

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

Effet de l'exsudation de citrate chez le lupin blanc sur la phytodisponibilité de l'uranium

Antoine Tailliez

Juillet 2013

ISRN/IRSN-2015/183

L2BT - Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et
Transfert des radionucléides



Système de management
de la qualité IRSN certifié

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

École Doctorale 251 - Sciences de l'Environnement - Aix-Marseille Université

DOCTORAT

Spécialité : Sciences de l'Environnement Terrestre

Antoine Tailliez

Effet de l'exsudation de citrate chez le lupin blanc sur la phytodisponibilité de l'uranium

Thèse dirigée par Catherine KELLER
et encadrée par Pascale HENNER

Soutenue le 8 juillet 2013

Devant le jury composé de :

- Pr. Camille DUMAT, ENSA Toulouse/ECOLAB, rapporteur
- Pr. Guillaume ECHEVARRIA, ENSAIA Nancy/Université de Lorraine, rapporteur
- Pr. Rainer SCHULIN, ETHZ, Suisse, examinateur
- Dr. Emmanuel DOELSCH, CIRAD, examinateur
- Pr. Catherine KELLER, CEREGE-AMU, directrice de thèse
- Dr. Pascale HENNER, IRSN/L2BT, co-directrice de thèse

Remerciements

Après trois années passées à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire au sein du Laboratoire de Biogéochimie, Biodisponibilité et Transferts des radionucléides, le temps de refermer ce long chapitre de ma vie est enfin venu.

Avant toute chose je tiens à remercier Camille DUMAT, Guillaume ECHEVARRIA, Rainer SCHULIN et Emmanuel DOELSCH, les membres du jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail.

Je me souviens avec un brin de nostalgie des premiers contacts que j'ai eu avec Pascale HENNER et des premiers mails que nous avons échangés lorsque je souhaitais en savoir davantage sur le sujet de thèse que tu proposais. Vu leur longueur j'aurais dû me douter que j'allais avoir affaire à une sacrée pipelette ! Moi, naïf, je me suis focaliser sur la précision que tu mettais dans tes réponses et sur ton implication dans le sujet. Au final je n'ai pas eu tort, tu as été une super encadrante, toujours à l'écoute, toujours en train de tout remettre en cause et toujours encline à trouver des solutions aux nombreux problèmes inextricables qui ont fait de cette thèse une aventure inoubliable à tous points de vue. Je te remercie pour tout, pour ton caractère acharné dans le travail mais aussi pour toutes les discussions extra-scolaires que nous avons pu avoir pendant ces trois années. J'espère ne pas avoir été un thésard trop dissipé et j'espère aussi que mon caractère très (trop ?) relativiste dans les moments délicats ne t'a pas valu de trop nombreuses montées de stress ! Je te l'avais bien dit qu'on réussirait à le faire pousser ce lupin avec ou sans phytotron (elle est pas démente ma GrowBox ?), à les avoir ces foutues racines protéoïdes et à le doser ce citrate ! Maintenant je peux en rire mais sur le moment je n'en menais pas large quand même, crois-moi !

Je me souviens aussi du premier coup de téléphone de ma future directrice de thèse, Catherine KELLER, du sandwich surimi-mayo que j'étais en train de manger et du soleil qu'il faisait à Lille (si si je vous jure ça arrive !) quand le téléphone a sonné. Je me rappelle de la petite montée de stress du moment qui s'est très vite envolée pour faire place à une discussion agréable, comme toutes celles qui ont suivi au cours de la thèse. Tu as toujours été disponible quand cela s'est avéré nécessaire, tu m'as laissé la liberté dont j'avais besoin (pour faire des erreurs ?) et tu m'as permis de visiter un petit bout de Suisse très légèrement pentu par un magnifique jour de pluie ! Je me souviens que cette petite balade était tombée à pic, dans un moment plutôt difficile où rien n'allait au laboratoire et que ça m'avait permis de faire un peu le vide dans ma tête. . . mais pas dans mon estomac. . . Ah la la cette tartiflette au restaurant ! Un pur moment de bonheur ! Je te remercie bien évidemment pour tout et notamment pour le temps que tu consacres à l'heure où j'écris ces quelques lignes pour corriger toutes les bêtises que j'ai couchées dans ce manuscrit.

Je me souviens aussi de mes premiers pas au laboratoire et du jour de mon entretien. J'ai pu faire la connaissance de Rodolphe GILBIN, mon super chef de laboratoire, qui m'a tout de suite étonné par son calme et sa gentillesse. Ce fut un réel plaisir de te côtoyer et d'avoir travailler dans ta petite communauté. Je te remercie d'avoir donner ton

approbation quant à mon recrutement, tu m'as permis de réaliser le rêve que je caresse depuis mon premier cours de Biologie, faire une thèse et travailler dans la recherche ! Il est vrai que je ne voyais pas cela de la même manière avec mes yeux de collégien mais l'idée y était. Tu as été un chef idéal, toujours avenant, toujours à la recherche de compromis pour que tout aille pour le mieux dans le meilleur des mondes et toujours à l'écoute dans les bons comme dans les mauvais moments. J'espère que tu garderas toute la motivation qui te caractérise et qui permet de faire avancer les choses.

Je profite de ces remerciements pour faire de gros bisous à Claudine VAN CRASBECK, la championne des secrétaires, la meilleure parmi les meilleures, celle qui se plie en quatre pour nous éviter les cruelles taches administratives dont raffole l'IRSN et qui auraient vite pu devenir un véritable enfer. Tout n'a pas toujours été rose entre nous mais j'ai l'impression que le courant a fini par passer. Peut-être que tu regretteras un peu « l'ours » quand même ? En tout cas moi je suis sûr que je ne retrouverai jamais de « maman » comme toi sur mon prochain lieu de travail !

Je tiens bien évidemment à remercier toutes les personnes qui ont été impliquées dans les analyses nécessaires à l'obtention des résultats. Je n'aurais sans doute pas eu le quart du dixième de données sans votre intervention. Je pense tout particulièrement à Catherine LECOMTE-PRADINES dont l'éclair de génie a rendu possible l'analyse des exsudats racinaires. Encore aujourd'hui je ne sais pas comment j'aurais pu me sortir de l'impasse dans laquelle je m'étais perdu. Un très grand merci à Sylvie PIERRISNARD pour les longues heures que je t'ai obligé à passer devant la chromatographie ionique pour doser ce satané citrate. C'est bon on en a eu des pics ! Un grand merci également à Magali FLORIANI pour ton aide en microscopie électronique (j'espère que tu es toujours bien installée à Aix) et à Virginie CAMILLERI pour le temps que tu as consacré à l'observation de mes cellules de racines dans le noir et aux dosages du bon millier (quoi ? plus tu penses ?) d'échantillons passés en ICP-AES ! Bon, c'est vrai qu'ils étaient parfois un peu jaunes, mais il faut bien avouer que la couleur était vachement jolie quand même ! Je remercie également Sandrine FRELON pour les analyses faites en ICP-MS et c'est promis, je ne viderai plus le stock d'acide ultra-pur pour faire des minéralisations !

Après les analyses vient le temps des interprétations. Pour ces dernières je remercie notamment Frédéric COPPIN et Arnaud MARTIN-GARIN qui m'ont permis de comprendre un peu mieux le monde des réacteurs fermés, des Kd et des phénomènes de sorption/désorption. Votre aide m'a été précieuse pour mettre en place les protocoles expérimentaux et pour comprendre (dans la limite de ce qu'offre mon petit cerveau) tous ces tableaux de données qui n'avaient pour ainsi dire que peu de sens à mes yeux au début. Un grand merci à Laureline FÉVRIER pour les nombreuses discussions relatives à CHESS et aux modélisations qui ont découlées de son utilisation. J'ai aussi une pensée toute particulière pour Claire DELLA-VEDOVA pour le bon mois et demi passé à analyser mes jeux de données. Tu m'as transmis ton amour pour les statistiques et permis de découvrir un magnifique livre de chevet dont je ne saurais plus me passer, le merveilleux R-Book ! Tu as peut-être généré un « monstre », certes, mais dans ce cas un gentil monstre !

J'ai bien sûr une pensée pour la petite famille du LRE (oui, j'avoue avoir du mal à me faire aux nouvelles dénominations). Dans l'ordre d'apparition de mes souvenirs et aussi un peu de la petite fiche que je me suis préparée pour n'oublier personne, merci à Nicolas DUBOURG, Jean-Marc BONZOM, Olivier SIMON, Béatrice GAGNAIRE, Frédéric ALONZO, Christelle ADAM, Isabelle CAVALIÉ, Jean-François GUERRE-CHALEY, Daniel ORJOLLET, Sandrine PEREIRA et John MULLER. Un merci tout particulier à Nadine CAUVIN pour les heures passées à discuter de tout et surtout de rien, pour le stock de bonbons toujours disponible dans ton bureau, pour la soupe au pistou, et pour les crêpes

et autres gâteaux qui ont régulièrement sublimé les pauses café! Je tiens également à remercier Pierre HURTEVENT pour ce qu'il est, une force tranquille qui m'a très souvent permis de relativiser, un collègue de boulot génial et surtout un puits de connaissances avec qui le moindre sujet de discussion prend une tournure philosophique délicieuse. Merci pour tous les conseils de lecture, je ne suis pas prêt d'oublier les nuits que j'ai passées à lire Hypérion au lieu de travailler en attendant impatiemment de pouvoir discuter de cette épopée le lendemain autour d'un café et d'une cigarette. N'oublie pas, la sûreté nucléaire n'attend jamais! J'espère bien évidemment n'avoir oublié personne, j'ai bien creusé et toute omission serait purement fortuite!

Place à la nouvelle génération, aux jeunes, à toutes ces petites mains qui travaillent d'arrache-pied pour rendre leur rapport de stage ou leur thèse. Je veux bien sûr parler de tous les stagiaires et doctorants que j'ai eu la chance de croiser au cours de ces trois années et qui ont fait de chaque jour passé au laboratoire un moment inoubliable. C'était chouette de partager ces moments avec vous, de pouvoir cracher sur nos manipulations foireuses et d'oublier tout cela le temps d'un repas, d'une excursion à cheval, d'une randonnée ou au détour des soirées bien arrosées que l'on a partagées. Je pense bien sûr à Guillaume BUCHER, Nicolas THEODORAKOPOULOS, Simona AL-KADISSI, Delphine PLAIRE, Vincent LAMIRAND, Nicolas LOFFREDO, Solène COTEL, Adrien MARGERIT, Adeline GOUSSEN, Audrey STERNALSKI et Iris BARJHOX. J'ai une pensée toute particulière pour Starrlight AUGUSTINE (passe le bonjour à Manu le geek qui doit me faire un ordinateur quantique) et notamment quand je me remémore toutes les discussions formidables que l'on a pu avoir sur la vie, la Science et sur L^AT_EX (quoique L^AT_EX c'est un peu la vie aussi...). Merci pour les fabuleuses lasagnes que tu m'as cuisinées qui n'étaient pas du tout râtées contrairement à ce que tu penses, et pour m'avoir permis de rencontrer des gens tout à fait hors normes à la soirée que tu as organisée pour célébrer ton titre de docteur. J'ai bien sûr une pensée nostalgique pour le parigot, Florian PARISOT, mais honnêtement toi je ne sais pas s'il faut vraiment que je te remercie parce que mon foie a pris facile dix ans depuis que je t'ai rencontré. J'ai en mémoire un millier de souvenirs (enfin surtout des bribes) dont je ne peux, malheureusement, pas parler ici mais qui resteront gravés dans un coin de ma tête! J'espère te revoir un de ces quatre sur Lille, il me semble que tu avais bien aimé la petite soirée de l'espââââââce la veille du mariage de Barberousse dans mon fief! Ce mêêêêc quoi! Désolé pour les deux bonhommes que j'ai volontairement omis dans ce paragraphe, votre tour viendra plus tard!

Au sein de la jeune génération, il en est un qui mériterait une thèse à lui seul : Félix BRÉDOIRE! Le grand, le beau, l'unique, que dis-je le fantastique Félix! Stagiaire de la dernière chance qui a abattu un travail de dingue pendant six mois. Je pense que ce n'est pas un euphémisme de dire que tu as en partie sauvé ma thèse. Ce fut un immense plaisir de te connaître et de travailler avec toi. Tu posais beaucoup de questions mais c'était souvent constructif. J'espère ne pas t'avoir traumatisé mais visiblement ce n'est pas le cas puisque tu as finalement choisi le côté obscur de la force en t'engageant dans une thèse qui te fait visiter la Sibérie. J'espère que tu te plais dans ce que tu fais et que je t'ai transmis deux/trois petites choses qui te permettront de t'aguerrir dans la brillante carrière de chercheur qui s'offre à toi. En tout cas je n'oublierai pas de sitôt tous les moments que nous avons partagés dans le bureau à parler boulot devant le tableau Velleda ou à composer des musiques magnifiques le jour de la célébration du 78^e anniversaire de la naissance de Robert Moog (deuxième réponse de Google en tapant « synthétiseur google » pour les curieux!). Je n'oublierai pas non plus les péripéties au laboratoire (dédicace à la centrifugeuse du 186), les trajets en Ford Escort ni ton imitation incroyable de cette... personne croisée au sanatorium dans ce bled paumé quand tu nous as perdu

pour aller à l'excursion en bidet ! Je pourrais continuer longtemps mais il se fait tard et il me reste encore quelques personnes à évoquer. Chapeau bas l'artiste !

Pendant mes trois années de thèse j'ai eu la chance incroyable de pouvoir garder un lien permanent avec mon Nord-Pas-de-Calais natal ! Je le dois à notre merveilleuse coloc' nordiste ! Là aussi il me faudrait sans doute bien plus que les quelques lignes de ces remerciements pour détailler tous les souvenirs que je garde de cette expérience. Comment résumer les trois années que j'ai passées avec Morgan DUTILLEUL, Phillippe BRUNET ou Benoit GOUSSEN ? Entre les soirées, les repas, les sorties, les sessions plage, difficile de faire le tri ! Un grand merci à Philips avec qui j'aurai cohabité pendant le plus long moment. Tu resteras à tout jamais le bariton de l'appart', un compositeur hors-pair et un pianiste de renommée internationale. J'espère que tu es toujours aussi créatif et que tu t'es décidé à coucher sur le papier toutes tes créations. Tu m'auras bien fait marrer et j'attends avec impatience de te recroiser pour que tu m'apprennes à danser avec un balai ! Je remercie également Benoit le sage. Ton calme et ton flegme à toute épreuve m'ont toujours étonné. J'espère que l'on aura de nouveau l'occasion de cuisiner une carbonnade, une moule-frite ou un welsch ensemble, ceux que je mange ici n'ont plus la même saveur désormais. . . Il faudra quand même que l'on se perfectionne sur le dernier car il faut bien admettre qu'il était un peu lourd, mon estomac s'en souvient encore ! Pareil pour la tarte au sucre, notre seul véritable échec. Enfin je remercie Morgan (à prononcer comme ça s'écrit) pour toutes les qualités qui font de toi ce que tu es. Un super coloc, un super collègue et un super pote. Les souvenirs ne manquent pas, mais forcément le premier qui me vient à l'esprit est le soir de la compétition de snowboard des jeux olympiques. Mémorable ! Le réveil le fut tout autant (« c'est pas banal ») et je pense que Solène et Nico s'en souviendront un moment. Je te souhaite bien sûr le meilleur pour le futur et je te promets qu'un jour je viendrai à une soirée salsa ! Grâce à toi j'ai fait la connaissance de Matthieu LEROY et en y réfléchissant bien je pense qu'il a tout à fait sa place parmi les colocs. Le meilleur conteur d'histoires que je connais, l'as de l'explication du gros poulet (désolé de t'avoir fait ré-expliciter aussi souvent), tu es devenu un ami avec qui j'ai pu satisfaire mon amour pour les jeux vidéos, d'ailleurs il serait temps qu'on se le termine le mode armageddon de Diablo III quand même. Physicien parmi les physiciens, nos discussions sur la quantique resteront parmi les moments mémorables de ces trois années ! J'espère que tu en finiras bientôt avec tes calculs et tes modélisations, tu ne m'en voudras pas si je ne suis pas plus précis lorsque j'évoque ta thèse parce qu'entre nous je n'ai toujours pas compris ce que tu fais ! J'espère qu'on se recroisera bientôt sur Lille ou Marseille, au plus tard pour le traditionnel nouvel an entre russes auquel tu appartiens désormais.

Nouvel an entre russes, la transition est toute trouvée pour remercier les chevaliers de l'apocalypse, les faux rebelles, les VIKANOV. . . Les surnoms ne manquent pas quand je pense à Mathieu LOUAFI (de son vrai nom Igor), Baptiste TURQUET (en réalité Boris) et Gaël QUENTEL (le seul et unique Sergey). Même si j'ai un peu bougé jusqu'en Master 2, la séparation de trois ans n'a pas toujours été facile à vivre et je me dis qu'on en a des choses à rattraper. Les quelques weekends à Lille au cours desquels je vous ai retrouvés ont été salvateurs, des retours aux sources indispensables. On se connaît depuis tellement longtemps que ce serait un affront de ressortir un souvenir en particulier. J'espère simplement que l'on aura encore l'occasion de partager un milliard de choses ensemble (depuis mon retour ça semble plutôt bien engagé) et que mon futur boulot ne m'emmènera pas à l'autre bout du monde afin que l'on garde un peu plus le contact ! En guise de message personnel : Igor j'ai hâte de goûter la bière que tu as brassée, Boris je te donne rendez-vous sur la glace pour la reprise du hockey en septembre, et Sergey s'il te plaît arrête de te plaindre et évite de me faire un contrôle fiscal ! En tout cas maintenant que

vos noms sont couchés sur le papier vous avez intérêt à me lire les mecs, vous verrez c'est trop passionnant le lupin blanc, l'uranium et le citrate ! Si si, j'vous jure !

Après les amis vient le tour de la famille, inévitablement. J'ai une énorme pensée pour mon petit frère Vincent qui, je n'en doute pas, deviendra un grand monsieur. La vie n'est pas un long fleuve tranquille mais en choisissant la bonne embarcation le voyage peut être moins tumultueux. Évite de choisir le hors-bord, prends plutôt une péniche ! Conseil de frangin. Je remercie bien évidemment mes parents pour m'avoir permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui, pour votre amour, pour m'avoir toujours plus ou moins soutenu dans le choix de mes études (médecine c'était pas fait pour moi maman !) et pour m'avoir offert les moyens intellectuel et financier qui me permettent aujourd'hui de vous citer avec un grand plaisir dans ce qui bouclera définitivement ma vie d'étudiant et me donnera l'opportunité de voler de mes propres ailes. Catherine et Jean-Michel vous pouvez être fiers de vous.

Je ne pensais vraiment pas écrire autant ce soir, la fin est proche, mais ces remerciements ne pourraient pas être complets sans remercier profondément Stéphanie BARON. Nous nous sommes rencontrés à Lille trois semaines avant que je parte pour Aix en Provence, le pari n'était pas gagné d'avance, mais nous voilà aujourd'hui tous les deux. Quelle plus belle réussite que d'avoir parcouru ces trois années avec la distance qui nous séparait ? Tu as toujours été là pour moi, tu m'as toujours soutenu, à mon tour d'essayer de te rendre la pareille. T'avoir dans ma vie est la plus belle des choses qui soit et j'espère que tu me supporteras encore longtemps.

À la mémoire de Monique, Herminie et Roger...

Table des matières

Remerciements	iii
Table des matières	ix
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
I Introduction générale	1
II État de l'art	7
1 L'uranium, un radionucléide naturel	11
1.1 Quelques généralités	11
1.1.1 Origines naturelles et anthropiques	11
1.1.2 Concentrations naturelles dans les écosystèmes	11
1.1.3 L'exploitation minière en France	12
1.2 Propriétés physico-chimiques et nucléaires	15
1.2.1 Uranium naturel	15
1.2.2 Uranium appauvri	15
1.3 L'uranium dans les sols	15
1.3.1 Comportement dans la solution du sol	16
1.3.2 Influence des constituants solides du sol sur la dynamique de l'uranium	17
2 L'uranium dans les plantes	19
2.1 L'uranium dans le système sol/plante	19
2.1.1 Le transfert du sol à la plante	19
2.1.2 Analogies entre contaminants et nutriments	20
2.1.3 La bioaccumulation de l'uranium en chiffres	21
2.1.4 Localisation et microlocalisation de l'uranium accumulé par les plantes	23
2.2 Effet stimulant des faibles doses : l'hormèse	26
2.3 Seuils de toxicité de l'uranium	27
2.4 Les effets négatifs de l'uranium sur la croissance et le développement . . .	28
2.4.1 Effets sur la germination	28
2.4.2 Effets sur l'élongation racinaire	29
2.4.3 Effets sur la production de biomasse	30
2.4.4 Effets physiologiques et subcellulaires	30

3	Concepts de disponibilité et de biodisponibilité	33
3.1	La disponibilité environnementale	33
3.2	La biodisponibilité environnementale	34
3.3	La biodisponibilité toxicologique	34
4	Comment estimer la biodisponibilité ?	37
4.1	Les méthodes chimiques	37
4.1.1	Les extractions	38
4.1.2	Les approches mécanistes	39
4.1.3	Les préleveurs passifs	40
4.2	Les méthodes isotopiques	41
4.3	Les méthodes biologiques	43
4.3.1	Les tests biochimiques prédictifs	43
4.3.2	Les tests d'accumulation et de toxicité non prédictifs	44
5	Les Mécanismes rhizosphériques	45
5.1	Le prélèvement d'ions et de nutriments	45
5.2	L'exsudation racinaire	45
5.2.1	L'exsudation d'acides organiques	46
5.2.2	Un exemple concret : l'exsudation de citrate lors de carence en phosphore	48
5.2.3	Essais de phytoremédiation de l'uranium avec le citrate	49
5.3	L'oxydo-réduction des métaux déficients en électrons	49
5.4	Action de l'acide carbonique	51
6	Conclusions, perspectives et objectifs de recherche	53
 III Matériel & méthodes		 57
7	Informations génériques	61
7.1	Composition de la solution nutritive utilisée	61
7.2	Prélèvement et conservation des sols utilisés	61
7.3	Préparation des graines de lupin blanc avant manipulation	62
7.4	Conditions de culture	64
8	Protocole expérimental n° 1 : hydroponie	65
8.1	Concept et intérêt de la méthode	65
8.2	Plan expérimental	65
9	Protocole expérimental n° 2 : réacteurs fermés	69
9.1	Concept et intérêt de la méthode	69
9.2	Plan expérimental	70
10	Protocole expérimental n° 3 : rhizotests	71
10.1	Concept et intérêt de la méthode	71
10.2	Plan expérimental	71
10.2.1	Pré-culture en hydroponie	71
10.2.2	Mise en contact du tapis racinaire avec la couche de sol	72
10.2.3	Suivi de l'expérimentation	72

11 Techniques analytiques	73
11.1 Pesée et séchage	73
11.2 Suivi des solutions et dosages	73
11.3 Collecte des exsudats racinaires	73
11.4 Minéralisation du matériel végétal	74
11.5 Microscopie électronique	75
11.6 Analyses statistiques	75
IV Effets du phosphore et de l'uranium sur le comportement du lupin blanc en hydroponie	77
12 Résultats : hydroponie	81
12.1 Évolution du pH dans le milieu de culture	81
12.2 Croissance et développement du lupin blanc	82
12.2.1 Production et allocation de la biomasse	82
12.2.2 Développement foliaire	82
12.2.3 Production de clusters	84
12.3 Exsudation de citrate	87
12.4 Transfert de l'uranium au lupin blanc	87
12.4.1 Accumulation dans le végétal	87
12.4.2 Translocation des racines aux parties aériennes	89
12.5 Microlocalisation de l'uranium et effet sur l'ultrastructure des tissus racinaires	90
13 Discussion : hydroponie	93
13.1 Effet de l'uranium sur le développement des racines protéoïdes	93
13.2 Effets conjoints de l'uranium et du phosphore sur l'allocation de la biomasse	94
13.3 Effet de l'uranium sur l'exsudation de citrate	95
13.4 Influence de l'apport en phosphore et de l'exsudation de citrate sur l'accumulation et la translocation de l'uranium	96
V Effets du phosphore et du citrate sur la remobilisation de l'uranium en réacteur fermé	99
14 Résultats : réacteurs fermés	103
14.1 Méthode de calcul des échanges minéraux entre sol et solution d'incubation	103
14.2 L'uranium dans les réacteurs fermés	104
14.2.1 Quantités d'uranium échangée entre sol et solution	104
14.2.2 Coefficients de partage solide-liquide de l'uranium (Kd)	106
14.3 Comportement des cations et anions majeurs	107
14.3.1 Échange des cations majeurs	107
14.3.2 Corrélations monotones entre les comportements des cations et de l'uranium	107
14.3.3 Échange des anions majeurs et suivi des concentrations en citrate .	109
15 Discussion : réacteurs fermés	113
15.1 Comportement de l'uranium et caractéristiques du sol	114
15.2 Influence du citrate sur la remobilisation de l'uranium	115
15.2.1 Effet du citrate sur les pools d'uranium échangeable	115

15.2.2 Désorption rapide d'uranium et « priming effect »	116
15.2.3 L'extraction d'uranium gouvernée par l'état physique du sol	117
15.3 Bilan et perspectives	117
VI Phytodisponibilité de l'uranium chez le lupin blanc mesurée sur rhizotest	121
16 Résultats : rhizotests	125
16.1 Croissance et développement du lupin blanc sur rhizotest	125
16.1.1 Production et allocation de la biomasse	125
16.1.2 Évolution du tapis racinaire et apparition des racines protéoïdes	126
16.2 Flux de solution nutritive au travers des rhizotests	128
16.3 Exsudation racinaire	129
16.3.1 Exsudation de citrate	129
16.3.2 Exsudation d'autres composés	130
16.4 Accumulation et allocation de l'uranium dans les plantes	131
16.4.1 Accumulation dans les racines	131
16.4.2 Accumulation dans les parties aériennes	131
16.4.3 Transfert de l'uranium des racines aux parties aériennes	131
16.4.4 Accumulation d'autres éléments	133
17 Discussion : rhizotests	135
17.1 Quel bilan tirer de l'expérience en rhizotest ?	135
17.1.1 Le rhizotest ne permet pas d'observer de signes extérieurs de carence chez le lupin blanc	135
17.1.2 Le contact entre tapis racinaire et sol semble stimuler l'exsudation de citrate	137
17.1.3 Le lupin blanc a accumulé de faibles quantités d'uranium issu du sol	138
VII Conclusion générale	141
VIII Références bibliographiques	149
IX Annexes	173
A Documents complémentaires	177
B Valorisation de la thèse	189
B.1 Activités au sein de la communauté scientifique	189
B.2 Article publié dans le <i>Journal of Environmental Radioactivity</i>	191
C Encadrement	203
D Résumés de la thèse	207
D.1 Version française	207
D.2 English version	208

Liste des figures

1.1	Localisation des zones minières d'uranium en France	13
1.2	Photographies de dépôts de stériles miniers	13
1.3	Stockages réaménagés de résidus miniers	14
2.1	Accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes d'espèces mono- et dicotylédones	22
2.2	Accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes de plantes cultivées sur sol	22
2.3	Accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes de la moutarde indienne et du maïs	24
2.4	Localisation de l'uranium sur une coupe transversale de l'apex racinaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
2.5	Microlocalisation de l'uranium dans des cellules racinaires d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.6	Schématisation d'une courbe dose-réponse décrivant le phénomène d'hormèse	26
3.1	Concepts de la (bio)disponibilité	35
4.1	Schématisation de la réponse des essais chimiques et des essais biologiques	37
4.2	Schéma explicatif de la dilution isotopique	42
4.3	Représentation mamellaire de la phytodisponibilité	42
5.1	Schéma des flux et réservoirs d'acides organiques dans les sols	47
5.2	Schématisation de racines protéoïdes	49
5.3	Schématisation du métabolisme des racines protéoïdes lors de carence en phosphore	50
7.1	Photographies du « Germinem' »	64
8.1	Schéma du déroulement de la manipulation en hydroponie	66
9.1	Schéma d'un réacteur fermé.	69
10.1	Schéma d'un rhizotest.	71
12.1	Évolution du pH de la solution nutritive	81
12.2	Production de biomasse du lupin blanc	83
12.3	Rapport de masses racines/parties aériennes	84
12.4	Développement du lupin blanc : feuilles et clusters	85
12.5	Photographie du lupin blanc 49 jours après initiation de la germination . .	86
12.6	Exsudation de citrate par les racines du lupin blanc	88
12.7	Concentration d'uranium dans les racines et parties aériennes	89

12.8	Ultrastructure des tissus racinaires et microlocalisation de l'uranium	91
14.1	Uranium échangé dans les réacteurs fermés	105
16.1	Production de feuilles sur rhizotest	125
16.2	Photographies des parties aériennes du lupin blanc sur rhizotest.	126
16.3	Production de biomasse sur rhizotest	127
16.4	Aspect des tapis racinaires	128
16.5	Flux de solution (évapo)transpirée en rhizotest.	129
16.6	Exsudation racinaire de citrate mesurée en rhizotest.	130
16.7	Accumulation d'uranium dans les tissus végétaux en rhizotest	132
A.1	Accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes	179
A.2	K_d désorption de l'uranium en réacteurs fermés	188
B.1	Article publié dans le <i>Journal of Environmental Radioactivity</i>	191

Liste des tableaux

1.1	Production mondiale d'uranium en 2011	12
1.2	Série de désintégration de ^{238}U	14
1.3	Comparaison des masses et activités de l'uranium naturel et appauvri . . .	15
2.1	Facteurs de transfert de l'uranium	20
2.2	Effet de la concentration en uranium sur le rendement du blé et de la tomate	27
2.3	Propriétés de sols utilisés pour caractériser les capacités germinatives du maïs	29
4.1	Valeurs de K_d de l'uranium en système sol/solution en fonction de la texture	39
4.2	Valeurs de K_d de l'uranium en système sol/solution en fonction du pH . . .	39
7.1	Composition en macroéléments de la solution nutritive	61
7.2	Composition en microéléments de la solution nutritive	61
7.3	Caractéristiques du sol étudié en réacteurs fermés et sur rhizotest	63
8.1	Simulation CHESS de la solution nutritive : distribution de U et Pi	67
11.1	Composition de la solution utilisée pour la collecte des acides organiques .	74
12.1	Rapport de concentration d'uranium parties aériennes/racines	90
14.1	Quantités d'uranium remobilisé dans les réacteurs fermés en série et continu	106
14.2	K_d désorption de l'uranium en réacteurs fermés	108
14.3	Remobilisation du fer dans les réacteurs fermés en série au jour 1	109
14.4	Coefficients de corrélation de SPEARMAN calculés avec les données des ré- acteurs fermés	109
14.5	Échanges de citrate et d'oxalate entre le sol et la solution d'incubation en réacteur fermé	111
A.1	Détail de la préparation des solutions stocks	178
A.2	Désorption et Resorption des cations majeurs en réacteur fermé	180
A.3	Désorption et Resorption des anions majeurs en réacteur fermé	181
A.4	Flux d'acides organiques mesurés sur les rhizotests (nmol X g^{-1} MS raci- naire h^{-1})	182
A.5	Flux d'acides organiques sur les rhizotests entiers (6 plantes) (nmol X par rhizotest h^{-1})	183
A.6	Flux d'anions majeurs mesurés sur les rhizotests (mg X g^{-1} MS racinaire h^{-1})	184
A.7	Accumulation des cations dans les racines et parties aériennes sur rhizotests	185
A.8	Facteurs de transfert de l'uranium du sol à la plante - plage 1	186
A.9	Facteurs de transfert de l'uranium du sol à la plante - plage 2	187

PARTIE I

Introduction générale

Les sols sont à la fois un outil de production (aliments et biomasse), un réacteur et un filtre (stockage et transformation des minéraux, de matières organiques, d'eau et de substances chimiques) et une source de matières premières (minéraux, tourbe, etc.). En ce sens ils font l'objet d'une surveillance régulière permettant d'évaluer leur fertilité et leur qualité biologique et de suivre l'évolution de leurs stocks (matière organique, éléments traces, etc.) et des flux de contaminants.

Dans ces sols, l'uranium est un actinide présent à l'état de traces (0.5 et 5 mg kg⁻¹) dont la teneur peut fortement augmenter naturellement pour atteindre plusieurs centaines de mg kg⁻¹ de sol dans les zones uranifères (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Les activités anthropiques telles que l'utilisation militaire d'uranium appauvri ou les activités liées au cycle du combustible nucléaire peuvent également augmenter le stock du sol. De la même manière, l'utilisation intensive dans les agrosystèmes d'engrais issus de roches phosphatées est une source majeure de contamination. En effet, ces dernières peuvent contenir plusieurs centaines de mg U kg⁻¹ entre autre impureté (Romero Guzmán et collab., 2002). Les sols deviennent ainsi un réservoir potentiel de contamination en uranium pour les organismes qui interagissent avec lui, en premier lieu les plantes supérieures terrestres.

Le transfert de l'uranium aux plantes est très variable. Les valeurs de facteur de transfert sont globalement comprises entre 10⁻⁵ et 10⁻². Sheppard et collab. (2006) proposent des valeurs moyennes de 2 × 10⁻³ ou de 8 × 10⁻⁴ pour les végétaux consommés et de 3 × 10⁻³ pour les fourrages et la végétation naturelle. La répartition dans le végétal est de plus très hétérogène. L'uranium présente en effet une très grande affinité pour les racines des plantes et des concentrations pouvant atteindre 10 à 15 mg U g⁻¹ MS racinaires sont parfois observées (Dushenkov et collab., 1997; Laroche, 2005).

L'uranium n'a aucune fonction physiologique connue et a des effets toxiques avérés. Ceux-ci concernent principalement une inhibition des paramètres de croissance et de développement tels que le rendement (Sheppard et Evenden, 1992) ou l'élongation racinaire (Laroche, 2005). D'autres études ont aussi montré un effet sur les chlorophylles (Aery et Jain, 1997), le stress oxydant (Vandenhove et collab., 2006; Vanhoudt et collab., 2008) ou la perturbation de l'homéostasie phosphatée (Misson et collab., 2009). L'analyse critique des données disponibles montre qu'il existe un manque criant de données pertinentes relatives à la dynamique du devenir de l'uranium à l'interface sol/racine et à sa biodisponibilité environnementale, pouvant expliquer à la fois le large éventail de concentrations d'uranium dans le sol décrit pour un même niveau d'effet mais aussi la difficulté d'extrapoler une teneur en uranium dans le sol prévue sans effet utilisable dans le cadre d'une analyse de risque. Selon les espèces et les caractères observés, les concentrations provoquant un effet toxique peuvent effectivement varier de 0.5 à 1000 mg U kg⁻¹ de sol sec (Sheppard et collab., 2005). Le fait que les doses d'irradiation correspondant à ces valeurs pondérales soient nettement inférieures aux doses connues pour avoir un effet néfaste sur les végétaux justifie de considérer l'uranium en tant qu'élément trace métallique (ETM) dans cette étude.

L'absorption des éléments par les racines découle d'un ensemble de processus parmi lesquels on retrouve l'alimentation de la solution du sol par la phase solide pendant la durée de culture de la plante (fourniture), le transport vers la racine et l'absorption à proprement parler. Comme pour d'autres métaux, les paramètres gouvernant le devenir de l'uranium dans le sol en absence de plante sont relativement bien connus mais la capacité du sol à réalimenter la phase liquide sous forme phytodisponible l'est beaucoup moins, bien que ce processus soit considéré comme limitant cinétiquement le transfert. De plus, les mécanismes d'absorption de l'uranium restent inconnus. Dans les rares cas où les méthodes, les concepts ou les modèles développés dans le cadre des études de transferts

des métaux lourds aux plantes ont été appliqués à l'uranium, les résultats concernant la biodisponibilité de l'uranium dans le sol et le lien avec son transfert n'ont pas été concluants (Vandenhove et collab., 2007b,c).

Concernant la description des processus, il est admis que les conditions physico-chimiques et biologiques dans la rhizosphère sont différentes de celles du sol non rhizosphérique. Celles-ci sont influencées de manière dynamique par l'activité des racines (respiration, absorption d'éléments, relargage de molécules organiques, quantité de microorganismes (Hinsinger et collab., 2006)) et il est probable que ces variations dans la rhizosphère puissent avoir des conséquences sur la biodisponibilité de l'uranium, notamment en modifiant sa spéciation, sa solubilité ou la labilité de ses complexes avec la phase solide ou en solution. Il n'est donc pas étonnant que les méthodes basées sur la modélisation de la spéciation théorique à l'équilibre de l'uranium dans le milieu conduite à l'aide de logiciels dédiés (CHESS par exemple) montrent leurs limites lors de l'application dans un système sous influence de racines. Malgré tout, au niveau conceptuel comme au niveau de la modélisation, l'influence potentielle de la plante sur la dynamique du système est rarement prise en compte. C'est par exemple le cas lors de l'utilisation des facteurs de transfert qui est subordonnée au respect de certaines hypothèses dont une est l'absence d'effet de la plante sur son milieu.

Comme le suggèrent les données récentes acquises sur le cuivre par Bravin (2008), il semble nécessaire d'aller au-delà de ces approches classiques intégratrices. Cela implique d'une part de prendre en compte l'influence des racines sur leur milieu pour mieux comprendre la biodisponibilité et d'autre part d'intégrer la dimension cinétique des différents processus.

Ce manuscrit est composé de cinq parties principales découpées en 17 chapitres. La première partie bibliographique (chapitres 1 à 6) présente le radionucléide uranium, quelques généralités sur ses origines et son utilité dans l'industrie, ainsi que les propriétés physico-chimiques qui gouvernent son comportement dans les sols et influencent son transfert aux plantes. Les concepts de disponibilité et de biodisponibilité ainsi que les méthodes expérimentales permettant de les évaluer sont ensuite exposés. Après un bref rappel de ce que représente la rhizosphère, les mécanismes physiologiques susceptibles d'influencer la phytodisponibilité de l'uranium dans ce compartiment du sol sont détaillés. Cet état de l'art s'achève sur un rappel des connaissances actuelles, sur les questions qu'elles suscitent et sur les hypothèses qui en découlent pour finalement décrire les perspectives de recherche qui font l'objet des travaux conduits au cours de la thèse.

La deuxième partie méthodologique (chapitres 7 à 11) regroupe des informations générales et décrit les techniques analytiques qui ont amené à l'acquisition des résultats présentés dans le mémoire. Les différents protocoles ayant permis d'étudier le comportement du lupin blanc en hydroponie, le rôle du citrate sur la remobilisation de l'uranium en réacteurs fermés, et la phytodisponibilité de l'uranium en rhizotest sont également détaillés. Ces trois dispositifs ont été choisis pour répondre de la manière la plus adéquate possible aux différentes questions posées. L'hydroponie favorise en effet un contrôle précis des conditions de culture et des facteurs à étudier (nutrition, contamination, etc.), les réacteurs fermés permettent l'étude de la mobilité des éléments chimiques dans un sol *via* la détermination du coefficient de partage sol/solution (K_d) tout en maîtrisant précisément les paramètres expérimentaux (OECD, 2000), et enfin le rhizotest est un outil spécialement développé pour l'étude des transferts sol/plante au niveau de la rhizosphère (Chaignon et Hinsinger, 2003).

Les troisième, quatrième et cinquième parties constituent le cœur du manuscrit. Les résultats des différentes expériences y sont présentés, analysés et discutés sur la base des

connaissances recueillies dans la littérature. Les trois parties suivent l'ordre logique de la réflexion menée au cours des travaux et décrivent dans un premier temps les résultats relatifs au système découplé – d'abord le système solution/racines en hydroponie (chapitres 12 et 13) puis le système sol/solution en réacteurs fermés (chapitres 14 et 15) – et dans un second temps le système complet sol/solution/racine avec les rhizotests (chapitres 16 et 17). Ce découpage permet d'apporter respectivement les informations relatives à l'effet de l'uranium sur l'exsudation de citrate (hydroponie) et à l'effet du citrate sur la remobilisation de l'uranium dans la solution du sol (réacteur fermé) pour finalement chercher à voir s'il existe une logique entre ces résultats et ce qui est observé lorsque sol et tapis racinaire sont mis en contact (rhizotest).

La discussion de la partie consacrée à l'étude sur rhizotests fera office de discussion transverse. Les résultats obtenus au cours de cette dernière expérience y seront analysés et discutés sur la base des diverses conclusions que nous avons pu tirer des expériences en hydroponie et en réacteurs fermés.

PARTIE II

État de l'art

Cette partie consacrée à la synthèse bibliographique est articulée autour des différentes notions permettant d'aborder le travail de recherche qui fait l'objet de ce manuscrit. Sans se prétendre exhaustif, cet état de l'art permet de faire un bilan global des connaissances ayant trait au vaste sujet des transferts entre sol et plante. Il se focalise toutefois sur l'uranium, sur le concept de (phyto)disponibilité et sur la rhizosphère, trois éléments au cœur du sujet et pour lesquels il est nécessaire de poser les bases théoriques.

L'état de l'art est divisé en six chapitres :

- des informations d'ordre général au sujet de l'uranium au chapitre 1 ;
- des connaissances relatives à son transfert aux plantes au chapitre 2 ;
- une description des concepts de disponibilité et de biodisponibilité au chapitre 3 ;
- un résumé des méthodes d'estimation de la biodisponibilité au chapitre 4 ;
- une liste des mécanismes racinaires influençant la phytodisponibilité au chapitre 5 ;
- un bilan permettant de poser les objectifs de recherche au chapitre 6.

Cette étude bibliographique a notamment permis de mieux appréhender le sujet de recherche initial, d'en définir les bornes et de formuler un certain nombre d'hypothèses quant au rôle que peuvent avoir les racines sur le transfert du contaminant du sol à la plante. En outre, il a permis de choisir l'espèce modèle que nous avons étudiée – le lupin blanc – et de nous focaliser sur l'exsudation de citrate comme potentiel acteur de la phytodisponibilité de l'uranium dans un sol.

1 L'uranium, un radionucléide naturel

1.1 Quelques généralités

1.1.1 Origines naturelles et anthropiques

L'uranium (U) est un élément naturel, ubiquiste et radioactif de la famille des actinides découvert en 1789 par Martin Heinrich Klaproth. Présent en quantités variables dans les roches, l'eau, l'air et la biosphère, il est très répandu dans les matériaux acides tels que les roches plutoniques, les roches volcaniques et les sédiments volcanoclastiques. Il entre également dans la composition de certains minéraux tels que la pechblende (variété amorphe du minéral) et l'uranite (UO_2) dans des concentrations variables (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Depuis 1939 et la découverte de la fission nucléaire, il est devenu un élément essentiel aux activités humaines. Son champ d'utilisation s'étend du domaine de la production d'énergie civile à celui de l'armement militaire. Il permet notamment la production d'armes, de blindages et d'électricité. Tous ces domaines consommateurs d'uranium sont autant de sources potentielles de contamination de l'environnement et des différentes chaînes trophiques. En agriculture, l'utilisation d'engrais phosphatés produits à l'aide de roches contenant parfois plusieurs centaines de mg U kg^{-1} sous forme d'impuretés est également une source de contamination des écosystèmes (Shishkunova et collab., 1989). L'uranium est caractérisé par une double toxicité chimique et radiologique. À l'instar de l'industrie du nucléaire, le risque radiologique (émission de radon notamment) préoccupe le grand public. Le risque chimique qui est beaucoup moins mis en avant fait toutefois l'objet de nombreuses études scientifiques.

1.1.2 Concentrations naturelles dans les écosystèmes

La teneur moyenne en uranium est supposée équivalente à celle des chondrites carbonatées, une catégorie de météorites dont la composition chimique est considérée comme étant représentative de la composition chimique initiale de la nébuleuse planétaire. En se basant sur cette hypothèse, la teneur moyenne en uranium de la Terre avoisinerait 0.01 à 0.02 g t^{-1} . La croûte terrestre contient à elle seule 46 à 77 % de l'uranium total, soit une concentration moyenne de 3 g t^{-1} (Bonin et Blanc, 2001). Peu présent dans les roches basiques, l'uranium est en revanche concentré dans les roches sédimentaires saturées en silice et les granites (3 à 4 g t^{-1}) et dans les roches phosphatées (20 à 120 g t^{-1}) (Langmuir, 1978). Dans les sols, la teneur en uranium est généralement faible, de l'ordre de 3 mg kg^{-1} de sol sec, néanmoins certains sols riches en phosphates présentent des concentrations pouvant atteindre 7 à 25 mg kg^{-1} (Plant et collab., 2003). Dans les eaux de surface oxygénées, l'uranium est mobile et peu concentré avec une teneur moyenne de 0.02 à $0.6 \mu\text{g l}^{-1}$ dans les rivières et océans (Bonin et Blanc, 2001). Enfin, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2001), l'air contient de 0.02 à 0.45 ng m^{-3} .

1.1.3 L'exploitation minière en France

L'exploitation minière a débuté après la seconde guerre mondiale et a pris fin en juin 2001 avec la fermeture du site de Jouac (Haute-Vienne). Au total, 210 sites répartis sur 25 départements ont été concernés par cette activité dont 8 sites avec usine (extraction de minerai) et 15 sites de stockage des résidus de traitement. Comparés aux gisements kazakhs, canadiens et australiens – les plus prolifiques du monde en 2011 comme l'indiquent les données du tableau 1.1 ci-dessous – les gisements exploités en France présentaient des teneurs relativement faibles de l'ordre du kg t^{-1} de minerai. Ils ont produit près de 76 kt d'uranium ce qui a nécessité l'extraction de 52 Mt de minerai et 200 Mt de roches stériles c.-à-d. des roches sans intérêt économique. Comme le montrent les cartes de la figure 1.1 ci-contre, les gisements se distribuent principalement sur le pourtour du Massif-Central, en Vendée, en Bretagne, en Alsace et dans une moindre mesure dans les Alpes et en Aquitaine.

TABLE 1.1: Tonnes d'uranium produites en 2011. Les pays pour lesquels les données sont des estimations sont suivis de la mention « est ». Données fournies par l'Association Mondiale du Nucléaire (2011).

