant les plantes), pH 4,9, (le terme moy désignant le calcul du flux comme une moyenne pour les 4 haricots).....	126
Tableau 19. Teneur en uranium (μmol) et masse de racine en fonction de la partie de racine considérée (âgée ou jeune) et le % correspondant par rapport à l'ensemble de la racine.	128
Tableau 20. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de <i>P. vulgaris</i> , Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et flux moyens normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après une exposition de 5h, $[U_T] = 300$ nM et pour une gamme croissante en calcium (mmol/L), (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 6.	133
Tableau 21. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de <i>P. vulgaris</i> , Flux moyens ($\mu\text{molU/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et Flux moyens normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$), en fonction du pH après une exposition de 5h, $[U_T] = 300$ nM et pour une gamme croissante en phosphates ($\mu\text{mol/L}$), (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 7.	138

Tableau 22. Concentration en uranium mesurée dans la solution nutritive ($\mu\text{molU/L}$) en fonction de la concentration en citrate de sodium ($\mu\text{mol/L}$) au moment de la contamination (t_0) et avant d'exposer les plantes (t_0 avant plantes après 36 heures d'équilibration). 142

Tableau 23. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t_0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de *P. vulgaris*, Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et Flux moyens normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après une exposition de 5h, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$ et pour une gamme croissante en citrate ($\mu\text{mol/L}$), (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 8. 146

Tableau 24. Comparaison des CECR (cmol_e/kg) des parties jeunes et âgées de racines de plants de *Phaseolus vulgaris*, aux stades plantule et floraison, soumis ou non à une contamination à l'uranium à 3 pH. 163

Tableau 25. Pourcentage d'élongation racinaire ($(L_{\text{métal}} - L_{\text{initiale}} / L_{\text{témoin}} - L_{\text{initiale}}) * 100$) des graines germées de *P. vulgaris* en présence de concentrations croissantes en uranium dans le milieu, en fonction du pH ($n = 5$ graines). 167

Tableau 26. CE_{50} (et CE_{25} pour information), en μM , calculée par le modèle de Hill en fonction du temps de contamination et du pH du milieu d'exposition. 172

Liste des planches

Planche 1. Photographies de l'évolution de l'élongation de graines de *P. vulgaris* germées, depuis 5 jours, soumises à une contamination de 87 nM d'uranium (plus fort % d'élongation racinaire) au pH 4,9, durant 24h (A), 48h (B) et 72h (C). En comparaison, est présentée au pH 4,9 l'élongation racinaire après 48h d'exposition à 5,9 μ M d'uranium (D) et les témoins après 48h (E).....187

Liste des annexes

Annexe 1. Photographies de notre plante modèle *Phaseolus vulgaris*, au stade plantule dans la vermiculite et au stade mature (avec les gousses)..... 183

Annexe 2. Biomasse sèche (gMS) des tiges, feuilles et racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations préliminaires sur 6 jours d'exposition, au stade floraison aux pH 4,9 et 5,8..... 184

Annexe 3. Biomasse sèche (gMS) des tiges, feuilles et racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations préliminaires sur 3 jours d'exposition, au stade plantule aux pH 4,9 et 5,8..... 185

Annexe 4. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations de cinétique de transfert sur 9 heures, au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7..... 186

Annexe 5. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en uranium (t = 5h d'exposition), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7..... 187

Annexe 6. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en calcium (mmol/L) (t= 5h d'exposition, $[U_T] = 300$ nM), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7..... 188

Annexe 7. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en phosphates (μ mol/L) (t= 5h d'exposition, $[U_T] = 300$ nM), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7..... 189

Annexe 8. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en citrate (μ mol/L) (t= 5h d'exposition, $[U_T] = 300$ nM), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7..... 190

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AIEA : Agence Internationale à l'Energie Atomique

ARN : Acide Ribo Nucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

BLM : Biotic Ligand Model

CEC : Capacité d'Echange Cationique

CECR : Capacité d'Echange Cationique Racinaire

EDTA : Ethylen Diamine Tetra Acétate

EXAFS : Extended X-ray Absorption Fine Structure

FIAM : Free-Ion Activity Model

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

Ld : Limite de détection

MET : Microscope Electronique à Transmission

NEA : Nuclear Energy Authority

NTA : Acide NitriloTriAcétique

TRLFS : Time-Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy

XAS : X-ray Absorption Spectroscopy

Glossaire

Biodisponibilité : Quantité d'un élément donné pouvant être transférée dans la plante durant son exposition.

Bioaccumulation : Accumulation d'un élément dans un organisme (diffus ou localisé dans un organe, un tissu ou une structure cellulaire ou subcellulaire).

Capacité d'Echange Cationique Racinaire : La CECR représente le nombre de sites d'échange de cations (anions fixés, groupements carboxyliques $R-COO^-$) situés dans les parois des cellules de la racine.

Citrate : Le terme de citrate employé dans cet étude prend en compte le citrate sous ses divers degrés de protonation.

Hydroponie : La culture en hydroponie est une culture réalisée non pas dans un sol mais en phase liquide. Le milieu de culture est un milieu liquide représenté par la solution nutritive (solution hydroponique ou nutritive) qui permet d'éviter toute association sur une phase solide.

Ligands (de l'uranium) : Composés pouvant former des complexes avec l'uranium (dans notre étude, il s'agit des phosphates, du citrate, hydroxyles, carbonates)

Phytodisponibilité : La phytodisponibilité (ou biodisponibilité pour les végétaux) peut être définie comme la quantité d'un élément donné pouvant être transférée dans la plante durant son développement.

Racines jeunes et âgées : Dans cette étude, les racines jeunes et âgées sont différenciées selon leur couleur. Les racines jeunes sont translucides, blanches ou crème claire (racines latérales). Les racines âgées sont quant à elles de couleur brun foncé (racines sur lesquelles prennent naissance les racines latérales).

Toxicité : La toxicité d'une substance pour un organisme est sa propriété à engendrer, temporairement ou non, des troubles de certaines fonctions biologiques. Dans notre étude, la phytotoxicité (toxicité pour les végétaux) de l'uranium est évaluée en termes d'inhibition de l'élongation racinaire.

Transfert racinaire ou prise en charge : Ce qui se retrouve « associé » à la racine après exposition dans un milieu contaminé. Ce terme inclut l'adsorption à la surface de la racine ou l'absorption (dans les tissus).

Translocation : Passage de l'élément des parties racinaires aux parties aériennes (tige et feuilles).

Spéciation : Ce terme regroupe la distribution des éléments dans différentes formes chimiques (ions libres, complexes solubles) ou physiques (formes solides ou gazeuses) et différents états d'oxydation.

Introduction générale

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du programme ENVIRHOM initié à l'IRSN en 2001 (Garnier-Laplace et Paquet, 2001). La stratégie des recherches conduites est d'intégrer dans une approche expérimentale commune la protection de l'homme et celle de l'environnement en étudiant, en situation d'exposition chronique, le comportement des radionucléides et leurs effets biologiques pour des organismes vivants représentatifs du règne végétal et du règne animal. Les objectifs spécifiques dans le domaine de la protection de l'environnement sont :

- d'intégrer la notion de spéciation chimique dans les modèles de comportement des radionucléides au sein des écosystèmes, de la relier explicitement à la bioaccumulation chez les organismes vivants et de rechercher les effets biologiques induits sur des modèles végétaux et animaux représentatifs des principaux niveaux trophiques.
- de relier les éventuelles perturbations observées chez les individus (comportement, croissance, reproduction) avec les effets à l'échelle des populations composant les écosystèmes.

L'uranium est, à l'exception des zones d'activités minières, présent dans l'écorce terrestre à des teneurs moyennes de $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Ribera *et al.*, 1996). Sous l'action des processus d'érosion, des mécanismes de formation des sols et de leur lessivage par les eaux de pluie, ainsi que des activités anthropogéniques (rejets des activités minières et industrielles en amont du cycle du combustible nucléaire, utilisation de charbon, utilisation agricole d'engrais phosphatés issus de phosphates naturels riches en uranium et utilisation militaire d'uranium appauvri), il est présent dans toutes les composantes de l'environnement, dont les organismes vivants, animaux ou végétaux (Bourrelier et Berthelin, 1998).

En ce qui concerne plus particulièrement les écosystèmes terrestres, l'un des objectifs vise à étudier les multiples transformations physico-chimiques des radionucléides présents dans les compartiments physiques réservoirs tels que les sols. Ceux-ci peuvent jouer le rôle de sources d'exposition pour les organismes vivants, notamment les végétaux supérieurs, par transfert racinaire. Les végétaux y représentent le premier maillon de la chaîne trophique terrestre. Aussi le

transfert sol-plante des éléments traces toxiques est un des mécanismes les plus préoccupants associés à la pollution des sols, dans la mesure où les végétaux jouent le rôle de vecteur de ces éléments vers les animaux et l'homme.

Les interactions uranium-plantes sont complexes car dépendantes de paramètres d'ordre physico-chimique mais aussi biologique. En effet, de par leurs propriétés, les sols vont imposer les formes physico-chimiques thermodynamiquement plausibles de l'uranium et leur évolution à long terme (spéciation). De plus, les propriétés biologiques intrinsèques de la plante (espèce, stade végétatif, état physiologique) et de sa microflore associée (exsudation d'acides organiques, de protons, etc... au niveau de la rhizosphère), tout comme celles de la microfaune et de la macrofaune, vont jouer un rôle déterminant sur le cycle de l'uranium et son transfert à la plante (phytodisponibilité).

L'entrée et surtout les effets d'un élément trace tel que l'uranium, à un niveau quelconque de la chaîne alimentaire, est directement liée à sa biodisponibilité (quantité pouvant être absorbée par l'organisme) qui va dépendre non seulement des formes chimiques sous lesquelles l'uranium est présent, mais aussi de l'aptitude de l'organisme considéré à l'absorber.

Enfin, l'uranium étant un élément potentiellement toxique de par ses propriétés métalliques et radioactives, les phénomènes de phytotoxicité, de localisation dans les tissus végétaux, ainsi que tous les effets potentiellement induits au niveau cellulaire/sub-cellulaire, en liaison ou non avec la spéciation de l'uranium demandent à être étudiés en détail et sont peu renseignés dans la littérature.

Ce travail de recherche a pour objectif d'analyser et de fournir les concepts de base pour le lien entre la spéciation chimique de l'uranium dans la solution du sol, sa bioaccumulation et les effets biologiques potentiellement induits lors d'un transfert racinaire chez une plante supérieure. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à une plante supérieure cultivée (le haricot).

Objectif général et articulation du mémoire

L'objectif général de ce travail est d'étudier le transfert racinaire de l'uranium dans un système milieu simplifié-plante (hydroponie) en relation avec sa spéciation dans le milieu d'exposition. La démarche expérimentale entreprise vise également à déterminer la localisation cellulaire de l'uranium dans les organes de la plante et à mettre en évidence les effets biologiques pouvant être induits suite à cette exposition.

Un rappel des connaissances générales sur les sols, les mécanismes d'absorption racinaire des éléments nutritifs par les plantes et surtout le comportement de l'uranium dans les sols et les végétaux, avec l'étude de sa spéciation avec les phases solides du sol et en solution, ses teneurs dans les sols et dans les plantes, sa localisation dans les tissus végétaux et enfin les effets toxiques induits seront présentés dans le chapitre 1. Cette analyse bibliographique constituera la base pour choisir la stratégie expérimentale retenue dans le cadre des recherches.

Le chapitre 2 présentera le modèle biologique choisi, le milieu simplifié représentant la solution nutritive utilisée, l'approche expérimentale choisie, qui consiste en des dispositifs en hydroponie et enfin la description des expériences menées pour étudier le transfert racinaire de l'uranium en relation avec sa spéciation en solution, sa biodisponibilité, la localisation de l'élément internalisé dans la plante et les effets toxiques induits mesurés ou observés.

Dans les chapitres 3 et 4 seront présentés et discutés respectivement :

- Les résultats acquis concernant la relation spéciation aqueuse de l'uranium (VI) - transfert à la plante ou plus précisément comment la biodisponibilité de l'uranium est affectée par l'ajout de ligands (phosphates et citrate) ou d'ions compétiteurs (H^+ et Ca^{2+}) dans le milieu d'exposition et dans quelle mesure elle peut affecter le transfert racinaire de l'uranium à la plante.
- Les observations de microlocalisation de l'uranium dans les divers organes de la plante (tige, feuilles et racine) et les effets biologiques induits suite à son exposition à l'uranium.

Enfin, la dernière partie conclura et ouvrira des perspectives de recherches dans le cadre du programme ENVIRHOM.

Chapitre 1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE ET STRATEGIE EXPERIMENTALE RETENUE

Spéciation, biodisponibilité et toxicité de l'uranium dans un système sol – plante

1.1. Généralités sur les sols

Les sols représentent une interface étroite entre l'atmosphère et la lithosphère et forment un milieu unique où se combinent une phase solide, une phase gazeuse et une phase liquide, le tout associé à divers organismes et matériels d'origine biologique. Ce sont des milieux complexes dont la formation et les propriétés dépendent largement des processus biologiques.

Les sols assurent 5 fonctions principales :

- Celle de support mécanique pour les végétaux ;
- Celle d'habitat pour les micro-organismes, champignons, invertébrés, etc...;
- Celle de stock d'éléments minéraux nécessaires à la nutrition des plantes ;
- Celle de stock de matière organique, laquelle constitue une source d'énergie pour de nombreux organismes du sol qui vont ainsi la décomposer. La fraction décomposée interagit avec la fraction inorganique

du sol pour former des structures organo-minérales nécessaires à l'organisation et à la stabilité de la matrice du sol ;

- Et enfin celle de stocker de l'eau permettant ainsi la croissance des plantes et des autres organismes.

Composition des sols et type de sol (Robert, 1996)

Les sols sont constitués d'éléments minéraux tels que Si, Al, Fe, Ca, K, Mg, Na, etc.. et constituent une source d'eau, d'azote et de phosphore qui vont être importants notamment dans la nutrition des plantes et la synthèse de biomasse.

Par ailleurs, un des composants inorganiques les plus importants en termes de comportement du sol est indubitablement le groupe de substances caractérisées généralement sous le terme d'argiles. D'un point de vue textural, les argiles font références aux particules dont le diamètre ne dépasse pas 2 μm .

La matière organique, autre composante très importante des sols a pour origine aussi bien les organismes vivants que le matériel mort d'origine biologique tel que les racines des plantes, les plantes et animaux en décomposition, mais aussi les hyphes morts des champignons, les spores, les bactéries et autres matériels constitutifs d'origine microbienne ou de la faune. La concentration en CO_2 dans le sol est près de 10 fois supérieure à celle de l'atmosphère du fait de la respiration des racines des végétaux et des organismes du sol. Cette phase gazeuse est d'ailleurs importante notamment dans la régulation du pH de la solution du sol.

La phase minérale des sols est caractérisée et classifiée en fonction de sa texture, c'est à dire la taille de ses particules. Les textures peuvent aller des argiles (particules dont le diamètre est $\leq 2 \mu\text{m}$) aux blocs (diamètre $> 20 \text{ cm}$).

Dans la plupart des cas, les particules du sol s'agglomèrent en agrégats de tailles variées et cette structuration du sol a une importance considérable pour la croissance des plantes. Elle facilite d'une part la pénétration des racines dans le sol (dans les fissures entre agrégats) et d'autre part, elle diminue les flux d'éléments et d'eau du sol aux racines particulièrement si les agrégats sont de petite taille. La morphologie racinaire peut alors être fortement modifiée par une structure défavorable, notamment la croissance des jeunes racines (Callot *et al.*, 1982).

Propriétés chimiques des sols (Robert, 1996)

pH des sols

Le pH des sols est une propriété chimique essentielle qui va déterminer le comportement des éléments chimiques présents, mais aussi le comportement des être vivants (microflore et végétation).

Différents types de sols existent :

- Les sols acides où l'acide carbonique ou différents acides organiques saturés de façon incomplète par des cations alcalins et alcalino-terreux vont se dissocier partiellement et fournir des protons à la solution du sol. L'une des réactions essentielles s'effectue avec les cations saturant les argiles ou les matières organiques. Ainsi, lorsque le pH s'abaisse de 7 à 5,5, les argiles se désaturent aux dépens des protons.
- Les sols carbonatés dont le pH reste compris entre 7 et 8,5 – 9 tant qu'il y a un excès de CaCO_3 .

Pouvoir tampon des sols

C'est une propriété importante de la phase solide des sols qui détermine leur aptitude à modérer les variations de pH de la solution du sol en cas d'apports d'acides ou de bases. Les carbonates constituent un premier système tampon, les silicates également, qui contiennent de nombreux cations basiques échangeables avec les protons. Mais c'est, en général, la capacité d'échange des argiles qui constitue le système tampon essentiel.

Condition d'oxydo-réduction

Les conditions d'oxydo-réduction ont un rôle très important et vont déterminer le comportement des éléments chimiques à différentes valences mais surtout le fonctionnement biologique (microorganismes, racines).

Les sols qui sont en contact avec l'atmosphère sont normalement aérés. Cependant, certains facteurs peuvent altérer l'oxygénation des sols. C'est notamment le cas lorsque l'eau s'accumule (sols hydromorphes). La diffusion de l'oxygène à partir de l'atmosphère devient alors plus faible. Il en est de même dans les sols très riches en matière organique où la consommation d'oxygène par les bactéries pour la dégrader est très forte.

1.2. Voie de contamination des végétaux par les racines et entrée des polluants dans les chaînes alimentaires

La contamination des végétaux par les radionucléides peut se faire de deux façons : par dépôt direct sur les organes aériens (ou *via* une resuspension à partir du sol) ou par transfert racinaire.

Dans ce travail de recherche, c'est par transfert racinaire que nous allons étudier la contamination des plantes supérieures.

Les végétaux sont exposés, par voie racinaire, aux éléments chimiques présents dans les sols où ils se développent. Dans cette partie, nous verrons les mécanismes intervenant dans la contamination des végétaux par voie racinaire avec notamment l'influence du système racinaire, les mécanismes intervenant dans l'absorption racinaire, le transport des éléments dans la plante et au final un récapitulatif de l'ensemble des mécanismes contrôlant l'absorption des éléments. Généralement, il est plus important de savoir si les organismes peuvent absorber ces éléments, et donc s'ils peuvent entrer dans les chaînes trophiques et affecter au final l'être humain. C'est ce que nous verrons dans le chapitre consacré à la théorie de la biodisponibilité des métaux (§ 1.6.).

1.2.1. Morphologie du système racinaire et capacité d'absorption des éléments nutritifs

Les végétaux supérieurs présentent des systèmes racinaires très diversifiés. On distingue différents types de racines : les racines primaires, secondaires, pivotantes ou latérales. Il existe également les racines adventives, coronaires ou d'ancrage. Dans un milieu sans contrainte à la diffusion des éléments, toutes les racines ont des capacités d'absorption assez comparables. Les racines se différencient également par l'intensité de leurs ramifications qui favorisent ainsi la colonisation d'un plus grand volume de sol et peut-être l'absorption.

Les racines « âgées » sont généralement fortement subérisées et lignifiées. Elles supportent l'ensemble de la plante et conduisent l'eau et les éléments nutritifs du sol aux parties aériennes, et les carbohydrates solubles formés dans les feuilles aux extrémités racinaires où ils peuvent aussi être exsudés. Ces racines sont pérennes et forment la base sur laquelle les nouvelles racines vont prendre naissance. A contrario, les racines fines, plus jeunes sont spécialisées dans l'assimilation de l'eau et des nutriments. Elles ne sont jamais subérisées ou

lignifiées, sont généralement de couleur claire et couvertes de poils qui augmentent leur surface d'absorption. Leur durée de vie est courte et peut varier selon leur niveau de mycorrhization, la fertilité du sol, le climat, la compétition avec d'autres espèces, etc... (Lavelle et Spain, 2001).

Pour assurer son alimentation, un végétal dispose, en général, d'une capacité d'absorption par les racines très supérieure à celle nécessaire pour assurer ses besoins même en période de pleine croissance. Les facteurs limitant l'absorption sont plutôt la biodisponibilité des éléments dans le sol et les processus métaboliques permettant l'utilisation des éléments absorbés.

1.2.2. Absorption racinaire et solution du sol

1.2.2.1. Micro-environnement rhizosphérique

La rhizosphère peut être définie comme l'ensemble du volume de sol directement influencé par les racines, où se déroulent l'ensemble des processus biologiques, chimiques et physiques associés au fonctionnement du sol. Elle inclut (Lavelle et Spain, 2001) :

- la matière organique du sol et la litière de racines, qui fournissent énergie et éléments nutritifs ;
- les racines encore vivantes et actives qui favorisent l'activité microbienne ;
- les micro-organismes libres actifs dominés par les bactéries hétérotrophes et des prédateurs tels que les nématodes et les protistes ;
- les micro-organismes symbiotiques incluant les bactéries fixatrices d'azote, les champignons mycorrhiziens...

Les conditions micro-environnementales dans la rhizosphère peuvent différer du reste du sol. L'atmosphère y est enrichie en CO₂ du à la respiration des racines, les minéraux argileux s'accumulent le long de la racine et les mouvements d'eau, d'exsudats et d'ions y créent des conditions spécifiques. Le sol y est relativement sec et pauvre en nutriments comparé au sol extérieur à cette zone.

Les racines induisent des changements de pH à l'interface sol-racine et les gradients de protons peuvent être importants, mais aussi des changements de potentiel redox (respiration des racines et des organismes qui leur sont associés). Les processus redox sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans les processus d'immobilisation/mobilisation impliquant les éléments traces pouvant exister sous différents états d'oxydation selon les conditions du sol (Hinsinger, 2001).

1.2.2.2. Absorption racinaire

Des éléments sont indispensables au développement des végétaux : les macroéléments tels que carbone, hydrogène, oxygène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium et magnésium, qui sont consommés en quantités élevées, alors que les oligoéléments le sont en moindre mesure : fer, bore, manganèse, molybdène et chlore.

Ces éléments sont prélevés sous forme d'ions dans la solution du sol, excepté le carbone, l'hydrogène et l'oxygène qui viennent de l'eau et du gaz carbonique de l'air. Cette ressource nutritive se renouvelle continuellement, par convection ou diffusion (figure 1).

La solution du sol constitue la phase aqueuse dans un sol humide. C'est elle qui régule la biodisponibilité d'un élément chimique, pour la racine, de deux façons :

- par le fait de laisser les éléments sous la forme d'ions
- et en fournissant un vecteur pour le mouvement des ions vers les racines des plantes.

L'absorption d'ions par les racines est intimement liée à celle de l'eau. Le mécanisme majeur contrôlant cette absorption est le phénomène d'évapotranspiration des tiges et feuilles qui crée un flux net d'eau et d'ions de la solution du sol aux racines.

Si l'on considère une racine qui absorbe des ions à partir de la solution du sol en contact avec elle, cette solution devient déficiente en certains ions qui ont été absorbés, à moins qu'un ou deux processus aient lieu : soit une quantité plus importante de solution se déplace d'une autre portion du sol jusqu'à la racine (c'est le « mass flow » due à l'absorption d'eau par la plante), soit ce sont les ions qui se déplacent en quantité plus importante à travers la solution du sol jusqu'à la racine (c'est la « diffusion d'ions », due au gradient de concentration créé lorsque la plante absorbe les ions directement autour d'elle).

Les racines vont pousser pour explorer de nouveaux volumes de sol, afin de minimiser les distances de déplacement de l'eau et des ions (figure 1).

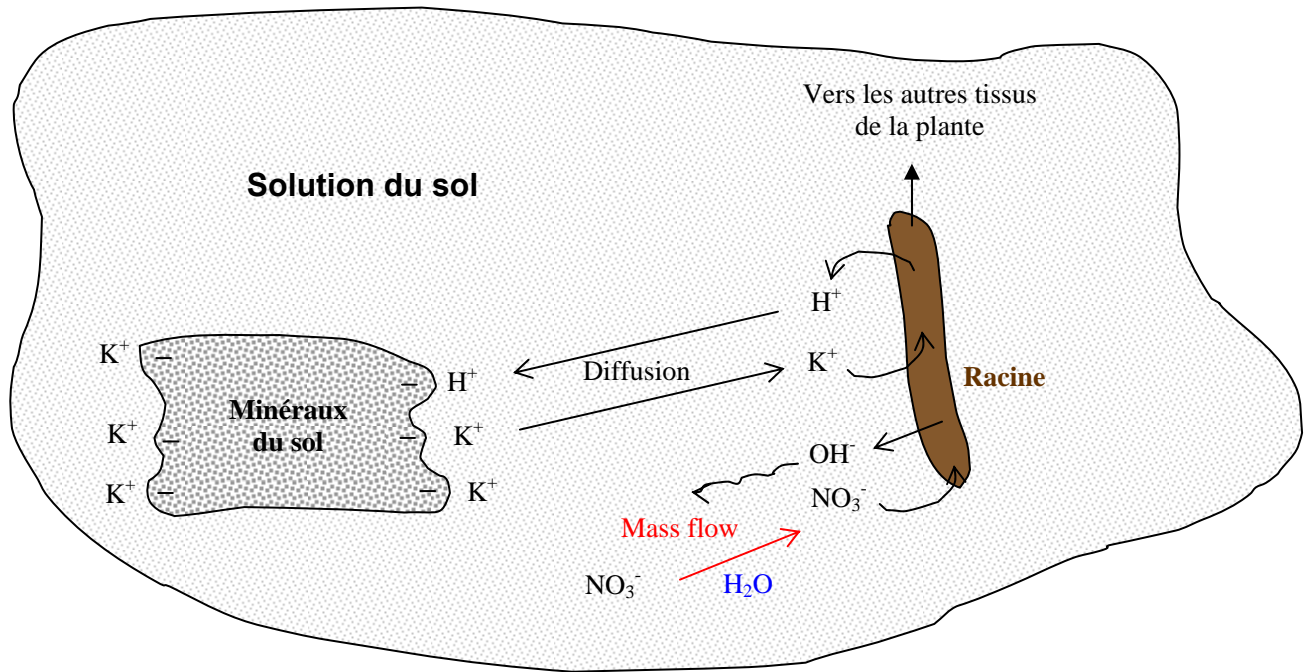


Figure 1. Interaction racine – solution du sol : mouvements d'eau et d'ions. Le « mass flow » est le flux d'eau dû à l'absorption par la plante et la « diffusion d'eau », le flux d'eau dû au gradient de concentrations créé par la racine qui absorbe les ions dans son voisinage proche.

L'absorption des nutriments par la plante peut donc se faire de façon active (contre un gradient de concentration ou un gradient d'eau) ou de façon passive (avec le gradient).

L'absorption active est le mécanisme prépondérant pour l'accumulation sélective des ions. C'est un processus consommant de l'énergie qui peut être limité dans le cas où les réserves énergétiques sont appauvries. Cette absorption active n'est rendue possible qu'après hydrolyse de l'ATP par les ATPases créant ainsi un gradient de pH et de potentiel négatif.

L'absorption passive est due à l'accumulation d'ions dans les espaces « libres », qui sont équivalents à 20-30 % du volume de la racine. Ces espaces « libres » sont constitués par les espaces de diffusion (espaces des cellules à partir desquels, les ions peuvent diffuser librement vers l'intérieur ou l'extérieur) et les « espaces de Donnan » dans lesquels les ions sont retenus par fixation ou échange du fait des charges négatives portées par les constituants des parois des cellules et des protéines cytoplasmiques (Callot *et al.*, 1982). Les concentrations en éléments ainsi atteintes par cette diffusion passive peuvent excéder celles de la solution du sol, puisque ce processus d'échange se base sur une égalité des

potentiels chimiques entre le sol et la racine plutôt que sur un équilibre de concentrations. La quantité totale de cations pouvant être absorbée est appelée capacité d'échange cationique (CEC) des racines (Lavelle et Spain, 2001).

1.2.3. Transport des éléments dans la plante

1.2.3.1. Flux de sèves

Les parties aériennes et racinaires des végétaux sont très interdépendantes l'une de l'autre puisque chacune va approvisionner l'autre en éléments. Le système racinaire va ainsi recevoir, des organes aériens chlorophylliens où s'effectue la photosynthèse, les glucides nécessaires à sa croissance et va, quant à lui, alimenter en eau et éléments minéraux ces organes aériens.

2 flux de sève existent donc dans les végétaux :

- Le flux de sève brute (eau et ions), véhiculée par les vaisseaux du xylème, des racines jusqu'aux feuilles (flux ascendant). Le trajet de l'eau depuis son point d'absorption (surface de la racine) jusqu'aux vaisseaux de xylème est présenté sur la figure 2.
- Le flux de sève élaborée (produits de la photosynthèse) transportée des feuilles aux organes receveurs (bourgeons, fleurs) ou de stockage (racine, fruits,...) par le phloème (flux descendant) (figure 3). Cette sève contient de l'eau, des sels minéraux, des substances organiques nutritives (saccharose principalement, mais aussi vitamines, acides aminés, ...) ou informatives (hormones).

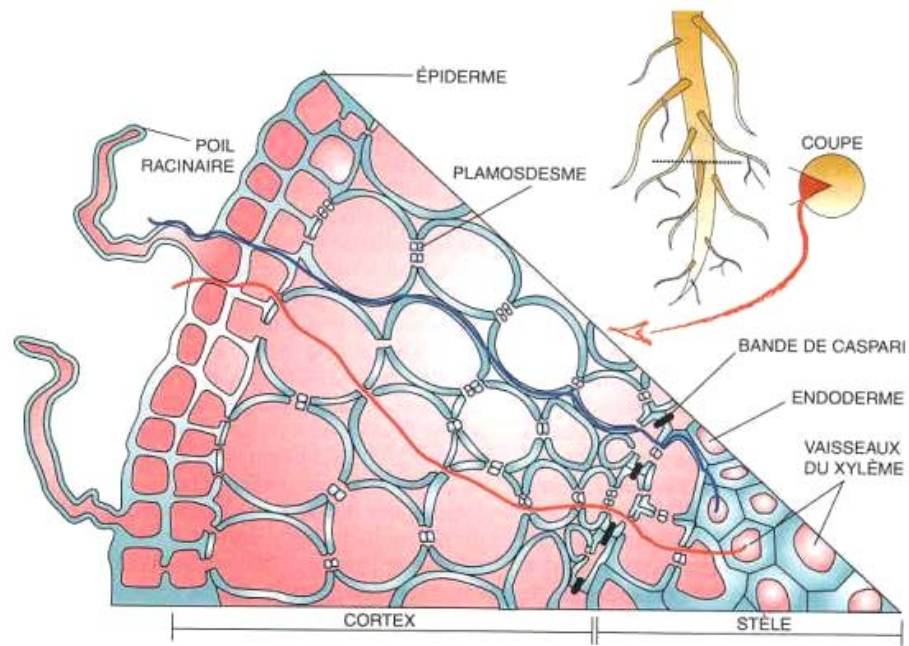


Figure 2. Trajet radial de l'eau et des solutés de la surface de la racine aux vaisseaux de xylème *via* la voie symplasmique figurée en rouge (passage au travers de la membrane plasmique des cellules de l'épiderme puis de cellules à cellules par des pores de la paroi pecto-cellulosique, les plasmodesmes) ou la voie apoplasmique figurée en bleu (passage dans les parois pecto-cellulosiques et les espaces intercellulaires (Touraine, 2000).

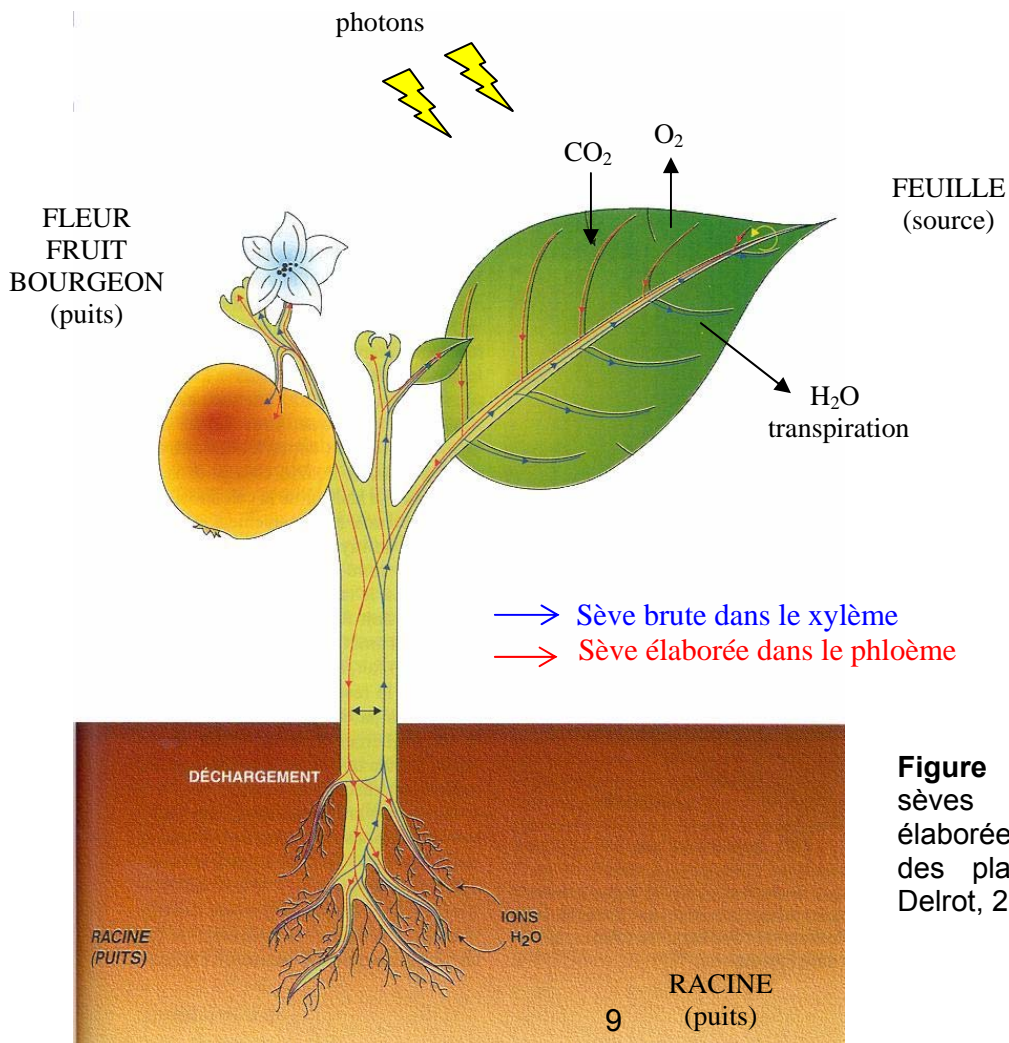


Figure 3. Trajet des sèves brutes et élaborées au travers des plantes (d'après Delrot, 2000).

1.2.3.2. Mécanismes d'exsudation

Une partie des carbohydrates synthétisés dans les feuilles et transloqués vers les racines par le phloème est transférée au sol sous forme d'un mélange de substances solubles et insolubles. Ce phénomène d'exsudation est important du fait des immenses flux de carbone et de nutriments qu'il implique (jusqu'à 20-25 % du carbone fixé par photosynthèse et 30-40 % des produits de photosynthèse transloqués aux racines). A travers ce processus, une large quantité de composés chimiques est apportée au sol, qui peut avoir une forte influence sur les organismes et sur la spéciation des éléments proches des racines.

La composition de ces exsudats est variable selon l'âge de la plante, son espèce et les conditions environnementales. La production d'exsudats est sensible à un ensemble de facteurs externes tels que l'intensité lumineuse, la température, l'aération, la disponibilité des éléments et les caractéristiques du sol. Les conditions de stress chez la plante conduisent d'ailleurs généralement à un accroissement de leur production. Ces exsudats sont composés principalement d'un mélange de carbohydrates (sucres simples et polysaccharides), d'acides aminés, d'acides organiques, de nucléotides, de flavones, d'enzymes et de facteurs de croissance (Lavelle et Spain, 2001). Ils exercent un rôle dans les échanges sol-solution des éléments en traces par leurs propriétés d'acides faibles et peuvent, par exemple, complexer les métaux (cas du citrate par exemple).

1.2.4. Conclusion : facteurs contrôlant l'absorption d'éléments nutritifs et de métaux traces

Le sol est donc un milieu complexe dans lequel interviennent de nombreux facteurs tant physiques que biologiques pouvant affecter le fonctionnement de la plante et le transfert d'éléments (figure 4).

Pour comprendre les mécanismes de transfert uranium – plante, il sera nécessaire de pouvoir s'astreindre de ces facteurs et donc simplifier le système, notamment par l'utilisation d'un milieu de culture simplifié, la solution nutritive. La réponse de la plante (en condition où les facteurs abiotiques sont contrôlés) sera alors considérée comme inhérente à ses propres propriétés physiologiques et non à d'autres facteurs.

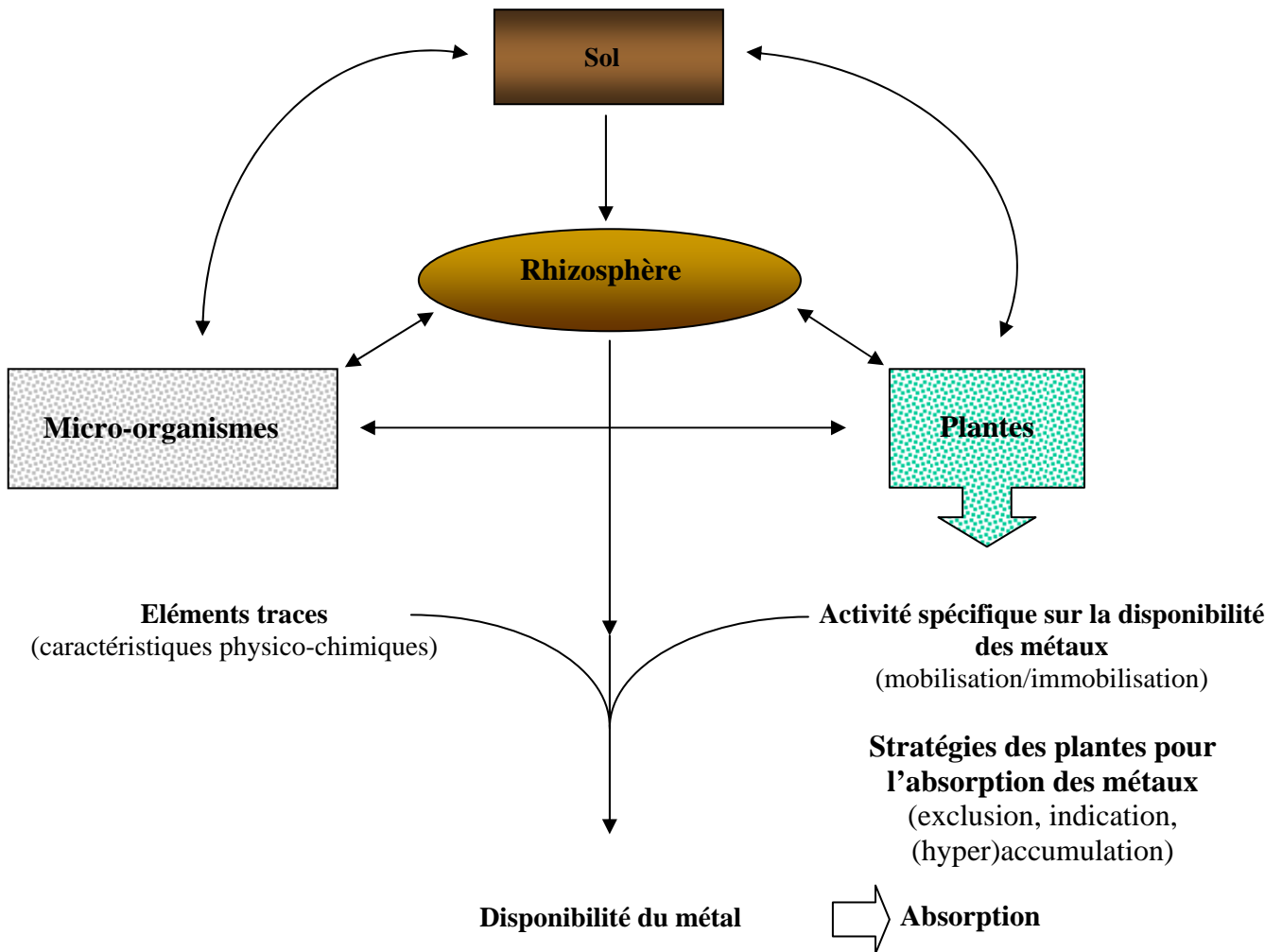


Figure 4. Principaux facteurs contrôlant l'absorption d'un métal dans un système sol-plante (d'après Lombi *et al.*, 2001).

1.3. Comportement de l'uranium dans les sols

1.3.1. Origine et teneur en uranium dans les sols et dans les roches

Origine

L'uranium est retrouvé à l'état naturel dans un certain nombre de minéraux tels que la pechblende, l'uranite et à des concentrations variables dans certaines roches phosphatées, certains granites ou certaines roches ignées.

C'est un radioélément possédant de nombreux isotopes allant de ^{226}U à ^{240}U , tous radioactifs, dont trois principaux isotopes naturels : ^{234}U à 0,0057%, ^{235}U à 0,719% et ^{238}U à 99,275% qui se désintègrent en émettant des rayonnements principalement α .

L'activité spécifique et la période des principaux isotopes de l'uranium sont données dans le tableau 1.

Tableau 1. Période radioactive et activité spécifique des principaux isotopes de l'uranium

Isotope	Période (ans)	Activité (Bq) pour 1 g de l'isotope
U-232	69,85	$8,16 \cdot 10^{11}$
U-233	$1,59 \cdot 10^5$	$3,56 \cdot 10^8$
U-234	$2,46 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^8$
U-235	$7,04 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^4$
U-236	$2,34 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$
U-238	$4,47 \cdot 10^9$	$1,24 \cdot 10^4$

Etats d'oxydation

L'uranium possède différents états d'oxydation : U(III), U(IV), U(V) et U(VI). En solution aqueuse, les formes U(III) et U(IV) sont sous la forme d'ions libres U^{3+} et U^{4+} alors que les formes U(V) et U(VI) existent sous forme UO_2^+ et UO_2^{2+} (ion uranyle) respectivement (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

Si les formes U(IV) et U(VI) sont les espèces majoritaires de l'uranium dans les systèmes pédologiques, les formes U(III) et U(V) ne semblent pas être des formes stables.

Teneur

L'uranium est un constituant trace de la croûte terrestre, plus abondant que l'argent, le mercure ou l'iode par exemple. Sa redistribution est en partie liée aux activités anthropogéniques pouvant créer des zones où la teneur en uranium peut excéder les concentrations « normales » de plusieurs ordres de grandeur (Paulin, 1997) : rejets des activités minières et industrielles en amont du cycle du combustible nucléaire, utilisation de charbon dont la combustion conduit à l'émission d'uranium dans l'atmosphère, utilisation agricole d'engrais phosphatés issus de phosphates naturels riches en ²³⁸U et enfin utilisation militaire d'uranium appauvri.

La teneur moyenne de l'uranium dans la croûte terrestre est de 2 – 3 ppm (Plant *et al.*, 1999). De fortes concentrations en uranium sont retrouvées dans des nodules de manganèse où elles atteignent 7,7 mg/kg (Ben Othman *et al.*, 1989) ainsi que dans les roches phosphatées qui contiennent de 20 à 120 mg/kg (Langmuir, 1978). En comparaison, le manteau primitif contient en moyenne 0,18 mg/kg (Gill et Williams, 1990). Selon le type de roches, les teneurs en éléments radioactifs, dont l'uranium, vont varier (tableau 2).

Tableau 2. Concentrations des éléments radioactifs naturels dans différents types de roches (Paulin, 1997).

Type de roches	Radionucléides (Bq.kg ⁻¹)			
	²³⁸ U	²²⁶ Ra	²³² Th	⁴⁰ K
Granites	52	50	48	1100
Basaltes	-	37	37	405
Grès	15	18	26	340
Calcaires	15	15	5	90
Schistes				
Argileux	18	16	5	85
Bitumeux	890	-	-	-
Alunifères	-	2250	6	1070

En fonction du contexte géochimique, l'uranium peut être transporté et/ou accumulé dans certaines zones en liaison avec ses propriétés physico-chimiques. Associé à ses potentialités de bioaccumulation chez les animaux et végétaux, ses propriétés font que sa présence dans l'environnement peut constituer un risque chronique potentiel pour la biocénose à la fois sur le plan chimique que radiologique (effet des rayonnements ionisants en particulier des particules α).

1.3.2. Mobilité de l'uranium dans les sols

Près de la surface, les conditions oxydantes prévalent. L'uranium a donc une forte mobilité, comportement expliquant la teneur généralement faible des sols (à l'exception de conditions particulières : conditions réductrices, présence de matière organique).

La rétention de l'uranium, est plus élevée dans les sols à fine texture car ils possèdent une forte densité de sites de sorption chargés négativement (Sheppard et Evenden, 1988).

Tout mécanisme permettant d'augmenter la mobilité de l'uranium peut être important pour l'absorption racinaire. De tels mécanismes impliquent la formation de complexes et l'association avec les colloïdes. L'impact de la complexation avec les carbonates sur la sorption de l'uranium peut avoir un rôle très important (figure 5). Il peut donc être suggéré que le pH et la concentration en carbonates constituent les facteurs inorganiques majeurs influençant l'état de l'uranium dans la solution du sol ou dans l'extrait de sol.

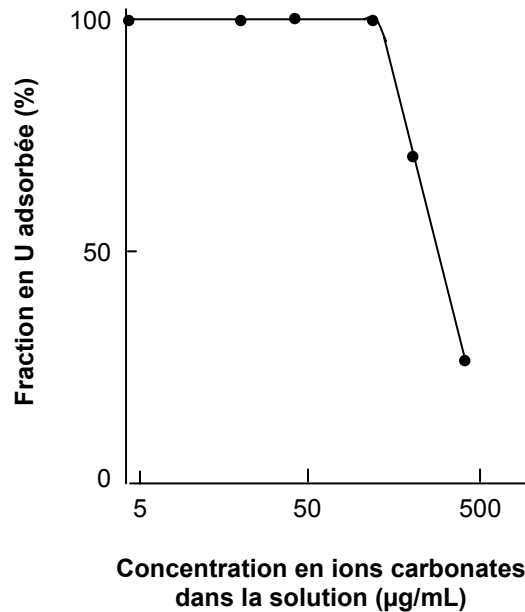


Figure 5. Fraction d'uranium sorbé sur un sol sableux en fonction de la concentration en ions carbonates (solution de carbonate de potassium) dans la solution pour une concentration en U (nitrate d'uranyle) de 50 µg/mL (de Yamamoto *et al.*, 1973).

La matière organique peut influencer la mobilité de l'uranium de 2 façons : les sols organiques sont efficaces dans la rétention de cet élément et à l'opposé, les complexes organiques colloïdaux peuvent augmenter sa mobilité dans les sols (Sheppard et Evenden, 1988).

Enfin, la présence de molécules organiques en solution, notamment le citrate, qui est un des composés exsudés par les racines des végétaux mais aussi présents dans les rejets des installations nucléaires, peut jouer un rôle majeur sur la solubilité de l'uranium et donc sur son comportement dans les sols (Keiling *et al.*, 1991). Il favorise la désorption de l'uranium du sol et entraîne l'augmentation de la teneur en uranium dans la solution du sol (Shahandeh et Hossner, 2002 ; Huang *et al.*, 1998 ; Ebbs *et al.*, 1998) (figure 6).

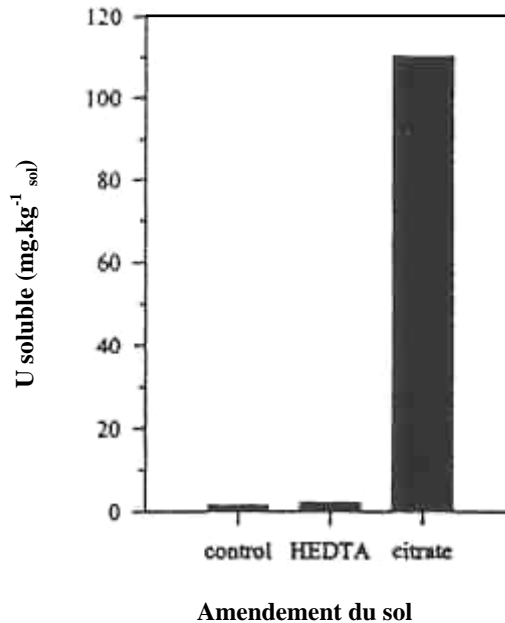


Figure 6. Effet du type d'amendement du sol sur la solubilité de l'uranium dans un sol de pH 6,8 provenant d'un site contaminé près d'Ashtabulah (d'après Ebbs *et al.*, 1998).

1.3.3. Caractérisation du transfert sol – plante

La relation élément - plante peut être abordée selon 3 échelles (Sheppard et Evenden, 1988) :

- Une macro-échelle où la plante représente schématiquement un conduit hydraulique pour l'eau stockée dans le sol, qui sera évaporée au niveau des feuilles. Ce flux d'eau va ainsi apporter les éléments dissous dans la solution du sol, tels que l'uranium, aux racines de la plante. Par ailleurs, si le flux d'eau au travers de la plante est plus important, il aura tendance à augmenter l'absorption des radionucléides par la plante. Or, ce flot en augmentation étant corrélé avec une croissance plus importante, les radionucléides se retrouveront alors dilués dans les tissus de la plante.
- Une méso-échelle selon laquelle la plante peut être considérée comme un organisme qui tente de réguler d'une part son absorption et d'autre part ses pertes. Les plantes ont ainsi été classées selon leur stratégie d'absorption des éléments métalliques (Baker 1981). Peuvent être distingués les « excluseurs », qui tendent à stopper leur absorption jusqu'à un certain seuil de teneurs. Les accumulateurs, quant à eux, tendent à concentrer fortement

ces éléments dans leurs tissus, relayé par des mécanismes internes de détoxification pour éviter tout stress physiologique. Cependant, l'ensemble de ces stratégies est spécifique à un élément et à une plante et peut-être même à un environnement, rendant les généralisations difficiles.

- Une micro-échelle focalisée sur le système racinaire puisqu'il modifie activement ou passivement les caractéristiques physico-chimiques du sol à ses environs immédiats. L'exudation d'enzymes spécifiques, de chélatants, de produits métaboliques ou d'acides organiques créent autour de la racine un micro-environnement dans lequel les conditions biologiques, physico-chimiques tels que le pH, Eh ou la solubilité des éléments sont modifiées en comparaison avec le reste du sol. Ces mécanismes peuvent ainsi grandement affecter l'absorption des radionucléides.

Facteurs de Transfert

L'absorption racinaire d'éléments et donc leur transfert à la plante peut être caractérisée, quel que soit l'élément, par un terme unique : le Facteur de Transfert (FT) ou facteur de concentration sol/plante.

Ce ratio est plus communément exprimé en fonction de la teneur dans la plante, rapportée au poids des tissus considérés et de la teneur dans le milieu d'exposition (sol ou solution du sol). Il est préférable d'utiliser le poids sec de la plante pour limiter la variabilité entre individus du fait de la variabilité de leur teneur en eau individuelle (Sheppard *et al.*, 1988).

Le facteur de transfert racinaire s'exprime de la façon suivante (Baker *et al.*, 1976) pour l'uranium par exemple :

$$FT = \frac{\text{concentration de l'uranium dans la plante } (\mu\text{mol U ou Bq U / kg}_{\text{masse sèche}})}{\text{concentration dans le sol (ou la solution) } (\mu\text{mol U ou Bq U / kg}_{\text{sol sec}} \text{ (ou } \mu\text{mol/L)})}$$

Le Facteur de Transfert est donc une grandeur adimensionnelle ($\text{kg}_{\text{sol sec}} / \text{kg}_{\text{veg sec}}$), exprimée sur la base de la matière sèche extrêmement dépendante du protocole expérimental pour la mesure des concentrations de l'élément dans les 2 matrices.

Les valeurs des facteurs de transfert racinaire sont très variables car elles intègrent les variabilités physiques, chimiques et biologiques des systèmes sol –

plante considérés. Elles vont dépendre aussi des conditions expérimentales, notamment de la préparation des échantillons, du type de sol ou de solution hydroponique, du type de plante et de l'organe considéré et enfin de la spéciation du métal dans le milieu d'exposition et dans la plante (Van Netten et Morley, 1982 ; Günther *et al.*, 2003 ; Sheppard *et al.*, 2004 soumis). Quelques valeurs moyennes de FT ont été proposées par Sheppard et Evenden (1988) pour une teneur en uranium normalisée de $5 \mu\text{g} / \text{g}_{\text{sol}}$, selon le type de végétaux et sont présentées dans le tableau 3. L'influence du type de végétal considéré et du type de sol pour certains végétaux sur le transfert y est très nette.

Tableau 3. Facteurs de Transfert sol-plante ($\text{Bq.kg}^{-1}\text{MS} / \text{Bq.kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$) pour différentes catégories de végétaux pour une valeur standard de $5 \mu\text{gU/gsol}$ (d'après Sheppard et Evenden, 1988).

	Sol à texture fine	Sol à texture grossière	Sol organique	Sol de terril de mine d'uranium
Plantes sauvages				
Arbres	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$	-
Arbustes		$2,2 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	-
Plantes annuelles	$7,6 \cdot 10^{-3}$	-		$6,4 \cdot 10^{-3}$
Espèces cultivées				
Céréales	$1,4 \cdot 10^{-3}$	-	-	-
Fruits	$2,5 \cdot 10^{-3}$	-	-	-
Légumes feuilles	$8,2 \cdot 10^{-3}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$	-	-
Légumes racines	$2,5 \cdot 10^{-3}$	-	-	$1,9 \cdot 10^{-3}$
Fourrage	$8,4 \cdot 10^{-3}$	$0,53 \cdot 10^{-3}$	-	$4,8 \cdot 10^{-3}$

Sur la base de l'ensemble des Facteurs de Transfert sol-plante répertoriés, l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (AIEA, 1994) a donc proposé des FT moyens pour des espèces cultivées (tableau 4).

Tableau 4. Facteurs de Transfert sol-plante ($\text{Bq.kg}^{-1}\text{MS} / \text{Bq.kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$) pour différents types de végétaux (d'après AIEA, 1994).

Type de végétal	Facteur de Transfert
Céréales (grains)	$1,3.10^{-3}$
Herbe	$2,3.10^{-2}$
Légumes racines	$1,4.10^{-2}$
Pomme de terre	$1,1.10^{-2}$
Légumes feuilles	$8,3.10^{-3}$

En théorie, une traduction stricte de ce modèle implique une relation linéaire entre la teneur de l'élément considéré dans la plante et sa concentration dans le milieu d'exposition (Sheppard et Sheppard, 1985). Cependant, dans l'environnement, cette relation linéaire existe rarement pour différentes raisons : (i) la teneur de l'élément dans le sol n'est certainement qu'un des nombreux facteurs intervenant dans l'absorption racinaire des plantes (Amiro et Sheppard, 1987), et/ou (ii) un mécanisme de saturation existe aussi bien pour les surfaces développées par la phase solide du sol que pour les processus d'absorption de la plante (Simon et Ibrahim, 1987).

L'influence de la teneur en uranium sur le facteur de transfert dans le sol suggère un mécanisme de type saturation et indique que pour cet élément, la plupart des plantes se conforment à une stratégie d'accumulateurs (Sheppard et Evenden, 1988). La différence marquée entre l'étude dans l'environnement (à des échelles spatiales macro ou méso) et des études à des échelles beaucoup plus fines (échelle de la racine) est une des raisons les plus notables pouvant modifier les valeurs des facteurs de transfert. La différence majeure entre ces deux échelles d'étude concerne le volume de sol exploité par les racines. Dans un pot de culture, l'ensemble des racines est réduit à un volume de sol limité, sans accès à un sous-sol probablement moins contaminé. Les cylindres de sol modifié autour de chaque racine se mélangent et ce phénomène augmente leur effet sur la solubilité moyenne des radionucléides. Finalement, les apports de nutriments et d'eau, la température du sol et de l'air, et l'éclairage, affectent tous le taux de croissance

des plantes et diffèrent des études réalisées en plein champ (Sheppard et Evenden, 1988).

Enfin, il est communément supposé que les facteurs de transfert sont élément-spécifique et donc que l'absorption racinaire de l'ensemble des isotopes d'un élément donné est identique (Baes *et al.*, 1984). La similarité du comportement des isotopes de l'uranium $^{234}\text{U}/^{238}\text{U}$ dans les systèmes sol/plante a été démontrée (Evans et Eriksson, 1983).

Flux

Il existe d'autres termes permettant une description plus réaliste du transfert des radionucléides dans les plantes. C'est notamment le cas du calcul des flux. L'idée est de pouvoir recalculer un facteur de transfert en utilisant d'autres variables faciles à obtenir telles que le temps d'exposition (et donc le temps de croissance) ou le rendement. De cette façon il est possible de s'astreindre de certains biais, notamment les effets de dilution dus à une production de biomasse différente (Gerzabek *et al.*, 1998).

Ce concept repose sur 2 hypothèses principales :

- La teneur en radionucléides dans les végétaux est rapportée à la teneur totale de ce radionucléide dans le compartiment sol (premiers 20 cm du sol), qui est supposé être la zone principale contenant les racines des plantes cultivées dans un lysimètre. Dans le cas d'une culture en hydroponie, c'est la teneur dans la solution qui est prise en compte.
- La relation entre l'absorption du radionucléide et la production de matière sèche est linéaire.

Le flux sol-plante (par exemple en $\text{g}^{-1}.\text{j}^{-1}.\text{L}$) peut donc, sous ces hypothèses, être calculé de la façon suivante :

$$F = C_{\text{veg}} / (P * t * C_{\text{substrat}}) \quad (\text{mol} / (\text{g}.\text{j}.\text{mol/L}))$$

Où « C_{veg} » (mole U) désigne la quantité en radionucléide dans la plante au moment de la récolte, « P » le poids sec de la plante (g), « t » le temps d'exposition (jours) et C_{substrat} la concentration totale du radionucléide dans le substrat (mole dans le sol ou dans la solution selon le mode de culture).

1.4. Spéciation de l'uranium dans les sols

Différents facteurs liés aux propriétés physiques et chimiques des sols vont influencer le comportement de l'uranium et notamment ses formes physiques ou chimiques (spéciation) dans les sols. Nous verrons donc dans cette partie comment évaluer l'aptitude d'un sol à fixer l'uranium, mais surtout les différents constituants tant physiques, biologiques que chimiques pouvant influencer cette spéciation de l'uranium dans les sols.

1.4.1. Evaluation de l'aptitude d'un sol à fixer l'uranium

La localisation naturelle des éléments traces dans un sol est une conséquence de son évolution pédologique qui peut être modifiée par les apports exogènes. La connaissance des associations de ces éléments avec les constituants du sol et donc la détermination de leur spéciation dans le sol permet d'augurer de leur mobilité, leur biodisponibilité et donc leur toxicité.

La spéciation chimique est rendue particulièrement complexe sur des matrices telles que les sols, et des approches opérationnelles sont la plupart du temps utilisées pour caractériser la mobilité. Ces approches opérationnelles sont les suivantes :

- La détermination de son coefficient de partage entre la matrice organo-minérale et la solution du sol.
- La spéciation chimique.

1.4.1.1. Coefficient de distribution (Kd)

Le coefficient de distribution ou Kd est défini, à l'équilibre, comme le rapport entre la concentration d'un polluant associé à la phase solide (sol) à sa concentration en phase liquide (solution du sol). Ce paramètre est le plus couramment utilisé pour caractériser la résultante des paramètres de sorption-désorption d'un élément chimique dans un sol. Il englobe donc divers mécanismes biogéochimiques, eux mêmes influencés par les propriétés intrinsèques du sol et de l'élément considéré. Cependant, utiliser ce paramètre revient à supposer exactes un certain nombre d'hypothèses, notamment que la fixation de l'élément sur le solide (sol) est une relation d'équilibre linéaire instantané et réversible excluant toute modification de masse du solide et du liquide (dissolution/précipitation).

L'utilisation de ce Kd est fortement controversé du fait de la variabilité des valeurs mesurées pour un même sol et un même radionucléide. Ces valeurs sont le plus souvent classées en fonction des caractéristiques du sol tels que pH, texture, teneur en matière organique ou en ions compétiteurs, etc..., indépendamment de leur interdépendance et de la présence d'autres paramètres pouvant influencer le Kd.

Des exemples de Kd de l'uranium pour différents types de sols agricoles ont été rapportés par l'AIEA (1994) et sont reportés dans le tableau 5. Il semble que l'uranium ait une mobilité relativement importante dans les sols.

Cette variabilité couvrant souvent plusieurs ordres de grandeurs est due aux facteurs (type de sol, pH et état d'oxydation ; la zone Eh-pH des sols et de l'uranium étant reportée sur la figure 7) étudiés, au protocole expérimental appliqué et à la validité (ou non) des hypothèses sous-jacentes à ce modèle (réversibilité, linéarité et équilibre).