Pays	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Kazakhstan	3719	4357	5279	6637	8521	14020	17803	19451
Canada	11597	11628	9862	9476	9000	10173	9783	9145
Australie	8982	9516	7593	8611	8430	7982	5900	5983
Niger	3282	3093	3434	3153	3032	3243	4198	4351
Namibie	3038	3147	3067	2879	4366	4626	4496	3258
Russie	3200	3431	3262	3413	3521	3564	3562	2993
Ouzbékistan	2016	2300	2260	2320	2283	2657	2874	3000
États-Unis	878	1039	1672	1654	1430	1453	1660	1537
Ukraine (est)	800	800	800	846	800	840	850	890
Chine (est)	750	750	750	712	769	1200	1350	1500
Malawi	–	–	–	–	–	104	670	846
Afrique du Sud	755	674	534	539	655	563	583	582
Inde (est)	230	230	177	270	271	290	400	400
Brésil	300	110	190	299	330	345	148	265
République Tchèque	412	408	359	306	263	258	254	229
Roumanie (est)	90	90	90	77	77	75	77	77
Allemagne	77	94	65	41	0	0	0	52
Pakistan (est)	45	45	45	45	45	50	45	45
France	7	7	5	4	5	8	7	6
Total mondial	40178	41719	39444	41282	43798	51450	54660	54610
tonnes (U_3O_8)	47382	49199	46516	48683	51651	60675	64461	64402
demande mondiale (en %)		65	62	64	68	78	78	85

D'un point de vue environnemental, cette activité minière a généré deux types de déchets – les stériles et les résidus de traitement – pour lesquels des aménagements spécifiques sont requis, tant en termes de sécurité radiologique et chimique qu'en termes de préservation des paysages. Les stériles proviennent directement de l'extraction du minerai et sont semblables aux roches présentes aux alentours des gisements. Ils sont relativement riches en uranium – les teneurs variant de quelques g t^{-1} à plusieurs centaines de g t^{-1} de minerai – et peuvent présenter une activité massique atteignant plusieurs dizaines de milliers de Bq kg^{-1} . L'essentiel de ces stériles est resté sur leurs sites de production et a été placé en verses (figure 1.2 ci-contre). Dans certains cas, ils ont été utilisés pour réaménager les territoires, notamment pour combler les mines à ciel ouvert dans lesquelles des résidus

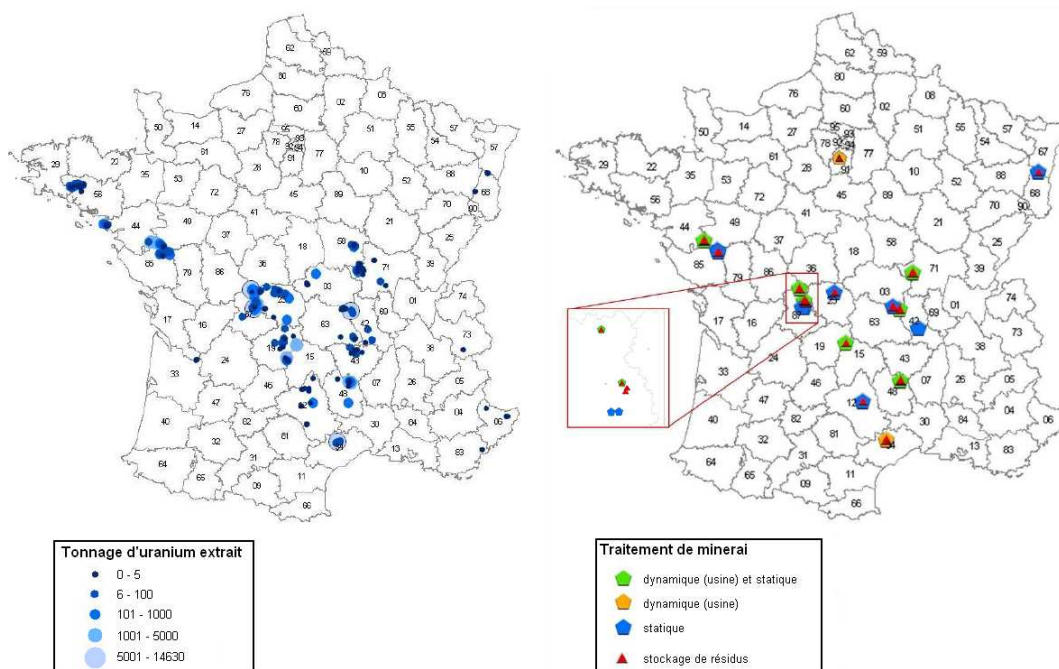


FIGURE 1.1: Localisation des zones minières d'uranium en France en fonction des tonnages produits (à gauche) et des lieux de traitement et de stockage (à droite) (IRSN, 2009).

de traitement sont parfois retrouvés. Ces derniers sont obtenus en fin de production après que le minerai a été épuré, broyé et traité. Les déchets résultant de ces différents processus se différencient de la roche initiale du fait des modifications physiques et chimiques qu'ils ont subies mais, bien qu'appauvris en uranium, ils présentent une radioactivité plus importante que les stériles due à la présence de l'ensemble des descendants de désintégration de l'uranium tels que le ^{234}U , le ^{230}Th et le ^{226}Ra (la liste exhaustive des descendants de l'uranium naturel est donnée dans le tableau 1.2 page 14). Le traitement des 52 Mt de minerai français extrait au cours de l'exploitation des mines d'uranium a généré une quantité équivalente de résidus déposés sur les anciens sites miniers ou à proximité des anciennes usines (figure 1.3 page 14).



FIGURE 1.2: Photographies de dépôts de stériles miniers, en vers (à gauche) ou en talus (à droite) (IRSN, 2009).



FIGURE 1.3: Stockages réaménagés de résidus miniers à Montmassacrot (à gauche) et Bellezane (à droite) dans la Haute-Vienne (87) (IRSN, 2009).

TABLE 1.2: Série de désintégration de ^{238}U (Kaye et Laby, 1986).

élément	demi-vie	rayonnement émis
^{238}U	$4.5 \cdot 10^9$ années	α
^{234}Th	24 jours	β
^{234}Pa	6.8 heures	β
^{234}U	$2.4 \cdot 10^5$ années	α
^{230}Th	$7.3 \cdot 10^3$ années	α
^{226}Ra	$1.6 \cdot 10^3$ années	α
^{222}Rn	3.8 jours	α
^{218}Po	3.1 minutes	α
^{214}Pb	27 minutes	β
^{214}Bi	20 minutes	β
^{214}Po	160 millisecondes	α
^{210}Pb	22 années	β
^{210}Bi	5 années	β
^{210}Po	138 années	α
^{206}Pb	stable	–

1.2 Propriétés physico-chimiques et nucléaires

1.2.1 Uranium naturel

L'uranium naturel (${}_{92}\text{U}$) est un métal lourd radioactif de la famille des actinides de couleur gris blanc. Il est malléable et ductile, sa densité vaut 19.1 et son point de fusion est de 1130 °C. C'est l'élément le plus lourd existant à l'état naturel sur Terre. Les 23 isotopes identifiés de l'uranium sont radioactifs et possèdent des propriétés chimiques similaires mais seuls trois d'entre eux participent à la composition de l'uranium naturel : ${}^{238}\text{U}$, ${}^{235}\text{U}$ et ${}^{234}\text{U}$. Ceux-ci se désintègrent principalement par émission de rayonnement α – émission d'un noyau d'hélium ${}^4_2\text{He}$ – et parfois par fission spontanée. Les isotopes ${}^{238}\text{U}$ et ${}^{235}\text{U}$ sont les plus abondants – respectivement 99.275 et 0.720 % de l'uranium total de la planète – et sont primordiaux. Le troisième isotope ${}^{234}\text{U}$ est produit par désintégration α de l'isotope ${}^{238}\text{U}$ mais ne représente qu'une partie infime de la masse totale. En revanche, il est le plus radioactif et contribue pour moitié à la radioactivité de l'uranium naturel. Les formes dites « enrichies », « appauvries » ou « de retraitement » ne sont que des mélanges de ces différents isotopes dans des proportions variables (Bonin et Blanc, 2001; Paquet et collab., 2009).

1.2.2 Uranium appauvri

L'uranium appauvri utilisé dans nos recherches est un sous-produit du processus d'enrichissement de l'uranium naturel. Il se caractérise par une faible teneur en ${}^{234}\text{U}$ et ${}^{235}\text{U}$ (tableau 1.3 ci-dessous) et par une activité spécifique de 14000 Bq g⁻¹, ce qui correspond à 60 % de l'activité de son homologue naturel. L'uranium appauvri possède des propriétés intéressantes : il est dense, pyrophorique au-delà de 600 °C et résistant. Cela lui vaut d'être utilisé à des fins militaires pour la fabrication de munitions (perforation) et de blindages (chars d'assaut). Il est également employé dans le domaine industriel pour la fabrication d'écran de protection anti-rayonnements et dans les transports (volets et gouvernes de direction d'avions, quilles de voiliers, etc.) (Bem et Bou-Rabee, 2004; Bleise et collab., 2003).

TABLE 1.3: Comparaison des masses et activités isotopiques de l'uranium naturel et de l'uranium appauvri à 0.2 % (Weigel, 1986; DPHE, 2001).

	Pourcentage en masse			Pourcentage en activité totale		
	${}^{234}\text{U}$	${}^{235}\text{U}$	${}^{238}\text{U}$	${}^{234}\text{U}$	${}^{235}\text{U}$	${}^{238}\text{U}$
U naturel	0.0054	0.7200	99.2700	49.1	2.3	48.6
U appauvri	0.0006	0.2000	99.8000	9.9	1.1	88.9

1.3 L'uranium dans les sols

Les sols sont issus de l'altération des roches – magmatiques, sédimentaires et métamorphiques – sous l'action du climat et de la biosphère. De manière générale, les sols issus de roches sédimentaires sont moins riches en uranium que ceux résultant de la dégradation de roches éruptives. Leur teneur moyenne varie entre 0.5 et 5 mg U kg⁻¹ de sol sec à

l'exception des zones uranifères dans lesquelles les concentrations peuvent atteindre plusieurs centaines de mg kg^{-1} (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). À cette provenance naturelle peuvent s'ajouter les apports résultant de l'activité anthropique – évoqués précédemment dans le propos – donnant lieu à la formation de sols dits « anthropisés » dont la nature est parfois très éloignée du sol originel.

Du fait de son comportement vis-à-vis des autres éléments chimiques – notamment par le biais de ses capacités d'adsorption et de complexation – l'uranium se répartit de manière hétérogène dans les sols. Sa mobilité c.-à-d. sa faculté de déplacement entre différents compartiments y est fortement influencée par la composition chimique et la profondeur (Sheppard et Thibault, 1988).

1.3.1 Comportement dans la solution du sol

En solution aqueuse, l'uranium se retrouve essentiellement aux degrés d'oxydation IV et VI : U(IV) sous la forme d'espèces solvatées $\text{U}(\text{H}_2\text{O})_n^{4+}$ et U(VI) sous forme d'ions uranyles UO_2^{2+} (entité linéaire $\text{O}=\text{U}=\text{O}$) et oxoaqua $\text{UO}_2(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$. L'uranium étant considéré comme un acide « dur » au sens de Pearson, il réagira préférentiellement avec les bases « dures » que sont par exemple les ligands à atomes donneurs d'électrons tels que l'oxygène et le fluor (Paquet et collab., 2009). Dans l'eau et les milieux aqueux, la spéciation chimique de l'uranium c.-à-d. la distinction entre les différentes formes de liaisons possibles de l'élément dans un environnement donné est majoritairement gouvernée par le pH et le potentiel d'oxydo-réduction. Celui du couple U(IV)/U(VI) vaut 0.267 V (Paquet et collab., 2009). Dans une moindre mesure, d'autres facteurs telles que la dureté et l'alcalinité de la solution peuvent influencer la spéciation (Giblin et collab., 1981; Echevarria et collab., 2001). Selon la nature de l'environnement, certaines réactions de complexation pourront alors avoir lieu, modifiant ainsi les paramètres de mobilité de l'uranium et donc les potentialités de transfert aux racines.

La détermination de la spéciation de l'uranium dans la solution du sol est généralement établie par des approches de modélisation. Dans le cas de l'uranium et en conditions oxydantes – comme c'est le cas dans la majorité des sols cultivables – l'ion uranyle est prépondérant jusqu'à pH 6, une gamme dans laquelle il peut aussi se complexer avec les sulfates (pH 3-4) et les phosphates (pH 5-6), des espèces avec lesquelles il forme des complexes stables. Les formes hydroxylées de l'uranium (UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, etc.) se forment entre pH 6 et pH 8 puis sont retrouvées les formes carbonatées (UO_2CO_3 , $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$, $\text{UO}_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^+$, etc.) pour des valeurs de pH supérieures à 8 (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). Ces différents complexes ont des affinités variables pour la phase solide, seront plus ou moins biodisponibles et donc plus ou moins facilement transférés aux plantes. De manière générale la sorption de U(VI) sur les particules de sol est moins forte dans les milieux aérés à pH acide du fait de la compétition entre H^+ et UO_2^{2+} (Giblin et collab., 1981; Morrison et collab., 1995). En conditions réductrices, l'uranium est majoritairement présent sous formes de valence U(IV) peu solubles qui ont tendance à précipiter et à rester peu mobiles en solution (Gascoyne, 1992; Sheppard et collab., 2005).

Dans la solution du sol, la spéciation de l'uranium est également influencée par la concentration en ligands organiques. En effet, la matière organique dissoute – en particulier les substances humiques qui peuvent représenter jusqu'à 75 % du carbone organique dissous – influence la formation de complexes organiques stables de l'ion uranyle et contribue à sa migration (Moulin et collab., 1992). Enfin, l'uranium peut s'associer à la fraction colloïdale, soit en liaison avec des colloïdes de fer (Fe), soit par interactions avec les acides humiques ou les humines (Porcelli et collab., 1997). La présence de carbonates dans la so-

lution du sol induit une forte diminution de l'adsorption de l'uranium sur les particules de sol et contribue à augmenter sa mobilité. À l'inverse, la présence de phosphates entraîne la précipitation des ions uranyles et limite leur mobilité.

1.3.2 Influence des constituants solides du sol sur la dynamique de l'uranium

1.3.2.1 Influence de la matière organique

La matière organique joue un rôle majeur dans la dynamique de l'uranium dans les sols, particulièrement lorsqu'elle influence fortement la pédogénèse. Trois types de distribution verticale de l'uranium sont décrites en fonction des profils de ces sols :

- lixiviation modérée et progressive dans les sols bruns, sans accumulation ;
- conservation générale avec appauvrissement des horizons supérieurs et un enrichissement des horizons B, comme dans certains sols de steppes riches en Fe ;
- redistribution avec accumulation variable, où plus de la moitié de l'uranium total peut être associée aux composés humiques, dans les horizons spodiques Bh ou Bs des podzols par exemple (Gueniot et collab., 1983, 1988).

La présence d'acides organiques influence l'adsorption de l'uranium sur d'autres métaux oxydés. Ce phénomène dépend du pH, de la concentration en électrolytes organiques dans la solution du sol, de la nature des oxydes et des substances humiques, de leur fractionnement et du niveau de couverture des surfaces par ces substances humiques. À titre d'exemple, Zuyi et collab. (2000) ont montré que des concentrations en acides fulviques de 50 et 100 mg l⁻¹ favorisent l'adsorption de l'uranyle sur les oxydes d'aluminium (Al), de fer et de silicium (Si) à des pH inférieurs à 7 (4 pour Si). De manière générale, en conditions aérées avec peu de matières organiques, l'uranium est peu mobile et se comporte comme le calcium (Ca), le magnésium (Mg), le potassium (K) ou le sodium (Na). En revanche, en présence d'importantes quantités de matières organiques, l'uranium est mobile et son comportement est comparable à celui de l'aluminium, du fer ou du manganèse (Mn). Enfin, en conditions réductrices, l'uranium est redistribué sur l'ensemble du profil de sol et s'accumule dans les zones où les matières organiques sont réduites et dans les zones de précipitation des oxy(hydr)oxydes de fer.

1.3.2.2 Influence des oxy(hydr)oxydes de fer et d'aluminium

Les oxy(hydr)oxydes sont très abondants dans les sols se formant sous climat chaud (Colle et collab., 2001). Ces complexes de fer et d'aluminium existent sous différentes formes telles que les oxydes cristallisés, les hydroxydes amorphes et les formes associées à la matière organique (Gueniot et collab., 1988). Résultant d'une forte altération des minéraux primaires, les oxy(hydr)oxydes sont d'importants sites de fixation de l'uranium. Ceci est d'autant plus vrai que les sols concernés subissent une évolution très rapide de la matière organique ce qui a pour effet de limiter son rôle de complexant (Colle et collab., 2001). L'adsorption de l'uranium sur les oxy(hydr)oxydes se fait par complexation de surface (Ragnarsdottir et Charlet, 2000). De cette manière, il est possible d'observer jusqu'à 40 % de l'uranium total associé à la fraction d'oxy(hydr)oxydes de l'horizon Bt des sols fersiallitiques. Dans l'horizon B1 de certains sols de steppes, ces composés peuvent même retenir jusqu'à 60 % de l'uranium présent. Enfin, dans les podzols et sols bruns, les

oxy(hydr)oxydes de fer et d'aluminium mélangés à la matière organique constituent des sites de fixation pour 30 % de l'uranium (Gueniot et collab., 1988).

1.3.2.3 Influence des carbonates

Dans les sols carbonatés l'ion uranyle est rarement libre dans la fraction liquide. Il se complexe facilement au carbonate $\text{UO}_2(\text{CO}_3)$, au bicarbonate $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ et au tricarbone $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ (Echevarria et collab., 2001). Les composés ainsi formés sont chargés négativement et présentent une affinité faible – inférieure à celle de l'ion uranyle – pour les minéraux et la matrice du sol (Armands, 1967; Harmsen et de Haan, 1980; Mason et collab., 1997). Il en résulte une augmentation de leur mobilité en l'absence d'autres complexants majeurs de l'uranium (Langmuir, 1978; Ho et Miller, 1986; Zheng et collab., 2003). À titre d'exemple, Yamamoto et collab. (1973) ont montré que la sorption de l'uranium est réduite de 75 % après ajout de $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ de carbonates en solution sur un sol sableux. Ceci est d'autant plus vrai lorsque le sol est pauvre en matière organique.

1.3.2.4 Influence des argiles

Les argiles jouent un rôle secondaire dans la fixation de l'uranium dans les sols. Bien qu'une corrélation entre quantité de particules fines et teneur en uranium soit souvent observée, il semblerait que cela ne soit dû qu'à leur capacité à adsorber des oxydes de fer ou des substances humiques ayant préalablement fixé l'élément (phénomène de coating), les rétentions de type ionique ou intrafoliaire restant très limitées (Gueniot et collab., 1983; Berthelin et collab., 1987; Bonin et Blanc, 2001).

2 L'uranium dans les plantes

La présence d'uranium à l'état naturel dans les sols et son implication dans des industries dites à risque justifient qu'il fasse l'objet d'études de toxicité. Comme d'autres éléments non essentiels pour les plantes tels que le cadmium (Cd), le chrome (Cr) et le plomb (Pb), l'uranium est vraisemblablement pris en charge par les systèmes fonctionnels impliqués dans l'absorption des métaux et le devenir des nutriments dans le système sol/plante (Ebbs et collab., 2001). Il peut être absorbé au niveau des racines et engendrer des effets délétères à plusieurs niveaux. Les manifestations caractéristiques d'une accumulation excessive dans les plantes sont un changement de coloration des fleurs, une production de fruits anormaux, une courbure du port de l'organisme et une modification du nombre de chromosomes (Goswani et collab., 1977).

2.1 L'uranium dans le système sol/plante

2.1.1 Le transfert du sol à la plante

Le transfert de l'uranium du sol à la plante varie en fonction des espèces végétales, des concentrations dans le milieu, du type de sol, des formes d'uranium présentes et de l'origine de l'uranium dans le sol. Ainsi, un sol naturel dans lequel l'uranium est considéré comme étant à l'équilibre entre sol et solution, des dépôts miniers ou des friches minières revégétalisées permettront d'observer des phénomènes différents. Ce transfert peut se faire par dépôt sur les organes aériens – dans ce cas l'uranium provient de particules en suspension dans l'atmosphère ou remises en suspension à partir du sol – et par absorption au niveau des racines. Nous nous intéressons exclusivement à la seconde voie qui est, d'après Smith et collab. (1983), largement prédominante. Par analogie avec les éléments transuraniens, les seules conditions qui favoriseraient la voie foliaire au point de la rendre majoritaire seraient des climats désertiques ou des conditions poussiéreuses mais il n'existe pas de données sur le sujet à ce jour.

Le transfert du sol à la plante est évalué par le facteur de transfert FT . Il correspond au rapport de concentration de l'élément dans le végétal sur la concentration dans le sol. Il peut par exemple être calculé à partir de rapport d'activité massique (en Bq kg⁻¹) ou en utilisant des données quantitatives (en mg g⁻¹). En se basant sur les données listées dans la littérature, Sheppard et Evenden (1988) ont proposé des facteurs de transfert moyens pour une concentration normalisée de 5 mg U kg⁻¹ de sol sec de l'ordre de 10⁻³ à 10⁻² (tableau 2.1 page 20). Aujourd'hui, aucune espèce hyperaccumulatrice d'uranium n'est connue. Sur la base des facteurs de transfert mesurés, recensés et analysés par les différents groupes de recherches, l'Agence Internationale pour l'Énergie Atomique (AIEA) a proposé une liste exhaustive en fonction des types de plantes, des organes et des types de sol (voir les annexes A.8 et A.9).

Outre la vision figée du facteur de transfert – parce que mesuré à un instant t de la vie de la plante – impliquant une relation linéaire entre concentration dans le sol et

TABLE 2.1: Facteurs de transfert de l'uranium exprimés en Bq kg^{-1} de végétal sec par Bq kg^{-1} de sol sec pour différentes catégories de végétaux correspondant à une valeur standard de 5 mg U kg^{-1} de sol sec (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	–	$9.5 \cdot 10^{-3}$	$2.2 \cdot 10^{-2}$	–
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
fouillage	$8.4 \cdot 10^{-3}$	$0.5 \cdot 10^{-3}$	–	$4.8 \cdot 10^{-3}$

dans la plante qui ne se retrouve que rarement à l'état naturel, une manière plus réaliste consiste à voir l'absorption de l'uranium et des éléments en général comme un flux. En ajoutant au modèle précédent des variables simples telles que le temps d'exposition ou le rendement, il devient possible de se décharger de biais tels que les effets de dilution dus aux variations de production de biomasse (Gerzabek et collab., 1998). Néanmoins, il reste très difficile d'appréhender cette thématique car, comme nous l'avons déjà évoqué, le système sol/plante est à la fois complexe intrinsèquement et très diversifié de part la variété du monde végétal et des différents types de sols existant.

À l'heure actuelle, les connaissances sur la physiologie du transfert de l'uranium du sol à la plante sont limitées et il reste difficile d'appréhender le système dans sa globalité. Il est avéré que ces deux compartiments interagissent – les évènements se produisant chez l'un ont des répercussions sur l'autre – et le défi actuel repose sur notre capacité à développer des méthodologies et à mettre au point des dispositifs permettant à la fois de cibler les mécanismes principaux régissant les transferts sol/plante et de développer des modèles qui expliqueront les généralités plutôt que les cas particuliers. Dans le cas de l'uranium, il est supposé que l'absorption se fait sous forme d'ion uranyle et que la capacité de complexation de l'élément avec les citrates, les carbonates et les phosphates peut influencer le transfert. Ces premières hypothèses, qui restent à démontrer, permettraient de faire un premier pas vers une meilleure appréhension du système de ce système complexe.

2.1.2 Analogies entre contaminants et nutriments

Les transporteurs impliqués dans l'absorption et la translocation de l'uranium sont encore inconnus. Comme d'autres éléments non-essentiels, l'uranium est vraisemblablement pris en charge par les systèmes fonctionnels impliqués dans l'absorption des nutriments du fait d'homologies atomiques ou moléculaires telles que la charge ou le rayon ionique (Bourguignon et collab., 2009; Ebbs et collab., 2001). Ce type d'analogie comportementale entre contaminant et nutriment a été mis en évidence avec certains radioéléments dont le césium (Cs) avec le potassium (K), le strontium (Sr) avec le calcium (Ca) et le technétium (Tc) avec les nitrates (NO_3^-) (Bourguignon et collab., 2009; Echevarria et collab., 1998). Concernant l'uranium, les travaux de Viehweger et Geipel (2010) suggèrent une interférence avec l'homéostasie du fer (Fe). L'uranium pourrait entrer dans la plante *via* le

transporteur IRT1 non spécifique impliqué dans l'absorption du fer. Il a en effet été montré que ce transporteur est également impliqué dans l'absorption de cations divalents tels que le cadmium (Cd), le cobalt (Co) et le zinc (Zn) (Eide et collab., 1996; Korshunova et collab., 1999; Vert et collab., 2002). Les homéostasie du fer et du phosphore sont liées. En effet la carence en phosphore s'accompagne d'une plus grande absorption/translocation de métaux tels que le fer ce qui s'explique notamment par une augmentation du nombre de transporteurs. Cette hypothèse est renforcée par les liens observés entre la toxicité de l'uranium et l'homéostasie du phosphore démontrés par Misson et collab. (2009).

2.1.3 La bioaccumulation de l'uranium en chiffres

En hydroponie, Eapen et collab. (2003) ont montré la capacité d'accumulation de racines génétiquement transformées à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* sur une large gamme de concentrations. Cultivées dans un milieu contenant de 10 à 500 μM , les racines de *Brassica juncea* et de *Chenopodium amaranticolor* absorbent l'intégralité de l'uranium présent dans le milieu de culture en moins de 10 et 24 h respectivement. Au-delà de 1 mM, le pourcentage d'uranium accumulé ne cesse de diminuer et se limite à 20 ou 30 % à 5 mM. Ces résultats confirment l'idée que les plantes – comme certainement la majorité des organismes – possèdent des capacités maximales en termes d'accumulation. Plus tôt, Dushenkov et collab. (1997) ont fait les mêmes observations avec des racines de tournesol (*Helianthus annuus*) dans une solution beaucoup moins concentrée contenant 60 $\mu\text{g U l}^{-1}$, à savoir le passage de près de 95 % de l'uranium de la solution aux racines en moins de 24 h. Il semblerait également que des racines séchées soient capables d'absorber l'uranium d'une solution contenant 200 mg U l^{-1} en 4 min (Bhainsa et D'Souza, 2001).

L'absorption rapide de l'uranium par les racines serait due d'une part à sa précipitation dans l'apoplasme comme cela est observé pour l'aluminium ou le zinc (Zn), d'autre part à des phénomènes d'adsorption sur les parois cellulaires. Les résultats obtenus avec la biomasse morte (sèche) plaident en faveur de la seconde hypothèse. Cette seconde option implique la Capacités d'Échange Cationique Racinaire (CECR) et expliquerait au moins en partie les différences d'accumulation observées entre mono- et dicotylédones. En effet, leur CECR avoisine respectivement 10 à 20 cmol kg^{-1} et 20 à 50 cmol kg^{-1} (Dufey et collab., 2001). Les résultats obtenus par Straczek et collab. (2010) avec les dicotylédones *Brassica juncea* et *Pisum sativum* et les monocotylédones *Triticum aestivum* et *Zea mays* sont en accord avec cette hypothèse (figure 2.1 page 22). Les extractions chimiques ainsi que les analyses de distribution réalisées par ces auteurs indiquent par ailleurs que l'accumulation résulte d'une adsorption aux parois cellulaires rapidement suivie par un transport radial et longitudinal. En moyenne, l'accumulation racinaire du blé, du maïs, de la moutarde indienne et du pois varie de 12 à 45 mg g^{-1} de poids sec. Dans les parties aériennes, l'accumulation varie également selon les espèces avec des extrêmes allant de 10 à 125 mg kg^{-1} de poids sec. Les facteurs de translocation des racines aux parties aériennes varient de $2.3 \cdot 10^{-4}$ à $3.5 \cdot 10^{-3}$.

Sur sol, la bioaccumulation est généralement plus faible qu'en hydroponie. Cela s'explique par la mobilité moins importante de l'uranium dans un milieu solide complexe où de nombreuses interactions interviennent. Dans une solution nutritive correctement élaborée, la majorité de l'uranium est disponible et en contact du système racinaire. Les valeurs présentées dans la figure 2.2 page 22 donnent une idée des valeurs retrouvées dans l'environnement. Elles ne font pas office de référence, elles sont spécifiques au sol calcaire de Weswood dopé avec 100 mg U kg^{-1} sous forme $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Shahandeh et Hossner, 2002). Comme en hydroponie, les dicotylédones présentent des concentrations

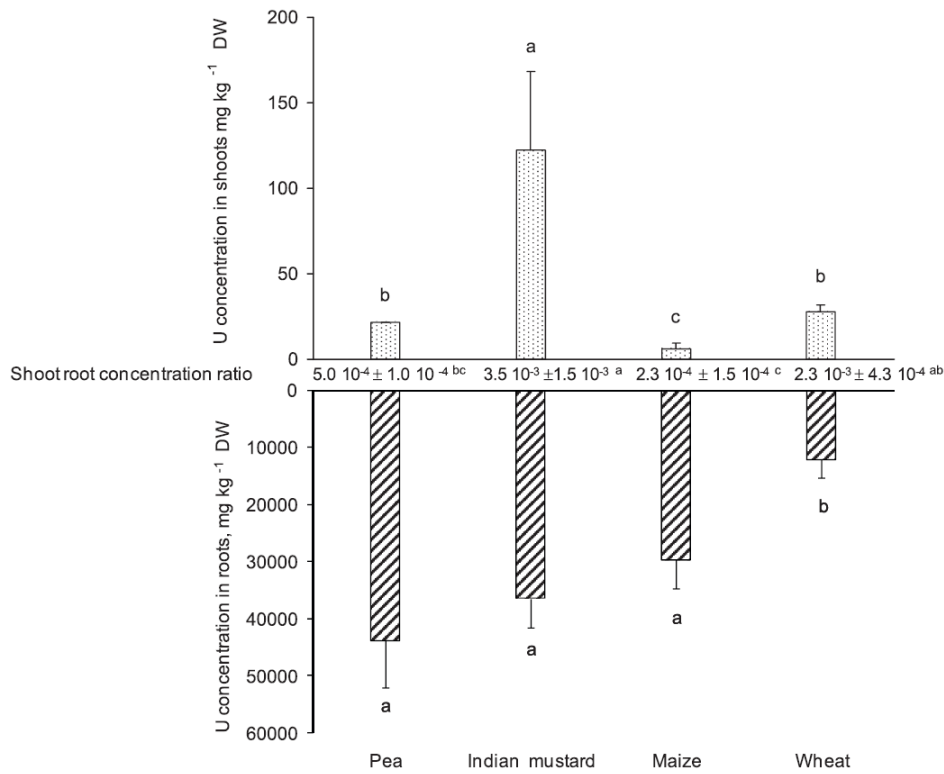


FIGURE 2.1: Concentration moyenne d'uranium accumulé dans les racines et parties aériennes des monocotylédones *Triticum aestivum* et *Zea mays* et des dicotylédones *Brassica juncea* et *Pisum sativum* exposées 7 jours à une solution contenant $100 \mu\text{mol U l}^{-1}$ (Straczek et collab., 2010).

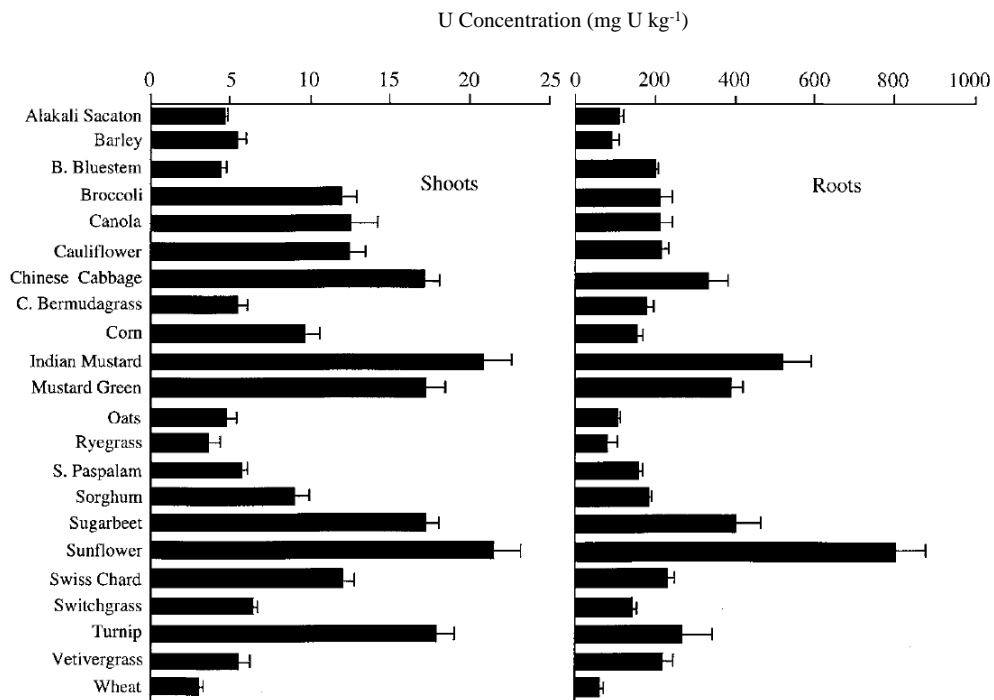


FIGURE 2.2: Accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes d'espèces végétales cultivées sur le sol de Weswood contaminé avec 100 mg U kg^{-1} (Shahandeh et Hossner, 2002).

internes plus élevées : 22 et 810 mg U kg⁻¹ de poids sec pour le tournesol et 21 et 530 mg U kg⁻¹ pour la moutarde indienne, respectivement dans les parties aériennes et les racines. À l'opposé, les monocotylédones et notamment le blé accumulent relativement peu : 3 mg U kg⁻¹ dans les parties aériennes et 50 mg U kg⁻¹ dans les racines.

2.1.4 Localisation et microlocalisation de l'uranium accumulé par les plantes

Les techniques d'imagerie récentes permettent de déterminer avec précision la distribution de l'uranium dans les plantes. Comme pour l'accumulation, il existe des différences notoires entre mono- et dicotylédones en termes de localisation comme le montre l'étude de Straczek et collab. (2010) (figure 2.3 page 24) sur la moutarde indienne (*Brassica juncea*) et le maïs (*Zea mays*). Chez la monocotylédone, l'uranium est principalement accumulé dans le premier centimètre de racine – 37 % de l'uranium total – avant de voir sa concentration diminuer de manière importante jusqu'au dernier centimètre le plus proche du collet. Radialement, l'uranium ne pénètre pas dans la stèle au niveau de l'apex – il reste préférentiellement dans l'épiderme et le cortex – puis sa répartition s'homogénéise en se rapprochant du collet. La translocation aux parties aériennes est extrêmement faible puisqu'on observe un facteur de 300 entre le dernier centimètre de racine et le premier centimètre de tige. Chez la dicotylédone, la distribution de l'uranium diminue d'abord graduellement tout au long de la racine avant de chuter drastiquement dans le dernier centimètre le plus proche du collet. Radialement, la majorité de l'uranium est localisée dans la stèle. La translocation vers les parties aériennes est plus importante que chez le maïs et aucune différence de concentration n'est observée entre le dernier centimètre de racine et le premier centimètre de tige. Ces observations indiquent que les espèces végétales ont mis en place des stratégies différentes vis-à-vis du stockage de l'uranium. En effet, contrairement à la moutarde indienne, il semblerait que le maïs possède des mécanismes permettant de limiter au maximum le transfert de l'uranium aux parties aériennes, à la fois en le cloisonnant en périphérie des racines – ce qui limite la remontée *via* le xylème – et à la fois en faisant obstacle à son passage des racines aux tiges. Ceci est en accord avec le fait que la plupart des céréales ont une stratégie d'absorption de type « exclure », à savoir des mécanismes empêchant l'entrée des éléments non essentiels et/ou toxiques (Baker, 1981).

L'étude de Misson et collab. (2009) sur *Arabidopsis thaliana* montre que l'uranium s'accumule essentiellement dans les parois cellulaires en association avec le calcium (Ca) et le phosphore (P) (figure 2.4 page 24). Il est peu internalisé dans les cellules dans les conditions utilisées mais toujours associé au phosphore (500 µM U et 30 µM P). Cela sous-entend l'existence d'un mécanisme de transport et/ou de stockage impliquant cet élément.

Tirés de la même étude, les clichés de la figure 2.5 page 25 obtenus en microscopie électronique à transmission montrent les structures d'accumulation de l'uranium au niveau subcellulaire et de quelle manière ces dernières évoluent avec la concentration en uranium (de 2 à 500 µM). À la plus faible exposition (2 µM), l'uranium colocalise avec le phosphore et le calcium et est stocké dans des cellules indifférenciées des couches externes sous forme d'agrégats concentrés dans de petites vacuoles. Avec une dose moyenne (50 µM), des précipités d'uranium qui colocalisent toujours avec phosphore et calcium sont retrouvés à l'intérieur du noyau. Enfin, à la plus forte exposition (500 µM), des granules riches en uranium sont internalisés dans les cellules racinaires. L'uranium se retrouve également dans les espaces interstitiels sous forme de paillettes.

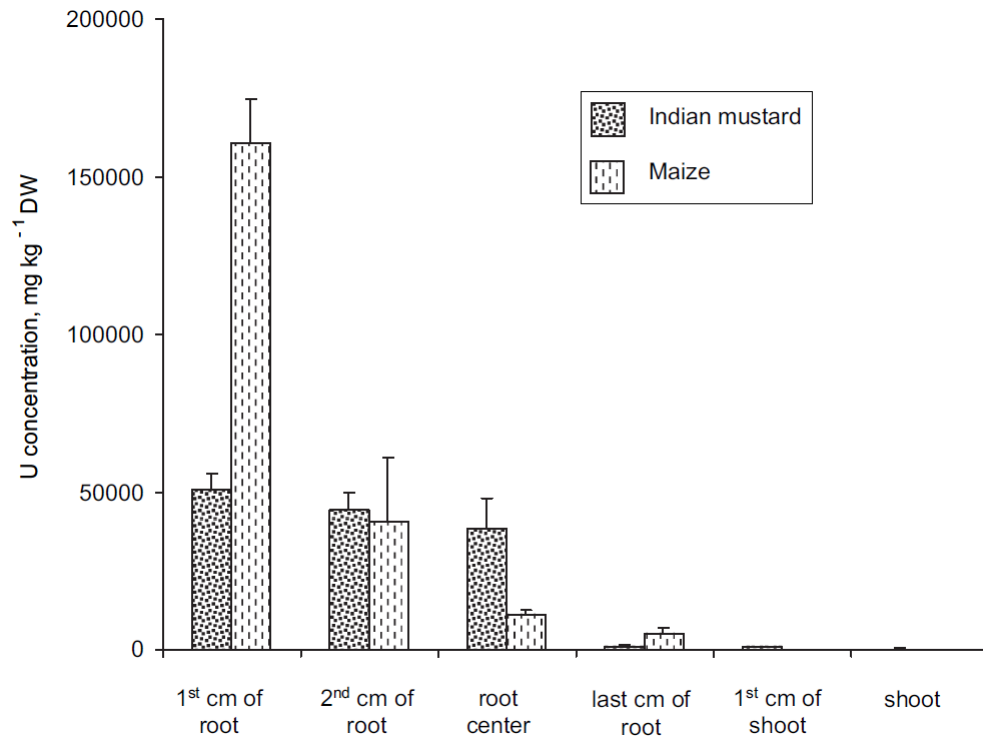


FIGURE 2.3: Concentration d'uranium retrouvée dans diverses portions des racines et parties aériennes de la moutarde indienne (*Brassica juncea*) et du maïs (*Zea mays*). Pour les racines, la distance est donnée par rapport à l'apex et pour les parties aériennes par rapport au collet (Straczek et collab., 2010).

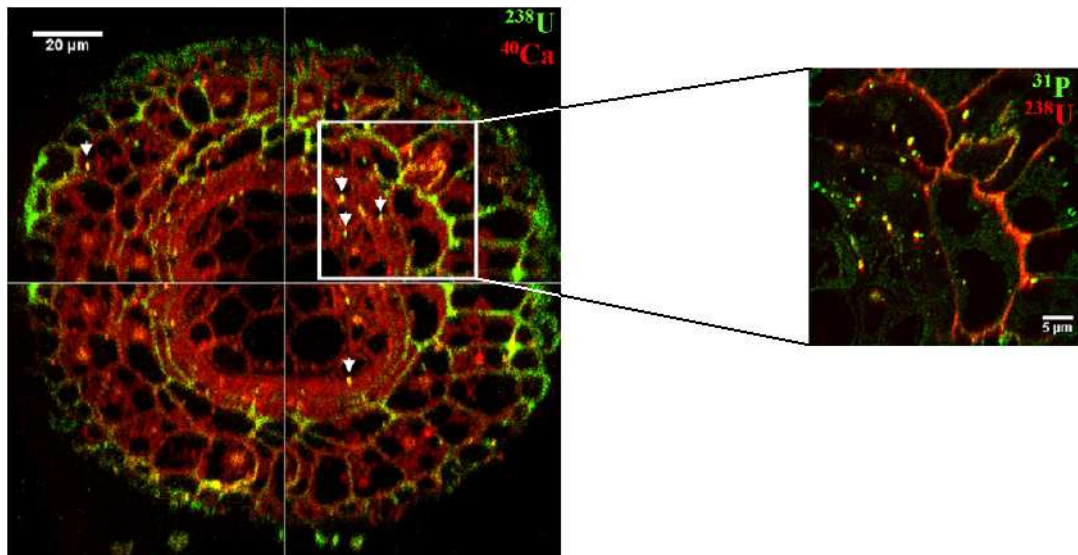


FIGURE 2.4: Images NanoSIMS d'une section de l'apex racinaire d'*Arabidopsis thaliana* (WS) ayant poussé en présence de 30 μM P et 500 μM U. L'uranium est coloré en vert et le calcium en rouge. Les spots d'uranium sont indiqués par les flèches blanches sur la photo de gauche. L'image de droite est un agrandissement de la zone encadrée en blanc, l'uranium est en rouge et le phosphore en vert (Misson et collab., 2009).

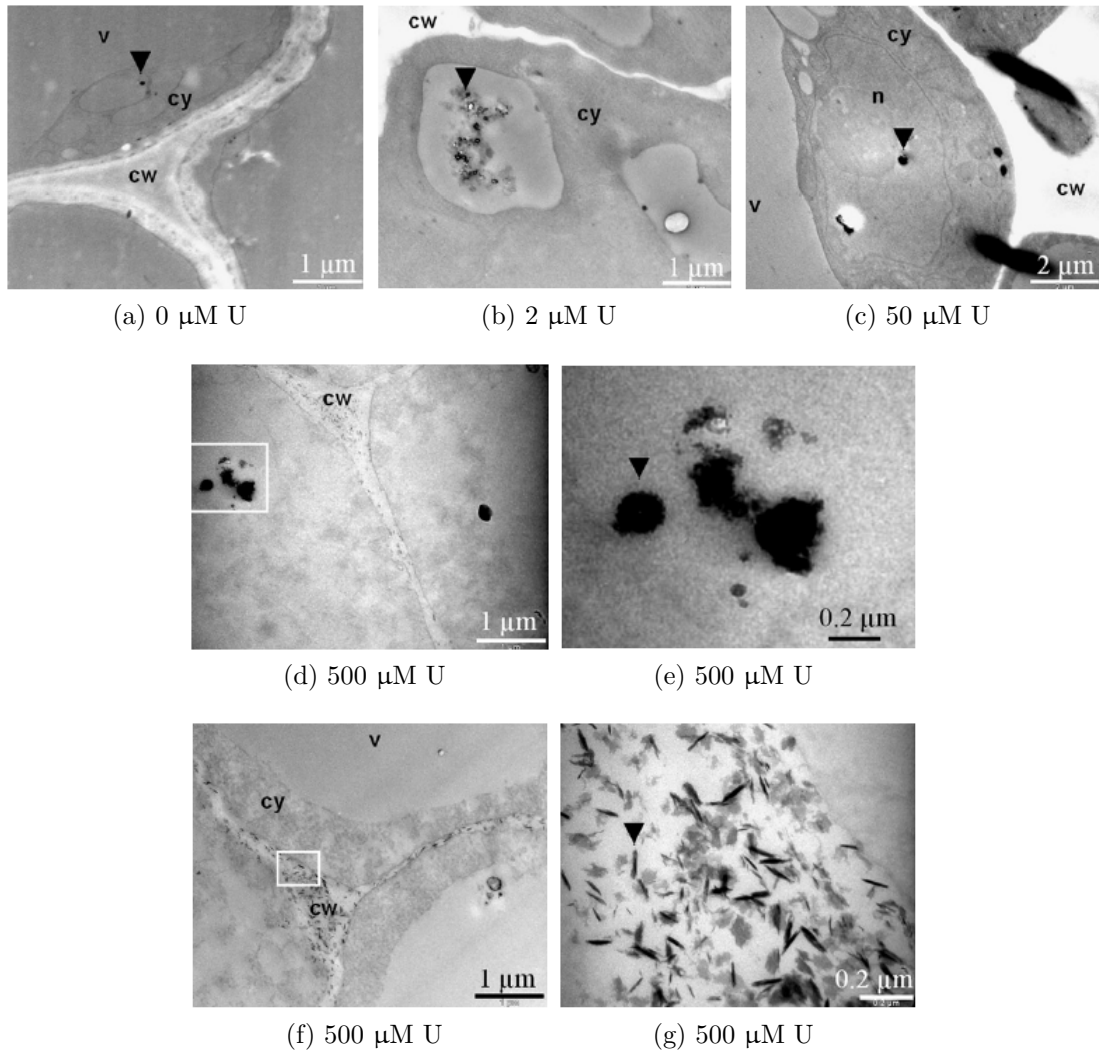


FIGURE 2.5: Microlocalisation de l'uranium dans des cellules de racines et co-localisation avec le phosphore. Les plantules d'*Arabidopsis thaliana* (WS) ont poussé sur un milieu de culture contenant 30 μM de phosphate provenant de l'agar. Les photographies (e) et (g) sont respectivement des agrandissements des photographies (d) et (f). cw : paroi cellulaire ; cy : cytoplasme ; v : vacuole ; n : noyau (Misson et collab., 2009).

2.2 Effet stimulant des faibles doses : l'hormèse

Le phénomène d'hormèse a été évoqué pour la première fois au XV^e siècle par Paracelse qui disait que « c'est la dose qui fait le poison. » Cette citation, reprise bien plus tard par le pharmacien Hugo Schulz, illustre le fait qu'un même produit peut être toxique ou non selon la dose d'exposition. Plus précisément, le phénomène d'hormèse désigne une réponse de stimulation des défenses biologiques à des expositions de faibles doses de toxines ou d'autres agents générateurs de stress. Ces réponses, généralement favorables dans la mesure où l'on observe une stimulation par rapport aux témoins, sont aujourd'hui associées à une manifestation en lien avec la toxicité. Cet effet d'hormèse, anciennement appelé Arndt-Schulz, suit une courbe dose-réponse de type β (figure 2.6 ci-dessous). Il n'est pas propre aux végétaux et s'observe chez de nombreux organismes tels que les poissons, les daphnies et les microorganismes, et en présence de diverses substances telles que les métaux, d'autres produits toxiques et les rayonnements ionisants (Calabrese et Howe, 1976; Stebbing, 1982; Calabrese et Baldwin, 2002).

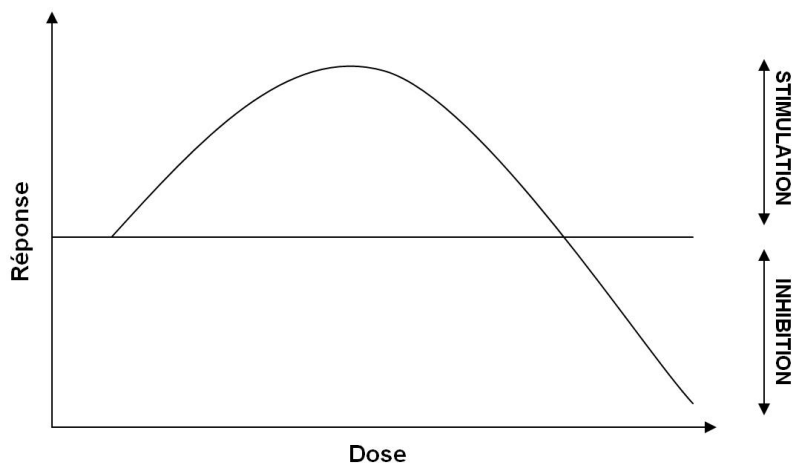


FIGURE 2.6: Schématisation d'une courbe dose-réponse β décrivant le phénomène d'hormèse

Pour illustrer cela, Costa et Morel (1994) ont montré que le cadmium en faible concentration peut induire une augmentation de la production de biomasse sur des plants de laitue (*Lactuca sativa*). Ils ont associé ce phénomène à l'augmentation de la conductance des feuilles et à une induction de l'ouverture des stomates ce qui aurait pour effet de favoriser les échanges gazeux. Chez *Panicum miliaceum*, la présence de faibles concentrations de composés phénoliques entraîne également la stimulation de la croissance racinaire (Wang, 1985).

En ce qui concerne l'uranium, une étude du début du siècle dernier démontre que des plantes mises en contact avec de très faibles doses présentent un développement légèrement accéléré – par rapport aux témoins – en termes de croissance et de capacité de germination (Stoklasa et Penkava, 1928). Plus tard, cet effet a été caractérisé par Drobkov (1951) à l'aide d'autoradiographies. Cette technique a permis de montrer que l'uranium présent dans le milieu de culture se retrouve dans les parties vertes des plantes, notamment dans les zones en fort développement tels que l'apex, les graines et les jeunes feuilles. Cela a été corrélé à une stimulation de la croissance, de la floraison, de la fructification, de la maturation et de la synthèse de carbohydrates mais il n'est pas à exclure qu'il n'y ait aucun lien de cause à effet. En effet, cette accumulation d'uranium pourrait aussi être le résultat du drainage naturel d'une grande quantité d'éléments en réponse aux demandes accrues en nutriments par la plante lors de ces phases de son développement. À l'époque,

ces observations ont poussé certains à croire que l'uranium pouvait être un élément essentiel car, avant que l'hormèse soit étudiée, toute substance provoquant une augmentation des paramètres de rendement était forcément considérée comme essentielle. De manière générale, il faut rester vigilant avec les études anciennes et vérifier les paramètres annexes tels que la teneur en nitrates qui peuvent avoir un effet positif. En effet, dans certains cas, les stimulations observées ne sont que des artéfacts liés à l'expérimentation.

Bien que cette hypothèse n'ait jamais été vérifiée dans les études de Stoklasa et Penkava (1928) et Drobkov (1951), l'observation de l'effet d'hormèse a été rapportée plus tard par Gulati et collab. (1980) chez le blé tendre (*Triticum aestivum*). Leurs résultats, qui sont présentés dans le tableau 2.2 ci-dessous, montrent une augmentation significative du rendement en fonction de l'augmentation de la concentration en uranium dans le sol jusqu'à une valeur de 3 mg kg⁻¹ de sol sec. Cet effet n'est toutefois pas observé chez l'autre espèce qu'ils ont étudiée, la tomate (*Lycopersicon esculentum*), ce qui suggère que cette réponse hormétique peut être espèce-spécifique. Misson et collab. (2009) ont également rapporté un effet hormétique de l'uranium à faible concentration (2 µM) en absence de phosphore chez *Arabidopsis thaliana*.

TABLE 2.2: Rendement du blé et des plants de tomates (g pots⁻¹) pour différentes teneurs en uranium appliquées et différents niveaux d'irrigation (Gulati et collab., 1980).

Niveau d'irrigation (l)	Teneur en uranium appliquée (en ppm)			
	0	1.5	3.0	6.0
Blé				
11.52	10.2	11.7	14.3	12.8
14.40	12.7	12.9	15.3	13.3
19.20	13.0	12.7	12.0	11.9
Tomate				
15.12	160	125	120	115
18.90	182	167	165	145
25.20	200	198	170	145

2.3 Seuils de toxicité de l'uranium

Comme tous les composés toxiques, l'uranium fait l'objet de recherches en écotoxicologie afin de définir des valeurs « seuils » de toxicité. Comme le montrent Sheppard et collab. (2006), les données toxicité de l'uranium sont très contradictoires. En effet, des concentrations de l'ordre du mg U kg⁻¹ de sol sec retrouvées naturellement dans les sols peuvent provoquer l'apparition de signes de toxicité chez certaines espèces, alors qu'il faut parfois des doses 100 à 1000 fois supérieures pour influencer le développement chez d'autres. C'est par exemple le cas chez *Zea mays* qui produit des graines et de hauts rendements de biomasse en présence de teneur en uranium avoisinant les 1000 mg U kg⁻¹ de sol sec (Stojanović et collab., 2009). Une étude a même montré que l'effet de l'uranium sur la quantité de biomasse produite, la fécondité et la survie à long terme chez trois graminées (*Buchloe dactyloides*, *Schizachyrium scoparium* et *Aristida purpurea*) n'était significatif qu'à partir d'une concentration atteignant 25000 mg U kg⁻¹ de sol sableux de pH 8.6 (Meyer et McLendon, 1997). À plus large échelle, Sheppard et Evenden (1992) ont mené une étude sur 11 sols contaminés et testé deux plantes agronomiques, le radis (*Raphanus sativus*) et le haricot (*Phaseolus vulgaris*), et n'ont pas décelé d'effet avant 300 mg U kg⁻¹.

De manière générale, les valeurs mesurées sont très variables selon le trait phénotypique observé et l'espèce étudiée. En se contentant d'associer des quantités d'uranium total à un effet délétère, les études passées n'ont pas permis d'expliquer l'existence d'une telle variabilité, parfois même au sein d'une même espèce. En partant de ce constat et en considérant les informations apportées précédemment dans ce document (sections 1.2 page 15 et 1.3 page 15), il semble évident que la chimie de l'uranium, son comportement dans les sols ainsi que la physiologie des racines influencent sa mobilité et donc sa phytodisponibilité. Quoiqu'il en soit, les seuils de phytotoxicité de l'uranium connus actuellement sont relativement élevés, de 3 à 8 fois plus que ceux retrouvés pour le zinc (Zn), un autre ETM.

2.4 Les effets négatifs de l'uranium sur la croissance et le développement

Les études portant sur les effets de l'uranium chez différents organismes permettent à la fois d'appréhender de manière fondamentale son influence sur l'environnement mais aussi d'obtenir les informations nécessaires à la gestion des risques liés à l'exploitation du nucléaire. Chez les plantes, la majorité des travaux réalisés à ce sujet s'intéressent aux effets d'une exposition sur la croissance des parties aériennes, sur la germination des graines et sur l'élongation racinaire. Ce dernier critère est régulièrement utilisé en écotoxicologie dans la mesure où il est un bon indicateur des stress environnementaux provoqués par la présence d'ETM. En effet, lorsque la croissance racinaire est perturbée la survie d'une plante est généralement mise en jeu. Différents tests ont d'ailleurs été validés pour leur sensibilité à déterminer l'apparition de toxicité due à la présence d'éléments traces métalliques chez la laitue (*Lactuca sativa*) et le ray-grass (*Lolium perenne*) (Wong et Bradshaw, 1982; Ratsch et Johndro, 1986).

2.4.1 Effets sur la germination

La germination n'est pas considérée comme étant le paramètre de la catégorie « croissance et développement » le plus sensible contrairement à l'élongation racinaire. Chez le maïs (*Zea mays*), des travaux ont été menés pour déterminer si la nature des sols – ici un pseudogley et un Chernozem (voir la description au tableau 2.3 ci-contre) – et le niveau de contamination peuvent avoir un effet sur l'initiation de la germination. Dans cette expérience, Stojanović et collab. (2009) apportent l'uranium sous forme de nitrate d'uranyle – de 10 à 1000 mg U kg⁻¹ de sol sec – et montrent que seules les doses supérieures à 100 mg U kg⁻¹ provoquent une réduction significative du pourcentage de germination. En effet, ce dernier n'atteint que 91.6 et 89.3 % à 250 mg U kg⁻¹, que 79.2 et 76.6 % à 500 mg U kg⁻¹ et que 64.6 et 63.8 % à la plus forte concentration, respectivement sur Chernozem et pseudogley. À noter que la capacité de germination des graines est légèrement plus affectée sur le sol dans lequel l'uranium est supposé être le plus biodisponible, le pseudogley acide sans carbonate. Parmi les graines qui ont germé, seules celles exposées à plus de 250 mg U kg⁻¹ de sol sec voient leur survie influencée. Des pourcentages de mort prématurée de l'ordre de 5 à 10 % puis de 11.7 et 22.9 % sont observés, respectivement pour des concentrations de 500 à 1000 mg U kg⁻¹ sur Chernozem et pseudogley. Aleksahina (1985) a décrit des effets similaires chez le riz (*Oriza sativa*) exposé à l'uranium mais ayant poussé sur différents types de sol.

TABLE 2.3: Quelques propriétés spécifiques des sols utilisés pour l'étude des capacités germinatives du maïs (Stojanović et collab., 2009)

Quelques propriétés des sols étudiés	Chernozem	Pseudogley
pH (H ₂ O)	8.10	5.22
pH (KCl)	7.20	4.45
CaCO ₃	2.27	0.00
N total	0.19	0.16
P ₂ O ₅ disponible (mg 100 g ⁻¹)	21.90	19.00
K ₂ O disponible (mg 100 g ⁻¹)	32.40	18.00
Humus (en %)	3.77	2.48
U total (en mg kg ⁻¹)	1.37	1.48

2.4.2 Effets sur l'élongation racinaire

Toutes les études traitant de l'effet des métaux présents en trace (ETM) dans les milieux concluent que l'élongation racinaire est inhibée avec l'augmentation de leur concentration. Cependant, le degré de toxicité varie beaucoup selon le polluant considéré (Wong et Bradshaw, 1982; Ratsch et Johndro, 1986). Les différentes méthodes existant pour caractériser l'effet d'un polluant sur l'élongation racinaire diffèrent selon le type de substrat utilisé (solide, liquide), la forme sous laquelle le polluant est apportée (nature chimique) et la nature de la contamination (naturelle, accidentelle). Ainsi, une exposition *directe* qualifie un protocole au cours duquel les racines sont mises en contact avec une solution contaminée et une exposition *indirecte* un protocole au cours duquel les graines sont déposées sur du sol, de la gelose ou du papier filtre eux-mêmes exposés à une solution contaminée. Dans la plupart des cas les résultats obtenus sont similaires quelle que soit la technique employée. Néanmoins, pour certains composés, la méthode directe est plus sensible (Ratsch et Johndro, 1986). Ceci s'explique par la biodisponibilité importante des éléments chimiques dans les solutions nutritives ce qui n'est généralement pas le cas lorsque l'on travaille sur des substrats dont les propriétés physiques sont susceptibles de provoquer l'adsorption – à leur surface – d'une partie des ions. En ce sens, il est primordial de savoir quel est le phénomène ciblé lors d'une expérience : l'effet maximal d'une concentration donnée d'un élément sur une plante (exposition directe) ou l'effet se rapprochant le plus d'une situation naturelle (exposition indirecte, avec du sol contaminé).

Dans la littérature, les exemples traitant spécifiquement de la toxicité de l'uranium sur l'élongation racinaire sont peu nombreux. En hydroponie, une étude réalisée sur des bulbes d'oignons (*Allium cepa*) exposés 5 jours à des concentrations de nitrate d'uranyle allant de 5 à 25 μM a montré que la croissance est inhibée de manière significative pour la plus haute teneur testée. Cette observation est la conséquence de l'arrêt de la division cellulaire au niveau des méristèmes des racines (Panda et collab., 2001). Un travail beaucoup plus ancien rapporte un effet stimulant de l'uranium sur la croissance racinaire pour une concentration de 8 μM dans une solution nutritive et des effets toxiques notables à 200 μM (apparition d'un jaunissement des pointes de racines) et à 2 mM avec l'apparition de racines jaunes très fines (Stoklasa et Penkava, 1928). Beaucoup plus récemment, Misson et collab. (2009) ont mené une étude sur le modèle végétal *Arabidopsis thaliana* semé sur boîte de pétri contenant du milieu Murashige et Skoog (MS) et ont démontré que l'uranium provoque la mort des cellules de la couche externe des racines à partir de 50 $\mu\text{mol U}$ et la destruction totale de ces dernières à 500 $\mu\text{mol U}$. Ces effets sont cependant annulés en présence de 500 μmol de phosphate ce qui coïncide avec la capacité de cet élément à se complexer à l'uranium, rendant ce dernier beaucoup moins toxique aux concentrations

testées.

2.4.3 Effets sur la production de biomasse

La production de biomasse est également un bon indicateur de l'état de santé d'une plante et des effets toxiques provoqués par la présence d'une substance donnée. En s'appuyant une nouvelle fois sur les travaux de Stojanović et collab. (2009), nous voyons que le développement racinaire du maïs n'est pas affecté jusqu'à une concentration de 25 mg U kg⁻¹ de sol sec. Il en est de même pour les parties aériennes des individus cultivés sur pseudogley jusque 10 mg U kg⁻¹ de sol sec. Chez les individus cultivés sur Chernozem, le développement des parties aériennes est affecté dès la plus petite quantité d'uranium ajoutée (diminution de 3 % dès 5 mg U kg⁻¹ de sol sec). Enfin, il faut attendre une concentration de 250 mg U kg⁻¹ de sol sec pour que la production de biomasse racinaire soit inhibée de 29 % et de 19 % respectivement sur Chernozem et pseudogley. C'est également à partir de cette dose que les parties aériennes des individus cultivés sur pseudogley deviennent sensibles avec une réduction de 15 %. Au traitement le plus élevé (1000 mg U kg⁻¹), les diminutions de production de biomasse sont toutes supérieures à 50 % ce qui traduit une importante phytotoxicité pour le maïs. Néanmoins, le taux de survie reste de 77 % ce qui est certes significatif mais insuffisant pour provoquer la disparition d'une population végétale (Stojanović et collab., 2009).

2.4.4 Effets physiologiques et subcellulaires

Les résultats présentés jusqu'à maintenant ont été obtenus en se focalisant sur des facteurs macroscopiques qui sont, en définitive, le fruit de l'altération de processus cellulaire et moléculaire. Il est donc tout à fait envisageable de voir apparaître des effets toxiques de l'uranium à plus petite échelle, et de surcroît à des concentrations bien plus faibles que celles qui ont été évoquées jusqu'à présent.

2.4.4.1 Teneur en chlorophylles

En hydroponie, l'exposition des racines de blé à 10 et 160 mg U l⁻¹ sous forme de nitrate d'uranyle provoque une diminution des teneurs en chlorophylle totale dans les feuilles de 25 et 50 % respectivement. Toutes proportions gardées, la production des chlorophylles a et b est affectée de la même manière (Aery et Jain, 1997). Des tests identiques sur le soja (*Glycine max*) réalisés par Murthy et collab. (1984) confirment que 42 mg U l⁻¹ sont suffisants pour entraîner la destruction de 30 à 40 % de la chlorophylle totale. Les mécanismes sous-jacents impliqués ne sont toutefois pas encore connus (inhibition d'enzymes, etc). Ananyev et collab. (1999) ont montré *in vitro* que l'ion uranyle présente une très forte affinité pour le site de fixation du manganèse (Mn) dans le centre réactionnel de photolyse de l'eau du photosystème II (PS II). Ce mécanisme, s'il était démontré *in vivo*, serait en accord avec l'inhibition du fonctionnement du PS II observée chez *Chlamydomonas reinhardtii* par Pradines et collab. (2005).

2.4.4.2 Activité synthétique et dégradation cellulaire

D'après Aery et Jain (1997), la présence d'uranium dans le milieu de culture induit l'augmentation de la teneur en protéines solubles en même temps qu'une diminution de la teneur en protéines de structure insolubles. Elle induit également la synthèse de composés phénoliques qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité peroxydase (Fry, 1986).

Ces différents phénomènes combinés provoquent l'altération des membranes plasmiques ce qui aboutit à une diminution de l'extensibilité des parois, à la fuite d'ions potassium et à la réduction des phénomènes de turgescence (Gabbrielli et collab., 1990). D'autre part, la destruction des auxines observée par Pandolfini et collab. (1992) pourrait être une explication valable quant à l'inhibition de la croissance végétale observée à l'échelle macroscopique.

3 Concepts de disponibilité et de biodisponibilité

Les sols sont des milieux hétérogènes à trois dimensions dans lesquels s’observent des gradients temporels et spatiaux pour le carbone organique, le pH, la répartition des particules et les nutriments. Leurs caractéristiques physico-chimiques peuvent évoluer – par exemple sous l’action du climat, de l’Homme et d’autres organismes vivants – ce qui entraîne parfois la modification des paramètres de mobilité des différents éléments chimiques qui composent le milieu (Lanno et collab., 2004). Comme l’a suggéré Juste (1988), les thématiques liées à la mobilité dans les systèmes sol/plante nécessitent d’appréhender ces derniers sous forme de compartiments – le sol et la plante – et de chercher à comprendre dans quelle mesure l’élément d’intérêt – l’uranium – peut passer d’un des compartiments à l’autre. Cela suppose également d’admettre qu’une plante ne peut réellement « communiquer » (donc échanger des éléments) qu’avec une fraction du sol dans laquelle elle est capable de s’alimenter par le biais de ses racines c.-à-d. la solution du sol. En résumé, chercher à comprendre le transfert de l’uranium du sol à la plante nécessite de s’intéresser à la notion de (bio)disponibilité et donc de tenir compte du fait que :

- l’uranium est présent dans une certaine quantité dans le sol (pool total) ;
- l’intégralité de ce pool d’uranium total n’est pas forcément solubilisée/solubilisable ;
- la plante n’a donc pas forcément accès au pool total d’uranium ;
- la plante n’absorbe pas forcément l’intégralité de l’uranium à sa disposition (fonction de son stade phénologique) ;
- l’intégralité de l’uranium absorbé ne provoque pas forcément de toxicité.

Le concept de (bio)disponibilité tel qu’il est actuellement décrit et tel qu’il sera envisagé dans ces travaux est détaillé au schéma 3.1 page 35. Nous parlerons de disponibilité environnementale, de biodisponibilité environnementale et de biodisponibilité toxicologique (Peijnenburg et collab., 1997; Peijnenburg et Jager, 2003; NF ISO 17402, 2008).

3.1 La disponibilité environnementale

La disponibilité environnementale est considérée comme la teneur totale d’un élément dans un sol. Cela a déjà été évoqué dans ce manuscrit, il est maintenant acquis que la quantité d’une substance qu’une plante absorbe n’est que rarement reliée à sa concentration totale donc à sa disponibilité environnementale. La norme NF ISO 17402 (2008) définit cette disponibilité environnementale comme « la fraction d’un élément potentiellement disponible pour des organismes et qui résulterait d’un processus de désorption total ». Elle regroupe donc les formes fixées – les différents états de l’élément considéré

dans la fraction solide du sol à savoir réversiblement sorbé, constitutif et irréversiblement sorbé – et les formes solubles – les différents états de l'élément dans la fraction liquide à savoir complexé ou libre en solution. L'estimation de la disponibilité environnementale et des proportions relatives à chaque phase du sol se fait par extraction et calcul de coefficient de partage (se référer au paragraphe 4.1.1.2 à la page 38). Pour que l'intégralité d'un élément soit biodisponible pour les organismes vivants, il faudrait un transfert complet en solution de la fraction associée aux phases porteuses solides ainsi que le transport intégral de l'élément vers les récepteurs biologiques au cours de leur durée de vie. Ceci n'est pas envisageable naturellement et limite donc l'utilisation de la notion de disponibilité environnementale à la simple connaissance de la distribution des différents éléments (Peijnenburg et Jager, 2003; Hinsinger et collab., 2003).

3.2 La biodisponibilité environnementale

Contrairement à la disponibilité, la biodisponibilité environnementale ne considère que ce qui est intégré par les organismes vivants grâce à des mécanismes physiologiques d'absorption passive et active (NF ISO 17402, 2008). Pour ce faire, l'élément considéré doit à la fois être solubilisé dans la solution du sol, sous une forme chimique absorbable, et à proximité de l'organisme. Ce dernier point concerne notamment les végétaux qui ne sont pas mobiles et dont la seule possibilité de contact réside dans leur système racinaire. Aussi appelée « biodisponibilité externe » par Rensing et Maier (2003) ou « phytodisponibilité » chez les plantes, elle est dépendante du temps d'exposition. Plus ce dernier est long, plus l'organisme a le temps d'absorber. Elle est également dépendante de la cinétique d'absorption de l'organisme (Harmsen et collab., 2005). La phytodisponibilité de chaque nutriment et polluant varie donc selon les espèces vivantes qui possèdent toutes des métabolismes adaptés à leurs besoins. Chez les plantes, des différences sont observables jusqu'aux échelles des génotypes et écotypes (Chaignon, 2001; Michaud, 2007).

De manière plus opérationnelle, la phytodisponibilité d'un élément peut être considérée comme le flux vers la surface des racines d'une plante cible pendant une durée d'exposition précise (Harmsen et collab., 2005; NF ISO 17402, 2008). Même s'il est difficile à quantifier, ce flux peut tout de même être estimé en mesurant l'accumulation par la plante ou en utilisant des dispositifs particuliers (mesure de flux d'évapotranspiration, etc.). La biodisponibilité environnementale apparaît alors comme un concept dynamique nécessitant l'intégration des interactions sol/racine et leurs effets sur la modification de la disponibilité dans la rhizosphère au cours du temps (Peijnenburg et collab., 1997; Hooda et collab., 1999; Bravin, 2008).

3.3 La biodisponibilité toxicologique

La biodisponibilité toxicologique correspond à la quantité de substance qui doit être accumulée par un organisme pour que ce dernier présente les premiers signes de toxicité. Également connue sous le nom de biodisponibilité interne (Rensing et Maier, 2003) ou de phytotoxicité chez les plantes, son effet peut être déterminé à différentes échelles d'observations comme nous l'avons vu à la section 2.4 page 28. Elle est caractérisée par une valeur seuil minimale appelée Charge Critique du Corps en Résidu (CCCR ou CBR pour Critical Body Residue) qui est définie comme la concentration interne accumulée dans un tissu, un organe ou le corps entier et qui est corrélée à un effet préjudiciable (NF ISO 17402, 2008).

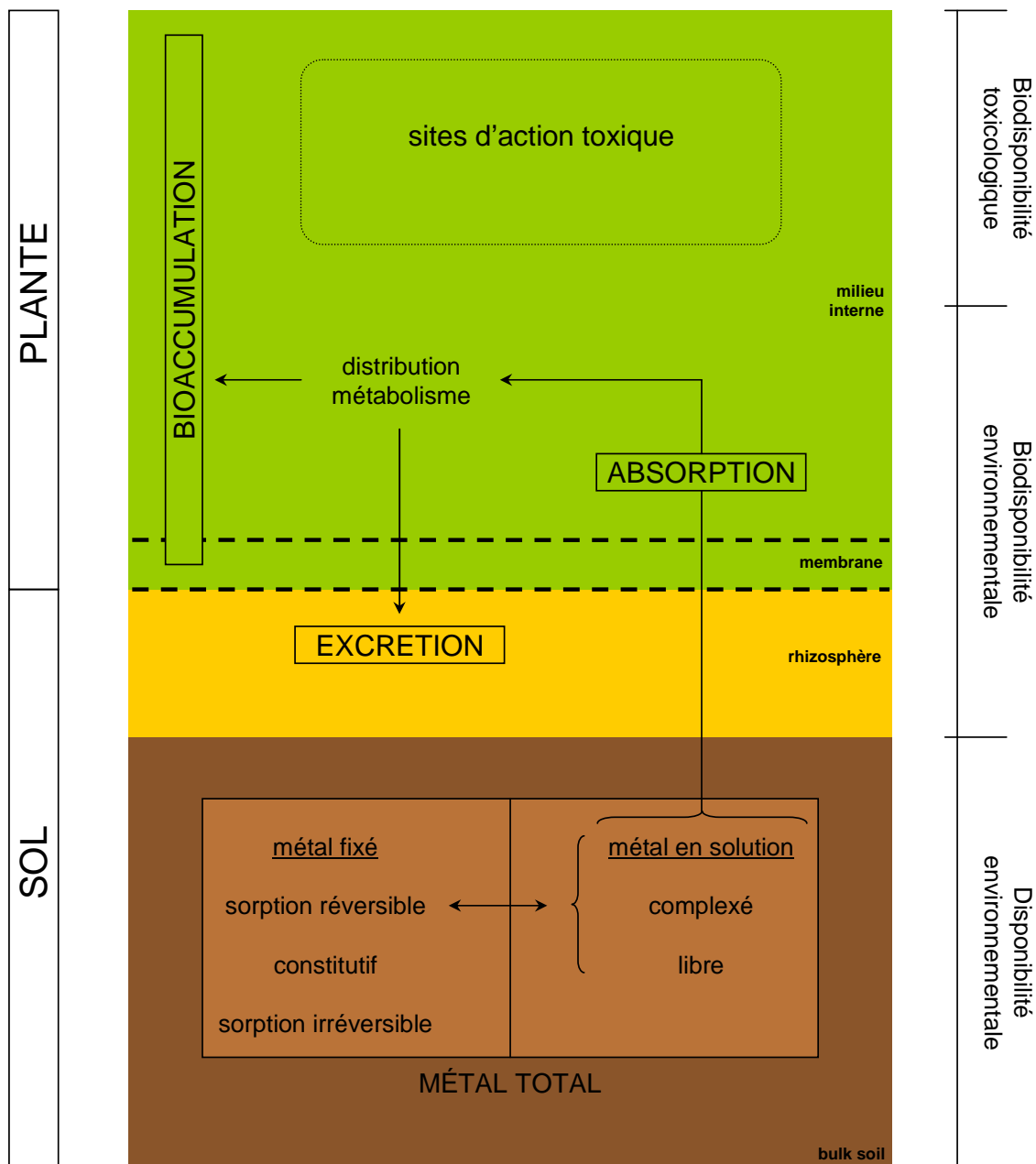


FIGURE 3.1: Schématisation des concepts de disponibilité environnementale, biodisponibilité environnementale et biodisponibilité toxicologique (Lanno et collab., 2004; Bravin, 2008; NF ISO 17402, 2008). Les barrières entre les différents compartiments ne doivent pas être considérées comme fixes et nettes.

4 Comment estimer la biodisponibilité ?

La biodisponibilité n'est pas un concept figé et il est sujet à des interprétations et mesures différentes. Il n'existe donc pas une seule méthode pour la mesurer, différents tests se basant sur des méthodes chimiques, isotopiques ou biologiques sont en effet à notre disposition. Chacun de ces tests présente un intérêt, ils apportent des informations complémentaires indispensables à la compréhension du comportement global de l'élément d'intérêt dans le système sol/plante. Le graphique 4.1 ci-dessous présente schématiquement la relation existant entre biodisponibilité, bioaccumulation et effets biologiques, et montre que le choix du test est déterminé par le sujet de l'étude.

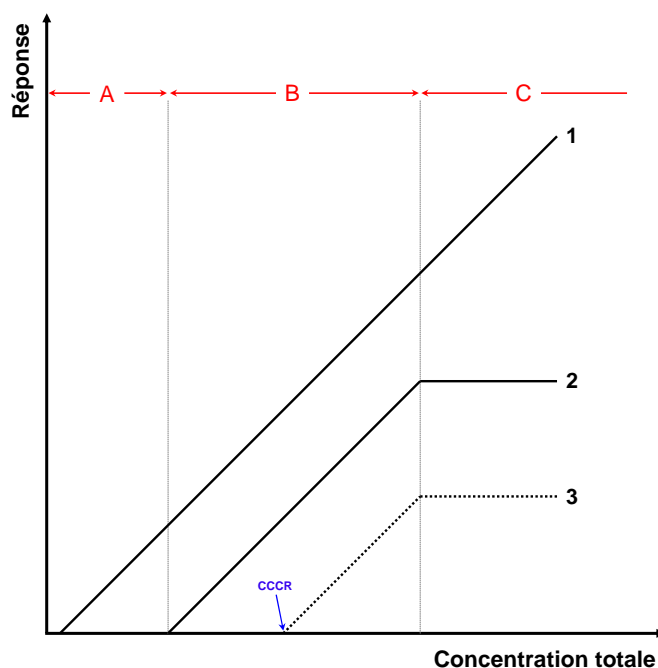


FIGURE 4.1: Réponse des essais chimiques et des essais biologiques en tant que fonction de la concentration totale : (1) essai chimique, (2) essai biologique = bioaccumulation, (3) essai biologique = effet, (A) uniquement détection du contaminant possible par test chimique, (B) présence de contaminant et bioaccumulation détectable, corrélation possible entre tests chimiques et biologiques, (C) présence du contaminant et effets détectables, corrélation impossible entre essais chimiques et biologiques (D'après Bravin (2008); NF ISO 17402 (2008))

4.1 Les méthodes chimiques

Depuis le XVIII^e siècle, agronomes et scientifiques développent des méthodes d'essais chimiques permettant de déterminer la concentration de nutriments disponibles dans les sols afin d'établir des plans de fertilisation adaptés aux besoins spécifiques des espèces.

Ces mêmes méthodes sont aujourd'hui appliquées lors d'études de risques liés à la présence de substances contaminantes. Les techniques d'extraction sont à l'heure actuelle les plus courantes. Elles ont été optimisées en corrélant résultats d'extraction et réponse biologique d'espèces sensibles.

4.1.1 Les extractions

4.1.1.1 Principe

Il existe principalement deux types d'extraction. Une extraction *simple* qualifie la mise en contact d'un échantillon de sol avec un unique extractant alors que l'extraction *séquentielle* qualifie la mise en contact d'un échantillon de sol avec plusieurs extractants successifs. L'extraction simple, généralement ciblée sur les fractions hydrosoluble et échangeable, a pour but de mesurer la fraction biodisponible. L'extraction séquentielle vise quant à elle à caractériser la spéciation solide et à déterminer les phases porteuses de l'élément considéré. Ces deux méthodes reposent fortement sur les interactions sol/eau et sol/solvant et donc sur le choix du ou des extractants selon l'information recherchée. L'eau et les sels neutres non tamponnés permettent de déterminer les concentrations directement disponibles pour les organismes. Ces extractants doux ciblent des processus d'échange, ils sont donc proches de ce qui est pertinent à l'échelle du vivant (Gupta et Aten, 1993; Lebourg et collab., 1998a,b; Fang et collab., 2007; Menzies et collab., 2007). Les extractants plus forts tels que les ligands synthétiques (EDTA) et les acides (HNO_3 , HCl) permettent de caractériser les quantités fortement retenues sur le sol, donc théoriquement peu ou pas disponibles (Menzies et collab., 2007).

Les extractions séquentielles décrites dans la littérature permettent une bonne approximation de la spéciation solide de différents éléments dans les sols (Tessier et collab., 1979; Gupta et Aten, 1993; Peijnenburg et collab., 1997; Schultz et collab., 1998; Rauret et collab., 1999). Les résultats de ces auteurs sont intéressants mais doivent tout de même être considérés avec précaution. En effet, les mesures sont peu répétables du fait de phénomènes de réadsorption rapide des produits extraits sur leurs phases originelles et par conséquent d'un intérêt limité pour caractériser l'évolution d'un système.

Les extractions chimiques donnent généralement lieu au calcul de coefficients de partage solide-liquide dont le concept est détaillé ci-après.

4.1.1.2 Coefficient de partage solide-liquide : le K_d

Pour un élément donné, le coefficient de partage – noté K_d , de dimension l kg^{-1} – correspond au rapport entre la concentration associée à la phase solide et la concentration dissoute dans la solution du sol (équation 4.1) (Rhodes, 1957).

$$K_d (\text{l kg}^{-1}) = \frac{\text{concentration dans la phase solide (Bq kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentration dans la phase liquide (Bq l}^{-1}\text{)}} \quad (4.1)$$

Il rend compte de la capacité de rétention de cet élément dans un sol et de sa mobilité dans la fraction liquide. Le K_d donne une bonne approximation des quantités qui peuvent entrer en contact direct avec les différents organismes du sol. Il varie énormément d'un type de sol à l'autre et en fonction du pH, comme nous pouvons le voir dans les tableaux 4.1 et 4.2 ci-contre. Bien que couramment utilisé, ce paramètre reste controversé et doit être utilisé avec prudence. Il est en effet soutenu par trois hypothèses rarement vérifiées dans l'environnement :

- l'existence d'un équilibre entre phases solide et liquide ;
- l'existence d'une relation linéaire entre concentration de l'élément adsorbé sur la phase solide et concentration de l'élément dans la phase liquide du sol ;
- la réversibilité totale et instantanée (Sheppard et Evenden, 1989).

Lorsque les équilibres sont susceptibles d'être perturbés, il est préférable d'employer le terme de coefficient de sorption (noté SR , de même dimension). Il se calcule comme le coefficient de partage et exprime cette même idée de partitionnement d'un élément entre phase solide et liquide. En revanche, il sous-entend que le système étudié n'est pas figé et que les phénomènes de sorption sur les particules du sol peuvent être réversibles. Il existe un modèle – SCEMR pour Soil Chemical Exchange and Migration of Radionuclides – permettant de calculer les K_d et SR en fonction des propriétés de sol. Néanmoins, les résultats obtenus présentent une grande variabilité et il est donc plus pertinent de travailler avec des valeurs obtenues expérimentalement sur les échantillons utilisés pendant les expériences (Hawkins et collab., 1995; Echevarria et Morel, 1997).

TABLE 4.1: Quelques valeurs de K_d (en $l\ kg^{-1}$) de l'uranium dans un système eau-sols agricoles. Les valeurs moyennes données dans le tableau correspondent à des moyennes géométriques (AIEA, 1994).

type de sol	valeur moyenne	intervalle de variation
sableux	33	0.055 à 20000
limoneux	12	0.017 à 9000
organique	400	2.7 à 60000
argileux	1500	4 à 490000

TABLE 4.2: Exemples de K_d (en $l\ kg^{-1}$) de l'uranium dans les sols en fonction du pH (AIEA, 2010).

pH du sol	valeur moyenne	intervalle de variation
pH < 5	71	70 à 6700
$5 \leq \text{pH} < 7$	740	2.6 à 67000
pH ≥ 7	65	90 à 6200

4.1.2 Les approches mécanistes

Plus théoriques, les méthodes mécanistes reposent sur des modèles mathématiques qui cherchent à relier facteurs biotiques et abiotiques. Comme tous les modèles, leur capacité prédictive est limitée par le nombre de facteurs utilisés pour décrire le phénomène étudié. La phytodisponibilité, qui ne se limite pas à une relation linéaire entre concentration totale du sol et effets toxiques, ne déroge pas à la règle.

Le premier modèle développé pour expliquer la disponibilité et la toxicité des éléments pour les organismes vivants est le modèle de l'ion libre (ou FIAM pour Free Ion Activity Model) (Campbell, 1995; Parker et Pedler, 1997; Brown et Markich, 2000). Il repose sur l'hypothèse simple que la biodisponibilité d'une substance est gouvernée par son activité dans le milieu aqueux c.-à-d. la solution du sol dans notre cas. La validité de ce modèle a été vivement critiquée dans la mesure où il ne tient pas compte de l'existence de compétition

entre cations pour les sites d'absorption (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , H^+) et qu'il néglige la présence de ligands organiques susceptibles d'adsorber une partie des ions libres du milieu (Hough et collab., 2005; McBride, 2001).

Ce modèle de l'ion libre a été modifié en tenant compte de ces deux facteurs pour donner le modèle du ligand biotique (ou BLM pour Biotic Ligand Model). Cette version ayant elle-même donnée lieu au développement d'une version spécifique à la biodisponibilité des éléments chimiques dans les sols, le modèle du ligand biotique terrestre (ou TBLM pour Terrestrial Biotic Ligand Model). Selon Thakali et collab. (2006), ce dernier donnerait des estimations de la toxicité du cuivre (Cu) et du nickel (Ni) sur l'élongation racinaire chez l'orge légèrement meilleures que le FIAM.

Ces deux modèles, TBLM et FIAM, ont un point faible de taille puisqu'ils supposent à tort que le sol est un milieu à l'équilibre dans lequel le transport des éléments vers les sites d'intégration se fait de manière rapide et non limitante (Degryse et collab., 2009).

Au final, le modèle qui se rapproche le plus de conditions environnementalement cohérentes est le modèle Barber-Cushman (Barber et Cushman, 1981). Développé pour décrire la nutrition des plantes en azote, il a été ajusté pour le cas particulier des contaminations des sols par les éléments traces métalliques. L'absorption des ions métalliques – la biodisponibilité environnementale – est définie par leur transfert à la plante et par leur transport dans la matrice de sol jusqu'aux racines. Ce dernier facteur étant lui-même décomposé en flux de masse et diffusion radiale au niveau des racines. En revanche, il n'intègre pas encore les données de spéciation ce qui peut se révéler capital dans le cas de l'uranium (Adhikari et Rattan, 2000; Sterckeman et collab., 2004).

4.1.3 Les préleveurs passifs

Les préleveurs passifs sont originellement dédiés à l'extraction des contaminants présents à l'état de traces dans les milieux aquatiques tels que les eaux et les sédiments. Ils ont deux particularités intéressantes, ils concentrent les polluants et apportent des informations intégrées dans le temps. Des dispositifs comme les membranes semi-perméables (SPMD pour Semi Permeable Membrane Devices) et les gradients de diffusion sur couche mince (DGT pour Diffusive Gradient in Thin film) ont été adaptés aux études de sols et à la mesure de la phytodisponibilité. Ils permettent de mimer la fonction de préleveur passif des racines et de quantifier les espèces métalliques labiles en solution (Davison et collab., 2007; Degryse et collab., 2009). Le prélèvement qu'ils induisent – lorsqu'ils sont placés sur un sol ou un sédiment – s'accompagne de la réalimentation potentielle de la phase liquide à partir de la fraction solide mais ne prend pas en compte les autres effets possibles provoqués par la présence de racines.

Malgré cela, les DGT montrent une capacité de prédiction de transfert tout à fait acceptable pour des éléments tels que le cadmium, le cuivre, le plomb et le zinc (Zhao et collab., 2006; Zhang et collab., 2004, 2001; Nolan et collab., 2005). Les valeurs obtenues avec ce type de dispositifs sont généralement surestimées dans la mesure où les conditions expérimentales nécessitent de travailler avec des sols très humides – 80 % de la capacité au champ – pour favoriser la diffusion des ions libres et des complexes labiles dans la résine.

Concernant l'uranium, différentes études sur sol prouvent également l'efficacité de ces dispositifs pour prédire l'absorption de l'élément par les plantes. En effet, les travaux de Duquène et collab. (2010) sur un sol dopé par l'ajout de 36 mg U kg^{-1} montrent qu'il existe une bonne corrélation entre les concentrations d'uranium labiles mesurées par la DGT, les concentrations extraites par de l'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), la concentration

d'uranium dans la solution du sol et les quantités absorbées par le raygrass (*Lolium perenne*). Sur du sol naturel, Vandenhove et collab. (2009) – qui ont étudié 6 sols contenant de l'uranium avec une histoire géologique différente – ont également observé une bonne corrélation entre les mesures réalisées avec DGT, la concentration dans l'eau interstitielle et les mesures de bioaccumulation du raygrass, mais une moins bonne corrélation avec les mesures réalisées par extraction sélective. Sur un sol de mine très riche en uranium fortement anthropisé, la corrélation entre DGT et accumulation est elle-aussi très bonne et permet même de déterminer l'existence de différents pools d'uranium présentant des cinétiques de remobilisation différentes (Mihalík et collab., 2012).

Néanmoins, comme cela a été signalé plus haut, la principale limite de ce préleveur passif réside dans son incapacité à mimer correctement l'activité d'une racine et notamment sa caractéristique essentielle de préleveur actif. Enfin, le choix du matériau constitutif de la résine est primordial dans la mesure où ils ne sont pas tous aussi efficaces avec les différents éléments en traces métalliques (Mihalík et collab., 2012).

4.2 Les méthodes isotopiques

L'intérêt majeur de ces méthodes repose sur le fait qu'elles ne nécessitent pas d'extraire l'élément à analyser. Les données sont obtenues par comptage de désintégrations radioactives et interprétées en appliquant les principes de dilution isotopique et des cinétiques d'échanges isotopiques. Cette technique permet de déterminer la taille et les propriétés cinétiques des éléments constitutifs d'un pool (ou compartiment) dans un système complexe sans provoquer de déséquilibre (Atkins, 1973; Frossard et Sinaj, 1997). Pour ce faire, il faut injecter une quantité connue d'un isotope traceur dans un pool choisi – généralement la solution du sol – et suivre les flux nets (sortant - entrant) de ce dernier. L'analyse mathématique de la diminution de radioactivité – qui correspond au transfert net de l'isotope du compartiment d'injection vers d'autres compartiments – donne des informations sur l'organisation des ions échangeables et sur leur aptitude à se déplacer entre les phases solides et la solution. En mesurant au fil du temps l'évolution du rapport entre isotope traceur et isotope tracé (r_t/R sur la figure 4.2 page 42) dans la solution du sol et en extrapolant cela à des temps longs par modélisation, cette approche permet d'obtenir une représentation dynamique des compartiments échangeables du sol.

En se concentrant sur des temps représentatifs d'une culture végétale, il est possible d'estimer de manière convenable les quantités qui seront ou non accessibles aux plantes (figure 4.3 page 42). Les temps représentatifs évoqués précédemment sont choisis en fonction de l'élément et de la physiologie de la plante considérés, essentiellement en fonction de la connaissance des phénomènes d'absorption active. À titre d'exemple, pour le phosphate :

- 0 à 1 minute : quantités quasi instantanément échangeables (période choisie arbitrairement) ;
- 1 minute à 24 heures : absorption active des ions par les racines (par opposition au flux d'eau total) ;
- 24 heures à 3 mois : quantité échangeable pendant la période culturale (fonction de l'espèce) ;
- 3 mois à 1 an : quantités non isotopiquement échangeables pendant la culture (fonction de l'espèce) ;
- après 1 an.

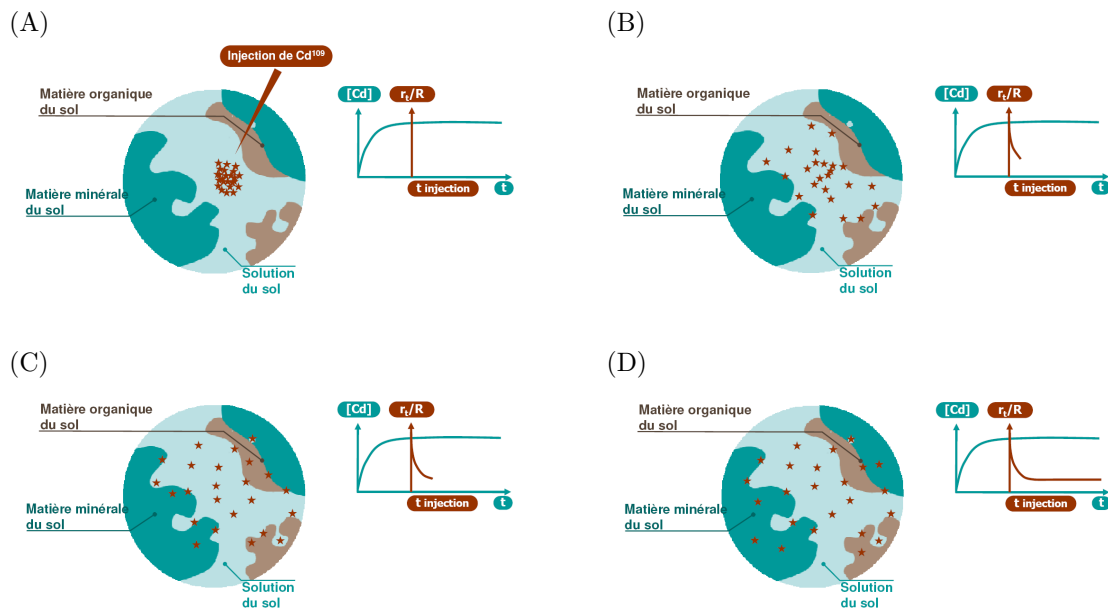


FIGURE 4.2: Schéma explicatif du principe de dilution isotopique (chronologiquement de (A) jusque (D)) permettant l'estimation des cinétiques d'échange entre les différents compartiments d'un sol. Exemple du cadmium.

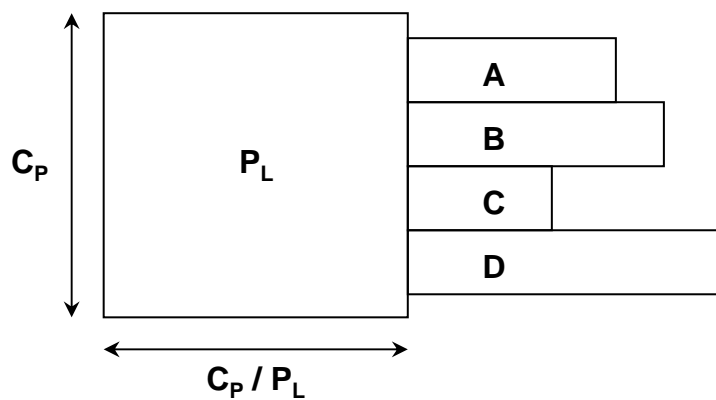


FIGURE 4.3: Représentation mamellaire schématique de la phytodisponibilité d'un élément développée pour le phosphore (C_P = concentration des ions dans la solution du sol ; P_L = compartiment échangeable instantanément ; A = compartiment échangeable entre 1 minute et 24 heures ; B = compartiment échangeable entre 24 heures et 3 mois ; C = compartiment échangeable entre 3 mois et 1 an ; et D = compartiment échangeable après 1 an (Fardeau, 1993).

En plus de donner des informations précises sur les cinétiques d'échange d'ions, les méthodes radioactives permettent de déterminer à quels pools les plantes ont accès pendant leur développement. Pour ce faire, la plante est cultivée sur un sol dans lequel l'isotope traceur a été injecté. À l'issue de la culture, l'activité spécifique de la biomasse végétale est comparée à celle obtenue après une extraction chimique du sol nu à l'aide d'un extractant permettant de récupérer une fraction la plus proche possible de la fraction biodisponible. Selon que cette activité spécifique est inférieure, égale ou supérieure à celle mesurée dans la plante – la teneur en isotope traceur dans le végétal peut également être inférieure, égale ou supérieure au ratio isotope traceur/isotope naturel – nous pouvons en conclure que la plante a exploité en partie ou totalement le pool chimiquement disponible et/ou a eu accès à des pools initialement non disponibles.

4.3 Les méthodes biologiques

Les tests biologiques tiennent compte du fait que les systèmes d'absorption sont spécifiques aux organismes vivants et que certains d'entre eux impliquent une modification de l'environnement immédiat. Ils sont complémentaires des analyses chimiques et isotopiques puisqu'ils sont en mesure de fournir des données de bioaccumulation et de toxicité. Dans les méthodes d'essais écotoxicologiques, les effets préjudiciables peuvent être observés à différents niveaux d'organisation biologique que sont :

- le niveau moléculaire ;
- le niveau cellulaire ;
- le niveau métabolique (activité enzymatique) ;
- le niveau de l'individu (accumulation, mortalité, reproduction, comportement) ;
- le niveau de la population (abondance, diversité) ;
- le niveau communautaire (composition des espèces).

La diversité d'échelle au sein de ces niveaux a nécessité de mettre en œuvre des tests très différents, notamment les tests biochimiques et les tests d'accumulation et de toxicité.

4.3.1 Les tests biochimiques prédictifs

Ils ciblent des processus métaboliques spécifiquement affectés par la présence de contaminant dans un milieu et permettent donc de quantifier l'état de stress au niveau cellulaire. Leurs résultats sont utilisés pour essayer de mieux comprendre les effets macroscopiques observés.

Il existe notamment des tests basés sur l'étude de microorganismes. À titre d'exemple, le test MetPLATE permet de détecter la présence de métaux lourds biodisponibles dans un milieu aqueux. Il repose sur l'inhibition de la β -galactosidase chez un mutant d'*Escherichia coli* et sur la corrélation entre intensité de coloration et activité enzymatique. À l'aide de cette technique, Bitton et collab. (1994) et Boularbah et collab. (1996) ont mis en évidence qu'une diminution de l'activité de l'enzyme peut être reliée à la concentration de cadmium et de zinc dans les parties aériennes du ray-grass (*Lolium perenne*). Une méthode similaire a été validée avec des souches modifiées d'*Escherichia coli* (CM2624). L'insertion d'une construction génique contenant deux gènes – un gène induit par la présence du métal et

un gène provoquant l'émission de photons – permet de déterminer la concentration de mercure dans les sols (Bontidean et collab., 2004).

Des mesures d'activités enzymatiques peuvent aussi être menées directement sur les cellules d'organismes d'intérêt. Sur le matériel végétal, le dérèglement des peroxydases et de la glutamate deshydrogénase est un bon indicateur d'une accumulation toxique de métal. De bonnes corrélations entre diminution de l'activité enzymatique et l'accumulation de mercure ont été démontrées dans les parties aériennes du haricot (Bontidean et collab., 2004; Van Assche et collab., 1988). L'utilisation de ces biosenseurs reste pour le moment limitée à des cas particuliers.