Tableau 5. Quelques valeurs de Kd de l'uranium dans un système sols agricoles – solution du sol (L/kg) (d'après AIEA, 1994).

Type de sol	Valeur moyenne	Intervalle de variation
« sableux »	13	0,055 à 20 000
« Limoneux »	12	0,017 à 9000
« Argileux »	1500	4 à 490 000
« Organique »	400	2,7 à 60 000

Du fait de la grande variabilité des Kd pour un même sol et un même radionucléide, il est parfois nécessaire une représentation plus fine et notamment la détermination de la spéciation chimique de l'élément considéré.

1.4.1.2. Spéciation chimique

Les méthodes chimiques d'extractions sélectives séquentielles sont souvent utilisées (Tessier *et al.*, 1979). Chaque phase de traitement étant censée correspondre à la dissolution d'un constituant particulier du sol : matière organique, carbonates, oxydes de fer ou de manganèse. Il s'agit d'une méthode indirecte d'estimation de la localisation des éléments et non pas de la spéciation en elle même. Ces extractions

sont supposées représenter une gamme de disponibilité décroissante, allant des fractions facilement extractibles (mobiles et biodisponibles) aux fractions réfractaires.

Des techniques d'extraction différentielle (Schultz, 1998) ont été utilisées pour déterminer la biodisponibilité des radionucléides dans les sols et en déduire la relation entre ces éléments et les caractéristiques des sols.

Il existe évidemment d'autres méthodes plus fines de spéciation directe : SLRT, spectrométrie à fluorescence aux rayons X, etc...

1.4.2. Effet des constituants physiques du sol (spéciation physique)

Le devenir de l'uranium dans les sols est essentiellement commandé par des processus d'interaction avec les surfaces réactives (matière organique, minéraux, colloïdes, microorganismes...). La solubilité des espèces minérales ou organiques porteuses et la stabilité des complexes de surface sont d'ailleurs très dépendantes des conditions physico-chimiques du milieu (Eh, pH).

En fonction du pH et des conditions redox, l'uranium peut exister sous la forme U(IV) et U(VI) majoritairement, voire sous la forme U(III) pour des conditions très anaérobies et très réductrices (figure 7). Les domaines d'existence de ces différentes formes de l'uranium sont figurés sur le diagramme Eh – pH établi à 25°C avec l'eau, pour une concentration en ions uranium de 10^{-6} M (modélisation JCHESS). Sur ce diagramme simplifié figure également le domaine de Eh – pH des sols : les valeurs de Eh vont d'un maximum de +600 mV (conditions oxydantes) à un minimum d'environ -300 mV (conditions très réductrices) (Deneux-Mustin *et al.*, 2003) et les valeurs de pH des sols de 5 à 9 (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Il apparaît ainsi que pour des conditions réductrices et de très faibles pH, l'uranium est présent sous la forme U^{4+} .

En conditions oxydantes et jusqu'à des pH < 5,5, l'uranium U(VI) est présent sous la forme d'ions uranyles UO_2^{2+} dont la structure est linéaire (O – U – O)²⁺. De même, lorsque le pH augmente, les formes hydroxylées de l'U(VI) apparaissent : UO_2OH^+ , $UO_2(OH)_2$ et $UO_2(OH)_3^-$.

Il apparaît donc que dans les écosystèmes terrestres et particulièrement dans les sols (à l'exception des sols hydromorphes), qui sont des milieux aérés et dont le pH est compris en moyenne entre 5 et 9, l'uranium existe majoritairement sous l'état de valence +VI. On constate également l'absence du domaine de stabilité thermodynamique de la forme U(V) et l'instabilité de la forme U (III). C'est pourquoi dans le reste de l'étude tant bibliographique qu'expérimentale, nous ne considérerons que l'état d'oxydation +VI de l'uranium.

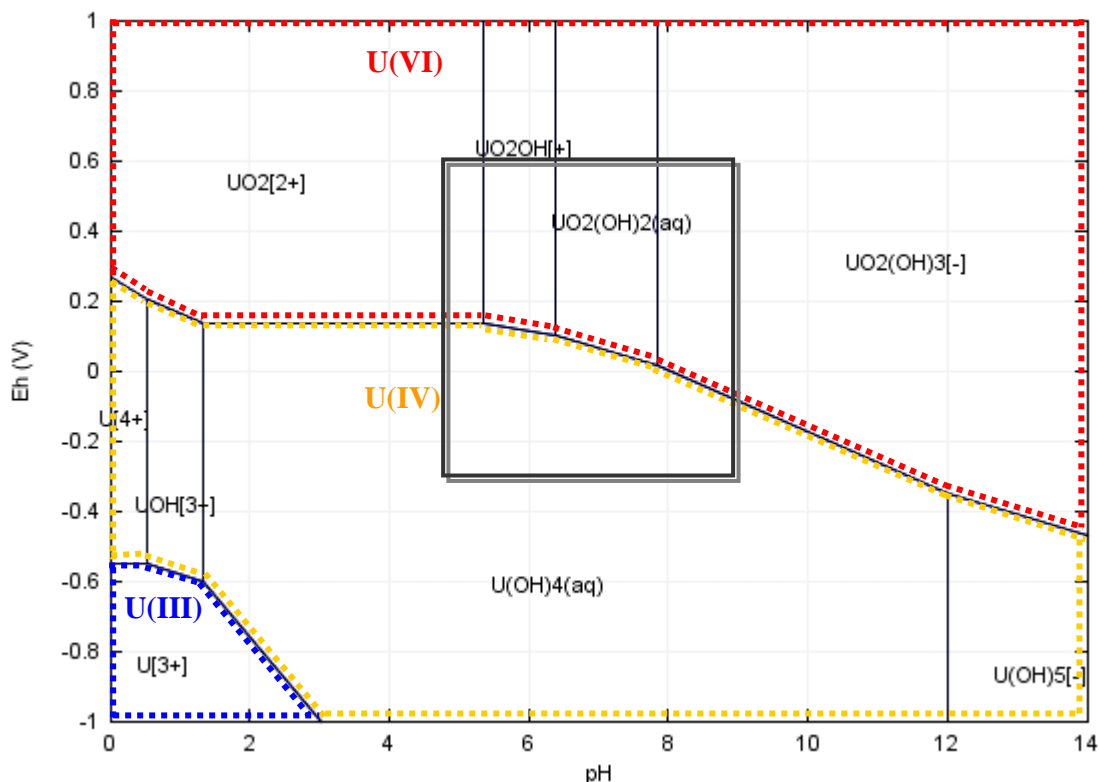


Figure 7. Diagramme Eh – pH simplifié de l'uranium pour une activité en $[\text{UO}_2]_{\text{T}}$ de 10^{-6} M à 25°C , en milieu fermé. Les domaines des états de valence des espèces sont caractérisés en rouge pour la forme U(VI), en jaune pour la forme U(IV) et en bleu pour la forme U(III) (Modélisation JCHESS), la zone Eh (-300 mV - +600 mV) – pH (5 – 9) des sols étant figurée par le rectangle noir.

1.4.2.1. Relations avec les complexants organiques

La matière organique est la composante qui joue le rôle majeur dans la dynamique de l'uranium dans les sols, spécialement dans ceux pour lesquels la elle influence fortement la pédogenèse. La matière organique représente en effet le principal vecteur de migration et de redistribution de l'uranium.

Dans ce type de sol, plus de 50 % de l'uranium total se trouve généralement associé aux composés humiques présents dans la zone d'accumulation organique. Des mécanismes similaires de rétention se rencontrent dans l'horizon de surface des sols bruns où les composés organiques d'uranium peuvent représenter jusqu'à 30 % de l'uranium total (Gueniot *et al.*, 1988).

Concernant les autres ligands organiques, entre autres, le citrate permet (comme cité précédemment) de désorber l'uranium du sol et d'augmenter la teneur en uranium dans la solution du sol (Shahandeh et Hossner, 2002 ; Huang *et al.*, 1998 ; Ebbs *et al.*, 1998).

1.4.2.2. Relations avec les oxydes et hydroxydes de fer et d'aluminium

Ces complexes sont très abondants dans les sols formés sous climat chaud. Résultant de l'altération poussée des minéraux primaires, ils présentent des sites de fixation importants pour l'uranium d'autant que, dans ces sols, la matière organique subit une évolution très rapide et que son rôle y est donc très réduit. En climat tempéré, ils ont aussi un effet non négligeable (Gueniot *et al.*, 1988). L'adsorption de l'uranium sur les oxy(hydr)oxydes (ferrihydrite, goethite, hématite..) ne se produit que par complexation de surface (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

1.4.2.3. Relations avec les argiles

Contrairement à d'autres éléments comme le césium par exemple, les minéraux argileux ne jouent qu'un rôle secondaire dans la rétention de l'uranium dans les sols. La corrélation souvent observée entre la richesse d'un sol en particules fines et sa teneur en uranium est probablement due à l'adsorption à la surface des particules et à leur « coating » d'oxydes de fer ou de substances humiques et non à une rétention de type ionique ou à une rétention intra foliaire.

1.4.2.4. Relations avec les carbonates

La présence d'ions carbonates et hydrogénocarbonates dans la solution du sol joue un rôle potentiellement important dans les processus de sorption-désorption de l'uranium dans les sols du fait de la formation de complexes carbonatés (Echevarria *et al.*, 2001). Ces composés, à cause de leur charge négative, présentent moins d'affinité que l'ion uranyle pour les constituants minéraux. Il en résulte une augmentation de la mobilité de l'uranium dans les sols carbonatés et peu pourvus en matière organique.

Ces ligands (tout comme le citrate) peuvent augmenter la sorption de l'uranium sur les particules minérales *via* la formation de complexes ternaires pour des pH de l'ordre de 8,5 (et 5 pour le citrate) avec une P_{CO_2} comprise entre la pression atmosphérique ($3,2 \cdot 10^{-3}$ Atm) et des pressions plus fortes de l'ordre de 10^{-2} atm.

1.4.3. Effet des micro-organismes du sol

La microflore du sol comprend 5 groupes principaux de micro-organismes : les virus, les bactéries, les actinobactéries, les champignons et les algues. La densité des bactéries par masse de sol est de l'ordre de 10^9 cell.g⁻¹_{sol} de bactéries et une quinzaine de kilomètres par grammes d'hyphes de champignons. Présents en forte quantité, leur biologie va déterminer leur rôle dans le sol directement ou non en association avec les autres organismes du sol. Ils jouent également un grand rôle par les transformations chimiques qu'ils entraînent dans le milieu où ils sont présents.

Ces micro-organismes vont pouvoir jouer un rôle non négligeable sur la spéciation de l'uranium dans le sol puisqu'ils influent sur la physico-chimie du sol et qu'ils peuvent aussi absorber l'uranium.

Accumulation d'uranium par les micro-organismes

Nakajima et Sakaguchi (1986) ont voulu tester la capacité d'absorption d'uranium de 83 espèces de micro-organismes (bactéries, levures, champignons et actinomycètes). Les ions uranyles furent aisément absorbés et accumulés par la plupart des espèces testées, démontrant ainsi la capacité des micro-organismes à accumuler l'uranium. Les actinomycètes et autres champignons se distinguent d'ailleurs de nombreuses bactéries et de la plupart des levures par leur accumulation sélective d'uranium et de mercure.

Réduction de l'uranium

Divers organismes présents dans le sol et l'environnement sub-surfacique ont été identifiés comme capables de réduire enzymatiquement l'U (VI) en U (IV) en conditions anoxiques. Cette réduction microbienne de l'uranyle joue donc un rôle important sur la mobilité de l'uranium dans les sols en diminuant le risque de transport de l'uranium vers et dans les hydrosystèmes grâce à la formation de composés peu solubles.

1.4.4. Spéciation de l'uranium en solution

En solution, la chimie de complexation de l'uranium est dominée par l'interaction avec des ligands oxygénés. Comme nous l'avons vu précédemment, dans les solutions de sols oxiques, l'uranium est majoritairement à l'état d'oxydation +VI

(figure 7). En conditions oxydantes et jusqu'à des pH < 5,5, l'uranium U(VI) est présent sous la forme d'ions uranyles UO_2^{2+} . Lorsque le pH augmente, les formes hydroxylées de l'U(VI) apparaissent : UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$ et $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$. En présence de carbonates, des complexes carbonatés vont pouvoir se former (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

L'ion UO_2^{2+} est susceptible de s'associer en solution avec la matière organique dissoute, les carbonates, les phosphates ou les sulfates. Ce sont ces différents mécanismes de complexation qui conditionnent pour l'essentiel son comportement dans les sols (Sheppard et Evenden, 1988) et qui expliquent que, dans les sols non remaniés par l'homme, la répartition de l'uranium en fonction de la profondeur n'est pas homogène. Lorsque l'uranium est sous forme de complexes plus ou moins solubles, il migre plus facilement en profondeur sous l'action du lessivage par les eaux de pluie que s'il était associé à la matrice minérale. En conditions réductrices (sols inondés ou au contact d'une nappe phréatique), l'uranium se trouve à l'état d'oxydation (+IV) et il a alors tendance à précipiter.

En solution, les concentrations en espèces dissoutes sont fonction principalement du potentiel redox, du pH, de la nature et teneur des ligands (les plus efficaces pour l'uranium, dans les écosystèmes, étant les hydroxydes, les carbonates, les phosphates, et les petites molécules organiques) présents. En phase liquide, la concentration de U(IV) n'excède jamais le $\mu\text{g.l}^{-1}$ alors que pour l'U(VI), elle peut atteindre la dizaine de mg.L^{-1} (Ragnarsdottir et Charlet, 2000 ; Colle *et al.*, 2001).

Hydroxydes et carbonates (effet du pH)

Les complexes carbonatés ou les hydroxocomplexes de l'uranyle ont des charges neutres ou négatives qui vont avoir un effet sur le comportement de l'ion uranyle et jouer notamment sur son adsorption.

Phosphates

En présence de phosphates, l'ion uranyle va former en fonction du pH différents complexes : $\text{UO}_2\text{H}_2\text{PO}_4^+$ (pH 2 – 3), $\text{UO}_2\text{HPO}_4^0$ (pH 3 – 6,6) et UO_2PO_4^- (pH 6,9 – 9,5) (Sandino et Bruno, 1992). Bien qu'il existe d'autres espèces susceptibles de se former, ces 3 espèces phosphatées restent les espèces prédominantes.

1.5. L'uranium dans les végétaux

Dans les années 80, des investigations ont été menées de façon à différencier la part d'uranium incorporée par les végétaux suite à un transfert de type sol-plante (culture en serres) et celle provenant de voies supplémentaires, notamment par dépôt foliaire et/ou resuspension des particules à partir du sol (expériences de plein champs) (Smith, 1981). Ces études ont ainsi mis en évidence que la voie prédominante pour l'incorporation de l'uranium par les végétaux était celle du transfert racinaire. C'est pourquoi, dans notre étude nous nous sommes focalisés sur le transfert racinaire de l'uranium dans un système milieu simplifié-plante.

Dans cette partie, nous verrons quels sont les facteurs influençant l'absorption d'uranium, les teneurs en résultant dans les végétaux, la mobilité de l'élément et enfin sa localisation et sa spéciation dans la plante.

1.5.1. Facteurs influençant l'absorption d'uranium

La teneur en uranium dans les végétaux est dépendante de nombreux facteurs tant physiologiques qu'environnementaux. Sheppard *et al.* (1980) suggèrent que la concentration en uranium dans les cendres dépend de la physiologie de la plante, son adaptation à son environnement géochimique (Lopatkina, 1970), la partie de la plante mesurée, la disponibilité de l'élément dans le sol et la composition chimique du milieu (Cannon, 1952).

Nous verrons successivement dans la revue de littérature ci-après les facteurs abiotiques (environnementaux) influençant l'absorption d'uranium, puis les facteurs physiologiques.

1.5.1.1. Facteurs environnementaux

La teneur dans les plantes semble dépendre de la teneur en uranium dans le milieu (Gulati *et al.*, 1979 ; Ramani *et al.*, 2002), mais aussi de l'importance de l'irrigation, du pH du milieu et du pH des cellules de la plante (Gulati *et al.*, 1979). Ainsi, Gulati *et al.* (1980) ont constaté que l'absorption d'uranium par des plants de tomates et de blé augmentait avec l'augmentation de la teneur en uranium dans le sol (avec un potentiel d'absorption plus élevé pour la tomate que pour le blé), mais aussi qu'il était possible de réguler l'absorption d'uranium par ces plantes en contrôlant le niveau d'irrigation. Si Berdnikova (1964) avait aussi mis en évidence qu'il existait une

corrélation entre les teneurs en uranium dans les végétaux, le sol et l'eau d'irrigation, Yamamoto *et al.* (1968), en revanche, ont observé que cette teneur dans les végétaux n'était pas toujours liée à celle dans les sols. Dans cette étude, l'auteur explique les différences de concentrations dans les légumes feuilles et racine, et dans les pommes de terre collectées dans diverses localités par des différences de concentration en uranium dans l'eau d'irrigation.

Enfin, la concentration en solution peut aussi revêtir une grande importance. Sheppard et Evenden (1988) ont constaté que l'absorption des radionucléides par les plantes est préférentiellement corrélée à leur concentration en solution plutôt qu'à leur concentration totale dans le sol.

Certains auteurs ont voulu savoir aussi si le facteur saisonnier pouvait affecter les teneurs en uranium relevées dans les végétaux. Il semble que pour la plupart des espèces étudiées, la saison ne soit pas un facteur influençant la concentration en uranium, bien que Cannon (1952) ait reporté que tout au long de la saison de croissance, la teneur en uranium avait augmenté dans les arbres à feuilles pérennes mais avait diminué dans la plupart des espèces à feuilles caduques. Ces résultats restent difficilement comparables car les espèces et le milieu d'étude considérés diffèrent totalement.

Dunn (1981), quant à lui, n'a pas relevé de changements saisonniers significatifs dans la teneur en uranium des brindilles de pin noir collectées dans le nord Saskatchewan. Il a cependant rapporté une diminution de 27,3 % de la teneur en uranium dans les aiguilles de pin noir entre juin et août. De la même façon, aucun effet saisonnier sur la teneur en uranium dans le *juniperus* n'a été observé.

1.5.1.2. Facteurs physiologiques

D'un point de vue physiologique Cannon et Kleinhampl (1956) ont constaté que la capacité d'absorption de l'uranium par les plantes dépendait du pH de la sève des cellules de la racine et ont conclu que l'uranium était absorbé plus facilement par les plantes pour lesquelles la sève des cellules était à un pH inférieur à 5,2 tel que dans les conifères ou certains membres de la famille des Rosacées.

D'autres facteurs liés à la physiologie de la plante peuvent intervenir comme la Capacité d'Echange Cationique Racinaire (CECR).

Les cations divalents, tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} , sont préférentiellement liés aux sites d'échange de cations, sites chargés négativement. La CECR représente le nombre de sites d'échange de cations (anions fixés, groupements carboxyliques R-COO^-)

situés dans les parois des cellules de la racine. Lorsque la CEC des tissus augmente, la capacité d'échange et d'adsorption des cations augmente (Marschner, 1995).

La CECR, très dépendante des espèces et variétés, diffère entre les plantes dicotylédones et monocotylédones, pouvant résulter pour les plantes cultivées en une intense compétition pour certains éléments essentiels. Ainsi, les dicotylédones, dont la CEC racinaire est la plus élevée, absorbent toujours des cations polyvalents de façon plus efficace que les monocotylédones dont la CEC est plus faible. Les monocotylédones, à l'opposé, seront plus efficaces pour absorber les cations monovalents.

L'âge des racines ou de certaines parties de racine influence aussi la CECR. En effet, les parois secondaires des cellules, très pauvres en pectines sont formées dans les parties les plus âgées des racines de telle sorte que l'augmentation en terme de poids sec n'est pas accompagnée d'une augmentation proportionnelle des sites d'échange (CECR plus élevée à l'apex des racines). Diverses études mettent en évidence l'influence de l'âge de la racine. Crooke *et al.* (1960) ont montré que la CECR, la quantité de pectine, la respiration et le contenu en azote étaient les plus importants au bout de la racine et diminuaient lorsqu'on s'en éloignait. Chamuah et Dey (1982), travaillant sur des plants de thé ont également voulu tester l'influence du stade de développement des racines. Dans le cas des plants de thé, les portions les plus jeunes des racines en croissance sont blanches et plus ou moins translucides. Lorsque l'âge de la racine avance, sa couleur se modifie allant du crème jusqu'au brun et enfin au brun rougeâtre pour les parties les plus anciennes. Ces auteurs ont donc mesuré la CECR pour ces différents stades de croissance de la racine, défini par des couleurs. Les valeurs de CEC ainsi obtenues sont très variables, allant de 8,33 (pour les parties les plus anciennes) à 48,20 meq.100g⁻¹ poids sec (pour les racines les plus jeunes) (tableau 6). La proportion de jeunes racines par rapport aux racines plus anciennes devient donc un facteur important pour la CECR de l'ensemble de la racine, mais surtout pour l'absorption des éléments.

Tableau 6. Capacité d'Echange Cationique Racinaire (CECR) de différents segments de racines chez des clones de plants de thé de 7 mois (moyenne de 4 réplicats) (d'après Chamuah et Dey, 1982).

Couleur des segments de racine	CEC (mequiv.100g ⁻¹ poids sec)	
	moyenne	écartype
Translucide (les plus jeunes)	48,20	0,48
Blanc	38,60	0,53
Blanc crème	36,00	0,54
Crème	31,88	0,60
Brun crème	20,32	0,62
Brun	12,12	0,56
Brun rougeâtre (les plus anciennes)	8,33	0,57
Racine entière	26,50	0,59

Par ailleurs, le statut nutritionnel des racines ou la présence d'éléments toxiques peuvent également influencer la CECR. Cela peut résulter de la modification de la « moyenne d'âge » du système racinaire. En effet, les éléments toxiques inhibent la croissance des racines et, de cette façon, augmente la moyenne d'âge du système racinaire, alors qu'un apport adéquat de nutriments augmente le système racinaire avec des parois développées de jeunes racines (Dufey *et al.*, 2001). Enfin, le pH du milieu extérieur peut influencer la CECR et la diminuer lorsque le pH extérieur s'abaisse. Rengel et Robinson (1989) ont ainsi observé que du fait du faible pH de la solution nutritive utilisée (pH = 4,2), la dissociation des ions H⁺ des groupements carboxyliques des acides polygalacturoniques contenus dans les parois des cellules était atténuée, engendrant une CEC racinaire plus faible que celle attendue à plus fort pH.

1.5.2. Teneur en uranium dans les végétaux

Certains auteurs rapportent une teneur en uranium dans les sols comprise entre 2,13 et 3,27 ppm et entre 0,22 et 1,77 ppm dans différentes plantes (Singh, 1997).

La teneur dans les légumes fruits et légumes racines est plus élevée comparée à celle des fruits et des céréales. C'est dans le riz et le blé (grains) que les teneurs sont les plus faibles. Par ailleurs, bien que la teneur en uranium soit plus élevée dans

la racine que dans les feuilles pour les légumes feuilles (épinard, chou, etc.), dans les légumes racines tels que la carotte, l'uranium est plus concentré dans les feuilles que dans la racine. Des résultats similaires ont été obtenus par Prister. Choudhury et Goswami (1990), quant à eux, retrouvent des teneurs relativement proches dans les feuilles et la racine des légumes racines (carotte et radis) et des teneurs plus élevées dans les feuilles d'épinard (légume feuille), plutôt que dans la racine (tableau 7).

Concernant les céréales, le maïs présente la plus grande capacité d'absorption d'uranium, tandis que le blé présente la plus faible (Singh, 1997).

Les différences dans l'intensité de la translocation des éléments minéraux dans la plante sont normalement dépendantes des fonctions physiologiques/biochimiques de l'élément considéré ou du type de plante étudié. Certaines plantes accumulent et transloquent bien plus l'uranium que d'autres. Les résultats indiquent que l'absorption d'uranium pourrait donc être un processus contrôlé génétiquement. Certaines espèces pouvant être des indicateurs d'une forte accumulation d'uranium comparé à d'autres espèces, une attention doit donc être menée dans le contrôle des entrées dans les chaînes alimentaires (Saric *et al.*, 1995).

Tableau 7. Teneurs en Uranium (ppm) relevées dans des sols et dans les différentes parties des plantes considérées qui ont poussé sur ces sols (d'après Choudhury et Goswami, 1990).

type	végétaux	Sol / organes végétal	Concentration en U (ppm)
Céréales	Riz	Sol	$2,72 \pm 0,04$
		Racine	$0,64 \pm 0,01$
		Tige	$0,37 \pm 0,006$
		Feuilles	$0,69 \pm 0,01$
		Grains	$0,34 \pm 0,006$
	Blé	Sol	$2,67 \pm 0,04$
		Racine	$0,30 \pm 0,005$
		Tige	$0,23 \pm 0,005$
		Feuilles	$0,49 \pm 0,009$
		Grains	$0,22 \pm 0,004$
	Maïs	Sol	$2,44 \pm 0,04$
		Racine	$0,80 \pm 0,01$
		Tige	$0,48 \pm 0,009$
		Feuilles	$0,65 \pm 0,01$
		Grains	$0,42 \pm 0,008$
Légume feuille	Epinard	Sol	$2,61 \pm 0,03$
		Racine	$0,63 \pm 0,01$
		Tige	$0,44 \pm 0,007$
		Feuilles	$0,71 \pm 0,01$
Légumes racines	Carotte	Sol	$2,28 \pm 0,03$
		Racine	$0,60 \pm 0,01$
		Tige	$0,34 \pm 0,006$
		Feuilles	$0,66 \pm 0,01$
	Radis	Sol	$2,63 \pm 0,04$
		Racine	$0,64 \pm 0,01$
		Tige	$0,44 \pm 0,001$
		Feuilles	$0,66 \pm 0,01$
Légumes fruits	Tomate	Sol	$2,16 \pm 0,03$
		Racine	$0,46 \pm 0,009$
		Tige	$0,33 \pm 0,007$
		Feuilles	$0,39 \pm 0,008$
		Fruits	$0,34 \pm 0,007$

Il semble donc que la distribution d'uranium (à partir d'une absorption racinaire) dans les végétaux varie en fonction du type de végétal considéré et que l'uranium ne soit pas systématiquement concentré dans la racine, mais puisse aussi se retrouver plus fortement concentré dans les feuilles (Morishima *et al.*, 1977).

Saric *et al.* (1995) ont aussi constaté que les plantes matures avaient souvent des concentrations en uranium plus élevées que les jeunes plants. Ainsi, les feuilles accumulaient plus d'uranium que les organes de stockage et les feuilles âgées accumulaient plus que les jeunes. Il en ressort donc que des quantités non négligeables d'uranium pouvaient être introduites dans le corps humain si les feuilles relevaient de la consommation humaine.

1.5.3. Flux d'uranium dans les végétaux

La mobilité de l'uranium dans les plantes est largement conditionnée par l'adsorption sur les constituants des cellules de la paroi. Les concentrations sont souvent plus élevées dans les tissus des parties les plus basses de la plante et sont souvent les plus fortes à la surface des racines. La plus grande partie de l'uranium soluble peut pénétrer l'épiderme et être précipité ou lié aux structures cellulaires dans la racine, près du point d'absorption, pouvant ainsi expliquer la localisation préférentielle (mais pas unique) de l'uranium dans les racines des plantes (Hanson, 1980).

Les concentrations dans les tissus peuvent aussi évoluer au cours du temps. Ainsi, comme le montre la figure 8, chez les arbres, l'accumulation de l'uranium augmente lentement dans les branches durant la phase de croissance et diminue ensuite du fait d'une translocation de l'uranium vers les autres parties de l'arbre lorsque la croissance des branches devient moins active (Sheppard et Evenden, 1988). Cannon *et al.* (1956) ont rapporté qu'une grande partie de l'uranium absorbé par les racines était déposée autour des cellules de la racine et que le reste était transporté vers les feuilles et les branches.

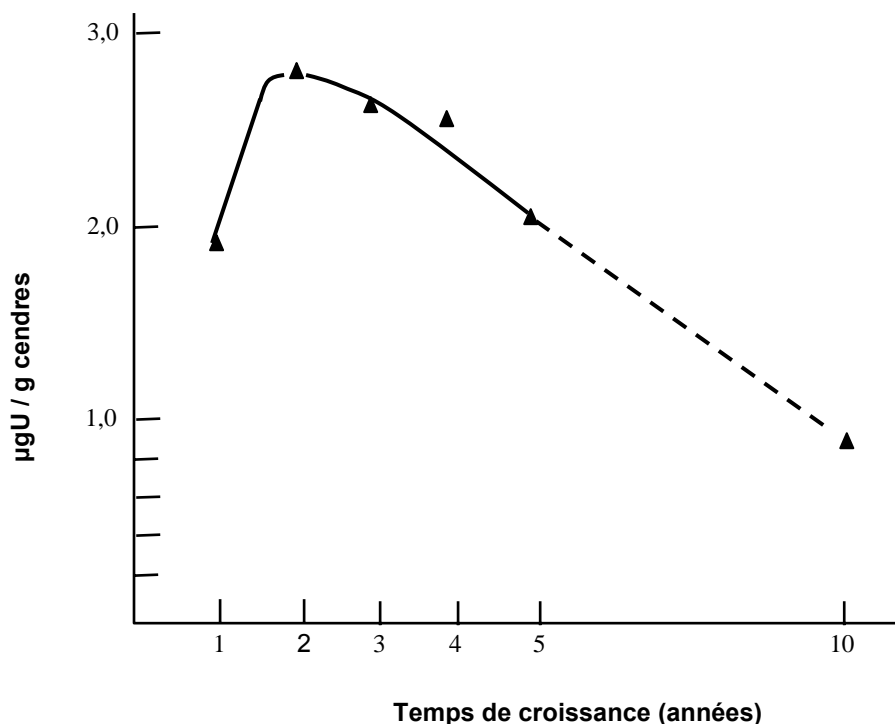


Figure 8. Concentration en uranium dans les branches d'épicéas en fonction de leur âge (de Dunn, 1981).

1.5.4. Spéciation et localisation de l'uranium dans les végétaux

Les études relatives à la localisation ou à la spéciation de l'uranium ont été principalement menées chez les organismes animaux et les micro-organismes. Cependant, les quelques données concernant la spéciation de l'uranium dans la plante semblent être similaires. Les métaux tels que l'uranium ou le cadmium, entre autres, ont une forte affinité pour les protéines et, sauf transitoirement et à faible concentration, ne peuvent exister sous forme libre dans l'organisme. Ils sont retrouvés sous forme complexée, liés aussi bien à des ligands de fort poids moléculaire que faible (Foulkes 2000).

Spéciation de l'uranium dans la plante

La connaissance de la nature et de la localisation des complexes de l'uranium, formés après absorption par les plantes est une information nécessaire pour décrire le comportement de l'uranium dans l'environnement et donc dans les chaînes alimentaires. Peu d'études concernent cette spéciation de l'uranium dans la plante après absorption et sa localisation.

Jusqu'à présent, il n'y avait pas de données disponibles quant à la spéciation de l'uranium dans la plante. Et connaître la nature des espèces disponibles dans le milieu d'exposition ne permet pas de conclure sur la spéciation à l'intérieur de la plante. Une étude ancienne (Whitehead *et al.*, 1970) suggère que les protéines (50 % de l'uranium total des feuilles est lié aux protéines de la paroi de la cellule) et les acides nucléiques sont les deux principales substances capables de chélater l'uranium dans les cellules vivantes. Dounce *et al.* (1949) ont rapporté que l'uranium se liait aux protéines notamment aux groupements carboxyle libres, mais aussi que les complexes les plus stables de l'uranium étaient ceux formés avec les composés comportant un certain nombre d'atomes de phosphore, tels que les acides nucléiques, l'ATP et les polymères inorganiques linéaires de phosphate (d'après les travaux sur la levure de Rothstein et Meier, 1948). Frindik (1986), quant à lui, a émis l'hypothèse que dans les jeunes parties aériennes des plantes, l'uranium se retrouvait lié sous forme de complexe protéiné.

Très récemment, Günther *et al.* (2003) ont focalisé leurs études sur la détermination de la spéciation de l'uranium dans des plants de lupin après absorption d'uranium (méthodes de spectroscopie à fluorescence (TRLFS) et à absorption des rayons X (XAS)). Ils ont ainsi pu mettre en évidence que la spéciation de l'uranium dans la plante différait de celle dans le milieu d'exposition (expériences réalisées sur des cultures hydroponiques et eau interstitielle du sol), mais qu'elle n'était pas liée à l'espèce de plantes investiguée puisqu'elle restait la même entre les 2 espèces considérées : la mâche et le lupin. L'uranium reste ainsi dans la plante à l'état d'oxydation (+VI), même après avoir été absorbé. Il est majoritairement lié à des groupements phosphates organique et/ou inorganique sous la forme de complexes uranyle (VI) – phosphate. Par ailleurs, la spéciation chimique de l'uranium reste identique dans les tiges, feuilles ou racines, indépendamment de sa spéciation chimique dans le milieu d'exposition.

De l'avis d'Acqua (1912), l'uranium est absorbé par les racines des plantes et est stocké sous forme d'un dépôt jaune dans les noyaux des cellules du méristème, entraînant une destruction de la chromatine et l'arrêt de l'activité nucléaire. Par ce processus, la racine empêche à une grande partie de l'uranium d'entrer dans les parties aériennes de la plante.

Cette spéciation est commune aux différents organismes existants puisque des études sur des souches de micro-organismes (*Streptomyces longwoodensis*), réalisées par Friis et Myers-Keith (1986), ont également révélé que l'uranium se

retrouvait dans la paroi cellulaire (12%) et que la plus grande partie était associée à la fraction cytoplasmique des cellules et qu'il pouvait être lié aux résidus phosphodiesterés présents dans ces deux compartiments. L'absorption d'uranium était, dans ce cas, fonction du contenu en phosphore des cellules avec une stœchiométrie phosphore : uranium de 1 : 1. Morishima *et al.* (1977) ont d'ailleurs rapporté une plus forte corrélation entre la teneur en uranium et celle en phosphore dans les légumes feuilles, plutôt qu'avec le calcium.

Localisation cellulaire de l'uranium

Les données bibliographiques concernant la localisation cellulaire de l'uranium dans les organes des végétaux font aussi grandement défaut. Les études portent essentiellement sur la quantification du transfert (et donc les teneurs en uranium dans les organes) et les moyens de phytoremédiation. Même si les informations sur le rôle de l'uranium dans la plante sont limitées, l'uranium est accumulé dans des quantités identiques aux autres métaux lourds.

L'ensemble des données montrent que l'uranium est préférentiellement localisé dans la racine des plantes. Le ratio racine/tige peut être par exemple de 10/1 dans le cas de plantule de soja soumis à de fortes concentrations en uranium (42 mg/L) (Murthy *et al.*, 1984). Ces observations sont en accord avec les travaux de Rothstein *et al.* (1948) qui ont rapporté que l'uranium formait des complexes dissociables avec certains groupes actifs à la surface de la cellule, tels que les groupements carboxyle, hydroxyle ou phosphate (Rothstein et Meier, 1951). Cette liaison couplée à une incapacité à pénétrer la barrière endodermique peut mener à l'accumulation de l'uranium dans l'apoplasme de la racine (Murthy *et al.*, 1984).

Quelques études ont été menées sur d'autres métaux traces, notamment le cadmium, de manière à déterminer la microlocalisation dans la racine par observation microscopique (Microscopie Electronique à Transmission). Rauser et Ackerley (1987) ont ainsi mis en évidence que du Cd était décelé dans des granules denses aux électrons à l'intérieur des cellules de parenchyme radiculaire de *Agrostis gigantea* et de *Zea Mays*, exposés à 3 mM de CdSO₄. Ces granules sont retrouvés dans le cytoplasme et les vacuoles des cellules corticales en différenciation et des cellules matures, et dans le noyau des cellules non différenciées. Ces granules contenant le Cd étaient toutefois absents des parois cellulaires et des cellules épidermiques alors que Khan *et al.* (1984) ont observé, dans les racines de maïs, des dépôts de Cd denses aux électrons dans la paroi nacrée des tubes criblés et spécialement dans la lamelle moyenne séparant l'endoderme du péricycle.

Cependant, ces dernières observations ont été faites sur des racines traitées au H₂S de manière à précipiter le Cd et pouvoir ainsi le détecter. Le fait d'induire la précipitation du Cd explique les différences d'observations.

Le plomb, quant à lui, est retrouvé principalement dans les parois et vacuoles des cellules de la racine, localisation le rendant non toxique pour les cellules de la racine et la plante dans son ensemble et constituant donc un processus de détoxification (Wierzbicka et Antosiewicz, 1993).

La simple présence de certains composés peut avoir un effet défavorable sur les organismes. Le préalable à la toxicité est de savoir si les organismes peuvent absorber ces éléments.

L'étude de la biodisponibilité d'un élément pouvant être considéré comme toxique dans le milieu d'exposition est donc nécessaire pour estimer son transfert dans les organismes vivants et par là sa bioaccumulation et son éventuelle toxicité. Il a en effet été établi que la bioaccumulation d'un élément ne dépendait pas de sa concentration totale dans le milieu d'exposition mais de la teneur en ion libre (modèles FIAM ou BLM). Cependant des exceptions à cette théorie existent.

Le schéma présenté ci-dessous (figure 9) établit les différentes interactions d'un radionucléide avec les différentes phases en présence et pouvant jouer sur sa biodisponibilité à la plante.

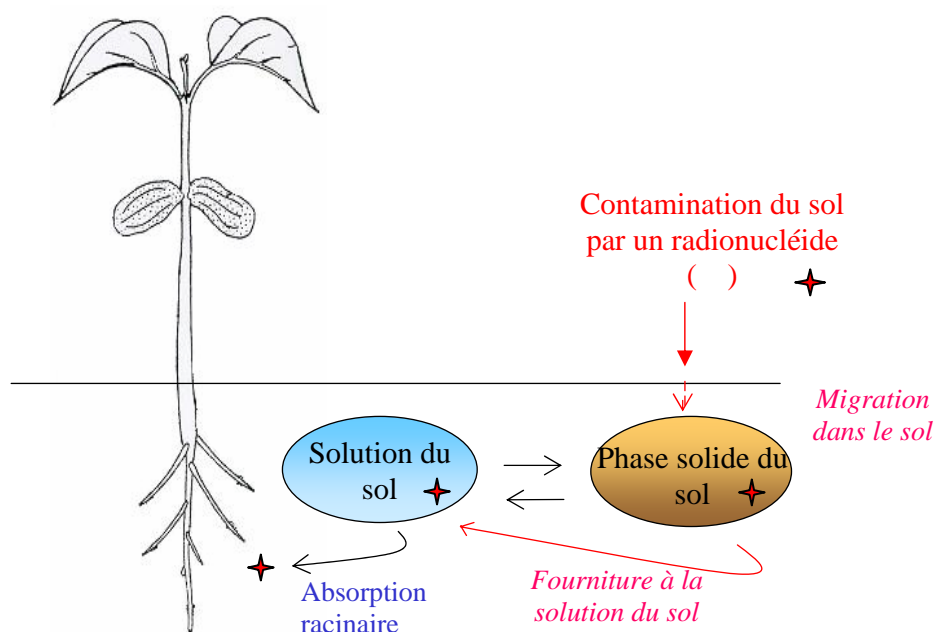


Figure 9. Schéma de migration et d'évolution d'un radionucléide présent dans un sol jusqu'à la plante.

1.6. Théorie de la biodisponibilité des métaux

1.6.1. Notion de biodisponibilité

Les risques associés aux sols pollués, contamination de la chaîne alimentaire et phytotoxicité, sont étroitement liés à la biodisponibilité des éléments toxiques, c'est-à-dire leur aptitude à pénétrer dans les différents compartiments de la chaîne alimentaire. La phytodisponibilité (ou biodisponibilité pour les végétaux) peut être définie comme la quantité d'un élément donné pouvant être transférée dans la plante durant son développement. Elle résulte d'un ensemble de processus qui contribuent au transfert de l'élément de la phase solide du sol aux tissus de la plante (fourniture à la solution du sol, transport par diffusion ou advection vers les surfaces racinaires et enfin prélèvement par les cellules racinaires suivi du transport et de sa distribution à l'intérieur du végétal).

La biodisponibilité est donc contrôlée par de nombreux facteurs liés au sol (forme chimique de l'élément, réactivité, composition du sol (Eh, pH, matière organique, etc..), à la plante (aptitude à prélever, transférer et accumuler l'élément considéré) et aux conditions climatiques (température et humidité dont dépendent les différents processus) (Bourelle et Berthelin, 1998).

1.6.2. Modèles de l'ion libre (FIAM) et du ligand biotique (BLM)

Jusqu'à présent, le modèle le plus utilisé dans les études environnementales est le Modèle de l'ion libre (FIAM) ou son dérivé le Modèle du Ligand Biotique (BLM). Ce modèle propose de formaliser, en accord avec 4 étapes et des hypothèses associées (présentées par la suite), la biodisponibilité et la toxicité d'un élément pour un organisme, en liaison avec sa spéciation chimique (Campbell, 1995, 2002).

Premier modèle mis en place, le FIAM a par la suite été modifié et la compétition entre les cations présents dans le milieu d'exposition (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , H^+) et les métaux traces pour la complexation aux sites de surface des cellules a été incluse. Le « ligand biotique » est supposé représenter un sous-ensemble physiologiquement actif de sites chargés à la surface de la membrane. Le modèle BLM suppose alors que l'interaction métal-ligand biotique puisse être caractérisée par un processus d'adsorption de surface.

Les tentatives de lier les propriétés physico-chimiques de la solution homogène à la biodisponibilité d'un métal doit tenir compte des 4 étapes suivantes (figure 10) :

- Le transport de masse du métal, de la solution homogène à l'interface biologique ;
- La spéciation du métal dans le micro-environnement de l'interface biologique ;
- La complexation de surface du métal avec les ligands physiologiquement actifs des membranes ;
- L'internalisation trans-membranaire du complexe métal – transporteur.

Ces modèles, FIAM ou BLM reposent également sur différentes hypothèses :

- (1) L'étape limitante de la vitesse de réaction de la bioaccumulation du métal est l'internalisation par les transporteurs de la membrane ;
- (2) Les cinétiques d'internalisation sont de premier ordre ou de pseudo-premier ordre ;
- (3) Le transport de masse du métal entre la solution homogène et l'interface biologique n'est pas limitant en termes de vitesse ;
- (4) La spéciation du métal à proximité immédiate de l'interface biologique n'est pas significativement différente de celle de la solution homogène ;
- (5) Un équilibre rapide est établi entre les espèces métalliques à proximité immédiate de l'interface et les ligands de la membrane ;
- (6) Pour une solution de composition fixe, l'activité de surface du site métal – ligand membranaire est constante ;
- (7) Aucune modification significative de l'interface biologique ne survient (la densité et la nature des transporteurs de la membrane restent constantes pour toutes les conditions étudiées) ;

- (8) Aucune modification significative de la régulation/internalisation biologique n'est induite par la liaison du métal avec les sites transporteurs ou par la modification d'autres paramètres étudiés (pH, etc.).

Les 4 étapes décrites et les 8 hypothèses associées sont un pré-requis pour toutes les réponses biologiques, *i.e.* l'internalisation d'un métal doit se produire pour qu'il y ait des réponses de toxicité.

Ce modèle peut décrire de façon plus ou moins satisfaisante les interactions métal – organisme selon la validité des hypothèses décrites précédemment (Garnier-Laplace *et al.*, 2004).

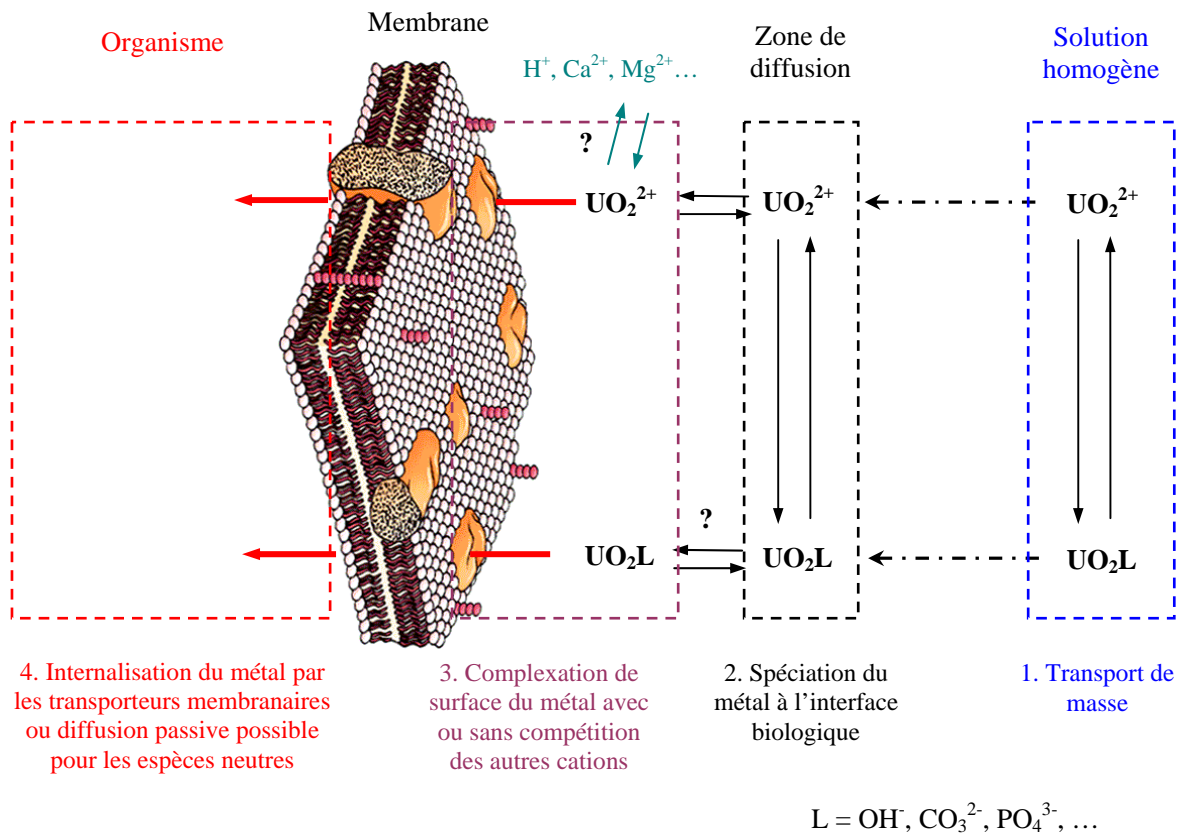


Figure 10. Processus impliqués dans la bioaccumulation de l'uranium par les organismes.

La biodisponibilité d'un métal peut donc diminuer selon deux processus :

- Soit par une diminution de l'activité de l'ion libre en solution, et donc diminution de la fixation du métal sur les sites biologiques récepteurs.

Les ligands du métal peuvent jouer ce rôle. Dans le cas de l'uranium, ce peut être des ligands inorganiques tels que les phosphates ou les carbonates, ou bien organiques tels que le citrate, molécule organique qui peut être exsudée par la racine.

- Soit par une augmentation de la concentration en ions compétiteurs, diminuant ainsi la quantité de métal liée aux sites récepteurs, ions compétiteurs tels que Ca^{2+} ou Mg^{2+} .

1.6.3. Application à l'uranium

Une comparaison des facteurs de transfert sol - plante pour l'uranium a montré que la présence ou l'absence de certains éléments dans le sol pouvait affecter considérablement l'absorption d'uranium par les plantes. Ainsi, les hauts niveaux de phosphates diminuent l'absorption d'uranium par les plantes tandis que la présence de sulfates ou de carbonates a pour effet d'amplifier cette absorption (Van Netten, 1982).

1.6.3.1. Effet des ions complexants

A. Complexants inorganiques : les phosphates

Généralités :

Les plantes absorbent les phosphates sous forme d'anions inorganiques à partir de la rhizosphère, donc de la zone proche entourant leurs racines. Les concentrations en phosphate dans la rhizosphère sont très faibles, communément inférieures à 2 μM , alors que les concentrations dans les cellules sont de l'ordre du millimolaire (Smith *et al.*, 2000).

A la différence du nitrate ou du sulfate, le phosphate n'est pas réduit dans les plantes et reste sous sa forme la plus oxydée. Après absorption, au pH physiologique principalement sous la forme H_2PO_4^- , il reste soit sous forme de phosphate inorganique (Pi), soit il est estérifié pour donner un simple ester de phosphates (C – O – P) tels que dans les sucres, ou enfin il peut être attaché à un autre phosphate par la liaison pyrophosphate riche en énergie (ATP).

Le phosphate inorganique absorbé par les racines est incorporé en quelques minutes dans un phosphate organique et est à nouveau relargué sous forme de

phosphate inorganique dans le xylème. Le phosphore, en tant que constituant des structures des macromolécules, est particulièrement retrouvé dans les acides nucléiques ADN et ARN.

Les besoins en phosphore des plantes pour une croissance optimale avoisinent les 0,3 – 0,5 % de la matière sèche pendant la phase végétative de croissance. La probabilité de toxicité du phosphore augmente pour des teneurs supérieures à 1% de matière sèche. La déficience en phosphore peut également entraîner des modifications physiologiques avec notamment accumulation de carbohydrates ou de pyruvate dans les zones méristématiques des racines (Cierieszko *et al.*, 1998 ; Juszczyk et Rychter, 2002), la production de radicaux libres dans les racines (Malusà *et al.*, 2002), etc., chez *Phaseolus vulgaris*. A la différence de la croissance des parties aériennes, la croissance racinaire est beaucoup moins inhibée par les carences en phosphore entraînant ainsi une diminution du rapport parties aériennes – racine, en terme de matière sèche, en cas de carence. Ainsi, chez *Phaseolus vulgaris*, ce ratio s'abaisse de 5,0 pour des plantes suffisantes en phosphore, à 1,9 en cas de carence. L'autre conséquence de cette carence étant de modifier la division et la répartition des carbohydrates dans la racine. Chez *Phaseolus vulgaris*, 22,7 % de la totalité des carbohydrates présents dans la plante sont retrouvés dans la racine dans les plantes carencées, contre 15,7 % dans les plantes non limitées (Marschner, 1995).

Effet des phosphates :

Peu d'études relatent la complexation des phosphates avec l'uranium et son effet sur la toxicité. Une étude menée par Nakajima *et al.* (1979) sur l'algue verte *Chlorella regularis* a révélé que l'absorption d'uranium par cette algue était affectée par la présence d'ions phosphates dans le milieu aux pH 5 et 8. Ainsi, l'augmentation de la teneur en phosphates dans la solution diminuait rapidement l'absorption d'uranium par les cellules. Plus récemment, Fortin *et al.* (2004) ont également démontré que, pour une autre algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, la complexation de l'uranium par les ions phosphates (pour des concentrations en phosphates réalistes dans l'environnement) réduisait la biodisponibilité de l'uranium et donc que la forme complexée uranium-phosphate ne contribuait pas de façon significative à l'absorption de ce métal.

Aucune étude concernant l'influence des phosphates sur le transfert d'uranium dans les végétaux supérieurs n'a encore été réalisée. Les seules études relatant

l'effet de complexation de l'uranium dans le système sol-plante portent sur la chélation de l'uranium par des acides organiques, notamment le citrate.

B. Les complexants organiques

Généralités :

Les acides organiques sont des composés comportant un ou plusieurs groupes carboxyles, et qui sont retrouvés dans tous les organismes. Selon la quantité de groupements carboxyliques, ceux-ci portent plus ou moins de charges négatives et peuvent de ce fait complexer les cations métalliques présents dans la solution. Les acides organiques sont impliqués dans de nombreux processus du sol incluant la mobilisation et l'absorption de nutriments par les plantes et les micro-organismes, la détoxification des métaux par les plantes, la prolifération microbienne dans la rhizosphère et la dissolution des minéraux du sol menant à la pédogenèse (Marschner, 1995). Il est important d'avoir une attention particulière concernant la présence de ces agents chélatants du fait de leur rôle potentiel dans l'augmentation de la mobilisation des ions métalliques dans les sites de dépôts des déchets nucléaires par exemple.

Les principaux flux et pools d'acides organiques dans le sol sont synthétisés et reportés sur la figure 11.

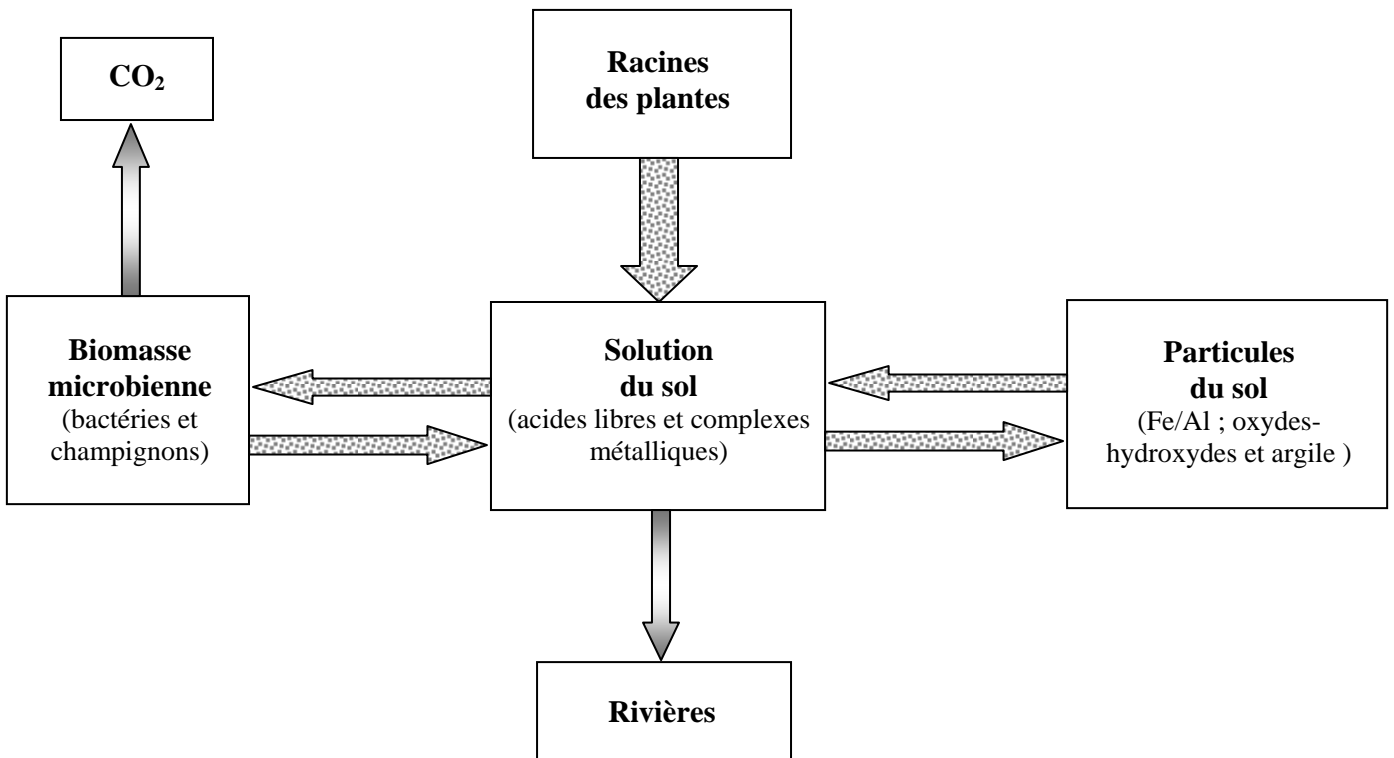


Figure 11. Diagramme schématique des principaux flux et pools d'acides organiques dans le sol (d'après Jones, 1998).

L'apport d'acides organiques au sol provient majoritairement des exudats racinaires, de la matière végétale morte et des produits de la décomposition microbienne (Jones, 1998). En effet, la concentration en acides organiques dans le cytosol (0,5 – 10 mM) est 1000 fois plus élevée que les teneurs retrouvées dans la solution du sol (0,5 – 10 μ M).

La composition des exsudats racinaires est hautement variable et dépend de l'espèce végétale considérée, de son âge et des conditions physico-chimiques du milieu.

Le degré de complexation dépend de l'acide organique considéré (nombre et proximité de groupements carboxyliques), de la concentration et du type de métal, mais aussi du pH de la solution du sol (Jones, 1998).

Le citrate :

Dans les sols, la solubilité de certains actinides (uranium, plutonium) augmente drastiquement de plusieurs facteurs sous l'influence de certains composés comme le citrate (Keiling *et al.*, 1991). Cependant, la biodégradation de ces complexes en composés insolubles peut retarder la migration de ces éléments (Francis, 1992). Une attention particulière est portée sur le citrate car il peut être présent non seulement dans les rejets des installations nucléaires (Keiling *et al.*, 1991), mais surtout, il existe naturellement dans l'environnement et peut être exsudé au niveau des racines des plantes supérieures.

Spéciation du citrate avec l'uranium :

Le citrate, acide hydroxycarboxylique, forme différents types de complexes avec les métaux, incluant les formes bidentates, tridentates, binucléaires et polymériques. Le type de complexes formés dépend non seulement du pH et de l'état d'oxydation du métal, mais aussi du rapport métal – citrate. En particulier, les complexes fer et uranium forment une espèce binucléaire avec le citrate aux pH 3,5 et 6,0 (Dodge, 2002). L'uranium peut former un complexe binucléaire composé de 2 ions uranyles et de 2 anions citrate incluant 4 groupes d'acide carboxylique et deux groupements hydroxyle (Rajan, 1965). Des expériences de biodégradation de complexes métal – citrate menées par Francis *et al.* (1992) ont révélé que ce complexe binucléaire n'était pas dégradé, la sélectivité des anions citrate pour l'uranium étant due à la haute affinité de l'ion uranyle pour les groupements carboxyliques (Koglin *et al.*, 1978 ; shangbag, 1981 ; Munier-Lamy, 1987).

Influence du citrate sur la biodisponibilité :

Huang *et al.* (1998) ont pu constater que l'application de 20 mmol/kg_{sol} de citrate pouvait augmenter les concentrations en uranium dans la solution du sol d'un facteur 200 et d'un facteur 1000 la concentration en uranium dans la tige de la moutarde indienne. Ils ont ainsi montré que l'addition d'un agent complexant spécifique de l'uranium est plus efficace pour augmenter sa solubilité à court terme que l'acidification.

Mais si sa présence dans le sol a pour effet d'augmenter l'accumulation d'uranium dans les parties aériennes, la réponse des plantes semble cependant être concentration-dépendante. Ainsi pour une application inférieure à 10 mmol/kg de citrate, l'accumulation d'uranium dans les parties aériennes n'augmentent que lentement. Au delà de cette concentration, l'accumulation d'uranium peut être multipliée par un facteur 5. Ces auteurs ont également pu observer que l'accumulation était plus élevée lorsqu'il était apporté sous forme d'acide sans ajustement de pH (pH 2).

Par ailleurs, l'accumulation est aussi dépendante du temps. Ainsi, l'hyperaccumulation d'uranium dans les parties aériennes était observée 24 heures après le traitement et cette teneur dans les parties aériennes atteignait un état d'équilibre 3 jours après l'application de citrate. A l'état d'équilibre, la teneur en uranium des parties aériennes de certaines plantes traitées avec le citrate était 1000 fois plus élevée que dans les plantes témoins.

Huang *et al.* (1998) estiment que la force gouvernant l'augmentation de la désorption de l'uranium par le citrate et l'absorption par les plantes était probablement la chélation de l'uranium par le citrate et que la composante acidification seule n'était pas suffisante. En revanche, Ebbs *et al.* (1998) concluaient que le citrate était capable d'acidifier le sol, d'augmenter la solubilité de l'uranium et donc d'augmenter l'absorption d'uranium par la betterave rouge. Ils avaient également démontré que le cation uranyle (UO_2^{2+}), espèce dominante au $\text{pH} < 5,5$, était vraisemblablement absorbé et transloqué. Le résultat de cette étude suggérait que l'acidification des sols contaminés par l'uranium pouvait être requise pour augmenter la biodisponibilité de l'uranium pour les plantes.

D'autres études ont également montré que la toxicité de l'ion uranyle était dépendante de la concentration en citrate. La réduction de la toxicité résulte en une diminution de 80 % de l'activité à 0,2 mM d'ion uranyle et une perte totale de l'activité à 1 mM UO_2^{2+} .

Enfin, Chen *et al.* (2003), quant à eux, ont étudié l'effet de la présence de citrate dans le sol sur la distribution tissulaire, notamment du plomb et du cadmium, chez le radis. Ils ont ainsi pu montrer que le citrate inhibait l'absorption du plomb, les teneurs en cet élément diminuaient aussi bien dans les feuilles que dans la racine. Pour ces auteurs, cette diminution de l'absorption était principalement due à une diminution du pH en présence de citrate. Avec le Cd, le traitement au citrate (0,5 mM à pH 6) augmentait le Cd dans les feuilles (et donc la translocation) de 14% tandis que dans la racine, sa teneur diminuait de 19%.