4.3.2 Les tests d'accumulation et de toxicité non prédictifs

Le principe de ce type de tests biologiques est simple puisqu'il consiste en l'exposition d'un organisme modèle à un substrat dont on cherche à estimer la biodisponibilité en un élément. Pendant l'expérience, différents traits phénotypiques caractérisant l'état de santé sont mesurés – ce qui permet de déterminer l'apparition de toxicité – et la bioaccumulation est mesurée. Cela permet de savoir si ce qui est observé correspond à de la biodisponibilité environnementale ou toxicologique (pour rappel voir la section 3 page 33). L'avantage évident de cette méthode est de travailler avec un système très proche de la réalité sans avoir à se reposer sur des prédictions dont la fiabilité peut être remise en cause. Cela permet également de s'intéresser à la potentielle influence de l'organisme sur son milieu proche et de mettre en évidence d'éventuel effet de ce dernier sur la biodisponibilité.

Comme toute technique, ces tests d'accumulation et de toxicité ont des inconvénients. Selon l'organisme utilisé, le temps nécessaire aux expériences peut parfois être nettement supérieur aux délais relativement courts des analyses chimiques. Nous pensons au cas des animaux à élever ou des plantes à cultiver par exemple. Dans ces cas-là, il faut bien s'assurer que le rapport coût-bénéfice en vaut la peine. D'autre part, le temps d'exposition sur le substrat est un point qui peut être critiqué. En effet, tous les organismes ne permettent pas de mesurer les effets et la bioaccumulation sur un cycle de vie complet – naissance, développement, reproduction et mort – alors qu'il ne semble pas inconcevable que la capacité d'absorption varie significativement selon les étapes du développement.

Pour terminer, il faut garder à l'esprit que la biodisponibilité toxicologique mesurée avec ce type de tests ne représente en réalité qu'une expression particulière de cette dernière. Les interprétations sont faites sur l'observation de traits phénotypiques, ceux-ci étant considérés comme représentatifs de l'apparition d'un effet biologique. Il est possible que nous passions à côté d'informations ou que nous fassions une approximation haute en ne choisissant pas le caractère affecté en premier par la présence d'une substance toxique dans l'environnement de l'organisme.

5 Les mécanismes rhizosphériques susceptibles d’agir sur la phytodisponibilité de l’uranium

La rhizosphère correspond au volume de sol – non stable dans le temps – qui interagit directement et immédiatement avec les racines vivantes (Hiltner, 1904; Darrah, 1993; Hinsinger, 1998; Richter et collab., 2007). Elle constitue les premiers nanomètres de sol depuis la surface racinaire – en distance radiale – et peut s’étendre jusqu’à quelques centimètres en présence de racines fortement actives (Waisel et collab., 2002). La rhizosphère se distingue du reste du sol par ses propriétés biologiques, chimiques et physiques puisqu’elle possède par exemple son propre pH et son propre potentiel d’oxydoréduction – qui peuvent varier au cours du temps. D’importantes populations d’organismes vivants s’y développent (animaux, archées, bactéries, champignons, protistes, et végétaux) ce qui impacte la concentration en ions du fait de leur activité d’absorption et d’exsudation (Marschner, 2002a). Dans la rhizosphère, le développement des racines exerce une pression mécanique sur les constituants du sol ainsi qu’une pression chimique *via* le relargage ou l’assimilation de composés organiques. Ces deux phénomènes contribuent ainsi à l’altération et la dissolution de certains constituants minéraux, participent à l’évolution du sol et sont donc susceptibles de modifier la phytodisponibilité des éléments chimiques.

5.1 Le prélèvement d’ions et de nutriments

Le premier mécanisme susceptible de modifier la phytodisponibilité est simplement le prélèvement racinaire. Ce dernier affecte entre autre l’équilibre acido-basique du sol dans la mesure où ce processus physiologique est électriquement neutre. Le prélèvement d’un cation ou d’un anion peut-être compensé par le relargage d’un H^+ ou d’un OH^- , ou par un autre ion. Ainsi, le statut nutritif d’une plante et son niveau de prélèvement peut conduire à l’acidification ou l’alcalinisation de la rhizosphère selon la nature des composés absorbés (Richter et collab., 2007). D’après April et Keller (1990), la différence de pH entre la rhizosphère et le sol non-rhizosphérique peut parfois atteindre deux unités.

5.2 L’exsudation racinaire

Le second mécanisme décrit est l’exsudation qui, au sens large, peut être définie comme la libération par les racines métaboliquement actives de composés solubles, minéraux ou organiques de faible ou haut poids moléculaire (Nguyen, 2003). Les exsudats racinaires remplissent plusieurs fonctions importantes, par exemple :

- le rôle de protection et de lubrification des couches cellulaires externes et de la coiffe (sécrétion d’une gaine polysaccharidique – le mucilage – qui favorise notamment les

mouvements racinaires (Ray et collab., 1988));

- le rôle nutritionnel par le biais de sécrétions influençant le pH, le potentiel redox, l'activité des transporteurs membranaires et la chélation d'oligoéléments (augmentation de la biodisponibilité de l'eau et de certains nutriments peu disponibles comme le fer et le phosphore (Guinel et McCully, 1986; Römheld et Marschner, 1990; Vance et collab., 2003; Duffner et collab., 2012));
- le rôle de chimiotactisme grâce à l'excrétion de molécules attractives (induction de nodulation et d'associations mycorhiziennes (Marschner, 2002b));
- le rôle de détoxification des métaux (Horst et collab., 1982).

Il existe deux grandes catégories d'exsudats racinaires. Les composés de haut poids moléculaire – acides gras, composés desquammés, flavonoïdes, hormones, métabolites secondaires, mucilage, polypeptides, protéines (notamment des enzymes), sucres complexes et vitamines (Uren, 2000; Bertin et collab., 2003; Nguyen, 2003) – et les composés de faible poids moléculaire tels que les sucres simples, les acides aminés, les acides organiques mais aussi, en plus faible proportion, les phénols, les lipides, les alcools ainsi que les métabolites secondaires (Grayston et collab., 1997; Verpoorte, 2000; Nguyen, 2003).

La nature et le niveau de l'exsudation dépendent des espèces et de l'intensité du métabolisme racinaire des individus. Ce dernier est régulé par les besoins en nutriments et l'offre du sol, le stade de développement du végétal, les conditions climatiques et la présence d'éléments stressants dans le milieu.

5.2.1 L'exsudation d'acides organiques

Les acides organiques retrouvés dans la rhizosphère proviennent des produits de décomposition, de l'oxydation de composés carbonés ainsi que de l'exsudation des racines et des microorganismes (Lapeyrie et collab., 1987; Herbert et Bertsch, 1995). À titre d'information, les différents flux et réservoirs observables dans un sol sont schématisés à la figure 5.1 ci-contre. Leur poids moléculaire varie dans une gamme allant de quelques Da pour les petits composés (acides citrique et oxalique par exemple) à environ 300 kDa pour les plus gros composés tels que les acides humiques. La majorité des acides organiques possède des groupements acides fonctionnels (principalement carboxyliques et phénoliques). Ce sont des acides faibles dont les valeurs de pKa varient de 3 pour les groupements carboxyliques à 9 pour les groupements phénoliques (Richter et collab., 2007). Les acides organiques et leurs anions sont susceptibles de modifier l'équilibre minéral entre phases solides et en solution par au moins trois mécanismes :

- en modifiant le taux de dissolution par un changement de pH ou en formant des complexes avec des cations à la surface des minéraux ;
- en affectant l'état de saturation de la solution ;
- en modifiant la spéciation des ions en solution, comme Al^{3+} qui joue lui-même sur le taux de dissolution des minéraux (Drever et Stillings, 1997).

En fonction de leur propriétés de dissociation et du nombre de groupements carboxyles qu'ils possèdent, les acides organiques peuvent présenter des charges négatives impliquées dans la complexation de cations métalliques en solution et le déplacement d'anions depuis la matrice du sol. Ils influent donc sur de nombreux processus physico-chimiques tels

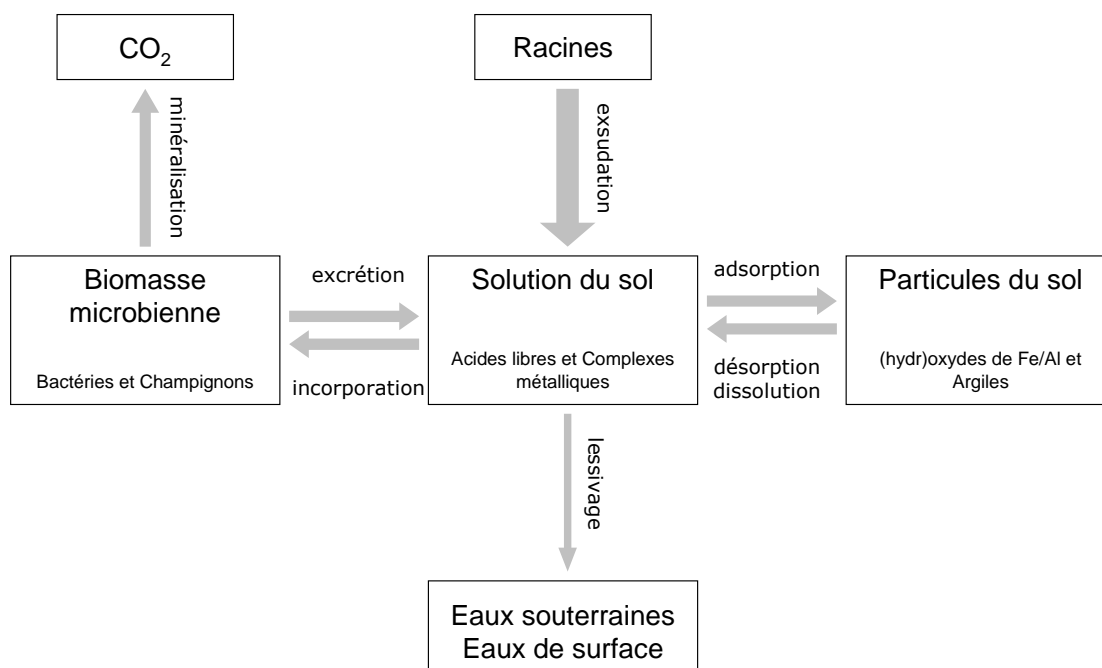


FIGURE 5.1: Schématisation des différents flux et réservoirs d'acides organiques dans les sols (Jones, 1998)

que l'érosion et la dissolution (Drever et Stillings, 1997; Fransson et collab., 2004), la podzolisation (Lundström, 1994; Strobel, 2001), le lessivage des métaux (Parker et Pedler, 1997; McLaughlin et collab., 1998; Parker et collab., 2001), la désorption et la dissolution des phosphates (Hocking et collab., 1997) ainsi que les réactions de désorption et de solubilisation des métaux (McBride, 1989).

Des simulations informatiques et des études *in vitro* prédisent qu'un fort gradient d'acides di- et tri-carboxyliques existe dans la rhizosphère. D'après Darrah (1991) et Jones et collab. (1996a), ce dernier aurait une sphère d'influence comprise entre 0.2 et 1 mm selon le type de sol, le type d'acide organique et le temps de contact. En utilisant des modèles mathématiques et les isothermes d'adsorption des anions, Jones et collab. (1996a) prédisent une adsorption rapide des acides organiques sur la phase d'échange du sol (> 60 %) quand leur concentration dans la solution du sol est comprise entre 1 et 50 μM (en fonction du stress en aluminium ou phosphore). À noter que ces concentrations sont en accord avec les concentrations extraites d'une rhizosphère naturelle (de 1 à 100 μM) (Jones, 1998).

De manière générale, les acides organiques sont présents à de plus fortes concentrations dans les horizons O et leur concentration décroît fortement avec la profondeur (Fox et Comerford, 1990; Herbert et Bertsch, 1995; Richter et collab., 1995). Dans la solution du sol, les concentrations moyennes en acides aliphatiques mono-carboxyliques – acide formique, acétique et propionique – sont comprises entre 0 et 1 mmol l^{-1} et celles des di- et tri-carboxyliques – acide oxalique, citrique, malique et succinique – entre 0 et 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Ces derniers peuvent cependant être bien plus concentrés au voisinage des racines. Les acides aliphatiques sont retrouvés dans les macropores et autres voies de circulation de la solution du sol au voisinage des racines actives et microbiota associés (Herbert et Bertsch, 1995; Strobel, 2001; Fransson et collab., 2004; Richter et collab., 2007). En effet, ils sont pour la plupart impliqués dans le cycle de Krebs.

Ajoutés à des concentrations environnementalement pertinentes (10 à 100 μM), les acides organiques sont rapidement dégradés dans le sol. Leur demi-vie moyenne est en effet de 2 à 3 h selon le type de sol. Cette dégradation est en général plus rapide dans

les horizons organiques de surface et deux à trois fois plus rapide dans la rhizosphère que dans le reste du sol (Jones et Darrah, 1994). Ceci est en partie dû à la présence de microorganismes dans le milieu (Jones, 1998).

5.2.2 Un exemple concret : l'exsudation de citrate lors de carence en phosphore

Du fait de son insolubilité et de sa forte capacité de sorption dans le sol, le phosphore peut rapidement devenir un paramètre limitant au développement des plantes (Marschner, 2002a). C'est généralement l'élément – avec l'azote – qui pose le plus de problème de carence en agriculture. Pour palier ce manque, les plantes ont développé des stratégies leur permettant de modifier leur rhizosphère et donc de rendre disponibles des pools de phosphore qui ne le sont pas directement. Elles peuvent par exemple modifier la longueur et la densité de leurs poils absorbants (augmentation de la surface d'échange), libérer des phosphatases (solubilisation du phosphore lié aux fractions organiques) ou sécréter des protons pour solubiliser le phosphore inorganique (P_i) (Jones, 1998). Il a ainsi été montré que certaines dicotylédones, notamment les non-mycorhiziennes comme le lupin blanc (*Lupinus albus*), sont capables de libérer de grandes quantités d'acides organiques dans la rhizosphère en réponse à la carence en phosphore (Gardner et collab., 1983; Dinkelaker et collab., 1989; Hoffland et collab., 1992; Gerke, 1994; Dinkelaker et collab., 1995; Johnson et collab., 1996a; Neumann et collab., 1999). Chez ces espèces, cela est rendu possible grâce au développement intensif de petites grappes de radicelles ressemblant à des goupillons – les clusters – sur des portions de racines latérales primaires quand l'élément fait défaut dans le milieu. Ces racines sont communément appelées « racines protéoïdes » du nom de la famille des *Proteaceæ* qui regroupe des espèces végétales adaptées aux sols peu fertiles (Lamont, 1982) et dans laquelle elles ont été mises en évidence pour la première fois. Ces goupillons (ou clusters) sont couverts de poils absorbants, mesurent de 1 à 5 centimètres de long, peuvent être regroupés à plusieurs par racine latérale et présentent une densité minimale de 10 radicelles par centimètre (figure 5.2 ci-contre) (Johnson et collab., 1996b). Quand ils sont actifs, ces clusters sont capables de produire et d'exsuder d'importantes quantités d'acides organiques et notamment de citrate. Cet acide organique possède un fort pouvoir complexant et permet aux plantes d'améliorer leur nutrition phosphatée. D'après les travaux de Dinkelaker et collab. (1995), cette réponse physiologique serait due à la réorientation totale du métabolisme des cellules des racines protéoïdes (schéma 5.3 page 50).

Dans le paragraphe précédent, l'accent a été mis sur le citrate mais il faut avoir à l'esprit que d'autres acides organiques tels que le malate ou l'oxalate sont également exsudés par les racines protéoïdes. Selon le type de sol et la spéciation, des taux de phosphore en solution de 10 à 1000 fois plus élevés ont été constatés en présence d'acides organiques (Earl et collab., 1979; Fox et collab., 1990a,b; Fox et Comerford, 1992; Gerke, 1994; Jones et Darrah, 1994). De manière générale, l'efficacité d'extraction du P_i est : citrate > oxalate > malate > acétate (Lan et collab., 1995). Le relarguage de phosphore induit par la présence d'acides organiques dépend de nombreux facteurs incluant le pH et la minéralogie du sol (Fox et collab., 1990a,b; Bolan et collab., 1994; Jones et Darrah, 1994; Lan et collab., 1995). Au moins deux mécanismes peuvent conduire à la libération de phosphore dans la solution du sol. Le premier implique un échange direct de ligands au cours duquel le citrate remplace le phosphore sur les surfaces d'échange (c'est le cas avec les cristaux de $Al(OH)_3$ ou $Fe(OH)_3$). Le second implique la complexation des ions métalliques avec le solide qui constitue la matrice d'échange contenant le phosphore (par exemple Ca^{2+}

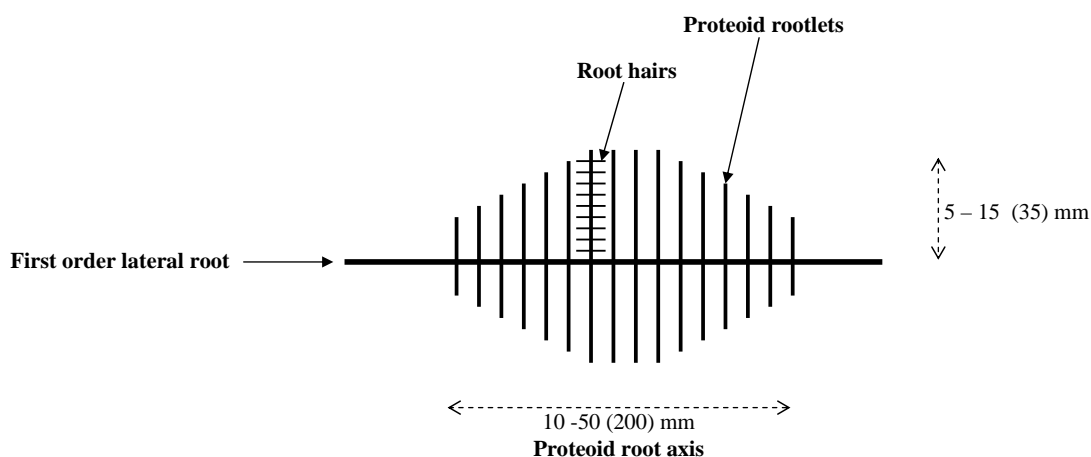


FIGURE 5.2: Représentation schématique d'une racine protéoïde (valeurs maximales entre parenthèses) (Dinkelaker et collab., 1995)

dans les roches phosphatées ou Fe^{3+} dans $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (Jones, 1998). En général, de grandes quantités d'acides organiques ($> 100 \mu\text{M}$ pour le citrate et $> 1 \text{ mM}$ pour l'oxalate, le malate et le tartrate) sont requises pour solubiliser de manière conséquente le phosphore ce qui est rarement en accord avec les capacités d'exsudation réelles des plantes (Earl et collab., 1979; Jones et Darrah, 1994; Lan et collab., 1995).

5.2.3 Essais de phytoremédiation de l'uranium avec le citrate

Huang et collab. (1998) ont montré qu'un apport de 20 mmol de citrate kg^{-1} de sol sec conduit à une multiplication par 20 de la quantité d'uranium présent dans la solution du sol. Cela provoque également une augmentation de son transfert vers les plantes : en passant de 15 à 209 mg U kg^{-1} de matière sèche, le transfert d'uranium à la betterave est multiplié par 15. Aux concentrations testées, la présence d'acide citrique provoque un abaissement du pH du sol (de 7 à 5) qui s'accompagne d'une augmentation de la concentration en ions uranyles mobiles dans la solution de sol, ce qui favorise *in fine* le transfert et l'accumulation de l'uranium aux racines (Ebbs et collab., 1998a,b). Il a par ailleurs été démontré que le citrate a un effet sur la solubilisation de l'uranium de 100 à 1000 fois supérieurs à des amendements tels que les acides acétique et malique (Huang et collab., 1998), le HEDTA (Ebbs et collab., 1998b), les acides oxalique, disuccinique S,S-éthylènediamine et nitrilotriacétique (Duquène et collab., 2008) ou encore l'EDTA et l'EDDS (Lozano et collab., 2011).

5.3 L'oxydo-réduction des métaux déficients en électrons

La présence d'oxygène (O) dans les sols bien aérés assure une faible concentration en électrons chimiquement réactifs et la prépondérance d'ions métalliques sous des formes de haute valence dans un état d'oxydation déficient en électrons. Contrairement au reste du sol généralement bien pourvu en oxygène, les rhizosphères peuvent constituer des environnements réducteurs du fait du renouvellement régulier de la matière organique provenant des racines. L'oxygène y étant activement consommé par la décomposition microbienne et de respiration racinaire, de forts gradients de potentiel rédox peuvent se

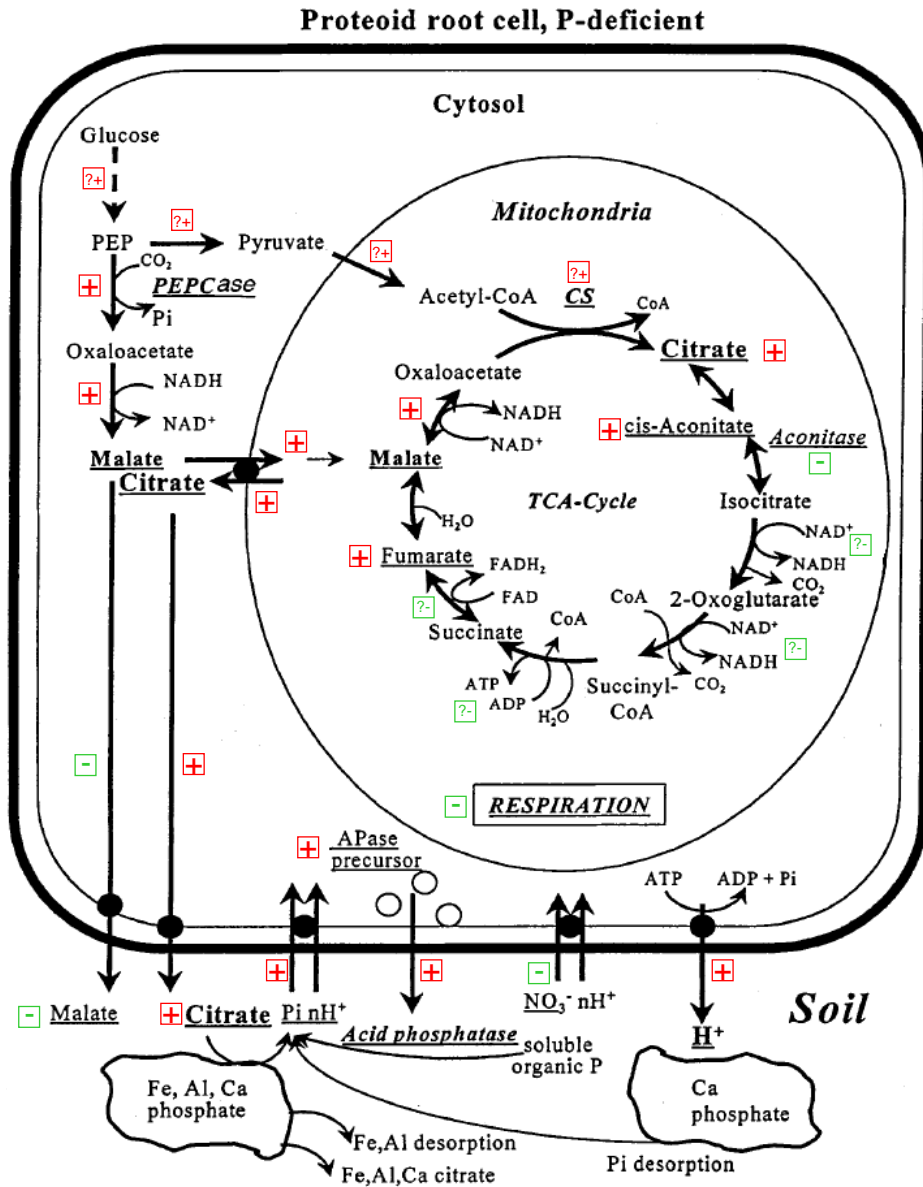


FIGURE 5.3: Représentation schématique des modifications physiologiques et de la mobilisation du phosphore non-disponible induites chez les racines protéoïdes mûres de lupin blanc lors d'une carence en phosphore. Les métabolites et les réactions enzymatiques impliqués sont marqués par les symboles (+) et (-) lorsque leur niveau d'activité est respectivement supérieur ou inférieur par rapport aux niveaux observés chez les contrôles. Lorsque des réactions sont susceptibles d'être influencées pendant une période de carence mais que la démonstration n'a pas encore été faite, les symboles (?+) et (?+) sont utilisés (Dinkelaker et collab., 1995)

former entre l'environnement avoisinant la racine et le sol environnant. L'un des effets visibles de ce phénomène est la mise en place de formations à l'aspect marbré contenant du fer réduit par remobilisation du Fe(III) provenant des zones environnantes plus oxydées (Richter et collab., 2007).

5.4 Action de l'acide carbonique

Les concentrations en acide carbonique dans le sol s'accroissent généralement avec la profondeur. Elles peuvent être relativement élevées dans la rhizosphère compte-tenu du fait que cette dernière représente un environnement idéal où se concentrent respirations racinaire et microbienne. L'acide carbonique possède un potentiel de dissolution minérale dans les trois phases du sol : CO₂ dans la phase gazeuse, acide carbonique et ions associés dans la phase liquide et, protons et carbonates qui interviennent dans les échanges cationiques et interagissent avec les surfaces et les structures minérales dans la phase solide (Reuss et Johnson, 1986; Amundson et Davidson, 1990; Richter et collab., 1995; Oh et Richter, 2004).

6 Conclusions, perspectives et objectifs de recherche

Les connaissances accumulées au sujet de l'uranium ne sont pas encore suffisantes pour prédire efficacement son transfert du sol aux plantes. Ce système représente pourtant la première voie d'entrée du contaminant dans les chaînes trophiques et notamment celle de l'Homme, soit directement par ingestion de végétaux, soit indirectement en se nourrissant des produits de l'élevage (viande, lait, etc.).

Dans l'environnement, l'uranium est présent naturellement dans les sols à des niveaux relativement faibles – de l'ordre de 0.5 à 5 mg U kg⁻¹ de sol sec – ou plus élevés comme c'est le cas sur des sols riches en phosphates dans lesquels les concentrations peuvent atteindre 120 mg U kg⁻¹ de sol sec. À cela s'ajoutent des zones ayant subi une forte anthropisation qui représentent un risque potentiel qu'il convient de maîtriser. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cet état de l'art, les solutions de traitement mises en œuvre pour le moment sont à la fois insuffisantes et temporaires, il est donc essentiel de continuer à accumuler des connaissances au sujet de cet élément potentiellement toxique afin de gérer au mieux sa présence dans notre environnement. L'uranium a une chimie complexe et son comportement dans les sols et la solution du sol est difficile à appréhender puisque sa spéciation dans ces compartiments est très dépendante des conditions physico-chimiques. À l'heure actuelle, les méthodes mises à notre disposition pour déterminer sa répartition entre sol et solution du sol reposent sur des modèles généralistes qui donnent une représentation instantanée et figée peu représentative de l'environnement variable et dynamique dans lequel l'uranium évolue.

Dans le système sol/plante, le comportement de l'uranium est régi par de nombreuses variables telles que les types de sol, les concentrations en présence ainsi que les espèces végétales. En effet, l'uranium n'est pas accumulé et transloqué aux parties aériennes dans les mêmes proportions lorsqu'il est en contact avec des espèces mono- ou dicotylédones. De la même manière, les niveaux de bioaccumulation enregistrés ainsi que les degrés de toxicité observés varient significativement selon la composition physico-chimique des sols. Accumulation et toxicité ne sont par ailleurs pas gouvernées par la concentration totale de l'élément dans le sol et il est donc difficile de généraliser son comportement. Toutefois, il est clairement établi que la mobilité de l'uranium dans un sol est fortement liée à la présence de phosphore, un élément avec lequel il présente une forte affinité et avec lequel il forme des complexes stables peu solubles. Les études de toxicité menées jusqu'à présent donnent en effet des résultats très différents lorsque des plantes sont cultivées en absence de phosphore. Dans ces conditions l'uranium est beaucoup plus toxique et sa présence affecte tous les niveaux observés, qu'ils soient macroscopiques (élongation racinaire, germination, production de biomasse, etc.) ou microscopiques (production de chlorophylles, activité synthétique, etc.). En outre, il semblerait que les mécanismes d'absorption de l'uranium soient reliés aux mécanismes de transport du fer avec lequel il présente une analogie atomique.

Depuis plusieurs années, l'étude des transferts sol/plante s'oriente vers des modèles intégrant la notion de dynamique. Comme le montre la figure 3.1 à la page 35, l'étude de l'absorption et de la toxicité est vue sous forme de compartiments qui échangent les uns avec les autres. Puisqu'il est extrêmement difficile de prédire les transferts en se fondant uniquement sur les quantités totales présentes dans un sol, il s'avère nécessaire de mieux appréhender les relations existant entre fraction solide du sol, solution du sol et système racinaire. En ce sens, le concept de la biodisponibilité décrit trois fractions de l'élément d'intérêt :

- la quantité totale fixée sur la fraction solide du sol et solubilisable dans la solution du sol : disponibilité environnementale ;
- la quantité absorbée par la plante : biodisponibilité environnementale ;
- la quantité absorbée provoquant une toxicité : biodisponibilité toxicologique.

Dans un système comme celui-ci, l'élément étudié peut être échangé de la fraction solide du sol à la solution par des phénomènes de solubilisation, de sorption et de précipitation, et de la solution du sol au système racinaire par des phénomènes d'ab- et/ou d'adsorption. En se fondant sur ce postulat, il devient primordial de comprendre de quelle manière se comporte l'élément d'intérêt dans le sol et dans la solution du sol, et de déterminer comment se déroule le transfert vers le végétal.

Différents outils analytiques permettent d'étudier ce système sol/plante et d'estimer la phytodisponibilité. Certains permettent des descriptions très statiques et décrivent le système à un instant t , c'est notamment le cas des extractions simples et séquentielles – telles qu'elles sont utilisées classiquement – et des prévisions à l'aide de modèles mécanistes. À l'inverse, il existe des méthodes plus dynamiques qui prennent en compte la notion de temps de contact et de flux. Nous pensons par exemple à l'utilisation des préleveurs passifs, aux méthodes isotopiques et aux différentes méthodes biologiques. Ces deux dernières intègrent la présence de l'organisme étudié ce qui permet, selon les cas, de tenir compte de l'effet actif que peuvent par exemple avoir les végétaux au travers de leur exsudation racinaire. Fondamentalement, il n'existe pas de méthode plus ou moins pertinente, le choix de l'une ou l'autre ne doit être dicté que par la question qui est posée et donc par le type de réponses souhaité.

Pour finir, nous avons vu que l'absorption des polluants par les racines n'est pas uniquement le résultat d'un échange passif entre solution du sol et plante. L'entrée de l'uranium dans les plantes peut mettre en jeu des transporteurs actifs – transporteurs de fer par exemple – par lesquels l'uranium transite en « déjouant » les processus classiques de la nutrition. En parallèle à cela, les différents éléments synthétisés par les racines et exsudés dans le milieu extérieur pour supporter des périodes de carence sont susceptibles de provoquer la remobilisation d'éléments non-essentiels et ainsi augmenter les pools biodisponibles. Ces phénomènes ne sont toutefois pas clairement établis et il est nécessaire d'approfondir les connaissances à ce sujet afin de compléter les modèles de transfert sol/plante actuels.

En guise de bilan, nous avons donc vu que de nombreux facteurs contrôlent le comportement de l'uranium et donc certainement sa biodisponibilité dans les sols et plus particulièrement à l'interface sol/racine. Tous ces facteurs sont déterminants, leur action est probablement simultanée et certains doivent être en interaction ce qui rend le fonctionnement du système sol/plante complexe et son appréhension parfois difficile. De fait, nous avons fait le choix de proposer une étude découplée de certains mécanismes que

nous supposons être majoritaires afin de tenter de mieux comprendre comment évolue la phytodisponibilité de l'uranium dans un sol.

Le réapprovisionnement de la solution du sol à partir des phases porteuses solides apparaît comme un processus clé dans la mise à disposition de l'uranium pour les plantes. En ce sens, l'activité exsudatrice des racines est une piste de recherche qui peut nous aider à mieux comprendre le transfert du radionucléide aux plantes. Parmi les différents exsudats racinaires, le citrate est particulièrement efficace lorsqu'il s'agit de solubiliser des éléments essentiels peu concentrés dans la solution du sol comme le fer ou le phosphore. Il est donc concevable que les quantités de citrate exsudées par les racines – très largement inférieures à celles utilisées dans des essais probants de phytoremédiation – favorisent le passage de l'uranium en solution et par là-même sa phytodisponibilité.

Le projet de recherche présenté dans ce manuscrit se focalise donc sur les pools d'uranium de la phase solide du sol et sur les cinétiques de désorption de l'élément. L'hypothèse de travail est qu'un ajout de citrate à des concentrations pertinentes d'un point de vue physiologique a un effet sur la solubilisation de l'uranium et sur son transfert vers les végétaux. Pour déterminer la pertinence de cette hypothèse, nous avons cherché à répondre à trois questions :

1. Quelle est la capacité d'exsudation de citrate de l'espèce modèle *Lupinus albus* lorsqu'elle est mise en contact avec de l'uranium ?
2. Est-ce que les quantités de citrate produites sont suffisantes pour favoriser la remobilisation d'une partie de l'uranium des fractions solides du sol vers la solution ?
3. Existe-t-il une corrélation entre les résultats obtenus à partir du système découplé (questions n° 1 et 2) et ce qui peut être observé sur le système sol/plante ?

Pour répondre à ces différentes questions, nous avons tout d'abord décidé de travailler avec un sol naturellement riche en uranium, un choix soutenu par l'hypothèse que les processus physico-chimiques qui y occurent sont stabilisés ce qui n'aurait pas été le cas dans un sol contaminé artificiellement – même vieilli – ou sur des phases porteuses simples. Par ailleurs, choisir le lupin blanc nous a semblé évident dans la mesure où cette espèce est le modèle végétal majoritairement utilisé dans les études ayant trait à l'exsudation de citrate. Cette espèce est en effet caractérisée par une physiologie et une activité racinaire bien particulière en situation de carence en phosphore. Ainsi, nous avons également pu jouer sur la nutrition en phosphore qui, comme cela a déjà été évoqué, représente un point critique quant à la toxicité de l'uranium.

Trois dispositifs expérimentaux ont été adaptés aux besoins spécifiques de l'étude pour répondre à chacune des trois questions posées ci-dessus :

1. la culture en hydroponie pour caractériser le comportement du lupin blanc vis-à-vis de l'uranium en jouant sur des apports adéquats ou limités en phosphore ;
2. les réacteurs fermés (ou batchs) pour déterminer le rôle du citrate en travaillant avec différentes concentrations correspondantes à des exsudations nulle, faible ou importante ;
3. la culture en rhizotest, un dispositif permettant d'étudier la phytodisponibilité d'un élément dans le sol en limitant les problèmes de contamination des différents compartiments du système à l'aide d'une séparation physique du sol, du système racinaire et des parties aériennes.

PARTIE III

Matériel & méthodes

Cette partie est consacrée à la description de l'ensemble des techniques et protocoles qui ont permis d'obtenir les résultats décrits et discutés dans les parties IV, V et VI du manuscrit.

Elle se compose de cinq chapitres :

- le chapitre 7 est un listing exhaustif des informations génériques (protocoles de préparation des solutions nutritives, de stérilisation des graines et de conservation des échantillons de sol) et détaille les conditions de culture utilisées en hydroponie et avec les rhizotests ;
- le chapitre 8 décrit le plan expérimental permettant l'étude de l'effet du phosphore et de l'uranium sur le comportement du lupin blanc en hydroponie ;
- le chapitre 9 décrit le plan expérimental ayant permis d'appréhender l'effet du phosphore et du citrate sur la remobilisation de l'uranium en réacteur fermé ;
- le chapitre 10 décrit le plan expérimental mis en œuvre pour déterminer la phyto-disponibilité de l'uranium chez le lupin blanc sur rhizotests ;
- le chapitre 11 apporte les informations relatives aux techniques analytiques déployées pour collecter et interpréter les données (appareillage utilisé, tests statistiques, etc.).

Le choix de regrouper le « matériel & méthodes » de toutes les expériences réalisées au cours de la thèse permet d'avoir une vision d'ensemble de la démarche scientifique mise en œuvre afin de pouvoir se concentrer sur les résultats obtenus par la suite.

7 Informations génériques

7.1 Composition de la solution nutritive utilisée

La solution nutritive dont la composition en macroéléments et en microéléments est détaillée dans les tableaux 7.1 et 7.2 ci-dessous a été utilisée sur l'ensemble des dispositifs expérimentaux (hydroponie, réacteurs fermés et rhizotests) et pour l'intégralité des protocoles décrits dans les chapitres suivants. Celle-ci était préparée la veille ou le jour même de son utilisation à partir de solutions mères conservées au maximum 1 mois à 4 °C et dans l'obscurité. Le détail de préparation de ces solutions est disponible en annexe à la page 178. L'apport de phosphore était assuré par l'ajout de 100 μM (13.6 mg l^{-1}) ou 1 μM (0.136 mg l^{-1}) de KH_2PO_4 dans les conditions adéquates à la culture du lupin blanc (noté +P ou P100) ou limitantes (noté -P ou P1) respectivement. La composition de la solution ainsi que les niveaux d'apport en phosphore choisis sont classiques et généralement utilisés dans les études sur le lupin blanc (communication personnelle, G Neumann, 2011).

TABLE 7.1: Composition en macroéléments (mM) de la solution nutritive utilisée en hydroponie, en réacteur fermé et avec les rhizotests.

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	K_2SO_4	MgSO_4	KCl
2	0.7	0.5	0.1

TABLE 7.2: Composition en microéléments (μM) de la solution nutritive utilisée en hydroponie, en réacteur fermé et avec les rhizotests.

Fe(III)-EDTA	H_3BO_3	MnSO_4	ZnSO_4	CuSO_4	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$
20	10	0.5	0.5	0.2	0.01

7.2 Prélèvement et conservation des sols utilisés

Le sol étudié dans les expériences en réacteurs fermés et sur rhizotests a été prélevé sur le site de La Creusaz/Les Marécottes, 7 km à l'Ouest de Martigny (Suisse). Ce site décrit par Pfeifer et collab. (1994) est caractérisé par l'affleurement en amont d'une veine de pechblende (UO_2) à l'origine d'un enrichissement des sols avoisinants en uranium. Ce type d'affleurements est retrouvé sur la partie Nord-Est du massif des Aiguilles Rouges et, plus particulièrement, sur la bordure Est du granite Varisque de Vallorcine. Le site est caractérisé par une anomalie de rayonnement sur une surface d'environ 50 x 100 m pour des altitudes allant de 1620 à 1560 m située en pente raide (30 %) et présentant de ce fait

un gradient de radioactivité décroissant du haut – à proximité de la veine de pechblende) vers le bas de la zone.

Le sol a été défini comme de type sol brun colluvial discontinu (colluviosol) recouvrant partiellement la roche mère granitique avec une épaisseur maximale de 60 cm. Son pH est situé entre 4 et 5. Les teneurs d'uranium dans les 20 premiers cm des profils de sol varient entre 2500 ppm – à proximité de la veine de pechblende – et 15 ppm en bas de pente de la zone étudiée. À titre de comparaison, un sol de référence prélevé hors de la zone d'anomalie de rayonnement gamma et non enrichi présente des teneurs en uranium d'environ 3 ppm. À des profondeurs plus grandes (20 à 40 cm), les teneurs en uranium diminuent de moitié par rapport à la surface ce qui indique un phénomène de transport dans les profils de sol. Les teneurs en uranium ne dépendent ni de la granulométrie (teneurs en argile), ni des teneurs en matière organique, mais une forte corrélation existe entre les teneurs en uranium et en oxyde de fer libre. Cela suggère l'existence d'un mécanisme d'adsorption sur les (hydr)oxydes de fer. Pfeifer et collab. (1994) suggèrent que, dans la pente, l'uranium est transporté par solifluxion de fragments de roches riches en uranium et que, libéré par l'oxydation des fragments de roche proches de la surface, l'uranium descend dans la colonne de sol jusqu'à ce que les conditions soient favorables à une adsorption sur des (hydr)oxydes de fer. Les teneurs élevées en uranium des eaux de surface locales qui peuvent dépasser 10 ppb au printemps (Dubois, 1991; Dominik et collab., 1992) montrent cependant que la sorption est réversible et/ou que la capacité de sorption de ce sol est limitée.

La végétation environnante dominante est composée de cytises (*Laburnum*), mélèzes, épicéas (*Picea*), hêtres (*Fagus*), ormes (*Ulmus*), fraisiers des bois (*Fragaria vesca*), herbes (*Agrostis*) et myrtilles (*Vaccinium myrtillus*). Des analyses de végétaux prélevés sur le terrain montrent que ceux-ci absorbent l'uranium : jusqu'à 90 ppm dans les graminées et mousses, et environ 3 ppm dans les myrtilles et sapins.

Pfeifer et collab. (1994) ayant effectué une cartographie de la radioactivité du site, nous avons utilisé cette approche pour choisir le sol utilisé dans les expériences en réacteurs fermés et sur rhizotests. À l'aide de mesures de radioactivité réalisées *in situ* avec un contaminamètre portable CoMo 170 (Saphymo, France) placé à 15 cm du sol, nous avons choisi un sol qui présentait une radioactivité de surface de 2000 c s^{-1} . Ce dernier était localisé en contrebas d'un rocher affleurant et présentait un horizon A passant très progressivement à un horizon S. Un échantillon de 5 à 6 kg de terre a été prélevé en juillet 2011 après que la litière eut été éliminée. L'échantillon correspond ainsi à un mélange de terre de l'horizon A et de l'horizon S sous-jacent c.-à-d les 15 premiers cm de sol. Après prélèvement, la terre a été séchée à l'air libre, tamisée à 2 mm sur tamis en métal puis stockés à 4 °C à l'obscurité.

L'analyse de la terre a été réalisée par le Laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras. Les données sont regroupées dans le tableau 7.3 ci-contre.

7.3 Préparation des graines de lupin blanc avant manipulation

Les graines de lupin blanc (*Lupinus albus* cv. amiga) utilisées pour les expériences en hydroponie et sur rhizotest nous ont été fournies gracieusement par M. Pierre Devaux (Florimond-Desprez, Cappelle en Pévèle, France). Afin de prévenir le développement de maladies telles que l'antracnose – une maladie qui touche régulièrement le lupin surtout lorsqu'il pousse dans un milieu humide et chaud comme cela est le cas en hydroponie –

TABLE 7.3: Caractéristiques du sol utilisé pour les expériences en réacteurs fermés et sur rhizotest (analyse réalisée par le Laboratoire d'Analyses des Sols d'Arras (INRA)).

Méthode de mesure	Composante mesurée	Valeurs	Unités
pH _{eau} sol *	pH _{eau}	4.97	–
Méthode Metson *	CEC Metson	15.5	cmol + kg ⁻¹
Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation *	Argile (< 2 µm)	183	g kg ⁻¹
Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation *	Limons fins (2–20 µm)	234	g kg ⁻¹
Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation *	Limons grossiers (20–50 µm)	124	g kg ⁻¹
Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation *	Sables fins (50–200 µm)	135	g kg ⁻¹
Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation *	Sables grossiers (200–2000µm)	324	g kg ⁻¹
U total HF **	Uranium (U)	400.5	mg kg ⁻¹
Éléments totaux HF (ICP-AES) *	Fer (Fe)	4.34	g 100 g ⁻¹
Éléments totaux HF (ICP-AES) *	Phosphore (P ₂ O ₅)	0.218	g 100 g ⁻¹
C organique et N total sans décarbonatation *	Azote (N) total	4.23	g kg ⁻¹
C organique et N total sans décarbonatation *	C/N	15.8	–
C organique et N total sans décarbonatation *	Carbone (C) organique	66.9	g kg ⁻¹
Calcaire total *	Calcaire (CaCO ₃) total	1.1	g kg ⁻¹
Échangeable à l'acétate d'ammonium *	Calcium (Ca)	3.15	cmol + kg ⁻¹
Échangeable à l'acétate d'ammonium *	Magnésium (Mg)	0.0801	g kg ⁻¹
Échangeable à l'acétate d'ammonium *	Manganèse (Mn)	28.4	mg kg ⁻¹
Échangeable à l'acétate d'ammonium *	Potassium (K)	0.211	g kg ⁻¹
Soluble dans l'eau ***	Calcium (Ca)	0.018	g kg ⁻¹
Soluble dans l'eau ***	Magnésium (Mg)	0.006 06	g kg ⁻¹
Soluble dans l'eau ***	Potassium (K)	0.03	g kg ⁻¹
Soluble dans l'eau ***	Sodium (Na)	0.0038	g kg ⁻¹
Soluble dans l'eau ***	Phosphore (P ₂ O ₅)	<0.002	g kg ⁻¹
Soluble dans l'eau ***	Carbone (C) organique	650	mg kg ⁻¹
Extraction à l'oxalate	Fer (Fe) (poids sec)	10 531	mg kg ⁻¹

* : méthode sous accréditation COFRAC n° 1-1380

** : méthode NF X 31-147 / selon NF EN ISO 17294-21

*** : méthode INRA

nous avons choisi de travailler avec un lot de graines pré-traitées au WAKIL XL (Syngenta Agro S.A.S., Guyancourt, France). Toutes les expériences ont été réalisées avec des graines sélectionnées selon leur masse, de l'ordre de 300 mg ± 7% afin de garantir une certaine homogénéité en termes de réserves nutritives (masse déterminée sur la base de la pesée de 689 graines choisies aléatoirement : 200 mg < 95 % < 400 mg).

Avant d'initier la germination, les graines ont systématiquement été stérilisées en surface en suivant un protocole en 5 étapes :

- sonication 15 min dans de l'eau déionisée ;
- trempage 4 min dans de l'éthanol à 70 % ;
- trempage 8 min dans de l'eau oxygénée (H₂O₂) à 30 % ;
- trempage 30 min dans de l'hypochlorite de calcium à 3 % ;
- 3 rinçages 15 min dans de l'eau déionisée.

Entre chaque étape, les graines étaient séchées pendant 1 min dans du papier absorbant. Hormis l'étape de sonication, tout le processus se déroulait en conditions stériles. Les graines étaient toujours stérilisées en surface la veille de la date prévue pour l'initiation de la germination. Ceci afin de garder un créneau de 24 h pour réaliser une phase d'imbibition – indispensable pour obtenir un taux de 90 % de germination le même jour – dans de l'eau stérile, à 20 °C et dans l'obscurité.

Comme le montrent les photographies de la figure 7.1 page 64, nous avons utilisé un petit dispositif simple pour faire germer convenablement les graines destinées à l'hydroponie – le « Germinem' » – lors des 4 à 5 jours suivant l'imbibition. Grâce à ce dispositif



FIGURE 7.1: Photographies représentant le dispositif utilisé pour obtenir des pousses de lupin blanc avec des racines rectilignes, le « Germinem' ». À gauche, des graines de lupin blanc après stérilisation et imbibition sont placées dans du papier absorbant autoclavé. Au centre, des rouleaux de papier absorbant contenant les graines sont placés dans une poche en plastique, un fond d'eau UHQ permet d'humidifier le papier par capillarité. À droite, des pousses de lupin blanc après avoir passé 4 à 5 jours à l'obscurité et à 20 °C.

humecté par de l'eau déionisée et placé à l'obscurité à 20 °C, les graines étaient maintenues en conditions optimales pour la germination et le début de la croissance. En outre, ce dispositif permet d'obtenir des plantules dont les racines se développent verticalement ce qui facilite leur transfert sur les pots utilisés en hydroponie.

7.4 Conditions de culture

Au cours des différentes expériences, nous avons travaillé avec les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, les plantes ont été cultivées dans une chambre de culture en condition contrôlées :

- 16 h de photopériode ;
- 26/20 °C jour/nuit ;
- 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en intensité lumineuse ;
- 60 % d'humidité relative dans l'air.

La stabilité des conditions de culture a été vérifiée quotidiennement à l'aide d'un HOBO Onset Data Logger[®] (photopériode, température et humidité relative) et d'une sonde de mesure d'intensité lumineuse.

8 Protocole expérimental n° 1 : effets du phosphore et de l'uranium sur le comportement du lupin blanc en hydroponie

8.1 Concept et intérêt de la méthode

Ce dispositif hydroponique a été utilisé pour obtenir les données concernant les effets du phosphore et de l'uranium sur le comportement du lupin blanc qui font l'objet de la partie IV.

L'hydroponie est une technique de culture hors-sol qui nécessite l'utilisation de solutions nutritives et d'un substrat inerte pour se passer du support et des apports d'un sol. Le contrôle exercé sur la solution qui irrigue les cultures hydroponiques permet d'assurer des apports optimaux d'eau et de substances nutritives dans des conditions idéales (oxygène, pH, etc.). L'intérêt de la culture hydroponique réside principalement dans le contrôle total des conditions de développement des plantes ce qui s'avère très utile pour la recherche en biologie végétale ainsi que pour la production puisque elle permet de s'affranchir des aléas météorologiques et de la variable pédologique. À noter tout de même que cette technique ne permet pas toujours de placer la plante dans des conditions normales de développement (floraison, fructification).

8.2 Plan expérimental

Après l'initiation de la germination (section 7.3 page 62), les plantes ont été placées dans des pots en polypropylène – 5 plantes par pot – remplis avec 1.5 l de solution nutritive (section 7.1 page 61). La solution nutritive était renouvelée tous les 3 jours afin de maintenir un apport nutritif régulier et aérée en permanence par bullage d'air filtré à 0.2 μm . Cette aération a été nécessaire car en son absence les racines ont tendance à se désagréger (résultat d'une expérience préliminaire). L'activité rhizosphérique du lupin blanc, en particulier en lien avec la nutrition phosphatée, s'accompagne naturellement de variations du pH rhizosphérique qui participent au mécanisme d'acquisition des nutriments (Guinel et McCully, 1986; Römheld et Marschner, 1990; Vance et collab., 2003; Duffner et collab., 2012). Ainsi, le pH des solutions n'a pas été tamponné afin de ne pas perturber les équilibres normaux à l'interface solution/racine. Ce dernier a été enregistré à chaque renouvellement de solution.

Comme cela a déjà été souligné, nous avons travaillé avec deux niveaux de phosphore (-P 1 μM et +P 100 μM) et une partie des plantes a été exposée à 20 μM d'uranium (+U) *via* la solution nutritive et donc par exposition directe des racines. Les plantes qui n'ont pas été exposées à l'uranium seront notées -U (0 μM) dans la suite du propos. La concentration d'exposition à l'uranium a été choisie en se fondant sur les résultats d'une expérience préliminaire – une exposition séquentielle – qui a montré que la croissance des racines

du lupin blanc est totalement inhibée par la présence de $40 \mu\text{M}$ d'uranium en condition -P en moins de 2 jours. À titre d'information, la technique de l'exposition séquentielle développée par Schat et Ten Bookum (1992) permet de déterminer en hydroponie la concentration minimale d'un contaminant nécessaire pour stopper la croissance racinaire. Elle repose notamment sur le principe qu'il n'existe pas d'interaction entre le charbon (plutôt hydrophobe) et l'élément. Les racines préalablement teintes avec de la poudre de carbone sont exposées pendant 2 jours à une faible concentration du contaminant, on observe ou non l'apparition de nouvelles cellules au niveau des apex – les cellules produites pendant les 2 jours ne sont pas teintes – et on double la concentration d'exposition si une croissance est observée. Avec cette technique, $40 \mu\text{M}$ d'uranium sont nécessaires pour stopper complètement la croissance donc nous avons choisi de diviser cette dose par 2 afin de placer les plantes dans un environnement qui soit toxique mais non létal trop rapidement.

Quatre conditions expérimentales ont été testées au cours de la manipulation : +P-U (contrôles), +P+U, -P-U et -P+U. Le déroulement de la manipulation est schématisé à la figure 8.1 ci-dessous. Chaque condition a été suivie dans un pot de 1.5 l contenant 5 plantes. L'exposition à l'uranium a été réalisée en ajoutant $750 \mu\text{l}$ d'une solution mère de nitrate d'uranyle (40 mM) afin d'atteindre les $20 \mu\text{M}$ souhaités dans la solution nutritive (4.76 mg U l^{-1}).

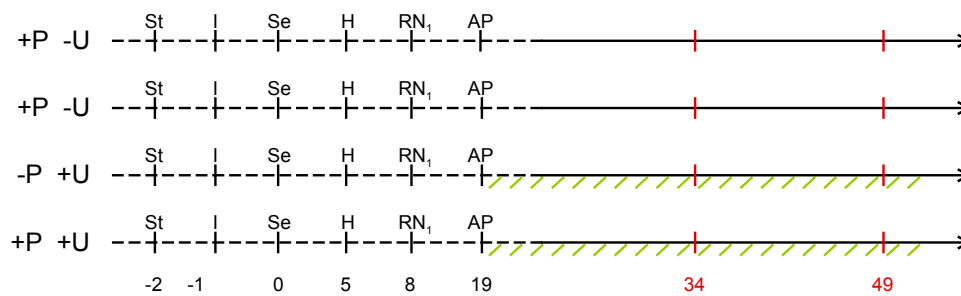


FIGURE 8.1: Schéma du déroulement de la manipulation en hydroponie. St = stérilisation ; I = imbibition ; Se = semis ; H = passage en hydroponie ; RN1 = 1^{er} renouvellement solution nutritive ; AP = apparition protéoïdes. Les hachures vertes indiquent l'exposition à l'uranium. Les nombres 34 et 49 indiquent les deux temps d'observation.

La spéciation de l'uranium et du phosphore dans la solution nutritive a été simulée en utilisant le code de spéciation géochimique J-CHESS (Java Chemical Equilibrium with Species and Surfaces (Van der Lee, 1998)) et les concentrations nominales. La base de données thermodynamique utilisée pour les simulations est fondée sur les travaux de Van der Lee et Lomench (2003) et complétée avec la dernière compilation de données thermodynamiques concernant l'uranium (Denison et Garnier-Laplace, 2003). Les solubilités prédites pour l'uranium et le phosphore dans les différents milieux de culture (+P et -P) sont reportées dans le tableau 8.1 ci-contre.

Au cours de cette expérience, le développement du lupin blanc a été suivi en observant différents traits phénotypiques tels que la production de feuilles et de clusters à intervalles réguliers (3 jours). En fin d'expérience, 34 et 49 jours après initiation de la germination, la production de biomasse a été déterminée par pesée, l'exsudation de citrate et l'accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes ont été mesurées, et des observations en microscopie ont été réalisées afin de visualiser l'effet de la présence d'uranium sur le développement des cellules des racines et déterminer de quelle manière le contaminant est accumulé.

TABLE 8.1: Simulation de la distribution de l'uranium (U) et du phosphore inorganique (Pi) du milieu de culture calculée à l'aide du logiciel CHESS en tenant compte de la composition initiale de la solution nutritive. L'uranium présent sous forme soluble est montré en tant que ion libre et formes complexées (avec -OH, -CO₃, -PO₄, -SO₄). Pi correspond aux formes de phosphore assimilables par les plantes (HPO₄⁻ and H₂PO₄²⁻). Toutes les valeurs sont indiquées en μM.

P dans le milieu de culture	Pi dans le milieu de culture	U dans le milieu de culture	U en solution (simulé)	U sous forme d'ion libre (simulé)	U sous forme de complexes (simulé)	U sous forme précipitée (simulé)
1	0.98	0	-	-	-	-
1	0.05	20	10.62	4.32	6.30	9.38
100	43.00	0	-	-	-	-
100	39.20	20	0.59	$\leq 10^{-3}$	0.59	19.41

9 Protocole expérimental n° 2 : effets du phosphore et du citrate sur la remobilisation de l'uranium en réacteur fermé

9.1 Concept et intérêt de la méthode

Les expériences en réacteurs fermés sont parmi les plus utilisées pour étudier les processus d'adsorption et de désorption des éléments chimiques dans les sols. Elles permettent d'évaluer la mobilité d'un élément *via* la détermination du coefficient de partage K_d qui a été défini au paragraphe 4.1.1.2 page 38. La méthode consiste à mélanger une masse de terre avec un volume de solution connu pendant un temps donné (figure 9.1 ci-dessous). Pour une étude de la sorption, l'élément étudié est apporté en quantité connue par la solution. Pour une étude de la désorption comme dans notre cas, l'élément est fixé sur la phase solide en proportions connues et passe dans la solution au cours de l'expérience. À la fin du contact, les particules de sol et la solution sont séparées par centrifugation, décantation et/ou filtration. La concentration résiduelle de l'élément d'intérêt dans la phase liquide est mesurée et la fraction fixée est déduite par différence (Perrier, 2004).

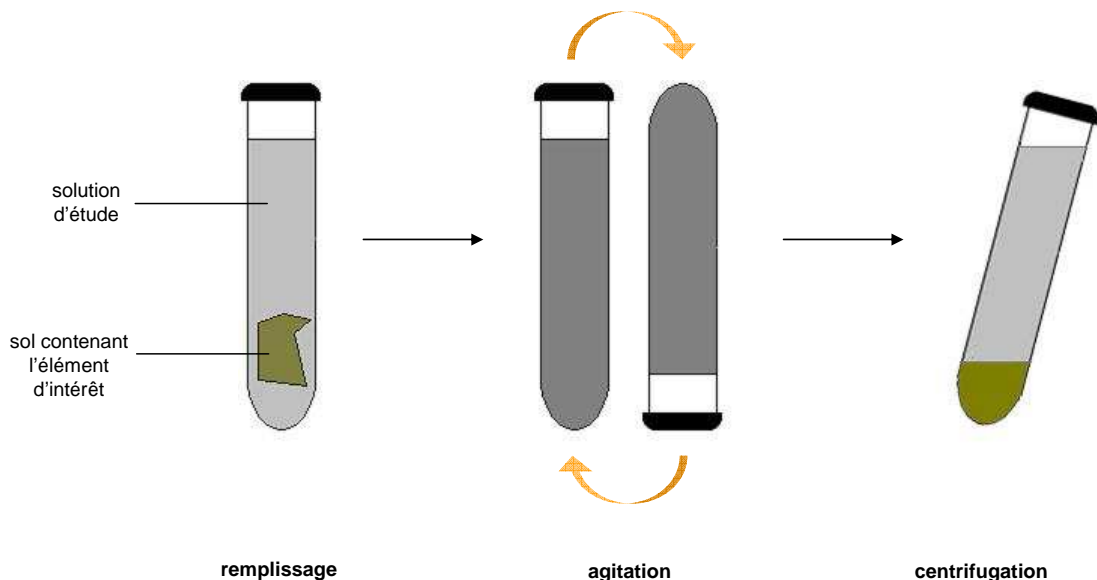


FIGURE 9.1: Schéma d'un réacteur fermé. Le mélange est réalisé en suivant un rapport entre volume de solution et masse de sol préci (rapport V/m), l'agitation à température constante pendant une durée donnée, et la centrifugation pendant un temps donné avec une accélération choisie et à température constante.

9.2 Plan expérimental

Afin d'évaluer les effets respectifs du phosphore et du citrate sur la solubilisation de l'uranium dans le sol étudié, ces derniers ont été incubés en présence de solutions nutritives (+P et -P) dopées avec différentes concentrations en citrate. Ces concentrations ont été déterminées sur la base des résultats de l'expérience en hydroponie décrite au chapitre précédent et d'expériences préliminaires sur rhizotests.

Les incubations se sont déroulées en réacteurs fermés utilisés en désorption continue sur une durée de 120 h (réacteurs fermés « continus ») ou en désorptions successives sur une durée de 24 h, pendant 5 j consécutifs et en renouvelant la solution à chaque pas de temps (réacteurs fermés « en série »). Le contact entre sol et solution a été réalisé dans des tubes à centrifugation de 50 ml contenant 4 g de sol sec et 20 ml de solution afin d'obtenir un rapport liquide/solide V/m de 5 (OECD, 2000). Les tubes étaient disposés sur une table agitatrice stabilisée à 400 rpm et placés dans une enceinte thermostatée (obscurité, 25 °C). Le citrate était ajouté aux solutions -P et +P à partir d'une solution stock préparée avec de l'acide citrique ($C_6H_8O_7$) pour atteindre des concentrations finales de :

- 0 mg l⁻¹ nommée C₀ ;
- 10.15 mg l⁻¹ nommée C₁₀ ;
- 40.60 mg l⁻¹ nommée C₄₀.

Ces concentrations ont été calculées à partir des valeurs de 100 et 400 nmol Cit g⁻¹ MS h⁻¹ (MS pour matière sèche) correspondant respectivement au flux d'exsudation moyen observé sur rhizotests lors d'expériences préliminaires visant à calibrer le dispositif et au flux d'exsudation moyen observé sur les individus cultivés en hydroponie en milieu carencé en phosphore et dépourvu en uranium. En supposant ces flux constants, la quantité exsudée pendant 24 h par 6 individus — un nombre d'individus qui correspond à l'effectif d'un rhizotest — a été calculée au stade physiologique correspondant à 38 jours après initiation de la germination. Connaissant le niveau de saturation en eau des sols ($\pm 53.2\%$), la quantité de sol dans un rhizotest et en considérant que le sol d'un rhizotest est saturé en eau, une estimation de la concentration en citrate de la solution du sol a pu être obtenue.

Au terme de chaque phase d'incubation (24 ou 120 h), les tubes sont centrifugés pendant 1 h à 6500 g (Centrifuge 5430 R, Eppendorf et Biofuge Stratos, Heraeus Instruments). Le surnageant est alors récupéré à l'aide d'une seringue stérile munie d'une canule, filtré à 0.45 μ m (filtre en polyéther sulfone) et enfin stocké à 4 °C en attendant d'être dosé en ILC et ICP.

10 Protocole expérimental n° 3 : phytodisponibilité de l'uranium chez le lupin blanc mesurée sur rhizotests

10.1 Concept et intérêt de la méthode

Le lupin blanc a été cultivé sur rhizotest, un dispositif développé par Chaignon et Hinsinger (2003) permettant de mettre en contact un tapis racinaire avec une fine couche de terre (2 mm) sans que les racines n'y pénètrent et tout en permettant les échanges entre les deux compartiments (exsudation, adsorption, etc.) (figure 10.1 ci-dessous). Ce dispositif permet de récupérer les différentes composantes du système indépendamment (sol, tapis racinaire et parties aériennes) et présente le gros avantage de laisser les racines propres, sans trace de pollution par des particules de sol. Ceci est indispensable pour obtenir des dosages précis, surtout lorsque les quantités accumulées dans les racines sont dérisoires au regard de la contamination retrouvée dans le sol.

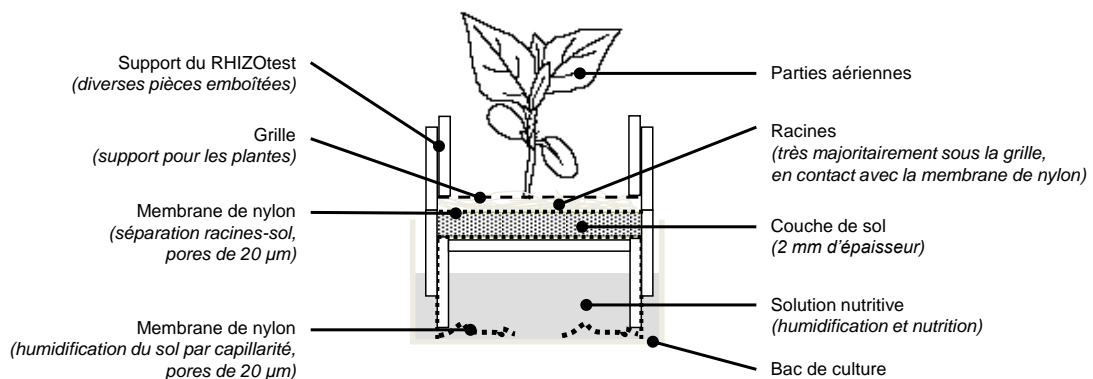


FIGURE 10.1: Schéma d'un rhizotest.

10.2 Plan expérimental

10.2.1 Pré-culture en hydroponie

Avant d'exposer les plantes au sol, celles-ci sont pré-cultivées en hydroponie. Six graines sont disposées dans la partie supérieure d'un rhizotest, lui-même installé dans un bac rempli de solution nutritive. Les bacs sont installés dans une armoire de culture en conditions contrôlées :

- photopériode de 16 h ;
- intensité lumineuse de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$;

- température jour/nuit de 26/20 °C ;
- humidité relative de 60 %.

La solution nutritive est aérée en permanence (dispositif de bullage avec filtration de l'air à 0.2 µm nécessaire pour maintenir les racines en vie) et mise à niveau autant que nécessaire afin de conserver une quantité de liquide suffisante pour que les tapis racinaires soient intégralement immergés. Cette solution nutritive est totalement renouvelée une fois par semaine, et les bacs et dispositifs de bullage sont rincés avec de l'eau déionisée.

10.2.2 Mise en contact du tapis racinaire avec la couche de sol

Après que le tapis racinaire a recouvert l'intégralité de la surface des rhizotests (35 à 40 jours après initiation de la germination), la partie supérieure du dispositif contenant les plantes est montée sur la partie inférieure contenant 20 g de sol (tableau 7.3 page 63) sur une épaisseur de 2 mm. Avant le contact, les sols ont été préalablement réincubés dans une enceinte thermostatée pendant une semaine à 20 % d'humidité, 20 °C et à l'obscurité afin d'équilibrer leur fonctionnement. Chaque rhizotest est alors installé dans un pot contenant la solution nutritive (-P ou +P) qui est renouvelée chaque jour mais non aérée. Le temps de contact entre tapis racinaire et couche de terre est de 5 jours comme dans les travaux de Bravin (2008).

10.2.3 Suivi de l'expérimentation

Des rhizotests témoins sans plante ainsi que des plantes témoins sans terre ont été suivis en même temps que les individus testés. Nous avons évalué les flux de solution (évapo)transpirée à l'aide de bilan massique, nous avons suivi la croissance du lupin blanc tout au long de l'expérience (production de biomasse, de feuilles) et nous avons quantifié l'exsudation racinaire et l'accumulation d'uranium avant et après le temps de contact.

11 Techniques analytiques

11.1 Pesée et séchage

Toutes les pesées (produits chimiques, matériel végétal, etc.) ont été réalisées sur balances de précision étalonnées PRECISA 100A-300M (min = 0.1 mg, max = 300 mg) et SARTORIUS SE2 (min = 0.1 µg, max = 2.1 g). Le matériel végétal – dont la biomasse a été mesurée – a été séché en étuve à 60 °C jusqu'à obtention d'une masse régulière (minimum 96 h). Toutes les masses évoquées dans la suite du manuscrit correspondront donc à des masses sèches. Dans le cas contraire, l'indication sera donnée dans le texte. Préalablement au séchage, les racines ont toujours été rincées environ 15 min dans de l'eau déionisée puis séparées des parties aériennes.

11.2 Suivi des solutions et dosages

En plus des dosages inhérents à l'acquisition des données (dosage de l'uranium et du citrate), les différentes solutions utilisées ont fait l'objet d'un suivi régulier. Les concentrations en anions majeurs (chlorures, fluorures, nitrates, nitrites et phosphates) et en acides organiques (acétate, citrate, formate, lactate et oxalate) ont été mesurées par ILC (Ionic Liquid Chromatography) sur un passeur automatique Dionex ICS 3000 équipé d'une colonne AS 11 HC et d'un suppresseur ASRS 4 mm. L'élution était assurée par un flux continu de KOH de 1 ml min⁻¹ injecté en augmentant progressivement la concentration de 1 à 45 mM. En fin de chaîne, la mesure de conductivité de l'échantillon associée au temps d'élution permettait de déterminer les différentes espèces chimiques et d'évaluer leur concentration en se reposant sur l'étalonnage réalisé en amont (LQ = 10 µg l⁻¹). Les échantillons destinés au dosage en ILC (de 150 µl à 5 ml) ne nécessitent pas de préparation spéciale mais doivent être conservés à 4 °C.

Les concentrations en cations (calcium, fer, sodium, magnesium, potassium et uranium) ont été mesurées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma with Atomic Emission Spectrometry) sur un passeur Perkin-Elmer OPTIMA 4300 DV (LQ = 10 µg l⁻¹) et par ICP-MS (Inductively Coupled Plasma with Mass Spectrometry) sur un passeur ThermoElectron PQ Excell (LD = 0.11 ng l⁻¹). Les échantillons destinés au dosage par ICP (de 3 à 5 ml) doivent être conservés à 4 °C dans HNO₃ à 2 % (v/v).

11.3 Collecte des exsudats racinaires

Le protocole de collecte des exsudats racinaires décrit ci-après a été appliqué de manière indifférenciée à l'ensemble des expérimentations ayant nécessité ce type de mesure. Il est basé sur les travaux de Neumann et collab. (1999) et a été modifié selon nos besoins. Après rinçage des racines, les systèmes racinaires entiers ont été plongés pendant 3 h dans

un volume de 100 ml d'une solution de composition simplifiée afin de faciliter le dosage de faibles concentrations. La composition de cette solution (tableau 11.1 ci-dessous) correspond au milieu minimum assurant le maintien de l'intégrité et du fonctionnement des membranes biologiques. Après 3 h, des sous-échantillons de 10 ml de solution de collecte sont récoltés, filtrés à 0.2 μm avec des filtres stériles (polyethersulfone, VWR) puis stockés à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ après ajout d'un puissant biocide sous forme d'azoture de sodium NaN_3 (concentration finale : 10^{-4} M).

Tous les échantillons ont été évaporés sous vide et à froid pendant environ 24 h avec un Speedvac (Jouan, Paris, France) puis reconcentrés 10 fois. Après analyse, les échantillons présentant une concentration supérieure à la gamme d'étalonnage ont été dosés de nouveau sans reconcentration.

TABLE 11.1: Composition de la solution utilisée pour la collecte des acides organiques (W. Horst, communication personnelle, 2011).

CaSO_4	H_3BO_3	MnSO_4	ZnSO_4	CuSO_4	Mo_7O_{24}
0.25 mM	10 μM	0.5 μM	0.5 μM	0.2 μM	0.01 μM

11.4 Minéralisation du matériel végétal

Toutes les plantes cultivées au cours de cette étude ont été minéralisées sur bain de sable – après séchage – selon une procédure alternant attaque à l'acide nitrique et attaque à l'eau oxygénée comme décrit ci-après :

- Cycle n° 1 :
 - trempage 1 nuit à température ambiante dans 1 volume de HNO_3 à 70% (volume suffisant pour recouvrir l'échantillon) ;
 - chauffage 2 h à $120\text{ }^\circ\text{C}$ avec un verre de montre pour éviter l'évaporation ;
 - ajout de 1/3 de volume de H_2O_2 à 30 % ;
 - chauffage 1 h avec un verre de montre ;
 - évaporation de l'échantillon à sec.
- Cycle n° 2 à n :
 - remise en solution du minéralisat dans un volume minimal de HNO_3 à 70% et évaporation à sec ;
 - reprise du minéralisat dans un volume minimal de H_2O_2 à 30 et évaporation à sec.

Le nombre de répétitions du second cycle dépend de la masse et de la nature de l'échantillon. Il faut généralement plus de cycles pour minéraliser les parties aériennes que les racines. Le résidu blanchâtre final est repris dans 3 ml de HNO_3 à 2 % (v/v) et stocké à $4\text{ }^\circ\text{C}$ en attendant d'être analysé.

11.5 Microscopie électronique

Avant observation au MET-EDX (Microscopie Électronique à Transmission couplée à une sonde EDX), les échantillons végétaux – apex de racines prélevés après récolte – ont subi un protocole de fixation, une déshydratation puis une inclusion dans la résine selon le protocole décrit ci-après (Floriani, 2001). La première étape a été réalisée immédiatement après la récolte.

- fixation 48 h à 4 °C dans du glutaraldehyde à 2.5 % tamponné à pH 7.4 avec du sodium cacodylate à 0.1 M ;
- nettoyage 3 fois avec le tampon sodium cacodylate à 0.1 M ;
- fixation 1 h dans de l'osmium tetroxide à 1 % tamponné à pH 7.4 avec du sodium cacodylate à 0.1 M ;
- déshydratation dans des bains successifs d'éthanol et d'oxyde de propylène ;
- intégration dans une gélule de résine EPON 812.

L'ultrastructure racinaire a été observée avec un Microscope Électronique à Transmission Tecnai G2 Biotwin (tension d'accélération = 100 kV) sur des coupes ultrafines de 140 nm réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Leica UCT et montées sur des grilles de cuivre. La sonde EDX a permis de détecter la présence d'uranium et de différents éléments chimiques. L'analyse a porté sur 3 coupes différentes de 3 individus différents. L'ultrastructure des tissus végétaux et ses anomalies ont été observées au MET. Les structures denses aux électrons (granules, paillettes, etc.) ont été recherchées et leur composition analysée ponctuellement avec la sonde EDX, en procédant à l'acquisition du spectre élémentaire pendant 3 minutes au moins.

11.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 2.15.1) (R Development Core Team, 2011). Les données ont été comparées par des ANOVA à un ou deux facteurs à l'aide de modèles de régression linéaire. Les comparaisons multiples ont été réalisées à l'aide de tests post-hoc de Tukey. Les hypothèses de normalité des distributions ainsi que l'homogénéité des variances ont été vérifiées graphiquement à l'aide d'un graphique des quantiles et du tracé de la racine carrée de la valeur absolue des résidus standardisés en fonction des valeurs ajustées, respectivement. L'hétéroscédasticité a été corrigée si nécessaire par modélisation de la variance.

Pour les expériences en réacteurs fermés, des recherches de corrélations monotones entre les comportements des différents cations et celui de l'uranium ont été conduites avec les tests de Kendall et de Spearman.

PARTIE IV

**Effets du phosphore et de
l'uranium sur le comportement du
lupin blanc en hydroponie**

Cette première partie de résultats est consacrée aux expériences réalisées en hydroponie et dont le protocole est détaillé au chapitre 8 page 65. Cette première partie expérimentale a eu pour objectif de caractériser le comportement de l'espèce modèle dans un milieu contrôlé grâce auquel nous avons pu exercer deux types de stress au niveau racinaire. Un stress nutritif en jouant sur l'apport de phosphore et un stress métallique par le biais de l'ajout d'uranium dans la solution nutritive. Les résultats présentés et discutés s'inscrivent dans la première phase de l'étude du système découplé consacrée au système solution/racine.

La partie est découpée en deux chapitres :

- le chapitre 12 expose les résultats relatifs à l'évolution du pH dans le milieu de culture et au développement du lupin blanc, à l'exsudation de citrate, au transfert d'uranium et à la microlocalisation de ce dernier en fonction de conditions testées ;
- le chapitre 13 discute de l'effet de l'uranium sur le développement des racines protéoïdes et l'exsudation de citrate, de l'effet conjoint de l'uranium et du phosphore sur l'allocation de la biomasse, et de l'influence de l'apport en phosphore et de l'exsudation de citrate sur l'accumulation et la translocation d'uranium dans la plante.

Les résultats originaux obtenus en termes de toxicité, de réponse physiologique ou d'accumulation de l'uranium ont fait l'objet d'une publication scientifique dans le *Journal of Environmental Radioactivity* (2013, 124 : 255-265). Ce dernier est disponible dans la partie « annexes » du manuscrit à la page 191.

12 Résultats : hydroponie

12.1 Évolution du pH dans le milieu de culture

Comme le montre la figure 12.1 ci-dessous, au cours de la première semaine de culture en hydroponie, les valeurs de pH de la solution nutritive restent relativement faibles, aux alentours de 4.5 et 5, avec peu de variations entre les quatre combinaisons P/U. Ensuite, les valeurs de pH entre les conditions +P et -P commencent à évoluer différemment. En conditions +P, le pH augmente jusqu'à atteindre une valeur de 7 entre le jour 13 et le jour 28 puis n'évolue plus jusqu'à la fin de l'expérimentation. En revanche, en conditions -P, l'augmentation du pH est plus faible et atteint une valeur maximale de 5.5 entre le jour 16 et le jour 19. Aucune différence n'a été observée entre les conditions +U et -U, quel que soit l'apport en phosphore.

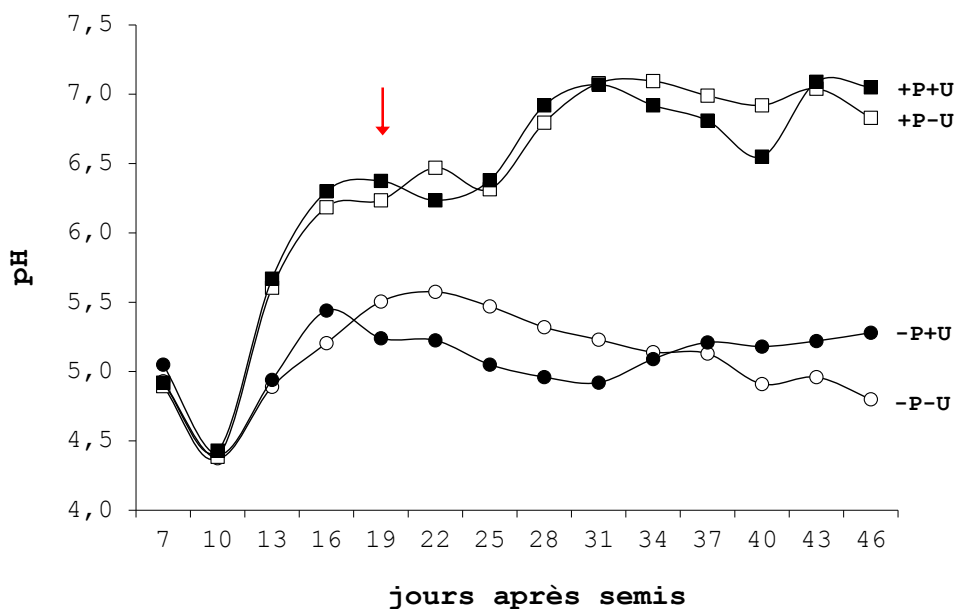


FIGURE 12.1: Évolution du pH du milieu de culture au cours du développement du lupin blanc en hydroponie en conditions -P-U (cercles blancs), -P+U (cercles noirs), +P-U (carrés blancs) et +P+U (carrés noirs). La flèche rouge indique le début de l'exposition des racines à l'uranium.

12.2 Croissance et développement du lupin blanc

12.2.1 Production et allocation de la biomasse

La figure 12.2A ci-contre montre que la production de biomasse racinaire n'est affectée ni par l'absence de phosphore ni par la présence d'uranium au premier temps de mesure. Au second temps de mesure les plantes carencées exposées à l'uranium affichent une production significativement inférieure aux trois autres conditions et les plantes carencées non exposées présentent une légère diminution par rapport aux plantes non carencées. La présence d'uranium dans le milieu riche en phosphore n'affecte pas la production.

En ce qui concerne la production de biomasse aérienne (figure 12.2B ci-contre), les effets de la carence en P et de l'exposition à l'uranium sont visibles dès le jour 34. Au premier temps de mesure il est en effet possible d'observer une tendance à l'inhibition de la production de biomasse aérienne chez les plantes carencées non exposées et une inhibition significative chez les plantes carencées exposées à l'uranium. Au second temps de mesure ces observations se confirment. La production de biomasse est significativement inférieure chez les plantes ayant poussé dans le milieu pauvre en phosphore. Dans ces conditions ce sont les plantes exposées à l'uranium qui subissent le stress le plus important puisqu'elles présentent le plus faible niveau de production, significativement inférieur aux plantes non exposées. Comme pour les racines, la présence d'uranium dans le milieu riche en phosphore n'a pas d'influence sur la production de biomasse aérienne.

L'observation des résultats à l'échelle de la plante entière confirme que l'inhibition de la production de biomasse provoquée par la présence d'uranium chez les plantes carencées intervient plus rapidement que chez les plantes carencées non exposées. Une différence significative de la production est en effet visible dès le premier temps de mesure chez les plantes en -P+U alors qu'il faut attendre le second temps de mesure pour observer un effet inhibiteur significatif chez les plantes en -P-U (figure 12.2C ci-contre).

En conditions non limitantes en phosphore, le ratio racines/parties aériennes reste à une valeur moyenne de 0.4 tout au long de l'expérience. Chez les plantes carencées en phosphore, ce ratio est plus élevé et augmente entre les deux temps de mesure, passant de 0.55 à 0.7 aux jours 34 et 49 respectivement. Il est significativement plus élevé chez les plantes carencées exposées à l'uranium, il passe en effet de 0.7 à 0.9 entre les jours 34 et 49 (figure 12.3 page 84).

12.2.2 Développement foliaire

Comme le montre la figure 12.4A page 85, la production de feuilles est restée constante chez les plantes ayant poussé dans le milieu riche en phosphore tout au long de l'expérience pour atteindre une moyenne de 20 feuilles par plante au moment de la récolte. Dans ces conditions l'exposition à 20 μ M d'uranium n'a pas affecté pas la production.

Chez les plantes carencées non exposées la production de feuilles est restée constante jusqu'au jour 31 (10 feuilles par plante en moyenne) puis a décliné jusqu'au jour 40 pour finalement atteindre un plateau avec une moyenne de 8 feuilles par plante en fin d'expérience. Chez les plantes carencées exposées à l'uranium la production de feuilles est restée constante jusqu'au 19^e jour puis n'a plus évolué jusqu'au dernier jour où elles ont également affiché une moyenne de 8 feuilles par plante. Ainsi, dans un milieu pauvre en phosphore, la présence du contaminant n'a pas influencé quantitativement la production de feuilles toutefois il semblerait qu'elle ait précipité son inhibition.

D'un point de vue qualitatif, la coloration des feuilles est restée normale chez les

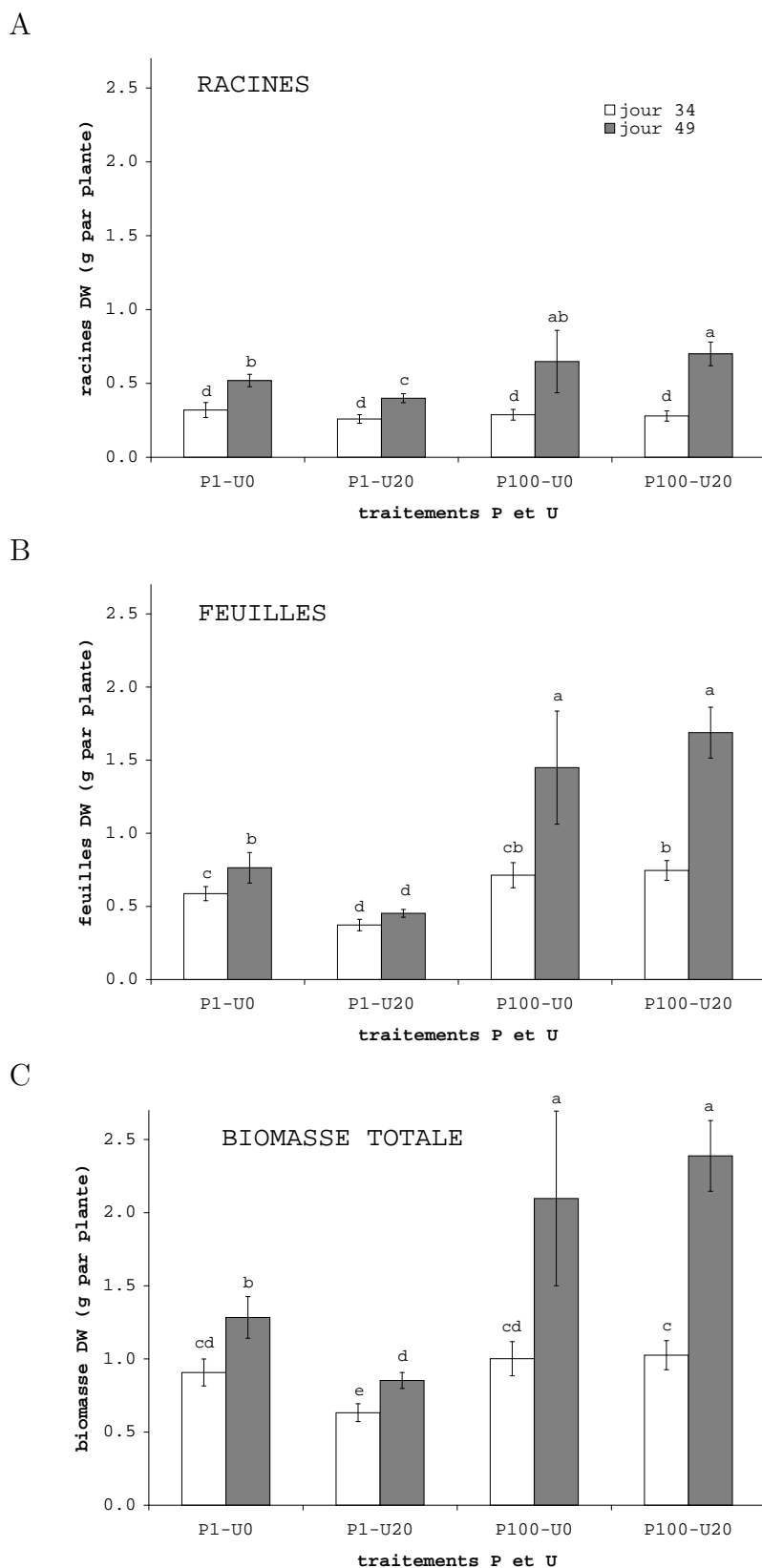


FIGURE 12.2: Biomasse des racines (A), des parties aériennes (B) et totale (racines + parties aériennes) (C) (poids sec) après 34 et 49 jours de culture en condition -P ($1 \mu\text{M}$) ou +P ($100 \mu\text{M}$) et en absence ($0 \mu\text{M}$) ou présence ($20 \mu\text{M}$) d'uranium. Moyennes \pm écart-type ($n=5$). Des lettres différentes indiquent des groupes statistiques significativement différents ($P < 0.05$).

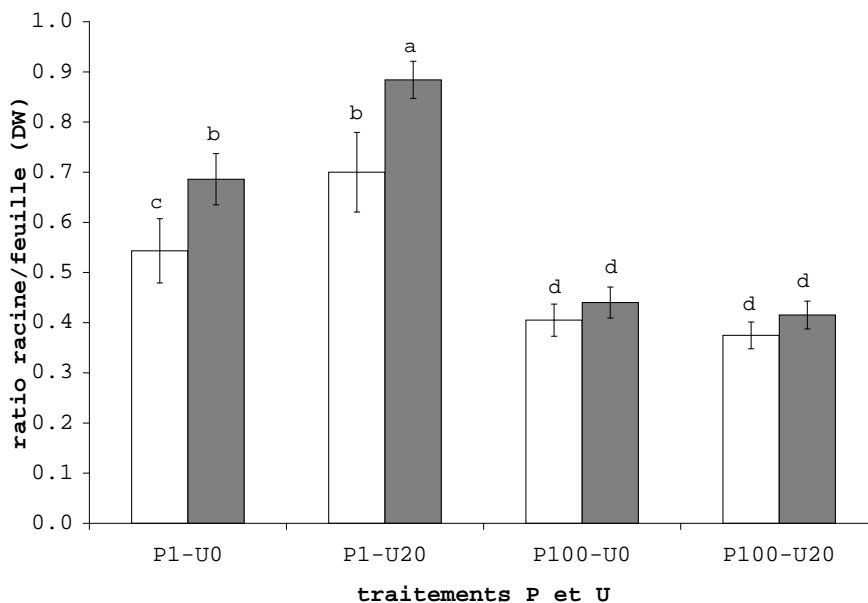


FIGURE 12.3: Rapport de masses racines/parties aériennes (poids sec) après 34 et 49 jours de culture en condition -P (1 μ M) ou +P (100 μ M) et en absence (0 μ M) ou présence (20 μ M) d'uranium. Moyennes \pm écart-type (n=5). Des lettres différentes indiquent des groupes statistiques significativement différents ($P < 0.05$).

plantes ayant poussé dans les milieux riches en phosphore (couleur vert foncé) alors qu'un changement de couleur a pu être observé chez les plantes carencées. Chez ces dernières le vert foncé est devenu plus clair jusqu'à tendre vers le jaune, et des taches nécrotiques ont fait leur apparition. Ces changements sont apparus aux alentours des jours 34 et 40 respectivement en condition -P+U et -P-U (figure 12.5 page 86).

12.2.3 Production de clusters

Comme le montre la figure 12.4B page ci-contre, la production importante de clusters est un autre symptôme visible de la carence en phosphore chez le lupin blanc. Au 19^e jour, dans chaque condition P/U toutes les plantes ont produit au moins un cluster ce qui a déterminé le début de l'exposition à l'uranium pour les plantes concernées par ce traitement.

En -P-U les plantes ont produit une quantité de racines protéoïdes significative, constante et importante avec en fin d'expérience une moyenne de 98 (± 19) clusters par plante. En -P+U la présence d'uranium dans la solution nutritive a eu un effet inhibiteur sur la production de racines protéoïdes. Dans ces conditions cette dernière a été plus lente et a fini par décroître à partir du jour 40. En fin d'expérience une moyenne de 17 (± 3) clusters par plante a été observée. En +P-U la production de clusters est restée quasi nulle tout au long de l'expérience puisque seulement 3 (± 2) clusters par plante ont été comptabilisés en moyenne. Enfin en +P+U le développement des racines protéoïdes a suivi la même tendance qu'en +P-U jusqu'au jour 40 puis une augmentation de la production a pu être observée jusqu'à ce qu'elle devienne significativement supérieure en fin d'exposition.

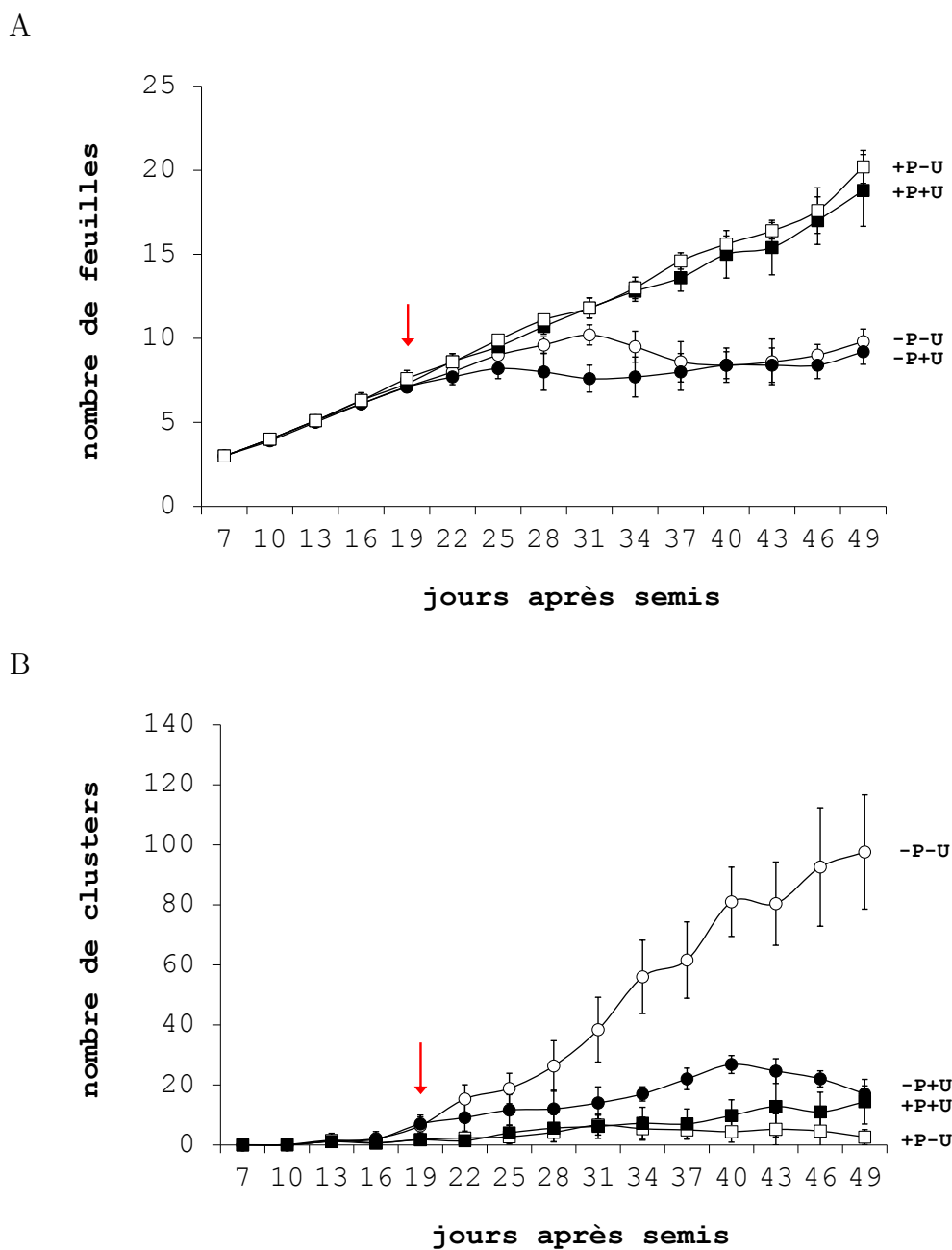


FIGURE 12.4: Nombre de feuilles (A) et de clusters (B) après 34 et 49 jours de culture en conditions -P-U (cercles blancs), -P+U (cercles noirs), +P-U (carrés blancs) et +P+U (carrés noirs). La flèche noire indique le début de l'exposition des racines à l'uranium. Moyennes \pm écart-type (n=5).

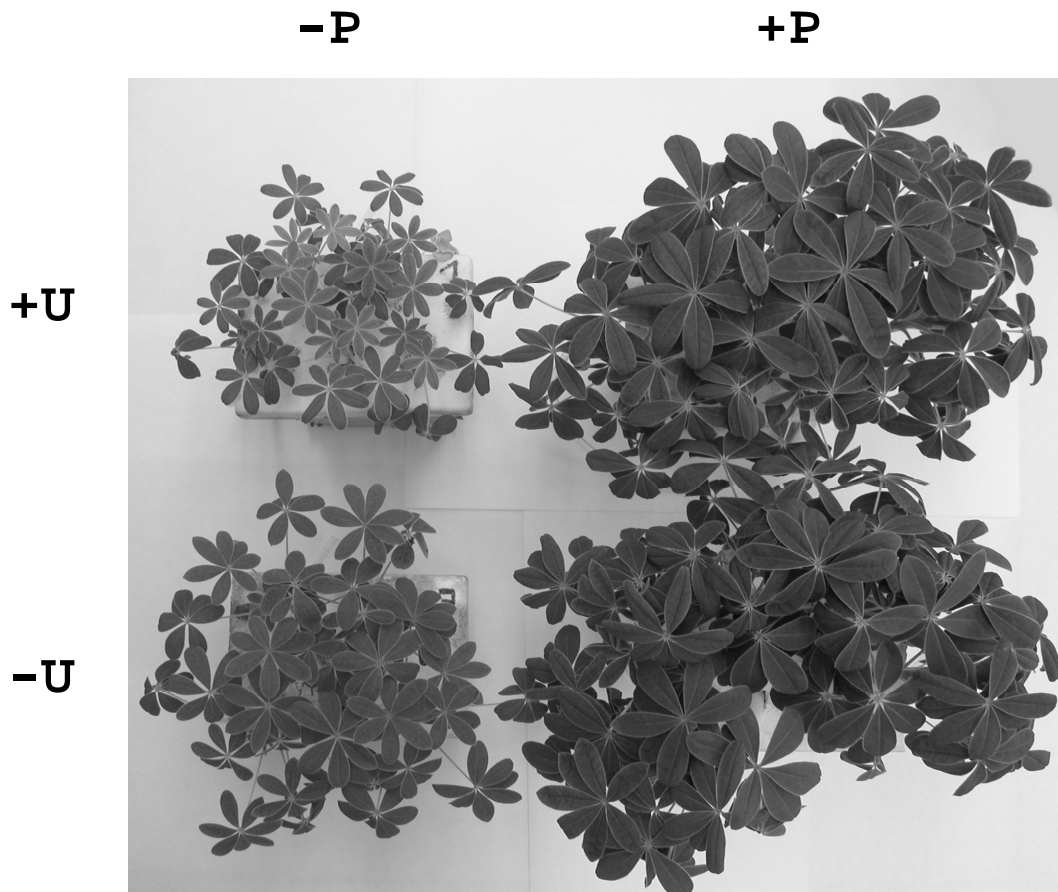


FIGURE 12.5: Photographie du lupin blanc 49 jours après initiation de la germination. Les différents pots correspondent aux conditions $-P-U$, $+P-U$, $-P+U$ et $+P+U$, respectivement en bas à gauche, en bas à droite, en haut à gauche et en haut à droite.