1.6.3.2. Effet des ions compétiteurs

A. Effet des protons

Franklin *et al.* (2000), qui ont étudié la toxicité de l'uranium sur une algue tropicale australienne d'eau douce (*Chlorella sp.*), ont constaté que la quantité d'uranium intracellulaire était environ 2 fois plus élevée au pH 6,5 qu'au pH 5,7, mais aussi que la quantité d'uranium liée à la surface de la cellule était aussi plus élevée à ce pH 6,5. La spéciation de l'uranium dans leur milieu a été prédite à l'aide du modèle HARPHRQ et a révélé qu'à pH 5,7, la teneur en ions uranyles était très faible et diminuait avec l'augmentation de pH tandis que la proportion d'espèces complexées d'uranyle augmentait (hydroxocomplexes et complexes carbonatés). L'augmentation du pH jusqu'à 6,5 augmente la formation de ces composés polymériques et la proportion en ions uranyles à ce pH devient insignifiante (<1%). Or, les résultats de leurs biotests d'inhibition de croissance en présence d'uranium ont montré que l'uranium était plus toxique à pH 6,5 (correspondant à une liaison plus importante de l'uranium à la surface de la cellule et une plus forte absorption). Cette toxicité semble donc davantage liée à une compétition à la surface de la cellule entre les ions H⁺ et les ions uranyles.

D'autres études, réalisées sur des micro-organismes, mettent en évidence cette compétition. Friis et Myers-Keith (1986), travaillant sur *Streptomyces longwoodensis*, ont observé une augmentation linéaire de la teneur en ions H⁺ dans le milieu avec la quantité d'uranium accumulée par les cellules. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une compétition entre les ions uranyles et les ions H⁺ pour les sites actifs à la surface de la cellule par déplacement de ces ions H⁺ des sites actifs.

Ces observations se retrouvent également avec d'autres métaux comme le nickel ou le cuivre dont l'absorption par *Chlorella vulgaris* diminue avec la réduction du pH (Mehta *et al.*, 2000 et 2002).

Plusieurs hypothèses ont été mises en avant pour expliquer cette apparente « protection » des ions H⁺ contre les métaux. L'effet du pH sur l'absorption d'un métal peut être double : la concentration en H⁺ peut exercer son effet directement en affectant l'absorption d'uranium ou indirectement, en affectant la biodisponibilité du pool dissous (Peterson *et al.*, 1984). En effet, l'absorption d'un cation métallique peut entrer en compétition avec les ions H⁺ pour les sites de fixation, du fait du comportement général d'acide faible des groupes cellulaires fixant les éléments (Davies, 1978). Ces groupements fonctionnels, à forte affinité pour les métaux, confèrent une charge nette négative à la surface des cellules et

sont composés principalement de groupes carboxyliques, sulfhydriques ou phosphatiques.

D'autres métaux ont également été étudiés dans ce sens, mais certains résultats semblent contradictoires entre algues et plantes supérieures. Ainsi, si Slaveikova *et al.* (2003) ont pu montrer que les ions H^+ affectaient l'adsorption du Pb à la surface des algues en entrant en compétition directement pour les sites de surface et en modifiant la charge à la surface de l'algue et la spéciation chimique du Pb en solution, Tyler et McBride (1982) n'ont vu aucun effet sur une plante supérieure. Ces auteurs ont testé l'effet de certains paramètres sur l'absorption du cadmium et notamment le pH pour la même espèce de haricot (*Phaseolus vulgaris*). Ils ont ainsi pu montrer que les protons H^+ n'entraient pas en compétition avec Cd^{2+} pour l'absorption et donc que le pH de la solution autour des racines n'avait pas d'effet direct sur l'absorption de Cd.

B. Effet du calcium

Généralités :

A la différence des autres macronutriments, une forte proportion du calcium présent dans les tissus des végétaux est souvent située dans la paroi des cellules (apoplasme). Cette distribution est le résultat d'une forte abondance de sites de fixation pour le calcium dans la paroi, mais aussi d'un transport restreint du calcium dans le cytoplasme. Dans la lamelle moyenne, ce calcium est lié aux groupements $R-COO^-$ des acides polygalacturoniques (pectines) sous une forme plus ou moins facilement échangeable (paroi des cellules). Une partie du calcium est ainsi fortement liée dans les structures et une autre partie est échangeable au niveau des parois des cellules et sur la face externe de la membrane plasmique. C'est la présence de ce calcium, à la surface des cellules, qui va pouvoir influencer l'absorption par les organismes de métaux tels que l'uranium en entrant directement en compétition avec le métal libre pour la fixation à la surface des cellules.

La plupart des fonctions du calcium, en temps que composant structural des macromolécules, sont relatives à ses capacités de coordination par lesquelles il fournit des liaisons stables mais réversibles entre molécules, particulièrement dans la paroi des cellules et la membrane plasmique.

Effet du calcium :

L'ion uranyle, désigné comme de classe A par son comportement biochimique (Boileau *et al.*, 1985), est un ion cherchant à lier les atomes d'oxygène et ressemble de ce point de vue aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Rothstein et Meier (1948), qui travaillaient sur la levure, ont montré que les ions divalents tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} pouvaient entrer en compétition avec l'ion uranyle pour les sites de fixation à la surface des cellules. En effet, habituellement, les réactions de phosphorylation requièrent la présence de cations divalents tels que, Mg^{2+} , Mn^{2+} et Ca^{2+} . Il est présumé que les composés polyphosphatés à la surface des cellules soient présents sous la forme de complexes avec ces ions. L'ion uranyle entrerait donc en compétition avec les ions calcium et magnésium pour les sites des polyphosphates libres, formant ainsi un complexe fort physiologiquement inactif (d'autres études avaient d'ailleurs suggéré que l'uranium inhibait ces réactions de phosphorylation se déroulant à la surface des cellules inhibant de ce fait le transport actif des sucres à l'intérieur de la cellule (Rothstein *et al.*, 1951)).

Plus récemment, des expériences menées en milieu aquatique ont suggéré qu'un certain nombre de paramètres abiotiques tels que le pH, la dureté de l'eau et la matière organique pouvaient influencer la toxicité de certains métaux, notamment l'uranium ou le zinc. Charles *et al.* (2002), ont ainsi constaté qu'une augmentation de la dureté de l'eau entraînait une forte diminution de la toxicité de l'uranium sur l'algue tropicale d'eau douce *Chlorella sp.*. Les effets antagonistes observés pour Ca^{2+} et Mg^{2+} sur la toxicité de l'uranium sont potentiellement attribués à une compétition accrue pour les sites de fixation des tissus sensibles entre le métal et ces ions ou à une modification de la spéciation et, par là, à un abaissement de l'activité du métal (Charles *et al.*, 2002). Les données de modélisation démontrent cependant que la spéciation de l'uranium en solution n'est pas affectée de façon significative par l'accroissement de la dureté de l'eau. Ces auteurs ont donc suggéré que la modification de spéciation de l'uranium ne pouvait être responsable de cette diminution de toxicité, mais qu'elle devait être due plus vraisemblablement à une compétition entre l'uranium et le calcium et/ou le magnésium pour la fixation à la surface des cellules algales. Ce mécanisme est confirmé par la réduction des teneurs en uranium intra et extracellulaires lorsque la dureté est augmentée, indiquant bien une réduction de sa fixation à la surface des cellules.

Des résultats similaires ont déjà été rapportés sur des végétaux supérieurs par Jarvis *et al.* (1976) qui ont démontré qu'à court terme (jusqu'à 4 heures) la présence de Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} dans le milieu diminuait considérablement

l'absorption de Cd par les racines de ray-grass. Ainsi, l'ion Ca^{2+} qui a le même rayon que le cadmium peut entrer en compétition avec Cd^{2+} pour les sites d'échange à la surface de la racine. Il en est de même pour Mg^{2+} et Zn^{2+} qui entrent eux aussi en compétition avec Cd^{2+} . D'autres auteurs en revanche n'ont rapporté aucun effet du calcium sur l'absorption de Cd (McLaughlin *et al.*, 1998). Tyler et McBride (1982) ont également montré que l'addition de CaSO_4 à la solution et l'augmentation des concentrations en calcium, de 1 à 5 mM, n'avaient pas d'effet sur l'absorption de Cd mais diminuaient le ratio de Cd entre les parties aériennes et les racines et diminuaient donc la translocation.

L'effet de l'ensemble de ces complexants et de ces ions compétiteurs sera étudié dans le cadre de ce travail de recherche appliqué à notre milieu d'exposition et à notre modèle biologique. Nous pourrions ainsi faire le lien spéciation – transfert de l'uranium à la plante.

1.7. Toxicité de l'uranium chez les végétaux

L'uranium est naturellement présent dans les organismes et sa concentration dans les plantes est de l'ordre de quelques ppm. Sa toxicité est modérée. Elle se manifeste par une variation de la couleur des fleurs, une présence de fruits anormaux, une augmentation du nombre de chromosomes dans le noyau ou une courbure des plantes (Goswani *et al.*, 1977).

Cependant, l'uranium à faible concentration peut avoir un effet stimulant. Nous présenterons un test d'estimation de toxicité, ainsi que les effets toxiques physiologiques et cellulaires engendrés sur les végétaux suite à leur exposition à l'uranium.

1.7.1. Effet stimulant des faibles teneurs en uranium

Des études anciennes, datant du début du siècle dernier, ont démontré que de faibles quantités d'uranium pouvaient stimuler le développement des plantes. Cette stimulation de la croissance, pour de très faibles concentrations en uranium, concerne également la germination des graines (Stoklasa et Penkava, 1928 et 1932), mais aussi les bactéries (Becquerel, 1913 ; Aghulon et Robert, 1914). De la même façon, Gulati *et al.* (1980), ont rapporté que le rendement du blé augmentait

significativement avec l'augmentation de la teneur en uranium dans le milieu jusqu'à un certain niveau (rendement maximum à 3 ppm d'uranium), puis diminuait pour des teneurs beaucoup plus élevées. En revanche, les mêmes expériences conduites sur des plants de tomates n'ont pas révélé d'augmentation du rendement, mais une baisse significative du rendement avec l'augmentation de la teneur en uranium dans le sol, avec toutefois une augmentation du rendement avec l'augmentation du niveau d'irrigation (le rendement du blé était lui diminué pour le plus haut niveau d'irrigation) (tableau 8).

Tableau 8. Rendement du blé et des plants de tomates (g/pot) pour différentes teneurs en uranium appliquées et sous différents niveaux d'irrigation (d'après Gulati *et al.*, 1980).

Niveaux d'irrigation (L)	Teneur en uranium appliquée (ppm)				moyenne
	0	1,5	3,0	6,0	
Blé					
11,52	10,2	11,7	14,3	12,8	12,2
14,40	12,7	12,9	15,3	13,3	13,5
19,20	13,0	13,6	12,0	11,9	12,6
moyenne	12,0	12,7	13,9	12,7	
Tomate					
15,12	160	125	120	115	130
18,9	182	167	165	145	165
25,2	200	198	170	145	178
moyenne	181	163	152	135	

Drobkov (1951) avait montré, à l'aide d'autoradiographies, que l'uranium présent dans les parties vertes de la plante migrait vers les zones de développement intense, telles que les apex en croissance, les jeunes feuilles, les graines, etc.... La croissance, la floraison, la fructification et la maturation étaient stimulées et la teneur en carbohydrates augmentée.

Ces observations ont également été reportées pour de faibles concentrations en d'autres métaux notamment le cadmium. A faible concentration, le Cd pouvait induire un accroissement de biomasse alors qu'à de plus fortes concentrations,

l'effet était inhibiteur. Costa et Morel (1994) rapportent ce cas, par exemple, pour des plants de laitue (*Lactuca sativa*) contaminés à diverses concentrations en cadmium. Pour de faibles concentrations (0,01 et 0,1 μM), la production de biomasse racinaire ou aérienne était augmentée puis déclinait au delà de 0,1 μM jusqu'à devenir toxique pour ces 2 parties à 100 μM . Cette augmentation de biomasse était associée, dans leur cas, à une augmentation de la conductance des feuilles et à une induction de l'ouverture des stomates augmentant ainsi les échanges gazeux (CO_2 et H_2O). En revanche, à 100 μM de Cd, le statut en eau et les échanges gazeux de la plante étaient diminués. Des résultats similaires de stimulation de la croissance racinaire ont été observés par Wang (1985) avec des composés phénoliques, qui à faibles concentrations entraînaient également une stimulation notable de la croissance racinaire de *Panicum miliaceum*.

Enfin, cet effet de stimulation est observé chez de nombreux organismes (poissons, algues, daphnies, micro-organismes, etc) et pour diverses substances (Stebbing, 1982 ; Calabrese et Howe, 1976 ; Calabrese et Baldwin, 2002).

D'abord appelé effet Arndt-Schulz, ce phénomène de stimulation aux faibles doses et d'inhibition aux plus fortes doses est retrouvé sous le nom générique d'hormesis. La forme d'hormesis la plus commune suit une courbe dose-réponse de type β (figure 12).

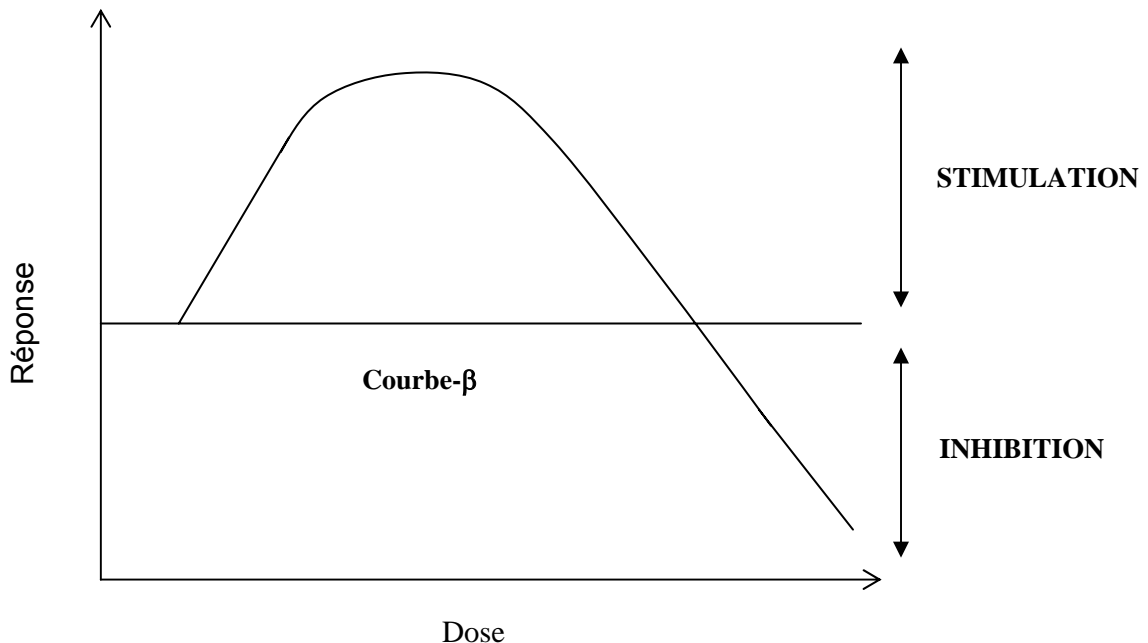


Figure 11. Courbe de dose-réponse la plus commune montrant le phénomène d'hormesis, la courbe- β .

Le phénomène d'hormesis ne se restreint pas uniquement à une stimulation de croissance. Il peut aussi concerner l'effet de toxiques sur d'autres variables comme par exemple la production de CO₂, qui est un indice aussi bien de la respiration que de la croissance des populations d'organismes vivants.

Pour expliquer ce phénomène, il est suggéré qu'il est la conséquence de régulations, et/ou de compensations réalisées par des mécanismes de contrôle biosynthétiques, se produisant à faibles doses de polluants et se traduisant alors par une croissance plus forte que la normale (Stebbing, 1982). Il a ainsi été suggéré qu'un des mécanismes par lequel la tolérance des espèces s'acquerrait pouvait se faire *via* des ajustements des mécanismes de contrôle de la croissance au « taux de croissance requis » (figure 13). Peut être que ce phénomène d'hormesis serait directement lié à l'acquisition de la tolérance vis à vis d'expositions à des toxiques grâce à des mécanismes de contrôle de la croissance (Stebbing, 1997).

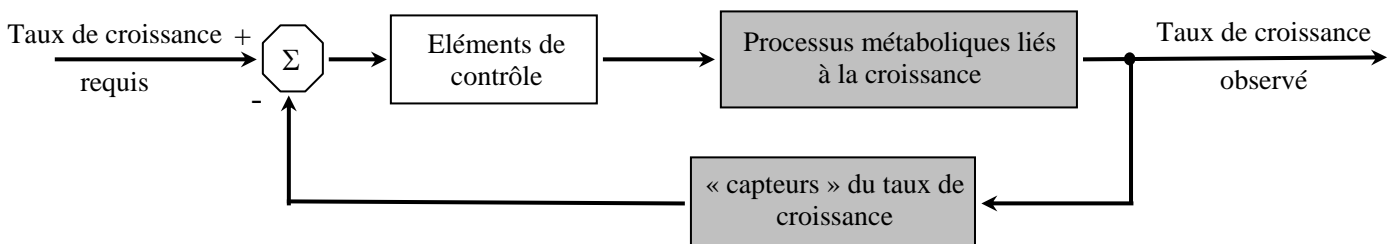


Figure 13. Schéma indiquant la mise en place d'un mécanisme de rétroaction simple tel celui capable de réguler la croissance (d'après Stebbing, 1997).

1.7.2. Toxicité de l'uranium : test d'élongation racinaire

La germination des graines et l'élongation racinaire, qui représentent les premières phases de développement des plantes, sont des phases sensibles aux stress environnementaux provoqués notamment par les pollutions métalliques. Durant cette période, la croissance des plantes est fortement sensible aux effets des différents phénomènes se produisant dans l'environnement et elle peut, de ce fait, être utilisée comme indicateur de stress environnemental (Wang et Elseth, 1990).

Dans cette optique, le test d'élongation racinaire a été intégré aux bioessais concernant l'étude des effets sur les écosystèmes terrestres et notamment sur la

phytotoxicité de divers métaux sur les végétaux. Divers auteurs ayant testé la phytotoxicité de composés chimiques ou de métaux traces à l'aide du test d'élongation racinaire ont conclu que ce test était valide et sensible pour tester la toxicité de ces éléments dans l'environnement et dans les sols contaminés (Wong et Bradshaw, 1983 ; Ratsch, 1986).

Toutes les études menées sur l'impact de métaux traces dans le milieu concluent que l'augmentation de la teneur de ces métaux dans le milieu aura pour conséquence l'inhibition de l'élongation racinaire à des niveaux plus ou moins élevés en fonction du polluant considéré (Wong et Bradshaw, 1982 ; Wang et Elseth, 1990 ; Ratsch et Johndro, 1986 entre autres).

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour appréhender l'inhibition de cette croissance racinaire, en jouant notamment sur le type de substrat sur lesquels les graines sont déposées, sur l'orientation des graines dans le système et la forme sous laquelle le composé chimique est apporté aux graines germées. Deux méthodes ont été testées par Ratsch et Johndro (1986) : une exposition directe, le substrat est un milieu liquide, et dans ce cas les graines sont exposées directement à la solution contaminée ou bien une exposition indirecte : les graines sont déposées sur un substrat (papier filtre ou sol) et exposées à la solution contaminée. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que pour certains composés, les deux méthodes étaient aussi sensibles mais que pour certains autres, l'exposition directe (sans substrat) dans la solution contaminée était beaucoup plus sensible. C'est pourquoi, lors de nos tests d'élongation racinaire de *P. vulgaris*, appliqués à l'uranium, les graines ont été exposées directement à la solution contaminée sans substrat.

Peu d'études concernant la toxicité de l'uranium sur l'élongation racinaire ont été menées. Récemment, des expériences menées en hydroponie par Panda *et al.* (2001) ont montré que la présence de nitrate d'uranyle à une concentration de 25 μM inhibait de façon significative la croissance des racines et la division cellulaire de bulbes d'*Allium cepa* après 5 jours d'exposition. Plus anciennement, Stoklasa et Penkava (1928), qui ont testé l'effet de l'uranium sur la germination des graines, ont pu montrer que la croissance était stimulée par l'addition d'environ 8 μM de nitrate d'uranium dans la solution nutritive. A 200 μM , les effets d'empoisonnement étaient notables et les pointes des racines étaient devenues jaunes et à 2 mM, les racines étaient fines et jaunes et les feuilles avaient une croissance anormale et devenaient « tordues ». Enfin, une concentration de 42 mM d'uranium était totalement toxique pour la germination des graines. Ces mêmes auteurs avaient

aussi testé l'effet des radiations provenant de l'uranium et avaient ainsi mis en évidence, comme d'autres auteurs, que ces radiations avaient un effet très néfaste sur la germination des graines. Verducci (1945) a par la suite observé que l'effet des radiations provenant d'une source de sulfate d'uranium était bien plus sévère pour la germination des graines que celui généré par une source de nitrate d'uranium.

L'ensemble des auteurs s'accordent donc à montrer que de fortes concentrations en uranium inhibent sévèrement le développement des racines des plantes supérieures.

Quelques études ont également été menées sur la germination. Aery et Jain (1997) ont mis en évidence, qu'il existait aussi une légère stimulation pour les faibles teneurs en nitrate d'uranyle. Ainsi, la germination des graines de blé débutait légèrement plus tôt en présence d'uranium (après 11 heures, contre 12 heures pour les témoins). Les effets toxiques débutaient à 1,25 mg/L et l'élongation racinaire était considérablement inhibée pour des teneurs plus élevées (160 mg/L) et entraînait la mort de la plante. Ces mêmes auteurs ont d'ailleurs pu constater que, pour une même teneur en uranium, l'inhibition de l'élongation racinaire était bien plus forte que l'inhibition de l'élongation de la tige.

1.7.3. Autres effets toxiques de l'uranium sur les végétaux

Si l'uranium est toxique pour les plantes étudiées, aux niveaux accumulés, des symptômes visuels de toxicité ne sont pas toujours observés (Saric, 1995).

Les symptômes de toxicité relevés sur des plants de soja de 4 semaines se traduisent par une chlorose, une abscission précoce des feuilles, une réduction générale de la taille de la racine et à partir d'une forte contamination, de 42 mg/L, une large diffusion de la nécrose des tissus (Murthy *et al.*, 1984).

D'une manière générale, les plantes concentrent majoritairement l'uranium dans leur racine (à quelques exceptions) et la teneur en uranium dans les tissus de la plante augmente avec l'augmentation de la teneur en uranium dans le sol.

L'augmentation de l'absorption d'uranium peut être due (i) à une dénaturation de la membrane des cellules permettant ainsi à l'uranium d'entrer librement à l'intérieur des cellules et de se lier aux ligands localisés dans l'espace intracellulaire ; (ii) à un accroissement du nombre de sites de fixation dû à la dénaturation des matériaux de la cellule (Horikoshi *et al.*, 1979). Murthy *et al.*

(1984) pensaient que la sévère réduction de l'élongation racinaire, due à la présence d'uranium dans le milieu, pouvait conduire à une réduction de la capacité à absorber, le tout couplé à un possible dysfonctionnement des tissus du xylème et du phloème entraîné par la précipitation de l'uranium (Cannon, 1960) et à une complexation. L'ensemble de ces mécanismes peut constituer les principales causes de la nécrose précoce des tissus accompagnée par la réduction de la chlorophylle des feuilles.

Sur les zones à forte teneur en uranium, on constate le développement d'une flore particulière, ou d'espèces indicatrices. Cette réponse doit plutôt être considérée comme une réaction à long terme des communautés végétales à un gradient environnemental, dont l'aspect le plus important concerne les propriétés chimiques de l'uranium. L'impact de l'uranium sur les micro-organismes du sol est une considération importante à prendre en compte dans l'ensemble des réponses des plantes, car l'uranium peut avoir un effet stimulant à basse concentration et un effet toxique à 100 ppm. En général, il est considéré que les effets négatifs de l'uranium sur les bactéries du sol devraient être moindres que ceux sur les cellules de la plante (Luchetti, 1932).

Les effets, à plus fine échelle, peuvent être les suivants :

- Au niveau de la teneur en chlorophylle :

Un traitement à l'uranium entraîne une réduction drastique de la teneur en chlorophylle totale dans les feuilles de blé. Ainsi, à 10 mg/L, cette teneur est réduite de 25% par rapport aux plants de blé témoins et ce taux de destruction de la chlorophylle augmente avec l'augmentation de la teneur en uranium jusqu'à atteindre 50 % de perte environ pour 160 mg/L de nitrate d'uranyle. Les chlorophylles a et b sont affectées de la même façon, en proportion relative, par la présence d'uranium (Aery et Jain, 1997). Quant à Murthy *et al.* (1984) qui avaient soumis des plants de soja à 42 mg/L d'uranium, ils n'ont observé une diminution significative de 30 à 40 % de la chlorophylle totale, chl_a et chl_b, que dans les étages 2 et 3 des plantes et aucune dans l'étage 1.

- Au niveau de la quantité de protéines solubles des feuilles :

Il a été constaté qu'en présence d'une concentration croissante en uranium, apparaissait une augmentation brute de la quantité des protéines solubles présentes dans les feuilles de blé. Cette tendance montrait donc que pendant que des enzymes étaient synthétisées, il pouvait peut-être se produire une destruction accélérée des protéines structurales et insolubles. L'augmentation de la quantité de protéines solubles des feuilles peut donc servir d'indication du passage d'une activité synthétique normale à une dégradation (Aery et Jain, 1997, Dutta 1980).

- Au niveau des composés phénoliques des feuilles :

Tout comme la quantité de protéines solubles des feuilles de blé augmentait avec la teneur en uranium, il apparaît un comportement similaire de la teneur en composés phénoliques des feuilles. Généralement, en conditions de stress, il existe une relation inverse entre la teneur en composés phénoliques de la plante et la production de matière sèche. Une augmentation de la quantité de phénols est souvent accompagnée par une stimulation de l'activité peroxydase entraînant une destruction des auxines (Pandolfini *et al.*, 1992) et donc une altération de l'intégrité de la membrane plasmique menant à une réduction du contenu en eau des tissus due à une fuite d'ions K^+ . L'ensemble de ces processus réduit alors la turgescence des cellules et entraîne l'inhibition de l'élargissement des cellules dans la zone d'élongation de la racine et donc une inhibition de la croissance (Gabrielli *et al.*, 1990).

- Au niveau des parois des cellules :

L'inhibition de croissance peut aussi être due à une extensibilité réduite de la paroi des cellules due à un raidissement de la paroi, en partie régulé par les peroxydases extracellulaires qui sont stimulées en conditions de stress (Fry, 1986).

- Au niveau des membranes :

La forte liaison de l'ion uranyle après remplacement du calcium pourrait être responsable de l'augmentation de la perméabilité au Na^+ observée dans les tissus animaux (Lin-Shiau *et al.*, 1979). Nous savons en effet que l'ion uranyle qui tend à lier les atomes d'oxygène ressemble de ce point de vue aux ions Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les données concernant la formation de complexes entre les ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et UO_2^{2+} avec les dérivés phosphatés, les acides carboxyliques et les autres ligands contenant de l'oxygène indiquent que l'ion UO_2^{2+} forme des complexes bien plus

stables que les 2 autres ions. Cette différence de stabilité détermine probablement l'effet toxique de l'ion uranyle sur les membranes.

- Au niveau cellulaire :

Au niveau de l'ADN :

Suite à l'inhibition observée sur la croissance cellulaire due à une exposition à l'uranium, Panda *et al.* (2001) ont supposé que la génotoxicité de l'ion UO_2^{2+} dans une gamme de 10 à 300 μM , devait être due à une toxicité chimique de l'ion UO_2^{2+} plutôt qu'à sa radioactivité. Cette toxicité chimique de l'ion UO_2^{2+} est attribuée à sa liaison aux groupements phosphate de l'ADN entraînant des aberrations chromosomiques.

Au niveau des chloroplastes :

Aucune donnée de la littérature ne fait mention de l'effet de l'uranium sur l'ultrastructure des organites et leur éventuelle modification lors d'une exposition. Cependant, il existe quelques données sur la modification de l'ultrastructure des chloroplastes, suite à une exposition à un excès de métaux traces tel que le nickel. Ainsi, sur des plants de chou (*Brassica oleracea* L.), sous l'influence du nickel, sous une forme complexée avec l'EDTA (Ni(II)-EDTA), il est observé dans les chloroplastes une accumulation d'amidon, pouvant indiquer aussi bien une augmentation de l'activité photosynthétique qu'une inhibition du transport des carbohydrates des feuilles aux racines (Molas, 2002).

L'accumulation d'amidon dans les chloroplastes pourrait être le résultat d'une inhibition du transport de carbohydrates parce qu'elle est accompagnée de nombreux et gros « plastoglobules ». Il est connu que le contenu des plastoglobules augmente en condition de stress, incluant le stress causé par la présence de nickel (Molas, 1997a, Kukkola et Huttunen, 1998) et pendant la sénescence (Chonan *et al.*, 1977), mais aussi suite à des conditions de stress hydrique par exemple (Rey *et al.*, 2000). Les plastoglobules sont des structures lipidiques sphériques. Généralement, les chloroplastes contiennent en petit nombre des plastoglobules de petite taille. Il est considéré que les plastoglobules ont une fonction dans le stockage des composants des thylakoïdes tels que les lipides (triacylglycerols), plastohydroquinones et α -tocopherol (Tevini and Steinmueller, 1985).

Les perturbations et inhibitions du transport de carbohydrates du lieu de la photosynthèse (i.e des feuilles) aux organes non photosynthétiques, qui résultent en une accumulation d'amidon, entre autres, sont également observées sous

l'influence de Ni sous forme inorganique dans le maïs, le haricot (Samarakoon, 1979) et les haricots blancs (Rauser, 1978).

L'augmentation du nombre et de la taille des plastoglobules peut être considérée, dans certaines espèces, comme un marqueur de conditions de stress provoquée dans les plus sévères dégradations des structures plastiques et dans la sénescence (Eymery et Rey, 1999).

1.8. Conclusions sur l'état de l'art et questions restant posées

1.8.1. Conclusions

Il apparaît donc au terme de cette recherche bibliographique que :

- ◆ La distribution de l'uranium dans les végétaux varie selon le végétal considéré et que l'uranium n'est pas systématiquement concentré dans la racine (même s'il l'est tout de même préférentiellement) (Morishima *et al.*, 1977).

Aucune indication particulière ne concerne l'effet du stade de croissance sur l'absorption d'uranium, les informations relevées concernant plutôt l'évolution des concentrations dans les tissus au cours du temps (translocation) (Dunn, 1981).

- ◆ Pour la relation spéciation U (VI) – transfert plante supérieure :

Effet de la complexation: Peu d'études relatent de l'effet de la complexation de l'uranium avec les phosphates sur la biodisponibilité, les études portant d'ailleurs uniquement sur des algues vertes (Nakajima *et al.*, 1979 ; Fortin *et al.*, 2004). Ces auteurs ont ainsi pu mettre en évidence que la présence de phosphates dans le milieu réduisait la biodisponibilité de l'uranium.

Quant au citrate, sa présence dans le milieu favorise l'absorption d'uranium par les plantes et sa translocation aux parties aériennes (Huang *et al.*, 1998 ; Ebbs *et al.*, 1998).

Effet des ions compétiteurs H^+ et Ca^{2+} : Dans les 2 cas, les études portent sur l'effet de ces ions sur le transfert de l'uranium aux algues et non aux végétaux supérieurs. Les études sur les végétaux supérieurs concernent d'autres métaux tels que le cadmium.

Pour les ions H^+ , si sur les algues et les micro-organismes, ils semblent entrer en compétition avec les ions uranyles, sur les végétaux supérieurs, ces études n'ont pas été réalisées. Les études portent sur le Cd, avec des résultats différents entre algues et plantes supérieures. En effet, Slaveikova *et al.* (2003) ont mis en évidence un effet compétition tandis que sur les plantes, aucun effet n'a été observé par Tyler et Mc Bride (1982).

Pour les ions Ca^{2+} , Charles (2002) a pu mettre en évidence un effet compétition entre le calcium et l'ion uranyle sur *Chlorella sp.*. Concernant les plantes supérieures, si Jarvis *et al.* (1976) ont mis en évidence ce phénomène de compétition, Tyler et Mc Bride (1982) et Mc Laughlin *et al.* (1998) ne l'ont pas observé.

Il apparaît donc nettement que les études concernant l'effet spéciation U(VI) – transfert plante supérieure fassent grandement défaut, les études restant principalement axées en milieu aquatique pour des algues vertes.

◆ Localisation de l'uranium dans les tissus :

Si des études récentes de Günther *et al.* (2003) ont confirmé la liaison de l'uranium, de façon majoritaire, avec les groupements phosphates organiques et/ou inorganiques dans la plante, sous la forme de complexes uranyle VI – phosphates, les études de localisation de l'uranium dans les tissus restent absentes. Des études ont cependant été réalisées pour d'autres métaux, tels que le Cd par exemple, lequel est retrouvé associé, dans la racine, à des granules denses aux électrons. On peut donc se demander s'il en va de même avec l'uranium.

◆ Toxicité de l'uranium :

Il apparaît que la présence d'uranium dans le milieu d'exposition puisse affecter la teneur en chlorophylle totale, les protéines solubles des feuilles,

l'ADN, etc..., mais aucune modification des organites n'est mentionnée (comme ça l'est avec le Ni sur les chloroplastes, Molas 2002).

Par ailleurs, l'uranium inhibe l'élongation racinaire, mais il semble exister également une stimulation de croissance pour de faibles concentrations en uranium et une inhibition à plus fortes concentrations. Il serait utile de confirmer ou non ces observations.

1.8.2. Questions restant posées

Au terme de cette revue bibliographique, certaines questions restent posées, questions pour lesquelles notre démarche expérimentale aura pour objectif d'y répondre :

1. Existe-t-il un stade de croissance assimilant de façon « plus efficace » l'uranium et dans quel organe se concentre préférentiellement l'uranium : racine, tige ou feuille (pour un temps d'exposition bien défini) ?
2. Relation spéciation U (VI) – transfert : les ions compétiteurs (Ca^{2+} et H^+) et les complexants (phosphates et anions citrates) vont-ils influencer le transfert racinaire de l'uranium à la plante, avec quelle intensité et dans quel sens ?
3. Localisation et effets biologiques induits : Où se localise l'uranium dans les tissus ? Est-il associé à des granules comme dans le cas du Cd ?

Y-a-t-il une modification de certains organites ?

L'élongation racinaire est-elle inhibée et surtout stimulée à faibles concentrations en uranium quel que soit le pH du milieu d'exposition ? Enfin, existe-t-il d'autres effets biologiques induits, notamment au niveau des parois et membranes des cellules racinaires ?

L'ensemble de l'articulation de la thèse aura pour but de répondre à ces 3 grands jeux de questions dont les choix de démarches expérimentales sont présentées dans la section suivante.

1.9. Démarche expérimentale entreprise

1.9.1. Choix stratégiques

1.9.1.1. Choix du radionucléide

Comme nous l'avons vu précédemment, cette étude s'inscrit dans le cadre du programme ENVIRHOM visant à étudier le comportement des radionucléides dans l'environnement et leurs effets biologiques pour les organismes vivants animaux et végétaux. Le choix des radionucléides s'est fait selon :

- ◆ leur présence significative dans les différents compartiments sources ;
- ◆ leur type de rayonnement (avec priorité aux émetteurs α et β) ;
- ◆ leur période physique qui doit être significative au sens d'une contamination chronique à l'échelle de la durée de vie humaine (70 ans) ;
- ◆ leur comportement géochimique (les cations pouvant s'associer à de nombreux ligands et sites de surface) ;
- ◆ leur catégorie d'appartenance en termes de propriétés biochimiques entrant dans la constitution de la matière vivante, en tant que macronutriments ou oligoéléments ; par analogie de comportement avec son isotope stable ; ou analogue biochimique (dit compétiteur) ou enfin éléments sans compétiteurs stables, n'ayant pas de fonction biologique connue à ce jour ;
- ◆ leur propension à se fixer sur des molécules organiques et donc à se bioaccumuler ;
- ◆ la faisabilité de la métrologie et de la conduite d'expériences en milieu contrôlé.

Choix de l'uranium

L'uranium est un élément émetteur α , d'origine naturelle, possédant divers degrés d'oxydation, mais plus couramment retrouvé dans les sols aérobies à l'état d'oxydation +VI, toxique sur le plan chimique et pouvant être bioaccumulé par les organismes. Par ailleurs, les apports anthropiques d'uranium conduisent à l'augmentation de sa concentration dans les milieux terrestres et aquatiques (cycle du combustible nucléaire, utilisation d'engrais phosphatés, utilisation en milieu médical ou militaire).

En fonction du contexte géochimique, l'uranium peut être transporté et/ou accumulé dans certaines zones en liaison avec ses propriétés physico-chimiques.

Associé à ses potentialités de bioaccumulation chez les végétaux, ces propriétés font que sa présence dans l'environnement peut constituer un risque chronique potentiel à la fois sur le plan chimique et radiologique.

1.9.1.2. Choix du modèle biologique

Un modèle de plante supérieure, le haricot (*Phaseolus vulgaris*, haricot nain mangetout) a été retenu pour nos recherches (§ 2.1.). Le haricot commun *Phaseolus vulgaris* est une légumineuse largement cultivée et consommée dans le monde entier et sa production augmente d'années en années.

Ce végétal fait donc partie de la chaîne trophique humaine et présente à cet égard un grand intérêt pour l'étude du transfert sol - plante de l'uranium. Plus largement, il peut être considéré comme représentatif des composantes végétales des écosystèmes terrestres.

Ce végétal présente par ailleurs l'avantage d'avoir un cycle de développement relativement court (3 mois), des organes bien développés facilitant les manipulations et une certaine capacité à absorber l'uranium (expériences de Ramaswami, 2001, sur une autre espèce de *Phaseolus*).

1.9.1.3. Milieu de culture

Le sol étant un milieu complexe (composé d'une phase solide, une phase liquide et une gazeuse), celui-ci va imposer une spéciation, tant physique sur les phases porteuses que chimique en solution, qui va influencer la biodisponibilité d'un élément et, par là même, son transfert aux végétaux.

C'est pourquoi, dans notre étude, un milieu simplifié, mimant la solution du sol, a été utilisé de manière à éviter l'interaction avec les phases porteuses (ou interactions avec les micro-organismes du sol) et permettre la maîtrise de la spéciation de l'uranium en solution (§ 2.2.).

Cette solution nutritive a été basée sur la composition de solutions nutritives (Hoagland) couramment utilisées en cultures hydroponiques. L'utilisation du modèle de spéciation géochimique JCHESS (Van der Lee, 1998) nous a permis d'adapter cette solution nutritive, tant aux besoins nutritionnels de la plante qu'à la maîtrise de la spéciation de l'uranium en solution. C'est pourquoi la teneur en certains micronutriments a été légèrement diminuée.

Ce milieu de culture et d'exposition sera de composition identique (et de force ionique constante) pour chaque expérience, à l'exception de la variation de la

teneur en ligands (ajout de phosphates ou de citrate de sodium) ou en ions compétiteurs (augmentation de la teneur en ions Ca^{2+} , en gardant la force ionique constante, et influence du pH pour les ions H^+) selon l'effet recherché.

Dans une dernière étape, la détermination de la spéciation de l'uranium dans notre solution nutritive, en fonction du pH, nous a permis de déterminer 3 pHs d'étude, déterminant 3 conditions contrastées de spéciation : les pHs 4,9, 5,8 et 7.

1.9.2. Relation uranium - végétal

La quantification du transfert dans chaque condition est estimée par le calcul du Facteur de Transfert racinaire (FT). Il représente, dans nos expériences, le rapport de la concentration de l'élément exprimé par unité de masse sèche dans la plante en fin d'exposition et la concentration en uranium dans le milieu d'exposition au moment d'introduire les plantes. Dans notre étude, il sera caractérisé en $\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$.

1.9.2.1. Etudes préliminaires

Les données bibliographiques n'ont pas indiqué s'il existait un stade de développement plus efficace dans l'assimilation. C'est pourquoi, dans une première approche du transfert racinaire de l'uranium à la plante, la comparaison du transfert entre un stade précoce (stade plantule) et un stade plus avancé (stade floraison) a été étudiée (§ 2.4. et § 3.1.).

Ces expériences avaient 3 objectifs principaux :

- ◆ Déterminer les cinétiques de transfert sur 6 jours ;
- ◆ Etudier l'influence du stade de croissance de *Phaseolus vulgaris* sur ce transfert ;
- ◆ Etudier la répartition de l'uranium dans les tiges, feuilles et racines et déterminer un éventuel organe bioaccumulateur.

Ces expériences nous ont par ailleurs permis de confirmer que, comme l'avaient observé Ramaswami *et al.* (1998), les cinétiques de transfert étaient très rapides (dans les premières 24 heures d'exposition), nous permettant ainsi l'étude d'une autre cinétique sur plus court terme (moins de 10 heures). Par ailleurs, à ce stade de l'étude, nous avons pu déterminer (i) que le stade plantule et le stade floraison avait des Facteurs de Transfert moyens identiques, et (ii) que dans tous les cas, l'uranium était concentré à 99 % dans la racine. Ces observations nous ont permis

d'axer notre choix concernant le stade de développement du végétal et l'organe à étudier et nous donner une idée des cinétiques de transfert pour les études plus fines spéciation U (VI) – transfert.

Par ailleurs, puisque nous voulions évaluer la teneur en uranium dans chaque organe de la plante, il était nécessaire d'utiliser un isotope permettant de bénéficier d'une technique de mesure dont la limite de détection était la plus basse possible. C'est pourquoi, à ce stade des expériences, l'²³³U a été utilisé pour contaminer les plantes. La concentration dans les organes et la solution nutritive a été mesurée en scintillation liquide (seuil de 1 ng/L contre 5 µg/L en ICP-AES).

1.9.2.2. Etude du lien spéciation U(VI) - transfert

Les expériences préliminaires nous ont donc permis de nous placer à l'échelle de cinétiques de transfert courtes (de l'ordre de quelques heures) et d'utiliser le stade plantule (culture plus rapide). Par ailleurs, puisque la racine concentre 99 % de l'uranium, nous avons décidé, à ce stade des expériences, de focaliser les études de transfert sur la racine, nous permettant par là même, de ne plus utiliser l'²³³U mais de l'uranium appauvri (n'ayant plus de contraintes quant au seuil de détection) (§ 2.4. et § 3.2.).

Dans cette partie de l'étude, 2 objectifs principaux gouvernent :

- ◆ La mise en évidence d'une éventuelle compétition entre des ions présents naturellement dans la solution du sol (Ca^{2+} et H^+) et les ions uranyles (§ 2.4.1.B, § 2.4.2.B, § 3.2.2., § 3.2.4. et § 3.2.5.) ;
- ◆ L'identification des ligands naturels inorganiques (phosphates) et organiques (citrate de sodium) pouvant influencer la spéciation de l'uranium par complexation et de ce fait son transfert à la plante (§ 2.4.1.B, § 2.4.2.B, § 3.2.6. et § 3.2.7).

1.9.3. Microlocalisation de l'uranium et effets biologiques induits

1.9.3.1. Microlocalisation dans les organes

La localisation de l'uranium dans les organes des végétaux est très peu renseignée. Nous avons donc voulu déterminer la localisation intracellulaire de l'uranium dans les divers organes du haricot (§ 2.7. et § 4.1.). Pour cela des

coupes transversales dans les tiges, feuilles et racines ont été effectuées et observées au Microscope Electronique à Transmission associé à une sonde EDAX (donnant la composition élémentaire des structures pointées). Pour être décelé dans une structure, l'uranium doit représenté au moins 1 % de la composition élémentaire de la structure considérée.

1.9.3.2. Effets biologiques induits

La bioaccumulation de l'uranium dans la plante étant réelle, nous nous sommes intéressés aux éventuels effets biologiques pouvant être induits suite à la contamination.

C'est pourquoi, nous avons étudié (i) d'une part une éventuelle modification des propriétés de la paroi de la racine au travers de l'évaluation de la Capacité d'Echange Cationique Racinaire (CECR), déterminant la capacité d'absorption des cations (§ 2.6. et § 4.2.2.) ; et (ii) d'autre part une éventuelle toxicité de l'uranium sur une phase précoce du développement, sensible aux stress environnementaux : l'élongation racinaire (§ 2.5. et § 4.2.3.).

La figure 14 ci-après présente l'articulation des différentes études conduites dans le cadre de notre programme expérimental.

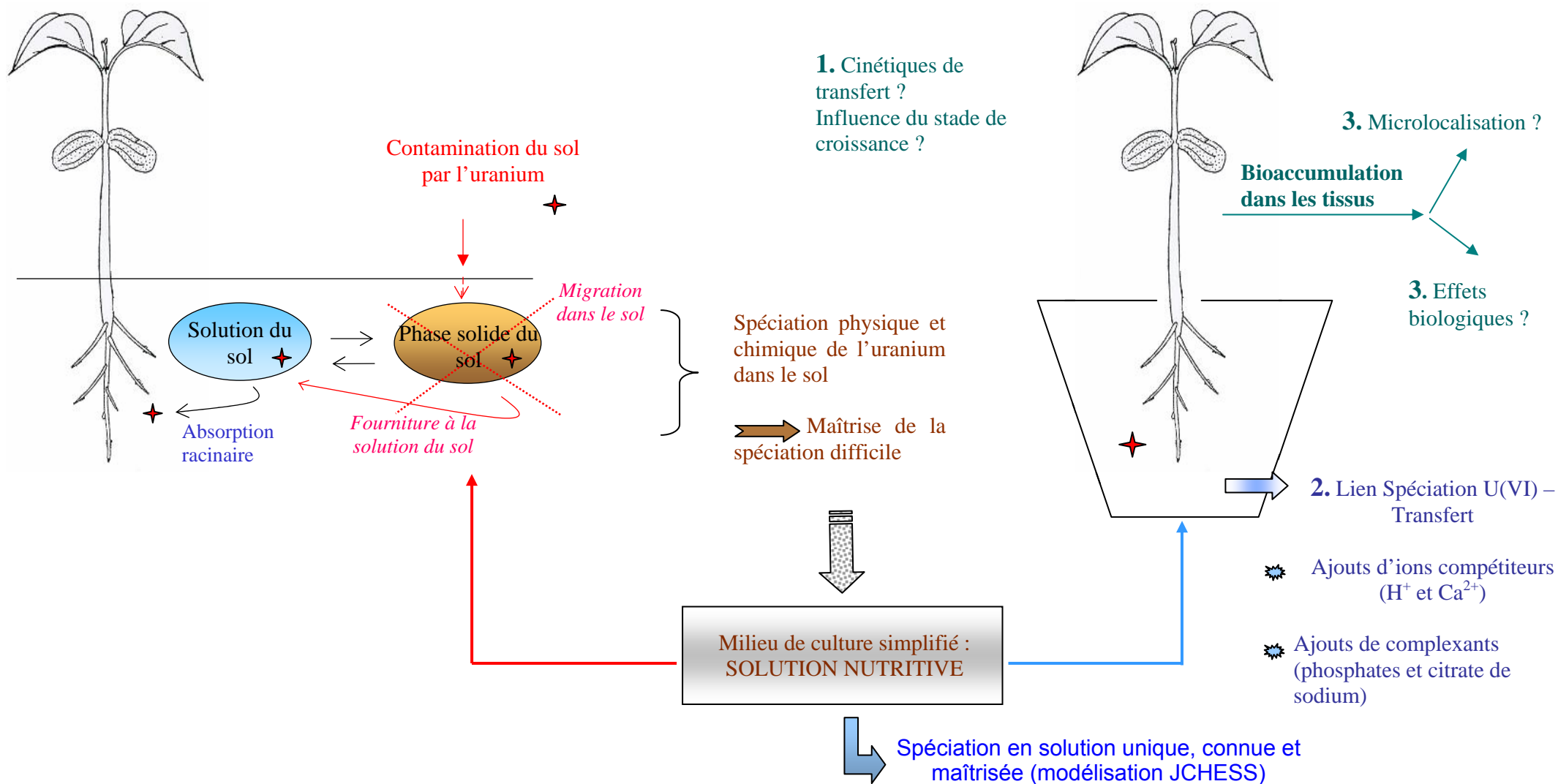


Figure 14. Schéma récapitulatif de la démarche expérimentale entreprise dans cette étude.

Chapitre 2

MATERIELS ET METHODES

Dans ce chapitre seront présentés pour caractériser le système milieu simplifié – plante, le modèle biologique végétal choisi et la solution nutritive utilisée, mais aussi le calcul de la spéciation chimique de l'uranium (VI) en solution en fonction de différents paramètres tels que pH, présence ou absence de ligands ou d'ions compétiteurs.

Nous verrons également l'ensemble des dispositifs expérimentaux (ouvert ou fermé pour les expériences à court terme et long terme) utilisés pour étudier le transfert d'uranium à la plante ; la détermination de la Capacité d'Echange Cationique Racinaire et le test de toxicité (élongation racinaire) suite à une exposition à l'uranium appauvri. Nous finirons ensuite sur la détermination de la localisation de l'uranium dans les tissus du modèle biologique (MET) et les techniques et protocoles de préparation des échantillons (calcination, préparation des échantillons végétaux pour la mesure de l'uranium en scintillation liquide lors de l'utilisation de ^{233}U ou en ICP-AES avec l'uranium appauvri pour la quantification de l'uranium total) et analyses chimiques (pH, cations, anions, uranium) de la solution nutritive, employés lors de ce travail.

2.1. Choix du modèle biologique végétal

Un modèle de plante supérieure, le haricot (*Phaseolus vulgaris*, haricot nain mangetout) a été retenu pour nos recherches (photographies en annexe 1). Ce

végétal présente l'avantage d'avoir un cycle de développement relativement court (3 mois), mais aussi des organes aériens (feuilles, tiges, racines..) de grande taille facilitant les observations microscopiques de localisation de l'uranium dans les structures cellulaires de différents tissus.

Le haricot commun *Phaseolus vulgaris* est une légumineuse largement cultivée et consommée dans le monde entier et sa production augmente d'années en années. Ce végétal fait donc partie de la chaîne trophique humaine et présente à cet égard un grand intérêt pour l'étude du transfert sol - plante de l'uranium. Par ailleurs, plus largement, il peut être considéré comme représentatif des composantes végétales des écosystèmes terrestres.

C'est une plante propre aux climats chauds (tropical tempéré) mais qui supportent mal les températures excessives (28 à 30°C) et les régimes d'humidité relative bas. Les limites optimales de pH pour la croissance de cette espèce sont comprises entre pH 5,5 et 7.

2.2. Choix du type de milieu de culture

Le sol est, comme nous l'avons vu, un milieu complexe composé de trois phases (solide, liquide et gazeuse) en équilibre dynamique. Ses différentes composantes, tant minérales qu'organiques (abiotiques ou biotiques), interagissent fortement avec les composés organiques ou inorganiques, polluants ou non, qui y sont apportés. Le sol impose de ce fait pour chaque élément une spéciation tant physique (phases porteuses) que chimique (ensemble des formes chimiques sous lesquelles l'élément est présent), découlant des conditions biophysico-chimiques qui y règnent. De cette spéciation va découler la mobilité de l'élément, mais aussi sa biodisponibilité, et plus particulièrement dans le cas qui nous intéresse, sa capacité à être transféré au végétal (phytodisponibilité). L'activité des racines, *via* en particulier les phénomènes d'exsudation de composés divers et le prélèvement d'ions dans la solution du sol, va modifier les conditions physico-chimiques du sol et les équilibres entre solution et phase solide, jouant le rôle de réservoir. La plante ne prélève par ailleurs que certaines formes chimiques de l'élément.

La critique qui peut être faite concernant ce mode de culture repose sur le fait que les racines qui ont poussé en solution nutritive peuvent être différentes de celles ayant poussé dans un vrai sol : absence de poils racinaires, de dégénérescence cortical, pas d'impédance mécanique ou de stress hydrique par exemple. Par ailleurs, l'aération, le statut microbien et nutritif de ces cultures hydroponiques sont

souvent très différents des conditions dans l'environnement typique de sol (Jones, 1998).

Cependant, pour étudier certains phénomènes complexes comme le transfert à la plante, des systèmes simplifiés et artificiels comme les solutions nutritives sont souvent utilisés, afin d'éliminer les interactions avec la phase solide du sol ou l'activité des micro-organismes du sol. Dans ce système, il sera possible de contrôler plus facilement les conditions physico-chimiques et donc la spéciation chimique de l'uranium en solution.

2.2.1. Composition de la solution nutritive

Seize éléments sont indispensables à la survie des végétaux : les macroéléments tels que carbone, hydrogène, oxygène, azote, soufre, phosphore, potassium, calcium et magnésium sont consommés en quantités élevées, alors que les oligoéléments le sont en moindre mesure : fer, bore, manganèse, molybdène et chlore. L'ensemble de ces éléments sont prélevés sous forme d'ions dans la solution du sol, excepté le carbone, l'hydrogène et l'oxygène qui viennent de l'eau et du gaz carbonique de l'air.

Les solutions nutritives peuvent être considérées comme des solutions d'ions inorganiques non libres. En effet, l'équilibre dynamique existant entre les réactions de complexation (formation, dissociation), de dissolution / précipitation aboutit à une spéciation spécifique des éléments (de Rijck et Schrevens, 1997). Par ailleurs, la biodisponibilité et la toxicité des métaux dissous sont étroitement liées à cette spéciation chimique dans le milieu d'exposition. Une bonne connaissance des réactions chimiques se déroulant dans la solution nutritive est un prérequis nécessaire pour travailler en hydroponie et comprendre les phénomènes observés. L'étape de mise au point de la solution nutritive, à l'aide d'un modèle de spéciation géochimique, présentée va dans ce sens.

L'objectif était de créer un milieu artificiel mimant la solution du sol et qui serait un bon compromis entre les besoins nutritionnels de la plante et la maîtrise de la spéciation de l'uranium en solution.

Cette spéciation en solution, pH dépendante, est complexe et nécessite un contrôle dans le milieu de culture. Pour cela, des modèles de spéciation sont utilisés pour déterminer les complexes pouvant se former entre l'uranium et les éléments nutritifs de la solution. Plusieurs solutions nutritives utilisées pour cultiver les plantes supérieures ont déjà été décrites dans la littérature. Ces solutions sont souvent concentrées en éléments nutritifs pouvant complexer et précipiter l'uranium. Pour déterminer une composition de la solution nous permettant de

maîtriser la spéciation de l'U(VI) en solution, nous nous sommes appuyés sur un modèle de spéciation géochimique, JCHESS (Van der Lee, 1998). Les constantes de formation des divers complexes possibles en solution et des espèces solides ont été révisées et corrigées à partir de diverses bases de données (NEA, NIST, IUPAC) (Denison, 2002). La composition de la solution nutritive ayant servi de base à la modélisation est la solution de Johnson modifiée, proche de la solution de Hoagland diluée 2 fois couramment utilisée en hydroponie (Ebbs *et al.*, 1998). Cette solution s'est révélée trop concentrée en certains éléments tels que le zinc, le cuivre et le magnésium, composés qui précipitaient. Une nouvelle solution a donc été élaborée de manière à éliminer toute précipitation de l'uranium (tableau 9). Le pH de la composition de la solution de référence, en équilibre avec l'air, est d'environ 5,3 et la force ionique de $0,0044 \text{ mol.L}^{-1}$.

Par ailleurs, les phosphates, qui forment des complexes très stables avec l'uranium pour une large gamme de pH, ont été éliminés de la solution et seront apportés par voie foliaire.

Tableau 9. Composition chimique de la solution nutritive modélisée et utilisée pour les contaminations, en équilibre avec l'atmosphère ($\text{CO}_2(\text{g}) = 3,2 \cdot 10^{-4}$). La solution de départ (Johnson modifiée), base pour la modélisation, est donnée pour référence, tout comme la solution de Hoagland.

Espèces	<i>Hoagland diluée 2 fois</i>	<i>« Johnson modifiée »</i>	<i>Solution nutritive (utilisée)</i>
	Concentration (mol/L)	Concentration (mol/L)	Concentration (mol/L)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	$5,0 \cdot 10^{-4}$		
KNO_3	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$0,25 \cdot 10^{-3}$
$\text{MgSO}_4(\text{aq})$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$0,15 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4(\text{aq})$		$1,0 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
$\text{ZnSO}_4(\text{aq})$		$1,0 \cdot 10^{-6}$	$0,25 \cdot 10^{-6}$
$\text{CuSO}_4(\text{aq})$		$0,5 \cdot 10^{-6}$	$0,25 \cdot 10^{-6}$
$\text{MoO}_4(2-)$		$0,1 \cdot 10^{-6}$	$0,1 \cdot 10^{-6}$
NiSO_4		$0,1 \cdot 10^{-6}$	$0,1 \cdot 10^{-6}$
Fe EDTA		$5,0 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$

2.2.2. Spéciation de l'uranium dans la solution nutritive

Le modèle de spéciation géochimique JCHESS a été utilisé pour prédire la spéciation de l'uranium en solution.

Nous avons ainsi pu déterminer 3 grands domaines d'étude (figure 12) :

- pH < 5,5, où l'uranium est majoritairement sous sa forme d'ions libres (ions uranyles UO_2^{2+}) ;
- pH 5,5 < 6,4, où les hydroxocomplexes dominent ;
- pH > 6,4, où ce sont les complexes hydroxo-carbonatés qui dominent.

Ces 3 pH : 4,9 ; 5,8 et 7, qui déterminent des conditions contrastées, quant à la spéciation de l'uranium en solution, seront nos 3 pH d'étude pour l'ensemble des expérimentations.

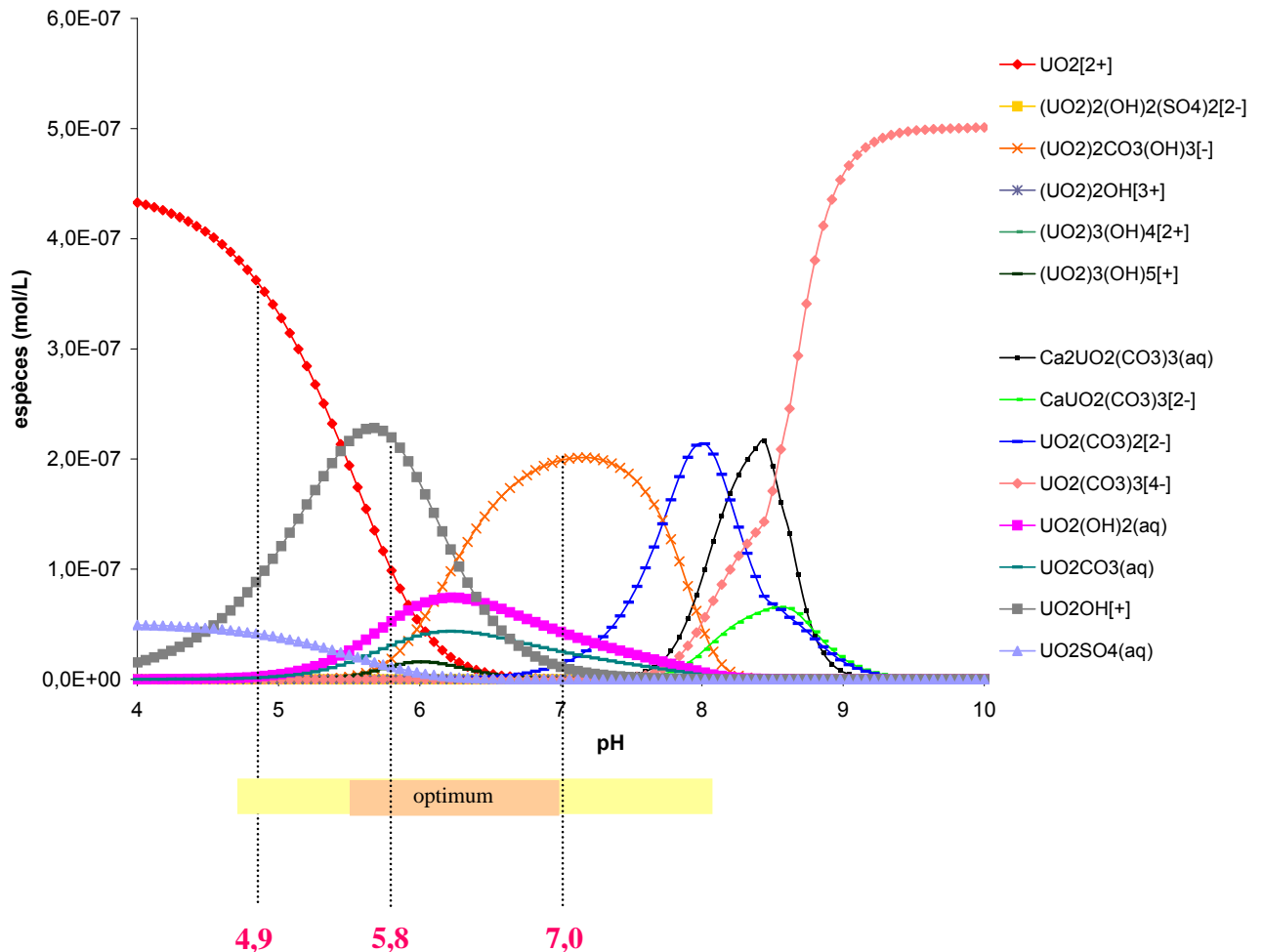


Figure 12. Diagramme simplifié de spéciation de l'uranium dans la solution nutritive de travail, $[\text{U}] = 500 \text{ nM}$, sans phosphates, en équilibre avec l'atmosphère. La gamme de pH tolérés par *Phaseolus vulgaris* et le domaine de l'optimum de croissance sont également représentés.

La variation de la force ionique peut constituer un facteur parasite potentiel pouvant être due, par exemple, à la modification de la charge superficielle de l'interface biologique.

Pour nos expériences, nous avons décidé de maintenir la force ionique de la solution constante pour toutes les conditions, impliquant de ce fait de jouer sur la concentration de contre-ions pour la condition où les concentrations en calcium varient, par ajout de KNO_3 .

2.3. Conditions de culture des plantes

Germination des haricots

La germination des haricots est réalisée sur papier filtre imbibé d'eau distillée pendant 4 jours à 24°C et à l'obscurité.

Les graines germées sont ensuite transférées dans des bacs contenant de la vermiculite qui servira de support aux plantes et permettra ainsi le développement racinaire. Les caractéristiques de la vermiculite sont données dans le tableau suivant (tableau 10) :

Tableau 10. Caractéristiques générales de la vermiculite.

Type	pH	porosité	Rétention en eau (en volume)	Granulométrie	caractéristiques
Mica expansé laminaire	7,5	Hydrophile 95,4 %	45 – 50 %	1 – 4 mm	Stérile, aéré, léger, incombustible

La vermiculite va agir comme un tampon retenant l'eau et les éléments et pouvant les libérer en cas de manque. Si dans le cas des cultures traditionnelles, il est souvent associé à du terreau compact pour l'aérer, dans notre culture, ce matériau est utilisé seul et sert de support physique aux plantes. Les plantules sont arrosées avec de la solution nutritive pour leur apporter tous les éléments dont elles ont besoin et l'apport en phosphates se fait par pulvérisation foliaire (0,5 mM tous les 5 jours).

Période d'adaptation des plantes à la solution nutritive

Les plantules sont laissées dans ces bacs jusqu'à ce que les cotylédons se soient légèrement développés (de façon aussi à ce que le chevelu racinaire se développe suffisamment) puis sont transférées dans la solution nutritive de travail, de manière à adapter la physiologie de la plante à ce nouveau milieu.

Avant transfert, les plantes sont retirées délicatement de manière à ne pas trop léser les racines. Les racines sont ensuite débarrassées manuellement des particules de vermiculite restées accrochées puis transférées dans des bacs contenant de la solution nutritive aérée en continu (une vingtaine de plants dans 6 L de solution, de manière à respecter les ratios lors de la contamination qui sont de 300 - 400 mL de solution par plantes).

Enfin, une dernière étape avant contamination consiste à adapter les plantes au pH d'étude. Les plantes sont donc adaptées au pH de la solution nutritive durant 2-3 jours avant d'être transférées dans les solutions contaminées (le seul facteur de stress, discriminant entre les groupes témoins et les groupes exposés, devient alors uniquement la présence d'uranium dans la solution) (figure 13).

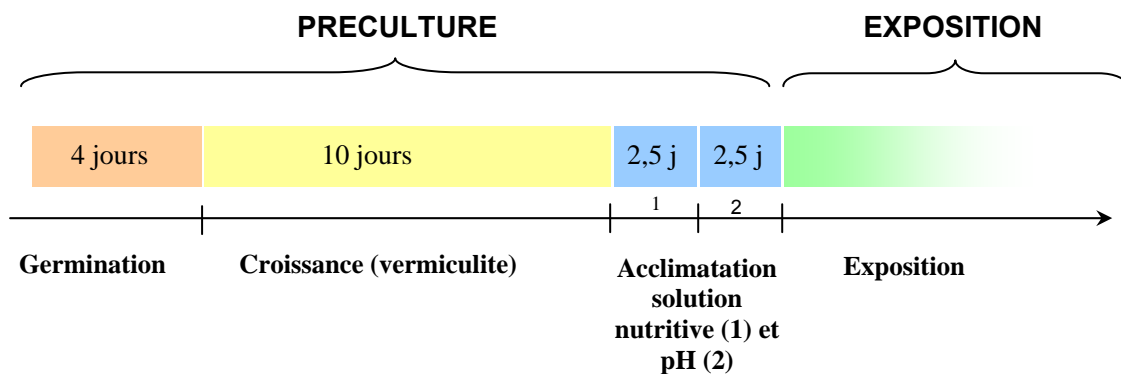


Figure 13. Schéma général des différentes phases de culture (germination, croissance et acclimatation) avant exposition à l'uranium des végétaux.

Conditions de culture

La culture des haricots (pré-culture et exposition) est conduite dans une chambre de culture (phytotron) dont les paramètres extérieurs de type photopériode, intensité lumineuse, température et humidité relative sont maîtrisés de manière à ne pas modifier la physiologie de la plante en réponse à un changement de ces facteurs.

Les conditions de culture choisies sont donc les suivantes : 16 heures de photopériode (jour) (dont une heure pour la diminution ou l'augmentation de luminosité) et 8 heures de nyctipériode (nuit):

- 00h – 07 h : jour, 24°C, 660 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ (66%) et 60% d'humidité
- 07h – 08h : idem avec mi-luminosité (33%)
- 08h – 16h : nuit, 18°C, 60% d'humidité (0%)
- 16h – 17h : mi-luminosité (33%)
- 17h – 24h : jour, 24°C, 660 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ (66%) et 60% d'humidité

Ces conditions sont couramment retrouvées dans la littérature pour les expériences conduites sur le haricot.

NB : Pour s'assurer que les racines des plantes soient bien à l'obscurité (lors de la culture ou de la contamination), les pots ont été recouverts de plastique agricole (noir sur sa face interne et blanc sur sa face externe pour éviter de chauffer la solution). La solution est également aérée en permanence par bullage.

2.4. Etude de la relation spéciation de l'uranium (VI) et transfert dans le végétal

Pour chacune des expériences, les prélèvements destinés à la détermination de la concentration en uranium dans la solution nutritive sont toujours réalisés selon 3 étapes présentées ci-dessous (figure 14) :

- t0 au moment où l'uranium est ajouté au milieu (contamination)
- t0 avant plantes (prélèvement du milieu avant d'y mettre les plantes et après 36 h d'équilibration du système)
- en fin d'exposition

De plus, pour l'ensemble des expériences, en fin d'exposition et après avoir retiré les plantes de la solution contaminée, les racines sont rincées 2 fois dans 80 mL de solution nutritive non contaminée puis 1 fois à l'eau déminéralisée (à la pissette).

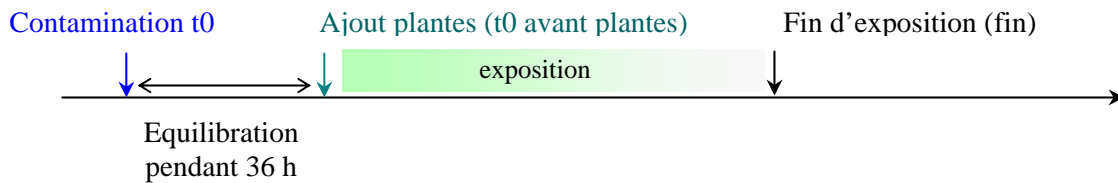


Figure 14. Schéma général des divers prélèvements destinés à la détermination de la concentration en uranium dans la solution nutritive.

2.4.1. Dispositifs expérimentaux

A. Expériences préliminaires sur la plante entière (système ouvert)

Les objectifs de cette expérience étaient de :

- ◆ Déterminer si le stade de croissance des plantes pouvait influencer le transfert d'uranium ;
- ◆ Déterminer s'il existait un organe (tige, feuilles ou racine) concentrant particulièrement l'uranium ;
- ◆ Déterminer les cinétiques de transfert de l'uranium aux plantes sur quelques jours d'exposition et la cinétique de translocation.

Des expériences préliminaires ont été menées dans un premier temps sur la plante entière (séparation en tiges, feuilles et racines) de manière à étudier sur une période de 6 jours le transfert d'uranium de la solution nutritive aux plants de haricots. Deux stades de croissance ont été comparés : le stade plantule (premières feuilles trilobées présentes mais peu développées) et le stade floraison. L'ensemble de ces expérimentations nous donnera donc une idée de la cinétique de transfert de l'uranium mais aussi de sa répartition dans le végétal, et nous permettra de déterminer le stade de croissance du haricot à considérer pour les autres expérimentations.

Les faibles facteurs de transferts racinaires déterminés pour les légumes fruits (pois, haricots) en présence d'uranium ($2,5 \cdot 10^{-3} \text{ Bq} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{veg sec}} / \text{Bq} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{sol sec}}$) (Sheppard et Evenden, 1988) ont conduit à privilégier l'utilisation de l'uranium 233 pour ces expérimentations. L'utilisation de ^{233}U permet de bénéficier, en termes de métrologie de l'uranium, de meilleurs seuils de détection grâce à l'analyse par scintillation liquide (80 mBq/aliquote, soit pondéralement 1 ng/L contre 5 $\mu\text{g/L}$ pour l'ICP-AES).

Le dispositif employé lors de ces expériences préliminaires est présenté en figure 15.

Expérimentations pour les 2 stades (dispositif ouvert) :

- 400 mL de solution nutritive contaminée pour chaque plante
- 1 bac nourrice de 5 L donc le pH est maîtrisé et qui alimente en continu les pots de 400 mL, lesquels se déversent dans ce même bac.
- pH d'étude : 4,9 ; 5,8 ($\pm 0,05$) mesuré par une sonde pH reliée à un pH-stat (Consort K305, multicanal), lequel est relié à une pompe péristaltique injectant de l'acide nitrique 0,1 M lorsque le pH augmente. Solution aérée en continu (pompe à air M2K3 SCHEGO, 350 L/h).
- Après contamination à l' ^{233}U (250-300 nM, source CERCA-LEA Framatome, sous forme de nitrate d'uranium dans 1N de HNO_3), l'ensemble du dispositif (bullage et maintien du pH) tourne durant 36 heures sans plantes, de manière à équilibrer le système et saturer les sites de fixation à la surface des matériaux
- Les plantes sont ensuite ajoutées (n = 4 réplicats par conditions) et retirées après 1, 2, 3, 4 ou 6 jours d'exposition à l'uranium au stade floraison et 3 jours au stade plantule. Les tiges, feuilles et racines sont séparées, pesées et mises à l'étuve et seront préparées de manière à déterminer leur teneur en uranium en scintillation liquide (protocole § 2.8.1).

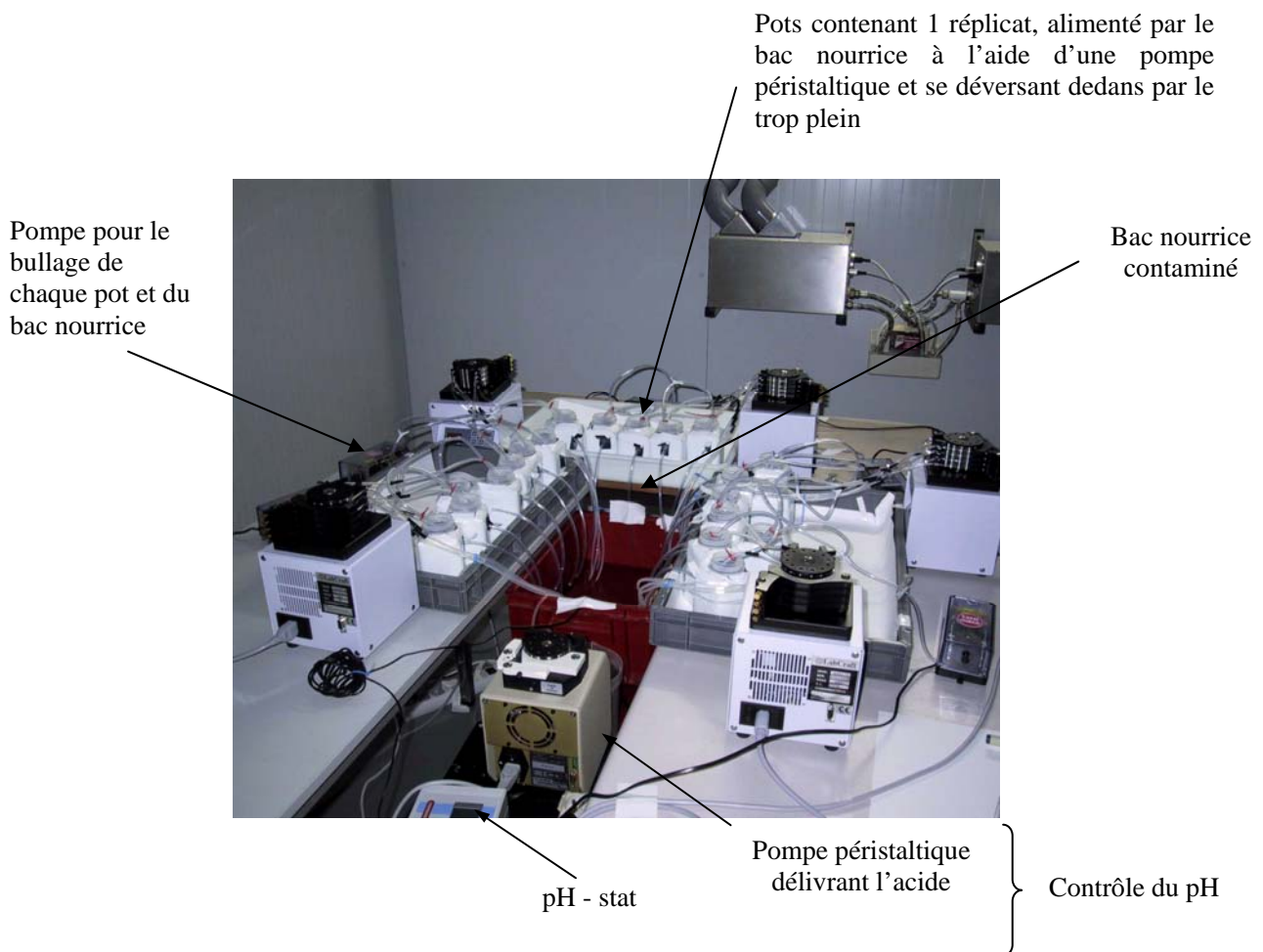


Figure 15. Dispositif expérimental, en circuit ouvert, utilisé pour les expériences préliminaires d'étude du transfert solution contaminée – plante, durée d'exposition de 6 jours.

B. Expériences visant à comprendre la relation spéciation U(VI) – transfert à la plante (milieu fermé)

Les objectifs de cette expérience étaient de :

- ◆ Déterminer l'effet sur le transfert de la concentration en uranium dans le milieu d'exposition ;
- ◆ Déterminer si les ions compétiteurs (Ca^{2+} et H^+) influençaient le transfert ;
- ◆ Déterminer si les complexants (phosphates et citrate) influençaient également ce transfert ;

Pour cela, des expériences à « *court terme* » ont été menées sur quelques heures, en s'intéressant plus particulièrement aux interactions de l'uranium en solution avec la racine de la plante. Le stade de développement sélectionné est le stade « plantule ».

Les expérimentations préliminaires, conduites sur une durée maximale de 6 jours, nous ont révélé que l'uranium se concentrait à 99% dans la racine et que le stade plantule concentrait plus l'uranium.

Les plants de haricots ne sont donc plus exposés à l' ^{233}U mais à de l'uranium appauvri (source beaucoup moins onéreuse, les expériences précédentes ayant montré que pour cet organe, les limites de détection de l'ICP-AES étaient adéquates).

Sur la base d'un design expérimental identique, un ensemble d'expériences a été conduit pour quantifier l'accumulation du métal en fonction de différentes variables abiotiques / biotiques : pH, ions compétiteurs ou complexants (dont un complexant organique mimant un exsudat racinaire).

L'ensemble de ces expériences nous permettra de vérifier ou non la validité du modèle de l'ion libre ou modèle du ligand biologique (dit « BLM » pour Biotic Ligand Model) (§ 1.6.2.).

Le détail du dispositif expérimental employé est présenté en figure 16.

Expérimentations (dispositif fermé, figure 16) :

- Bacs contenant 1,2 L de solution nutritive et 4 plants de haricots
- pH d'étude : 4,9 ; 5,8 ou 7,0 ($\pm 0,05$) mesuré dans chaque bac par une sonde pH, reliée à un pH-stat (relié à une pompe péristaltique injectant de l'acide nitrique 0,1 M), solution aérée en continu (contrôle du pH identique à celui des expériences préliminaires sur la plante entière).
- Après contamination à l'uranium (uranium appauvri sous forme de nitrate d'uranyle solide $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), l'ensemble du dispositif tourne également durant 36 heures sans plantes, de manière à équilibrer le système et saturer les sites de fixation à la surface des matériaux
- Les plantes sont ensuite ajoutées (n = 4 réplicats par conditions) et retirées après un temps spécifique d'exposition à l'uranium. Les racines sont les seuls organes étudiés. Elles sont pesées et mises à l'étuve et seront préparées de manière à déterminer leur teneur en uranium en ICP-AES (protocole § 2.8.1).

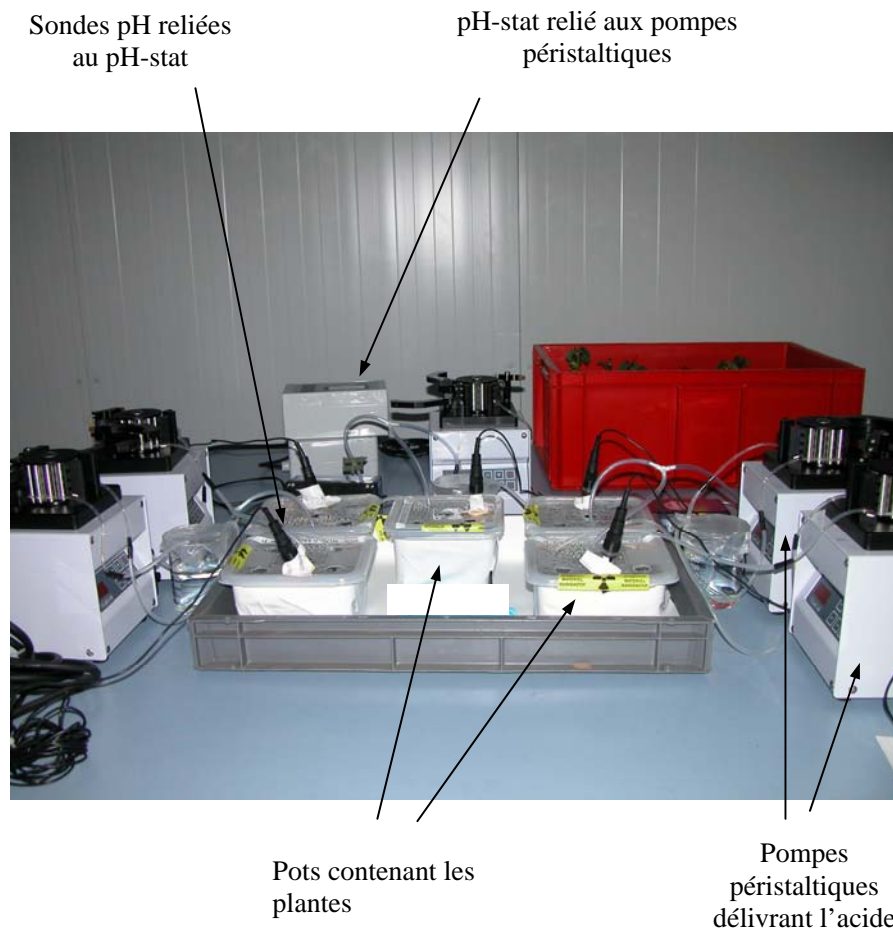


Figure 16. Dispositif expérimental, en circuit fermé, utilisé pour les expériences spéciation (VI) – transfert focalisées sur la racine, exposition dur quelques heures.

C. Test de saturation des racines et répartition de l'uranium selon l'âge des racines

Les objectifs de cette expérience à pH 4,9 étaient de :

- ◆ Déterminer la concentration en uranium saturant les racines ;
- ◆ Déterminer si le calcium présent au niveau des parois racinaires était déplacé par l'uranium ;
- ◆ D'établir une « cartographie » de l'uranium dans la racine selon l'âge des racines.

Les expériences relatives à l'influence de la concentration de l'uranium sur le transfert ont révélé que dans la gamme établie (jusqu'à 3 - 4 μM aux pH 5,8 et 7 et 21 μM au pH 4,9), il n'y avait pas de saturation des racines. Une autre expérience a donc été conduite, au pH 4,9 (limite de solubilité de l'uranium la plus élevée), en circuit ouvert, c'est à dire en alimentant en continu le bac contenant les plantes avec de la solution nutritive fortement contaminée (environ 20 μM) avec un débit de renouvellement de la solution contenant les plantes de 2 L/h. La concentration en uranium de la solution d'exposition est maintenue constante. Les plants de *Phaseolus vulgaris* ont ainsi été exposés durant 5 heures.

L'intérêt de cette expérience était d'une part de déterminer une concentration pour laquelle les racines des plantes étaient saturées en uranium et d'autre part, d'étudier au niveau de la paroi les mécanismes de fixation de l'uranium sur la racine, en particulier si l'uranium remplace les ions Ca^{2+} présents dans les parois des cellules. Pour cela, les ions Ca^{2+} ont été retirés de la solution nutritive (force ionique corrigée avec du KNO_3 de manière à la conserver identique entre les expériences) de façon à pouvoir mesurer un éventuel relargage des ions Ca^{2+} en solution, à mesure que l'uranium se fixe sur les parois des cellules des racines. Nous avons en effet pu constater suite à la revue bibliographique (§ 1.6.3.2.2.) qu'une forte proportion du calcium présent dans les tissus des végétaux est souvent située dans la paroi des cellules (apoplasme). Une partie du calcium est ainsi fortement liée dans les structures et une autre partie est échangeable au niveau des parois des cellules et sur la face externe de la membrane plasmique. C'est la présence de ce calcium, à la surface des cellules, qui va pouvoir influencer l'absorption par les organismes de métaux tels que l'uranium en entrant directement en compétition avec le métal libre pour la fixation à la surface des cellules.

Enfin, par cette expérience nous voulions également établir une « cartographie » de la répartition de l'uranium dans la racine et notamment distinguer sa répartition entre les jeunes racines (de couleur claire) et les racines plus âgées (de couleur marron foncé).

Le dispositif expérimental employé est présenté en figure 17.

Dispositif (figure 17) :

- Le pot contenant les 4 réplicats de plantes (1,2 L de solution) est alimenté, en continu (à partir d'un bac nourrice contenant 11 L de solution nutritive), par une solution contaminée de manière à conserver constante la teneur en uranium (pot ayant un système de trop plein permettant de conserver les volumes et se déversant dans un bac sortie dans lequel les prélèvements seront réalisés). Dans ce bac nourrice, la solution est bullée (pompe à air M2K3) de manière à l'aérer mais surtout à l'homogénéiser. Le pot contenant les plantes est également bullé. Enfin, dans chacun des bacs (nourrice et avec plantes), le pH de la solution nutritive est maintenu à une valeur donnée de 4,9 ($\pm 0,05$) comme décrit précédemment. Les plantes sont ainsi exposées durant 5 heures.

- Mesure dans la solution nutritive :

Pour chaque expérience, la solution nutritive est analysée en terme de teneur en uranium, cations et anions à :

t_0 , t_0 avant plantes et en fin d'expérience

la solution du bac de sortie est également prélevée (tous les quart d'heure) de manière à être analysée en termes de teneur en cations (évolution du calcium) et en uranium.



Figure 17. Dispositif expérimental, en circuit ouvert, utilisé pour les expériences d'étude des mécanismes d'interaction avec la paroi à court terme.

2.4.2. Protocoles expérimentaux détaillés des expériences spéciation U (VI) - transfert

Seront d'abord présentés les protocoles des expériences préliminaires qui nous ont permis de dimensionner les travaux étudiant plus spécifiquement le lien biodisponibilité – transfert d'uranium. Les protocoles expérimentaux de ces derniers sont ensuite proposés (effet des ions compétiteurs et des ligands).

A noter que les protocoles détaillés des expériences préliminaires sur la plante entière et sur le test de saturation et cartographie des racines sont présentés en figures 15 et 17 respectivement.

A. Expériences préliminaires

Des cinétiques, de l'ordre de quelques heures, vont nous permettre de définir pour les 3 pH d'étude un temps d'exposition donné et de définir, grâce à une gamme de concentrations en uranium, une concentration pour laquelle les plantes accumulent.

1. Cinétique de transfert

Le transfert de l'uranium dans le haricot a été étudié à court terme, sur une échelle de quelques heures : de 30 min à 9 heures (30 min, 1h, 2h, 3h, 5h et 9h, voire entre 5 min et 30 min au pH 4,9) aux 3 pH (4,9 ; 5,8 et 7,0) avec une contamination des plantes de 600 nM (uranium appauvri).

2. Influence de la concentration en uranium sur le transfert

Les plantes ont été exposées à une gamme de concentrations croissantes en uranium pendant 5 heures. Cette gamme s'étend de 40 nM à environ 4 µM aux pH 5,8 et 7,0 et a été étendue jusqu'à près de 21 µM au pH 4,9 (à la limite de la solubilité de l'uranium à ce pH).

Pour l'ensemble des expériences, le même protocole expérimental, et donc le même dispositif sera utilisé, le circuit fermé (figure 16).

Les solutions nutritives sont préparées (avec des teneurs différentes en certains ions tels que phosphates, citrate, calcium, etc.. selon la variable étudiée), placées dans les pots et contaminées avec une concentration donnée en uranium (qui sera la même pour chaque expérience) (t_0). Le pH de la solution nutritive est ajusté à la valeur consigne et le dispositif est laissé ainsi pour s'équilibrer durant 36 heures (t_0)

avant plantes). Après équilibration du système, les plantes sont transférées dans les solutions contaminées et sont exposées durant 5 heures. Après ces 5 heures, les racines sont rincées, pesées, séchées, puis l'uranium y a été mesuré.

B. Relation spéciation U (VI) - transfert

1. Effet des cations compétiteurs : H⁺ (effet pH) et Ca²⁺

- Effet des ions H⁺

L'effet pH peut être appréhendé au travers de l'expérience utilisant la gamme de concentrations aux pH 4,9, 5,8 et 7,0. Ainsi, nous pourrions comparer les Facteurs de Transfert pour ces 3 pH et donc étudier l'influence de la spéciation sur le transfert, puisque ces 3 pH déterminent des conditions contrastées de spéciation de l'uranium (figure 12).

Les plantes sont donc exposées durant 5 heures aux gammes suivantes (t₀ avant plantes) :

- pH 4,9 : 78 nM - 234 nM - 774 nM - 1,43 µM - ,97 µM - 3,30 µM - 7,74 µM - 12,5 µM - 16,2 µM - 20,7 µM.
- pH 5,8 : 21 nM - 184 nM - 671 nM - 958 nM - 2,44 µM - 4,39 µM.
- pH 7,0 : 99 nM - 461 nM - 606 nM - 1,89 µM - 3,28 µM.

- Effet des ions calcium

Cette expérience consiste à augmenter la concentration en ions calcium, ions supposés compétiteurs de l'uranium pour les sites de fixation à la surface de la racine.

Dans l'environnement, le calcium (tout comme le magnésium), qui fait partie des éléments majeurs pour la nutrition des végétaux, est présent à des teneurs moyennes de 0,1 à 2 mM (5 mM dans les cas extrêmes) dans la solution du sol.

Nous nous sommes donc appuyés sur ces teneurs et avons déterminé une gamme de concentrations en calcium s'étendant de 0,1 à 5 mM (0,1 – 0,5 – 1 – 2 – 5 mM). Des précautions restent cependant nécessaires à prendre car l'action sur la teneur en ions calcium modifie sensiblement la force ionique du milieu. Celle-ci a donc été corrigée à l'aide de KNO₃ pour rester du même ordre de grandeur pour chaque condition (modélisation par JCHESS).

2. Effet des ions complexants : phosphate et citrate

- Effet des phosphates

Cette étude repose sur le fait que la spéciation de l'uranium peut être grandement affectée par la présence de phosphates qui vont pouvoir complexer l'ion libre et ainsi diminuer sa teneur dans le milieu.

Gamme de concentrations en phosphates

La gamme de concentrations en phosphates utilisée a été bornée par les valeurs proches des extrêmes pouvant être observés dans l'environnement. Ainsi, dans les sols, ils peuvent être trouvés à des concentrations allant de quelques micromolaires à près de 20 micromolaires, dans les cas vraiment les plus extrêmes. La gamme de concentrations en phosphates choisie est donc la suivante : 0 – 0,5 – 1 – 5 – 10 et 15 μM pour les 3 pH d'étude 4,9, 5,8 et 7,0.

Teneur en uranium choisie

Dans un premier temps, nous nous sommes appuyés sur les résultats de modélisation pour déterminer la quantité d'uranium totale à apporter tout en s'assurant que l'uranium ne précipite pas. En effet avec une concentration élevée en phosphates et en uranium, ces deux espèces vont former des complexes insolubles qui vont précipiter. Il a donc été déterminé une teneur en uranium pour laquelle il n'y a pas de précipitation (indice de saturation < 0) quel que soit le pH de la solution nutritive. Les contaminations se feront donc avec 300 nM d'uranium (t_0), concentration qui sera également utilisée pour l'ensemble des autres expériences (calcium, citrate). L'évolution de l'indice de saturation, pour 300 nM d'uranium, en fonction de la concentration en phosphates est donnée en exemple au pH 7,0 (figure 18).

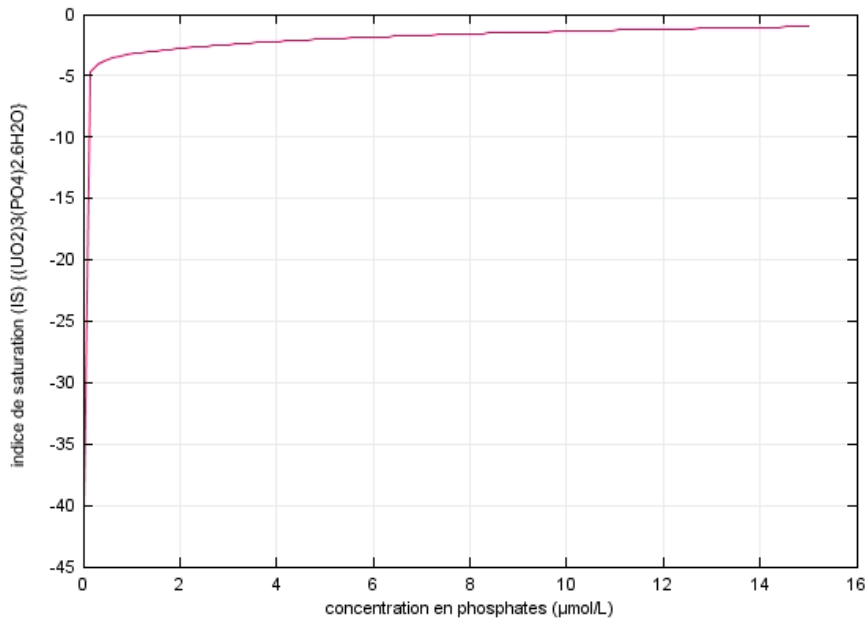


Figure 18. Evolution de l'indice de saturation à pH 7,0 en fonction de la concentration en phosphates dans le milieu, $[U_T] = 300 \text{ nM}$.

- Effet du citrate

Une gamme de concentrations en citrate de sodium a été choisie variant entre 0 et 10 $\mu\text{mol/L}$. Cette gamme a été établie en fonction des teneurs retrouvées dans la solution du sol naturellement : 0 – 0,5 – 1,5 – 3 – 5 – 10 $\mu\text{mol/L}$.

Précautions à prendre

Lors de ces expérimentations, quelques précautions restent à prendre. En effet, Dodge *et al.* (1992) ont rapporté qu'il se produisait une photodégradation du complexe binucléaire uranium – citrate aux pH 3,5 et 6. L'uranium est d'abord réduit puis réoxydé en présence de dioxygène pour précipiter en solution sous la forme de schoepite. Ce composé peut alors se combiner aux différentes formes de citrate ou les composés intermédiaires organiques pour continuer les réactions photochimiques. Cette réaction entraîne alors la disparition de protons, intervenant dans l'augmentation du pH observée lors de la photodégradation.

L'exposition du complexe à la lumière entraîne une dégradation du citrate, provoquant un abaissement de 55 % de sa teneur pendant les 7 premières heures d'exposition. La conséquence de cette dégradation est une augmentation de près d'une unité et demie du pH (de 3,48 à 4,9). Après 48 heures, celui-ci est totalement dégradé. La photodégradation du complexe entraîne également une disparition de l'uranium dans la solution. Après 24 heures, la teneur en uranium dans la solution

avait diminué de 78 %. Cette diminution s'est poursuivie lentement pour atteindre 95 % après 192 heures (Cleveland, 2002).

C'est pourquoi, pour s'affranchir de toute photodégradation éventuelle, la solution est conservée à l'abri de la lumière pendant toute la durée de l'expérimentation.

Le tableau 11 présente une synthèse des différentes expériences menées.

Matériels et Méthodes

Tableau 11. Synthèse des différentes conditions testées pour l'étude de la relation spéciation U (VI) - transfert.

Expériences	Stade de développement	réplicats	pH	[U_T]	Temps d'exposition	[calcium] (mM)	[phosphate] (µM)	[citrate] (µM)	Organes étudiés	Descriptif
Cinétiques préliminaires plante entière	floraison et plantule	n = 4	4,9 et 5,8	250 nM	1, 2, 3, 4 et 6 jours	0,25	0	0	Tige, feuilles et racine	§ 2.4.1.A, figure 15
Cinétiques préliminaires racine	plantule	n = 4	4,9, 5,8, 7,0	600 nM	5 – 30 min, 1h, 2h, 3h, 5h, 9h	0,25	0	0	racine	§ 2.4.1.B, § 2.4.2.A, figure 16
Expériences préliminaires effet concentration	plantule	n = 4	4,9, 5,8, 7,0	78 nM - 20,7µM 21 nM - 4,4 µM 99 nM - 3,3 µM	5 heures	0,25	0	0	racine	§ 2.4.1.B, § 2.4.2.A, figure 16
Effet calcium	plantule	n = 4	4,9, 5,8, 7,0	300 nM	5 heures	0,1 - 0,5 - 1- 2 - 5	0	0	racine	§ 2.4.1.B, § 2.4.2.B, figure 16
Effet phosphates	plantule	n = 4	4,9, 5,8, 7,0	300 nM	5 heures	0,25	0 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 15	0	racine	§ 2.4.1.B, § 2.4.2.B, figure 16
Effet citrate	plantule	n = 4	4,9, 5,8, 7,0	300 nM	5 heures	0,25	0 - 0,5 - 1,5 - 3 - 5 - 10	0	racine	§ 2.4.1.B, § 2.4.2.B, figure 16
Test saturation et cartographie	plantule	n = 4	4,9	19,7 µM	5 heures	0	0	0	racine	§ 2.4.1.C, figure 17

2.4.3. Caractérisation du transfert : Facteurs de Transfert

Comme nous l'avons vu précédemment, le transfert d'éléments à la plante est caractérisé, quel que soit l'élément, par un terme unique : le facteur de transfert (FT) ou facteur de concentration plante/sol. Il est bien évident que les facteurs de transfert déterminés en solution hydroponique ne sont pas comparables à ceux calculés dans les conditions environnementales. En solution hydroponique simplifiée, la biodisponibilité des éléments est maximale car les interactions avec les phases minérale et organique ne sont pas prises en compte car inexistantes.

Cette expression du transfert permet ainsi de « normaliser » les résultats et de pouvoir comparer les résultats aux différentes concentrations en uranium dans le milieu.

$$\text{FT racinaire} = \frac{\text{concentration en uranium dans la racine } (\mu\text{mol U/gMS})}{\text{concentration en uranium dans la solution } (\mu\text{mol U/ L})}$$

Le facteur de Transfert utilisé dans cette étude est un calcul propre à nos conditions expérimentales dans lesquelles la teneur en uranium dans le milieu varie entre le moment où les plantes sont placées dans le milieu et en fin d'exposition. Le FT racinaire est défini dans cette étude comme le rapport de la concentration en uranium mesurée dans la racine en fin d'exposition ($\mu\text{molU/gMS}$) et la concentration en uranium dans le milieu d'exposition au moment d'y introduire les plantes (t_0 avant plantes en $\mu\text{molU/L}$).

D'autres termes permettent aussi de décrire de façon plus réaliste les transferts d'éléments. C'est le cas du calcul des flux (§ 1.3.3.), avec le flux donné par le rapport de la concentration en uranium dans la racine et le temps d'exposition ($\mu\text{molU/gMS/h}$) et le flux normalisé, notre facteur de transfert exprimé en fonction du temps :

$$\text{Flux normalisé} = C_{\text{racine}} / (P * t * C_{\text{solution}}) \text{ en } \mu\text{mol U/gMS/h}/\mu\text{molU/L}$$

Avec :

C_{racine} : la teneur en uranium dans la racine en fin d'exposition ($\mu\text{moles U}$) ;

P : la masse de matière sèche de racine (gMS) ;

t : le temps d'exposition des plantes (heures) ;

C_{solution} : la concentration en uranium dans le milieu d'exposition avant d'introduire les plantes (t_0 avant plantes).

2.5. Test de toxicité : effet de l'uranium sur l'élongation racinaire

L'objectif de cette expérience était de déterminer l'effet sur l'élongation racinaire de concentrations croissantes en uranium.

Les données bibliographiques ont montré que l'élongation racinaire, après germination des graines, était une phase de croissance sensible aux stress environnementaux. Par ailleurs, la validité et la sensibilité de ce test pour déterminer la phytotoxicité des métaux traces étant admise, la phytotoxicité de l'uranium sur notre plante modèle a donc été étudiée grâce à ce test, après exposition directe des graines germées à la solution contaminée (absence de substrat). Le protocole d'évaluation de l'élongation racinaire, d'une plante soumise à la contamination d'un métal, employé par Parker *et al.* (1998, 2001) a servi de base à celui que nous avons employé pour déterminer la phytotoxicité de l'uranium. Il a été adapté à notre espèce végétale *P. vulgaris*, différente de celle employée par Parker *et al.* (1998, 2001), qui étudiaient le blé.

Les graines de *P. vulgaris* sont germées sur papier filtre imbibé de solution nutritive non contaminée durant 5 jours, à l'obscurité et à 24°C. Après 5 jours, les 3 plus longues racines latérales de chacune des graines, qui seront contaminées, sont mesurées (L_{initiale}), puis 5 de ces graines sont transférées dans des bacs contenant 3 litres de solution nutritive contaminée au nitrate d'uranyle dont le pH est maîtrisé aux pH 4,9, 5,8 ou 7. La solution est aérée en continu par bullage et les graines sont conservées à l'obscurité et à 24°C durant toute la durée de l'expérience (72 heures). Des graines témoins, germées dans les mêmes conditions, subissent le même protocole mais sont placées dans une solution nutritive non contaminée ($L_{\text{témoin}}$).

Les 3 plus longues racines (déterminées et mesurées au temps initial) sont à nouveau mesurées au terme de 24h, 48h et 72h d'exposition à l'uranium ($L_{\text{métal}}$).

L'élongation racinaire est alors calculée comme suit :

$$\% \text{ élongation} = (L_{\text{métal}} - L_{\text{initiale}} / L_{\text{témoin}} - L_{\text{initiale}}) * 100$$

NB : de façon à pouvoir reconnaître les graines et les racines considérées, les graines sont « baguées » (colliers de couleur pour les différencier) et photographiées.

2.6. Effet de l'uranium sur la Capacité d'Echange Cationique des racines (CECR)

Les objectifs de cette expérience étaient de :

- ◆ Déterminer l'influence de la contamination à l'uranium sur la capacité d'échange cationique des racines ;
- ◆ Déterminer la CECR en fonction de l'âge des racines et du stade de développement.

Généralités sur la CECR

Nous avons vu précédemment (section 1.5.1.2) que la CECR représentait en quelque sorte le nombre de sites d'échange de cations (sites anioniques, dont les groupements carboxyliques R-COO⁻) situés dans les parois des cellules de la racine. Lorsque la CEC des tissus augmente, la capacité d'échange et d'adsorption des cations augmente (Marschner, 1995). L'âge des racines joue également un rôle important puisqu'il influence la CECR.

Nous allons donc étudier la CECR des plants de haricots au stade floraison et au stade plantule, après exposition de 3 jours à l'uranium (mêmes conditions que dans les expériences préliminaires) de manière à pouvoir éventuellement expliquer le comportement des plantes à ces 2 stades vis à vis de leur absorption d'uranium. La CEC des racines sera donc déterminée pour les 2 stades sur 2 réplicats de plantes témoins et contaminées, en dissociant pour chaque racine les parties jeunes des parties plus âgées, aux 3 pH d'étude.

Cette CECR va refléter la densité des sites ionisables de la paroi (densité des sites électro-négatifs) et sera exprimée en cmol_c/kg, soit la quantité (10⁻² moles) de cations rapportée au poids sec de racine considérée. Elle permet d'ailleurs de comparer les végétaux sur le plan de l'absorption et de l'adsorption.

Dispositif expérimental :

- Bacs contenant 600 mL de solution et 2 plants de haricots
- pH d'étude à 4,9 ; 5,8 et 7 ($\pm 0,05$) (haricots témoins et contaminés) mesuré dans chaque bac par une sonde pH reliée à un pH-stat (relié à la pompe péristaltique injectant l'acide nitrique 0,1 M lorsque le pH augmente), solution aérée en continu.
- Après contamination à l'Unat (uranium appauvri sous forme de nitrate d'uranyle $UO_2(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), l'ensemble du dispositif tourne durant 36 heures sans plantes.
- Les plantes sont ensuite ajoutées ($n = 2$ réplicats par conditions) et retirées après 3 jours d'exposition à l'uranium. Les racines sont les seules organes étudiés où l'uranium est quantifié (§ 2.8.1.)

Protocole expérimental

Les conditions de culture et d'acclimatation des plantes restent les mêmes que pour l'ensemble des expériences.

Une méthode basée sur une adsorption de Cu, suivie par une extraction acide a été proposée comme référence par Dufey et Braun (1986). Parce que le cuivre est un élément trace dans les racines, le contenu en cuivre après des rinçages successifs avec $CuSO_4$ peut être attribué à la liaison du cuivre avec les sites d'échange. Par ailleurs, les groupements carboxyliques ont une très grande affinité pour les ions cuivre, de telle sorte que les cations « natifs » échangeables sont facilement déplacés par des rinçages au $CuSO_4$.

La CECR est mesurée pour des plants de haricots contaminés et non contaminés (témoins). Dans les 2 cas, les racines sont séparées en des portions de racines jeunes (apex) et plus anciennes, dont les CEC sont mesurées séparément.

Ces racines jeunes et âgées, contaminées ou non, subissent alors une série de bains :

- Rinçage : 15 mL de $CuSO_4$ (0,01M) pendant 10 min, 15 fois.
Dans la plupart des cas, la concentration en Ca^{2+} , Mg^{2+} et Na^+ devient négligeable à partir du 5ème lavage (Dufey, 1986).

Les 15 aliquotes de rinçage sont alors rassemblés en 1 volume, acidifié à 2% les concentrations en cations majeurs, cuivre et uranium sont mesurées en ICP-AES. Cette mesure donne la quantité d'uranium extractible (proportion pouvant être comparée à celle des autres cations).

- Rinçage de la racine avec CuSO_4 (10^{-4} M) pendant 10 min, pour enlever l'excès de CuSO_4 , tout en maintenant les sites d'échange de la racine saturé en Cu^{2+} . Cette procédure donne la concentration en ions libres de Cu, fraction négligeable en comparaison des ions Cu^{2+} fixés.
- Rinçage de la racine avec 500 mL de HCl (0,1 M) pendant 10 min, de manière à extraire le Cu^{2+} présent sur les sites d'échange. Dosage des cations et de l'uranium comme précédemment en ICP-AES.
- Deuxième rinçage avec 250 mL d'acide pour s'assurer que tout le Cu^{2+} soit retiré. Dosage des cations et de l'uranium comme précédemment en ICP-AES.
- Les racines sont séchées à l'étuve (60°C) pendant 72 heures de façon à déterminer le poids sec.
- Les racines sont ensuite calcinées, dissoutes dans l'acide nitrique et la teneur en uranium mesurée en ICP-AES comme décrit au § 2.8.1.

2.7. Détermination de la localisation cellulaire de l'uranium : Microscopie Electronique à Transmission

Les plants de haricots (stade floraison) ont été exposés durant 48 heures à 4,5 μM d'uranium naturel (nitrate d'uranyle) au pH 4,9. Cette expérience était une expérience préliminaire de manière à déterminer de façon « grossière » la microlocalisation de l'uranium dans les organes du haricot pour une forte concentration en uranium dans le milieu.

Après exposition, les haricots sont sortis de la solution nutritive contaminée, les racines rincées et des sections dans les organes sont réalisées immédiatement :

- dans la racine : juste au dessus de la partie apicale active de la racine (nommée « apex », jeunes racines) et dans la partie haute de la racine, plus proche du collet (racine âgée)
- dans la tige, dans sa partie basse et haute
- dans les cotylédons (limbe)
- et dans les feuilles (limbe et nervures)

Protocole de fixation et inclusion des tissus biologiques (Floriani, 2001) :

Le but de ce protocole est de rendre les molécules du tissu prélevé insolubles dans l'eau et dans les solvants inorganiques et de bloquer les systèmes enzymatiques pour éviter toute modification des tissus postérieure aux coupes. Il est aussi important de respecter les caractéristiques physico-chimiques des fluides cellulaires de manière à éviter un lessivage des ions et donc du métal étudié suite à un mouvement d'eau ou d'ions avant la réticulation. Il est donc important de considérer la concentration molaire, le pH et la concentration ionique de l'agent fixateur.

NB : Les coupes de tissus sont manipulées pendant tout le protocole avec grand soin de manière à ne pas modifier les structures cellulaires.

Produits utilisés :

- Tampon cacodylate (caco) : 0,1M ajusté au pH 6,8 – 7,2 pour les tissus végétaux (se conserve plusieurs mois à 4°C)
- Glutaraldéhyde : solution à 1,5% dans le tampon caco (se conserve 2 – 3 semaines à 4°C)
- Acide osmique ou osmium (produit très toxique par inhalation ou contact, à manipuler avec précaution) : ramené extemporanément à 1% ou 2% dans du tampon caco (se conserve dans un endroit bien ventilé, dans un récipient étanche et bien fermé, rempli de papier absorbant pour piéger les vapeurs résiduelles)
- Epon 812 (à manipuler aussi avec précaution) : mélanger dans un bécher 50,6 mL d'Epon 812 ; 28,2mL d'accélérateur MNA et 24,6 mL de Hardener DDSA. Après homogénéisation, ajouter 1,55 mL de DMP 30. Le tout est réparti dans des tubes plastiques ou des seringues prêtes à l'emploi puis congelés (se conserve plusieurs mois à -20°C et peut être décongelé et recongelé sans être altéré).

Fixation

Immédiatement après avoir sorti les plantes de leur milieu contaminé, des coupes d'environ 1 mm³ sont réalisées dans les organes cités précédemment (6 par organes) à l'aide d'une lame de scalpel neuve, pour ne pas déchirer les tissus, sur une feuille de papier bristol et dans quelques gouttes de tampon caco.

Les coupes sont déposées dans un tube à hémolyse contenant un mélange glutaraldéhyde/caco avec un volume suffisant pour baigner toutes les coupes.

Elles sont laissées ainsi 2 à 3 heures à température ambiante ou durant 24h à 4°C puis le mélange glutaraldéhyde/caco est retiré et remplacé par du tampon caco (2x5'). Les échantillons peuvent ainsi être conservés durant quelques jours dans le bain de rinçage.

Post-fixation (uniquement sur la moitié des échantillons)

Dans des tubes à hémolyse, mettre environ 0,25 mL de mélange OsO₄ 1% avec tampon caco, dans lesquelles une partie des cubes de tissu est plongée. Les tissus sont ainsi baignés pendant 1h dans ce mélange, sous hotte, de manière à noircir les structures.

L'osmium est retiré et rincé 3 fois durant 5 minutes avec du tampon caco (tube rempli au $\frac{3}{4}$).

NB : il est nécessaire de ne pas utiliser d'éclairage sous la hotte lors de l'utilisation de l'osmium.

Déshydratation

L'ensemble des cubes de tissus osmiés (post-fixation) et non osmiés (reste des échantillons) sont rassemblés dans un même tube. Le tampon caco est remplacé par divers bains successifs d'éthanol et un d'oxyde de propylène :

- Ethanol à 50 % (2 fois 5 min)
- Ethanol à 70 % (2 fois 5 min)
- Ethanol à 95 % (2 fois 5 min)
- Ethanol à 100 % (2 fois 30 min)
- Oxyde de propylène (2 fois 30 minutes)

Imprégnation

L'oxyde de propylène (des bains précédents) est remplacé par un mélange 1/1 bien homogénéisé d'Epon/oxyde de propylène (tube rempli au moins jusqu'à la moitié). Les échantillons sont conservés pendant une nuit au réfrigérateur, tubes débouchés de manière à évaporer l'oxyde de propylène.

Puis les échantillons sont replacés sous hotte à température ambiante. Les tubes sont remplacés par de nouveaux tubes à hémolyse propres, de façon à éliminer les résidus d'oxyde de propylène restant sur les parois des tubes. Avant d'y mettre les cubes de tissu essorés sur du papier absorbant, de l'Epon est déposé au fond de ces tubes. Les cubes sont alors déposés sur l'Epon sans les enfoncer.

Les échantillons sont ainsi laissés en contact sous hotte durant 1h minimum.

Inclusion

Les gélules sont remplies préalablement d'Epon jusqu'à 1 – 2 mm du bord, les cubes de tissu, quant à eux, sont retirés de l'Epon, essorés sur papier absorbant, puis déposés un par un au centre de la gélule. Le cube de tissu est laissé durant $\frac{1}{2}$ heure de façon à ce qu'il se dépose doucement dans le fond de la gélule.

Le tout est ensuite déposé à l'étuve durant 1 nuit (60 °C).

Puis des coupes ultra-fines (ultra-microtome) avec une lame de diamant sont réalisées dans ces gélules, les coupes sont déposées sur une grille de cuivre et observées au MET.

2.8. Préparations des échantillons et mesures analytiques

2.8.1. Quantification de la teneur en uranium dans les végétaux

Les deux techniques utilisées nécessitent de préparer de façon totalement différente les échantillons, de manière à les présenter dans une configuration adaptée. Cependant, quelle que soit la technique employée les échantillons subissent le même cycle de séchage et surtout de calcination.

Les plantes sont récoltées et séparées en tiges, feuilles et racines, pour les expériences sur l'organisme entier et seules les racines sont traitées dans le cas des autres expérimentations. Les échantillons sont transférés dans l'étuve pendant 3 jours (60°C), la masse de matière sèche est ainsi déterminée. Les échantillons sont ensuite calcinés sur une période de 60 heures, selon le cycle présenté en figure 19. Pour la suite de la préparation, les échantillons présentent, à ce stade, des protocoles de préparation bien distincts.

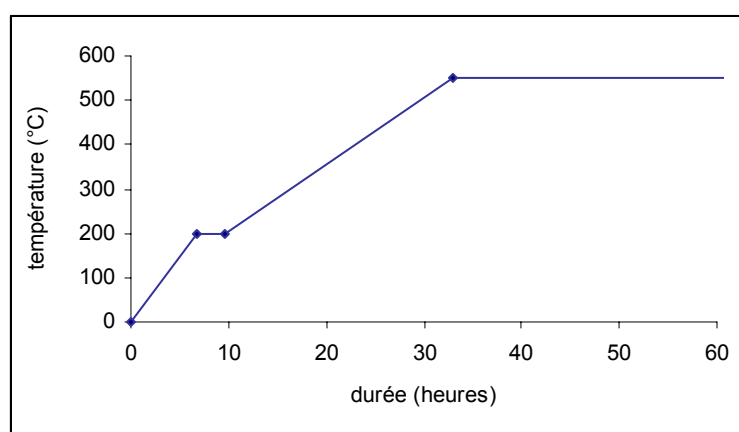


Figure 19. Programme de calcination par paliers (200 et 550 °C), dans un four ventilé pour des échantillons végétaux.

Uranium 233 : scintillation liquide

Les cendres sont dissoutes dans 2 mL d'acide nitrique 69%, dans des flacons à scintillation en verre de 20 mL (Glass Vial, Packard Bioscience). Le tout est ensuite évaporé sur bain de sable (200°C) de manière à reprendre l'ensemble dans un volume d'acide de 1 mL (0,1 M) et 19 mL de liquide scintillant Instagel® (Packard Instrument, Rungis, France). L'²³³U est ensuite dosé en scintillation liquide (Quantulus de Wallac, capable de mesurer de très faibles activités : 1 ng/L). La scintillation liquide constitue l'une des techniques les plus performantes pour mesurer l'²³³U grâce à une détection très efficace, proche de 95% pour les émetteurs alpha comme l'²³³U.

Uranium naturel : ICP-AES

Les cendres sont dissoutes dans 2 mL d'acide nitrique 69%, et l'échantillon est transféré dans une fiole à scintillation liquide en verre de 20 mL (Glass Vial, Packard Bioscience) pour être évaporé sur bain de sable (200°C). Les parois du bécher ayant contenu les cendres sont rincées 2 fois à l'eau distillées de façon à bien reprendre tout l'échantillon. Il est repris avec 10 mL d'acide nitrique 2% et transféré dans des tubes de 15 mL (tubes Falcon Blue Max en polystyrène) pour être analysé en ICP-AES.

NB : les facteurs de concentration de l'uranium dans la racine étant important, les échantillons de racines sont dilués 10 fois avant d'être donnés pour la mesure en ICP-AES.

2.8.2. Caractérisations physico-chimiques

Comme nous l'avons vu précédemment (figure 14), la solution nutritive est analysée au moment de la contamination (concentration en uranium), mais surtout avant d'y introduire les plantes (t0 avant plantes) et en fin d'exposition.

Mesure du pH et maintien du pH

Le pH est mesuré et maintenu à une valeur donnée ($\pm 0,05$) par un pH-stat (Consort K305, multicanal) permettant de contrôler 2 pH grâce à ses 2 sondes pH (électrode Schott). Cet appareil est relié à une ou deux pompe(s) péristaltique(s) selon le nombre de pH contrôlés (pompes Lab Craft hydric comprenant 4 canaux). Lorsque la

sonde pH détecte une variation de pH ($\pm 0,02$), la pompe se déclenche et injecte de l'acide nitrique 0,1M.

Cations et teneur en uranium

Les teneurs en cations majeurs (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} et Ca^{2+} , Id = 10 $\mu\text{g/L}$ dans notre matrice) et en uranium sont mesurées en ICP-AES.

Pour cela 10 mL de solution (3 réplicats) sont filtrés sur une membrane isopore 0,20 μm et acidifié à 2% (HNO_3).

Anions

Les anions (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} , Id = 50 $\mu\text{g/L}$ et 100 $\mu\text{g/L}$ PO_4^{3-}) sont mesurés en chromatographie ionique liquide (Dionex DX-120 équipé des colonnes Ionpac[®] AG-14 et AS-14). 10 mL de solution sont préalablement filtrés sur membrane isopore 0,20 μm puis les anions présents sont dosés.

2.9. Analyse statistique

2.9.1. Validité des données

Pour chaque expérimentation, les bilans de matière (en termes d'uranium) ont été réalisés. Les conditions pour lesquelles, le bilan ne bouclait pas avec une marge de $\pm 20\%$ (homogénéisation de la solution plus ou moins correcte, pipetages, calcination et récupération des cendres, etc... sont autant d'erreurs qui s'accumulent au cours de l'expérience, nous laissant ainsi une petite marge d'erreur) ont été retirées des résultats.

La comparaison des séries de données ainsi obtenues a été effectuée par des tests ANOVA et la significativité du test pour $P = 0,05$ est représentée sur les figures par une astérisque « * ».

Les données représentant pour la plupart des moyennes de 4 réplicats, les barres de variabilité représentées sur les figures correspondent à l'écart type calculé (Excel) pour les 4 valeurs des réplicats.

2.9.2. Expression de la toxicité

La toxicité est calculée à partir de la mesure de l'élongation racinaire des graines de *P. vulgaris* soumis à une contamination à l'uranium. Afin de permettre une

comparaison entre les différents pH étudiés, les résultats seront exprimés en termes de CE_{50} , calculés à partir des pourcentages d'inhibition de l'élongation racinaire. Le calcul s'effectue à partir des relations dose-réponse représentant le % d'inhibition de l'élongation racinaire en fonction de la concentration en uranium, avec le programme Regtox 7 (macro pour Microsoft Excel, mise à disposition par Eric Vindimian, INERIS, France). Cet outil de régression est basé sur le modèle de Hill (1910) initialement établi pour modéliser la liaison de l'oxygène sur l'hémoglobine, mais aussi approprié pour d'autres mécanismes comme les relations dose-réponse en toxicologie et écotoxicologie (Vindimian *et al.*, 1983). La macro est basée sur un algorithme robuste et rapide permettant d'estimer les paramètres initiaux (nombre de Hill, CE_{50} , effet nul et maximum) par itérations successives. Ensuite une simulation de type « bootstrap » totalement non-paramétrique estime les intervalles de confiance des paramètres, sur un nombre de simulations données (500 en général). Les valeurs sont données avec un intervalle de confiance de 95 % évalué à partir de 500 simulations. L'effet pour la dose zéro et l'effet maximum sont imposés respectivement à 0 et 100 dans le modèle.

Chapitre 3

RELATION ENTRE LE TRANSFERT D'URANIUM A LA PLANTE ET SA SPECIATION DANS LE MILIEU D'EXPOSITION

3.1. Expériences préliminaires

Les premières expériences menées sur l'organisme entier, exposé entre 1 et 6 jours, nous ont permis d'appréhender d'une part la cinétique de transfert de l'uranium à la plante (en milieu fermé) et d'autre part sa localisation dans les différents tissus et sa distribution dans le végétal sur la période considérée.

L'étude de deux stades de croissance distincts (plantule et floraison) nous a également permis de déterminer un stade de croissance pour les études de transfert. Pour résumer, les objectifs de ces expériences préliminaires sont les suivants :

Hypothèses à tester / objectifs :

1. Obtenir l'ordre de grandeur du transfert d'uranium et de la translocation ;
2. Identifier le stade de développement le plus efficace pour le transfert racinaire ;
3. Réaliser ces objectifs pour 2 pH contrastés.

3.1.1. Cinétique de transfert sur l'organisme entier (stade floraison)

L'étude de cette cinétique a tout d'abord été menée sur des plants au stade floraison. Les expérimentations ont été conduites sur 6 jours et les concentrations en uranium dans le milieu d'exposition (à 2 pH contrôlés : 4,9 et 5,8) et dans l'ensemble du haricot ont été mesurées au cours du temps d'exposition.

Les premiers résultats des cinétiques (figure 20) indiquent que les transferts sont relativement rapides à partir de la solution (moins de 24 heures) et que le haricot présente une grande capacité pour prendre en charge l'uranium : 75 % de l'uranium présent au départ dans le milieu d'exposition est associé à la plante après 48 heures d'exposition au pH 4,9 et 82 % après 24 heures au pH 5,8.

Les résultats de ces cinétiques de transfert sont en accord avec ceux de Ramaswami *et al.* (2001), qui avaient relevé pour une autre espèce de haricot (*Phaseolus nanus*), également cultivée en solution hydroponique, une diminution de 85 à 90 % de l'uranium présent en solution, après 48 heures d'exposition. L'utilisation de la solution nutritive favorise l'accessibilité de l'uranium pour la plante, contrairement aux sols, où l'uranium est fortement lié aux particules minérales et organiques de la phase solide. Ces mêmes auteurs ont ainsi démontré que dans un sol sableux, les plantes pouvaient extraire de 2 à 12% seulement de l'uranium présent dans le sol et seulement 2 % dans les sols organiques.