12.3 Exsudation de citrate

Au 34^e jour, les racines du lupin blanc ont exsudé en moyenne 153, 23, 298 et 29 nmol de citrate g^{-1} de racines h^{-1} , respectivement en conditions -P-U, -P+U, +P-U et +P+U. Chez les plantes exposées à l'uranium, les mesures entre individus sont relativement homogènes – valeurs comprises entre 9 et 42 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} et entre 10 et 46 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} en conditions -P and +P respectivement – alors qu'elles le sont beaucoup moins chez les plantes non exposées pour lesquelles les valeurs sont comprises entre 2 et 404 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} et entre 117 et 884 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} en conditions -P et +P respectivement. Les niveaux d'exsudation diffèrent en fonction de l'exposition à l'uranium mais les différences ne sont pas significatives. Seule une tendance à une plus forte exsudation a pu être observée en condition +P-U (figure 12.6A page 88).

Au 49^e jour, les racines du lupin blanc ont exsudé en moyenne 384, 41, 202 et 712 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} en conditions -P-U, -P+U, +P-U et +P+U respectivement. Les mesures sont homogènes chez les plantes carencées en phosphore non exposées à l'uranium – valeurs comprises entre 22 et 67 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} – par rapport aux trois autres conditions pour lesquelles les mesures sont comprises entre 248 et 716 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} , entre 0 et 837 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} , et entre 0 et 1160 nmol de citrate g^{-1} de racine h^{-1} en conditions -P-U, +P-U et +P+U respectivement. Les analyses statistiques ont démontré que les exsudations de citrate sont similaires en conditions -P+U et +P-U, similaires en conditions -P-U et +P+U, et que les valeurs de la première paire sont inférieures à la seconde (figure 12.6B page 88).

12.4 Transfert de l'uranium au lupin blanc

12.4.1 Accumulation dans le végétal

Comme le montre la figure 12.7A page 89, la bioaccumulation d'uranium dans les racines dépend de la concentration en phosphore dans la solution nutritive. Les concentrations moyennes d'uranium mesurées dans les racines des plantes carencées sont en effet 3.8 et 5.8 fois supérieures à celles mesurées chez les plantes non carencées respectivement aux 34^e et 49^e jours. Chez les plantes non carencées en phosphore la concentration moyenne d'uranium dans les racines a décliné significativement entre la première et la seconde mesure alors qu'elle est restée stable chez les plantes carencées.

Dans les parties aériennes en revanche, la bioaccumulation d'uranium n'a pas été influencée par la disponibilité du phosphore en solution (figure 12.7B page 89). Les concentrations moyennes mesurées dans les plantes carencées sont 1.7 et 1.8 fois plus élevées que chez les plantes non carencées respectivement aux jours 34 et 49 mais les différences ne sont pas significatives.

En s'intéressant aux résultats en termes de quantités totales accumulées et non plus en termes de concentrations afin de tenir compte des différences de production de biomasse, il s'avère que l'accumulation dans les racines est 3 fois plus importante chez les plantes carencées en phosphore aux deux temps de mesure. Toutefois, chez les plantes non carencées une légère augmentation de l'accumulation d'uranium est visible entre le jour 34 et le jour 49 ce qui traduit le fait que les racines continuent à absorber de l'uranium ce qui n'est pas le cas chez les plantes carencées. Dans les parties aériennes des plantes non carencées l'accumulation a été multipliée par 1.1 et 2.0 par rapport aux plantes non carencées respectivement aux jours 34 et 49 néanmoins les tests statistiques ne permettent pas

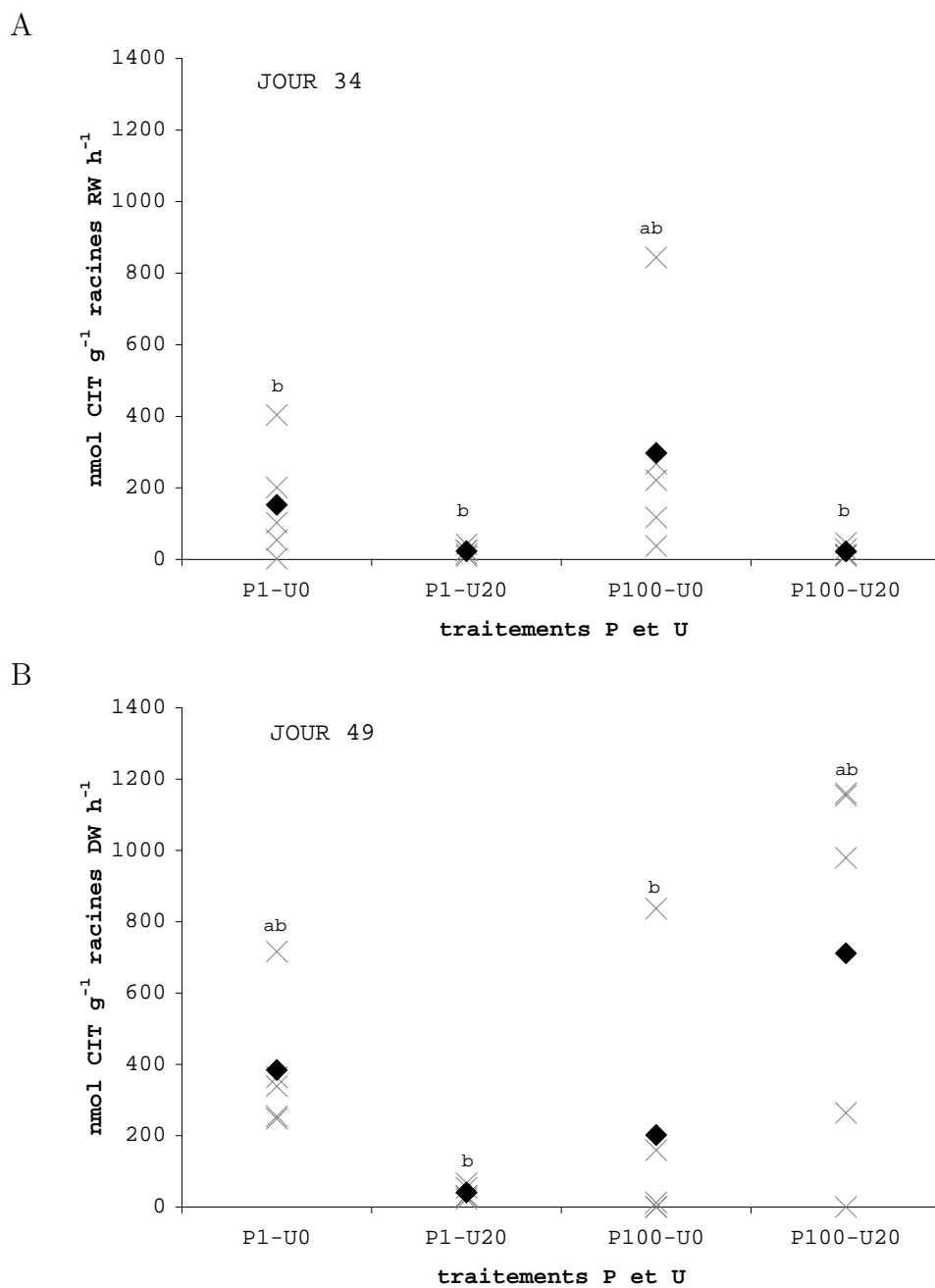


FIGURE 12.6: Exsudation racinaire de citrate après 34 (A) et 49 (B) jours de culture en condition -P (1 μM) ou +P (100 μM) et en absence (0 μM) ou présence (20 μM) d'uranium. Les moyennes sont représentées par un losange noir et les 5 réplicats par des croix grises. Des lettres différentes indiquent des groupes statistiques significativement différents ($P < 0.05$).

de mettre en évidence une différence statistique. Les graphiques relatifs à ce paragraphe ont été placés en annexe (figure A.1 page 179).

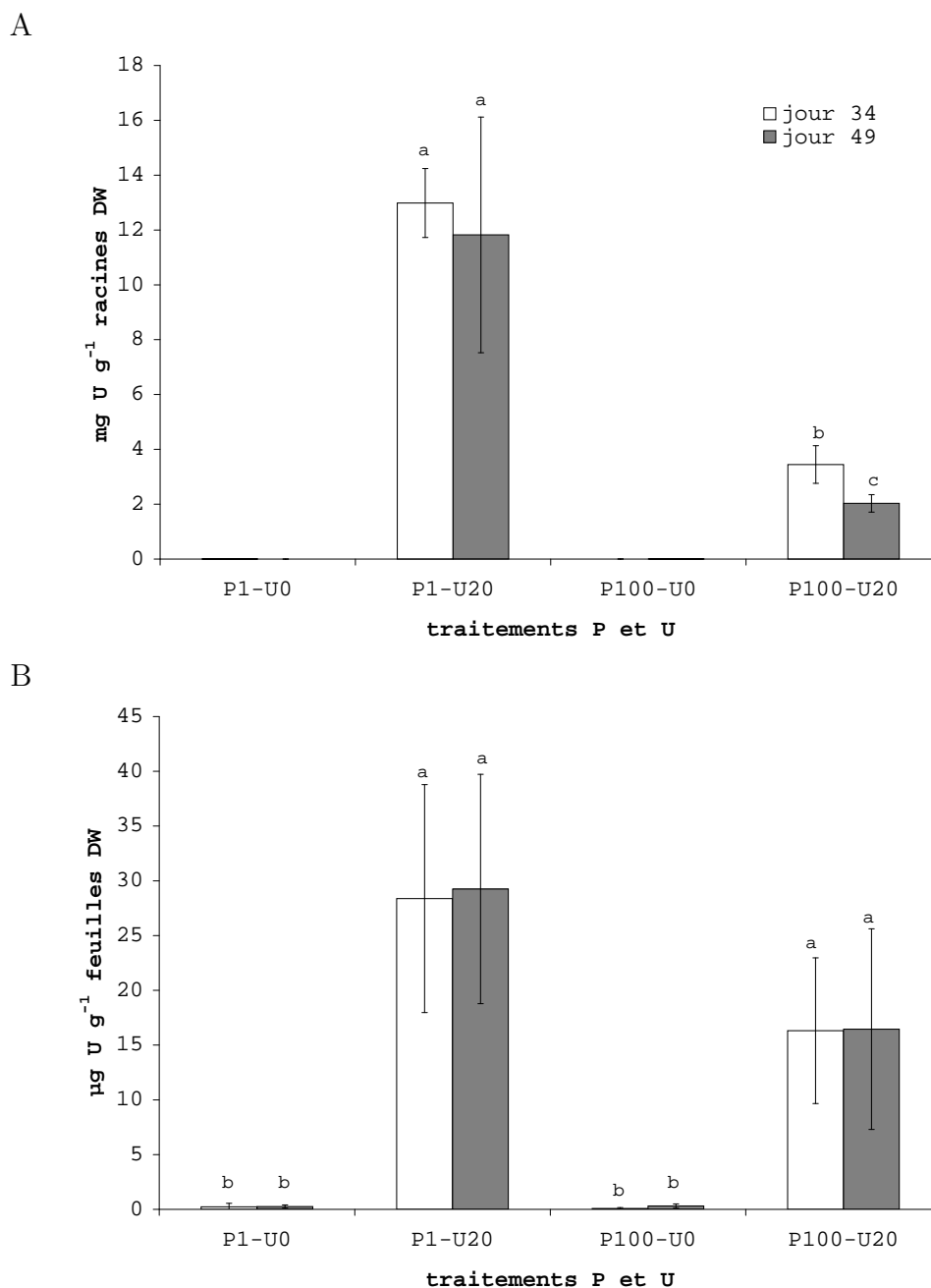


FIGURE 12.7: Concentration d'uranium dans les racines (A) et les parties aériennes (B) après 34 et 49 jours de culture en condition -P (1 μM) ou +P (100 μM) et en absence (0 μM) ou présence (20 μM) d'uranium. Moyennes \pm écart-type ($n=5$). Des lettres différentes indiquent des groupes statistiques significativement différents ($P < 0.05$).

12.4.2 Translocation des racines aux parties aériennes

En se fondant sur les accumulations moyennes décrites au paragraphe précédent, les résultats donnés dans le tableau 12.1 page 90 montrent que le facteur de translocation de l'uranium des racines aux parties aériennes est significativement différent selon l'apport en phosphore. Chez les plantes carencées le ratio vaut 3.16×10^{-3} (± 1.30) et $2.70 \times$

10^{-3} (± 1.40) aux jours 34 et 49 respectivement. Ces valeurs sont multipliées par 4 et 7 chez les plantes non carencées pour atteindre 13.06×10^{-3} (± 6.00) et 18.66×10^{-3} (± 8.78) aux jours 34 et 49 respectivement. Malgré une accumulation plus faible dans leurs racines, les plantes qui ont été correctement approvisionnées en phosphore transfèrent plus d'uranium dans leurs parties aériennes.

TABLE 12.1: Rapport de concentration d'uranium parties aériennes/racines \pm écart-type fondés sur les accumulations moyennes en conditions -P et +P aux jours 34 et 49. Des lettres différentes indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0.05$).

	jour 34	jour 49
-P+U	$3.16 \times 10^{-3} \pm 1.30$ (a)	$2.70 \times 10^{-3} \pm 1.40$ (a)
+P+U	$13.06 \times 10^{-3} \pm 6.00$ (b)	$18.66 \times 10^{-3} \pm 8.78$ (b)

12.5 Microlocalisation de l'uranium et effet sur l'ultrastructure des tissus racinaires

La figure 12.8 ci-contre illustre les principaux résultats obtenus à partir de l'observation des apex racinaires de la racine primaire récoltés au jour 34. En condition contrôle – sans uranium – les clichés ne montrent que peu de dommages au niveau des tissus quel que soit le niveau d'apport en phosphore dans la solution nutritive (figure 12.8A,C ci-contre). Néanmoins, dans les cellules des contrôles cultivés en l'absence de phosphore des symptômes caractéristiques de la carence en cet élément peuvent être observés (haut niveau de vacuolisation, présence de nombreux grains d'amidon).

La présence d'uranium chez les plantes non carencées provoque une légère dégradation des premières couches de cellules. Des précipités d'uranium associés au phosphore, au calcium et au potassium de forme lamellaire sont retrouvés à la surface des racines. Ils sont associés à une couche de matériel fibreux qui s'apparente au mucigel. Dans certains cas ils sont localisés à l'intérieur de la paroi cellulaire des cellules de l'épiderme mais ils n'ont jamais été retrouvés à l'intérieur des cellules (figure 12.8B ci-contre). Chez les plantes carencées exposées à l'uranium, un important niveau de dommages internes est visible, au minimum sur les 4 premières couches de cellules corticales. Ces cellules contiennent de nombreux précipités d'uranium relativement denses associés au phosphore et au calcium. Dans les couches cellulaires profondes, la densité de grains d'amidon est plus importante que chez les plantes non exposées. Aucun précipité n'a été retrouvé à la surface de la racine (figure 12.8D ci-contre).

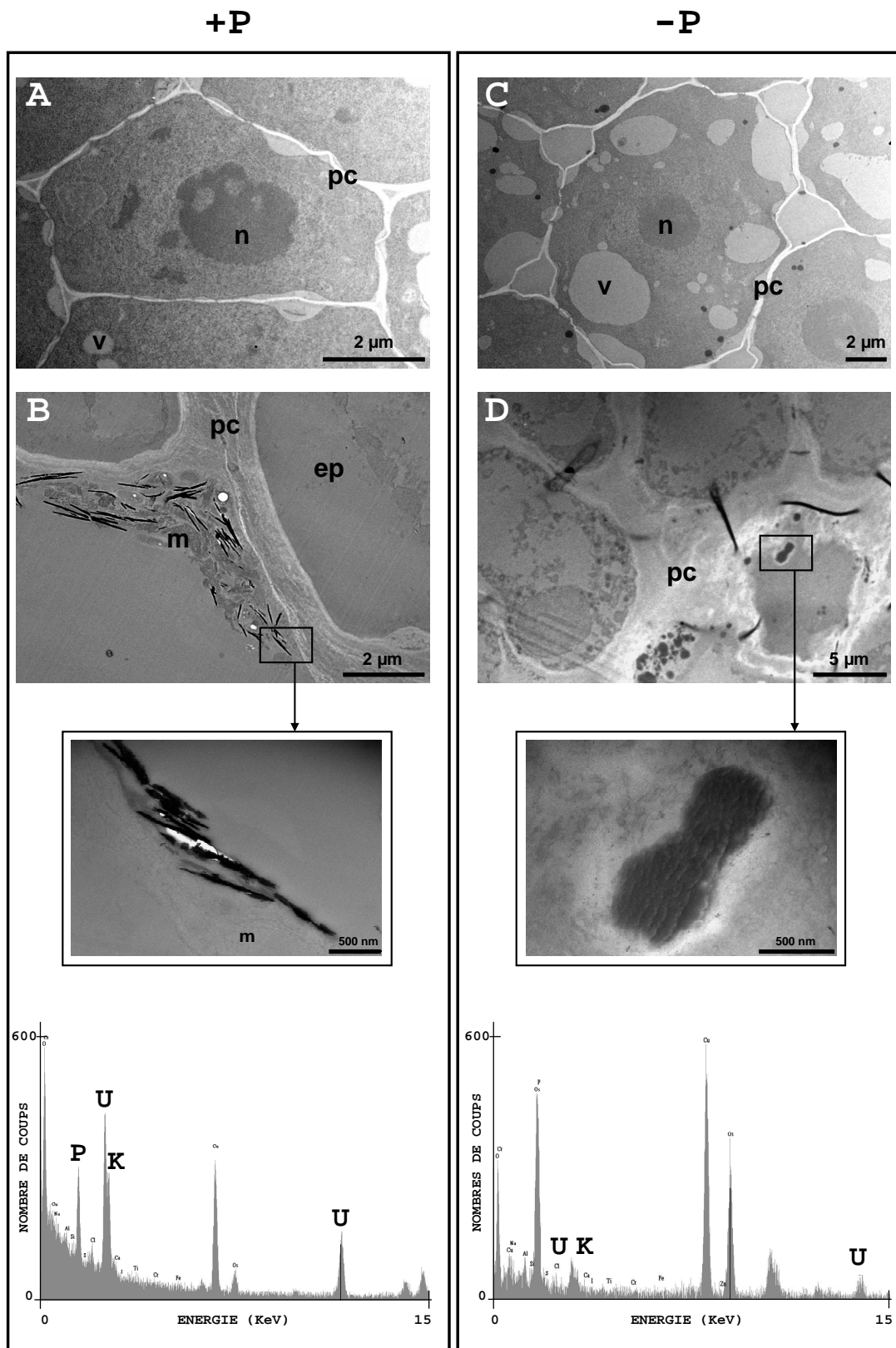


FIGURE 12.8: Ultrastructure des tissus racinaires et microlocalisation de l'uranium révélés par l'analyse TEM-EDX des cellules de l'apex de lupin blanc cultivé en condition -P (1 μM) ou +P (100 μM) et en absence (0 μM) ou présence (20 μM) d'uranium. A : +P-U, B : +P+U, C : -P-U, D : -P+U. pc : paroi cellulaire, ep : épiderme, m : mucigel, n : noyau, v : vacuole. Les échelles sont indiquées sur chaque photographie. Les spectres obtenus par analyse TEM-EDX montrent l'uranium et les éléments avec lesquels il colocalise.

13 Discussion : hydroponie

Dans cette étude, les résultats ont été obtenus en travaillant avec de hauts niveaux d'uranium – 20 μM d'uranium total correspondant à une concentration de 4.76 mg U l⁻¹ – si l'on se réfère aux niveaux retrouvés dans l'environnement. En effet, la plupart des sols ne contiennent en moyenne que 3 mg U kg⁻¹ de sol sec ce qui implique des concentrations en uranium dans la fraction aqueuse relativement faibles, de l'ordre de 0.002 à 0.25 mg l⁻¹ selon les types de sols (AIEA, 2010). L'utilisation de cette concentration élevée a toutefois été nécessaire pour pouvoir mettre en évidence la toxicité du polluant ainsi que les effets induits par le stress lié à sa présence. Par ailleurs, dans les sols contaminés par l'uranium où les concentrations peuvent atteindre quelques centaines de mg kg⁻¹, il est tout à fait envisageable de retrouver des concentrations similaires à celle utilisée.

Concernant les apports de phosphore dans le milieu de culture, la plus faible concentration utilisée (1 μM) est cohérente avec des doses provoquant une situation de carence comme le souligne Marschner (2002a). La plus haute concentration est quant à elle jugée suffisante pour assurer une croissance normale. Comme cela a été démontré chez une autre espèce dycotylédone (*Brassica napus*), la présence de 10 μM de phosphore dans la solution du sol est suffisante pour ne pas limiter l'absorption par les racines et constitue un apport adéquat (Barraclough, 1989).

13.1 Effet de l'uranium sur le développement des racines protéoïdes

Le développement du lupin blanc – notamment en ce qui concerne le développement des racines protéoïdes – confirme ce qui a déjà été observé dans des études précédentes traitant de l'adaptation physiologique à la carence en phosphore chez cette espèce. Comme on peut le voir sur la figure 12.4B page 85, l'apparition d'un nombre important de clusters tout au long des plus anciennes racines latérales est le premier symptôme visible de la carence chez les plantes ayant eu un apport en phosphore insuffisant. Dans une moindre mesure des clusters se sont formés chez les plantes en condition +P, comme l'ont également observé Marschner et collab. (1986, 1987) et Johnson et collab. (1996b). Dans cette condition, leur production semble être induite par le niveau de phosphore interne plutôt que par la concentration du milieu de culture (Dinkelaker et collab., 1995). Dans notre étude, on observe l'apparition des premiers clusters 19 jours après l'initiation de la germination quel que soit l'apport en phosphore, *i.e.* quelques jours plus tard que dans l'étude de Neumann et collab. (1999). Comme attendu, ce développement a rapidement été inhibé chez les racines des lupins en présence de 100 μM de phosphore.

En présence de 20 μM d'uranium dans la solution nutritive, le développement des clusters a été influencé chez les plantes en condition -P puisque la présence du polluant mène à l'arrêt complet de leur production. On assiste à une diminution du nombre de clusters au fur et à mesure de la mise en place de la sénescence. À l'origine, nous nous attendions au

phénomène inverse mais les différents résultats obtenus dans cette expérimentation ont dévoilé une toxicité de l'uranium plus importante que prévue dans le milieu appauvri en phosphore. De la même manière, nous ne nous attendions pas à ce que la présence d'uranium induise la production de clusters en condition +P par rapport aux contrôles +P-U. Cela suggère que la présence d'uranium dans le milieu induit un signal s'apparentant au signal perçu par la plante lors d'une carence en phosphore, ce qui la pousse à mettre en place les réponses spécifiques au niveau de son système racinaire.

13.2 Effets conjoints de l'uranium et du phosphore sur l'allocation de la biomasse

En comparaison avec les travaux de Wang et collab. (2007) qui ont travaillé avec une solution nutritive semblable à la nôtre – apport de phosphore différent (50 μM) – il apparaît que les différences observées en termes de production de biomasse racinaire et aérienne dans notre expérience sont moins prononcées entre les conditions +P et -P (figure 12.2A et B page 83). Alors que Wang et collab. (2007) décrivent une inhibition significative en absence de phosphore à la fois sur la production de biomasse racinaire et aérienne 30 jours après germination, nous relevons uniquement un effet inhibiteur sur la production des parties aériennes au 49^e jour. À la figure 12.3 page 84, nous constatons toutefois une évolution du rapport de biomasse racinaire sur biomasse foliaire – ce ratio est supérieur chez les plantes en -P et il augmente entre les deux temps de mesure – ce qui est un phénomène couramment observé lorsque le phosphore est l'élément limitant dans le milieu de culture (Ericsson et collab., 1992; Ericsson, 1995).

L'augmentation de ce rapport est la conséquence d'une réponse physiologique connue chez les plantes carencées en phosphore qui se met en place préalablement à l'induction des racines protéoïdes : en période de carence, la majorité des plantes modifient leur architecture racinaire afin d'accroître le volume de sol qu'elles peuvent explorer à l'aide de leurs racines et ainsi augmenter la probabilité d'occuper une zone de plus forte concentration (Misson et collab., 2005). Dans ces conditions, la croissance des racines primaires ralentit en faveur du développement du système racinaire secondaire (phénomène de ramification) et les ressources nutritives sont réallouées vers les racines au détriment des parties aériennes – réallocation des stocks de phosphate inorganique (Pi) pour la synthèse de nouvelles structures par exemple – ce qui aboutit *de facto* à l'augmentation du rapport de biomasse racinaire sur biomasse foliaire.

Les figures 12.2A et 12.2B page 83 ne montrent aucun effet de la présence d'uranium sur la production de biomasse en condition +P par rapport aux contrôles +P-U. En revanche la présence du polluant en milieu pauvre en phosphore inhibe la production de parties aériennes aux deux temps de mesure et la production de biomasse racinaire au 49^e jour (par rapport aux contrôles -P-U). En conséquence, les rapports de biomasse racinaire sur biomasse foliaire sont similaires chez les plantes +P-U et +P+U et ils sont plus faibles que chez les plantes cultivées en condition limitante en phosphore. Chez ces dernières la présence d'uranium amplifie l'intensité de cette réponse spécifique à la carence et nous observons donc le plus grand rapport chez les plantes -P+U.

Ces différentes observations confirment l'effet négatif d'un apport limité en phosphore sur le comportement du lupin blanc et du rôle amplificateur que peut avoir l'uranium dans ces conditions comme démontré par Misson et collab. (2009) chez *Arabidopsis thaliana*.

13.3 Effet de l'uranium sur l'exsudation de citrate

Dans cette étude, nous avons choisi de travailler avec le lupin blanc pour ses hautes performances en termes d'exsudation de citrate et le rôle potentiel que pourrait jouer cet acide organique sur la biodisponibilité de l'uranium. Il est admis que sa présence dans le sol permet de solubiliser de 100 à 1000 fois plus d'uranium que ne le peuvent d'autres acides organiques tels que l'acétate, le malate ou l'oxalate (Huang et collab., 1998; Ebbs et collab., 2001; Duquène et collab., 2008; Lozano et collab., 2011).

Étant donné la variabilité importante observée entre les différents individus dans certaines conditions, il est nécessaire de souligner que les observations faites au cours de l'expérience mettent en évidence des tendances plutôt que des contrastes nets. Comme le montre la figure 12.6A page 88, les contrôles (-P-U et +P-U) ont un niveau d'exsudation similaire au 34^e jour (± 200 nmol de citrate g^{-1} de racine) ce qui n'est pas en accord avec la littérature (Neumann et collab., 1999; Wang et collab., 2007). Ces auteurs observent des différences significatives dans ces conditions aux alentours du 20^e jour après germination. Néanmoins nous avons également observé un délai dans l'apparition des premiers symptômes visibles de la carence en phosphore chez nos plantes (augmentation significative du nombre de clusters à partir du 22^e jour et diminution de la production de feuilles à partir du 31^e jour) donc cela reste cohérent. De plus, seul un individu en condition +P présente un niveau d'exsudation très important par rapport aux quatre autres et cela a joué sur la moyenne, les écart-types et donc le résultat des analyses statistiques. Au 49^e jour (figure 12.6B page 88), l'exsudation de citrate chez les témoins (-P-U et +P-U) est conforme à ce que nous attendions sur la base des études publiées : les plantes cultivées en condition limitante de phosphore exsudent deux fois plus qu'au premier temps de mesure alors que les plantes cultivées en condition adéquate voient leur niveau d'exsudation diminuer de 50 %. À noter également que les variations observées sont du même ordre que celles observées par Wang et collab. (2007).

L'effet de la présence d'uranium sur l'exsudation de citrate montré aux figures 12.6A,B page 88 est extrêmement contrasté comme cela a également été démontré au niveau des profils de croissance et sur la production de biomasse. En condition limitante de phosphore dans la solution nutritive, les niveaux d'exsudation enregistrés sont nuls ou quasi nuls. Ces résultats confirment la forte toxicité des 20 μM d'uranium sur le développement racinaire (croissance) et sur la physiologie (exsudation). Chez les plantes ayant reçu un apport de phosphore suffisant, nous avons d'abord observé une exsudation très faible au 34^e jour avant de voir cette dernière augmenter significativement au 49^e jour pour atteindre un niveau moyen de 700 nmol de citrate g^{-1} de racine, un niveau moyen significativement supérieur à celui observé chez les plantes carencées. Alors que Wang et collab. (2007) ont observé une augmentation de l'exsudation due à la présence de 50 μM d'aluminium uniquement chez des plantes carencées en phosphore (± 600 nmol de citrate g^{-1} racine), nos résultats démontrent que la présence d'un contaminant peut également provoquer des réponses racinaires lorsque le lupin blanc est cultivé dans des conditions adéquates.

Cependant, même si l'exsudation de citrate semble être une réponse physiologique du lupin blanc en présence d'uranium dans l'environnement, nous ne pouvons ignorer la possibilité qu'une forme de carence en phosphore se soit mise en place malgré l'apport par la solution nutritive. Malgré cet apport de 100 μM , il n'en reste pas moins que le phosphore et l'uranium présentent une forte affinité l'un pour l'autre ce qui peut favoriser la formation de complexes P-U solubles. Si l'on se réfère aux données théoriques – sous-estimées pour l'uranium donc vraisemblablement pour le phosphore – calculées par CHESS (tableau 8.1 page 67), seuls 40 % du phosphore ajouté initialement serait disponible sous

forme assimilable (Pi). Néanmoins, il semble peu probable qu'une carence se soit mise en place puisque les plantes cultivées en présence d'uranium en condition +P possèdent une apparence tout à fait normale (figure 12.5 page 86) et puisqu'il semblerait que 10 μM de phosphore dans la solution du sol soient suffisants pour permettre à d'autres espèces telles que *Brassica napus* de croître normalement.

En définitive, il s'avère délicat de distinguer les effets combinés de la présence d'uranium et du manque de phosphore. En effet, certaines réponses spécifiques des plantes à de faibles niveaux de phosphore dépendent de la détection à la surface racinaire – liées au niveau de phosphore dans le milieu – et d'autres dépendent de la détection interne – activées en fonction des stocks de phosphore cellulaire. Pour ce qui est de l'uranium, la bibliographie suggère que de très faibles quantités (0.6 μM) peuvent être responsables de réponses hormétiques sur la croissance chez *Arabidopsis thaliana* (Misson et collab., 2009).

13.4 Influence de l'apport en phosphore et de l'exsudation de citrate sur l'accumulation et la translocation de l'uranium

En ce qui concerne l'accumulation d'uranium, cette étude démontre une fois de plus l'importance de la quantité de phosphore présente dans le milieu de culture comme cela avait déjà été suggéré par Rufyikiri et collab. (2006); Mkandawire et collab. (2007); Misson et collab. (2009) chez *Trifolium subterraneum*, *Hordeum vulgare*, *Lemna gibba* et *Arabidopsis thaliana*. L'accumulation dans les parties aériennes est similaire en conditions -P et +P et environ 1000 fois moins importante que dans les racines. Cependant, l'accumulation dans les racines étant plus faible en condition +P, nous observons un facteur de translocation de l'uranium des racines aux parties aériennes de 4 à 7 fois plus important par rapport aux plantes carencées. Ce dernier passe en effet de 13 à $19 \cdot 10^{-3}$ entre le jour 34 et le jour 49 chez les plantes +P alors qu'il ne vaut que $3 \cdot 10^{-3}$ chez les plantes -P et ce aux deux temps de mesures. Ces résultats sont équivalents aux résultats obtenus par Straczek et collab. (2010) chez une autre dicotylédone, *Brassica juncea* ($14 \cdot 10^{-3}$) et supérieurs aux valeurs observées chez le pois (*Pisum sativum*, dicotylédone), le maïs (*Zea mays*, monocotylédone) et le blé (*Triticum aestivum*, monocotylédone) qui présentent respectivement des ratios de 1.4, 0.6 et $0.5 \cdot 10^{-3}$. Dans leur étude, les auteurs concluent que le transport de l'uranium des racines aux parties aériennes n'est pas significativement gouverné par la CECR (Capacité d'Échange Cationique Racinaire) mais plus certainement dû à la différence d'efficacité des transports radial et longitudinal au sein des différentes espèces. Malheureusement, ces auteurs n'ont travaillé qu'avec un niveau de phosphore apporté par une espèce chimique différente de la nôtre (200 μM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) ce qui nous empêche de comparer plus précisément ces données.

En combinant ces observations avec celles de Mihalík et collab. (2012) qui ont montré une corrélation positive entre la présence d'acide citrique dans le sol et l'augmentation de la translocation de l'uranium aux parties aériennes chez le tournesol (*Helianthus annuus*), nous pouvons supposer que l'augmentation de l'exsudation de citrate qui a été observée au 49^e jour a joué un rôle dans l'augmentation du niveau de translocation chez le lupin blanc. En effet, il semble tout à fait plausible que l'augmentation de l'exsudation de citrate mesurée dans la solution de collecte se répercute à l'intérieur des cellules et favorise le mouvement de l'uranium au sein des racines et jusqu'aux parties aériennes (Huang

et collab., 1998; Laurette et collab., 2012a,b; Mihalík et collab., 2012).

Cette expérience a permis l'observation de différences significatives en termes d'effets, d'accumulation et de translocation de l'uranium selon le niveau d'apport en phosphore dans le milieu de culture. Celles-ci peuvent être associées aux propriétés chimiques de l'uranium et du phosphore en solution, et en particulier à leur capacité à complexer. En plus des effets cellulaires associés à l'induction de la carence en phosphore qui étaient déjà connus – augmentation du nombre de vacuoles et apparition de grains d'amidon – nous avons mis en évidence des effets très différents en présence d'uranium.

Dans un milieu riche en phosphore, l'uranium ne pénètre pas facilement à l'intérieur des racines, il reste majoritairement adsorbé à l'extérieur ou précipité dans le mucigel et dans les espaces intercellulaires de l'épiderme. Dans ces conditions, l'uranium est majoritairement complexé au phosphore, au calcium et au potassium sous forme de précipités denses qui ont résisté au traitement (inclusion dans les résines). Cela signifie qu'ils sont associés aux racines et qu'ils ont été pris en compte dans les dosages d'accumulation racinaire. Sous cette forme il est probable que l'uranium et le phosphore soient peu disponibles et donc que la majorité de l'uranium présent dans les racines n'ait pas pu être transloquée aux parties aériennes. Il aurait d'ailleurs été intéressant de compléter l'étude de ces précipités par des analyses de diffraction (analyses de type μ XRF par exemple) afin d'en déterminer la nature. Malheureusement le protocole de préparation des échantillons permettant les observations par MET-EDX requiert l'addition d'osmium (Os) or ce composé n'est pas compatible avec les techniques de μ XRF. L'exsudation importante de citrate chez les plantes non carencées exposées à l'uranium et le faible niveau d'internalisation de l'élément suggèrent que les plantes répondent à un signal détecté à la surface racinaire. Puisque l'uranium reste essentiellement à l'extérieur des cellules, nous pouvons supposer que sa toxicité a été limitée ce qui expliquerait les observations faites dans cette étude. En se basant sur le fait que les complexes U-citrate sont biodisponibles, il est envisageable que le citrate exsudé par ces plantes ait favorisé la mobilité du contaminant dans l'apoplasme et mené à l'augmentation significative de la translocation mesurée entre le 34^e et le 49^e jour. Même si nos observations en microscopie électronique montrent que l'uranium reste essentiellement précipité à la surface des racines, nous pouvons imaginer que les faibles quantités d'uranium mises en jeu dans le phénomène de translocation n'aient pas pu être détectées ou qu'elles se soient retrouvées sous une forme non précipitée peu visible en microscopie.

Au niveau cellulaire, chez les lupins cultivés dans un milieu pauvre en phosphore, nous avons observé d'importants dommages internes qui peuvent être associés à la présence de grandes quantités d'uranium à l'intérieur des cellules des quatre premières couches de l'épiderme. D'après les prédictions faites par CHESS, le faible apport de phosphore favorise la présence d'uranium sous forme d'ion libre ou de complexes solubles – U associé à -OH, -CO₃, -PO₄, -SO₄. Il semble évident que ces formes chimiques sont susceptibles de tamponner la concentration de l'ion libre par décomplexation au voisinage de la racine ce qui favorise le transfert aux racines, l'internalisation et l'apparition de toxicité chez le lupin blanc. Dans ces conditions, les précipités d'uranium qui colocalisent avec le phosphore sont rares et nous pouvons supposer qu'ils se sont formés après que l'uranium a été accumulé dans les cellules, par exemple en s'associant avec du matériel présent dans le cytoplasme (résidus d'ADN et de phospholipides, etc.). L'absence d'exsudation de citrate chez les plantes carencées, les dommages très importants observés sur les cellules ainsi que l'allocation des ressources favorisant la production de biomasse racinaire sont de bons indicateurs qui expliquent le très faible taux de translocation d'uranium aux parties aériennes.

PARTIE V

**Effets du phosphore et du citrate
sur la remobilisation de l'uranium
en réacteur fermé**

Cette partie est dédiée à l'exposé des résultats obtenus en réacteurs fermés dont le protocole est détaillé au paragraphe 9 page 69. Après avoir caractérisé le comportement du lupin blanc en hydroponie et notamment l'effet de la présence d'uranium et de phosphore sur l'exsudation racinaire de citrate, nous avons cherché à savoir dans quelle mesure cet acide organique peut avoir une influence sur la phytodisponibilité du radionucléide dans le sol. Pour ce faire, un sol naturel riche en uranium a été mis en contact avec de la solution nutritive contenant différentes concentrations de citrate et de phosphore. Ce dernier a été délivré en faible concentration (1 μM) ou forte concentration (100 μM) de manière à travailler dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente. Les concentrations de citrate ont quant à elles été choisies sur la base des exsudations mesurées en hydroponie – exsudation moyenne la plus forte relevée chez les plantes carencées non exposées à l'uranium au jour 49 – et au cours des expériences préliminaires sur rhizotests – exsudation moyenne quatre fois inférieure à la première. Cette expérience s'inscrit dans la seconde phase de l'étude du système découplé et est dédiée au système sol/solution.

La partie est découpée en deux chapitres :

- le chapitre 14 expose les résultats relatifs aux échanges observés entre sol et solution (uranium, cations majeurs et anions majeurs), les corrélations d'échange existant entre cations et uranium, et les concentrations en citrate retrouvées dans les réacteurs fermés en fin d'expérience ;
- le chapitre 15 discute du comportement de l'uranium en se basant sur les caractéristiques du sol et de l'effet du citrate sur la remobilisation d'uranium, puis fait le bilan des quantités d'uranium que le dispositif est capable de mettre en solution afin de pouvoir faire une comparaison avec les résultats obtenus sur rhizotests par la suite.

En jouant à la fois sur les temps de contact entre sol et solution ainsi que sur le renouvellement de la solution nutritive nous avons pu démontrer l'importance de la concentration en citrate sur la remobilisation de l'uranium en solution ainsi que l'existence de pools d'uranium plus ou moins disponibles dans le sol. Ces résultats font l'objet d'un article actuellement en préparation.

14 Résultats : réacteurs fermés

14.1 Méthode de calcul des échanges minéraux entre sol et solution d'incubation

Au cours de cette expérience en réacteurs fermés (batchs désorption), l'effet conjoint de la présence/absence de phosphore et de citrate sur la solubilisation de l'uranium a été testé. Le sol a été mis en contact avec différentes solutions nutritives. Deux concentrations de phosphore (1 et 100 μM) et trois concentrations de citrate : une concentration nulle notée C_0 , une concentration basse de 10.15 mg de citrate l^{-1} notée C_{10} et une concentration haute de 40.60 mg de citrate l^{-1} notée C_{40} . Comme cela a été rappelé en introduction de ce chapitre, la concentration C_{10} a été choisie sur la base de tests préliminaires d'exsudation sur rhizotests (exsudation moyenne) et la concentration C_{40} correspond à un fort niveau d'exsudation mesuré en hydroponie chez les plantes carencées non exposées à l'uranium (paragraphe 12.3 page 87). Deux types de contact sol/solution ont été comparés, un contact continu pendant 5 jours sans renouvellement de la solution (réacteur fermé continu) et un contact de 5 jours avec renouvellement de la solution toutes les 24 heures (réacteur fermé en série).

Pour un élément X , la quantité échangée entre le sol et la solution pendant un temps de contact a été calculée comme suit :

$$X_{\text{échangé}} = \frac{[X]_{\text{surnageant}} - [X]_{\text{solution d'incubation}} - [X]_{\text{résiduel}}}{m_{\text{sol}}} \times V_{\text{surnageant}} \quad (14.1)$$

où :

- $X_{\text{échangé}}$ est la quantité d'élément en mg $X \text{ g}^{-1}$ de sol sec ayant été échangée entre le sol et la solution (désorption, adsorption et/ou précipitation) pendant la durée d'incubation du réacteur fermé ;
- $[X]_{\text{surnageant}}$ est la concentration en mg $X \text{ l}^{-1}$ dosée dans le surnageant récupéré en fin d'incubation ;
- $[X]_{\text{solution d'incubation}}$ est la concentration en mg $X \text{ l}^{-1}$ dosée dans la solution d'incubation avant mise en contact avec le sol ;
- $[X]_{\text{résiduel}}$ est la concentration en mg $X \text{ l}^{-1}$ dans la solution qui n'a pas pu être récupérée lors de la centrifugation précédente pour les réacteurs fermés en série ;
- $V_{\text{surnageant}}$ est le volume de surnageant en l récolté après centrifugation ;
- m_{sol} la masse de sol sec en g contenue dans les réacteurs fermés.

Une valeur de $X_{\text{échangé}}$ positive signifie donc que l'échange s'est majoritairement produit du sol vers la solution ce qui traduit l'existence de phénomènes de désorption, et inversement une valeur de $X_{\text{échangé}}$ négative signifie que l'échange s'est majoritairement produit de la solution vers le sol. Dans ce cas de figure, le dispositif expérimental ne permet pas de faire la distinction entre les phénomènes de sorption, de dégradation et de précipitation, ces derniers indiquant la formation d'une nouvelle phase porteuse de l'élément. Ces trois phénomènes sont à l'origine de la perte d'élément dissous en solution, en effet les précipités néoformés peuvent être restés dans le réacteur fermé lors de la récupération du surnageant et/ou avoir été perdus au cours de la filtration des échantillons avant leur analyse. Il faut toutefois garder à l'esprit que désorption et perte en élément dissous peuvent se produire en même temps puisque ces processus sont dynamiques, ainsi le calcul de $X_{\text{échangé}}$ permet uniquement de déterminer si l'un des deux phénomènes prédomine sur l'autre. À noter que le terme « échangé » employé dans le propos pour caractériser les phénomènes de désorption, précipitation, dégradation et sorption est généralement utilisé pour décrire des échanges ioniques.

14.2 L'uranium dans les réacteurs fermés

14.2.1 Quantités d'uranium échangée entre sol et solution

Comme le montrent les résultats de la figure 14.1 ci-contre, la quantité de phosphore apportée par la solution d'incubation n'a pas influencé le comportement de l'uranium dans le sol et ce quel que soit le type de réacteur fermé utilisé.

Dans les réacteurs fermés continus après 5 jours d'incubation une désorption significative de l'uranium a été mise en évidence pour les trois conditions de citrate testées. En C_0 , on retrouve dans la solution d'incubation des concentrations de 4.08×10^{-4} ($\pm 2.06 \times 10^{-4}$) et 4.23×10^{-4} ($\pm 1.61 \times 10^{-4}$) mg U g⁻¹ de sol sec respectivement en +P et -P, en C_{10} des concentrations de 2.85×10^{-4} ($\pm 0.22 \times 10^{-4}$) et 3.03×10^{-4} ($\pm 0.14 \times 10^{-4}$) mg U g⁻¹ de sol sec respectivement en +P et -P, et en C_{40} des concentrations de 2.82×10^{-4} ($\pm 0.43 \times 10^{-4}$) et 3.80×10^{-4} ($\pm 0.95 \times 10^{-4}$) mg U g⁻¹ de sol sec respectivement en +P et -P. Comme l'indiquent les tests statistiques, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence dans ces conditions, la présence des différentes concentrations de citrate n'a donc pas influencé la remobilisation de l'uranium après un contact long sans renouvellement de la solution d'incubation.

Dans les réacteurs fermés en série, le comportement de l'uranium varie très nettement entre le premier jour et les suivants. Au cours du premier contact de 24 heures (jour 1), d'importantes quantités d'uranium passent du sol à la solution. On retrouve en effet des concentrations en C_0 de 5.04×10^{-4} ($\pm 0.60 \times 10^{-4}$) et 5.58×10^{-4} ($\pm 0.63 \times 10^{-4}$) mg U g⁻¹ de sol sec respectivement en +P et -P, en C_{10} des concentrations de 10.43×10^{-4} ($\pm 1.85 \times 10^{-4}$) et 8.76×10^{-4} ($\pm 0.51 \times 10^{-4}$) mg U g⁻¹ de sol sec respectivement en +P et -P, et en C_{40} des concentrations de 20.62×10^{-4} ($\pm 1.03 \times 10^{-4}$) et 19.61×10^{-4} ($\pm 0.37 \times 10^{-4}$) mg U g⁻¹ de sol sec respectivement en +P et -P. Un effet du citrate a pu être mis en évidence, la quantité d'uranium désorbé du sol est en effet d'autant plus importante que la concentration en citrate dans la solution d'incubation est élevée. À partir de deuxième jour de contact entre sol et solution d'incubation, une désorption de l'uranium a pu être observée – hormis au jour 2 en C_{40} où l'on constate une légère perte en élément dissous – néanmoins les valeurs mesurées sont nettement plus faibles qu'au jour 1 et les tests statistiques ne permettent pas de valider un effet significatif de la présence de citrate aux quatre derniers temps de mesure.