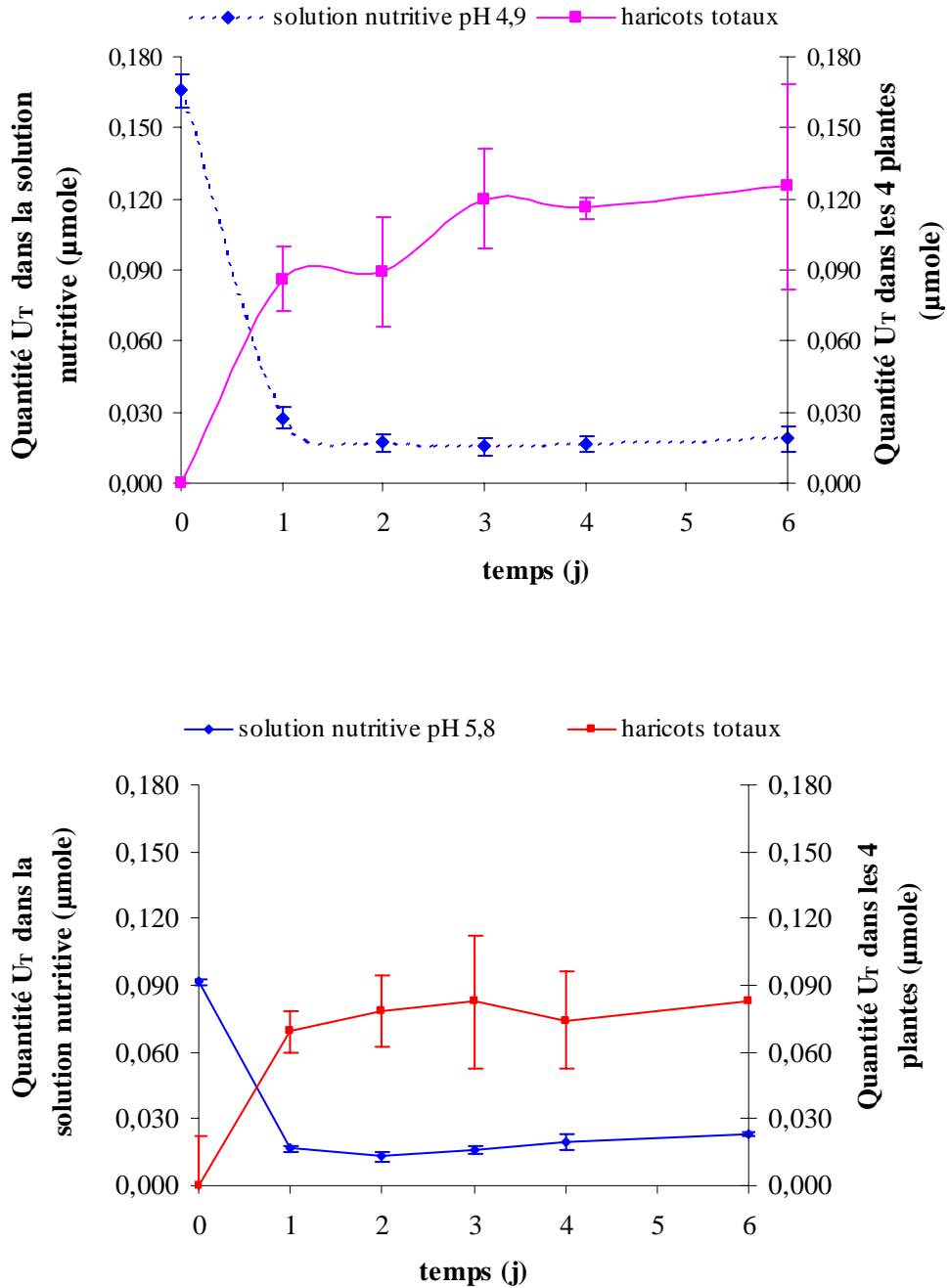


Figure 20. Quantité moyenne en uranium dans les plantes entières (chaque point représentant la somme des 4 réplicats, en μmole) aux pH 4,9 et 5,8 et évolution en parallèle de sa quantité dans le milieu d'exposition (moyenne de 3 prélèvements, en μmole).

Translocation de l'uranium aux parties aériennes

Le système racinaire contribue pour 99% à la quantité totale d'uranium retrouvée dans la plante et ceci quel que soit le pH d'étude ou le temps d'exposition (tableaux 11 et 12). Moins de 1 % de l'uranium transféré à la plante est donc transloqué sur les 6 jours d'exposition, dans ces conditions. Ramaswami *et al.* (2001) rapportaient quant à eux que 26 % de l'uranium était transloqué, après 9 jours de contamination, à des niveaux d'environ 50 μM dans la solution nutritive et un pH de 5,8 à 6,5, chez *Phaseolus nanus*. Cependant, la concentration en uranium utilisée par ces auteurs est 200 fois supérieure à celle que nous avons utilisée dans notre étude.

Nous pouvons également remarquer qu'au pH 4,9, la translocation dans les parties aériennes, notamment les feuilles, augmente sensiblement à partir du sixième jour d'exposition.

Nous avons pu constater dans la littérature, qu'il n'était pas rare que les teneurs en uranium les plus élevées dans les tissus soient retrouvées préférentiellement dans les racines plutôt que dans les feuilles (Hanson, 1980). C'est le cas ici de *Phaseolus vulgaris*.

Tableau 12. Proportion et concentration en uranium dans chaque organe de *Phaseolus vulgaris* au pH 4,9 et au stade floraison, en fonction du temps d'exposition, le bruit de fond en uranium pour les plantes non contaminées étant nul. $[U_T]$ représente la concentration en U total dans la solution (en nM), ($P < 0,05$). La masse des organes étant donnée en annexe 2.

pH 4,9						
$[U_T]$ avant plantes = 160 nM						
Temps (j)	Tiges		Feuilles		Racines	
	%	$\mu\text{molU/gMS}$	%	$\mu\text{molU/gMS}$	%	$\mu\text{molU/gMS}$
1	0,037 ($\pm 0,035$)	$2,2 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 2,2 \cdot 10^{-4}$)	0,006 ($\pm 0,002$)	$3,9 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 2,1 \cdot 10^{-5}$)	99,96 ($\pm 0,004$)	0,603 ($\pm 0,071$)
2	0,079 ($\pm 0,047$)	$4,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 3,1 \cdot 10^{-4}$)	0,009 ($\pm 0,008$)	$4,9 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 2,1 \cdot 10^{-5}$)	99,91 ($\pm 0,067$)	0,543 ($\pm 0,095$)
3	0,149 ($\pm 0,047$)	$7,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 2,2 \cdot 10^{-4}$)	0,013 ($\pm 0,005$)	$6,2 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 2,1 \cdot 10^{-5}$)	99,84 ($\pm 0,048$)	0,489 ($\pm 0,068$)
4	0,134 ($\pm 0,038$)	$6,6 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 1,8 \cdot 10^{-4}$)	0,014 ($\pm 0,015$)	$6,7 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 1,6 \cdot 10^{-5}$)	99,86 ($\pm 0,029$)	0,484 ($\pm 0,087$)
6	0,403 ($\pm 0,186$)	$2,2 \cdot 10^{-3}$ ($\pm 9,4 \cdot 10^{-4}$)	0,035 ($\pm 0,013$)	$18,8 \cdot 10^{-5} *$ ($\pm 5,8 \cdot 10^{-5}$)	99,54 ($\pm 0,20$)	0,543 ($\pm 0,074$)

Tableau 13. Proportion et concentration en uranium dans chaque organe de *Phaseolus vulgaris* au pH 5,8 et au stade floraison, en fonction du temps d'exposition, le bruit de fond en uranium pour les plantes non contaminées étant nul. $[U_T]$ représente la concentration en U total dans la solution (en nM). La masse des organes étant donnée en annexe 2.

pH 5,8						
$[U_T]$ avant plantes = 90 nM						
Temps (j)	Tiges		Feuilles		Racines	
	%	$\mu\text{molU/gMS}$	%	$\mu\text{molU/gMS}$	%	$\mu\text{molU/gMS}$
1	0,197 ($\pm 0,192$)	$7,0 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 7,3 \cdot 10^{-4}$)	0,009 ($\pm 0,005$)	$3,1 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 1,7 \cdot 10^{-5}$)	99,794 ($\pm 0,196$)	0,36 ($\pm 0,094$)
2	0,129 ($\pm 0,116$)	$5,8 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 4,3 \cdot 10^{-4}$)	0,006 ($\pm 0,009$)	$2,6 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 1,7 \cdot 10^{-5}$)	99,87 ($\pm 0,116$)	0,45 ($\pm 0,089$)
3	0,426 ($\pm 0,388$)	$1,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 6,7 \cdot 10^{-4}$)	0,009 ($\pm 0,003$)	$2,7 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 8,6 \cdot 10^{-5}$)	99,57 ($\pm 0,392$)	0,30 ($\pm 0,037$)
4	0,266 ($\pm 0,070$)	$1,2 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 1,4 \cdot 10^{-4}$)	0,011 ($\pm 0,002$)	$5,0 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 2,2 \cdot 10^{-5}$)	99,72 ($\pm 0,070$)	0,44 ($\pm 0,19$)
6	0,321 ($\pm 0,220$)	$1,4 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 7,8 \cdot 10^{-4}$)	0,017 ($\pm 0,007$)	$7,0 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 3,4 \cdot 10^{-5}$)	99,66 ($\pm 0,222$)	0,42 ($\pm 0,045$)

Bien que faible, la translocation de l'uranium dans les parties aériennes, est immédiate car observée dès les premières 24 heures (tableaux 11 et 12). Dans les racines et tiges du haricot, aucune différence significative de concentration en uranium n'est observée au cours du temps. Par contre, entre les 2 pH 4,9 et 5,8, il existe une différence de comportement des racines. En effet, pendant les trois premiers jours d'exposition, la concentration en uranium dans les racines est plus élevée au pH 4,9 qu'au pH 5,8. Cependant, l'activité initiale en ^{233}U (après 36 heures de fonctionnement du système sans plantes pour équilibration) au pH 5,8 était inférieure de 40 % à celle au pH 4,9 malgré un apport initial proche d' ^{233}U . Cette différence s'explique par un taux d'adsorption différent de l'uranium aux matériaux du dispositif, adsorption qui augmente avec le pH. Par ailleurs, la différence d'activité des racines est du même ordre de grandeur. Par conséquent, cette différence pourrait être reliée à la différence de concentration en uranium au moment d'y introduire les plantes, bien qu'à priori les espèces chimiques de l'uranium présentes en solution ne soient pas les mêmes. C'est aussi pour cela que les Facteurs de Transfert sont calculés, de manière à s'affranchir de cette différence de concentration au moment où les plantes sont introduites. Ils vont permettre de « normaliser » les résultats et donc de comparer le transfert en fonction du pH du milieu d'exposition.

Dans les feuilles du haricot, la teneur en uranium commence à devenir significativement plus élevée au pH 4,9 au sixième jour (figure 21, tableaux 11 et 12). A ce même pH, l'uranium en solution se trouve majoritairement sous forme d'ions uranyles (60 % environ). L'ion uranyle semble donc être la forme de l'uranium plus facilement transloquée sur cette période. Ces résultats semblent en concordance avec ceux observés par Ebbs *et al.* (1998). Ces auteurs avaient démontré que le cation uranyle (UO_2^{2+}), espèce dominante au pH < 5,5, était vraisemblablement absorbé et transloqué.

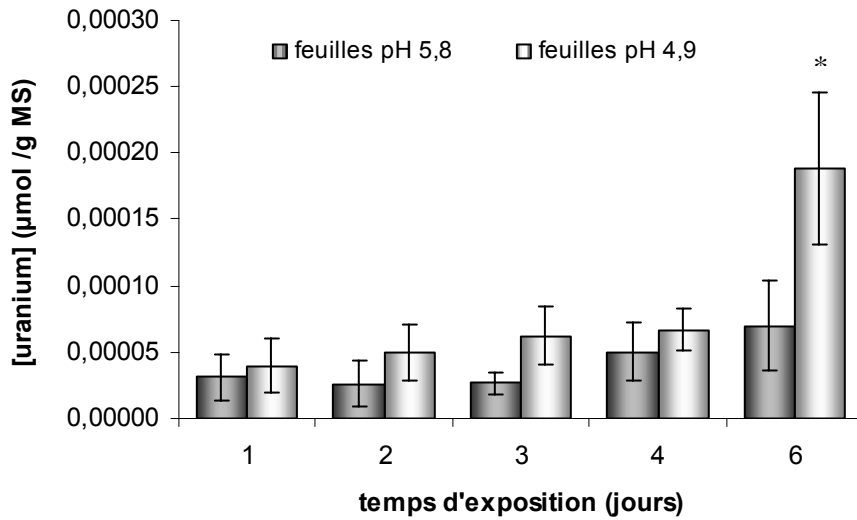


Figure 21. Teneur en uranium dans les feuilles du haricot en fonction du temps d'exposition, aux pH 4,9 et 5,8 ($P < 0,05$).

Conclusions :

- ◆ Au stade floraison, les cinétiques de transfert à la plante sont rapides et atteignent un équilibre (les plantes ont accumulé la quasi totalité de l'uranium de la solution) en moins de 24 heures, quel que soit le pH.
- ◆ 99 % de l'uranium présent dans la plante est associé au système racinaire.
- ◆ La translocation aux tiges et feuilles de l'uranium, bien que très faible quantitativement, est rapide car mesurable dès 24 heures d'exposition.
- ◆ La concentration en uranium dans les feuilles est plus élevée au pH 4,9 (2,8 fois plus élevée qu'au pH 5,8), la contribution de l'ion uranyle passant de 60 % à 10 % entre ces 2 pH.

3.1.2. Influence du stade de développement

Tout comme au stade floraison, quel que soit le pH considéré, aucune différence significative dans la teneur en uranium des tiges, feuilles ou racines n'est observée (tableau 14, $p < 0,05$). La quasi totalité de l'uranium présent en solution étant aussi transférée.

Teneur dans les organes

Si l'on compare maintenant les teneurs en uranium dans les organes, au stade plantule et au stade floraison aux 2 pH étudiés, nous pouvons observer que l'uranium se trouve plus concentré dans les organes aériens des haricots au stade plantule (0,004 et 0,003 $\mu\text{molU/gMS}$ à pH 4,9 et 5,8 respectivement dans les tiges de plantules) qu'au stade floraison (0,00073 et 0,00013 $\mu\text{molU/gMS}$ respectivement, figure 22, tableau 13). Au stade floraison, l'uranium est dilué dans une biomasse plus importante (facteur de 1,6 environ de poids sec entre les 2 stades), mais les différences en concentrations ne varient pas en proportion. Car c'est surtout la biomasse foliaire qui diffère dans nos expériences entre ces 2 stades. Cette dilution n'explique donc pas complètement la concentration de l'uranium dans les organes au stade plantule. La translocation de l'uranium est peut être plus aisée au stade plantule qu'au stade floraison car les structures secondaires sont moins formées. En revanche, dans les racines la concentration en uranium est du même ordre.

Tableau 14. Teneur en uranium total dans les organes de *P. vulgaris* pour divers pH du milieu d'exposition, aux stades plantule et floraison après 3 jours d'exposition ($[U_T] = 250 \text{ nM}$). Les biomasses sèches des racines étant données en annexe 3.

[uranium] ($\mu\text{molU/g MS}$)										
Stade floraison						Stade plantule				
pH	$[U_T] \text{ t0}$ (μM)	$[U_T]$ avant plantes (μM)	Tiges	Feuilles	Racines	$[U_T] \text{ t0}$ (μM)	$[U_T]$ avant plantes (μM)	Tiges	Feuilles	Racines
4,9	0,210	0,188	$7,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 2,2 \cdot 10^{-4}$)	$6,2 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 2,1 \cdot 10^{-5}$)	0,489 ($\pm 6,8 \cdot 10^{-2}$)	0,237	0,112	0,0042 ($\pm 0,001$)	$1,8 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 8,6 \cdot 10^{-5}$)	0,29 ($\pm 0,051$)
5,8	0,160	0,90	$1,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 6,7 \cdot 10^{-4}$)	$2,7 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 8,6 \cdot 10^{-6}$)	0,299 ($\pm 3,7 \cdot 10^{-2}$)	0,235	0,099	0,0032 ($\pm 6,4 \cdot 10^{-4}$)	$1,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 4,6 \cdot 10^{-5}$)	0,32 ($\pm 0,069$)
7	-	-	-	-	-	0,238	0,104	0,0032 ($\pm 0,0012$)	$1,3 \cdot 10^{-4}$ ($\pm 4,6 \cdot 10^{-5}$)	0,31 ($\pm 0,11$)

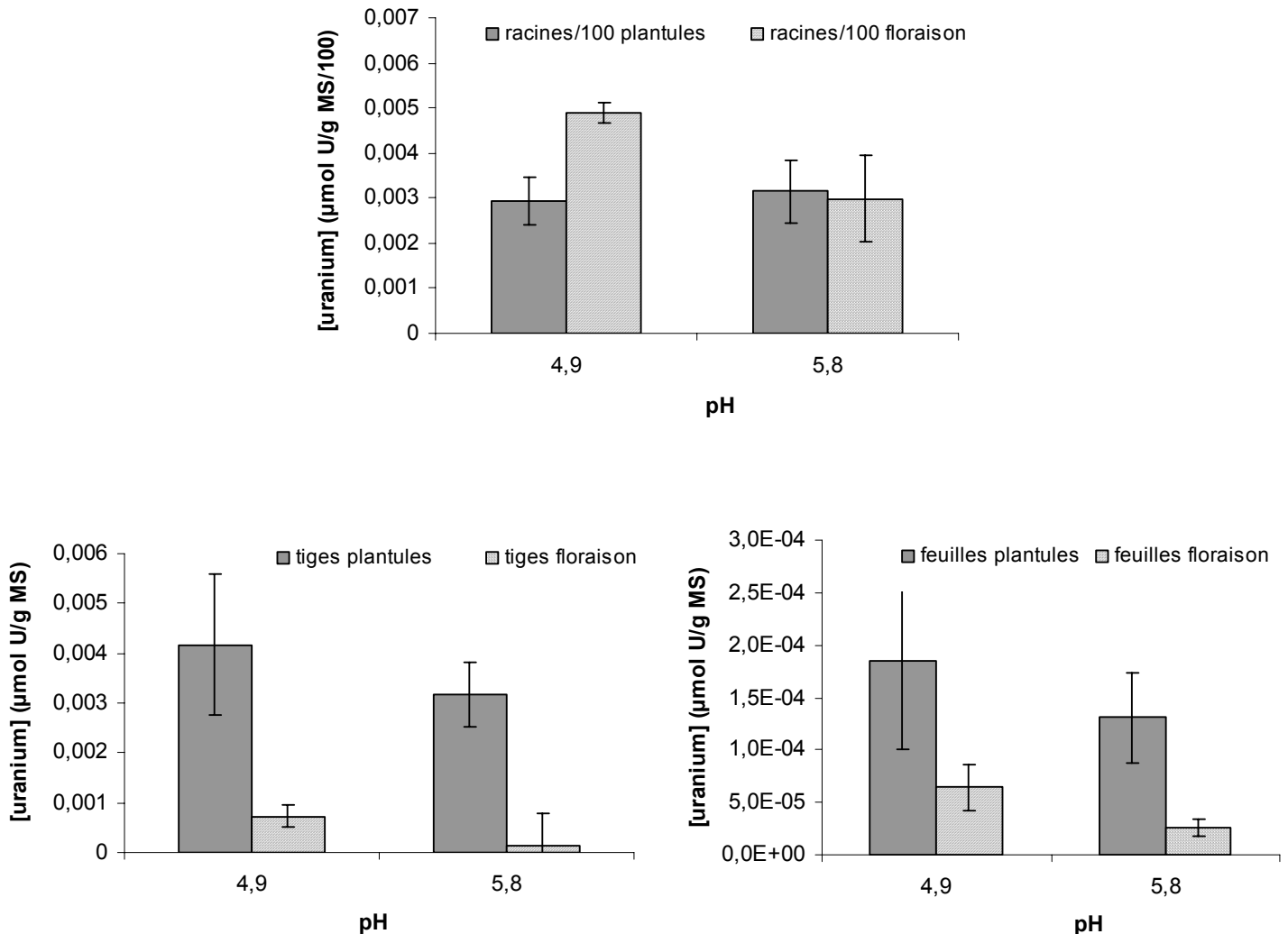


Figure 22. Teneur en uranium dans les organes de *Phaseolus vulgaris* en fonction du pH et du stade de développement.

Facteurs de Transfert

Sous l'hypothèse d'une relation linéaire entre la concentration de l'élément considéré dans la plante et sa concentration dans le milieu d'exposition (Sheppard et Sheppard, 1985), il est possible de comparer les Facteurs de Transfert au stade plantule et au stade floraison (figure 23). Il apparaît tout d'abord que pour un même stade, les FT ne sont pas différents entre les pH 4,9 et 5,8. La différence de transfert, observée entre les deux stades de développement considérés doit très certainement être due à la dilution dans la biomasse. 99% de l'uranium est localisé dans la racine, les FT calculés sont donc particulièrement liés aux concentrations dans les racines. La biomasse végétale au stade floraison est entre 1,6 fois (pH 4,9) et 2,2 fois (pH 5,8) plus élevée 5,8 qu'au stade plantule

(annexes 1 et 2) et que le facteur existant entre ces 2 stades pour les FT moyens est du même ordre (2,19 et 2,17 $\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{M}$ au stade floraison aux pH 4,9 et 5,8 respectivement contre 3,10 et 3,36 $\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{M}$ au stade plantule).

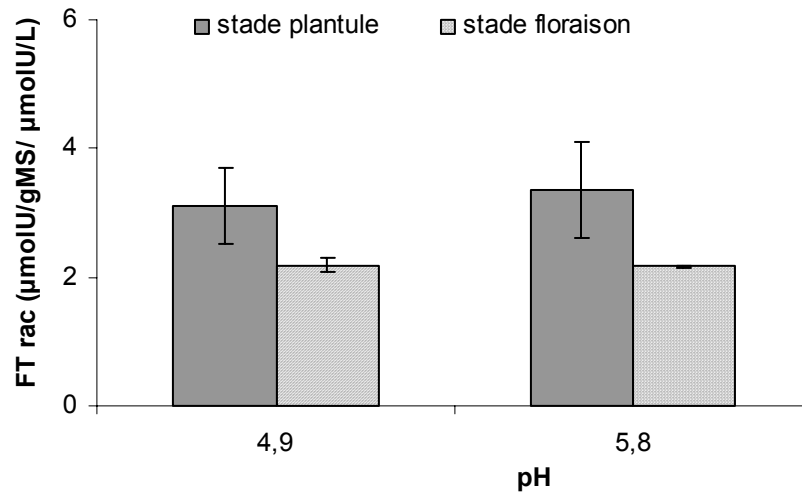


Figure 23. Facteurs de Transfert racinaire pour deux stades de développement du haricot en fonction du pH ; t = 3 jours.

3.1.3. Conclusions générales

Avancées obtenues :

Les transferts de l'uranium à la racine sont très rapides, quel que soit le pH du milieu d'exposition. Par ailleurs, *P. vulgaris* concentre 99 % de l'uranium dans sa racine.

Ces bases ont permis de dimensionner les travaux suivants, focalisés sur l'étude des mécanismes de transport pour un temps d'exposition court de l'ordre de quelques heures et prioritairement au niveau des racines.

Si la translocation de l'uranium dans les organes aériens semblent plus élevée au stade plantule, en revanche, la prise en charge de l'uranium au niveau de la racine n'est pas affectée par le stade de développement (les FT moyens calculés étant du même ordre entre les 2 stades si l'on prend en compte la dilution dans la biomasse au stade floraison).

Questions encore posées :

1. Quelles variables du milieu gouvernent les mécanismes d'interactions uranium (VI) – racine (pH, cations compétiteurs, ligands) ?

2. Quelles espèces aqueuses de l'uranium sont biodisponibles chez la plante (racine) ?

3.2. Etude des interactions U (VI) – racine chez *P. vulgaris* – Flux de prise en charge à court terme, en fonction de la spéciation de l'uranium en solution

Une première série d'expériences a été menée aux 3 pH d'étude, dans le but de déterminer à court terme (de l'ordre de quelques heures), d'une part la cinétique de transfert de l'uranium à la racine, et d'autre part de mettre en évidence la relation entre la teneur en uranium dans le milieu d'exposition et le flux d'entrée dans les plantes. Les expériences sont conduites sur des plantes au stade plantule.

3.2.1. Cinétique de prise en charge aux 3 pH (à court terme)

Les cinétiques de transfert ont donc été réalisées durant 9 heures aux pH 4,9, 5,8 et 7,0 ($[U_T] = 600 \text{ nM}$) sur les plantes au stade plantule. Les résultats des teneurs en uranium dans les racines et des flux d'uranium résultant au cours du temps, à ces 3 pH, sont détaillés dans le tableau 14. La quantité d'uranium retrouvée au niveau des racines de *P. vulgaris* augmente en fonction du temps, particulièrement dans les deux premières heures d'exposition, jusqu'à devenir constante passée cette période. Les flux diminuent très rapidement, en parallèle, dans la première heure (figure 24 A et B).

Il est confirmé que la cinétique de transfert de l'uranium à la plante est un processus très rapide qui s'apparente, aux vues de la vitesse, à une adsorption à la surface de la racine.

Les expérimentations ayant montré que le transfert était déjà quasi maximal après 30 minutes d'exposition, une cinétique plus fine a donc été réalisée entre 5 et 30 minutes d'exposition au pH 4,9. Les résultats de cette expérience ont été reportés sur la figure 24 A. Nous avons ainsi pu observer que la racine se comporte comme une surface d'adsorption pour l'uranium puisqu'une grande partie de l'uranium présent dans la solution nutritive se retrouve associée à la racine (il reste dans la solution nutritive, après 10 min d'exposition, 39 % de l'uranium présent avant d'y introduire les plantes et moins de 30 % après une demie heure).

Deux phases peuvent être distinguées : une cinétique extrêmement rapide et intense qui conduirait à une phase où l'adsorption domine, suivie d'une cinétique plus lente. Un palier est atteint quel que soit le pH.

La résultante est un flux net positif qui diminue de manière drastique dans les 2 premières heures d'exposition.

Tableau 15. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t_0 avant plantes et fin, *i.e.* au temps de prélèvements des plantes) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de *P. vulgaris*, Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{MU}$) et Flux normalisés ($\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après un temps d'exposition variable, $[\text{U}_T] = 600 \text{ nM}$, (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 4.

t (h)	pH	$[\text{U}_T]$ (μmol) t_0 avant plantes	$[\text{U}_T]$ milieu (μmol) fin	U_T rac (μmol) (n =4)	$[\text{U}_T]$ rac (μmol /gMS) moy	Flux ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moy	FT moy ($\mu\text{molU/gMS}$ / $\mu\text{molU/L}$)	Flux norm ($\mu\text{molU/gMS}$ / $\mu\text{molU/L/h}$) moy
0,08	4,9	0,307	0,201	0,107	0,452 ($\pm 0,030$)	5,45 ($\pm 1,54$)	1,47 ($\pm 0,42$)	18,4 ($\pm 5,25$)
0,17	4,9	0,449	0,175	0,147	0,564 ($\pm 0,030$)	3,32 ($\pm 0,78$)	1,26 ($\pm 0,29$)	7,41 ($\pm 1,71$)
0,38	4,9	0,401	0,116	0,216	0,698 ($\pm 0,020$)	1,84 ($\pm 0,48$)	1,74 ($\pm 0,46$)	4,58 ($\pm 1,21$)
0,5	4,9	0,439	0,118	0,360	0,619 ($\pm 0,026$)	1,24 ($\pm 0,340$)	1,41 ($\pm 0,74$)	2,82 ($\pm 1,48$)
1	4,9	0,462	0,119	0,347	0,767 ($\pm 0,036$)	0,767 ($\pm 0,125$)	1,66 ($\pm 0,27$)	1,66 ($\pm 0,27$)
2	4,9	0,383	0,042	0,385	0,755 ($\pm 0,039$)	0,378 ($\pm 0,075$)	1,97 ($\pm 0,39$)	0,985 ($\pm 0,195$)
3	4,9	0,376	0,032	0,410	0,934 ($\pm 0,081$)	0,311 ($\pm 0,079$)	2,48 ($\pm 0,63$)	0,827 ($\pm 0,210$)
5	4,9	0,457	0,029	0,537	1,22 ($\pm 0,270$)	0,244 ($\pm 0,054$)	2,68 ($\pm 0,59$)	0,536 ($\pm 0,118$)
9	4,9	0,485	< ld	0,538	0,923 ($\pm 0,150$)	0,103 ($\pm 0,019$)	1,91 ($\pm 0,35$)	0,212 ($\pm 0,039$)
0,5	5,8	0,237	0,125	0,084	0,373 ($\pm 0,077$)	0,746 ($\pm 0,154$)	1,57 ($\pm 0,64$)	3,14 ($\pm 1,28$)
1	5,8	0,231	0,102	0,110	0,376 ($\pm 0,152$)	0,376 ($\pm 0,152$)	1,63 ($\pm 0,65$)	1,63 ($\pm 0,65$)
2	5,8	0,242	0,047	0,136	0,449 ($\pm 0,125$)	0,225 ($\pm 0,063$)	1,86 ($\pm 0,64$)	0,930 ($\pm 0,320$)
3	5,8	0,324	0,062	0,232	0,662 ($\pm 0,241$)	0,221 ($\pm 0,080$)	2,56 ($\pm 0,74$)	0,853 ($\pm 0,247$)
5	5,8	0,214	0,034	0,222	0,829 ($\pm 0,193$)	0,166 ($\pm 0,039$)	3,87 ($\pm 0,89$)	0,774 ($\pm 0,178$)
9	5,8	0,355	0,036	0,333	0,984 ($\pm 0,240$)	0,109 ($\pm 0,027$)	2,77 ($\pm 0,67$)	0,308 ($\pm 0,074$)
0,5	7	0,074	< ld	0,013	0,313 ($\pm 0,170$)	0,626 ($\pm 1,25$)	4,23 ($\pm 0,35$)	8,46 ($\pm 0,07$)
1	7	0,049	< ld	0,011	0,313 ($\pm 0,125$)	0,313 ($\pm 0,310$)	3,48 ($\pm 1,05$)	3,48 ($\pm 1,05$)
2	7	0,075	< ld	0,019	0,463 ($\pm 0,149$)	0,232 ($\pm 0,120$)	4,93 ($\pm 1,31$)	2,47 ($\pm 0,655$)
3	7	0,037	< ld	0,013	0,363 ($\pm 0,237$)	0,121 ($\pm 0,040$)	4,66 ($\pm 1,04$)	1,553 ($\pm 0,347$)
5	7	0,061	< ld	0,026	0,459 ($\pm 0,270$)	0,092 ($\pm 0,018$)	5,1 ($\pm 0,27$)	1,02 ($\pm 0,054$)
9	7	0,054	< ld	0,027	0,511 ($\pm 0,168$)	0,057 ($\pm 0,006$)	5,7 ($\pm 1,35$)	0,633 ($\pm 0,150$)

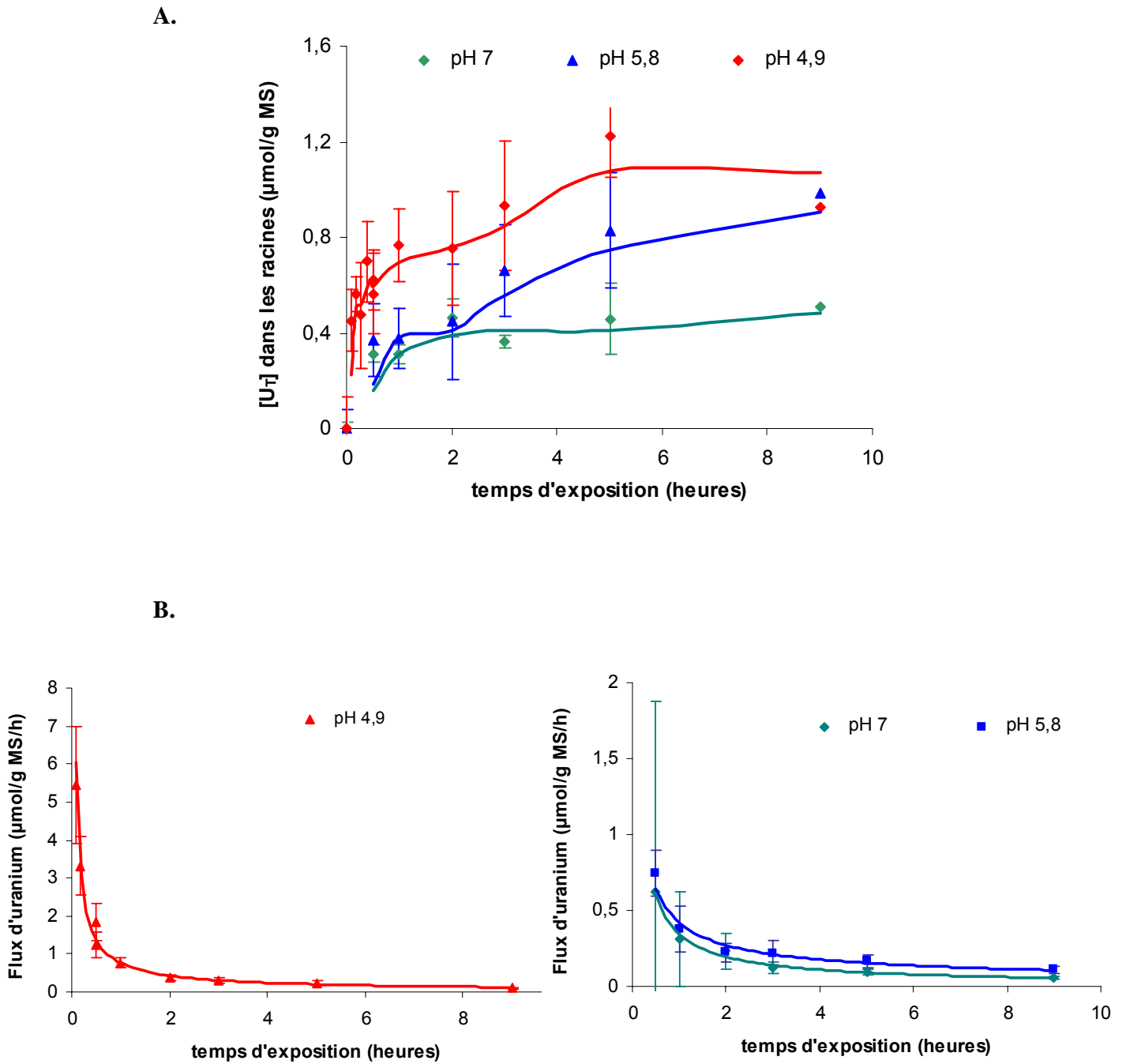


Figure 24. **A.** Evolution de la teneur en uranium dans les racines de *P. vulgaris* et **B.** des flux d'uranium à la racine en fonction du temps de contamination et du pH, $[U_T] = 600$ nM (nominale en solution).

Cette expérience avait pour but d'étudier à court terme le transfert de l'uranium dans la racine de *P. vulgaris* pour 3 pH donnés. Nous pouvions ainsi définir un temps d'exposition pour lequel il y avait un transfert suffisamment important mais aussi une relation linéaire entre le temps d'exposition et l'absorption des éléments (de façon à s'astreindre d'une éventuelle limitation de vitesse des transporteurs en cas de saturation). Or, c'est dans la première demie heure (et même dans les 5 premières minutes d'exposition) que les transferts sont les plus élevés. Au delà de ce temps, l'absorption reste relativement constante. Etudier le transfert de l'uranium dans un végétal supérieur sur un temps si court (30 min) n'est pas raisonnable car trop de variabilité pourrait être observée. C'est pourquoi, 5 heures d'exposition ont été choisies, pour s'affranchir d'une part des variabilités pouvant exister sur temps trop courts, d'autre part de bénéficier d'un transfert relativement important et variant peu à plus ou moins 1 ou 2 heures.

Pour la suite des expérimentations, *P. vulgaris* sera donc exposé à l'uranium durant 5 heures.

Facteurs de Transfert

Les Facteurs de Transfert racinaires calculés sont reportés dans le tableau 16 (figure 25, $P < 0,05$). Il apparaît ainsi que les FT moyens sont identiques aux pH 4,9 et 5,8 avec $2,08 (\pm 0,49) \mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$ et $2,25 (\pm 0,71) \mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$ respectivement, et augmentent d'un facteur 2 à pH 7 pour atteindre $4,68 (\pm 0,92) \mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$.

Tableau 16. Facteurs de transfert racinaires de l'uranium calculés en fonction du pH et du temps d'exposition, n = 4.

Temps (heures)	Facteurs de Transfert ($\mu\text{molU/gMS}$ / $\mu\text{molU/L}$)		
	pH 4,9	pH 5,8	pH 7
0,5	1,74 ($\pm 0,74$)	1,57 ($\pm 0,64$)	4,22 ($\pm 0,35$)
1	1,66 ($\pm 0,27$)	1,63 ($\pm 0,65$)	3,48 ($\pm 1,09$)
2	1,99 ($\pm 0,39$)	1,86 ($\pm 0,64$)	4,93 ($\pm 1,31$)
3	2,48 ($\pm 0,63$)	2,56 ($\pm 0,74$)	4,66 ($\pm 1,04$)
5	2,68 ($\pm 0,59$)	3,09 ($\pm 0,89$)	5,1 ($\pm 0,27$)
9	1,91 ($\pm 0,35$)	2,77 ($\pm 0,89$)	5,68 ($\pm 1,46$)
Valeur moyenne	2,08 ($\pm 0,49$)	2,25 ($\pm 0,71$)	4,68 ($\pm 0,92$)

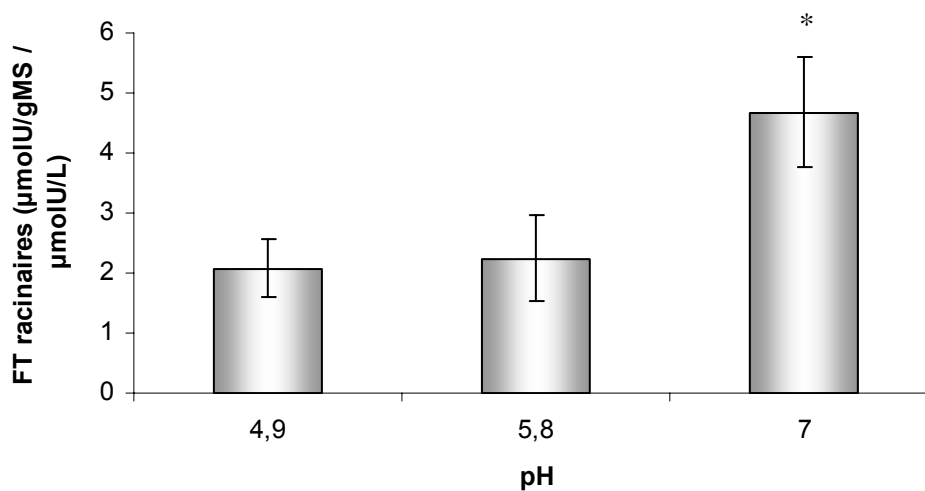


Figure 25. Facteurs de Transfert racinaires moyens, calculés à partir des cinétiques, sur une période de 9 heures d'exposition, en fonction du pH

3.2.2. Effet de la concentration en uranium dans la solution d'exposition et effet du pH.

Les plantes ont été exposées à une gamme de concentrations croissantes en uranium pendant 5 heures. Cette gamme d'uranium total s'étend de 80 nM à environ 4 µM. Les données d'accumulation dans la racine, en fonction d'une part de la teneur en uranium total dans le milieu et d'autre part du pH, sont reportées dans le tableau 16. La spéciation de l'uranium en solution est, comme nous l'avons vu précédemment (figure 12), fortement affectée par le pH. Les ions uranyles (UO_2^{2+}) diminuent progressivement avec l'augmentation du pH pour être remplacés par d'autres formes (hydroxocomplexes et hydroxocomplexes carbonatés). Si au pH 4,9, les ions uranyles représentent 60 % de l'uranium total, au pH 5,8, ils ne représentent plus que 10 – 15 % et moins de 1 % au pH 7.

Selon l'hypothèse du modèle conceptuel de l'ion libre, la biodisponibilité du métal, serait dépendante de la concentration en ions libres dans le milieu. La bioaccumulation dans les racines et donc les Facteurs de Transfert devraient, de ce fait, être plus importants au pH 4,9 qu'au pH 5,8 ou 7. C'est au pH 7, pH où l'ion uranyle est presque inexistant, que le Facteur de Transfert racinaire est le plus élevé, tandis qu'aux pH 4,9 et 5,8 ceux-ci sont équivalents (tableau 16). De même, si l'on observe les teneurs accumulées dans la racine, elles restent toujours supérieures aux teneurs en ions uranyles dans le milieu, quel que soit le pH.

Ces résultats impliquent que l'ion uranyle seul ne peut expliquer l'accumulation et le transfert d'uranium dans les racines de *P. vulgaris*.

Par ailleurs, dans la gamme de concentrations testées, aucun mécanisme de saturation, pour la plante et plus spécifiquement dans la racine, n'est observé (figure 26). Ces gammes ont été établies en fonction des limites de solubilité de l'uranium dans notre milieu en fonction du pH (modélisation JCHESS). Au delà de ces limites, l'uranium va précipiter sous forme de schoepite. Toutefois les limites de solubilité sont bien plus élevées au pH 4,9 et un peu plus de 20 µM d'uranium total peuvent être apportés à la solution sans précipiter. La gamme de concentrations a donc été étendue, au pH 4,9, jusqu'à 21 µM et les résultats d'accumulation sont donnés en figure 27. Jusqu'à 21 µM d'uranium dans le milieu, aucun phénomène de saturation n'est encore observé.

Quel que soit le pH, dans la gamme de concentrations étudiée pour l'uranium dans la solution d'exposition, la concentration en uranium dans les racines (après 5 heures d'exposition) est une fonction quasi-linéaire de la concentration en uranium total dans le milieu.

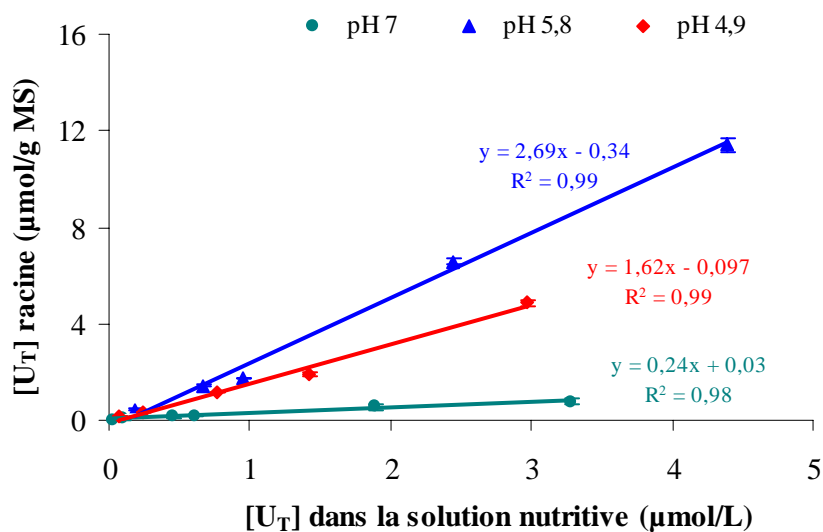


Figure 26. Relation entre la concentration en uranium dans les racines de *P. vulgaris* (moyenne sur 4 réplicats) et la concentration en uranium total dans la solution nutritive en fonction du pH (t = 5 heures d'exposition).

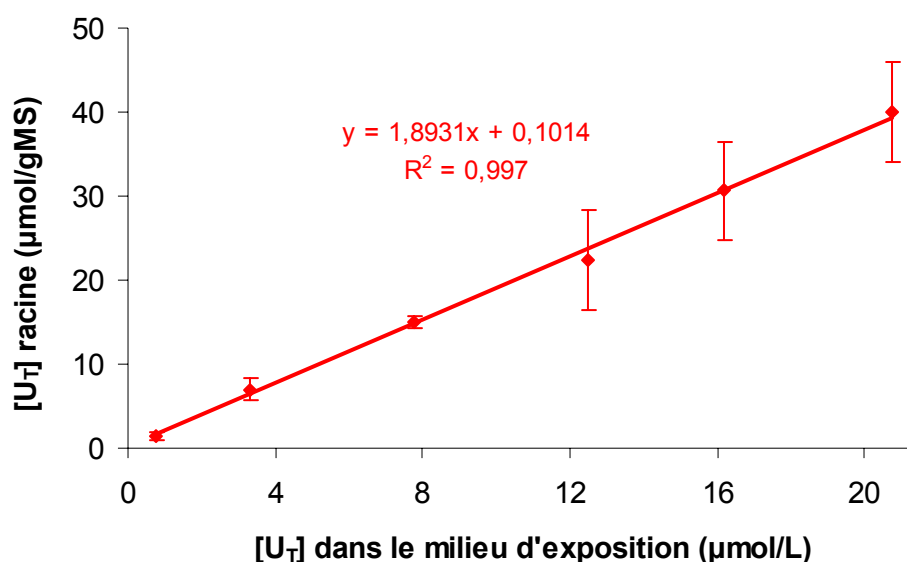


Figure 27. Relation entre la concentration en uranium dans les racines de *P. vulgaris* et la concentration en uranium total dans la solution nutritive au pH 4,9 (t = 5 heures d'exposition).

Le flux d'entrée est proportionnel à la concentration totale en uranium dans la solution, pour la gamme étudiée. Ceci est cohérent avec une relation d'ordre 1 avec la concentration en ions uranyles ou encore avec une combinaison de plusieurs espèces (complexes de l'uranyle, proportionnels à la concentration en ions uranyles à pH constant) (figure 28). Si la bioaccumulation est exprimée par rapport à la concentration en ions uranyles, il devient évident que celle-ci ne peut pas être simplement décrite en fonction de cette espèce (figure 29).

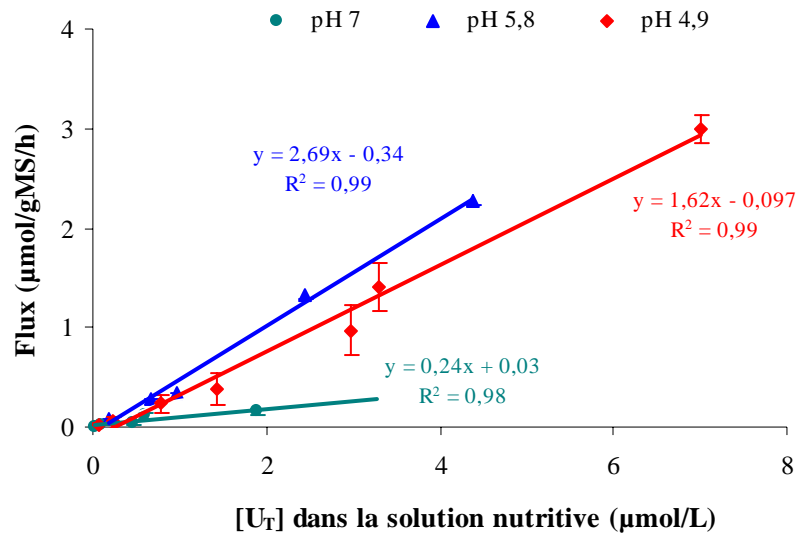


Figure 28. Relation entre les Flux d'uranium à la racine (µmolU/gMS/h) moyens et la concentration en uranium (µmol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH.

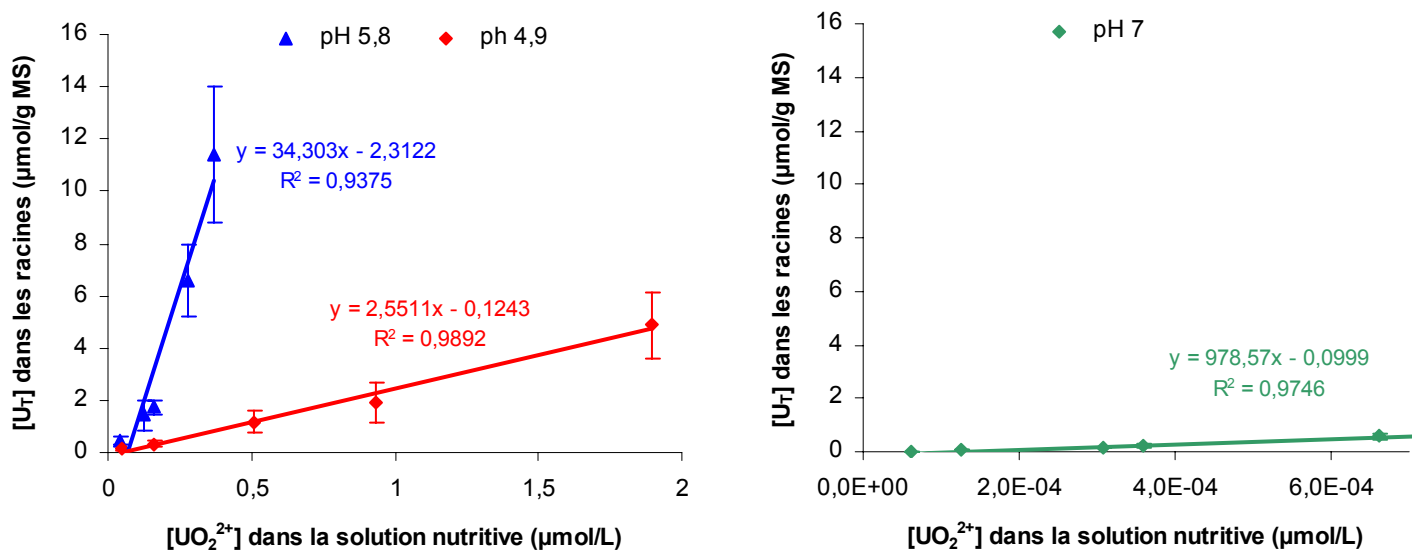


Figure 29. Relation entre les Flux d'uranium à la racine (µmolU/gMS/h) moyens et la concentration en ions uranyles (µmol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH.

Tableau 17. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de *P. vulgaris*, Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et Flux normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après une exposition de 5 h, pour une gamme croissante en uranium ($\mu\text{mol/L}$), (le terme moy désignant le calcul de la moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 5.

pH	U_T (μmol) t0 avant plantes	UO_2^{2+} (μmol) t0 avant plantes	U_T (μmol) fin	U_T racine (μmolU)	$[U_T]$ racine ($\mu\text{molU/gMS}$) moy (n = 4)	Flux ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moy	FT rac ($\mu\text{molU/gMS}$ / $\mu\text{molU/L}$) moy	Flux norm ($\mu\text{molU/gMS} /$ $\mu\text{molU/L/h}$) moy
4,9	0,078	0,052	< ld	0,077	0,133 ($\pm 0,06$)	0,027 ($\pm 0,002$)	1,71 ($\pm 0,60$)	0,342 ($\pm 0,120$)
4,9	0,234	0,158	< ld	0,228	0,343 ($\pm 0,12$)	0,069 ($\pm 0,006$)	1,47 ($\pm 0,51$)	0,294 ($\pm 0,102$)
4,9	0,774	0,512	0,131	0,686	1,17 ($\pm 0,41$)	0,234 ($\pm 0,082$)	1,51 ($\pm 0,53$)	0,302 ($\pm 0,106$)
4,9	1,43	0,933	0,120	0,982	1,92 ($\pm 0,77$)	0,384 ($\pm 0,160$)	1,34 ($\pm 0,54$)	0,268 ($\pm 0,108$)
4,9	2,97	1,89	0,649	2,18	4,87 ($\pm 0,60$)	0,974 ($\pm 0,222$)	1,64 ($\pm 0,59$)	0,328 ($\pm 0,118$)
4,9	3,30	2,20	0,363	2,57	7,02 ($\pm 1,21$)	1,40 ($\pm 0,242$)	2,13 ($\pm 0,37$)	0,426 ($\pm 0,074$)
4,9	7,74	4,91	1,34	5,88	15,0 ($\pm 0,68$)	3,0 ($\pm 0,136$)	1,94 ($\pm 0,09$)	0,388 ($\pm 0,018$)
4,9	12,5	7,48	0,120	5,97	22,3 ($\pm 5,96$)	4,46 ($\pm 1,19$)	1,78 ($\pm 0,48$)	0,356 ($\pm 0,096$)
4,9	16,2	9,27	3,36	9,93	30,7 ($\pm 5,82$)	6,14 ($\pm 1,16$)	1,89 ($\pm 0,36$)	0,378 ($\pm 0,072$)
4,9	20,7	11,2	5,08	15,13	40,1 ($\pm 5,97$)	8,02 ($\pm 1,19$)	1,94 ($\pm 0,29$)	0,388 ($\pm 0,058$)
5,8	0,021	0,0011	< ld	0,022	0,061 ($\pm 0,017$)	0,012 ($\pm 0,003$)	2,90 ($\pm 0,79$)	0,580 ($\pm 0,158$)
5,8	0,184	0,023	< ld	0,217	0,45 ($\pm 0,16$)	0,090 ($\pm 0,032$)	2,45 ($\pm 0,74$)	0,490 ($\pm 0,148$)
5,8	0,671	0,063	0,071	0,536	1,44 ($\pm 0,57$)	0,288 ($\pm 0,114$)	2,15 ($\pm 0,74$)	0,430 ($\pm 0,148$)
5,8	0,958	0,082	0,171	0,747	1,73 ($\pm 0,25$)	0,346 ($\pm 0,050$)	1,89 ($\pm 0,22$)	0,378 ($\pm 0,044$)
5,8	2,44	1,31	0,507	2,026	6,59 ($\pm 1,37$)	1,32 ($\pm 0,274$)	2,70 ($\pm 0,50$)	0,540 ($\pm 0,100$)
5,8	4,39	1,73	0,839	3,171	11,4 ($\pm 2,60$)	2,28 ($\pm 0,242$)	2,60 ($\pm 0,52$)	0,520 ($\pm 0,104$)
7	0,099	$1,25 \cdot 10^{-4}$	< ld	0,109	0,425 ($\pm 0,04$)	0,085 ($\pm 0,008$)	4,30 ($\pm 0,04$)	0,860 ($\pm 0,008$)
7	0,461	$3,08 \cdot 10^{-4}$	0,056	0,421	1,25 ($\pm 0,12$)	0,250 ($\pm 0,024$)	2,71 ($\pm 0,12$)	0,542 ($\pm 0,024$)
7	0,606	$3,59 \cdot 10^{-4}$	0,121	0,619	2,07 ($\pm 0,79$)	0,414 ($\pm 0,158$)	3,42 ($\pm 0,79$)	0,684 ($\pm 0,158$)
7	1,89	$6,61 \cdot 10^{-4}$	0,405	1,59	5,70 ($\pm 1,27$)	1,14 ($\pm 0,254$)	3,01 ($\pm 1,7$)	0,602 ($\pm 0,340$)
7	3,28	$8,82 \cdot 10^{-4}$	0,818	2,67	7,84 ($\pm 1,45$)	1,57 ($\pm 0,290$)	2,39 ($\pm 1,3$)	0,478 ($\pm 0,260$)

NB : les lignes grisées représentent les conditions comparables entre chaque expérience.

Synthèse des résultats de ces expériences préliminaires

Questions testées

- ◆ Quelles sont les cinétiques d'entrée de l'uranium dans la racine ?
- ◆ Les flux d'entrée dans la racine sont-ils proportionnels à la concentration en uranium en solution (ordre 1) ?

Avancées obtenues

1. Les cinétiques d'entrée sont rapides et intenses et atteignent en milieu fermé un équilibre quel que soit le pH.
2. Pour une concentration nominale de 600 nM d'uranium dans la solution et une exposition de 9 heures, aucune différence significative des FT racinaires n'a été observée entre les pH 4,9 et 5,8. Cependant, à pH 7, le FT racinaire est multiplié par 2.
3. Quel que soit le pH et pour une gamme croissante en uranium (pour 5 heures d'exposition), la concentration en uranium dans les racines est une fonction quasi-linéaire de la concentration en uranium total dans le milieu.
4. Les flux d'entrée, normalisés par rapport à la concentration en uranium dans la solution d'exposition, calculés pour une période d'exposition de 5 heures et une concentration nominale en uranium de 600 nM sont les suivants :

$$0,54 \text{ (pH 4,9)} < 0,77 \text{ (pH 5,8)} < 1,02 \text{ (pH 7)} \mu\text{molU/g MS} / \mu\text{molU/L/h}$$

Questions encore posées

- ◆ Quels sont les flux maximaux de prise en charge de l'uranium par la racine ?
- ◆ Quelle est la concentration en uranium saturante des racines ?

En effet, nous avons pu constater que jusqu'à 21 $\mu\text{mol/L}$ d'uranium en solution au pH 4,9, aucun phénomène de saturation au niveau de la racine n'avait été observé. Une autre expérience a été conduite dans le but de déterminer d'une part

la teneur en uranium dans la racine correspondant à la saturation des sites à la surface des racines et d'autre part, de déterminer si le calcium présent dans la paroi des cellules pouvait jouer un rôle quelconque dans l'adsorption d'uranium au niveau de la racine.

Le rôle du calcium sera également étudié dans le prochain paragraphe, mais cette fois en temps qu'ion compétiteur présent dans la solution.

3.2.3. Estimation des flux de prise en charge maximaux au pH 4,9 – Influence de l'âge des racines.

Les expérimentations précédentes en circuit fermé avaient révélées une première phase de cinétique rapide dont un processus d'adsorption domine à la surface de la racine, se produisant dès les premières minutes d'exposition.

Cette expérimentation a été réalisée cette fois en circuit ouvert (descriptif en figure 17), en alimentant en continu à forte concentration le bac contenant les plantes, lequel se reversant par trop plein dans un bac de sortie. L'évolution de la teneur en uranium dans ces différents bacs au cours du temps est reportée en figure 30. Une forte concentration en uranium a été apportée (environ 20 $\mu\text{mol/L}$, à la limite de la solubilité au pH 4,9), renouvelant la solution à la vitesse de 2 L/h, de manière à observer une éventuelle saturation des sites de fixation au niveau de la racine. Nous pouvons observer sur la figure 30 que la concentration en uranium dans la solution contenant les plantes reste constante après 2 heures de renouvellement et augmente en parallèle dans le bac sortie jusqu'à se stabiliser de la même façon après 2 heures. Il semble donc qu'après 2 heures, les sites de fixation à la surface de la racine soient saturés en uranium. Chaque plante concentre environ entre 8 et 11 μmol d'uranium dans sa racine (tableau 18) soit près de 36 μmol d'uranium retrouvées dans les racines des 4 plantes, en comparaison des 15 μmol dans les expériences en circuit fermé (tableau 17). Les racines de *Phaseolus vulgaris* sont donc capables de concentrer en forte quantité l'uranium.

Tableau 18. Teneur en μmol d'uranium et $\mu\text{mol/gMS}$ dans les racines jeunes et âgées des 4 réplicats de *P. vulgaris*, Flux d'uranium moyens ($\mu\text{molU/gMS/h}$) et normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), soumis à une exposition de 5h à environ $19,7 (\pm 0,44)$ $\mu\text{mol/L}$ d'uranium en continu (dans le bac nourrice et une moyenne de $17,6 (\pm 0,26)$ $\mu\text{mol/L}$ dans le pot contenant les plantes), pH 4,9, (le terme moy désignant le calcul du flux comme une moyenne pour les 4 haricots).

	réplicats	Racines jeunes	Racines âgées	Σ racines jeunes + âgées
U_T racine (μmol)	1	2,32	5,77	8,09
	2	3,40	8,17	11,57
	3	1,95	6,38	8,32
	4	1,60	6,10	7,71
	moyenne	2,32 ($\pm 0,78$)	6,61 ($\pm 1,07$)	8,92 ($\pm 1,78$)
Σ 4 (μmol)		35,7		
U_T racines ($\mu\text{mol/gMS}$)	1	115,8	72,2	80,9
	2	339,8	90,8	115,7
	3	194,7	58	69,4
	4	53,4	50,9	51,4
	moyenne	175,95 ($\pm 123,6$)	67,9 ($\pm 17,6$)	79,3 ($\pm 27,1$)
Flux moy ($\mu\text{molU/gMS/h}$)	1	23,2	14,44	16,18
	2	67,96	18,16	23,14
	3	38,94	11,6	13,88
	4	10,68	10,18	10,28
	moyenne	35,19 ($\pm 24,72$)	13,58 ($\pm 3,5$)	15,86 ($\pm 5,42$)
Flux moy norm ($\mu\text{molU/gMS}/\mu\text{molU/L/h}$)	1	1,32	0,82	0,92
	2	3,86	1,03	1,31
	3	2,21	0,13	0,79
	4	0,61	0,58	0,58
	moyenne	2,00 ($\pm 1,40$)	0,77 ($\pm 0,20$)	0,90 ($\pm 0,31$)

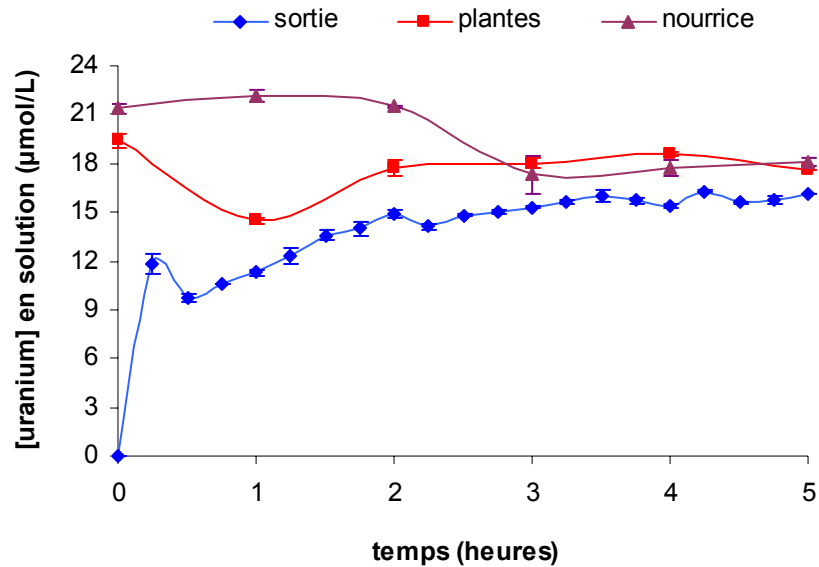


Figure 30. Evolution au cours du temps de la concentration en uranium en solution ($\mu\text{molU/L}$), dans le bac nourrice, le bac contenant les plantes et le bac de sortie (trop plein des plantes), $t = 5$ heures d'exposition.

En fin d'exposition, la racine a été excisée et la teneur en uranium dans chacun des réplicats a été mesurée en ICP-AES. Lors de cette étape, pour chaque racine, les parties jeunes de la racine (extrémités des racines plus claires, de couleur translucide, blanche ou crème clair) et plus anciennes (racines principales et marrons) ont été dissociées de manière à établir une sorte de « cartographie » de la répartition de l'uranium dans la racine. Les résultats de répartition de l'uranium dans la racine sont reportés dans le tableau 19.

Il semble bien que ce soit les parties jeunes de la racine qui jouent un rôle majeur dans le transfert d'uranium à la plante. En effet, si la teneur en uranium dans ces parties jeunes ne représente que 20 à 30 % de l'uranium présent dans la totalité de la racine, si l'on rapporte cette teneur à la masse de matière sèche qu'elle représente en comparaison au reste de la racine, ces parties jeunes de racine contribue en moyenne, pour 70 % de la teneur en uranium dans la racine (tableau 19, figures 31 et 32). Il apparaît donc qu'en proportion de la masse de matière sèche qu'elle représente, les parties jeunes de la racine semblent être les parties actives de la racine pour l'absorption d'uranium.

Tableau 19. Teneur en uranium (μmol) et masse de racine en fonction de la partie de racine considérée (âgée ou jeune) et le % correspondant par rapport à l'ensemble de la racine.

Partie de la racine	réplicats	uranium racine (μmol)	%	Masse sèche racine (g)	%	uranium racine ($\mu\text{molU/gMS}$)	%
Racines jeunes	1	2,32	28,6	0,020	20	115,8	61,6
	2	3,40	29,4	0,010	10	339,8	78,6
	3	1,95	23,4	0,010	8,3	194,7	77,1
	4	1,60	20,8	0,030	20	53,4	51,2
	moyenne	2,32 ($\pm 0,78$)	26	0,018 ($\pm 0,010$)	14,9	175,95 ($\pm 123,6$)	72,1
Racines âgées	1	5,77	71,4	0,080	80	72,2	38,4
	2	8,17	70,6	0,090	90	90,8	21,9
	3	6,38	76,6	0,110	91,7	58	22,9
	4	6,10	79,2	0,120	80	50,9	48,8
	moyenne	6,61 ($\pm 1,07$)	74	0,100 ($\pm 0,018$)	85,1	67,9 ($\pm 17,6$)	27,9

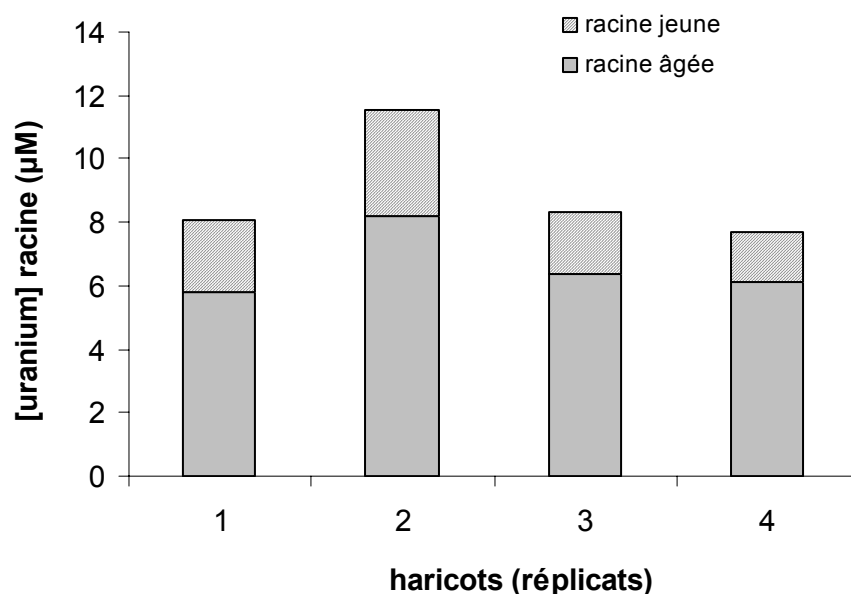


Figure 31. Teneur en uranium (μmol) dans les parties jeunes (couleur claire) et les parties anciennes des racines des 4 réplicats de *P. vulgaris*, (milieu ouvert, $[\text{U}_\text{T}] = 19,7 \mu\text{M}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition, $\text{pH} = 4,9$).

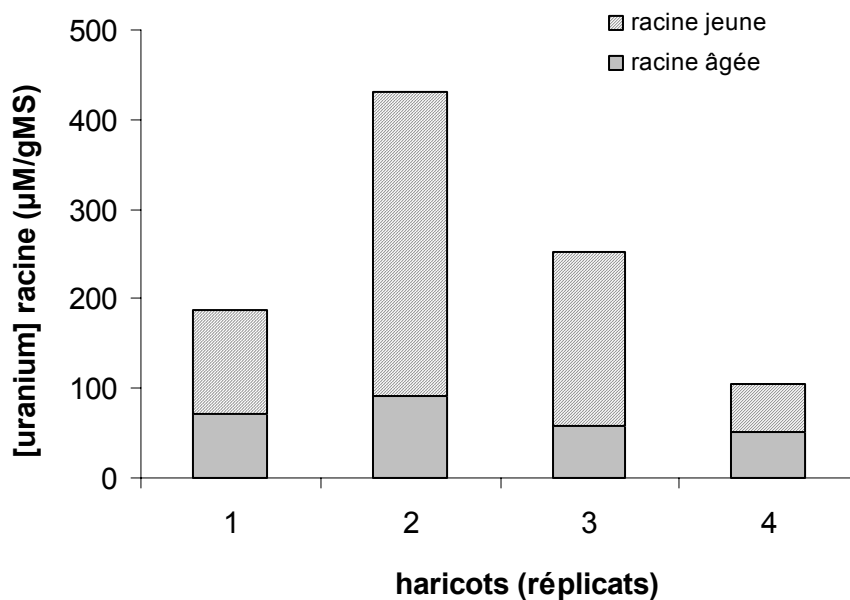


Figure 32. Teneur en uranium ($\mu\text{mol/gMS}$) dans les parties jeunes (couleur claire) et les parties anciennes des racines des 4 réplicats de *P. vulgaris*, en rapport avec la masse de matière sèche qu'elles représentent (milieu ouvert, $[\text{U}_\text{T}] = 19,7 \mu\text{M}$, $t = 5\text{h}$ d'exposition, $\text{pH} = 4,9$).

Conclusions

En maintenant la concentration de la solution nutritive constante, (environ 19 – 20 $\mu\text{mol/L}$ à pH 4,9), la concentration obtenue dans la racine est de l'ordre de 79 $\mu\text{mol/gMS}$ au bout de 5 heures d'exposition (soit 2 fois plus qu'en milieu fermé). Par ailleurs, les parties jeunes des racines sont les plus efficaces par rapport à la faible masse de matière qu'elles représentent.

Enfin, les flux calculés à pH 4,9 sont de 2,0 $\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L/h}$ pour les parties jeunes contre 0,77 pour les parties plus âgées (avec un total pour l'ensemble des racines de 0,90 $\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L/h}$).

3.2.4. Effet des ions H^+ (pH)

L'effet de compétition des ions H^+ avec les ions uranyles a été appréhendé à partir des expérimentations étudiant l'effet de la concentration en uranium dans le milieu d'exposition en fonction du pH. Nous savons en effet que selon le pH de la solution nutritive, la teneur en ions uranyles et des espèces dominantes de l'uranium en solution va être grandement modifiée (section 2.2.1).

Facteurs de Transfert

Les moyennes des Facteurs de Transfert en fonction du pH (à partir des valeurs du tableau 17) ont été reportées sur la figure 33. Nous avons déjà pu constater qu'il existait une relation linéaire positive entre la teneur en uranium dans le milieu et celle dans les racines de *P. vulgaris*. L'hypothèse de cette relation linéaire, émise en section 3.2.2. de manière à pouvoir comparer les FT, est donc vérifiée.

Tout comme observé lors des cinétiques de transfert, les FT racinaires restent équivalents aux pH 4,9 et 5,8 (1,74 et 2,28 $\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$ respectivement) et augmentent avec le pH (3,17 $\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$ à pH7).

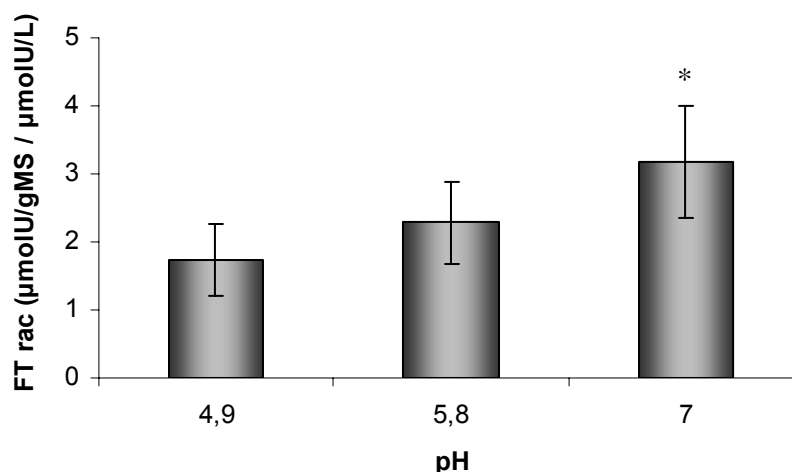


Figure 33. Facteurs de Transfert racinaires moyens, calculés à partir de gammes croissantes en uranium, en fonction du pH.

3.2.5. Effet des cations compétiteurs : Ca^{2+}

Les expérimentations ont été conduites sur une période d'exposition de 5 heures, aux 3 pH (4,9, 5,8 et 7) avec une gamme de concentrations croissantes en calcium (0,1 – 5 mM) et une teneur en uranium total fixe de 300 nM (t_0) dans la solution nutritive. Les résultats de ces expérimentations sont données dans le tableau 19. La force ionique a été maintenue constante à 0,0033 mol/L, en variant KNO_3 .

L'ion Ca^{2+} est un ion supposé compétiteur avec l'ion UO_2^{2+} pour la fixation sur les sites de transport à la surface de la racine. A pH constant, il n'intervient en aucun cas sur la spéciation de l'uranium et notamment la teneur en ion uranyle comme nous pouvons le constater dans le tableau 20. Les éventuelles différences dans le transfert seraient donc dues à la compétition et non à la spéciation.

Teneur en uranium dans la racine

Les quantités en uranium mesurées dans les racines, aux pH 4,9, 5,8, et 7 sont approximativement les mêmes que la quantité en uranium total dans la solution. Cependant, cette quantité reste toujours supérieure à celle des ions UO_2^{2+} dans la solution nutritive (notamment au pH 7), quelle que soit la concentration en cations calcium dans le milieu. Ces résultats d'accumulation indiquent que soit l'ion UO_2^{2+} est la seule forme d'uranium prise en charge par la racine et donc que les formes complexées soient dissociées, soit qu'il est adsorbé/absorbé avec d'autres

espèces. Dans le premier cas de figure, si l'ion uranyle est absorbé très majoritairement, alors l'effet de compétition de l'ion Ca^{2+} avec l'ion UO_2^{2+} serait non existant.

A noter, toujours le pH 7, où la quantité en uranium dans la racine reste 20 fois supérieure à celle en ions uranyles dans la solution d'exposition.

En ce qui concerne les flux d'uranium calculés sur la période d'exposition, ce flux reste identique quelle que soit la concentration en calcium dans la solution d'exposition (figure 34).

Facteurs de Transfert

Pour pouvoir réellement comparer les transferts aux différents pH, les FT racinaires moyens calculés ont été reportés en figure 35. Bien que les ions calcium n'influence pas la teneur en ions uranyles du milieu, les résultats ont été présentés en relation avec la teneur en ions libres de manière à homogénéiser la présentation des résultats.

Ces FT racinaires restent identiques quel que soit le pH du milieu et la concentration en calcium (tableau 20, figure 35).

La prise en charge d'uranium par la racine de *P. vulgaris* ne semble donc pas être affectée par la présence de calcium dans le milieu. Ces observations impliquent ainsi que le phénomène de compétition entre les ions calcium et uranyles, pour la fixation sur les sites de transport à la surface de la racine, ne soient pas existant dans ces conditions expérimentales.

Conclusions :

L'accumulation de l'uranium dans la racine n'est pas modifiée par la variation de la concentration en calcium dans la solution d'exposition, pour une gamme allant jusqu'à 5 mM, à force ionique constante (0,0033 mol/L), quel que soit le pH. Il n'existe pas de compétition pour les sites de transport entre Ca^{2+} et l'uranium (UO_2^{2+} et/ou d'autres espèces) de la membrane.

Tableau 20. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de *P. vulgaris*, Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et flux moyens normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après une exposition de 5h, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$ et pour une gamme croissante en calcium (mmol/L), (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 6.

pH	$[\text{Ca}^{2+}]$ (mM)	U_T (μmol) t0 avant plantes	U_T (μmol) fin	UO_2^{2+} (μmol) t0 avant plantes	U_T racine (μmol) (n = 4)	U_T racine ($\mu\text{molU/gMS}$) moy (n = 4)	Flux ($\mu\text{molU/}$ gMS/h) moy	FT rac ($\mu\text{mol/gMS} /$ $\mu\text{mol/L}$) moy	Flux norm ($\mu\text{mol/gMS} /$ $\mu\text{mol/L/h}$) moy
4,9	0,1	0,343	0,050	0,256	0,291	1,43 ($\pm 0,44$)	0,286 ($\pm 0,088$)	4,17 ($\pm 1,28$)	0,834 ($\pm 0,256$)
4,9	1	0,272	0,041	0,204	0,262	1,18 ($\pm 0,42$)	0,235 ($\pm 0,083$)	4,34 ($\pm 1,53$)	0,868 ($\pm 0,306$)
4,9	2	0,287	< Id	0,216	0,290	1,00 ($\pm 0,037$)	0,200 ($\pm 0,007$)	3,48 ($\pm 0,13$)	0,696 ($\pm 0,026$)
4,9	5	0,267	< Id	0,202	0,270	1,57 ($\pm 0,25$)	0,314 ($\pm 0,050$)	5,88 ($\pm 0,94$)	1,18 ($\pm 0,188$)
5,8	0,1	0,100	< Id	0,024	0,084	0,224 ($\pm 0,054$)	0,045 ($\pm 0,011$)	2,24 ($\pm 0,54$)	0,448 ($\pm 0,108$)
5,8	0,5	0,158	< Id	0,037	0,155	0,387 ($\pm 0,15$)	0,077 ($\pm 0,030$)	2,45 ($\pm 0,95$)	0,490 ($\pm 0,190$)
5,8	1	0,109	< Id	0,026	0,111	0,300 ($\pm 0,12$)	0,060 ($\pm 0,023$)	2,75 ($\pm 1,05$)	0,550 ($\pm 0,210$)
5,8	2	0,091	< Id	0,022	0,111	0,258 ($\pm 0,091$)	0,052 ($\pm 0,018$)	2,84 ($\pm 1,10$)	0,568 ($\pm 0,220$)
5,8	5	0,133	< Id	0,035	0,123	0,281 ($\pm 0,049$)	0,056 ($\pm 0,010$)	2,12 ($\pm 0,36$)	0,424 ($\pm 0,072$)
7	0,5	0,204	< Id	$2,26 \cdot 10^{-4}$	0,166	0,573 ($\pm 0,23$)	0,112 ($\pm 0,047$)	2,81 ($\pm 1,15$)	0,562 ($\pm 0,230$)
7	1	0,127	< Id	$2,01 \cdot 10^{-4}$	0,141	0,399 ($\pm 0,086$)	0,080 ($\pm 0,017$)	3,14 ($\pm 0,68$)	0,628 ($\pm 0,036$)
7	2	0,128	< Id	$2,01 \cdot 10^{-4}$	0,171	0,458 ($\pm 0,17$)	0,092 ($\pm 0,034$)	3,58 ($\pm 1,35$)	0,716 ($\pm 0,270$)
7	5	0,117	< Id	$1,86 \cdot 10^{-4}$	0,146	0,380 ($\pm 0,17$)	0,076 ($\pm 0,068$)	3,24 ($\pm 1,42$)	0,648 ($\pm 0,284$)

NB : Ne sont représentées dans ce tableau que les conditions pour lesquelles le bilan de matière était bouclé ($\pm 20\%$).

Les lignes grisées représentent les conditions comparables entre chaque expérience.

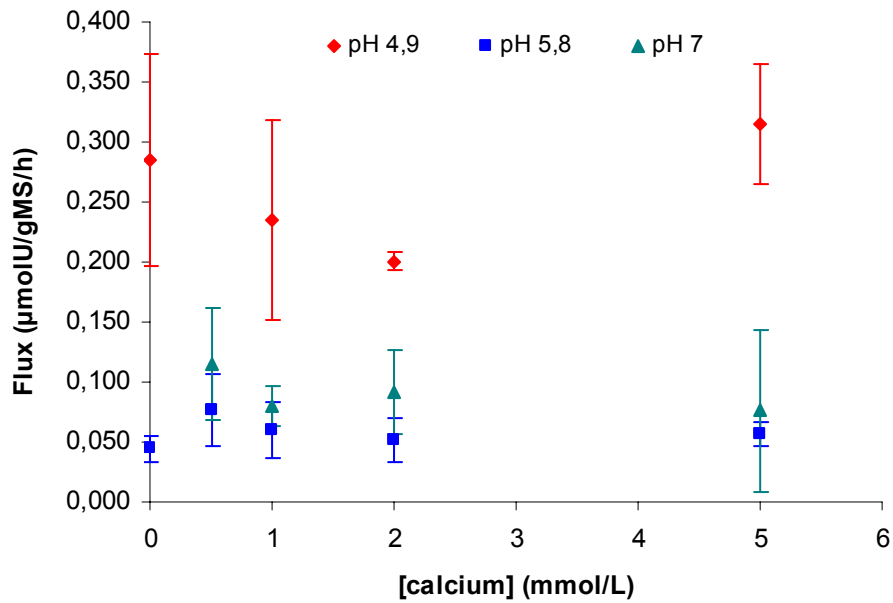


Figure 34. Relation entre les Flux d'uranium à la racine ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moyens et la concentration en calcium (mmol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH ($[\text{U}_T] = 300$ nM, $t = 5$ h d'exposition).

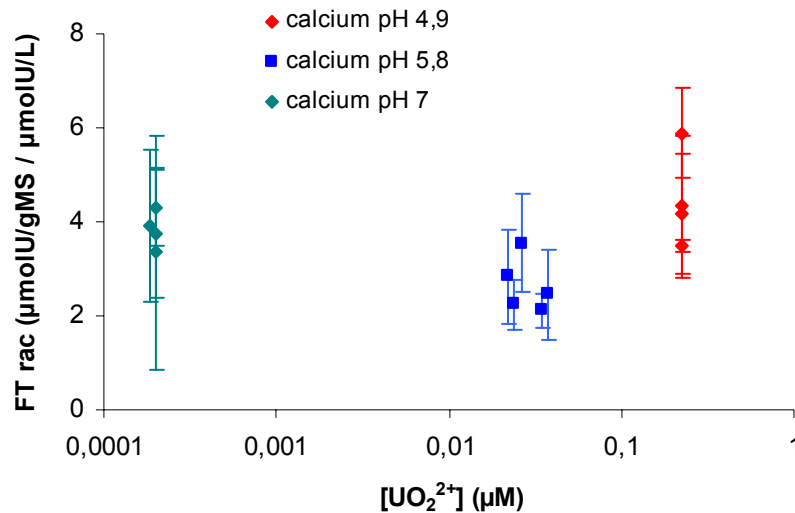


Figure 35. Relation entre les Facteurs de Transfert racinaires moyens et la concentration en ions uranyles dans la solution nutritive, en fonction de la concentration en calcium dans le milieu et du pH ($[\text{U}_T] = 300$ nM, $t = 5$ h d'exposition).

3.2.6. Effet de la complexation par les phosphates

Une série d'expérimentations a été conduite sur une période de 5 heures d'exposition, aux 3 pH (4,9, 5,8 et 7) avec une gamme de concentrations croissantes en phosphates (0 – 15 μM) et une teneur en uranium total fixe de 300 nM (t_0) dans la solution nutritive. Les résultats de ces expérimentations sont donnés dans le tableau 21.

3.2.6.1. Effet des phosphates sur la spéciation

La spéciation de l'uranium peut être grandement affectée par la présence de phosphates dans le milieu d'exposition, phosphates qui vont pouvoir complexer et ainsi diminuer la teneur en ions libres. Les effets des phosphates sont plus importants au pH 5,8 où la teneur en ions uranyles va diminuer de près de 70 % entre 0 et 15 μM de phosphates et de 40 % au pH 4,9 (tableau 21). En revanche, à pH 7, l'effet des phosphates sur la teneur de ces ions est plus faible, celle-ci n'est diminuée que de 12 %, leur teneur à ce pH étant déjà très faible.

La spéciation de l'uranium reste par ailleurs très similaire entre les pH 4,9 et 5,8 (figure 36). Si les ions uranyles restent prépondérants en solution au pH 4,9 jusqu'à 15 μM de phosphates, au pH 5,8, ils deviennent légèrement minoritaires autour de 12 μM de phosphates. En parallèle, la teneur du complexe UO_2HPO_4 va augmenter dans les 2 cas jusqu'à atteindre, voire dépasser au pH 5,8, la teneur en ions UO_2^{2+} . Les ions UO_2OH^+ sont également présents mais restent minoritaires face aux deux autres formes chimiques. A contrario, cette spéciation au pH 7 est sensiblement différente puisque les formes majoritaires sont les complexes $\text{UO}_2(\text{OH})_2(\text{aq})$ et UO_2PO_4^- (qui devient majoritaire par rapport au complexe hydroxylé après 7 μM de phosphates) et les formes carbonatées $\text{UO}_2\text{CO}_3(\text{aq})$ $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$.

Il convient donc d'admettre que si seul l'ion uranyle intervient dans le transfert et la bioaccumulation de l'uranium au niveau de la racine de *P. vulgaris*, les FT racinaires au pH 7 devraient être bien plus faibles qu'aux 2 autres pH.

Relation entre le transfert d'uranium à la plante et sa spéciation dans le milieu

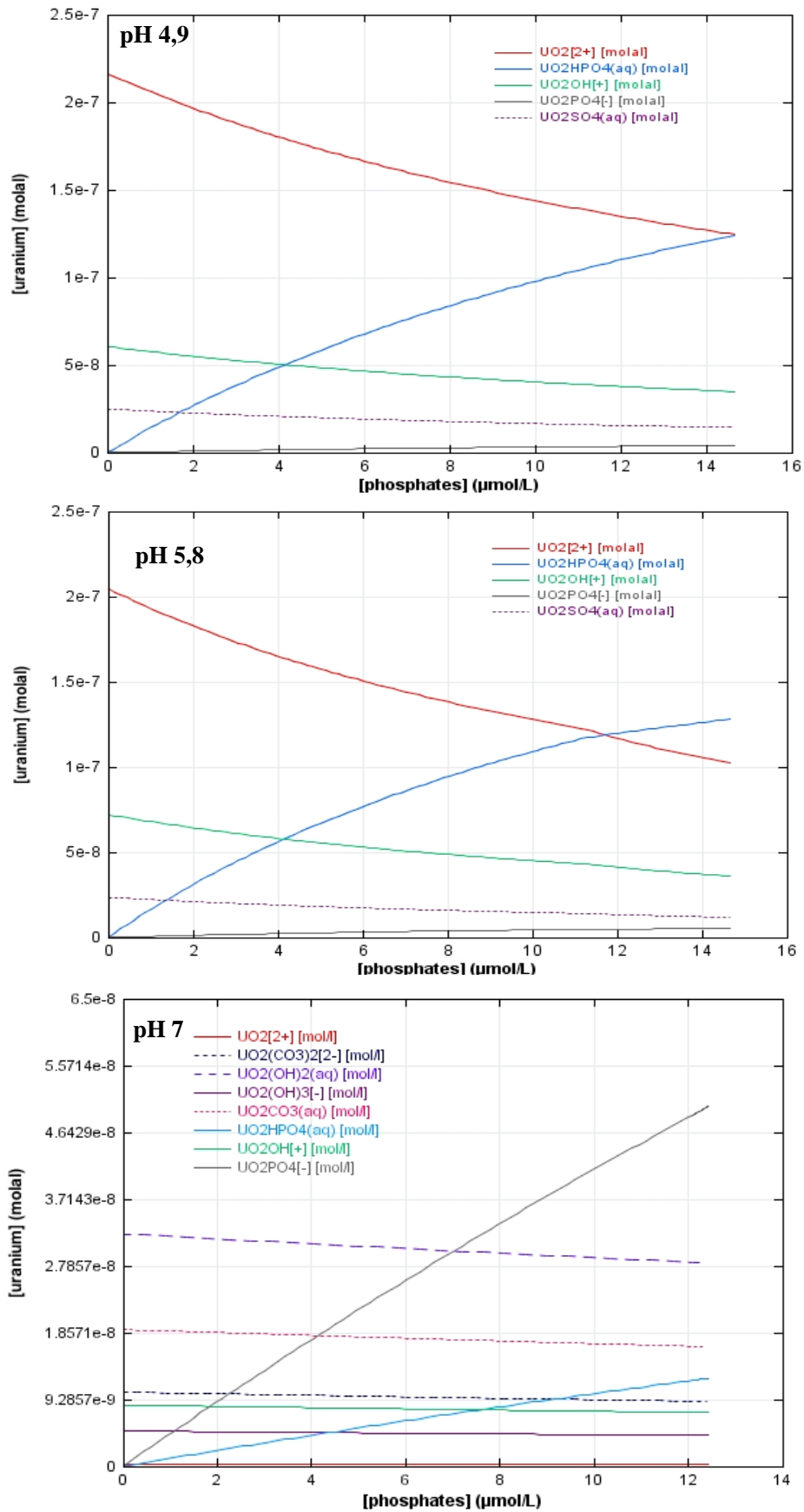


Figure 36. Spéciation de l'uranium en solution en fonction de la teneur en phosphates et du pH, $[U_T] = 300 \text{ nM}$.

3.2.6.2. Effet des phosphates sur la prise en charge de l'uranium par la racine

Il semble que la bioaccumulation d'uranium dans la racine ne soit pas uniquement due à la teneur en ions uranyles car quel que soit le pH du milieu, la teneur en micromoles d'uranium ($[U_T]$ racine) dans les racines excède celle en ions libres (UO_2^{2+}) dans le milieu (tableau 21). Ceci est particulièrement visible au pH 7 où la teneur en ion libre est de l'ordre du nanomolaire tandis que dans la racine, la teneur en uranium est de l'ordre de la centaine de micromolaires.

Quel que soit le pH, l'accumulation de l'uranium dans la racine ne varie pas significativement en fonction de la concentration en phosphates, ceci malgré le changement drastique de spéciation. Au pH 7, la quantité en uranium dans la racine reste constante quelle que soit la concentration en phosphates. Il semblerait qu'à ces pH, les différentes formes complexées ou non de l'uranium soient prises en charge, notamment le complexe hydroxylé $UO_2(OH)_2$ (aq), le complexe phosphaté anionique $UO_2PO_4^-$ ou neutre UO_2HPO_4 , mais aussi carbonatés UO_2CO_3 (aq) $UO_2(CO_3)_2^{2-}$, majoritaires à ces pH ou bien que ces complexes soient dissociés à la surface de la racine.

Concernant les flux d'uranium calculés sur la période d'exposition, ceux-ci restent identiques quel que soit la concentration en phosphates dans le milieu d'exposition (figure 37).

Facteurs de Transfert

Pour pouvoir réellement comparer les transferts aux différents pH et leur relation avec la teneur en ion libre, les FT racinaires calculés ont été reportés en figure 38, en fonction de la concentration en ions UO_2^{2+} . Ces FT racinaires restent identiques quel que soit le pH du milieu et la concentration en phosphates et donc la concentration en ions libres.

Tableau 21. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de *P. vulgaris*, Flux moyens ($\mu\text{molU/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et Flux moyens normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$), en fonction du pH après une exposition de 5h, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$ et pour une gamme croissante en phosphates ($\mu\text{mol/L}$), (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 7.

pH	[P] (μM)	U_T (μmol) t0 avant plantes	U_T (μmol) fin	UO_2^{2+} (μmol) t0 avant plantes	U_T racine (μmol) (n = 4)	$[\text{U}_T]$ racine ($\mu\text{molU/gMS}$) moy (n = 4)	Flux ($\mu\text{mol/gMS/h}$) moy	FT rac ($\mu\text{mol/gMS} / \mu\text{mol/L}$) moy	Flux norm ($\mu\text{mol/gMS} / \mu\text{mol/L/h}$) moy
4,9	0	0,299	< ld	0,240	0,286	0,708 ($\pm 0,066$)	0,156 ($\pm 0,013$)	2,37 ($\pm 0,50$)	0,474 ($\pm 0,100$)
4,9	0,5	0,354	< ld	0,236	0,313	0,789 ($\pm 0,012$)	0,158 ($\pm 0,002$)	2,20 ($\pm 0,34$)	0,440 ($\pm 0,068$)
4,9	1	0,272	< ld	0,230	0,298	0,872 ($\pm 0,021$)	0,174 ($\pm 0,004$)	3,21 ($\pm 0,79$)	0,642 ($\pm 0,013$)
4,9	5	0,261	0,031	0,193	0,252	0,633 ($\pm 0,022$)	0,127 ($\pm 0,004$)	2,43 ($\pm 0,85$)	0,486 ($\pm 0,170$)
4,9	10	0,229	< ld	0,160	0,244	0,583 ($\pm 0,011$)	0,117 ($\pm 0,002$)	2,55 ($\pm 0,50$)	0,510 ($\pm 0,100$)
5,8	0,5	0,188	< ld	0,048	0,126	0,515 ($\pm 0,077$)	0,103 ($\pm 0,015$)	2,74 ($\pm 0,79$)	0,548 ($\pm 0,158$)
5,8	1	0,194	< ld	0,048	0,105	0,260 ($\pm 0,011$)	0,052 ($\pm 0,002$)	1,34 ($\pm 0,57$)	0,268 ($\pm 0,114$)
5,8	5	0,290	< ld	0,032	0,241	0,601 ($\pm 0,014$)	0,120 ($\pm 0,003$)	2,07 ($\pm 0,47$)	0,414 ($\pm 0,094$)
5,8	10	0,323	< ld	0,022	0,221	0,503 ($\pm 0,021$)	0,101 ($\pm 0,004$)	1,56 ($\pm 0,64$)	0,312 ($\pm 0,128$)
7	0	0,176	< ld	$1,59 \cdot 10^{-3}$	0,125	0,350 ($\pm 0,028$)	0,070 ($\pm 0,006$)	1,99 ($\pm 0,66$)	0,398 ($\pm 0,132$)
7	0,5	0,165	< ld	$1,58 \cdot 10^{-3}$	0,150	0,617 ($\pm 0,091$)	0,123 ($\pm 0,018$)	4,46 ($\pm 1,5$)	0,892 ($\pm 0,300$)
7	1	0,180	< ld	$1,57 \cdot 10^{-3}$	0,124	0,445 ($\pm 0,049$)	0,089 ($\pm 0,010$)	2,47 ($\pm 0,27$)	0,494 ($\pm 0,054$)
7	5	0,162	< ld	$1,53 \cdot 10^{-3}$	0,125	0,341 ($\pm 0,063$)	0,068 ($\pm 0,013$)	2,11 ($\pm 0,39$)	0,422 ($\pm 0,078$)
7	10	0,142	< ld	$1,47 \cdot 10^{-3}$	0,118	0,302 ($\pm 0,054$)	0,060 ($\pm 0,011$)	2,13 ($\pm 0,38$)	0,426 ($\pm 0,076$)
7	15	0,201	< ld	$1,40 \cdot 10^{-3}$	0,120	0,402 ($\pm 0,096$)	0,080 ($\pm 0,019$)	2,00 ($\pm 0,48$)	0,400 ($\pm 0,096$)

NB : Ne sont représentées dans ce tableau que les conditions pour lesquelles le bilan de matière était bouclé ($\pm 20\%$).

Les lignes grisées représentent les conditions comparables entre chaque expérience.

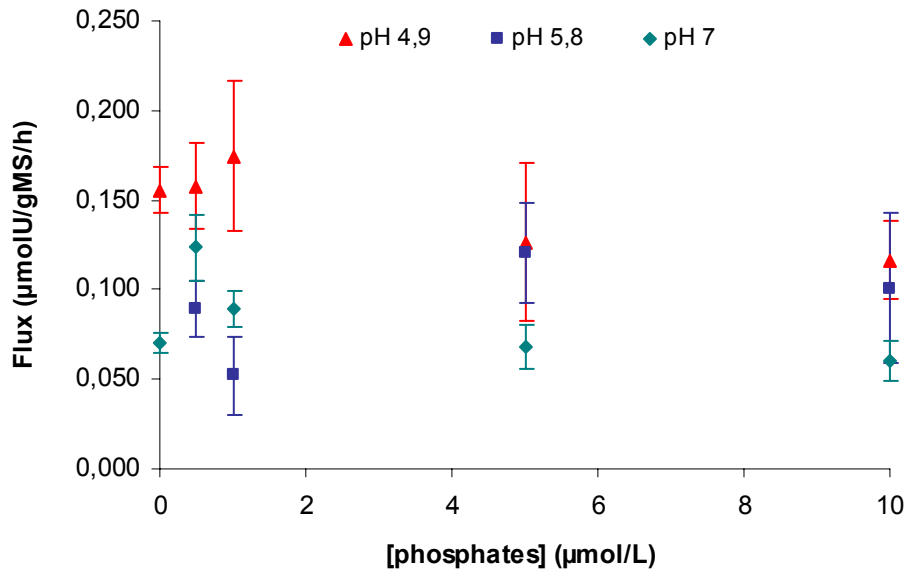


Figure 37. Relation entre les Flux d'uranium à la racine (µmolU/gMS/h) moyens et la concentration en phosphates (µmol/L) dans la solution nutritive, en fonction du pH ($[U_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5 \text{ h}$ d'exposition).

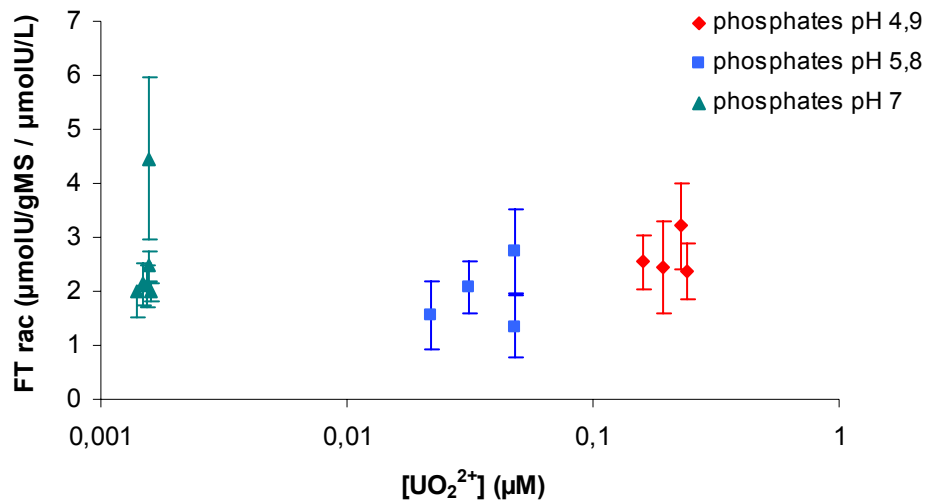


Figure 38. Relation entre les Facteurs de Transfert racinaires moyens (µmolU/gMS / µmolU/L) et la concentration en ions uranyles (µmol/L) dans la solution nutritive, en fonction de la concentration en phosphates dans le milieu et du pH ($[U_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5 \text{ h}$ d'exposition).

Conclusions :

L'accumulation de l'uranium dans la racine ne varie pas significativement en fonction de la concentration en phosphates dans la solution d'exposition, quel que soit le pH. Et ceci, malgré une réduction significative de la concentration en ions UO_2^{2+} , notamment aux pH 4,9 et 5,8, due à la complexation de l'uranium avec les phosphates. Il existe peut être une prise en charge d'une espèce uranyl-phosphate (UO_2HPO_4 , UO_2PO_4^- , UO_2OH^+ , UO_2CO_3 (aq) et/ou $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$) ou une dissociation des complexes.

3.2.7 Effet de la complexation par un ligand organique : le citrate.

Une série d'expérimentations ont été conduites sur une période de 5 heures d'exposition, aux 3 pH (4,9, 5,8 et 7) avec une gamme croissante de concentrations en citrate de sodium (0 – 10 μM) et une concentration en uranium total fixe de 300 nM dans la solution nutritive. Les résultats de ces expérimentations sont donnés dans le tableau 23.

3.2.7.1. Effet du citrate de sodium sur la spéciation

La présence de citrate de sodium dans le milieu va fortement influencer la spéciation de l'uranium à pH 4,9 et 5,8, notamment la concentration en ions libres, puisque celle-ci va diminuer avec l'augmentation de sa concentration (figure 39). Cette diminution est rapide et forte (la teneur s'abaisse de plus d'un facteur 100) particulièrement jusqu'à 5 $\mu\text{mol/L}$ de citrate. En revanche, à pH 7 sa présence n'influe pas sur la concentration en ions libres dans le milieu (celle-ci étant déjà très faible).

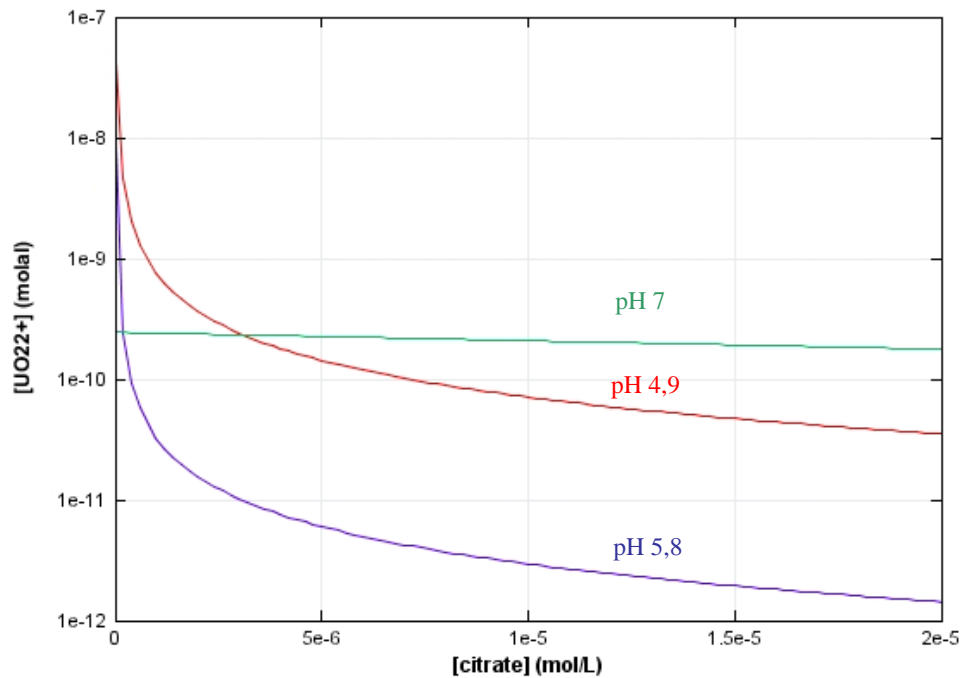


Figure 39. Relation entre la concentration en ions uranyles (mol/L) et la concentration en citrate de sodium (mol/L) dans la solution nutritive aux pH 4,9 ; 5,8 et 7, $[U_T] = 300$ nM, modélisation JCHESS.

Effet du citrate sur la solubilité de l'uranium

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, pour chaque expérimentation, la concentration en uranium dans le milieu d'exposition est mesurée systématiquement au moment de l'ajout d'uranium (t_0), et après 36 heures d'équilibration du système maintenu au pH d'étude (t_0 avant plantes), de façon à saturer les sites d'adsorption du contenant, adsorption expliquant la diminution de la concentration en uranium observée entre ces 2 temps (tableau 22). Cependant, nous pouvons remarquer que l'ajout plus conséquent de citrate dans le milieu favorise le maintien en solution de l'uranium. En effet, la concentration en uranium dans la solution, après 36 h (t_0 avant plantes) augmente avec la concentration en citrate. Ainsi, si l'on apporte $1,5 \mu\text{M}$ de citrate de sodium dans le milieu, la concentration en uranium augmente de 23 % et de 40 % avec $10 \mu\text{M}$ à pH 4,9. La solubilisation est encore plus importante à pH 5,8 puisque pour ces deux mêmes concentrations en citrate, $1,5$ et $10 \mu\text{M}$, la concentration en uranium dans la solution augmente de 51 et 72 % respectivement. A pH 7, c'est à $10 \mu\text{M}$ de citrate que la différence devient sensible avec une augmentation de 20

% de la concentration en uranium dans la solution. Le citrate joue donc le rôle d'un ligand qui va pourvoir maintenir en solution l'uranium fixé sur le contenant. C'est également ce qui est observé dans le sol lors d'un apport de citrate. Celui-ci permet ainsi de désorber l'uranium du sol et d'augmenter la concentration en uranium dans la solution du sol (Shahandeh et Hossner, 2002 ; Huang *et al.*, 1998 ; Ebbs *et al.*, 1998).

Tableau 22. Concentration en uranium mesurée dans la solution nutritive ($\mu\text{molU/L}$) en fonction de la concentration en citrate de sodium ($\mu\text{mol/L}$) au moment de la contamination (t_0) et avant d'exposer les plantes (t_0 avant plantes après 36 heures d'équilibration).

		[citrate] ($\mu\text{mol/L}$)					
		0	0,5	1,5	3	5	10
pH 4,9	[U _T] ($\mu\text{mol/L}$) t0	0,354 ($\pm 0,072$)	0,355 ($\pm 0,071$)	0,358 ($\pm 0,006$)	0,352 ($\pm 0,032$)	0,362 ($\pm 0,059$)	0,351 ($\pm 0,082$)
	[U _T] ($\mu\text{mol/L}$) t0 avant plantes	0,236 ($\pm 0,012$)	0,265 ($\pm 0,006$)	0,291 ($\pm 0,008$)	0,297 ($\pm 0,011$)	0,317 ($\pm 0,032$)	0,331 ($\pm 0,038$)
pH 5,8	[U _T] ($\mu\text{mol/L}$) t0	0,376 ($\pm 0,064$)	0,373 ($\pm 0,051$)	0,351 ($\pm 0,012$)	0,339 ($\pm 0,006$)	0,332 ($\pm 0,003$)	0,345 * ($\pm 0,049$)
	[U _T] ($\mu\text{mol/L}$) t0 avant plantes	0,200 ($\pm 0,025$)	0,269 ($\pm 0,050$)	0,302 ($\pm 0,053$)	0,269 ($\pm 0,098$)	0,321 ($\pm 0,066$)	0,396 ($\pm 0,023$)
pH 7	[U _T] ($\mu\text{mol/L}$) t0	0,356 ($\pm 0,003$)	0,347 ($\pm 0,001$)	0,345 ($\pm 0,013$)	0,344 ($\pm 0,016$)	0,358 ($\pm 0,031$)	0,350 ($\pm 0,001$)
	[U _T] ($\mu\text{mol/L}$) t0 avant plantes	0,197 ($\pm 0,017$)	0,186 ($\pm 0,017$)	0,132 ($\pm 0,029$)	0,163 ($\pm 0,005$)	0,135 ($\pm 0,019$)	0,232 ($\pm 0,016$)

* A pH 5,8, et pour une concentration en citrate de 10 μM , la concentration mesurée de l'uranium est supérieure à t_0 avant plantes (0,396 μM) par rapport à la contamination initiale t_0 (0,345 μM) et est peut-être due à une mauvaise homogénéisation de départ. La valeur retenue pour le calcul du % d'augmentation de la concentration en uranium dans la solution étant celle de départ (donc celle maximale) de 0,345 μM par rapport à la concentration en U dans la condition sans citrate.

3.2.7.2. Effet du citrate sur le transfert

La teneur en uranium dans la racine (μmolU) reste supérieure à la teneur en ions UO_2^{2+} dans la solution, impliquant donc que l'accumulation d'uranium au niveau de la racine n'est pas uniquement liée à la teneur en ions libres, mais que les formes complexées de l'uranium avec le citrate sont aussi prises en charge ou bien dissociées. Différents complexes uranium-citrate sont retrouvés en fonction de la concentration en citrate et pour une concentration fixe en uranium (300 nM) (figure 40). Ainsi, à forte concentration en citrate, ce sont les complexes anioniques (UO_2Cit^- , $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$) et neutre UO_2Hcit qui sont prépondérants. On retrouve également d'autres complexes comme les complexes carbonatés ($\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$, UO_2CO_3 , $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$)

Relation entre le transfert d'uranium à la plante et sa spéciation dans le milieu

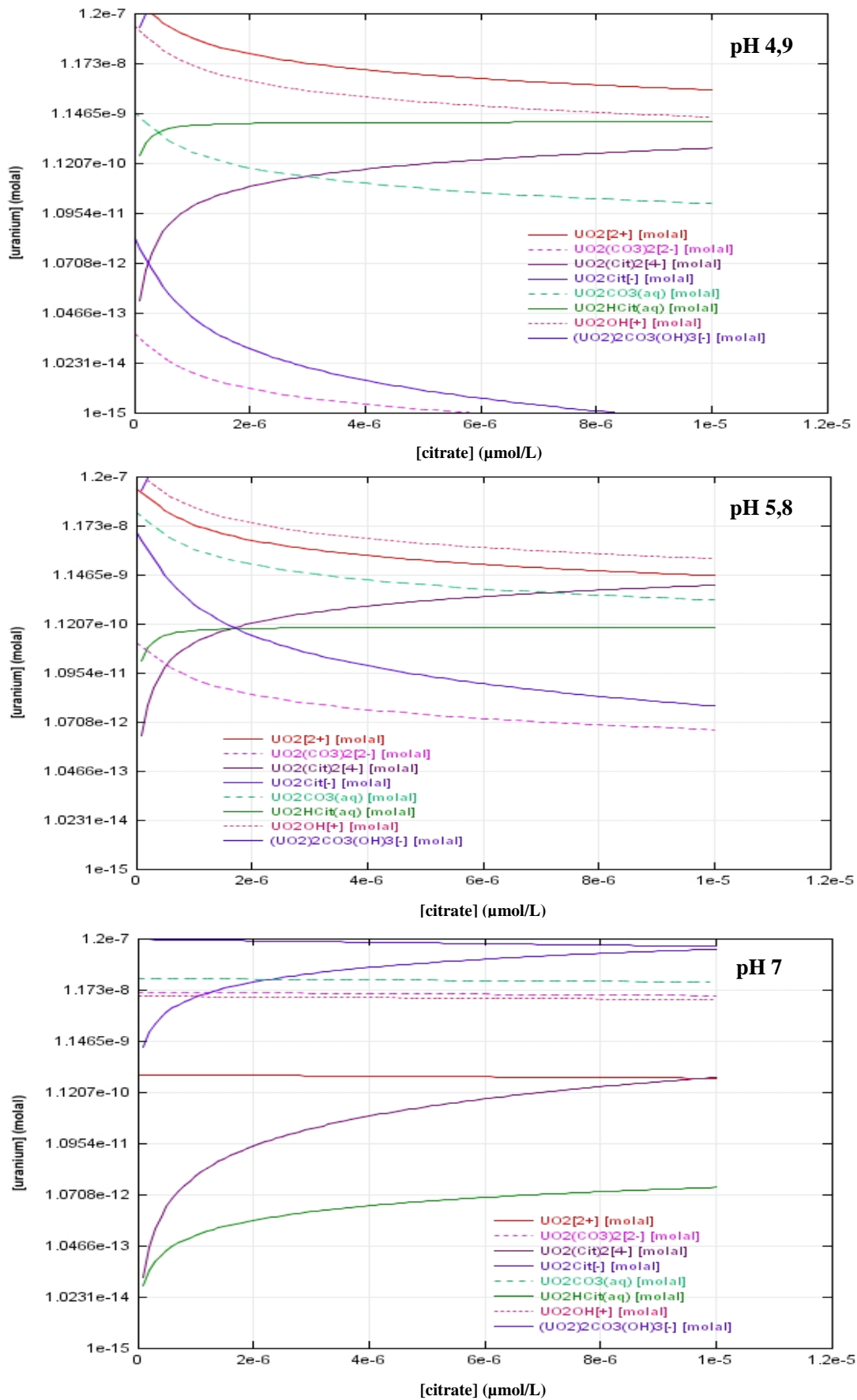


Figure 40. Spéciation de l'uranium en solution en fonction de la concentration en citrate et du pH, $[U_T] = 300 \text{ nM}$.

Les flux d'uranium à la racine, calculés sur la période d'exposition de 5 heures ne sont pas affectés par la concentration en citrate dans la solution d'exposition, excepté au pH 5,8 où il diminue (diminue d'un facteur 2 entre 0,5 µmol/L et 10 µmol/L de citrate) avec l'augmentation de la concentration en citrate (figure 41).

Facteurs de Transfert

Si aux pH 4,9 et 7, la présence de citrate de sodium ne semble pas affecter le transfert, en revanche, au pH 5,8, le transfert diminue lorsque la teneur en citrate de sodium augmente (figure 42 , $P < 0,05$).

Il semble donc que la présence de citrate induise une légère inhibition de la prise en charge d'uranium par la racine de *P. vulgaris* mais uniquement rapporté au pH 5,8. Les transferts sont ainsi diminués de 10 % pour 1,5 µM de citrate, de 40 à 50 % au delà de 3 µM de citrate de sodium.

De ce point de vue l'uranium semble se comporter de la même façon que le cadmium avec le citrate, puisque Chen *et al.* (2003) ont rapporté qu'en présence de Cd, le traitement au citrate (0,5 mM à pH 6) augmentait le Cd dans les feuilles de 14% tandis que dans la racine, sa teneur diminuait de 19%.

Tableau 23. Quantités en uranium (μmol) dans la solution (t0 avant plantes et fin) et dans les racines (en μmolU et $\mu\text{molU/gMS}$) de *P. vulgaris*, Flux moyens ($\mu\text{mol/gMS/h}$), FT racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU}$) et Flux moyens normalisés ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{MU/h}$), en fonction du pH après une exposition de 5h, $[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$ et pour une gamme croissante en citrate ($\mu\text{mol/L}$), (le terme moy désignant le calcul du flux ou des FT comme une moyenne pour les 4 haricots). Les biomasses sèches des racines sont données en annexe 8.

pH	[Cit] (μM)	U_T (μmol) t0 avant plantes	U_T (μmol) fin	UO_2^{2+} (μmol) t0 avant plantes	$[\text{U}_T]$ racines (μmol) (n = 4)	$[\text{U}_T]$ racine ($\mu\text{mol/gMS}$) moy (n = 4)	Flux ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moy	FT rac ($\mu\text{mol/gMS}$ / $\mu\text{mol/L}$)	Flux norm ($\mu\text{mol/gMS} /$ $\mu\text{mol/L/h}$)
4,9	0	0,236	0,024	0,196	0,170	0,398 ($\pm 0,042$)	0,080 ($\pm 0,008$)	1,69 ($\pm 0,18$)	0,338 ($\pm 0,036$)
4,9	0,5	0,265	0,024	0,018	0,158	0,591 ($\pm 0,030$)	0,118 ($\pm 0,006$)	2,23 ($\pm 0,11$)	0,446 ($\pm 0,022$)
4,9	1,5	0,291	0,046	0,0046	0,180	0,435 ($\pm 0,13$)	0,087 ($\pm 0,060$)	1,50 ($\pm 0,43$)	0,218 ($\pm 0,086$)
4,9	3	0,297	0,054	0,0021	0,189	0,587 ($\pm 0,16$)	0,117 ($\pm 0,032$)	1,98 ($\pm 0,52$)	0,396 ($\pm 0,104$)
4,9	5	0,317	0,041	0,0013	0,189	0,509 ($\pm 0,12$)	0,102 ($\pm 0,024$)	1,60 ($\pm 0,36$)	0,320 ($\pm 0,072$)
4,9	10	0,331	0,046	$6,58 \cdot 10^{-4}$	0,200	0,597 ($\pm 0,092$)	0,119 ($\pm 0,018$)	1,80 ($\pm 0,28$)	0,360 ($\pm 0,056$)
5,8	0	0,200	< ld	$52,3 \cdot 10^{-4}$	0,186	0,912 ($\pm 0,20$)	0,182 ($\pm 0,04$)	4,09 ($\pm 0,20$)	0,818 ($\pm 0,040$)
5,8	0,5	0,269	< ld	$1,09 \cdot 10^{-3}$	0,197	1,13 ($\pm 0,40$)	0,226 ($\pm 0,08$)	4,21 ($\pm 0,40$)	0,842 ($\pm 0,080$)
5,8	1,5	0,302	< ld	$2,33 \cdot 10^{-4}$	0,137	1,09 ($\pm 0,31$)	0,218 ($\pm 0,062$)	3,60 ($\pm 0,31$)	0,720 ($\pm 0,062$)
5,8	3	0,269	< ld	$9,01 \cdot 10^{-5}$	0,207	0,624 ($\pm 0,14$)	0,125 ($\pm 0,028$)	2,32 ($\pm 0,14$)	0,464 ($\pm 0,082$)
5,8	5	0,311	< ld	$6,02 \cdot 10^{-5}$	0,221	0,846 ($\pm 0,41$)	0,169 ($\pm 0,082$)	2,72 ($\pm 0,41$)	0,546 ($\pm 0,082$)
5,8	10	0,396	< ld	$3,09 \cdot 10^{-5}$	0,163	0,845 ($\pm 0,41$)	0,169 ($\pm 0,082$)	2,13 ($\pm 0,75$)	0,426 ($\pm 0,150$)
7	0	0,197	< ld	$1,87 \cdot 10^{-4}$	0,155	0,413 ($\pm 0,050$)	0,083 ($\pm 0,010$)	2,10 ($\pm 0,26$)	0,420 ($\pm 0,052$)
7	0,5	0,186	< ld	$2,19 \cdot 10^{-5}$	0,149	0,380 ($\pm 0,12$)	0,076 ($\pm 0,024$)	2,04 ($\pm 0,64$)	0,408 ($\pm 0,128$)
7	1,5	0,132	< ld	$3,79 \cdot 10^{-6}$	0,113	0,303 ($\pm 0,012$)	0,061 ($\pm 0,002$)	2,30 ($\pm 0,10$)	0,460 ($\pm 0,020$)
7	3	0,163	0,037	$2,27 \cdot 10^{-6}$	0,128	0,357 ($\pm 0,11$)	0,071 ($\pm 0,022$)	2,90 ($\pm 0,69$)	0,580 ($\pm 0,138$)
7	5	0,135	< ld	$1,09 \cdot 10^{-6}$	0,128	0,505 ($\pm 0,22$)	0,101 ($\pm 0,044$)	2,38 ($\pm 0,14$)	0,476 ($\pm 0,028$)
7	10	0,232	0,040	$9,26 \cdot 10^{-7}$	0,176	0,566 ($\pm 0,021$)	0,113 ($\pm 0,004$)	2,44 ($\pm 0,09$)	0,488 ($\pm 0,018$)

NB : Ne sont représentées dans ce tableau que les conditions pour lesquelles le bilan de matière était bouclé ($\pm 20\%$). Les lignes grisées représentent les conditions comparables entre chaque expérience.

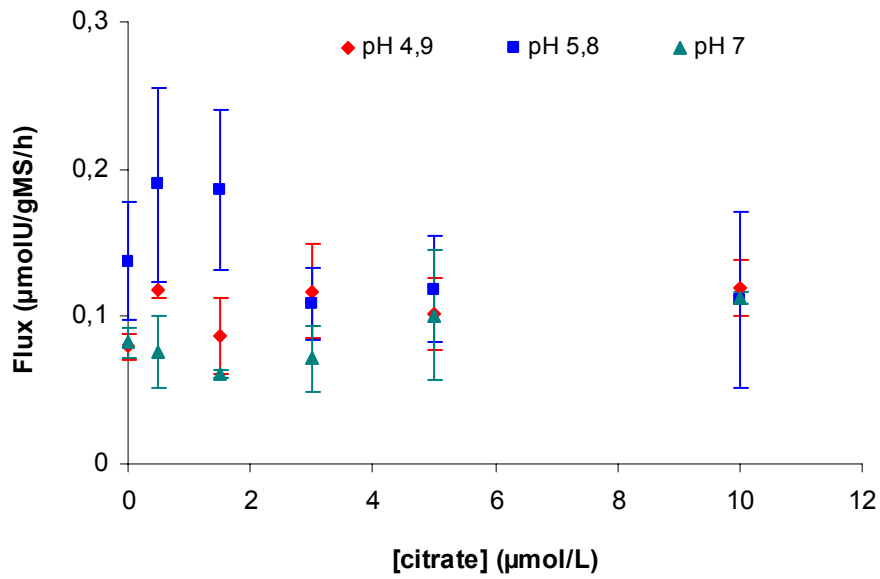


Figure 41. Relation entre les Flux d'uranium à la racine ($\mu\text{molU/gMS/h}$) moyens et la concentration en citrate ($\mu\text{mol/L}$) dans la solution nutritive, en fonction du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5 \text{ h}$ d'exposition).

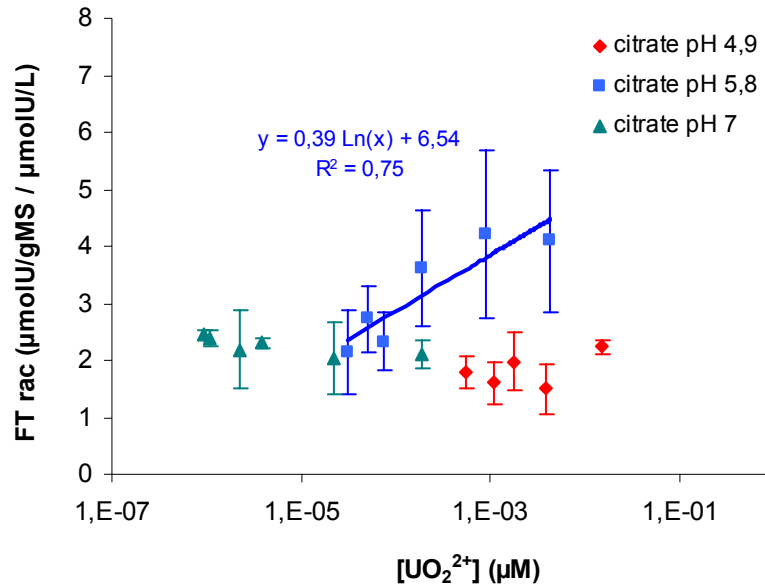


Figure 42. Relation entre les Facteurs de Transfert racinaires moyens ($\mu\text{molU/gMS} / \mu\text{molU/L}$) et la concentration en ions uranyles ($\mu\text{mol/L}$) dans la solution nutritive, en fonction de la concentration en citrate dans le milieu et du pH ($[\text{U}_T] = 300 \text{ nM}$, $t = 5 \text{ h}$ d'exposition).

Conclusion :

La présence de citrate dans le milieu d'exposition modifie de façon significative la prise en charge de l'uranium par la racine à pH 5,8. Aux autres pH, les flux d'uranium ne sont pas modifiés de manière significative.