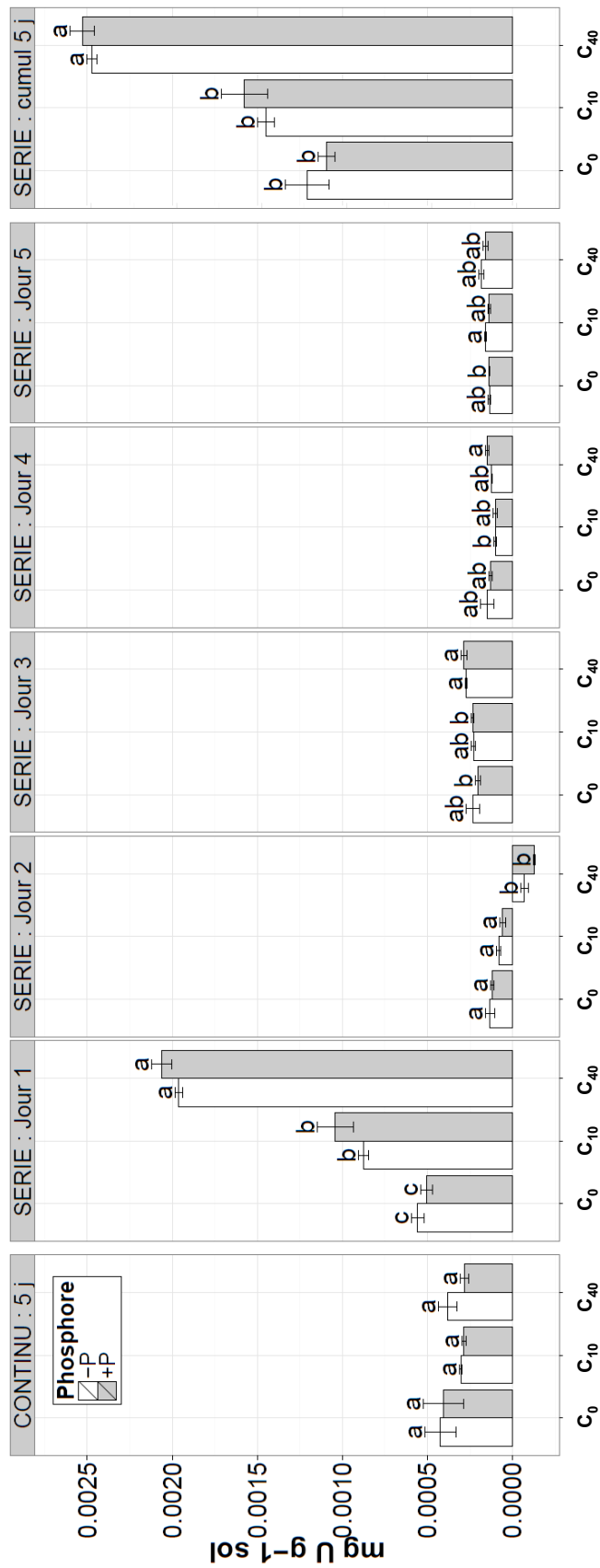


FIGURE 14.1: Quantité d'uranium échangé dans les réacteurs fermés en fonction des concentrations en C₀, C₁₀ et C₄₀ et en phosphore (-P : 1 μM; +P : 100 μM). Moyenne ± écart-type. Pour un jour donné, les lettres différentes indiquent des groupes statistiques significativement différents. De gauche à droite, les p-value sont : $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,01$ et $p < 0,01$.

En se référant aux données du tableau 14.1 ci-dessous dans lequel sont comparées les quantités d'uranium désorbé dans les deux types de réacteurs fermés, la différence d'efficacité entre les deux modes opératoires apparaît nettement. La quantité d'uranium récupérée après 5 jours dans les réacteurs fermés continus représente seulement 36 %, 20 % et 13 % de celle récupérée en 5 jours dans les réacteurs fermés en série, respectivement pour C₀, C₁₀ et C₄₀. Dans ces derniers les remobilisations observées au premier jour contribuent de manière importante dans le résultat final (cumul) puisque 46 %, 63 % et 80 % de l'uranium total sont récupérés au jour 1, respectivement en C₀, C₁₀ et C₄₀.

TABLE 14.1: Comparaison des quantités moyennes d'uranium remobilisé en mg U g⁻¹ de sol sec dans les réacteurs fermés en série (somme des 5 jours) et continus (n=3).

Phosphore	Citrate	Réacteur fermé en série (S)	Réacteur fermé continu (C)	rapport S/C (%)
+P	C ₀	10.93 × 10 ⁻⁴ ± 0.87	4.08 × 10 ⁻⁴ ± 2.06	37.3
	C ₁₀	15.75 × 10 ⁻⁴ ± 2.33	2.85 × 10 ⁻⁴ ± 0.22	18.1
	C ₄₀	25.28 × 10 ⁻⁴ ± 1.23	2.82 × 10 ⁻⁴ ± 0.43	11.2
-P	C ₀	12.06 × 10 ⁻⁴ ± 2.25	4.23 × 10 ⁻⁴ ± 1.61	35.1
	C ₁₀	14.47 × 10 ⁻⁴ ± 0.86	3.03 × 10 ⁻⁴ ± 0.14	20.9
	C ₄₀	24.71 × 10 ⁻⁴ ± 0.52	3.80 × 10 ⁻⁴ ± 0.95	15.4

14.2.2 Coefficients de partage solide-liquide de l'uranium (*Kd*)

Le dosage de l'uranium retrouvé dans les surnageants a permis de décrire la mobilité de l'élément dans le sol grâce au calcul de coefficients de partage solide/liquide (équation 14.2). Les observations réalisées à chaque pas de temps dans les réacteurs fermés en série ont été prises en compte dans les calculs.

$$K_d \text{ (L kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{concentration dans le sol (mg U kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentration dans le surnageant (mg U L}^{-1}\text{)}} \quad (14.2)$$

Les valeurs présentées dans le tableau 14.2 page 108 montrent que les *Kd* varient de 949 à 12650 L kg⁻¹ ce qui est en accord avec les données de l'AIEA pour des types de sol similaires en se fondant sur les propriétés de texture (de 0.0017 à 20000 L kg⁻¹ (AIEA, 1994)). De manière générale les différences entre les conditions -P et +P sont ténues et ne seront donc pas décrites.

Dans les réacteurs fermés en série le *Kd* a augmenté significativement au cours des désorptions successives, passant de 3700 à 11200 L kg⁻¹ en C₀, de 2100 à 11000 L kg⁻¹ en C₁₀ et de 1000 à 9000 L kg⁻¹ en C₄₀. Les *Kd* au jour 1 ont significativement diminué avec l'augmentation de la concentration en citrate ce qui traduit le passage plus important de l'uranium en solution en présence de cette molécule. Les *Kd* n'ont pas atteint de valeurs seuils en fin d'expérience ce qui suggère que le système n'est pas parvenu à un état stationnaire et ce quel que soit l'apport de citrate. Pour information, les courbes montrant cette évolution sont disponibles dans les annexes (figure A.2 page 188).

Dans les réacteurs fermés continus seules deux valeurs de *Kd* sont disponibles pour les jours 1 et 5. La première incubation des réacteurs fermés en série peut en effet être considérée comme un réacteur fermé continu de 24 heures. Quelle que soit la concentration de citrate apportée dans le système, les *Kd* ont augmenté significativement entre les deux temps de mesure, passant en moyenne de 3700 à 5200 L kg⁻¹ en C₀, de 2000 à 6800 L kg⁻¹ en C₁₀ et de 1000 à 6000 L kg⁻¹ en C₄₀. Ces augmentations entre la première et la seconde

valeur traduisent le fait qu'une partie de l'uranium désorbé du sol le premier jour s'est réadsorbé et/ou a formé un précipité stable. Au jour 5 aucune différence significative n'a pu être mise en évidence quelle que soit la concentration de citrate. Sa présence dans le milieu n'a pas eu d'effet sur la remobilisation de l'uranium lorsque sol et solution restent en contact pendant 120 heures sans renouvellement.

Au jour 5, les valeurs de Kd calculées pour les réacteurs fermés en série sont significativement supérieures à celles des réacteurs fermés continus. En effet, en C_0 le $Kd_{continu}$ vaut 5200 L kg^{-1} et le $Kd_{série}$ vaut 11200 L kg^{-1} , en C_{10} le $Kd_{continu}$ vaut 6800 L kg^{-1} et le $Kd_{série}$ vaut 11000 L kg^{-1} , et en C_{40} le $Kd_{continu}$ vaut 6000 L kg^{-1} et le $Kd_{série}$ vaut 9000 L kg^{-1} . Les réacteurs fermés en continu et en série n'ont donc pas le même effet sur la répartition de l'uranium entre sol et solution ce qui est logique puisque la matrice de sol dans les seconds réacteurs fermés est modifiée après le premier renouvellement de solution d'incubation. Les équilibres mis en jeu dans les deux dispositifs sont donc différents.

14.3 Comportement des cations et anions majeurs

14.3.1 Échange des cations majeurs

Les dosages des cations majeurs ont également permis de mesurer les teneurs en calcium (Ca), fer (Fe), magnésium (Mg) et potassium (K). Le sodium (Na) quant à lui n'a pas pu être détecté. Le comportement de ces éléments s'est révélé très hétérogène et aucune corrélation avec les concentrations de citrate et de phosphore n'a pu être détectée. Les données complètes ne seront pas présentées en détail dans le manuscrit mais sont toutefois à disposition en annexe (tableau A.2 page 180). Globalement, certains éléments ont plutôt tendance à être désorbés de la matrice du sol (Fe et Mg) tandis que les autres subissent des pertes en solution (Ca et K).

Dans le cadre de cette étude une observation est cependant intéressante : il existe un effet significatif de la concentration en citrate sur la désorption du fer au jour 1 des réacteurs fermés en série. En revanche le calcul du ratio U/Fe à partir des quantités échangées en réacteur fermé n'a pas apporté d'indication supplémentaire. Dans les conditions testées le ratio est toujours supérieur à 1 (sauf pour la condition $C_0\text{-P}$) et est compris entre 1.5 et 2.0 (tableau 14.3 page 109).

Les pertes de potassium (K) en solution sont permanentes tout au long des réacteurs fermés en série. Les quantités perdues dans les réacteurs fermés continus après 5 jours de contact sont équivalentes à celles observées dans les réacteurs fermés en série au jour 1. Cette équivalence des échanges entre les types de réacteurs fermés n'est pas retrouvée pour les autres éléments dont les échanges mesurés dans les réacteurs fermés continus sont toujours plus faibles que dans les réacteurs fermés en série.

14.3.2 Corrélations monotones entre les comportements des cations et de l'uranium

Les tests effectués (test de KENDALL et de SPEARMAN) permettent uniquement de rechercher des relations monotones du type « A augmente quand B augmente » ou « A diminue quand B augmente ». Ici, l'objectif était de voir si le comportement de l'uranium pouvait être relié de manière simple à celui des autres cations dosés lors de l'expérience d'incubation du sol en réacteurs fermés.

Comme le montrent les résultats consignés dans le tableau 14.4 page 109, le comportement de l'uranium est positivement corrélé – échange entre sol et solution dans le même

TABLE 14.2: Coefficient de partage solide-liquide (K_d désorption) de l'uranium en réacteurs fermés en L solution kg^{-1} sol. Les données sont indiquées pour chaque traitement en citrate (C_0 : 0 mg l^{-1} ; C_{10} : 10.15 mg l^{-1} et C_{40} : 40.60 mg l^{-1}), chaque condition de phosphore (+P : 100 μM et -P : 1 μM) et chaque type de réacteur fermé (C : réacteur fermé en continu et S : réacteur fermé en série). Moyenne \pm écart-type ($n=3$). Les écart-types sont donnés entre parenthèses sous chaque valeur.

	C_0				C_{10}				C_{40}			
	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P	+P	-P
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
Jour 1	3758 (247)	-	3642 (377)	-	1932 (333)	-	2355 (105)	-	949 (54)	-	1014 (1)	-
Jour 2	8495 (677)	-	8087 (1762)	-	7714 (1480)	-	8328 (721)	-	6701 (791)	-	6478 (171)	-
Jour 3	8234 (821)	-	7493 (1818)	-	7555 (505)	-	7684 (708)	-	6287 (697)	-	6457 (147)	-
Jour 4	11100 (1451)	-	10609 (3467)	-	12458 (1757)	-	12650 (523)	-	8837 (799)	-	10351 (284)	-
Jour 5	11248 (437)	5446 (2256)	11243 (215)	5105 (1601)	11661 (845)	7045 (409)	10445 (362)	6635 (322)	9440 (971)	6871 (1200)	8679 (1250)	5392 (1067)

TABLE 14.3: Quantités moyennes de fer remobilisé en mg Fe g⁻¹ de sol sec dans les réacteurs fermés en série au jour 1 et calcul du rapport U/Fe (n=3).

Phosphore	Citrate	Fe remobilisé au J1	Rapport U/Fe
+P	C ₀	$-19.02 \times 10^{-4} \pm 0.87$	-0.26
	C ₁₀	$5.38 \times 10^{-4} \pm 1.56$	1.94
	C ₄₀	$14.54 \times 10^{-4} \pm 1.07$	1.42
-P	C ₀	$2.81 \times 10^{-4} \pm 0.40$	1.99
	C ₁₀	$4.37 \times 10^{-4} \pm 0.15$	2.00
	C ₄₀	$12.93 \times 10^{-4} \pm 1.22$	1.52

sens pour les deux éléments – avec celui du fer au premier et au quatrième jour des réacteurs fermés en série, avec celui du magnésium au cinquième jour des réacteurs fermés en série et avec celui du potassium au deuxième jour des réacteurs fermés en série. Le comportement de l'uranium est négativement corrélé avec celui du fer au cinquième jour des réacteurs fermés en série, avec celui du calcium au premier jour des réacteurs fermés en série et avec celui du potassium les troisième et quatrième jours des réacteurs fermés en série.

Ces résultats sont hétérogènes et aucune conclusion précise ne peut être tirée à ce sujet avec le jeu de données.

TABLE 14.4: Coefficients de corrélation de SPEARMAN, ρ . Les valeurs positives indiquent un échange entre sol et solution dans le même sens pour les deux éléments comparés et les valeurs négatives indiquent un échange en sens contraire. Un coefficient proche de |1| exprime une forte corrélation.

Réacteur fermé	U-Fe	U-Mg	U-Ca	U-K
série jour 1	0.95***	-0.24	-0.61 **	-0.02
série jour 2	0.08	-0.11	0.23	0.69**
série jour 3	0.19	0.35	-0.17	-0.60 *
série jour 4	0.52*	-0.23	0.34	-0.56 *
série jour 5	-0.48 *	0.53*	0.29	-0.41
continu	0.19	-0.13	0.25	0.49

*** : $P < 0,001$; ** : $P < 0,01$; * : $P < 0,05$

14.3.3 Échange des anions majeurs et suivi des concentrations en citrate

L'analyse des surnageants en chromatographie ionique a permis de doser les anions majeurs (chlorures, nitrates, sulfates et phosphates) ainsi que deux acides organiques (citrate et oxalate). Tous les échantillons disponibles n'ont pas pu être analysés (seulement un réplicat sur les trois disponible) ce qui n'a pas permis de réaliser d'analyse statistique. Les résultats concernant les anions majeurs ne seront pas présentés en détail. Les tableaux de valeurs sont malgré tout disponibles en annexes (tableau A.3 page 181).

Les échantillons qui ont pu être dosés semblent indiquer que les sulfates et les phosphates sont essentiellement impliqués dans des processus de perte en élément dissous. Pour les phosphates, cette perte en éléments dissous est importante en condition +P (entre 0.03 et 0.05 mg g⁻¹ de sol sec) et quasi nulle en condition -P. Aucune différence n'a été observée entre les réacteurs fermés en continu et en série ce qui suggère que le phosphore apporté par la solution nutritive précipite ou est impliqué dans des processus

de sorption dès qu'il est en contact avec le sol. Les chlorures semblent plutôt impliqués dans des processus de désorption. Une forte remobilisation est en effet observée au jour 1 des réacteurs fermés en série (du même ordre que celle observée dans les réacteurs fermés continus après 5 jours de contact) suivie de faibles échanges les jours suivants.

En ce qui concerne le citrate (tableau 14.5 ci-contre), les dosages effectués sur les réacteurs fermés en série avec la plus forte concentration appliquée (C_{40}) montrent que l'élément est impliqué dans des processus de pertes en solution à chaque pas de temps. Nos résultats indiquent qu'environ 90 % de la quantité totale de citrate qui est apportée dans les réacteurs fermés sont sujet à des phénomènes de précipitation et/ou resorption et/ou dégradation. Les valeurs sont plus faibles au jour 1 (≈ 60 %) et sont supérieures à 99 % aux jours 2, 3, 4 et 5 (hormis en -P au J5 : 83 %). Aucun effet significatif du phosphore n'a pu être mis en évidence hormis au premier jour (51 et 73 % respectivement en +P et -P). Dans les réacteurs fermés en continu, la totalité du citrate a disparu de la solution d'incubation et a donc été impliquée dans des pertes en éléments dissous. Avec la concentration C_{10} , le comportement du citrate dans les réacteurs fermés est sensiblement identique à ce qui est observé avec la concentration C_{40} et ce quel que soit le type de réacteur fermé. Finalement, le citrate n'est pas retrouvé dans la solution d'incubation C_0 ni dans le surnageant des sols incubés avec cette dernière.

Enfin, il faut noter que l'oxalate est retrouvé dans les surnageants des conditions C_0 , C_{10} et C_{40} lors du premier jour d'incubation en série (de 5 à 10 μg d'oxalate g^{-1} de sol sec). Puisqu'aucune trace de cet acide organique n'a été détectée dans les solutions d'incubation, il provient certainement du sol. Au deuxième jour, l'oxalate est sorbé – un déficit d'environ 1 μg d'oxalate g^{-1} de sol est observé dans le surnageant – puis de nouveau désorbé dans les jours suivants mais en très faible quantité. Dans les réacteurs fermés continus, de faibles désorptions sont également détectées.

TABLE 14.5: Quantités de citrate et d'oxalate échangées avec le sol dans les réacteurs fermés en mg X g^{-1} de sol sec. Les valeurs positives (en noir) indiquent un échange majoritaire du sol vers la solution d'incubation, et les valeurs négatives (en rouge) un échange majoritaire dans le sens inverse (équation 14.1). La colonne P indique l'apport en phosphore (+ : $100 \mu\text{M}$; - : $1 \mu\text{M}$) et la colonne C indique la concentration en citrate (C_0 : 0 mg l^{-1} ; C_{10} : 10.15 mg l^{-1} et C_{40} : 40.60 mg l^{-1}). Données pour un seul échantillon par condition.

Acide Organique	P	C	Continu	mg X g^{-1} de sol sec					Cumul Série
				Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	
Citrate	+	C_0	0.0008	0.0019	-0.0002	0.0007	-0.0001	0.0000	0.0023
	-	C_0	0.0001	0.0033	-0.0005	0.0002	0.0000	0.0000	0.0030
	+	C_{10}	-0.0363	-0.0201	-0.0378	-0.0367	-0.0305	-0.0239	-0.1489
	-	C_{10}	-0.0336	-0.0300	-0.0336	-0.0313	-0.0271	-0.0295	-0.1514
	+	C_{40}	-0.1268	-0.0648	-0.1155	-0.0936	-0.1069	-0.1078	-0.4886
	-	C_{40}	-0.1428	-0.0899	-0.1211	-0.0990	-0.1066	-0.1025	-0.5191
Oxalate	+	C_0	0.00023	0.00762	-0.00096	0.00070	-0.00008	0.00005	0.00732
	-	C_0	0.00025	0.00808	-0.00121	0.00009	0.00007	-0.00001	0.00702
	+	C_{10}	0.00014	0.01014	-0.00132	0.00021	0.00008	0.00007	0.00918
	-	C_{10}	0.00024	0.00705	-0.00089	0.00010	-0.00002	0.00000	0.00624
	+	C_{40}	0.00015	0.00885	-0.00158	0.00012	0.00006	-0.00001	0.00702
	-	C_{40}	0.00027	0.00500	-0.00048	0.00011	0.00004	-0.00001	0.00466

15 Discussion : réacteurs fermés

D'un point de vue purement technique il est évident que les conditions expérimentales des réacteurs fermés sont relativement éloignées de conditions *in situ*. En premier lieu, la solution d'incubation utilisée est différente de la solution du sol mais ce choix a été dicté par la volonté d'avoir un point de comparaison pour interpréter les données obtenues sur les rhizotests. D'autre part, l'agitation permanente des réacteurs – qui est imposée par le protocole afin d'homogénéiser le système sol/solution – tend à augmenter les surfaces spécifiques qui participent aux échanges et à favoriser l'accès des solutés à de nombreux sites de rétention de l'uranium. Enfin, le ratio solution/sol utilisé ($V/m=5$) est nettement supérieur à ce qui peut être retrouvé dans l'environnement ou dans les rhizotests. D'après nos calculs il aurait fallu travailler avec un volume de solution d'incubation de 8 ml (au lieu de 20) pour 4 g de sol sec pour approcher les conditions des rhizotests et avec 1.4 ml pour atteindre l'humidité du sol de 26 % mesurée sur le terrain. Ces volumes auraient rendu le brassage dans les réacteurs fermés inefficace sur le sol étudié et n'auraient pas permis une récupération satisfaisante du surnageant, une expérience préliminaire nous ayant montré les limites du dispositif avec un rapport V/m de 3. En contrepartie le dispositif de réacteur fermé permet de travailler avec de petits volumes ce qui facilite la multiplication des conditions expérimentales en un minimum de temps comparativement aux expériences avec plantes.

Appréhender la phytodisponibilité d'un élément contenu dans un sol implique de prendre en compte de nombreux facteurs physico-chimiques difficiles à maîtriser. En travaillant avec un sol naturellement riche en uranium (400.5 mg U kg^{-1} de sol sec) il a fallu composer avec ses caractéristiques propres telles que la texture, la granulométrie, la composition chimique, etc. Ce type de sol a toutefois été préféré aux sols contaminés artificiellement ou aux phases porteuses pures qui sont moins représentatifs d'un point de vue environnemental (absence de vieillissement du sol, disponibilité du contaminant potentiellement bien supérieure à la normale, etc.).

Comme cela a déjà été évoqué au paragraphe 4.1.1, les extractions simples sont communément utilisées pour étudier la disponibilité des métaux en ciblant les fractions hydrosoluble et échangeable à l'aide de réactifs tels que le chlorure de magnésium (MgCl_2) ou l'acide acétique (CH_3COOH). D'après les travaux de Vandenhove et collab. (2007a) il existerait d'ailleurs une bonne corrélation entre les quantités d'uranium extraites par ces deux réactifs et les concentrations retrouvées dans les racines et parties aériennes chez le ray-grass (*Lolium perenne*). Nous avons ainsi cherché à déterminer si le citrate est susceptible d'influencer la remobilisation de l'uranium, comme cela peut être observé avec le MgCl_2 ou CH_3COOH . Comme le montrent un certain nombre d'études, le citrate est généralement inclus dans les protocoles d'extractions séquentielles dédiés à l'étude des sédiments, toutefois ces approches n'ont pas pour vocation de discuter de la biodisponibilité. Dans les protocoles de Tessier et collab. (1979) et Punshon et collab. (2003), le citrate est mélangé avec du sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) et du citrate de sodium ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) pour solubiliser les fractions d'éléments métalliques en trace liées aux oxydes de fer et

de manganèse. Au cours de ces extractions « fortes » réalisées en conditions réductrices qui ciblent des fractions « non échangeables », le citrate joue uniquement un rôle de complexant afin d'éviter la reprecipitation des éléments solubilisés par les extractants. Dans la mesure où la concentration en uranium dans notre sol est corrélée à la présence d'oxydes de fer – ce qui suggère une adsorption de l'élément sur les oxy(hydr)oxydes de fer (Pfeifer et collab., 1994) – nous avons supposé que le citrate peut avoir une influence sur la remobilisation du contaminant. En effet, si une partie de l'uranium du sol est effectivement adsorbée sur les oxy(hydr)oxydes alors le citrate suffira à favoriser sa solubilisation. En revanche, si l'uranium est inclus dans la matrice d'oxy(hydr)oxydes alors il ne pourra pas être remobilisé par la solution d'incubation des réacteurs fermés, et des extractions plus fortes telles que décrites ci-dessus seraient nécessaires pour réussir à le faire passer en solution.

L'originalité de la démarche réside dans l'utilisation de deux types d'incubation différents du sol dans des réacteurs fermés. Classiquement, ce dispositif est utilisé sans renouveler la solution d'incubation comme c'est le cas dans les travaux de Lozano et collab. (2011). En testant à la fois ce type de protocole et en mettant en œuvre en parallèle un système de renouvellement complet de la solution toutes les 24 heures, il a été possible d'apporter un certain niveau de dynamisme à notre système qui s'apparente plus aux flux de solution qui se déroulent dans la rhizosphère. En changeant régulièrement la solution d'incubation, les quantités d'uranium déplacées du sol vers la solution ont été récupérées comme cela se pourrait se produire avec des racines qui absorberaient l'intégralité de l'uranium phytodisponible. Ceci nous a donné accès à des informations impossibles à obtenir avec le protocole de réacteur fermé classique.

15.1 Comportement de l'uranium et caractéristiques du sol

De nombreuses études ont cherché à corréliser les valeurs de K_d des métaux avec les caractéristiques des sols. Sauvé et collab. (2000) estiment que la partition des métaux entre sol et solution dans les sols contaminés dépend principalement du pH, de la quantité de métal chargé et de la teneur en matière organique.

En ce qui concerne l'uranium, ce sont plutôt les K_d de sorption qui ont été étudiés. Echevarria et collab. (2001) ont ainsi montré que le pH du sol est le paramètre le plus fortement corrélé avec les valeurs de K_d et qu'il permet la meilleure explication du comportement du radioélément. Néanmoins, une autre étude suggère de s'intéresser également aux contenus en matière organique et/ou en fer amorphe car ces paramètres permettraient une meilleure prédiction du K_d pour des valeurs de pH inférieures à 6 (Vandenhove et collab., 2007c).

Le sol étudié a un pH égal à 4.97 et est riche en matière organique (116 g kg⁻¹) et en fer (10.53 g kg⁻¹ solubilisés par l'oxalate) (tableau 7.3 page 63). Il est donc probable que les teneurs en matière organique et/ou en fer amorphe comptent parmi les paramètres y exerçant un fort contrôle sur le comportement de l'uranium. Sur des sols prélevés sur le même site, Pfeifer et collab. (1994) ont montré que la teneur en uranium ne dépend ni de la granulométrie (teneurs en argile), ni des teneurs en matière organique, mais qu'il existe une forte corrélation entre l'uranium et l'oxyde de fer libre ce qui suggère une adsorption ou plutôt une occlusion de l'élément sur des oxy(hydr)oxydes de fer. De nombreuses études ont d'ailleurs mis en évidence l'importance de ces oxy(hydr)oxydes dans l'adsorption de l'uranium dans les environnements de surface (Hsi et Langmuir, 1985; Waite et collab.,

1994; Duff et Amrhein, 1996; Payne et collab., 1996; Lenhart et Honeyman, 1999). Ces derniers pourraient constituer le principal pôle d'adsorption de l'uranium dans le sol que nous avons étudié, avec une sorption réversible et/ou de capacité limitée comme en témoignent les teneurs élevées des eaux de surface locales et les extractions réalisées en réacteurs fermés (Pfeifer et collab., 1994). Cela reste tout de même à démontrer puisqu'au pH du sol les oxy(hydr)oxydes de fer ont plutôt tendance à être chargés négativement ce qui pourrait réduire leur affinité avec l'uranium.

Par ailleurs, il semble logique de ne pas avoir observé de différences significatives en termes de remobilisation de l'uranium dans les deux conditions de phosphore que nous avons testées (1 et 100 μM). Au pH du sol (4.97), les oxy(hydr)oxydes sont surtout chargés positivement et ont très vraisemblablement fixé les anions et notamment le phosphate ajouté dans le milieu (Hsu, 1964; Parfitt et collab., 1975; Goldberg et Sposito, 1984). C'est en tout cas ce que tendent à montrer les dosages réalisés en chromatographie ionique qui indiquent une perte en éléments dissous pour le phosphate dans toutes les conditions de citrate, dans les deux types de réacteurs fermés et à chaque pas de temps (tableau A.3 page 181). Il ne sera donc pas fait allusion aux différences non significatives entre les conditions $-P$ et $+P$ dans la suite de la discussion.

Étant donnée la capacité d'adsorption du phosphate sur les oxy(hydr)oxydes, i

15.2 Influence du citrate sur la remobilisation de l'uranium

Au cours de l'expérience, il a été démontré que les échanges d'uranium entre sol et solution sont significativement supérieurs dans les surnageants récupérés après le premier jour de contact dans les réacteurs fermés en série par rapport aux quatre autres jours, et également supérieurs à ceux observés dans les réacteurs fermés continus après 5 jours d'incubation (figure 14.1 page 105). Nous avons émis plusieurs hypothèses pour tenter d'expliquer cela et au final il semblerait que la combinaison des différents processus détaillés ci-dessous soit à l'origine des résultats obtenus.

15.2.1 Effet du citrate sur les pools d'uranium échangeable

La première hypothèse permettant d'expliquer l'importante remobilisation d'uranium observée dans les réacteurs fermés en série au jour 1 serait qu'il existe plusieurs stocks d'uranium (ou pools) dans le sol qui se distinguent par leur cinétique d'échange avec la solution d'incubation. Concrètement, cela signifie que ces pools pourraient être échangés plus ou moins « facilement » du sol à la solution et inversement.

L'existence d'un pool rapidement (≥ 24 heures) et facilement échangeable a été démontrée par les calculs de Kd désorption de l'uranium présentés au tableau 14.2 page 108 et notamment par les valeurs significativement plus faibles des Kd au jour 1 des réacteurs fermés en série par rapport aux suivants. Ce pool facilement échangeable est vidé rapidement et sa taille dépend de la concentration en citrate. Sa taille a été estimée à $2.1 \pm 0.2 \mu\text{g U}$ en condition C_0 , à $3.8 \pm 0.7 \mu\text{g U}$ en condition C_{10} et à $8.1 \pm 0.4 \mu\text{g U}$ en condition C_{40} .

Les quantités significativement plus faibles d'uranium échangé aux jours 2 à 5 des réacteurs fermés en série et dans les réacteurs fermés continus (par rapport au jour 1 en série) valident l'existence d'un ou de plusieurs pools d'uranium moins facilement échangeable mais qui permettent une alimentation de la solution à plus long terme puisque

de l'uranium est toujours retrouvé au jour 5 des réacteurs fermés en série. Nos résultats montrent que le citrate n'a pas d'influence sur ce(s) pool(s) puisqu'aucune différence significative n'est observée en termes de quantités d'uranium échangé, globalement de 0.4 à 1.2 $\mu\text{g U}$ par tranche de 24 heures. Cela corrobore les dosages effectués dans les solutions nutritives après chaque contact qui montrent que plus de 98 % du citrate ajouté dans la solution d'incubation des réacteurs fermés n'est pas retrouvée en fin de contact.

Finalement, en partant du postulat que le réacteur fermé en série au jour 1 correspond à une phase initiale ayant existé dans les réacteurs fermés en continu, nous pouvons affirmer que les échanges d'uranium entre sol et solution se font dans les deux sens (solubilisation et sorption et/ou précipitation) puisqu'une disparition en élément dissous est observée entre 24 et 120 heures. Cela signifie que la capacité de remobilisation de l'uranium par le citrate survenant en 24 heures est masquée par les phénomènes de réadsorption et/ou précipitation. Il convient donc de supposer que l'exsudation de citrate dans un sol n'a d'effet que dans le cas où la molécule est produite en permanence afin de maintenir une concentration constante et suffisamment élevée pour pallier à la dégradation microbiologique.

Il semble important de souligner que le temps de 24 heures qui a été évoqué plus haut pour caractériser le pool facilement échangeable est totalement arbitraire puisqu'il est la référence de temps la plus basse dont nous disposons du fait de notre design expérimental.

15.2.2 Désorption rapide d'uranium et « priming effect »

Dans le paragraphe précédent nous avons mis en évidence l'effet du citrate sur les quantités d'uranium remobilisé dans les réacteurs fermés et évoqué l'existence de différents pools d'uranium échangeable. Toutefois les différences significatives d'extraction d'uranium observées entre le premier jour des réacteurs fermés en série et les suivants pourraient avoir être en partie sous contrôle microbiologique.

Selon Jenkinson (1966) et Kuzyakov et collab. (2000), la modification brutale d'un sol produit un renouvellement brusque et intense de la matière organique (décondensation de substances humiques) présente dans le sol qui s'accompagne d'une explosion de l'activité microbiologique elle-même corrélée à la stimulation de la remise en solution de divers constituants du sol tels que les éléments facilement remobilisable en solution. Ce renouvellement brutal, appelé « priming effect », est notamment observé lors de l'ajout de fertilisants organiques ou minéraux (Olayinka, 2001; Leifeld et collab., 2002), en présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (Eschenbach et collab., 1998) et en présence d'une forte activité d'exsudation racinaire (Fu et Cheng, 2002). Cela sous-entend que l'ajout d'eau et de composés chimiques assimilables sur le sol sec au premier jour de l'expérience a pu favoriser la mise en place de ce « priming-effect » et donc conduire à la remise en solution d'une partie de l'uranium fixé sur le sol. La quantité d'uranium remobilisé au jour 1 en C_0 ($2.1 \pm 0.2 \mu\text{g U}$) significativement supérieure aux jours 2 à 5 (en moyenne $0.6 \pm 0.2 \mu\text{g U}$) pourrait en être la manifestation. La présence supplémentaire de citrate dans les solutions en C_{10} et C_{40} pourrait avoir eu un effet stimulant sur ce « priming-effect » puisque cette molécule est métabolisée par les microorganismes pour produire de l'énergie.

L'oxalate retrouvé en grande quantité dans tous les surnageants au premier jour des réacteurs fermés en série est un signe qui semble indiquer la présence d'une activité microbiologique dans les réacteurs fermés puisque ce composé ne figure pas dans la composition de la solution d'incubation. De la même manière la disparition complète du citrate ajouté *via* la solution à partir du deuxième jour des réacteurs fermés en série et dans les réacteurs fermés en continu suggère le développement d'une activité biologique intense qui aurait

atteint son rendement maximal en termes de métabolisme du citrate à partir du deuxième jour (37 % du citrate ajouté est récupéré après 24 heures de contact contre moins de 1 % les jours suivants).

15.2.3 L'extraction d'uranium gouvernée par l'état physique du sol

Les fortes désorptions d'uranium observées au premier jour des réacteurs fermés en série peuvent trouver leur explication dans l'existence d'un pool d'uranium accessible en moins de 24 heures – dont la taille serait influencée par la présence de citrate – et/ou par le relargage intense d'uranium dû à l'imbibition de la matière organique accompagné par une explosion de l'activité microbiologique dans le sol. Plus classiquement, les caractéristiques physico-chimiques de ce dernier ont pu avoir une influence sur la remobilisation de l'uranium mise en évidence.

Ainsi, si l'on tient compte du fait que le sol déposé dans les réacteurs fermés au jour 1 a subi un certain nombre de traitements (séchage, homogénéisation et tamisage), il n'est pas incongru de supposer que ces derniers ont eu pour effet de modifier sa structure et d'augmenter sa surface spécifique ce qui a pu, *in fine*, favoriser l'accès de la solution d'incubation aux sites sur lesquels l'uranium est adsorbé. Nos observations abondent dans ce sens puisque la forte remobilisation d'uranium détectée au jour 1 est suivie d'une diminution importante qui pourrait coïncider avec le fait que le sol, à partir du jour 2, n'est plus sujet à une modification de son état physique : le protocole de renouvellement de la solution d'incubation – impliquant une centrifugation – ne permet pas de retirer l'intégralité de l'eau des réacteurs fermés ce qui laisse en permanence le sol à un niveau d'humidité relative proche de 50 %.

15.3 Bilan et perspectives

En guise de bilan, il convient de souligner que les résultats obtenus au cours de cette expérience en réacteur fermé nous permettent d'apporter des éléments de réponse relatifs au comportement de l'uranium dans ce sol et au rôle que peut avoir le citrate sur la remobilisation de l'élément dans la solution. Toutefois, les données que nous avons obtenues ne nous permettent pas de donner une interprétation unique des phénomènes se produisant dans les différents réacteurs fermés.

La première chose à retenir est que les quantités d'uranium remobilisable en solution sont relativement faibles. Après 5 jours de contact entre sol et solution, seulement 1.7 μg U a pu être extrait du sol dans les réacteurs fermés en continu soit 0.1 % de l'uranium total présent dans le sol. Comme nous l'avons vu tout au long de cette partie, les réacteurs fermés en série présentent une meilleure efficacité en termes d'extraction toutefois cela reste très limité à l'échelle du sol dans la mesure où seulement 4.6, 6.0 et 10.1 μg U sont récupérés dans les réacteurs fermés en série, respectivement en condition C_0 , C_{10} et C_{40} , ce qui correspond à 0.3 %, 0.4 % et 0.6 % de l'uranium total. Sur ce type de réacteurs fermés, le premier contact de 24 heures est en grande partie responsable de la différence observée entre réacteur fermé en continu et réacteur fermé en série dans la mesure où 46 %, 64 % et 80 % de l'uranium total qui est extrait l'est dans ce laps de temps, respectivement en C_0 , C_{10} et C_{40} .

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette différence marquante :

- un effet de la réimbibition du sol sec au premier jour de l'expérience ;

- un effet de la remise en solution brutale de matière organique accompagnée d'une explosion de l'activité microbiologique ;
- un effet du citrate sur la taille du pool d'uranium facilement accessible.

Dans l'état actuel des choses il ne nous paraît pas possible de distinguer quantitativement l'effet de ces trois phénomènes qui se sont déroulés dans les réacteurs fermés. Il existe bien une différence de remobilisation d'uranium entre les conditions C_0 et les conditions C_{10} et C_{40} et il serait tentant de conclure que l'effet citrate correspond à la différence entre les résultats obtenus en C_{10}/C_0 et C_{40}/C_0 . Néanmoins la composante microbiologique a très certainement été stimulée en présence de cet acide organique et est donc sans doute en partie responsable de ce que l'on pourrait, à tort, considéré comme l'effet citrate.

Malgré le fait qu'une activité microbiologique ait pu se mettre en place dès le premier jour et même si elle a pu favoriser la dégradation du citrate – le temps de demi-vie des principaux acides organiques dans un sol non-rhizosphérique est estimé à 2 ou 3 heures (Jones et Darrah, 1994; Jones et collab., 1996b) – l'influence de l'acide organique sur la remobilisation de l'uranium au premier jour des réacteurs fermés ne peut pas être complètement remise en cause dans la mesure où une différence est bien observée entre les conditions C_0 , C_{10} et C_{40} . Il n'est en revanche pas étonnant de ne pas observer d'effet citrate aux jours suivants puisque ce dernier disparaît complètement de la solution et a très vraisemblablement été dégradé. Afin de déterminer la part éventuelle de cette activité microbienne ainsi que de la réimbibition du sol, il serait intéressant de reproduire le début de la manipulation en réacteur fermé sur le même sol préalablement réhumidifié – environ une semaine au même taux d'humidité que lors de son prélèvement – ou fraîchement prélevé. Une autre solution pourrait consister à stériliser le sol avant de démarrer le contact entre sol et solution. Dans ce cas, il faudrait admettre le fait que l'on ajoute une composante supplémentaire différenciant le sol étudié du sol originel.

Pour terminer, nous estimons que cette étude pourrait gagner en précision en s'intéressant à la spéciation de l'uranium et du citrate dans le milieu. Il aurait pour cela fallu obtenir plus de résultats en termes de composition chimique des solutions d'incubation (manque de réplicats pour les anions, données manquantes pour certains éléments, absence de réel schéma « comportemental » dans le milieu entre les différents temps observés) ce qui nous aurait permis de réaliser des simulations à l'aide de CHESS. Il semblerait toutefois que le comportement de l'uranium dans un sol soit régi par la formation du complexe U-citrate, un complexe organique transitoire dont la photo- et la biodégradation aboutissent à la formation d'un composé insoluble non lessivable d'uranium trioxyde ($UO_3 \cdot 2H_2O$) (Francis et collab., 1992; Dodge et Francis, 1994). Étant donnée l'évolution de la concentration en citrate au fil des jours, nous sommes en droit de supposer que ce phénomène de précipitation a pu se produire dans les réacteurs fermés, de manière plus importante à partir du second jour au cours duquel plus de 99 % de citrate disparaît du milieu.

PARTIE VI

**Phytodisponibilité de l'uranium
chez le lupin blanc mesurée sur
rhizotest**

Dans les chapitres précédents le système sol/plante a été abordé de manière découplée. Dans un premier temps nous avons focalisé notre attention sur le système racines/solution et chercher à comprendre de quelle manière le lupin blanc répond au stress lié à la présence d'uranium en termes d'exsudation racinaire. Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés au système sol/solution et avons utilisé les connaissances acquises en hydroponie pour comprendre le comportement de l'uranium dans le sol et apporter la preuve que les quantités de citrate que le lupin est capable d'exsuder peuvent avoir un effet sur la disponibilité de l'uranium dans le sol. Pour terminer cette étude, l'objectif de cette dernière partie est de travailler sur le système sol/plante dans son ensemble et plus précisément de nous placer à l'échelle du sol rhizosphérique qui constitue le lieu d'échange privilégié entre sol et racines. À partir du protocole décrit au paragraphe 10 page 71 nous avons voulu placer le lupin blanc dans des conditions favorisant l'expression de différents niveaux d'exsudation de citrate afin de voir si les conclusions tirées des résultats obtenus en hydroponie et en réacteur fermé – système sol/plante découplé – sont en adéquation avec ce qui est observé sur le système pris dans son intégralité.

La partie est scindée en deux chapitres :

- le chapitre 16 détaille le développement du lupin blanc sur rhizotest (production de biomasse et évolution du tapis racinaire), l'exsudation racinaire (citrate et autres acides organiques) et l'accumulation d'uranium et d'autres éléments (racines et parties aériennes) ;
- le chapitre 17 discute des résultats obtenus au cours de l'expérience et s'attarde sur l'absence d'observation de carence en phosphore, sur la stimulation de l'exsudation par le tapis racinaire mis en contact avec le sol et sur l'accumulation d'uranium dans la plante.

16 Résultats : rhizotests

16.1 Croissance et développement du lupin blanc sur rhizotest

16.1.1 Production et allocation de la biomasse

La figure 16.1 ci-dessous décrit l'évolution de la production de feuilles chez le lupin blanc. Celle-ci est constante tout au long de la période de préculture ce qui signifie que les plantes sont toujours en phase de croissance lorsque le tapis racinaire est mis en contact avec le sol au 38^e jour. Aucune différence n'est observée entre les plantes cultivées en milieu déficient -P (1 μM) et les plantes cultivées en milieu adéquat +P (100 μM), il n'est donc pas possible de déterminer si les plantes en -P sont effectivement mises en carence en phosphore en s'intéressant à ce paramètre physiologique. La mise en contact des tapis racinaire avec le sol entre le 38^e et le 43^e jour de l'expérience n'a pas d'effet sur le rythme de production de feuilles (aucune variation de la courbe de croissance). Il en résulte donc que le contact avec le sol contaminé en uranium n'a pas influencé le développement foliaire.

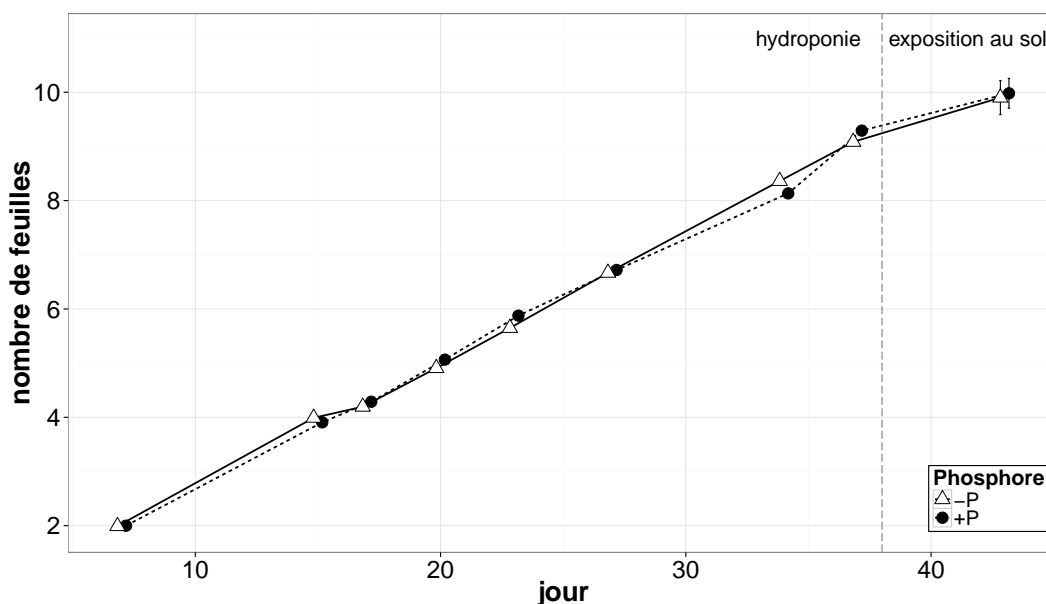


FIGURE 16.1: Production de feuilles chez le lupin blanc pré-cultivé en hydroponie (jusqu'au 38^e jour) puis exposé au sol naturellement riche en uranium sur rhizotest (du 38^e au 43^e jour). Les individus cultivés en condition +P et -P sont représentés par des ronds noirs et des triangles blancs respectivement. Les jours sont indiqués à partir de l'initiation de la germination.

Tout au long de la période de culture, les parties aériennes ont conservé un aspect identique quelle que soit la concentration de phosphore apporté dans le milieu. Aucun

symptôme spécifique de la carence en phosphore – diminution de la croissance, coloration violacée des feuilles – n'a été détecté sur les parties aériennes (figure 16.2 ci-dessous).



FIGURE 16.2: Photographies des parties aériennes du lupin blanc cultivé sur rhizotest 34 jours après initiation – donc toujours en hydroponie à ce stade – de la germination en conditions +P (à gauche) et -P (à droite).

La production de biomasse (racines, parties aériennes et totale) a également été mesurée sur tous les rhizotests utilisés au cours de l'expérience, avant et après contact avec le sol. Les données relatives à cela sont regroupées dans le graphique 16.3 ci-contre.

À la fin de la période de préculture et avant la mise en contact avec le sol (38^e jour), aucune différence significative n'a pu être observée en termes de production de biomasse entre les plantes cultivées sur milieu adéquat (+P) et sur milieu déficient (-P). Respectivement en -P et +P, la production de biomasse racinaire atteint $0.423 \text{ g} \pm 0.010$ et $0.394 \text{ g} \pm 0.020$ (figure 16.3a ci-contre), la production de biomasse aérienne atteint $1.822 \text{ g} \pm 0.030$ et $1.740 \text{ g} \pm 0.100$ (figure 16.3b ci-contre), ce qui donne au total des masses de $2.246 \text{ g} \pm 0.030$ et $2.133 \text{ g} \pm 0.100$ (figure 16.3c ci-contre). De fait, les ratios de biomasse racinaire sur biomasse aérienne sont eux aussi similaires et valent 0.233 ± 0.004 et 0.227 ± 0.008 respectivement en conditions -P et +P (figure 16.3d ci-contre).

Au 43^e jour, après 5 jours de contact avec le sol, la production de biomasse semble avoir augmenté très légèrement néanmoins les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative. Respectivement en -P et +P, la production de biomasse racinaire atteint $0.467 \text{ g} \pm 0.020$ et $0.479 \text{ g} \pm 0.020$ (figure 16.3a ci-contre), la production de biomasse aérienne atteint $1.989 \text{ g} \pm 0.050$ et $1.886 \text{ g} \pm 0.090$ (figure 16.3b ci-contre), ce qui donne au total des masses moyennes de $2.456 \text{ g} \pm 0.070$ et $2.365 \text{ g} \pm 0.100$ (figure 16.3c ci-contre). Les ratios de biomasse racinaire sur biomasse aérienne calculés sont par conséquent semblables et valent 0.235 ± 0.005 et 0.255 ± 0.008 respectivement en conditions -P et +P (figure 16.3d ci-contre).