3.3. Synthèse des résultats expérimentaux et discussion

♣ Cinétiques de transfert à court terme et long terme et translocation

Les cinétiques de transfert réalisées sur *Phaseolus vulgaris*, durant quelques jours ont révélé que le transfert de l'uranium en solution à la racine des plantes était un processus rapide, qui atteint un équilibre en moins de 24 heures d'exposition. Ces observations ont été confirmées et affinées lors des études à court terme et il apparaît que l'uranium présent en solution se retrouve au niveau des racines de *Phaseolus vulgaris* dès les 30 premières minutes d'exposition.

Nous avons également pu mettre en évidence que l'uranium se retrouvait très majoritairement dans la racine et ce à 99 %. Les racines des plantes supérieures sont souvent considérées comme des barrières à la translocation des métaux vers les parties aériennes. C'est également le cas de *P. vulgaris* avec le Cd, lequel est accumulé essentiellement dans les racines (Leita *et al.*, 1991). Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence avec l'expérience en milieu ouvert (19,7 μM d'uranium à pH 4,9) que la racine pouvait concentrer 79 $\mu\text{molU/gMS}$ après 5 heures d'exposition.

Concernant la translocation de l'uranium, de la racine aux parties aériennes, celle-ci est rapide car mesurable dès 24 heures d'exposition. Par ailleurs, ce n'est qu'à partir du sixième jour que la translocation dans les feuilles devient significativement différente entre les pH 4,9 et 5,8 (concentration en uranium 2,8 fois plus élevée au pH 4,9). La teneur en uranium dans les feuilles devient alors plus élevée au pH 4,9, pH où l'ion uranyle est majoritaire en solution (résultats en concordance avec les observations de Ebbs *et al.*, 1998).

♣ Influence du stade végétatif et de l'âge des racines

L'étude du transfert d'uranium pour deux stades végétatifs distincts de *P. vulgaris*, un stade précoce (stade plantule) et un stade avancé (stade floraison), a mis en évidence que le stade plantule concentrait plus l'uranium dans ses organes aériens (tige et feuilles) que le stade floraison, mais que la prise en charge de l'uranium au niveau de la racine était identique, les FT moyens étant identiques entre ces 2 stades. Nous avons par ailleurs pu mettre en évidence l'efficacité des jeunes racines pour la prise en charge de l'uranium en comparaison de la biomasse qu'elle représente (70% de l'U associé à la racine en proportion de la masse sèche qu'elles représentent).

♣ Relation spéciation de l'uranium en solution – transfert dans la racine

Pour chacune des expériences visant à déterminer l'effet de différentes variables (calcium, phosphates ou citrate) sur la prise en charge de l'uranium par la racine, une des conditions de l'expérimentation était proche d'une expérience à l'autre. Cette condition nous a permis de comparer les FT obtenus dans des conditions similaires entre chaque expérience de façon à comparer la répétitivité des résultats. La figure 43 synthétise ces FT calculés dans chacune des expériences (lignes grisées dans les tableaux 16, 19, 20 et 22), avec modification de la spéciation par ajout de phosphates ou de citrate de sodium, ou encore par la modification de la teneur en ions calcium. Les conditions sont comparables : la solution nutritive est de même composition, c'est à dire sans phosphates, ni citrate de sodium (correspondant aux témoins des 2 expériences avec ajout de phosphate et de citrate de sodium). Seule la condition en calcium est légèrement différente car la teneur en Ca^{2+} est légèrement plus forte que dans la solution nutritive (0,5 mM au lieu de 0,25 mM). Nous pouvons ainsi observer que les FT racinaires de l'uranium des « témoins » ne sont pas différents d'une expérience à l'autre et sont donc comparables aux pH 5,8 et 7. Au pH 4,9, seule la condition avec calcium diffère des 2 autres. Ces différentes conditions peuvent donc être comparées les unes aux autres.

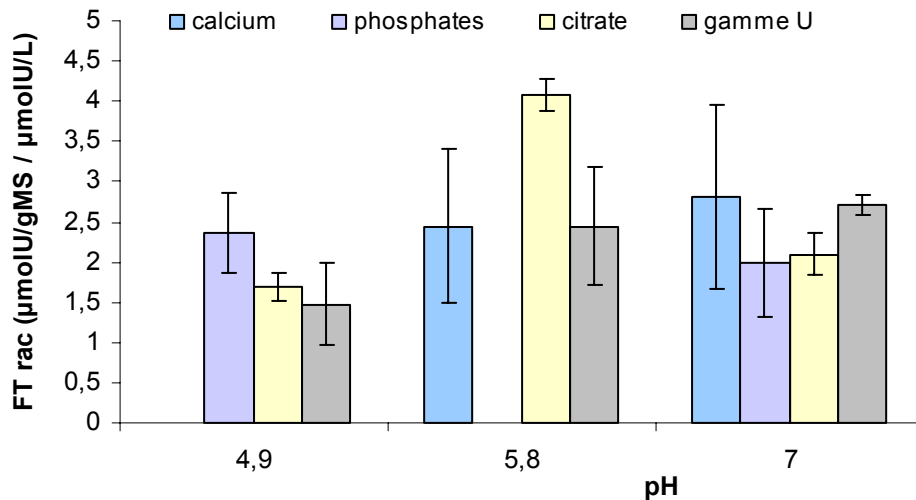


Figure 43. Comparaison des FT racinaires pour chacun des « témoins » des expériences avec ajout de phosphates, de calcium ou de citrate aux 3 pHs d'étude.

◆ *Effet des ions compétiteurs H^+ et Ca^{2+}*

Ions H^+

Nous avons pu remarquer que le Facteur de Transfert racinaire était identique aux pH 4,9 et 5,8, tandis qu'au pH 7, celui-ci était significativement plus élevé dans les expériences de cinétique à court terme (figure 25) et de la gamme de concentrations en uranium (figure 33). Or, si l'on compare les résultats de l'ensemble des expériences où les conditions sont approximativement les mêmes (pas de citrate de sodium ni de phosphates, une concentration en calcium proche de 0,25 mM et en uranium de 300 nM), les FT racinaires au pH 7 ne sont pas plus élevés (figure 43). Si l'on se reporte aux concentrations en uranium avant d'introduire les plantes dans le milieu pour ces 2 expériences, celles-ci sont plus faibles, notamment dans le cas de la cinétique (tableau 14). Ceci peut entraîner une variabilité des Facteurs de Transfert calculés et peut éventuellement expliquer

les différences observées, impliquant qu'il n'y ait en réalité pas de différence significative entre les pH 4,9, 5,8 et 7.

Pour les modèles à l'équilibre, sous l'hypothèse que les propriétés membranaires ne soient pas modifiées avec le pH, l'absence de différences de transfert entre les pH 4,9 et 5,8 et 7 indiquerait que plusieurs formes de l'uranium pourraient être prises en charge. Par ailleurs, si seul l'ion uranyle était pris en charge, les courbes de teneurs en uranium dans la racine en fonction de la concentration en ions uranyles dans le milieu aux 3 pH devraient se superposer. Or ce n'est pas le cas (figure 29). Ces résultats semblent être en contradiction avec l'hypothèse du modèle de l'ion libre (FIAM) qui indique que la bioaccumulation et la toxicité d'un métal dépendent de la concentration en ions libres. Ainsi, au pH 4,9, l'ion uranyle est la forme uranium prédominante dans la solution. A ce pH, les facteurs de transfert devraient donc être plus conséquent qu'aux autres pH, si seule la forme libre de l'uranium était absorbée. Au pH 5,8, les ions uranyles ne représentent plus que 10 à 15 % des espèces et moins de 1 % au pH 7. La prise en charge de l'uranium par *Phaseolus vulgaris* semble donc gouvernée par les ions uranyles (UO_2^{2+}) au pH 4,9, les hydroxocomplexes (UO_2OH^+) au pH 5,8 et les complexes hydroxo-carbonatés au pH 7. Des résultats similaires ont également été rapportés par Franklin *et al.* (2000) entre l'uranium et une algue tropicale d'eau douce (*Chlorella sp.*).

Cependant, nos expérimentations ont été conduites en circuit fermé. Tout l'uranyle de la solution est alors pris en charge au niveau de la racine, créant ainsi une déplétion dans le milieu non ré-alimentée puisque le circuit est fermé (se rapprochant plus des conditions environnementales, dans le cas de l'absorption des éléments par la racine). Une autre hypothèse peut donc être avancée, qui consiste à considérer que tout l'ion uranyle serait pris en charge et du fait de cette déplétion dans le milieu, les complexes seraient dissociés pour redonner la forme libre de l'uranium.

Ces observations ont été rapportées dans le cas de l'absorption de Cobalt, en présence de NTA, par une cyanobactérie marine *Prochlorococcus*. Dans cette étude, Pinheiro *et al.* (2004) ont conclu que la déplétion en Co libre dans le milieu était le processus de contrôle de l'absorption et que seule la dissociation du Cobalt complexé contribuait à son absorption.

Il peut également y avoir des micro-variations très locales (au voisinage des racines) des conditions chimiques, telles que des variations de pH par exemple.

Comme nous l'avons vu en § 1.6.3.2.1., l'effet du pH sur l'absorption d'un métal peut être double : la concentration en H^+ peut exercer son effet directement par compétition pour les sites de transport, modification des propriétés membranaires (densité de sites, propriétés des transporteurs) ou indirectement, en affectant la biodisponibilité du pool dissous (Peterson *et al.*, 1984). En effet, l'absorption d'un cation métallique peut entrer en compétition avec les ions H^+ pour les sites de fixation due au comportement général d'acide faible des groupes cellulaires fixant les éléments (Davies, 1978). Ainsi, au pH 4,9, les ions H^+ peuvent entrer en compétition avec les ions uranyles pour les sites de fixation à la surface de la racine. Si Slaveikova *et al.* (2003) ont pu montrer que les ions H^+ affectaient l'adsorption du Pb à la surface des algues en entrant en compétition directement pour les sites de surface, en modifiant la charge à la surface de l'algue et la spéciation chimique du Pb en solution, Tyler et McBride (1982) n'avaient vu, quant à eux, aucun effet sur une plante. Ces derniers avaient testé l'effet de certains paramètres sur l'absorption du cadmium et notamment le pH pour la même espèce de haricot (*Phaseolus vulgaris*). Ils ont ainsi pu montrer que les ions H^+ n'entraient pas en compétition avec Cd^{2+} pour l'absorption et donc que le pH de la solution autour des racines n'avait pas d'effet direct sur l'absorption de Cd.

De ce fait, parce que différentes espèces d'uranium peuvent être absorbées par la plante, parce qu'il peut exister une compétition entre les ions H^+ et les ions uranyles et/ou parce que les complexes peuvent être dissociés suite à la déplétion du métal libre dans la solution, il peut ne pas y avoir de différence dans le transfert de l'uranium pour mon 3 pH.

Ions Ca^{2+}

Concernant le calcium, il n'existe pas, dans nos conditions expérimentales, de compétition antagoniste pour les sites de transport de la membrane entre ce cation et l'uranium.

Les données de la littérature n'indiquent pas de résultats expérimentaux sur l'effet du calcium sur la prise en charge de l'uranium par les racines des plantes supérieures. Les études expérimentales se restreignant à des études sur les algues aquatiques. Ainsi Charles *et al.* (2002) ont mis en évidence un effet antagoniste du calcium avec l'uranium pour la fixation sur les sites de transport à la surface de l'algue *Chlorella sp.*. Des études ont également été menées pour tester cet effet antagoniste entre le calcium et un autre métal : le cadmium. Jarvis *et al.* (1976) ont démontré qu'à court terme (jusqu'à 4 heures) la présence de

Ca^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} dans le milieu diminuait considérablement l'absorption de Cd par les racines de ray-grass. En revanche, d'autres auteurs McLaughlin *et al.*, (1998) et Tyler et McBride (1982) n'ont pas observé cet effet sur les plantes. Les résultats expérimentaux pour un même métal restent donc partagés, les conditions expérimentales et espèces végétales considérées variant d'une étude à l'autre.

◆ *Effet des ligands phosphates et citrate de sodium*

La prise en charge de l'uranium dans la racine ne varie pas significativement en fonction de la concentration en phosphates ou citrate dans le milieu d'exposition, quel que soit le pH, malgré une réduction significative de la concentration en ions uranyles due à la complexation de l'uranium.

Cependant, au pH 5,8, les FT racinaires sont diminués de près de 50 % dès 3 μM de citrate de sodium.

Ces résultats suggèrent donc, que comme dans le cas des hydroxocomplexes ou complexes carbonatés, les complexes uranium – phosphate ou uranium – citrate peuvent être pris en charge ou dissociés suite à la déplétion en ions uranyles du milieu.

Chapitre 4

MICROLOCALISATION DE L'URANIUM ET EFFETS BIOLOGIQUES INDUITS

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Microlocalisation de l'uranium dans les organes du haricot

Nous avons vu précédemment que les données bibliographiques, quant à la localisation cellulaire de l'uranium dans les organes des végétaux, font grandement défaut, les études existantes portant essentiellement sur la quantification du transfert et les moyens de phytoremédiation.

Les plants de *Phaseolus vulgaris* ont été exposés durant 48 heures à 4,5 μM d'uranium appauvri au pH 4,9. Des coupes sur les plants témoins et les plants contaminés ont été effectuées et observées au Microscope Electronique à Transmission (MET), en couplage avec une sonde EDAX. Les résultats de ces observations dans la racine et la tige sont donnés ci-dessous.

4.1.1. Localisation dans la racine

Dans la racine, les coupes ont été réalisées dans les parties âgées (de couleur marron) et les parties jeunes de la racine (parties claires). Les observations

microscopiques ont révélé que l'uranium précipité n'était décelable que dans les coupes réalisées dans les parties jeunes.

Dans ces racines, l'uranium est retrouvé associé à des granules riches en phosphore dans les cellules bordant les vaisseaux de xylème (rapport U/P = 0,6 environ). Ces vaisseaux sont les éléments conducteurs de la sève brute et vont alimenter le reste de la plante en ions et en eau (figure 2). L'uranium a donc non seulement migré de l'épiderme vers le centre de la racine mais a aussi traversé la barrière endodermique. Ces observations restent en accord avec la « cartographie » de l'uranium observée en section 3.2.3., dans laquelle le rôle des jeunes racines apparaît comme majeur dans l'absorption de l'uranium par la plante. L'uranium semble être absorbé au niveau de ces racines puis transféré dans le reste de la plante *via* les vaisseaux de xylème.

Par ailleurs, ces granules ne semblent pas se retrouver dans une structure particulière puisqu'ils sont présents aussi bien dans le cytoplasme que dans la vacuole de ces cellules (figure 44).

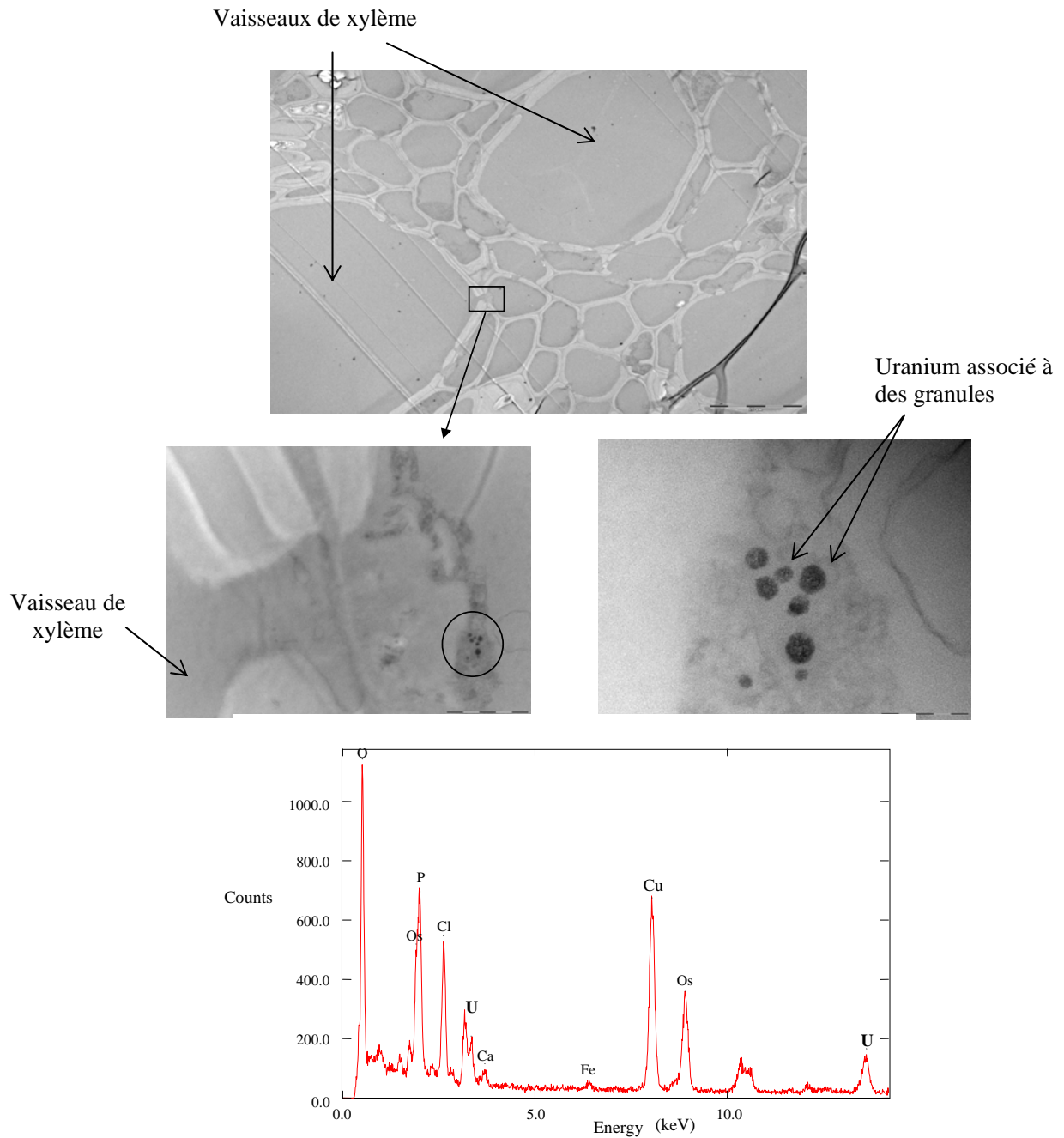


Figure 44. Localisation de l'uranium dans les cellules de la racine (partie jeune) de *Phaseolus vulgaris* (A. vacuole et B. cytoplasme) et diagramme des éléments qui lui sont associés dans ces granules, après contamination au nitrate d'uranyle (4,5 μm ; pH 4,9 ; t = 48h).

4.1.2. Localisation dans les parties aériennes

Les plants de haricots n'ayant été exposés à l'uranium que durant 48 heures, ce n'est que dans la partie basse de la tige qu'il a pu être détecté.

Comme pour la racine, l'uranium est associé à des granules. On le retrouve également dans le cytoplasme (contre la membrane plasmique de la cellule) et dans la vacuole des cellules du cortex (couche de cellules immédiatement en dessous de l'épiderme, figure 45). Les granules denses dans lesquels se localise l'uranium sont, comme dans les racines, riches en phosphore, mais ils sont aussi très riches en chlore. Dans la tige, ces granules sont cependant bien plus riches en ces éléments que dans la racine.

L'uranium n'a pas été décelé ailleurs, impliquant certainement que cette présence n'est pas due à une redistribution à partir des vaisseaux du xylème (car on le retrouverait partout), mais à un cheminement à partir de l'épiderme de la tige, épiderme qui dans sa partie basse trempe dans la solution nutritive contaminée.

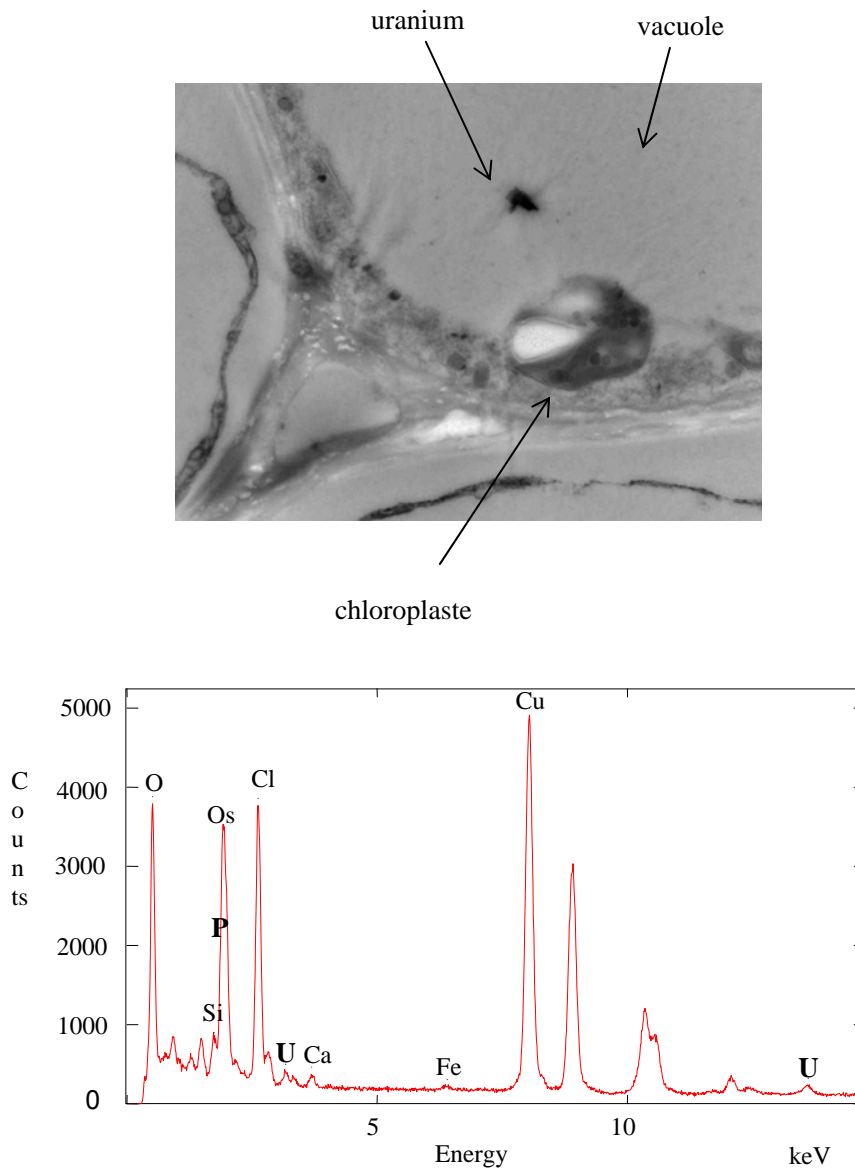


Figure 45. Localisation de l'uranium dans la vacuole des cellules corticales de la tige de *Phaseolus vulgaris* et diagramme des éléments qui lui sont associés dans ces granules, après contamination au nitrate d'uranyle ($[U_T] = 4,5 \mu M$; pH 4,9 ; t = 48h).

4.2. Effets biologiques induits suite à l'exposition à l'uranium

4.2.1. Effet cellulaire

Une première observation des coupes réalisées à partir de tiges de plantes exposées comme précédemment, indique que les chloroplastes des haricots sont modifiés suite à la contamination par l'uranium. En effet, dans les cellules

corticales de la tige, ces derniers contiennent un gros grain amidon et de nombreux plastoglobules (figure 46). De tels chloroplastes sont très nombreux dans les cellules de la moelle. En revanche dans les plants témoins, ces chloroplastes présentent un petit grain d'amidon et quelques « plastoglobules » (figure 47).

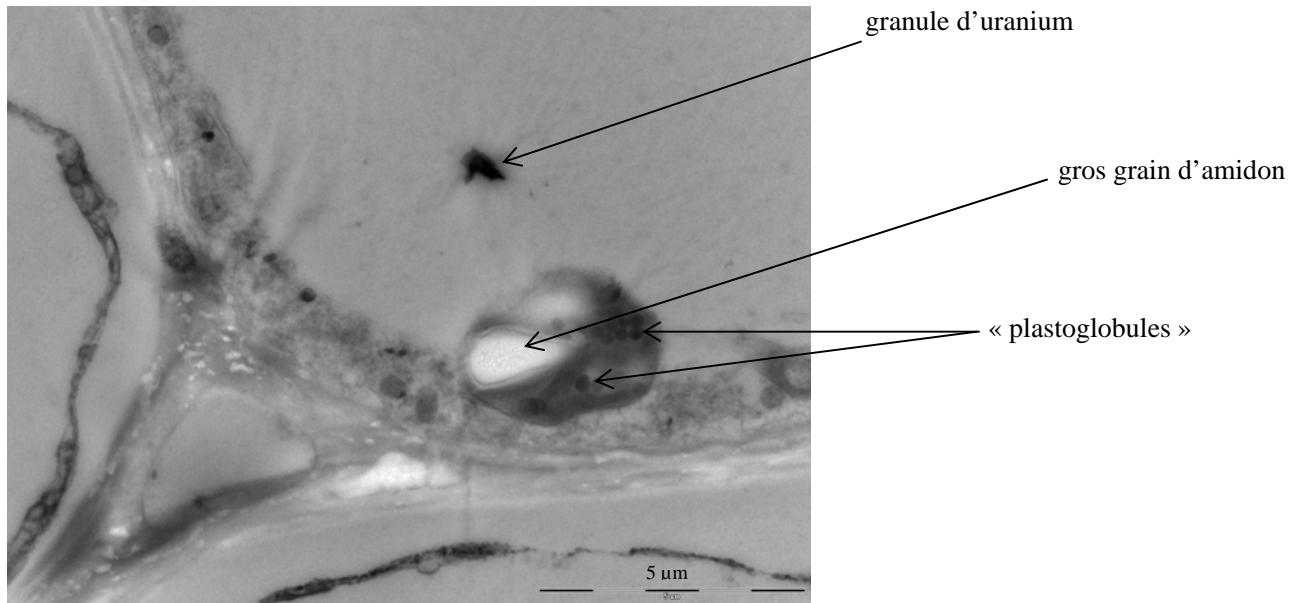


Figure 46. Chloroplastes des cellules corticales de la tige chez les plantes exposées à l'uranium (48h ; pH 4,9 ; 4,5 µM d'uranium).

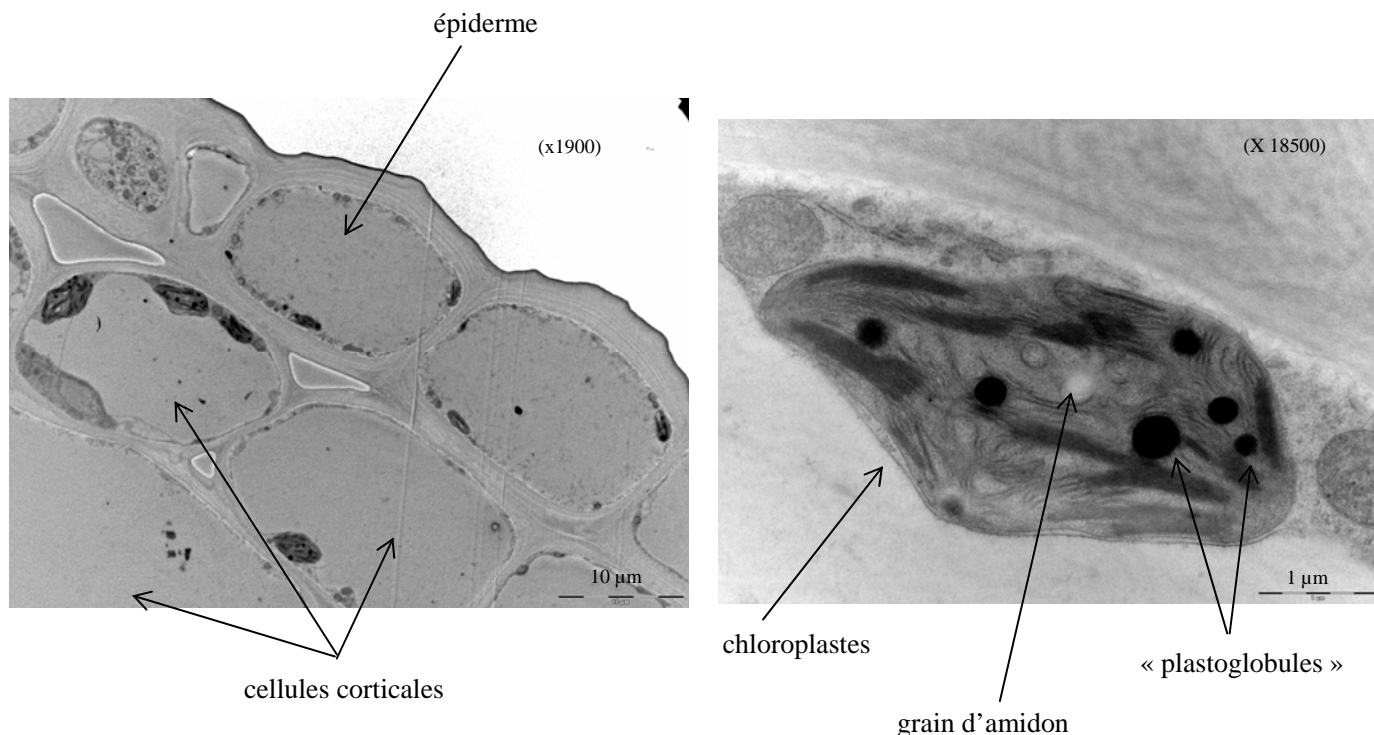


Figure 47. Chloroplastes des cellules corticales de la tige chez les plantes témoins non exposées à l'uranium (48h ; pH 4,9).

La concentration en carbohydrates, tout comme le taux de croissance, sont les 2 déterminants majeurs du taux de respiration des plantes.

La présence d'uranium dans le milieu de culture semble donc influencer la physiologie de la plante au niveau des organites de la photosynthèse.

Ces résultats sont similaires à ceux observés pour un excès de nickel complexé sur des plants de chou (*Brassica oleracea* L.). Ainsi sous l'influence du nickel sous une forme complexée avec l'EDTA (Ni(II)-EDTA) dans la solution d'exposition, une accumulation d'amidon est observée dans les chloroplastes, pouvant indiquer aussi bien une augmentation de l'activité photosynthétique qu'une inhibition du transport des carbohydrates des feuilles aux racines (Molas, 2002).

L'accumulation d'amidon dans les chloroplastes pourrait être le résultat d'une inhibition du transport de carbohydrates parce qu'il est accompagné de nombreux et gros « plastoglobules ». Il est connu que le contenu et le nombre des plastoglobules augmente en condition de stress, incluant le stress causé par la présence de nickel (Molas, 1997, Kukkola et Huttunen, 1998) et pendant la sénescence (Chonan *et al.*, 1977).

Les perturbations et inhibitions du transport de carbohydrates du lieu de la photosynthèse (i.e. des feuilles) aux organes non photosynthétiques, qui résultent en une accumulation d'amidon, entre autres, est également observée sous l'influence de Ni sous forme inorganique dans le maïs ; le haricot (Samarakoon, 1979) et les haricots blancs (Rauser, 1978).

4.2.2. Influence de l'uranium sur la Capacité d'Echange Cationique Racinaire (CECR)

Cette expérience a été menée de manière à appréhender les éventuelles modifications de la CECR des plants de *Phaseolus vulgaris* engendrées par une contamination à l'uranium.

Nous savons que la CECR représente de façon générale le nombre de sites d'échange de cations (anions fixés, groupements carboxyliques R-COO⁻) situés dans les parois des cellules de la racine. Lorsque la CEC des tissus augmente, la capacité d'échange et d'adsorption des cations augmente (Marschner, 1995).

Pour se faire, les contaminations ont été réalisées durant 3 jours (concentration en uranium de 300 nM, temps d'exposition de 3 jours). La CECR des parties jeunes (racines latérales de couleur blanc/ crème) et anciennes (axe principal de couleur marron) de la racine a été déterminée sur des plants contaminés et témoins, au stade floraison et plantule, aux 3 pH d'exposition. Les résultats des CECR mesurées sont reportés dans le tableau 24.

Au stade floraison, aux pH 5,8 et 7, les valeurs de CECR des plants témoins restent du même ordre de grandeur : de l'ordre de 25 cmol_c/kg pour les parties jeunes des racines et de 15 cmol_c/kg pour les parties plus âgées. Tandis qu'au pH 4,9, ces valeurs sont bien supérieures avec 49,7 cmol_c/kg et 25,6 cmol_c/kg respectivement pour les parties jeunes et âgées des racines. Au stade plantule, c'est aux pH 5,8 et 7 que la CECR est plus forte : 95,2 cmol_c/kg et 58,5 cmol_c/kg respectivement pour les plants témoins et 30,4 cmol_c/kg et 39,3 cmol_c/kg pour les plants contaminés ; contre 34,2 cmol_c/kg et 20 cmol_c/kg au pH 4,9 pour les parties jeunes des racines.

Pour ces 2 stades, il apparaît bien un changement de la CECR en fonction de l'âge de la racine avec une diminution de celle-ci accompagnant le vieillissement de la racine (CECR des parties âgées de la racine plus faible que celle des parties jeunes dans tous les cas).

Par ailleurs la présence d'uranium dans le milieu d'exposition influence également cette CECR puisque celle-ci diminue, suite à la contamination, d'une dizaine de cmol_e/kg au stade floraison, voire plus au stade plantule. Cette réduction de la CECR pourrait être le résultat d'un changement de « l'âge moyen » du système racinaire. En effet, les substances toxiques inhibent la croissance racinaire et, de ce fait, augmente l'âge moyen des racines (Dufey *et al.*, 2001).

Tableau 24. Comparaison des CECR (cmol_e/kg) des parties jeunes et âgées de racines de plants de *Phaseolus vulgaris*, aux stades plantule et floraison, soumis ou non à une contamination à l'uranium à 3 pH.

		CECR (cmol_e/kg)					
		Stade floraison			Stade plantule		
		pH 4,9	pH 5,8	pH 7	pH 4,9	pH 5,8	pH 7
Témoins	racine						
	Jeune	49,7 ($\pm 0,47$)	25,2 ($\pm 0,49$)	24,0 ($\pm 0,35$)	34,2 ($\pm 8,6$)	95,2 ($\pm 27,7$)	58,5 ($\pm 21,5$)
	Agée	25,6 ($\pm 10,6$)	15,4 ($\pm 6,8$)	15,0 ($\pm 6,2$)	25,2 ($\pm 1,3$)	30,5 ($\pm 22,2$)	39,7 ($\pm 5,0$)
Contaminés	Jeune	15 ($\pm 1,2$)	10,7 ($\pm 0,27$)	15,9 ($\pm 1,5$)	20,0 ($\pm 6,3$)	30,4 ($\pm 7,1$)	39,3 ($\pm 12,4$)
	Agée	6,5 ($\pm 2,2$)	6,1 ($\pm 0,16$)	9,0 ($\pm 0,82$)	8,3 ($\pm 4,8$)	12,7 ($\pm 1,7$)	12,4 ($\pm 4,7$)

L'étude de l'influence de la teneur en uranium dans le milieu d'exposition sur l'élongation racinaire de graines germées va nous permettre de confirmer ou non cette potentielle inhibition de croissance racinaire engendrée par la présence de substances toxiques. C'est ce que nous allons voir dans la prochaine section.

4.2.3. Influence de l'uranium sur l'élongation racinaire

4.2.3.1. Elongation racinaire

Les données bibliographiques ont montré que l'élongation racinaire, après germination des graines, était une phase sensible aux stress environnementaux. Les graines de *P. vulgaris* ont été germées sur papier filtre imbibé de solution nutritive non contaminée durant 5 jours, à l'obscurité et à 24°C. Après 5 jours, les 3 plus longues racines latérales de chacune des graines, qui seront contaminées, ont été mesurées (L_{initiale}), puis 5 de ces graines ont été transférées dans des bacs contenant 3 litres de solution nutritive contaminée au nitrate d'uranyle dont le pH est maîtrisé aux pH 4,9, 5,8 ou 7. Des graines témoins, germées dans les mêmes conditions, subissent le même protocole mais sont placées dans une solution nutritive non contaminée ($L_{\text{témoin}}$).

Les 3 plus longues racines (déterminées et mesurées au temps initial) sont à nouveau mesurées au terme de 24h, 48h et 72h d'exposition à l'uranium ($L_{\text{métal}}$), pour une gamme de concentrations en uranium s'étendant de 0 à 21 μM au pH 4,9, jusqu'à environ 7 μM au pH 5,8 et enfin 3,6 μM au pH 7.

L'élongation racinaire est alors calculée comme suit :

$$\% \text{ élongation} = (L_{\text{métal}} - L_{\text{initiale}} / L_{\text{témoin}} - L_{\text{initiale}}) * 100$$

Résultats aux pH 4,9 et 5,8

La mesure de l'élongation racinaire après exposition des graines à des concentrations croissantes en uranium a révélé que pour de faibles concentrations en uranium, aux pH 4,9 et 5,8, il y avait une stimulation de la production de biomasse racinaire par rapport aux témoins non contaminés. Passées ces faibles concentrations, on observe une inhibition rapide de la croissance racinaire. L'élongation racinaire ne sera en effet que de 20 % environ après 72 h, par rapport aux témoins pour 15,4 μM d'uranium au pH 4,9 et entre 2,6 et 6,9 μM au pH 5,8. Nous pouvons d'ailleurs remarquer que l'inhibition de l'élongation racinaire est plus rapide au pH 5,8 qu'au pH 4,9 (tableau 25).

Cette concentration en uranium stimulante pour la croissance augmente avec l'augmentation de pH. La stimulation de croissance est par ailleurs beaucoup plus forte au pH 4,9 qu'au pH 5,8 : jusqu'à 720 % après 72 h pour 87 nM d'uranium contre 113 % après 72 h à 374 nM d'uranium (correspondant d'ailleurs à des

teneurs en ions uranyle relativement proche) (tableau 25, planche 1). Il semble donc exister une relation dose-réponse dans laquelle intervient un facteur temporel qui va différer en fonction du pH, car si au pH 4,9, la stimulation racinaire augmente au cours du temps, aux pH 5,8 et 7, celle-ci tend à diminuer (figures 48 et 49). L'inhibition de l'élongation, quant à elle, tend dans tous les cas à augmenter au cours du temps.

pH 7

Au pH 7, l'élongation racinaire est affectée différemment par rapport aux 2 autres pH. En effet, la stimulation de croissance racinaire est observée pour de fortes teneurs en uranium de l'ordre de 2 μM , avec une stimulation semblable à celle observée au pH 5,8, soit une concentration en uranium 20 fois et 5 fois supérieure à celles nécessaires aux pH 4,9 et 5,8 respectivement (tableau 25 et figure 48). L'inhibition reste donc moins conséquente qu'aux pH 4,9 et 5,8.

Cette stimulation ne semble pas liée à la teneur en ion libre dans le milieu puisque pour 2 μM d'uranium, au pH 7, la teneur en ions uranyles n'est que de 0,68 nM soit 100 fois moins que la teneur pour laquelle il y a une stimulation aux pH 4,9 et 5,8 (tableau 25).

Les calculs de spéciation (tableau 25) nous indiquent qu'aux pH 4,9 et 5,8, les teneurs en ions uranyles dans le milieu sont relativement proches (60 et 76 nM respectivement) impliquant une éventuelle réaction de la plante face à la toxicité de l'ion uranyle. Toxicité induisant une stimulation de la plante pour compenser. Compensation qui ne devient plus efficace lorsque cette teneur en métal libre augmente de façon trop conséquente. A ces mêmes pH, la forme hydroxylée de l'uranium UO_2OH^+ est aussi une espèce bien présente, avec tout de même une teneur 10 fois plus élevée au pH 5,8 qu'au pH 4,9 (169 nM et 16,8 nM respectivement). Au pH 5,8, le complexe hydroxylé neutre $\text{UO}_2(\text{OH})_{2\text{aq}}$ apparaît aussi en bonne quantité, tout comme le complexe carbonaté neutre. Ces 2 formes étant 100 fois plus faibles au pH 4,9 indiquant que leur rôle doit être faible et que peut être, à ces 2 pH, la plante réagirait à la teneur en ions libres.

En revanche, au pH 7, la concentration en ions libres est 100 fois plus faible (0,68 nM) comparativement aux concentrations en ions libres relevées lors des stimulations de croissance aux pH 4,9 et 5,8. Si ce sont des formes particulières de l'uranium en solution qui entraînent cette stimulation, à ce pH, elle ne peut être expliquée par la concentration en ions libres. A ce pH, ce sont les complexes

neutres hydroxylés et carbonatés (cités précédemment) qui sont dominants avec une concentration de 91,3 nM et 53,6 nM respectivement. A noter que la concentration en ions UO_2OH^+ à ce pH (24,04 nM) est du même ordre de grandeur que celle du pH 4,9 (16,8 nM), pour la concentration en uranium total de stimulation. Cependant, les équilibres peuvent être déplacés et les complexes dissociés du fait de l'absorption racinaire de tout l'ion uranyle.

Il reste difficile de pouvoir confirmer réellement si ce comportement de la plante peut être du à une réponse biologique face à une forme spécifique de l'uranium en solution et à une certaine concentration, en fonction du pH.

Tableau 25. Pourcentage d'élongation racinaire ($(L_{\text{m\u00e9tal}} - L_{\text{initiale}} / L_{\text{t\u00e9moin}} - L_{\text{initiale}}) * 100$) des graines germ\u00e9es de *P. vulgaris* en pr\u00e9sence de concentrations croissantes en uranium dans le milieu, en fonction du pH (n = 5 graines).

		% \u00e9longation racinaire, pH 4,9									
concentration en uranium dans le milieu	[U _T] (\u00b5M)	0	0,054	0,087	0,201	0,717	5,94	15,4	19,9	21,3	
	[UO ₂ ²⁺] (nM)	0	37,3	60,1	139	492	3850	8900	10900	11500	
% \u00e9longation racinaire	24 h	100	233 (\u00b1 11,3)	571 (\u00b1 62,1)	197 (\u00b1 17,5)	54 (\u00b1 19,6)	115 (\u00b1 10,0)	36 (\u00b1 1,7)	13 (\u00b1 2,6)	19 (\u00b1 2,3)	
	48 h	100	251 (\u00b1 11,3)	550 (\u00b1 62,1)	249 (\u00b1 40,5)	72 (\u00b1 19,2)	77 (\u00b1 9,2)	20 (\u00b1 2,3)	12 (\u00b1 2,6)	12 (\u00b1 2,9)	
	72 h	100	245 (\u00b1 6,0)	723 (\u00b1 64,2)	290 (\u00b1 18,0)	61 (\u00b1 28,1)	57 (\u00b1 10,1)	24 (\u00b1 2,1)	11 (\u00b1 2,5)	11 (\u00b1 2,4)	
		% \u00e9longation racinaire, pH 5,8									
concentration en uranium dans le milieu	[U _T] (\u00b5M)	0	0,024	0,374	0,565	1,17	1,56	2,61	4,19	5,11	6,90
	[UO ₂ ²⁺] (nM)	0	5,6	76,2	107	180	215	287	363	398	454
% \u00e9longation racinaire	24 h	100	144 (\u00b1 23,0)	225 (\u00b1 7,9)	133 (\u00b1 15,4)	66 (\u00b1 0,19)	39 (\u00b1 12,5)	37 (\u00b1 0,11)	50 (\u00b1 0,07)	43 (\u00b1 0,09)	51 (\u00b1 0,10)
	48 h	100	117 (\u00b1 44,0)	156 (\u00b1 19,3)	88 (\u00b1 23,9)	42 (\u00b1 0,25)	28 (\u00b1 15,3)	20 (\u00b1 0,15)	25 (\u00b1 0,11)	24 (\u00b1 0,11)	24 (\u00b1 0,10)
	72 h	100	72 (\u00b1 64,0)	113 (\u00b1 34,1)	70 (\u00b1 42,7)	34 (\u00b1 0,32)	42 (\u00b1 17,5)	21 (\u00b1 0,32)	25 (\u00b1 0,07)	22 (\u00b1 0,13)	22 (\u00b1 0,09)
		% \u00e9longation racinaire, pH 7									
concentration en uranium dans le milieu	[U _T] (\u00b5M)	0	0,048	0,120	0,264	0,511	1,39	2,06	2,33	3,59	
	[UO ₂ ²⁺] (nM)	0	0,077	0,14	0,22	0,32	0,55	0,68	0,73	0,91	
% \u00e9longation racinaire	24 h	100	95 (\u00b1 17,7)	95 (\u00b1 18,9)	63 (\u00b1 11,2)	69 (\u00b1 6,8)	59 (\u00b1 6,7)	209 (\u00b1 12,0)	192 (\u00b1 9,2)	77 (\u00b1 12,0)	
	48 h	100	110 (\u00b1 42,8)	87 (\u00b1 25,4)	68 (\u00b1 15,1)	47 (\u00b1 10,6)	50 (\u00b1 10,6)	149 (\u00b1 13,0)	132 (\u00b1 11,2)	61 (\u00b1 13,0)	
	72 h	100	109 (\u00b1 54,8)	104 (\u00b1 32,1)	72 (\u00b1 37,6)	33 (\u00b1 6,9)	49 (\u00b1 6,9)	118 (\u00b1 14,0)	96 (\u00b1 13,5)	65 (\u00b1 14,0)	

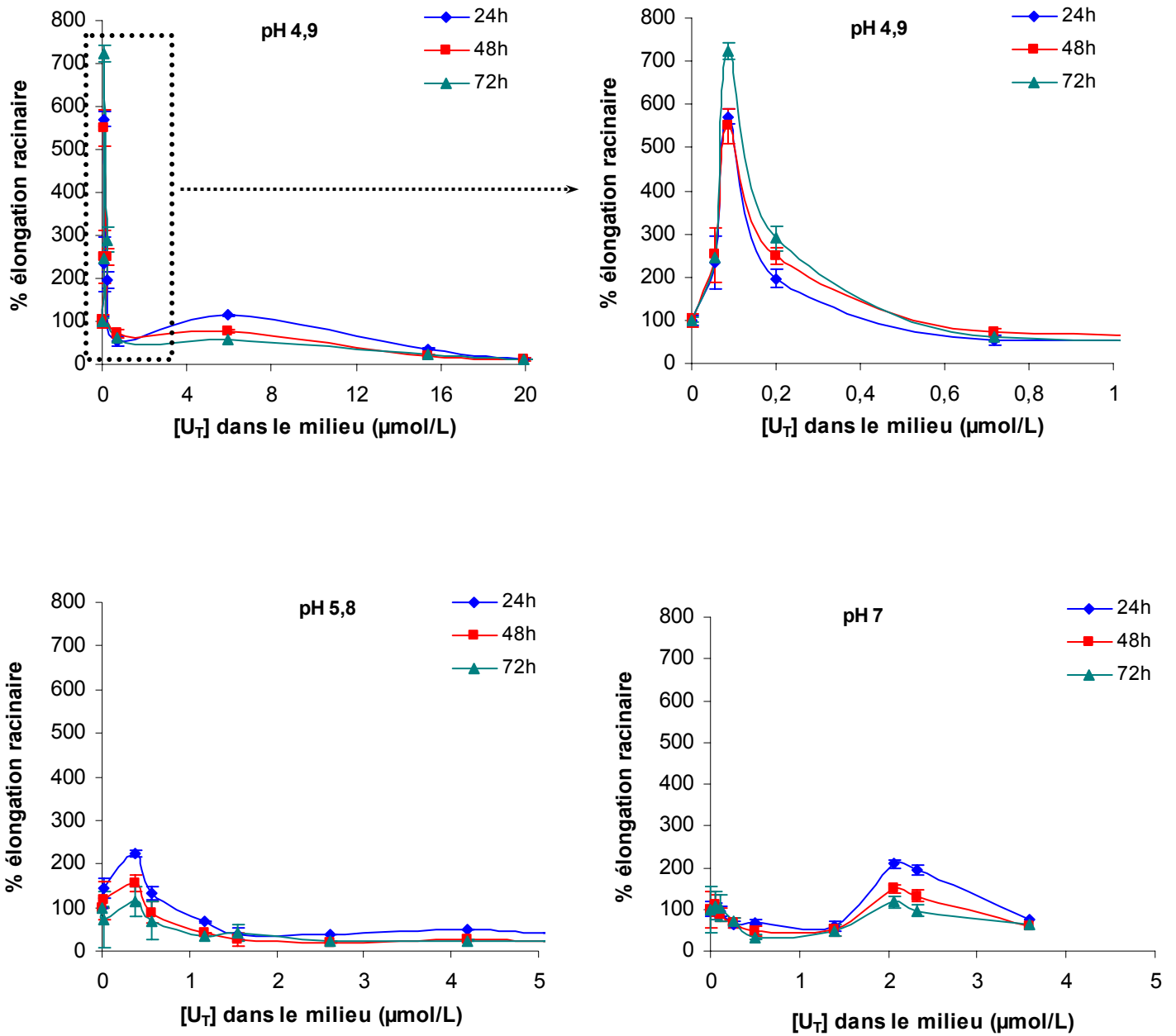
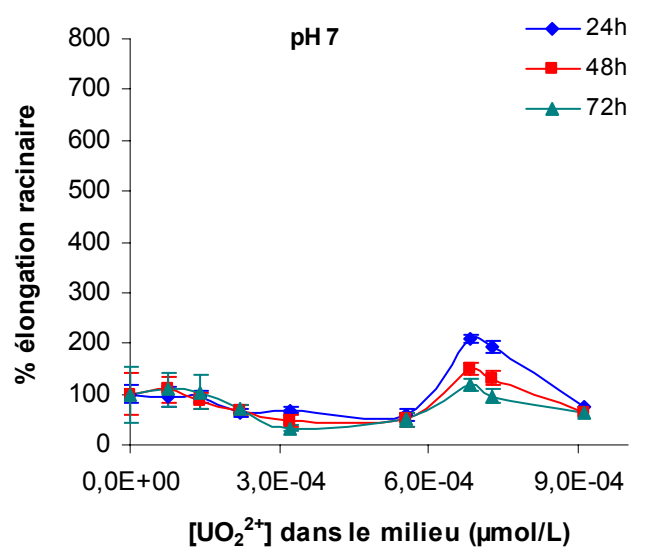
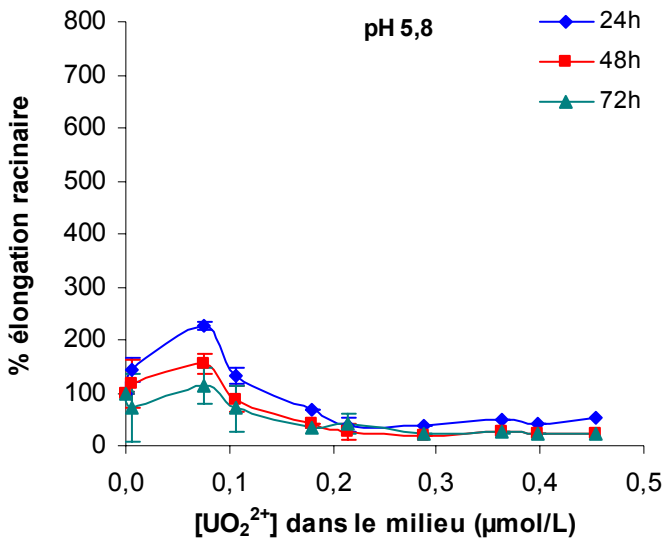
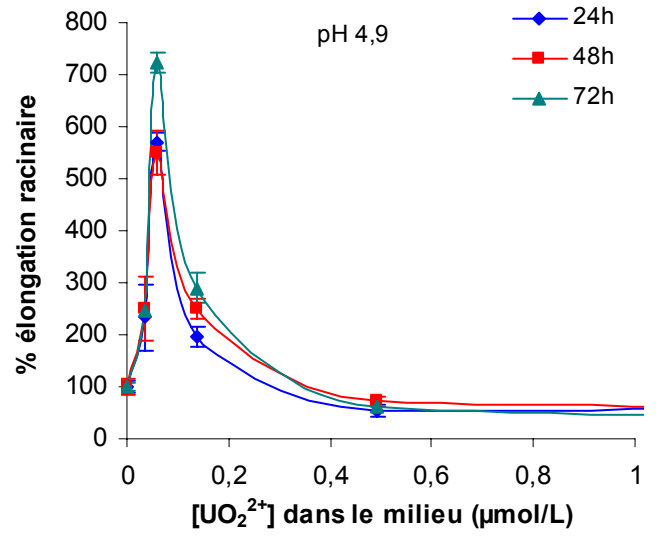
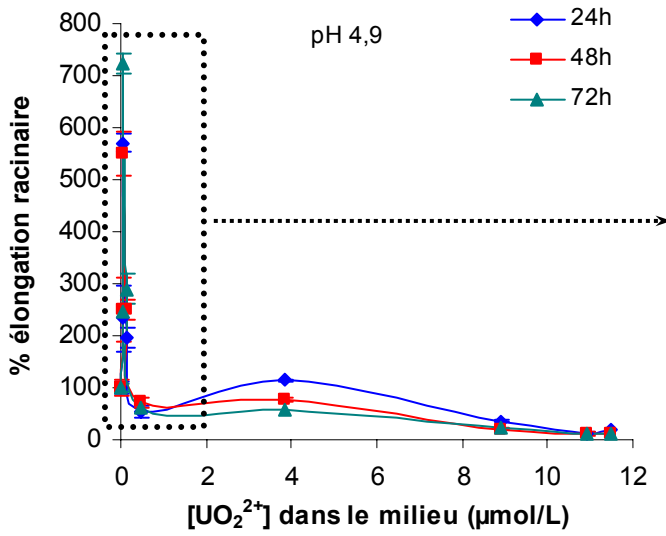


Figure 48. Influence de la présence d'uranium dans le milieu d'exposition sur l'élongation racinaire des graines germées de *P. vulgaris*, en fonction du temps d'exposition et du pH du milieu.



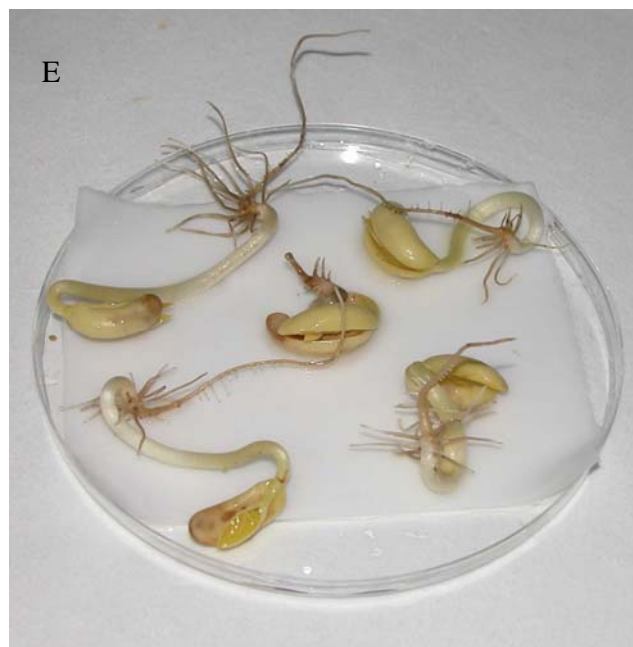
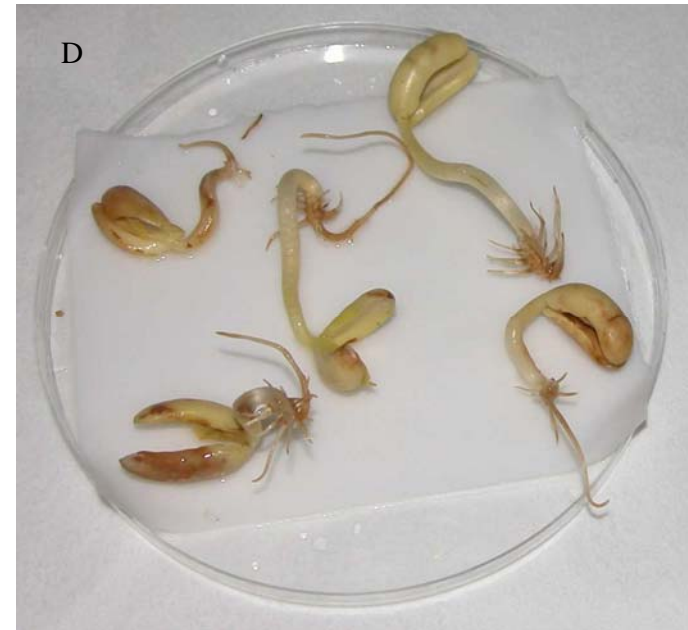
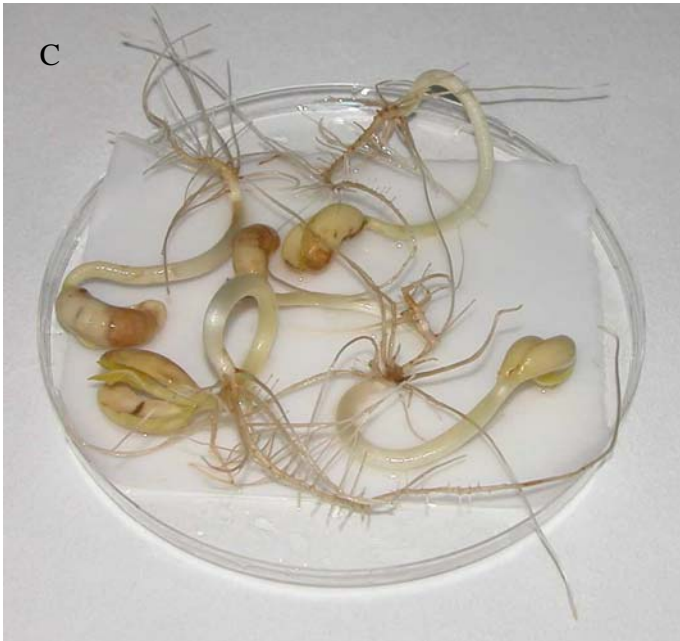
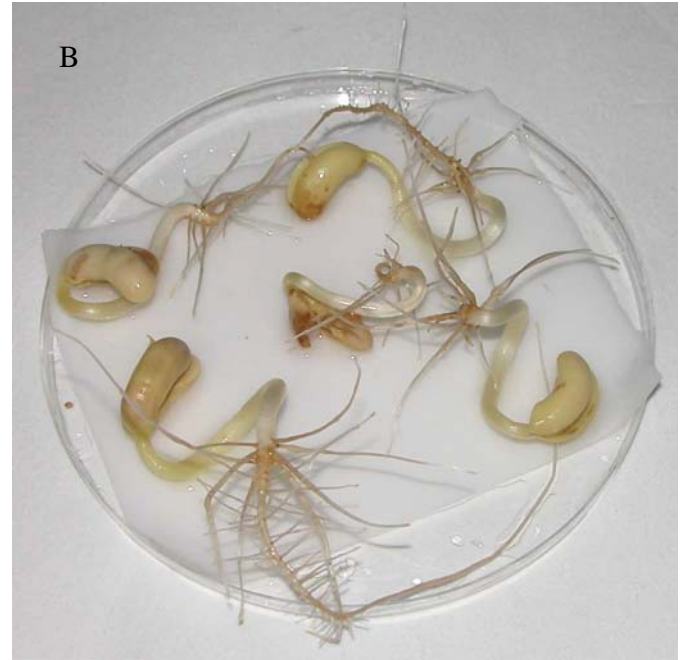


Planche 1. Photographies de l'évolution de l'élongation de graines de *P. vulgaris* germées, depuis 5 jours, soumises à une contamination de 87 nM d'uranium (plus fort % d'élongation racinaire) au pH 4,9, durant 24h (A), 48h (B) et 72h (C). En comparaison, est présentée au pH 4,9 l'élongation racinaire après 48h d'exposition à 5,9 μ M d'uranium (D) et les témoins après 48h (E).

4.2.3.2. Détermination de la CE₅₀

La toxicité est souvent exprimée en concentration effective (CE_x) pour laquelle on observe x % d'effet. Classiquement, c'est la CE₅₀ qui est calculée. Elle représente la concentration effective pour laquelle on observe 50 % de l'effet. Dans le cas de cette étude, elle représente la concentration effective pour laquelle on observe 50 % d'inhibition de l'élongation racinaire.

Les CE₅₀ ont été déterminées à l'aide de la macro REGTOX utilisant entre autres le modèle de Hill (modèle dose-réponse monotone) ou GENTOX. Dans le cas où l'on observe une induction linéaire puis un effet toxique, le modèle GENTOX peut être utilisé. D'après nos résultats d'élongation racinaire, cette induction est présente, cependant il n'est pas possible d'obtenir la convergence du modèle à partir de ces jeux de valeurs. Le modèle de Hill, qui ne prend pas en compte l'effet de stimulation, a été utilisé sur la partie monotone de la courbe (retrait des faibles concentrations en uranium aux pH 4,9 et 5,8). Les valeurs ainsi calculées sont reportées dans le tableau 26 et la figure 50, en fonction du pH d'étude et du temps d'exposition à l'uranium.

La toxicité de l'uranium augmente au cours du temps d'exposition puisque la concentration effective inhibant 50 % de l'élongation racinaire diminue avec le temps. L'effet est particulièrement marqué au pH 4,9 tandis qu'au pH 5,8 c'est entre 24h et 48h que la toxicité est la plus importante. Au pH 4,9, la toxicité diminue d'un facteur 5 entre 24h et 48h d'exposition contre un facteur 3 au pH 5,8.

Cette toxicité est également affectée par le pH du milieu et donc la spéciation de l'uranium. Elle sera plus forte au pH 5,8 qu'au pH 4,9. La plus faible toxicité pour ce stade de développement précoce étant observée au pH 4,9, pH où la forme uranyle prédomine. La CE₅₀ à 72h varie ainsi de 0,95 µmolU/L au pH 5,8 à 2,5 µmol/L au pH 4,9.

Tableau 26. CE₅₀ (et CE₂₅ pour information), en μM , calculée par le modèle de Hill en fonction du temps de contamination et du pH du milieu d'exposition.

	pH 4,9		pH 5,8	
	CE ₅₀ (μM)	CE ₂₅ (μM)	CE ₅₀ (μM)	CE ₂₅ (μM)
24h	14,1	11,35	3,3	1,08
48h	9,3	6,08	1,18	0,46
72h	2,52	0,46	0,95	0,27

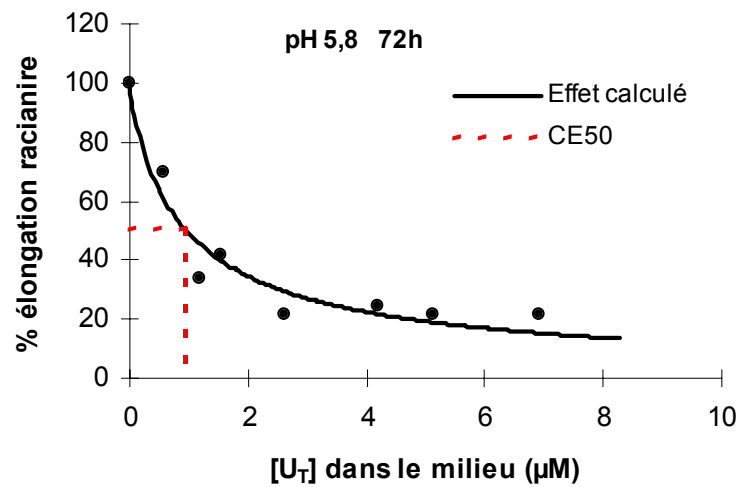
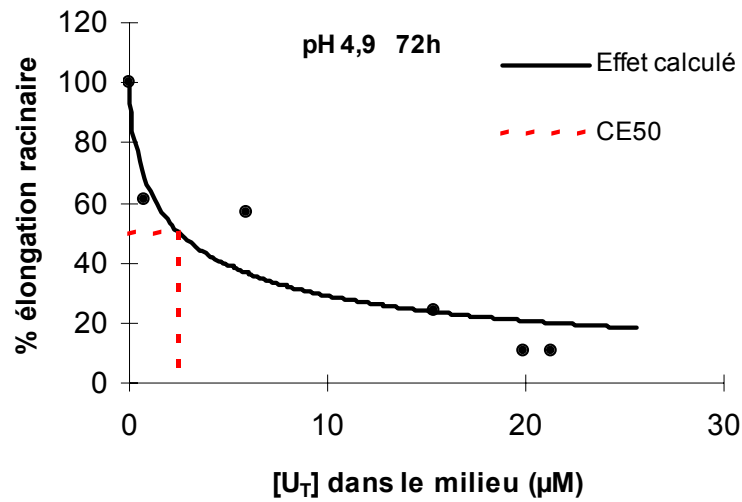


Figure 50. Détermination de la CE₅₀ à l'aide de la macro REGTOX et utilisation du modèle de Hill aux pH 4,9, 5,8 (exploitation de la partie monotone de la courbe).

4.3. Résumé des principaux résultats et discussion

♣ Localisation de l'uranium dans les organes

Aucune structure histologique particulière accumulant l'uranium dans les organes de *Phaseolus vulgaris* n'a été mise en évidence. Dans la racine et la tige, l'uranium est retrouvé associé à des granules riches en phosphore tant dans le cytoplasme que dans la vacuole de certaines cellules.

Une étude de Günther *et al.* (2002), (plants de lupins contaminés à des concentrations allant de $1,0 \cdot 10^{-4}$ M (pH 3-8) à $2,5 \cdot 10^{-2}$ M (pH 3-4) et analyse en spectroscopie à fluorescence et à absorption aux rayons X), indique que l'uranium dans les plantes est principalement lié à des groupes phosphatés, ce qui pourrait être le cas dans ces granules.

La présence de l'uranium, chez *Phaseolus vulgaris*, dans des granules riches en phosphore est une observation déjà reportée pour ce même végétal avec un autre métal : le zinc. Dans cette expérience, *P. vulgaris* a été exposé à 50 μ M de Zn durant 72h. Les observations au MET des feuilles, avec microanalyse des composants de précipités (sonde EDX), ont révélé la présence de granules (petites particules < 1 μ m) dans le cytoplasme et dans certains chloroplastes (figure 51). Ces granules sont riches en Zn et P, contiennent peu de calcium et présentent une absence de potassium. Par ailleurs, le ratio Zn / P reste relativement constant ($0,5 \pm 0,1$) et du même ordre de grandeur que les valeurs reportées dans la littérature pour d'autres espèces de plantes (ou de la valeur du ratio U/P de notre expérience, qui est de 0,6 environ). Les témoins, quant à eux, ne présentaient pas ces granules. Ces résultats suggèrent que le zinc est accumulé dans les feuilles de *P. vulgaris* sous forme de composés phosphatés, dont il n'est pas possible là de conclure quant à la nature du ligand contenant ce phosphore. Des analyses réalisées en EXAFS ont permis à ces auteurs de suggérer que le Zn était lié à des groupements phosphates inorganiques plutôt qu'à des groupement organiques (e.g. phytate). Enfin ces auteurs ont pu conclure de cette étude que les mécanismes d'accumulation des métaux dans le végétal *Phaseolus vulgaris* dépendaient de la nature du métal considéré (Sarret *et al.*, 2001).

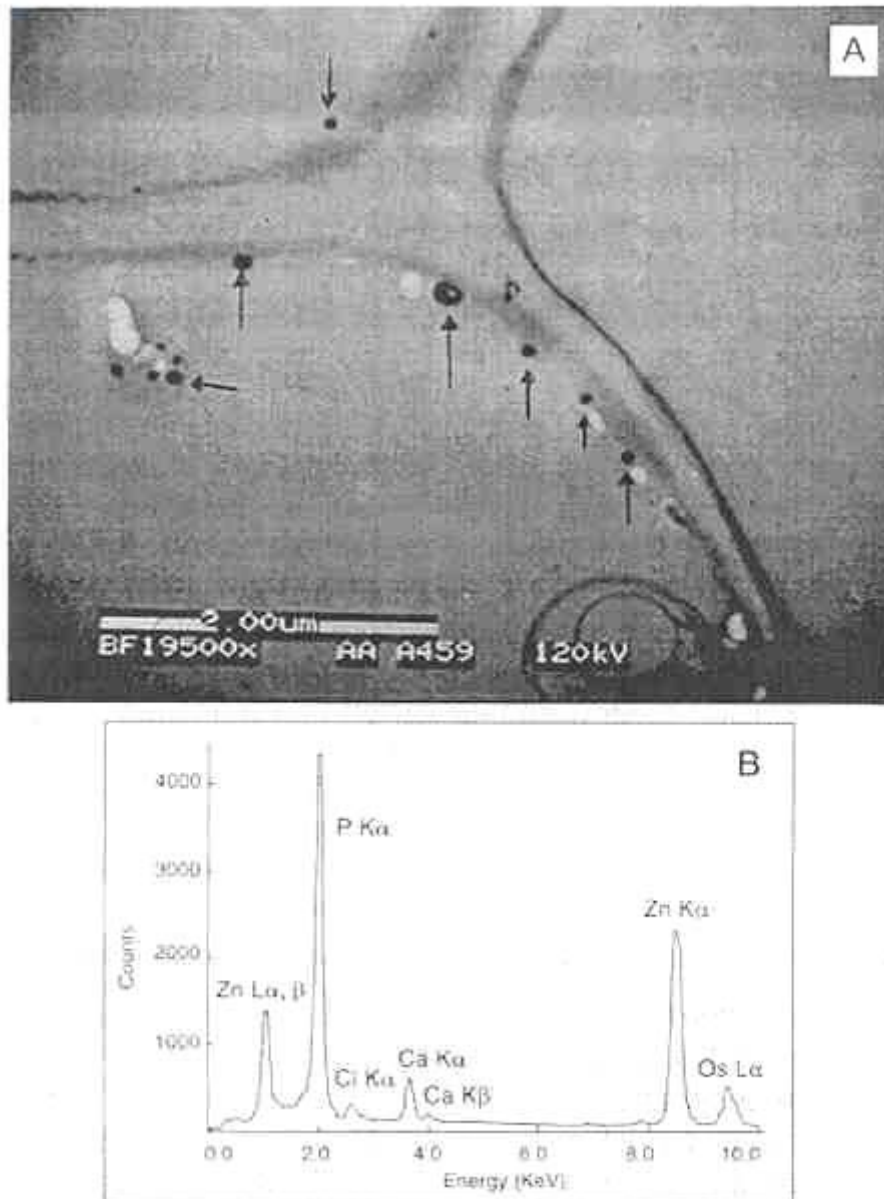


Figure 51. A. Photographie de cellules de feuilles de *P. vulgaris*, exposés à une solution de sulfate de zinc, montrant les granules denses d'environ 1 µm de diamètre près de la membrane et dans les chloroplastes (observations au MET). B. Spectre des éléments contenus dans ces granules denses (d'après Sarret *et al.*, 2001).

♣ Effets biologiques induits par l'uranium

Nous avons pu constater, suite aux observations microscopiques, que les chloroplastes des plants contaminés étaient modifiés : présence d'un gros grain d'amidon et de nombreux plastoglobules probablement due à une inhibition du transport des carbohydrates. Ces effets ont d'ailleurs été observés suite à une contamination par d'autres métaux comme le Nickel (Molas, 2002).

La contamination à l'uranium induit également des modifications au sein de la paroi des racines, notamment en modifiant sa CEC. Suite à cette contamination, la CEC des racines diminue du fait d'une probable augmentation de l'âge moyen des racines. Par ailleurs, nous avons également pu constater que la CECR des jeunes racines était supérieure à celle des racines plus âgées, induisant une augmentation de leur capacité à absorber les cations. Ces résultats sont en concordance avec les observations faites au chapitre 3, dans lesquelles nous avons mis en évidence que les jeunes racines étaient les parties les plus actives dans l'absorption de l'uranium.

♣ Effets de l'uranium sur l'élongation racinaire

Comme l'avaient déjà montré certains auteurs dans le cas de l'uranium ou d'autres métaux tels que le Cd (§ 1.7.1.), il existe, pour de faibles concentrations en uranium aux pH 4,9 et 5,8 (environ 100 nM et 400 nM respectivement), une stimulation de la croissance racinaire. Concentrations au delà desquelles l'uranium devient toxique et inhibe l'élongation racinaire. En revanche, au pH 7, c'est à plus forte concentration, autour de 2 μ M, que l'on observe cette stimulation de croissance (figure 52).

De nombreuses études ont révélé que des substances toxiques, présentes dans le milieu à faibles doses, pouvaient induire un ensemble de réponses de stimulation de croissance. La majorité de ces réponses présentent des similarités et plus spécifiquement, la stimulation varie dans un domaine d'augmentation de la croissance de 40-60 % par rapport aux témoins (Calabrese, 1999). Le concept d'hormesis est un phénomène biologique, induit par des agents potentiellement toxiques, caractérisé par une relation dose-réponse entraînant une stimulation aux faibles doses et une inhibition aux fortes doses (Calabrese et Baldwin, 2002 ; Stebbing, 1982). Lorsque des réponses hormétiques sont constatées, il existe

souvent une réponse initiale d'inhibition, suivie d'une réponse de compensation. La réponse de compensation peut éventuellement excéder les performances des témoins, résultant donc dans une stimulation nette communément appelé « effet hormétique ». A fortes doses, les réponses de compensation seraient similaires mais insuffisantes pour compenser les réponses initiales d'inhibition (Calabrese, 1999).

Des observations similaires ont été obtenues par Costa et Morel (1994), travaillant sur la laitue et le cadmium. Ils observaient que pour des concentrations de 0,01 et 0,1 μM de Cd dans le milieu, la production de biomasse augmentait alors qu'à 100 μM , le Cd était toxique aussi bien pour la croissance de la racine que pour les parties aériennes. Les explications avancées pour de telles observations étaient qu'à 100 μM de Cd, le statut en eau et les échanges gazeux de la plante étaient largement diminués, puisque cette teneur en Cd semblerait entraîner la fermeture des stomates alors que les faibles concentrations en Cd semblaient augmenter la conductance stomatique, sans toutefois modifier significativement la photosynthèse nette. Par ailleurs, les niveaux totaux en acides aminés et l'incorporation de ^{14}C dans les acides aminés augmentaient aux faibles concentrations en Cd, tandis qu'à plus forte concentration (dès 10 μM), elles diminuaient, suggérant une diminution du métabolisme de la plante.

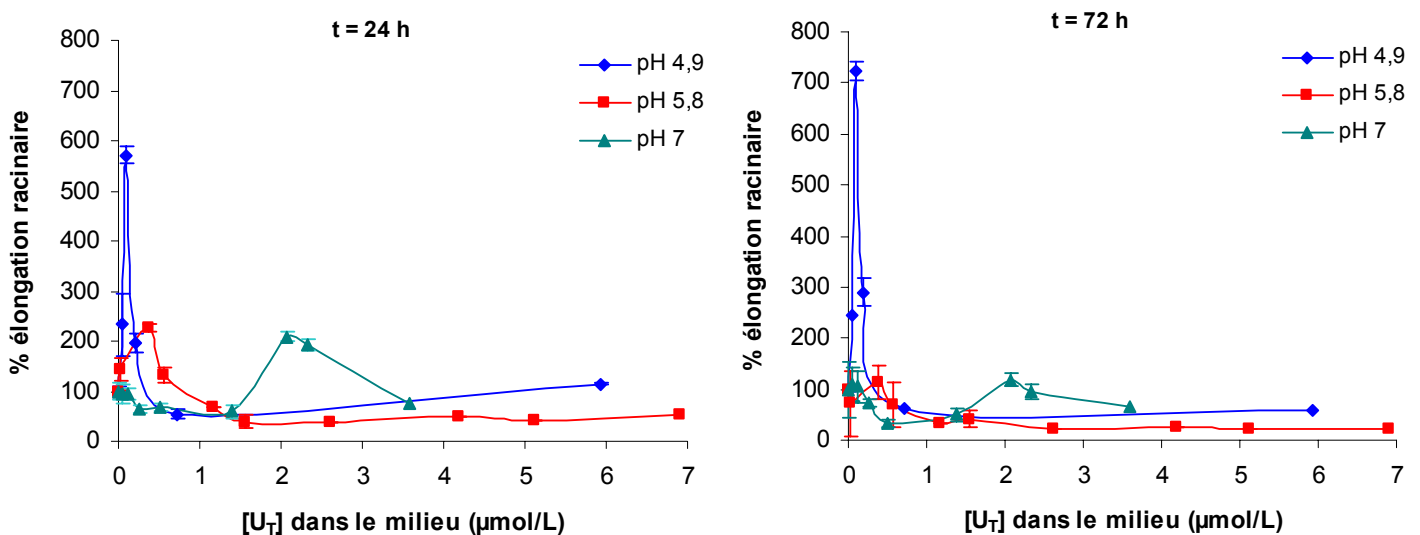


Figure 52. Evolution au cours du temps (24h et 72h) du % d'élongation racinaire en fonction du pH du milieu d'exposition.

Chapitre 5

SYNTHESE DES RESULTATS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Cette étude comportait trois grands axes de recherche :

- L'effet de la composition du milieu d'exposition (composition pouvant influencer la spéciation de l'U (VI)) sur la prise en charge racinaire de l'uranium par la plante ;
- La localisation de l'uranium dans les tissus après bioaccumulation ;
- Les effets biologiques pouvant être induits suite à cette exposition à l'uranium.

1. Concernant la relation spéciation U(VI) – transfert racinaire, les expériences préliminaires nous ont permis de constater tout d'abord que les cinétiques de transfert étaient très rapides (de l'ordre de l'heure en circuit fermé) et atteignaient un équilibre, que le stade plantule concentrait près de 4 fois plus l'uranium dans ses organes que le stade floraison et enfin que 99 % de l'uranium se concentrait dans les racines.

Nous avons par ailleurs pu établir un fonctionnement différent du système racinaire en fonction de l'âge des racines qui le composent. Ainsi, les racines les plus jeunes sont les racines les plus efficaces pour prendre en charge l'uranium (70 % de l'uranium rapporté à la masse de matière sèche qu'elles représentent y est retrouvé).

L'étude de la variation de la composition de la solution nutritive sur le transfert d'uranium à *Phaseolus vulgaris*, à court terme (5 heures d'exposition), avait pour but d'étudier l'effet des cations compétiteurs H^+ (pH) et Ca^{2+} et des ligands phosphates et citrate. Les expériences ont mis en évidence que, dans nos conditions expérimentales, les cations compétiteurs tels que Ca^{2+} n'entraient pas en compétition avec l'uranium pour les sites de transport à la surface de la racine. Nous avons également pu constater qu'il pouvait exister un petit effet pH, mais très inférieur à celui auquel on aurait pu s'attendre, au vu du changement drastique de spéciation de l'uranium dans la solution d'exposition. Le transfert d'uranium pouvant d'ailleurs être plus élevé au pH 7 alors que les ions uranyles ne représentent que moins de 1 % de l'uranium en solution.

Si nous avons aussi pu confirmer par modélisation que les ligands citrate et phosphates réduisaient grandement les concentrations en ions uranyles dans le milieu, les expériences n'ont pas mis en évidence d'effet sur le transfert d'uranium à la racine (à l'exception d'une réduction au pH 5,8 avec le citrate).

L'ensemble de ces expériences nous ont donc permis d'émettre les conclusions et hypothèses suivantes pour expliquer ces observations : (i) il peut exister une compétition des cations H^+ avec les cations uranyles pour la fixation sur les transporteurs à la surface de la racine ; (ii) les formes complexées de l'uranium pourraient être prises en charge au niveau de la racine ; (iii) ces formes complexées pourraient être dissociées et l'ion uranyle pris en charge, suite à la déplétion de sa concentration dans la solution d'exposition. Par ailleurs, au vu de l'efficacité de la racine à prendre en charge l'uranium de la solution, dans nos conditions expérimentales, la spéciation n'a pas joué un grand rôle.

2. Du point de vue de la localisation de l'uranium dans les tissus, les observations au Microscope Electronique à Transmission, menées après 24 heures d'exposition des plantes, n'ont pas mis en évidence de structures spécifiques accumulant l'uranium. Cependant, dans la racine et la tige, l'uranium est retrouvé associé à des granules denses aux électrons, riches en phosphore, aussi bien dans le cytoplasme que dans la vacuole de certaines cellules. Ces granules sont d'ailleurs retrouvés, dans les plantes, dans le cas d'une contamination au cadmium (Rauser et Ackerley, 1987).

Ces observations microscopiques nous ont aussi permis de mettre en évidence des anomalies cellulaires au niveau des chloroplastes. Sur les plants contaminés, ceux-ci possèdent un gros grain d'amidon et de nombreux plastoglobules. La présence de ce grain d'amidon, plus conséquent que sur les plants témoins, pourrait être expliquée par une inhibition du transport des carbohydrates, suite à la contamination à l'uranium. Ces observations ont d'ailleurs été rapportées par d'autres auteurs pour d'autres métaux (Molas, 2002).

3. Enfin, concernant les effets biologiques induits par une contamination à l'uranium, nous avons voulu tester si cette contamination pouvait affecter la Capacité d'Echange Cationique de la racine (CECR) et l'élongation racinaire.

Nous avons ainsi pu constater une modification au sein de la paroi des cellules racinaires, avec une diminution de cette CECR pour les plants contaminés, peut-être due à un accroissement de l'âge moyen des racines (du fait d'une inhibition de l'élongation racinaire). Ces expériences ont permis de confirmer aussi le statut plus actif des parties jeunes des racines pour lesquelles la CECR est plus importante que celle des racines âgées (pour les plants contaminés ou non). Cependant, ces racines jeunes ne représentent qu'une faible proportion en masse de l'ensemble de la racine, environ 20 % de la racine (§ 3.2.3.). Si l'on se réfère aux données de CECR calculées au pH 4,9 pour les racines jeunes et âgées : 34,2 cmol_c/kg et 25,2 cmol_c/kg respectivement, la CECR de la racine entière doit donc être de l'ordre de 27 cmol_c/kg. Par ailleurs, nous savons que, pour le design expérimental mis en œuvre, les 4 racines de nos plantules peuvent accumuler 79 μmolU/gMS (§ 3.2.3.). Si l'on exprime la CEC en moles d'ions divalents, l'ion UO_2^{2+} occuperait au maximum 29 % des sites divalents (58 % des sites monovalents), soit une occupation importante des sites d'échange à la surface de la racine. Cette proportion d'occupation des sites divalents est d'ailleurs du même ordre de grandeur que la proportion de racines jeunes dans la racine.

Quant à l'élongation racinaire, la présence d'uranium dans le milieu d'exposition inhibe ce processus, d'autant plus que la concentration en uranium augmente. Les CE_{50} déterminées aux pH 4,9 et 5,8 sont les suivantes : 2,5 μmol/L et 0,95 μmol/L en U_{Total} respectivement. Cependant

un autre phénomène a été mis en évidence : une stimulation de croissance pour de faibles concentrations en uranium (100 nM à pH 4,9 et 400 nM à pH 5,8) et pour de plus fortes concentrations au pH 7 (environ 2 µM). Ce phénomène biologique, nommé hormesis, est induit par des agents potentiellement toxiques et se traduit par une relation dose-réponse entraînant une stimulation aux faibles doses et une inhibition aux fortes doses (Calabrese et Baldwin, 2002 ; Stebbing, 1982). Ces observations ont souvent été rapportées pour différents toxiques.

Il peut être intéressant de comparer ces résultats de relation spéciation U (VI) – transfert avec des expériences réalisées cette fois en condition où la concentration en uranium dans la solution est maintenue constante (circuit ouvert).

Concernant les autres effets biologiques pouvant être induits, une attention particulière peut être portée sur la mise en évidence éventuelle d'un stress oxydant, d'une modification des pigments chlorophylliens, etc.. suite à une contamination. Par ailleurs, il peut être intéressant d'observer l'effet de l'uranium sur l'ensemble du cycle de vie de l'individu et à l'échelle de plusieurs générations, (voir si les graines restent viables, en admettant que l'on arrive à ce stade). D'autre part, un mécanisme d'éventuelle détoxification peut être étudié après avoir contaminé des plants à l'uranium et en le transférant en milieu non contaminé (les chloroplastes reviennent-ils à des «morphologies dites normales », etc...).

ANNEXES

Annexe 1. Photographies de notre plante modèle *Phaseolus vulgaris*, au stade plantule dans la vermiculite et au stade mature (avec les gousses).



Annexes

Annexe 2. Biomasse sèche (gMS) des tiges, feuilles et racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations préliminaires sur 6 jours d'exposition, au stade floraison aux pH 4,9 et 5,8.

Temps (j)	réplicats	pH 4,9			pH 5,8		
		Tiges (gMS)	Feuilles (gMS)	Racines (gMS)	Tiges (gMS)	Feuilles (gMS)	Racines (gMS)
1	1	0,142	0,367	0,108	0,523	0,465	0,157
	2	0,287	0,590	0,199	0,488	0,737	0,199
	3	0,186	0,456	0,150	0,548	0,539	0,218
	4	0,217	0,523	0,127	0,373	0,460	0,196
2	1	3,322	1,226	0,360	0,434	0,433	0,167
	2	1,952	0,655	0,190	0,527	0,681	0,223
	3	2,384	0,636	0,126	0,546	0,733	0,223
	4	2,811	0,785	0,284	0,649	1,083	0,171
3	1	0,383	0,897	0,263	0,447	0,634	0,274
	2	0,278	0,645	0,195	0,639	0,985	0,224
	3	0,413	0,741	0,325	0,466	0,531	0,279
	4	0,448	1,054	0,212	0,547	0,859	0,320
4	1	0,321	0,695	0,211	0,395	0,398	0,051
	2	0,412	0,779	0,276	0,579	0,528	0,152
	3	0,449	0,389	-	0,465	0,540	0,174
	4	0,394	0,943	0,242	0,552	0,776	0,164
6	1	0,292	0,627	0,147	0,483	0,608	0,179
	2	0,328	0,406	0,272	0,508	0,463	0,169
	3	0,489	0,805	0,271	0,481	0,531	0,182
	4	0,407	0,758	0,216	0,497	0,501	0,238

Annexe 3. Biomasse sèche (gMS) des tiges, feuilles et racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations préliminaires sur 3 jours d'exposition, au stade plantule aux pH 4,9 et 5,8.

Temps (j)	réplicats	pH 4,9			pH 5,8		
		Tiges (gMS)	Feuilles (gMS)	Racines (gMS)	Tiges (gMS)	Feuilles (gMS)	Racines (gMS)
3	1	0,238	0,575	0,228	0,280	0,569	0,186
	2	0,254	0,422	0,133	0,343	0,477	0,108
	3	0,288	0,200	0,137	0,332	0,346	0,089
	4	0,279	0,410	0,130	0,373	0,512	0,113

Annexe 4. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations de cinétique de transfert sur 9 heures, au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7.

Temps (h)	réplicats	pH 4,9	pH 5,8	pH 7	Temps (h)	pH 4,9	pH 5,8	pH 7
		Racines (gMS)	Racines (gMS)	Racines (gMS)		Racines (gMS)	Racines (gMS)	Racines (gMS)
0,08	1	0,050	-	-	2	0,130	0,060	0,060
	2	0,030	-	-		0,070	0,100	0,100
	3	0,080	-	-		0,100	0,070	0,060
	4	0,080	-	-		0,080	0,090	0,080
0,17	1	0,050	-	-	3	0,100	0,100	0,100
	2	0,060	-	-		0,130	0,050	0,020
	3	0,040	-	-		0,100	0,050	0,060
	4	0,110	-	-		0,110	0,080	0,070
0,38	1	0,050	-	-	5	0,120	0,100	0,070
	2	0,080	-	-		0,130	0,120	0,100
	3	0,080	-	-		0,070	0,070	0,100
	4	0,100	-	-		0,120	0,060	0,090
0,5	1	0,080	0,040	0,070	9	0,140	0,050	0,070
	2	0,080	0,070	0,130		0,140	0,100	0,130
	3	0,080	0,060	0,070		0,170	0,070	0,070
	4	0,180	0,080	0,090		0,130	0,130	0,090
1	1	0,120	0,080	0,070				
	2	0,090	0,110	0,130				
	3	0,130	0,050	0,070				
	4	0,110	0,060	0,070				

Annexe 5. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en uranium (t = 5h d'exposition), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7.

réplicats	pH 4,9				pH 5,8		pH 7	
	[U _T] (μmol)	Racines (gMS)	[U _T] (μmol)	Racines (gMS)	[U _T] (μmol)	Racines (gMS)	[U _T] (μmol)	Racines (gMS)
1		0,190		0,050		0,160		0,090
2	0,078	0,150	3,30	0,120	0,021	0,090	0,099	0,060
3		0,130		0,100		0,130		0,040
4		0,130		0,110		0,160		0,070
1		0,150		0,070		0,140		0,080
2	0,234	0,170	7,74	0,080	0,184	0,140	0,461	0,060
3		0,180		0,130		0,130		0,100
4		0,150		0,110		0,080		0,100
1		0,180		0,100		0,100		0,100
2	0,774	0,150	12,5	0,030	0,671	0,070	0,606	0,050
3		0,180		0,110		0,100		0,060
4		0,110		0,080		0,120		0,120
1		0,080		0,100		0,070		0,070
2	1,43	0,170	16,2	0,100	0,958	0,130	1,89	0,040
3		0,240		0,040		0,100		0,090
4		0,070		0,100		0,130		0,100
1		0,170		0,090		0,120		0,080
2	2,97	0,140	20,7	0,090	2,44	0,080	3,28	0,090
3		0,130		0,120		0,050		0,060
4		0,110		0,090		0,070		0,110
1								0,050
2				4,39	0,110			
3					0,050			
4					0,080			

Annexe 6. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en calcium (mmol/L) ($t= 5h$ d'exposition, $[U_T] = 300$ nM), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7.

[calcium] (mmol/L)	réplicats	pH 4,9	pH 5,8	pH 7
		Racines (gMS)	Racines (gMS)	Racines (gMS)
0	1	0,060	0,090	0,060
	2	0,030	0,110	0,100
	3	0,080	0,100	0,060
	4	0,050	0,080	0,080
0,5	1	0,060	0,080	0,100
	2	0,050	0,100	0,020
	3	0,010	0,160	0,060
	4	0,020	0,090	0,070
1	1	0,090	0,090	0,070
	2	0,030	0,120	0,100
	3	0,050	0,070	0,100
	4	0,080	0,110	0,090
2	1	0,080	0,140	0,070
	2	0,070	0,090	0,130
	3	0,070	0,100	0,070
	4	0,070	0,120	0,130
5	1	0,010	0,140	0,030
	2	0,040	0,110	0,202
	3	0,040	0,090	0,090
	4	0,060	0,090	0,070

Annexe 7. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en phosphates ($\mu\text{mol/L}$) ($t= 5\text{h}$ d'exposition, $[\text{U}_\text{T}] = 300 \text{ nM}$), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7.

[phosphates] ($\mu\text{mol/L}$)	réplicats	pH 4,9	pH 5,8	pH 7
		Racines (gMS)	Racines (gMS)	Racines (gMS)
0	1	0,120	0,080	0,070
	2	0,080	0,090	0,100
	3	0,110	0,090	0,080
	4	0,100	0,100	0,110
0,5	1	0,130	0,080	0,120
	2	0,090	0,060	0,060
	3	0,070	0,050	0,050
	4	0,110	0,050	0,050
1	1	0,110	0,100	0,070
	2	0,080	0,080	0,060
	3	0,120	0,140	0,060
	4	0,050	0,100	0,090
5	1	0,080	0,060	0,080
	2	0,220	0,140	0,090
	3	0,080	0,090	0,120
	4	0,070	0,090	0,080
10	1	0,140	0,110	0,100
	2	0,110	0,110	0,080
	3	0,090	0,110	0,090
	4	0,090	0,110	0,130
15	1	0,090	0,090	0,060
	2	0,070	0,060	0,060
	3	0,110	-	0,120
	4	0,050	0,070	0,110

Annexe 8. Biomasse (gMS) des racines des 4 réplicats de *Phaseolus vulgaris*, utilisés pour les expérimentations utilisant une gamme de concentrations croissantes en citrate ($\mu\text{mol/L}$) ($t= 5\text{h}$ d'exposition, $[U_T] = 300\text{ nM}$), au stade plantule aux pH 4,9, 5,8 et 7.

[citrate] ($\mu\text{mol/L}$)	réplicats	pH 4,9	pH 5,8	pH 7
		Racines (gMS)	Racines (gMS)	Racines (gMS)
0	1	0,130	0,050	0,080
	2	0,120	0,050	0,090
	3	0,070	0,080	0,130
	4	0,110	0,050	0,080
0,5	1	0,120	0,050	0,110
	2	0,070	0,050	0,090
	3	0,060	0,040	0,090
	4	0,090	0,040	0,100
1,5	1	0,140	0,070	0,060
	2	0,150	0,010	0,080
	3	0,090	0,030	0,150
	4	0,080	0,030	0,080
3	1	0,060	0,070	0,100
	2	0,100	0,090	0,100
	3	0,060	0,080	0,070
	4	0,100	0,090	0,100
5	1	0,050	0,050	0,040
	2	0,100	0,060	0,070
	3	0,050	0,060	0,080
	4	0,090	0,110	0,090
10	1	0,080	0,060	0,070
	2	0,080	0,060	0,070
	3	0,080	0,130	0,070
	4	0,110	0,030	0,100

BIBLIOGRAPHIE

A

1. Acqua C. (1912). Action of Uranium on the Plant Cell. *Archivio di Farmacologia Sperimentale e Scienze Affini* , **14**: 81-84.
2. Aery N.C., Jain G.S. (1997). Effect of uranyl nitrate on seed germination and early seedling growth of *Triticum aestivum*. *Biologia Brasiliava*, **52**(1): 115-119.
3. AIEA (1994). Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in temperate environment. Vienne.
4. Amiro B.D. et Sheppard S.C. (1987). Concentration ratios of natural U for cattail pollen. *Health Phys.*, **52**: 233-235.

B

5. Baes C.F. III, Sharp R.D., Sjoreen A.L., Shor R.W. (1984). A review and analysis of parameters for assessing transport of environmentally released radionuclides through agriculture. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tennessee, ORNL-5786.
6. Baker D.A., Hoenes G.R., Soldat J.K. (1976). Food: an Interactive code to calculate international radiation doses from contaminated food products. Battelle Pacific Northwest Laboratory, Richland, WA, USERDA Report, BNWL-SA-5523.
7. Baker A.J.M. (1981). Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *J. of Plant Nutrition*, **3**: 643-654.
8. Ben Othman D., White W.M., Patchett J. (1989). The geochemistry of marine sediments, island arc magma genesis, and crust-mantle recycling. *Earth and Planetary Science Letters*, **94** (1-2): 1-21.
9. Berdnikova A.V. (1964). Uranium content in the external environment and human excreta, *Voprosy Pitaniya* , **23** (4): 17-20.

10. Boileau L.J.R., Nieboer E., Richardson D.H.S. (1985). Uranium accumulation in the lichen *Cladonia rangiferina*. Part II. Toxic effects of cationic, neutral and anionic forms of the uranyl ion. *Can. J. Bot.*, **63**: 390-397.

11. Bourrelier P.H., Berthelin J. (1998). Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Paris, TEC et DOC, Lavoisier.

C

12. Calabrese J.E., Howe K.J. (1976). Stimulation of growth of Peppermint (*Mentha piperita*) by Phosfon, a growth retardant. *Physiol. Plant*, **37**: 163-165.

13. Calabrese J.E., Baldwin L.A. (2002). Hormesis and high-risk groups. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **35**: 414-428.

14. Calabrese J.E. (1996). Expanding the reference dose concept to incorporate and optimize beneficial effects while preventing toxic responses from nonessential toxicants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **24**: S68-S75.

15. Callot G., Chamayou H., Maertens C., Salsac L. (1982). Mieux comprendre les interactions sol-racine, incidence sur la nutrition minérale. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique.

16. Campbell P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free ion activity model. In Tessier A., Turner D.R. eds, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, **Vol 3**. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. John Wiley, New York, USA, 45-102.

17. Campbell P.G.C., Errecalde O.E., Fortin C., Hiriart-Baer V.P., Vigneault B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **133**: 189-206.

18. Cannon H.L. (1952). The effect of uranium-vanadium deposits on the vegetation of the Colorado Plateau. *American Journal of Science*, **250**: 735-770.

19. Cannon H.L., Kleinhampl F.J. (1956). Botanical methods of prospecting for uranium. U.S. Geol. Survey, Denver, CO, *Proc. Intern. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy*, Geneva, **6**: 801-805.

- 20.** Cannon H. L. (1960). The development of botanical methods of prospecting for uranium on the Colorado Plateau. *U.S. Geological Survey Bulletin*, **1085(A)**: 1-50.
- 21.** Chamuah G.S., Dey S. K. (1982). Cation-Exchange Capacity of clonal tea roots and its implications on fertiliser responses. *J. Sci. Food Agric.*, **33**: 309-317.
- 22.** Charles A.L., M. S., Stauber J.L., De Filippis L.F. (2002). The effect of water hardness on the toxicity of uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella sp.*). *Aquatic Toxicology*, **60**: 61-73.
- 23.** Chen Y.X., L. Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen S.J., Yu Y.L., Tian G.M., Wong M.H. (2003). The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere*, **50**: 807-811.
- 24.** Chonan N., Kawahara H., Matsuda T. (1977). Changes in chloroplast ultrastructure during senescence of leaves in rice plants. *Jpn Crop Sci.*, **46** : 379-386.
- 25.** Choudhury S. (1990). Estimation of uranium contents in different parts of the plants and soils. *Indian J. Phys* **64 (A)** (5): 399-404.
- 26.** Ciereszko I., Zambrzycka A., Rychter A. (1998). Sucrose hydrolysis in bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. *Plant Science* **133**: 139-144.
- 27.** Costa G., Morel J.L. (1994). Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiol. Biochem.*, **32(4)**: 561-570.
- 28.** Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S., Adam C., Baudin J.P. (2001). Comportement de l'uranium dans l'environnement. *In l'uranium de l'environnement à l'homme*. E. Sciences. Les Ulis, EDP Sciences: 340 pp.
- 29.** Crooke W.M., Knight A. H., MacDonald I.R. (1960). Cation exchange capacity and pectin gradients in leek root segments. *Plant and Soil*, **XIII(2)**: 123-127.

D

- 30.** Davies A.G. (1978). Pollution studies with marine plankton. Part 2. Heavy metals. *Adv. Mar. Biol.*, **15**: 381-508.

- 31.** de Rijck G., Schrevens E. (1997). Elemental bioavailability in nutrient solutions in relation to dissociation reactions. *Journal of Plant Nutrition*, **7 & 8**: 901-910.
- 32.** Delrot, S. (2000). Les sèves et leur circulation. *Pour la Science*, **janvier**: 28-33.
- 33.** Deneux-Dustin D., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munier-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Martin-Garin A., Gonze M.A., Garnier-Laplace J., Leyval C. (2001). Rôle des microorganismes dans le comportement des éléments dans le système sol-plante. Etude bibliographique, Tome 2, ANDRA, 203pp.
- 34.** Denison F, 2002. Application of chemical speciation modelling to uranium toxicity and bioavailability studies : compilation of a coherent database for simple experimental systems and an investigation of the effect of database uncertainty on model predictions. *Report IRSN/DPRE/SERLAB/LRE 02-41*, 162 pp.
- 35.** Dodge C.J., F. A. J. (2002). Photodegradation of a ternary iron (III)-uranium (VI)-citric acid complex. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 2094-2100.
- 36.** Dounce A.L., Lan T. H., Connors W., Kaley M. Robinson B., Rothermel D. (1949). The action of uranium on enzymes and proteins. National Nuclear Energy Series, *Manhattan Project Technical Section, Division 6*: University of Rochester Project, 1 (Pt. 2), 759-888.
- 37.** Drobkov, A.A. (1951). Biological effects of naturally radioactive elements. *Sovremennoi Biologii*, **31**: 82-100.
- 38.** Dufey J.E., Braun R. (1986). Cation exchange capacity of roots : titration, sum of exchangeable cations, copper adsorption. *Journal of Plant Nutrition* **9**(8): 1147-1155.
- 39.** Dufey J.E., Genon J.G., Jaillard B., Calba H., Rufyikiri G., Delvaux B. (2001). Cation exchange on plant roots involving aluminium: experimental data and modeling. *CRC. Press. LLC*: 228-249.
- 40.** Dunn C.E. (1981). The biogeochemical expression of deeply buried uranium mineralization in Saskatchewan, Canada. *J. Geochem. Exploration*, **15**: 437-452.
- 41.** Dutta I. (1980). Lead effect on some aspects of growth and metabolism of forage sorghum (*Sorghum vulgare*). *Indian J. Exp. Biol.*, **18**: 197.

E

42. Ebbs S.D., Brady D.J., and Kochian L.V. (1998). Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *Journal of Experimental Botany* **49** (324): 1183-1190.
43. Ebbs S.D., Norvell W. A., and Kochian L.V. (1998). The effect of acidification and chelating agents on the solubilization of uranium from contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, **27**: 1486-1494.
44. Echevarria G., Sheppard M.I., and Morel J.L. (2001). Effect of pH on the sorption of uranium in soils. *Journal of Environmental Radioactivity*, **53**: 257-264.
45. Eymery F., Rey P. (1999). Immunocytolocalization of CDSP 32 and CDSP 34, two chloroplastic drought-induced stress proteins in *Solanum tuberosum* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **37**(4): 305-312.

F

46. Floriani M. (2001). Techniques de microlocalisation d'éléments stables ou radioactifs dans des échantillons biologiques. Fiches techniques et bilan de différentes méthodes susceptibles d'être mises en œuvre au LRE. Rapport IRSN/DPRE/SERLAB/LRE-46, 72p.
47. Fortin C., Dutel L., Garnier-Laplace J. (2004). Uranium complexation and uptake by a green alga in relation to chemical speciation : the importance of the free uranyl ion. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**(4): 974-981.
48. Foulkes, E. C. (2000). Transport of toxic heavy metals across cell membranes. *Society for Experimental Biology and Medicine*, **223**: 234-240.
49. Francis A.J., Dodge. C.J., and Gillow J.B. (1992). Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility. *Nature*, **356**: 140-142.
50. Franklin N.M., Stauber J.L., Markich S.J., Lim R.P. (2000). pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic toxicology*, **48**: 275-289.

- 51.** Friis N., Myers-Keith P. (1986). Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**: 21-28.
- 52.** Frindik O. Uranium in soils, plants, and foods (1986). *Landwirtschaftliche Forschung*, **39** (1), 75-86.
- 53.** Fry S.C. (1986). Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases, In: Greppin H., Penel C., Gaspar Th. (eds), University of Geneva, Geneva, 169-182.

G

- 54.** Gabrielli R., Pandolfini T., Vergnano O., Plndri M.R. (1990). Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil*, **122**: 271-277.
- 55.** Garnier-Laplace J., Adam C., Gilbin R. *et al.* (2004). Environmental radioprotection : main lessons learnt from the Envirhom Program, *Radioprotection, soumis*
- 56.** Gerzabek M.H., Strebl F., Temmel B. (1998). Plant uptake of radionuclides in lysimeters experiments. *Environmental Pollution*, **99**: 93-103.
- 57.** Gill J., Williams R. W. (1990). Thorium isotope and uranium-series studies of subduction-related volcanic rocks. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **54**(5), 1427-1442.
- 58.** Goswani S.C., Gulati K.L., Nagpaul K.K. (1977). Estimation of uranium and boron contents in plants and soils by nuclear particle etch technique. *Plant and Soil* **48**: 709-717.
- 59.** Gouthu S., Weginwar R., Arie T., Ambe S., Ozaki T., Enomoto S., Ambe F., Yamaguchi I. (1999). Subcellular distribution and translocation of radionuclides in plants. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18** : 2023-2027.
- 60.** Gueniot B., Munier-Lamy C. (1988). Geochemical behavior of uranium in soils, part II. Distribution of uranium in hydromorphic soils and soil sequences. Applications for superficial prospecting. *J. Geochem. Explor.*, **31**: 39-55.

- 61.** Gulati K.L., Oswal M.C., Nagpaul K.K. (1979). Mineral element composition of natural vegetation and its relation to soil of Puga-valley, Ladakh, India. *Plant and Soil*, **52**: 345-351.
- 62.** Gulati K.L., Oswal M.C., Nagpaul K.K. (1980). Assimilation of uranium by wheat and tomato plants. *Plant and Soil*, **55**: 55-59.
- 63.** Günther A., Bernhardt G., Geipel G., Rossberg A., Reich T. (2003). Uranium speciation in plants. Proceedings of the International Uranium Mining and Hydrogeology III and the International Mine Water Association Symposium, Freiberg, Germany, Springer-Verlag.

H

- 64.** Hanson W. C. (1980). Ecological considerations of natural and depleted uranium. *DOE Symposium Series*, **51**(Nat. Radiat. Environ. 3, v2) : 1682-97.
- 65.** Hinsinger P. (2001). Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In : *Trace elements in the rhizosphere*. W. W. W. Gobran G.R., Lombi E., CRC Press: 25-41.
- 66.** Horikoshi T., Nakajima A., Sakaguchi T. (1979). Uptake of uranium by various cell fractions of *Chlorella regularis*. *Radioisotopes*, **28**(8): 485-488.
- 67.** Huang J.W., Blaylock. M.J., Kapulnik Y., and Ensley B.D. (1998). Phytoremediation of uranium-contaminated soils : role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants. *Environ. Sci. Technol.*, **32**: 2004-2008.

J

- 68.** Jarvis S.C., Jones L.H.P., and Hopper M.J. (1976). Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. *Plant and Soil*, **44**: 179-191.
- 69.** Jones (1998). Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* **205**: 25-44.

70. Juszczuk I.M., Rychter A.M. (2002). Pyruvate accumulation during phosphate deficiency stress of bean roots. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 783-788.

K

71. Kahn D.H., Duckett J.G., Frankland B., Kirkham J.K. (1984). An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea Mays* L. *J. Plant Physiol.*, **115**: 19-28.

72. Keiling C., Marx G. (1991). Investigations into the influence of organic complexing agents on the leaching behaviour and mobility of radionuclides solidified in ILW forms. *Radiochimica Acta*, **52/53**: 287-290.

73. Kukkola E., Huttunen S. (1998). Structural observations on needles exposed to elevated levels of copper and nickel. *Chemosphere*, **36**(4-5): 727-732.

L

74. Langmuir D. (1978). Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **42**(6): 547-69.

75. Lavelle P., Spain. A.V. (2001). Soil ecology. *Kluwer academic Publishers*, Dordrecht (Netherlands), 654 pp.

75. Lin-Shiau S.Y., Fu W.M., Lee C.Y. (1979). Effect of uranyl ions on neuromuscular transmission of Chick Biventer Cervicis muscle. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **241**: 332-343.

77. Lombi E., Wenzel W.W., Gobran G.R., Adriano D.C. (2001). Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes : a review. *Trace elements in the rhizosphere*. W. W. W. Gobran G.R., Lombi E., CRC Press: 3-24.

78. Lopatkina A.P., Komarov V.S., Sergeyer A.N., Andreyev A.G. (1970). On concentration of uranium by living and dead peat-forming plants. *Geochem. Int*, **7**, 277-282.

79. Luchetti G. (1932). The action of uranium salts on soil microorganisms and on their functions. *Boll. ist. super. agrar. Pisa*, **8**: 571-91.

M

80. Malusà E., Laurenti E., Juszczuk I., Ferrarri R.P., Rychter a.M. (2002). "Free radical production in roots of *Phaseolus vulgaris* subjected to phosphate deficiency stress. *Plant Physiol. Biochem.*, **40**: 963-967.

81. Marschner, H. (2002). Mineral nutrition of higher plants. London, Academic Press, Elsevier, 889 p.

82. McLaughlin M.J., Andrew S.J., Smart M.K. , Smolders E. (1998). Effects of sulfate on cadmium uptake by Swiss chard : I. Effects of complexation and calcium competition in nutrient solutions. *Plant and Soil*, **202**: 211-216.

83. Mehta S.K., Tripathi B.N., Gaur J.P. (2000). Influence of pH, temperature, culture age and cations on adsorption and uptake of Ni by *Chlorella vulgaris*. *Europ. J. Protistol.*, **36**: 443-450.

84. Mehta S.K., Singh A., Gaur J.P. (2002). Kinetics of adsorption and uptake of Cu²⁺ by *Chlorella vulgaris* : influence of pH, temperature, culture age and cations. *J. Environ. Sci. Health*, **37**(3): 399-414.

85. Molas (1997). Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an *in vitro* excess of nickel. *Photosynthetica*, **34**(4): 513-522.

86. Molas (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*, **47**: 115-126.

87. Morishima H., Koga T., Kawai H., Honda Y., Katsurayama K. (1977). Studies on the movement and distribution of uranium in the environments distribution of uranium in agricultural products. *J. Radiat. Res.*, **18**: 139-150.

88. Murthy T.C.S., Weinberger P., Measures M.P. (1984). Uranium effects on the growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Bull. Environ. Contam., Toxicol.*, **32**: 580-586.

N

89. Nakajima A., Horikoshi T., Sakaguchi T. (1979). Ion effects on the uptake of uranium by *Chlorella regularis*. *Agric. Biol. Chem.*, **43**(3): 625-629.

90. Nakajima A., Sakaguchi T. (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **24**: 59-64.

P

91. Panda B.B., Panda K.K., Patra J., Sahu G.K. (2001). Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of uranyl nitrate in *Allium* assay system. *Indian Journal of Experimental Biology*, **39**: 57-62.

92. Pandolfini T., Babrielli R., Comparini C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L.. *Plant, Cell and Environ.*, **15**: 719-725.

93. Parker D.R., Pedler J.F., Thomason D.N., Li H. (1998). Alleviation of copper rhizotoxicity by calcium and magnesium at defined free metal-ion activities. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **62**: 965-972.

94. Parker D.R., Pedler J.F., Ahnstrom Z.A., Resketo M. (2001). Reevaluating the free-ion activity model of trace metal toxicity toward higher plants: experimental evidence with copper and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(4): 899-906.

95. Peterson H.G., Healey F. P., Wagemann R. (1984). Metal toxicity to algae : a highly pH dependant phenomenon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **41**: 974-979.

96. Pinheiro J.P., Galceran J., Van Leeuwen H.P. (2004). Metal speciation dynamics and bioavailability: bulk depletion effects. *Environ. Sci. Technol.*, **38**: 2397-2405.

97. Plant J.A., Simpson P. R., Smith B., Windley B. F. (1999). Uranium ore deposits - products of the radioactive earth. *Reviews in Mineralogy*, 255-319.

98. Prister B.S., Prister S.S. (1970). Effect of uranium on the growth and development of plants and uranium accumulation as a function of the content in the germination medium. *Radiobiologiya*, **10**, 221-224.

R

99. Ragnarsdottir K.V., Charlet L. (2000). Uranium behaviour in natural environments. *Mineralogical Society of Great Britain and Ireland*, **9**: 333-377.

100. Rajan K.S., Martell A.E. (1965). Equilibrium studies of uranyl complexes. III. Interaction of uranyl ion with citric acid. *Inorg. Chem.*, **4**(4): 462-469.

101. Ramani S., Shaikh M.S., Suseelan K.N., Kumar S.C., Joshua D.C. (2002). Tolerance of *Sesbania* species to heavy metals. *Indian J. Plant Physiol.*, **7**(2): 174-178.

102. Ramaswami A., Carr P., and Burkhardt M. (2001). Plant-uptake of uranium : hydroponic and soil system studies. *International Journal of Phytoremediation*, **3** (2): 189-201.

103. Ratsch H.C., Johndro D. (1986). Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation test methods. *Environmental Monitoring and Assessment*, **6**: 267-276.

104. Rauser, W. E. (1978). Early effects of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel, and zinc in white beans. *Can. J. Bot.*, **56**: 1744-1749.

105. Rauser W.E., Ackerley C.A. (1987). Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. *Can. J. Bot.*, **65**: 643-646.

106. Rengel Z., Robinson D.L. (1989). Determination of cation exchange capacity of ryegrass roots by summing exchangeable cations. *Plant and Soil*, **116**: 217-222.

107. Rey P., Gillet B., Römer S., Eymery F., Massimino J., Peltier G., and Kuntz M. (2000). Over expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *The Plant Journal*, **21**(5): 483-494.

- 108.** Robert, M. (1996). Le sol : interface dans l'environnement, ressource pour le développement. Paris, Masson.
- 109.** Rothstein A., Frenkel A., Larrabee C. (1948). The relationship of the cell surface to metabolism. III. Certain characteristics of the uranium complex with cell surface groups of yeast. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **32**: 261-274.
- 110.** Rothstein A., Larrabee C. (1948). The relationship of the cell surface to metabolism. II. The cell surface of yeast at the site of inhibition of glucose metabolism by uranium. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **32**: 247-259.
- 111.** Rothstein A., Meier R., Hurwitz L. (1951). The relation of the cell surface to metabolism. V. The role of uranium-complexing loci of yeast in metabolism. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **37**: 57-81.
- 112.** Rothstein A., Meier R. (1951). The relationship of the cell surface to metabolism. VI. The chemical nature of uranium-complexing groups of the cell surface. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, **38**: 245-270.

S

- 113.** Samarakoon A.B., Rauser W. (1979). Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.*, **63**: 1165-1169.
- 114.** Saric M.R., Stojanovic M., and Babic M. (1995). Uranium in plant species grown on natural Barren soil. *Journal of Plant Nutrition*, **18**(7): 1509-1518.
- 115.** Sarret G., Vangrsveld J., Manceau A., Mussi M., D'Haen J., Menthonnex J.J., Hazemann J.L. (2001). Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and the absence of EDTA. *Environ. Sci. Technol.*, **35**: 2854-2859.
- 116.** Schultz M.K., Burnett W., Inn K.G.W., Smith G. (1998). Geochemical partitioning of actinides using sequential chemical extractions : comparison to stable elements. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **234**(1-2): 251-256.
- 117.** Shahandeh H., Hossner L. R. (2002). Enhancement of uranium phytoaccumulation from contaminated soils. *Soil Science*, **167**(4): 269-280.

- 118.** Sheppard M.I. (1980). The environmental behaviour of uranium and thorium. *Atomic Energy of Canada Limited*, Pinawa, Manitoba, AECL-6795.
- 119.** Sheppard M.I, Sheppard S.C. (1985). The plant concentration ratio concept as applied to natural U. *Health Physics Society*, **48**(4): 494-500.
- 120.** Sheppard S.C., a. Evenden W.G. (1988). Critical compilation and review of plant/soil concentration ratios for uranium, thorium and lead. *J. Environ. Radioactivity*, **8**: 255-285.
- 121.** Sheppard S.C., Evenden W. G. (1988). The assumption of linearity in soil and plant concentration ratios : an experimental evaluation. *J. Environ. Radioactivity*, **7**: 221-247.
- 122.** Sheppard S.C., Sheppard M.I., Llin M., Thompson P. (2004). Soil-to-plant transfers of uranium series radionuclides in natural and contaminated settings. *Radioprotection*, submitted.
- 123.** Simon S.L., Ibrahim S.A. (1987). The plant/soil concentration ratio for calcium, radium, lead and polonium : evidence for non linearity with reference to substrate concentration. *J. Environ. Radioactivity*, **5**, 123-142.
- 124.** Singh K.P. (1997). Uranium uptake by plants. *Current science*, **73**(6): 532-535.
- 125.** Slaveykova V.I., Wilkinson K.J. (2003). Effect of pH on Pb biouptake by the freshwater alga *Chlorella kesslerii*. *Environ. Chem. Lett.*
- 126.** Smith M.H., Alberts J.J. *et al.* (1981). Critical pathways of radionuclides to man from agroecosystems (NUREG-CR 3574, 1982 annual report).
- 127.** Smith F. W., Rae A. L., Hawkesford M.J. (2000). Molecular mechanisms of phosphate and sulfate transport in plants. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1465**: 236-245.
- 128.** Stebbing A.R.D. (1982). Hormesis - the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment*, **22**: 213-234.
- 129.** Stebbing A.R.D. (1997). A theory for growth hormesis. *BELLE Newsletter*, **6**(2): 1-11.
- 130.** Stoklasa J., Penkava J. (1928). The biology of uranium. *Biochemische Zeitschrift*, **194**: 15-76.

T

- 131.** Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, **51**(7): 844-851.
- 132.** Tevini M., Steinmueller D. (1985). Composition and function of plastoglobuli. II. Lipid composition of leaves and plastoglobuli during beech leaf senescence. *Planta*, **163**(1), 91-96.
- 133.** Touraine B. (2000). L'absorption racinaire. *Pour la Science*. janvier: 22-27.
- 134.** Tyler L.D., McBride M.B. (1982). Influence of Ca, pH and humic acid on Cd uptake. *Plant and Soil*, **64**: 259-262.

V

- 135.** Van der Lee J. (1998). Thermodynamic and mathematical concepts of CHESS. *Technical report*, LHM/RD/98/39, 99p.
- 136.** Van Netten C., Morley D.R. (1982). Uptake of uranium and molybdenum from uranium rich soils by Barley. *Intern. J. Environmental Studies*, **19**: 43-45.
- 137.** Verducci P. (1945). Comparative effect of radioactivity of uranium compounds on germination and development of seeds. *Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, **20**: 333-334.
- 138.** Vindimian E., Robaut C., Fillion G. (1983). A method for co-operative and non co-operative binding studies using non-linear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry*, **5**: 261-268.

W

- 139.** Wang, W. (1985). Use of millet root elongation for toxicity tests of phenolic compounds. *Environment International*, **11**(95-98).
- 140.** Wang W., Elseth G. (1990). Millet root elongation in toxicological studies of heavy metals : a mathematical model. *Plants for toxicity assessment*. L. RL. Philadelphia: 281-294.
- 141.** Whitehead N.E., Brooks R.R., and Peterson P.J. (1970). The nature of uranium occurrence in the leaves of *Coprosma australis* (A. Rich) Robinson. *Aust. J. Biol. Sci.*, **24**: 67-73.
- 142.** Wierzbicka M., Antosiewicz D. (1993). How lead can easily enter the food chain - a study of plants. *The Science of the Total Environment* : 423-429.
- 143.** Wong M.H., Bradshaw A.D. (1982). A comparison of the toxicity of heavy metals, using root elongation of rye grass, *Lolium perenne*. *New Phytologist*, **91**: 255-261.

Y

- 144.** Yamamoto T., Masuda K., Onishi N., Shimizu M. (1968). Studies on environmental contamination by uranium. Environmental survey of uranium in Kamisaibara Village, Okanawa Prefecture. *J. of Rad. Res.*, **9**: 92-99.
- 145.** Yamamoto T., Yunoki E., Yamakawa M., Shimizu M. (1973). Studies on environmental contamination by uranium 3. Effects of carbonate ion on uranium adsorption to and desorption from soils. *J. of Rad. Res.*, **14**: 219-224.

Résumé

L'uranium est un élément naturel trace dans l'environnement. Dans la solution du sol et en condition oxygène, il est présent à l'état d'oxydation +VI et peut former un grand nombre de complexes inorganiques ou organiques. En première approche, un ensemble d'expériences ont été mises en place de manière à appréhender les espèces d'uranium biodisponibles pour les racines des plantes. Le milieu d'exposition choisi, la solution nutritive, a été établie de manière à contrôler la spéciation de l'uranium en solution. Dans ce sens, le modèle de spéciation géochimique JCHESS a été utilisé pour déterminer les formes d'uranium en solution en fonction du pH et a permis de définir 3 domaines de pH pour lesquels une espèce dominait : le pH 4,9 avec l'ion uranyle, le pH 5,8 avec les hydroxocomplexes et le pH 7 avec les hydroxocomplexes carbonatés. Pour ces 3 pH, des expériences d'exposition ont été menées à court terme (5 heures) sur notre modèle biologique *Phaseolus vulgaris*. L'effet de cations compétiteurs (Ca^{2+}) et de ligands (phosphates et citrate) sur l'efficacité de la prise en charge de l'uranium par la racine a ainsi été testé. Les résultats ont montré que le transfert d'uranium n'était pas affecté par les cations Ca^{2+} , les phosphates ou le citrate (sauf une diminution de 60 % à pH 5,8 avec 10 μM de citrate) dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, les observations microscopiques (MET-EDAX) ont révélé l'association de l'uranium avec des granules riches en phosphore dans les cellules et la présence d'anomalies des chloroplastes. Enfin, la présence d'uranium affecte la CEC racinaire en la réduisant et provoque une stimulation de l'élongation racinaire à faible concentration (100 nM, 400 nM et 2 μM aux pH 4,9, 5,8 et 7 respectivement) et une inhibition à plus forte concentration.

Mots clés : uranium, spéciation, transfert, modèle

Abstract

Uranium exists naturally in the environment, usually present in trace quantities. In soil solution and oxic conditions, uranium is present in the +VI oxidation state and forms a large number of inorganic and organic complexes. The exposure medium, an artificial soil solution, was designed in such a way as to control the uranium species in solution. The geochemical speciation code JCHESS was used to calculate the uranium aqueous species concentrations and to define three domains of interest, each of them characterized by a limited number of dominant U species. These domains were defined as follows: pH 4.9 with uranyl ions as dominant species, pH 5.8 with hydroxyl complexes and pH 7 where carbonates play a major role. For each pH, short-duration (5 hours of exposure) well-defined laboratory experiments were carried out with *Phaseolus vulgaris* as plant model. The effect of competitive ions such as Ca^{2+} or the presence of ligands such as phosphate or citrate on root assimilation efficiency was explored. Results have shown that uranium transfer was not affected by the presence of calcium, phosphate or citrate (but was decreased of 60 % with citrate (10 μM) at pH 5.8) in our experimental conditions. Moreover, observations in Transmission Electronic Microscopy (TEM), equipped with an EDAX probe, have shown that uranium was associated with granules rich in phosphorus and that there were some chloroplastic anomalies. Finally, the presence of uranium affects root CEC by reducing it and stimulates root elongation at low uranium concentrations (100 nM, 400 nM and 2 μM at pHs 4.9, 5.8 et 7 respectively) and inhibits it at high uranium concentrations.

Keywords : uranium, speciation, transfer, model