16.1.2 Évolution du tapis racinaire et apparition des racines protéoïdes

À partir du 10^e jour de préculture, l'aspect des racines des plantes cultivées sur les deux types de milieux a commencé à diverger. Comme le montre la figure 16.4 page 128, chez les plantes cultivées en condition -P, les racines qui se sont développées étaient à la fois plus fines et plus nombreuses que chez les plantes cultivées en condition +P.

Au cours du développement du tapis racinaire, l'apparition de racines protéoïdes a pu être mise en évidence chez tous les individus et ce quel que soit l'apport en phosphore. Cependant, le design expérimental (rhizotest) utilisé n'a pas permis de réaliser un suivi précis de leur développement et il n'a donc pas été possible de déterminer avec précision leur

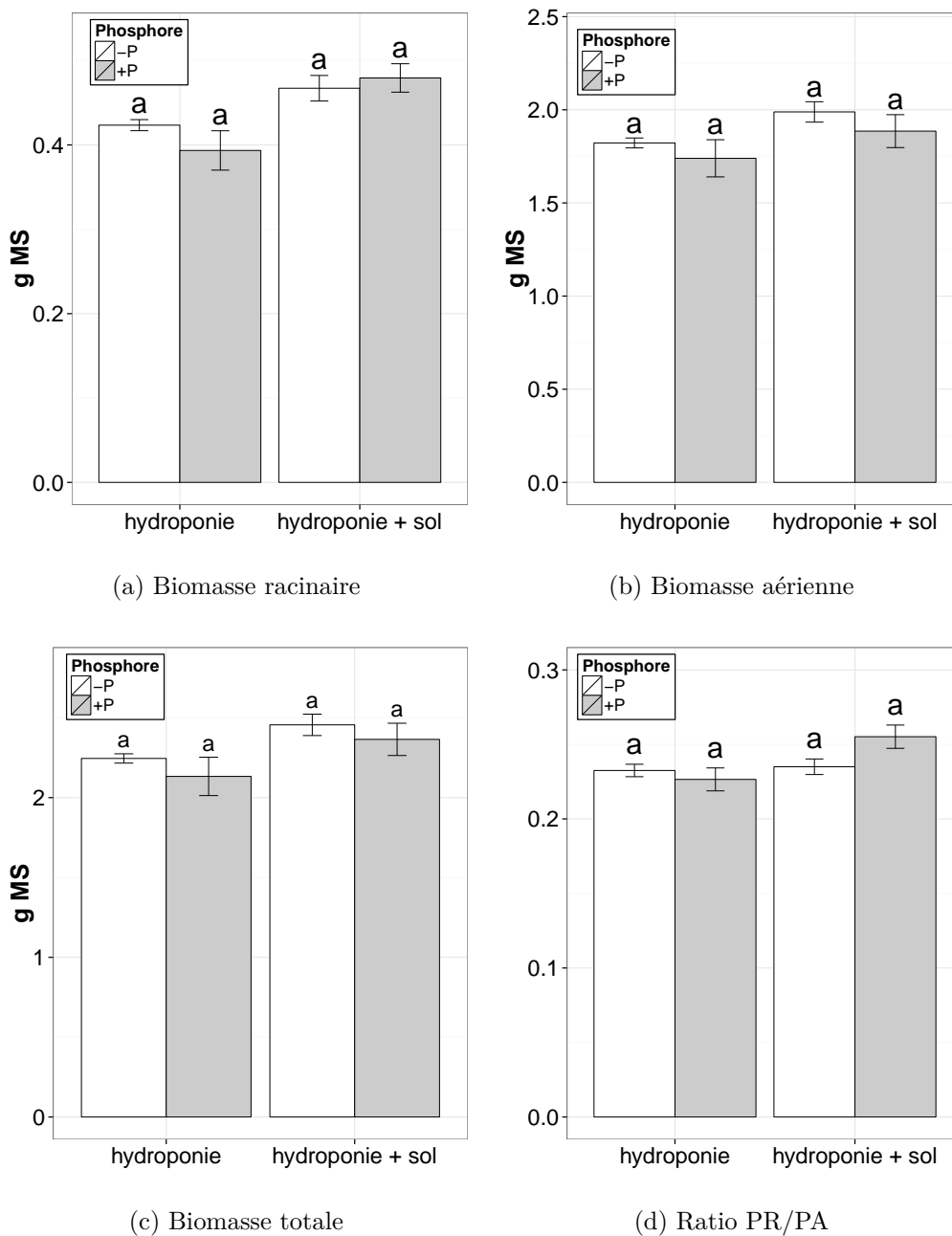


FIGURE 16.3: Production de biomasse racinaire (a), aérienne (b), totale (c) et ratio de biomasse aérienne sur racinaire noté PR/PA (d). Moyenne \pm erreur-standard. Les différentes lettres représentent des groupes significativement différents ($P < 0.05$). En abscisse, « hydroponie » correspond à la fin de la phase de pré-culture (38 jours) et « hydroponie + sol » à la fin du contact entre tapis racinaire et sol (43 jours).

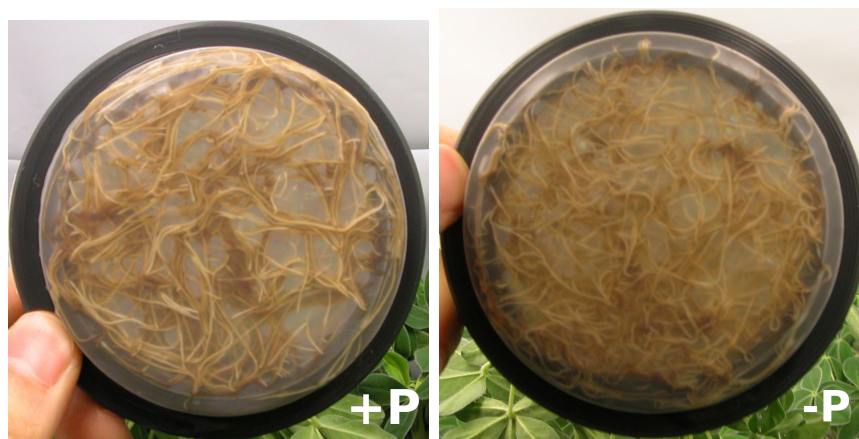


FIGURE 16.4: Aspect des tapis racinaires du lupin blanc obtenus en conditions +P (à gauche) et -P (à droite) 27 jours après initiation de la germination.

date d'apparition ni de les quantifier comme cela a pu être fait dans les expérimentations en hydroponie.

Afin de travailler dans des conditions standardisées et pour faciliter l'interprétation des résultats, il est nécessaire d'optimiser la surface de contact entre la couche de sol mince et les racines jusqu'à ce que celle-ci atteigne 100 % de la surface de la grille du rhizotest. Ce paramètre conditionne l'absorption de la solution qui transite au travers du sol des rhizotests et des éléments qu'elle contient, et donc, potentiellement de l'uranium qui pourrait être remobilisé. Dans les conditions expérimentales de l'étude, 30 à 35 jours de préculture en -P et +P ont été nécessaires pour remplir cette condition. Afin de s'assurer que le tapis racinaire obtenu est également homogène en terme d'épaisseur – malgré le fait que cet aspect ne soit que secondaire puisqu'il n'influence pas sur la surface d'absorption efficace – le début du contact entre sol et racines a été fixé 7 jours plus tard, soit au 38^e jour après initiation de la germination.

En parallèle aux rhizotests placés en contact avec le sol au 38^e jour, d'autres dispositifs ont été conservés en hydroponie pendant les 5 jours d'exposition à titre de contrôle externe. Une dégradation très rapide de la morphologie de ces individus a été observée en fin d'expérience ce qui est vraisemblablement dû à l'absence de bullage de la solution nutritive (nécessaire en hydroponie avec cette espèce). En effet, la taille et la forme des pots dans lesquelles ils ont été conservés – séparément afin de disposer de vrais répliqués – n'a pas permis de maintenir le dispositif d'aération mis en place dans les bacs lors de la phase de préculture. Ces individus n'ont, par conséquent, pas pu être exploités.

16.2 Flux de solution nutritive au travers des rhizotests

Le flux de solution traversant le sol des rhizotests – donc la quantité de solution (évapo)transpirée par les plantes – qui a été estimé pendant l'exposition montrent certaines tendances. En condition -P, le flux diminue au cours des 5 jours d'exposition, il passe de 1.92 g de solution h⁻¹ (± 0.13) au jour 1 à 1.17 g de solution h⁻¹ (± 0.11) au jour 5. En condition +P en revanche, le flux montre une très légère tendance à l'augmentation, il passe en effet de 1.30 g de solution h⁻¹ (± 0.06) au jour 1 à 1.45 g de solution h⁻¹ (± 0.11) au jour 5 (figure 16.5 ci-contre). Au final, malgré des profils différents selon les conditions en phosphore, les quantités totales d'eau (évapo)transpirées au cours des 5

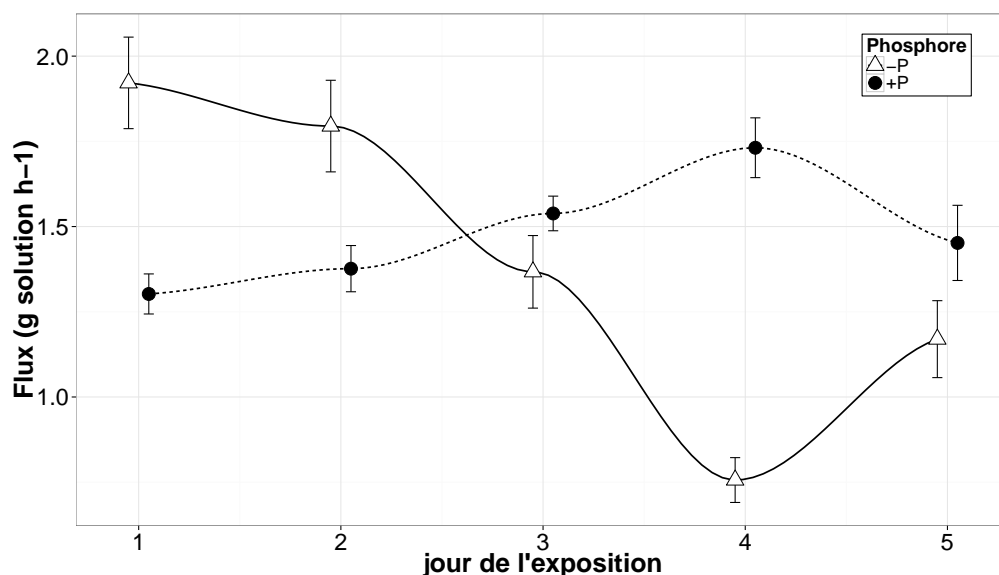


FIGURE 16.5: Flux de solution (évapo)transpirée dans les rhizotests. Ces valeurs ont été obtenues par différence de masse entre chaque renouvellement de la solution nutritive. Des rhizotests témoins sans plante ont permis de tenir compte de l'évaporation naturelle. Moyenne \pm erreur-standard.

jours de contact ne sont pas différentes, en moyenne $175 \text{ g de solution h}^{-1}$ (± 26) en -P et $169 \text{ g de solution h}^{-1}$ (± 9.5).

16.3 Exsudation racinaire

16.3.1 Exsudation de citrate

L'exsudation de citrate a été mesurée sur chaque unité expérimentale pendant 3 heures en fin de période de préculture et après les 5 jours de contact entre le tapis racinaire et le sol. Les données sont présentées à la figure 16.6 page 130.

Au 38^e jour, l'exsudation moyenne de citrate par les racines du lupin blanc est plus faible en condition +P qu'en condition -P. Chez les plantes cultivées en présence de quantité adéquate de phosphore ($100 \mu\text{M}$), l'exsudation moyenne de citrate vaut $29 \text{ nmol de citrate g}^{-1}$ de racines h^{-1} (± 8) alors qu'elle atteint $52 \text{ nmol de citrate g}^{-1}$ de racines h^{-1} (± 22) chez les plantes précultivées dans un milieu carencé en phosphore ($1 \mu\text{M}$). Cependant, les variations importantes relevées entre les différents rhizotests de chaque condition ne permettent pas de différencier statistiquement les deux groupes.

Après exposition au sol, les niveaux d'exsudation moyens de citrate ont augmenté par rapport à ceux mesurés lorsque les plantes ont été retirées de la préculture en hydroponie ce qui sous-entend que le contact avec le sol a stimulé l'activité racinaire. Chez les plantes cultivées en -P, l'augmentation par rapport aux témoins ne présente qu'une tendance à la hausse avec un niveau d'exsudation de $93 \text{ nmol de citrate g}^{-1}$ de racines h^{-1} (± 20). Malgré un niveau d'exsudation qui a triplé par rapport aux témoins, les valeurs extrêmes ne permettent pas de différencier les groupes statistiquement. En revanche, chez les plantes précultivées en milieu non carencé en phosphore qui ont été en contact avec le sol, l'augmentation de l'exsudation de citrate mise en évidence est bien significative. Elle est quasiment multipliée par quatre – par rapport aux contrôles +P au 38^e jour – après 5 jours de contact avec le sol et atteint $193 \text{ nmol de citrate g}^{-1}$ de racines h^{-1} (± 45).

Ce niveau d'exsudation est également significativement supérieur aux valeurs obtenues sur les rhizotests mis en contact avec le sol en condition -P. Le traitement des données d'exsudation en terme de flux arrivant sur le sol d'un rhizotest (en nmol de citrate par rhizotest h^{-1}) et donc en tenant compte de la production de biomasse racinaire n'apporte pas d'informations supplémentaires (les données sont néanmoins disponibles en annexe dans le tableau A.5 page 183).

16.3.2 Exsudation d'autres composés

Les anions majeurs (chlorure, nitrate, phosphate et sulfate) ont également été détectés et quantifiés dans les solutions d'exsudats racinaires. Cependant leur dynamique d'exsudation ne montre pas de tendance particulière, les données ne seront donc pas décrites en détail. Les données sont disponibles en annexe dans le tableau A.6 page 184.

En plus du citrate, les analyses ont permis de mesurer les flux et les exsudations d'autres acides organiques tels que l'acétate, le formate, le lactate et l'oxalate. Comme pour les anions majeurs, les résultats sont très hétérogènes et ne permettent pas de tirer de conclusion particulière quant à leur dynamique d'exsudation. Les données complètes sont également disponibles en annexe dans le tableau A.4 page 182. La seule indication donnée par ces résultats concerne l'oxalate. Comme pour le citrate, son niveau d'exsudation est très variable toutefois une différence significative a pu être observée avant et après le contact avec le sol. En effet, en fin de période de préculture (38^e jour), tous les individus n'exsudent pas ce composé notamment en condition -P dans laquelle la moyenne mesurée est de $5.0 \text{ nmol d'oxalate g}^{-1} \text{ de racines h}^{-1} \pm 15.1$ (valeurs négatives). En condition +P, la moyenne n'excède pas $23.8 \text{ nmol d'oxalate g}^{-1} \text{ de racines h}^{-1} \pm 7.9$. En revanche, une nette augmentation de l'exsudation est détectée après contact avec le sol (42^e jour) mais il n'est pas possible de distinguer les deux groupes -P et +P qui présentent des valeurs respectives de $172.4 \text{ nmol d'oxalate g}^{-1} \text{ de racines h}^{-1} \pm 38.7$ et de $192.6 \text{ nmol d'oxalate g}^{-1} \text{ de racines h}^{-1} \pm 50.3$.

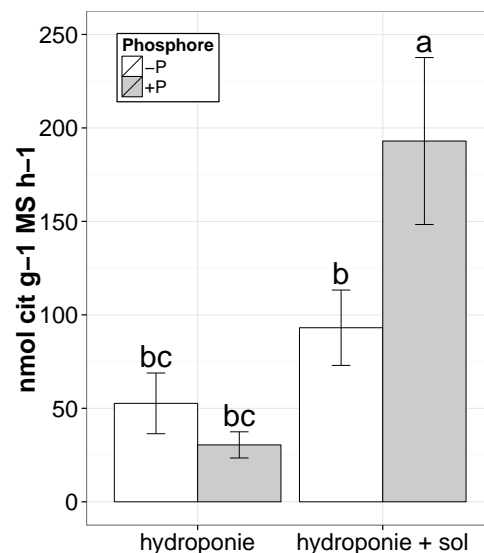


FIGURE 16.6: Exsudation racinaire de citrate mesurée avant et après exposition aux sols. Moyenne \pm erreur-standard. Les différentes lettres représentent les différences significatives ($P < 0, 1$). En abscisse, « hydroponie » correspond à la fin de la phase de pré-culture (38 jours) et « hydroponie + sol » à la fin du contact entre tapis racinaire et sol (43 jours).

16.4 Accumulation et allocation de l'uranium dans les plantes

16.4.1 Accumulation dans les racines

En phase de culture en hydroponie, les lupins blancs ont accumulé de très faibles quantités d'uranium dans leurs racines. Avant contact avec le sol, les racines en condition +P ont accumulé en moyenne $1.574 \times 10^{-4} \pm 0.460$ mg U g⁻¹. En condition -P les quantités d'uranium retrouvées dans les racines après minéralisation et dosage sont identiques aux valeurs des blancs de minéralisation et ont donc été considérées comme nulles (figure 16.7a page 132). La différence significative observée entre les conditions -P et +P avant contact avec le sol laisse supposer que l'uranium provient des sels de phosphore. Le fait de n'avoir pas retrouvé de trace d'uranium dans un échantillon de graines qui a été minéralisé au cours d'un test préliminaire semble conforter cette hypothèse (données non présentées).

Comme le montrent le graphique de la figure 16.7b page 132, l'exposition des tapis racinaires au sol riche en uranium a conduit à une accumulation du radionucléide. En effet, après les 5 jours de contact avec le sol, les teneurs retrouvées dans les racines sont significativement supérieures aux teneurs retrouvées chez les témoins qui sont restés en hydroponie. Les accumulations d'uranium mesurées en -P et +P ne sont toutefois pas significativement différentes et ne semblent donc pas dépendre de l'apport de phosphore dans le milieu *via* la solution nutritive. Les tapis racinaires ont accumulé $1.957 \times 10^{-2} \pm 0.078$ mg U g⁻¹ en condition -P et $1.774 \times 10^{-2} \pm 0.112$ mg U g⁻¹ en condition +P.

16.4.2 Accumulation dans les parties aériennes

De l'uranium a également été retrouvé dans les parties aériennes en fin de préculture (figure 16.7b page 132). Les quantités mesurées sont très faibles, en moyenne $3.8 \times 10^{-6} \pm 1.8$ mg U g⁻¹ et $7.9 \times 10^{-6} \pm 4.6$ mg U g⁻¹ respectivement en condition -P et +P. Une légère tendance peut être mise en évidence statistiquement, les plantes cultivées en présence d'un apport suffisant en phosphore tendent en effet à contenir plus d'uranium dans leurs parties aériennes. Ici encore, cela est peut être dû à la présence d'impuretés dans les sels de phosphore.

Après l'exposition au sol, les quantités d'uranium retrouvées dans les parties aériennes augmentent dans les deux conditions ce qui traduit un transfert à partir du système racinaire. En condition -P, la concentration d'uranium vaut $1.7 \times 10^{-5} \pm 0.4$ mg U g⁻¹ soit 4 fois plus qu'avant l'exposition. En condition +P, la concentration d'uranium est multipliée par 8 à la fin des 5 jours de contact et atteint $6.6 \times 10^{-5} \pm 1.5$ mg U g⁻¹.

L'observation de l'accumulation à l'échelle de l'organisme entier n'apporte pas d'information supplémentaire (figure 16.7c page 132). Elle confirme simplement le fait que la majorité de l'uranium qui est extrait du sol est stockée dans les racines. La différence d'accumulation significative observée dans les parties aériennes ne représente qu'une infime part de l'accumulation et ne change rien au bilan final.

16.4.3 Transfert de l'uranium des racines aux parties aériennes

Calculé à partir des valeurs moyennes d'accumulation, le ratio de la quantité d'uranium accumulé dans les parties aériennes sur celle des parties racinaires (PA/PR) est significativement différent selon le niveau d'apport de phosphore par la solution nutritive

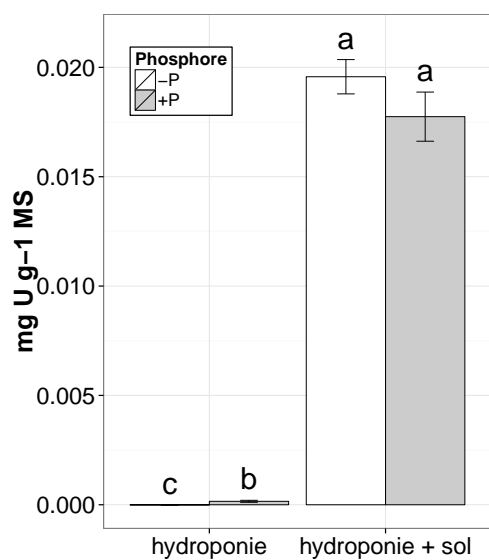
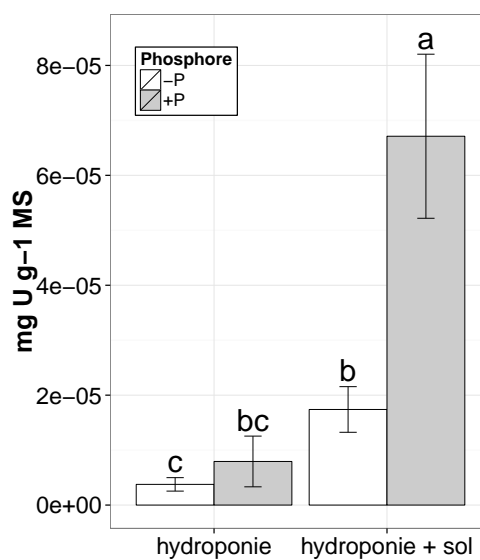
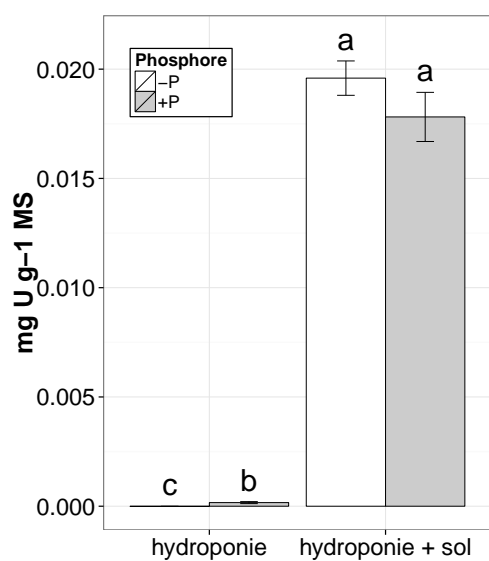
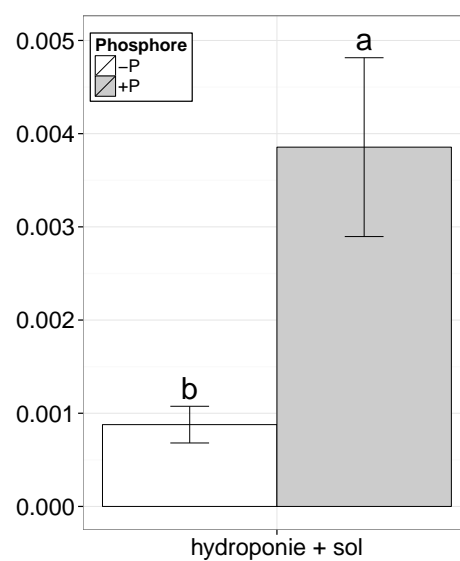
(a) Racines ($P < 0,001$)(b) Parties aériennes ($P < 0,05$)(c) Totale ($P < 0,001$)(d) Ratio PA/PR ($P < 0,01$)

FIGURE 16.7: Accumulation d'uranium dans les tissus végétaux. Moyenne \pm erreur-standard. Les différentes lettres représentent les différences significatives.

(figure 16.7d ci-contre). En fin d'expérience, ce ratio vaut respectivement 0.8×10^{-3} et 3.9×10^{-3} en condition -P et +P.

16.4.4 Accumulation d'autres éléments

En plus de l'uranium, l'accumulation de cations majeurs tels que le calcium (Ca), le fer (Fe), le magnésium (Mg), le potassium (K) et le sodium (Na) a été mesurée sur les échantillons de racines et de parties aériennes avant et après l'exposition au sol. Nos données n'indiquent pas l'existence d'accumulation imputable à un transfert du sol vers les plantes (données présentées en annexe au tableau A.7 page 185). Dans la mesure où il n'existe pas de différence significative en termes d'accumulation de cations avant et après le contact, il est probable que la majorité des éléments retrouvés dans les plantes provient de la solution nutritive.

17 Discussion : rhizotests

Après avoir démontré l'effet stimulant de la présence d'uranium sur l'exsudation de citrate chez des lupins blancs non carencés en phosphore en hydroponie et après avoir mis en évidence la capacité de remobilisation de l'uranium par cet acide organique en réacteurs fermés, nous avons cherché à déterminer si cette espèce – par le biais de son exsudation racinaire de citrate – pouvait avoir un effet sur la phytodisponibilité de l'uranium dans le sol étudié. Nous avons utilisé un dispositif expérimental permettant de travailler sur le système sol/solution/racine développé spécifiquement pour les études s'intéressant à la compréhension des transferts des éléments minéraux du sol aux plantes au niveau de la rhizosphère, la fraction du sol sous l'influence des racines et des microorganismes (Chaignon et Hinsinger, 2003). Au cours de cette expérience, nous avons voulu placer le lupin blanc dans des conditions de culture censées favoriser la mise en place d'une carence en phosphore, une condition *sine qua non* pour stimuler le développement de racines protéoïdes et l'exsudation de citrate chez notre espèce modèle (Dinkelaker et collab., 1989, 1995; Neumann et collab., 1999, 2000; Shen et collab., 2005). Cette dernière expérience a été réalisée dans le but de déterminer s'il existe une cohérence entre les observations faites en réacteur fermé, les observations faites en hydroponie et ce qu'il se passe effectivement lorsque la plante pousse en présence de son substrat. La discussion qui suit aura donc pour vocation de faire le lien entre les résultats obtenus au cours de l'expérience en rhizotests et les résultats décrits dans les parties IV et V de ce manuscrit.

17.1 Quel bilan tirer de l'expérience en rhizotest ?

17.1.1 Le rhizotest ne permet pas d'observer de signes extérieurs de carence chez le lupin blanc

Au cours de l'expérience, le développement du lupin blanc a été observé sous différents traits phénotypiques afin de détecter l'apparition de symptômes traduisant l'apparition de la carence en phosphore tels que le changement de la coloration des feuilles (Hopkins et Hüner, 2008), l'augmentation du ratio de biomasse racinaire sur biomasse aérienne (Ericsson, 1995) ou encore le développement de racines protéoïdes (Johnson et collab., 1996b).

En premier lieu, nous n'avons pas observé de différence significative en ce qui concerne la production de feuilles, que ce soit pendant la phase de préculture ou après le contact entre tapis racinaire et sol. Sur le rhizotest, le lupin blanc produit des feuilles régulièrement pour atteindre un nombre moyen de 10 feuilles par plante au 43^e jour et ce quel que soit le niveau de phosphore apporté *via* la solution nutritive. À titre de comparaison, au même stade de développement en hydroponie une différence nette pouvait être observée entre les plantes carencées et non carencées qui possédaient respectivement 8 et 16 feuilles en moyenne.

La production de biomasse – racinaire, aérienne et totale – n’est pas plus affectée par le manque de phosphore que la production de feuilles puisqu’encore une fois les valeurs retrouvées en condition +P et -P sont similaires avec une production de biomasse totale légèrement supérieure à 2 g sur chaque rhizotest comprenant chacun 6 plantes (soit en moyenne 0.3 g par plante). Encore une fois, ce caractère était très nettement influencé par la concentration en phosphore de la solution nutritive en hydroponie dans la mesure où en fin d’expérience les plantes carencées présentaient une biomasse totale avoisinant les 1.2 g contre plus de 2 g pour les plantes non carencées. Les observations réalisées au cours de cette expérience en hydroponie nous avaient également montré que la carence en phosphore – en plus d’avoir un effet sur la production de biomasse totale – provoquait une réallocation de la production vers le système racinaire (ratio biomasse racinaire/biomasse aérienne égal à 0.4 en +P et à 0.7 en -P) ce qui n’est pas du tout observé sur les rhizotests. Au contraire, les ratios estimés à 0.2 supposent un développement beaucoup plus important des parties aériennes.

Au final, le seul paramètre ayant attiré au développement qui pourrait avoir été influencé dans les rhizotests par la concentration en phosphore est la morphologie racinaire. En effet, à partir du 10^e jour de culture les racines des plantes poussant en présence de faibles quantités de phosphore cessent de grossir, elles restent fines et leur quantité semble augmenter par rapport aux racines +P dont le diamètre nous apparaît plus grand. Cela reste toutefois très descriptif et il aurait fallu avoir recours à des méthodes de mesures plus précises pour valider ces observations (utilisation du logiciel WinRHIZO (Arsenault et collab., 1995) par exemple). Nous avons également observé le développement de racines protéoides dans les deux conditions +P et -P sans être en mesure de réaliser un suivi précis, toutefois leur nombre semble dérisoire par rapport à la centaine de clusters comptabilisés chez les plantes carencées en hydroponie.

Comme nous venons de le voir, malgré notre volonté d’instaurer une carence en phosphore en jouant sur la concentration apportée par la solution nutritive, les signes de développement extérieur du lupin blanc n’abondent pas dans ce sens et au contraire aucun symptôme corrélé à cet état physiologique n’a pu être mis en évidence dans cette expérience sur rhizotests. Comme cela a été démontré en hydroponie dans la partie IV de ce manuscrit ainsi que dans des études plus anciennes (Neumann et collab., 1999; Wang et collab., 2007), il n’est pas nécessaire d’attendre 38 jours pour que le lupin blanc présente les caractéristiques d’une plante en manque de phosphore qui apparaissent plus conventionnellement entre le 15^e et le 20^e jour après l’initiation de la germination. Dans la mesure où les racines sont contraintes par le volume restreint entre la toile et la grille du dispositif, nous supposons que le rhizotest a induit un stress physique important qui a pu favoriser la mise en place d’une compétition pour l’espace entre les racines et limiter ainsi leur expansion. Cela est d’ailleurs suggéré par le très faible ratio de biomasse racinaire sur biomasse aérienne calculé en comparaison de celui observé chez les plantes en hydroponie qui disposaient d’un espace suffisant pour se développer. En réaction aux différents stress subis, les plantes cultivées en condition -P ont pu combiner différents mécanismes – activation de transporteurs de forte affinité, hausse de l’activité biochimique optimisant l’utilisation des réserves internes, etc. – permettant l’exploitation maximum du peu de phosphore disponible dans leur milieu limitant ainsi les différences qui auraient dû être observées entre les conditions -P et +P.

17.1.2 Le contact entre tapis racinaire et sol semble stimuler l'exsudation de citrate

Même si aucun signe apparent de carence n'a été détecté au cours de la période de préculture en hydroponie, l'expérience a été menée à son terme afin de procéder aux mesures d'exsudation racinaire et aux dosages d'accumulation d'uranium.

Avant le contact entre sol et tapis racinaire, les niveaux d'exsudation affichent des valeurs très basses de l'ordre de 40 nmol de citrate g^{-1} de racines h^{-1} comme nous l'avions déjà observé au cours des tests préliminaires effectués sur ce dispositif. Ces valeurs faibles sont par ailleurs très proches de celles observées en hydroponie chez les plantes en -P+U aux deux temps de mesure et chez les plantes en +P+U au premier temps de mesure. Sur les rhizotests, aucune distinction ne peut être faite entre les plantes ayant poussé sur un milieu pauvre en phosphore et celles ayant reçu un apport adéquat pendant la phase de préculture. Au vu de ce qui vient d'être dit dans le paragraphe précédent, cela n'est pas une surprise puisqu'il ne semble pas qu'une carence en phosphore se soit mise en place sur le dispositif, tout du moins les plantes n'en présentent pas clairement les symptômes. Pour s'en assurer, il aurait fallu réaliser des dosages de phosphates sur nos échantillons ce qui n'a pas été possible puisque ces derniers ont été intégralement minéralisés afin de réaliser les dosages de cations.

Après les 5 jours de contact avec le sol, les tapis racinaires présentent une augmentation de leur niveau d'exsudation, néanmoins ceux-ci ne sont significativement différents des valeurs mesurées avant le contact que chez les plantes en condition +P. Les niveaux affichés (93 et 193 nmol de citrate g^{-1} de racines h^{-1} respectivement en -P et +P) sont équivalents à ceux retrouvés en hydroponie chez les plantes en +P-U après 49 jours de culture. Il semble donc que le contact sol/racine ait influencé l'activité racinaire et que la présence de phosphore ait amplifié le phénomène. Un doute quant à l'effet du phosphore doit toutefois être émis dans la mesure où les expériences en réacteurs fermés ont révélé que cet élément est intégralement transféré des solutions d'incubation aux sols à tous les temps qui ont été testés et pour toutes les conditions de citrate. Ainsi, cette différence significative en termes d'exsudation entre les plantes en -P et en +P sur les rhizotests pourrait traduire une meilleure réponse métabolique des plantes précultivées en présence de phosphore et qui auraient par conséquent moins subi le stress lié au peu d'espace dont elles disposaient pour accroître leur système racinaire.

On peut également envisager l'existence d'une compétition qui se serait mise en place entre racines d'un même rhizotest du fait du manque d'espace pour se développer, ce qui pourrait être expliqué par le fait que l'on observe un mélange de réponses morphologiques racinaires – ramification accrue en -P qui peut certainement être reliée au déséquilibre des réserves internes de phosphore – et de réponses non spécifiques qui devraient pourtant l'être comme par exemple le développement de racines protéïdes dans les deux conditions. Sur certaines racines, et en particulier celles dont les poils absorbants ont été peu en contact avec la solution nutritive, ceci a pu conduire à des réactions caractéristiques d'une carence même lorsque l'alimentation en phosphore était adéquate. Dès lors, des modifications biochimiques ont pu se produire et influencer le fonctionnement des transporteurs de phosphore conduisant *in fine* à des réallocations internes des réserves de phosphore. Ces réallocations passeraient par une modification des flux au sein de la plante – par exemple un flux feuilles/racines accru et un flux racines/feuilles limité lorsqu'une carence est ressentie – ce qui a déjà été observé chez *Arabidopsis thaliana* (Misson et collab., 2009).

17.1.3 Le lupin blanc a accumulé de faibles quantités d'uranium issu du sol

Comme le montrent nos résultats, les tapis racinaires mis en contact avec le sol ont accumulé de l'uranium issu de ce dernier. Quantitativement parlant, il n'y a pas de différence significative entre les conditions -P et +P dans la mesure où il existe un facteur d'environ 3000 entre les quantités d'uranium retrouvées dans les racines et celles retrouvées dans les parties aériennes. À titre d'information ce ratio était nettement plus faible en hydroponie et variait de 50 à 400 respectivement en +P et -P.

Comme nous l'avons vu dans la partie V du manuscrit, les expériences en réacteur fermé ont permis de remobiliser des quantités d'uranium plus ou moins importantes en fonction du type utilisé. Dans les réacteurs fermés en continu, 1.7 μg d'uranium a été extrait en 5 jours sans renouvellement de la solution d'incubation quelle que soit la concentration de citrate apportée au début du contact. En renouvelant la solution d'incubation toutes les 24 heures, les quantités d'uranium passées dans la fraction liquide ont été significativement plus importantes et en partie gouvernées par la présence de citrate. On a ainsi pu récupérer en 5 jours 4.6, 6.0 et 10.1 μg d'uranium respectivement en condition C_0 , C_{10} et C_{40} . En comparant ces deux types de réacteurs fermés, nous avons mis en évidence le rôle non négligeable du renouvellement de la solution sur les quantités d'uranium remobilisable à partir du sol et, avec l'expérience en rhizotest, nous nous attendions à ce que l'accumulation d'uranium se situe dans un intervalle borné par les quantités d'uranium remobilisé dans les réacteurs fermés en continu et dans les réacteurs fermés en série. C'est effectivement ce que nous avons pu observer puisque la quantité d'uranium extraite par les plantes en 5 jours ($\approx 8.8 \mu\text{g}$) correspond à 104 % des quantités extraites dans les réacteurs fermés en continu et 17, 29 et 38 % de celles extraites dans les réacteurs fermés en série respectivement en C_0 , C_{10} et C_{40} . Cela suggère que l'approximation des quantités remobilisables en réacteur fermé n'est pas dénuée de sens et qu'elle est même plutôt pertinente dans notre cas.

Le rôle du citrate dans la remobilisation de l'uranium du sol des rhizotests à la solution nutritive, et de surcroît dans le transfert aux plantes, est quant à lui bien difficile à envisager. Il est en effet probable que le citrate qui a potentiellement pu être exsudé dans la rhizosphère soit rapidement dégradé comme cela a été le cas dans les réacteurs fermés à tous les temps de mesure mis à part au jour 1, et ce même s'il est produit de manière continue par les racines. Le plan expérimental qui a été utilisé au cours de cette expérience nous a permis de mettre en évidence un niveau d'exsudation en +P et -P légèrement supérieur à la concentration C_{10} néanmoins nous ne sommes pas en mesure de déterminer le moment à partir duquel le mécanisme s'est déclenché.

PARTIE VII

Conclusion générale

Au cours de cette thèse nous avons cherché à savoir si la phytodisponibilité de l'uranium à l'interface sol/racine pouvait être influencée par l'activité racinaire du lupin blanc en nous fixant trois objectifs principaux :

- déterminer si la présence d'uranium dans la rhizosphère est en mesure d'influencer l'exsudation de citrate par le lupin blanc ;
- déterminer si les quantités de citrate exsudées par les racines peuvent favoriser la remobilisation de l'uranium de la fraction solide du sol vers la solution ;
- déterminer si la potentielle solubilisation de l'uranium peut avoir un effet sur la phytodisponibilité de l'uranium en favorisant notamment son transfert à la plante.

Nous avons pour cela étudié les composantes physiologique et géochimique du sol de manière découplée afin de simplifier le système sol/solution/racine – en utilisant des dispositifs expérimentaux adaptés tels que la culture en hydroponie et les réacteurs fermés – avant de confronter leurs résultats à ceux obtenus dans le système tripartite plus complexe. Toute la difficulté du projet a résidé dans le fait de maintenir une cohérence entre les trois dispositifs mis en œuvre – hydroponie, réacteur fermé et rhizotest – ce que nous avons fait en travaillant avec la même solution nutritive au cours des trois expériences, en conservant des conditions de culture identiques en hydroponie et avec les rhizotests, et en utilisant dans les réacteurs fermés des concentrations en citrate fondées sur nos propres observations en hydroponie et sur les rhizotests. De la même manière, nous avons maintenu une continuité dans l'utilisation des techniques analytiques et des protocoles communs aux différentes expériences.

Les protocoles élaborés au cours de nos travaux sont le fruit de l'optimisation d'expériences préliminaires qui nous ont permis de définir les conditions expérimentales optimales et de déterminer les moyens à mettre en œuvre pour collecter les données que nous souhaitons obtenir. Ainsi, la solution nutritive utilisée dans les expériences finales a fait l'objet de plusieurs remaniements au cours de nos tests préliminaires – diminution des concentrations en macroéléments, diminution de la concentration +P, changement du sel de phosphate – suite à l'observation de toxicité n'ayant pas lieu d'être. De la même manière, l'aération de la solution nutritive a été décidée après avoir remarqué la dégradation anormale des racines lors des premiers tests réalisés en hydroponie. Ceci nous a amené à changer de lot de graines (traitées Wakil XL) et à essayer de cultiver le lupin en condition stérile, sans résultat. Le protocole permettant le dosage des exsudats racinaires est quant à lui issu de plusieurs mois de tests qui ont abouti à l'utilisation de la reconcentration des échantillons à l'aide d'un Speedvac et à la réalisation de la préparation de ces derniers dans l'obscurité pour éviter le phénomène de photodégradation (Francis et collab., 1992). Enfin le protocole en réacteur fermé et notamment l'utilisation d'un rapport V/m égal à 5 a été décidé après avoir testé différents ratios qui se sont révélés inadaptés à nos besoins, soit parce qu'ils empêchaient le bon déroulement de la manipulation, soit parce qu'ils nous auraient obligés à travailler avec du matériel de laboratoire peu adapté à la nécessité que nous avons d'étudier un nombre conséquent de conditions sur plusieurs pas de temps.

Dans les expériences en hydroponie, les traits phénotypiques qui ont été mesurés chez le lupin blanc ont toujours présenté des ordres de grandeurs équivalents au cours des tests préliminaires et manipulations réalisés, et sont en accord avec la littérature, que ce soit en termes de production de biomasse, de développement de clusters ou d'exsudation de citrate (Neumann et collab., 1999, 2000; Shen et collab., 2005; Shu et collab., 2007). Néanmoins nous avons dû composer avec une importante variabilité des exsudations mesurées ce qui est également le cas dans la plupart des études citées précédemment. D'un point de

vue technique, l'expérience en réacteur fermé est celle qui a posé le moins de problèmes dans la mesure où le contrôle de la solution d'incubation et l'absence de l'influence de la physiologie végétale permettent une bonne répétabilité des mesures. Finalement, le rhizotest dans sa conception actuelle ne semble pas correctement adapté au modèle végétal choisi – et par extension aux espèces à racines pivotantes – puisque l'architecture du lupin blanc n'a pas facilité l'obtention d'un tapis racinaire homogène sur toute la surface de contact entre sol et racines. Le problème a déjà été rencontré par Mihalík et collab. (2012) au cours de leurs travaux sur le tournesol (*Helianthus annuus*). Ces derniers n'ont en effet pas réussi à obtenir un recouvrement de 100 % de la surface du rhizotest ce qui a obligé les auteurs à calculer des flux d'absorption en se fondant sur des pourcentages de surface totale. Toutefois, ce dispositif correspond à un modèle particulièrement bien adapté aux besoins de notre étude ce qui nous a poussé à contourner le problème en travaillant avec un temps de préculture de 38 jours au lieu des 15 généralement utilisés dans des études du même type (Chaignon, 2001; Hinsinger et collab., 2003; Bravin et collab., 2010). Malgré cela nous n'avons pas réussi à placer les plantes dans les conditions de carence en phosphore souhaitées ou tout du moins les traits phénotypiques observables en hydroponie n'ont pas été retrouvés sur les rhizotests (jaunissement des feuilles, modification de l'allocation de production de biomasse, développement différencié des racines protéoïdes, etc.). Le dosage du citrate exsudé par les tapis racinaires s'est avéré aussi variable qu'en hydroponie mais les ordres de grandeur des valeurs obtenues restent cohérents avec ce qui a été observé en hydroponie. Au final, le plan expérimental suivi est en adéquation avec les questions que nous nous sommes posées toutefois il serait intéressant de développer un dispositif qui soit plus permissif en termes d'espace alloué au développement du tapis racinaire. Nous avons pourtant envisagé ce problème puisque nous avons pris le parti de réhausser la composante supérieure du rhizotest de quelques millimètres par rapport à sa position originelle.

Les résultats obtenus en termes d'exsudation de citrate soulignent le fait que nous avons réussi à imposer la carence en phosphore au lupin blanc en hydroponie. Nous avons pu observer le développement caractéristique de racines protéoïdes chez les plantes ayant poussé dans la solution nutritive pauvre en phosphore et mis en évidence un doublement de leur niveau d'exsudation par rapport aux plantes témoins au 49^e jour de l'expérience. Comme nous l'avons supposé la présence d'uranium dans le milieu de culture a eu un effet fort sur ce trait phénotypique toutefois nos observations sont allées à l'encontre des travaux de Wang et collab. (2007) qui ont démontré une stimulation de l'exsudation de citrate par l'aluminium en condition de carence en phosphore. Nos résultats indiquent en effet que ce sont les plantes non carencées qui ont affiché une plus forte activité d'exsudation dans notre étude. Les valeurs retrouvées chez ces individus, de l'ordre de 700 nmol de citrate g⁻¹ de racines h⁻¹ sont légèrement supérieures à celles des plantes carencées non exposées (380 nmol de citrate g⁻¹ de racines h⁻¹) ce qui nous laisse supposer que la présence d'uranium dans un milieu correctement approvisionné en phosphore peut favoriser la mise en place de ce mécanisme physiologique lié à la carence. Ceci pourrait s'expliquer par la forte affinité entre phosphore et uranium, un phénomène favorisant la formation de précipités peu solubles limitant potentiellement la disponibilité de l'élément essentiel pour la plante. Des mesures de phosphore dans les racines et les parties aériennes auraient vraisemblablement permis de valider ou infirmer cette hypothèse. À l'inverse, la présence d'uranium dans le milieu pauvre en phosphore a provoqué une toxicité très importante au niveau racinaire et les racines protéoïdes ont subi des dégâts trop importants pour leur permettre de fonctionner correctement. Ceci explique la quasi absence d'exsudation racinaire dans les plantes carencées en phosphore exposées à l'uranium. Dans les

rhizotests, comme nous l'avons évoqué au paragraphe précédent, nous n'avons pas réussi à observer de différences en termes d'exsudation entre les plantes ayant poussé sur les milieux pauvre ou riche en phosphore puisque les niveaux d'exsudation en fin de période de préculture sont sensiblement identiques dans les deux conditions et plus faibles qu'en hydroponie, de l'ordre de ce qui a été mesuré chez les plantes carencées en phosphore et exposées à l'uranium (40 nmol de citrate g^{-1} de racines h^{-1}). Cette ressemblance de niveaux d'exsudation entre les plantes ayant grandi sur les rhizotests et plantes ayant souffert d'une fort stress en hydroponie laisse supposer que le dispositif en lui-même est stressant pour le lupin blanc, et visiblement plus que la carence que nous avons cherché à appliquer. Selon nous, le stress provoqué par le rhizotest serait d'ordre physique du fait de la taille trop petite du compartiment dans lequel le tapis racinaire peut se développer. Ceci pourrait empêcher au végétal de produire suffisamment de biomasse (capacité d'échange avec le milieu insuffisante par rapport aux besoins), favoriser la mise en place d'une compétition entre racines d'un même rhizotest pour les ressources et donc nuire à son bon développement. Concernant l'effet de l'uranium sur l'exsudation de citrate sur les rhizotests, nous ne disposons pas de mesures directes permettant de le mettre en évidence. Même si une hausse significative du phénomène est observée après contact avec le sol – et par conséquent après contact entre tapis racinaire et contaminant – nos résultats permettent uniquement d'observer une hausse d'exsudation chez les plantes qui ont été mises en contact avec du sol alimenté par une solution nutritive riche en phosphore. En ce sens un dosage de l'uranium dans la solution du sol restant en fin d'expérience aurait peut-être permis d'apporter des éléments de réponse supplémentaires.

Grâce aux expériences réalisées en réacteur fermé et puisque les concentrations de citrate testées sont en adéquation avec ce qui a été mesuré dans les rhizotests, il est tout de même possible de faire des suppositions quant à ce qui a pu se dérouler dans le sol rhizosphérique. Dans les réacteurs fermés, nous avons démontré que la présence de citrate favorise la mise en solution d'uranium et que cette remobilisation est d'autant plus importante que la concentration de citrate est élevée. Néanmoins ceci n'est vrai que dans les réacteurs fermés en série après 24 heures de contact et il faut souligner que la désorption d'uranium n'est pas proportionnelle à la concentration, elle est simplement doublée alors que la concentration de citrate a elle été multipliée par quatre. En effet, au jour 1 des réacteurs fermés ce sont en moyenne 2.1 , 3.8 et $8.1 \mu\text{g U}$ qui sont remobilisés respectivement en C_0 , C_{10} et C_{40} . Cela suppose que les quantités d'uranium potentiellement remobilisables par le citrate dans ce sol sont très limitées. Au regard des observations faites aux autres jours des réacteurs fermés en série et dans les réacteurs fermés continus nous pouvons également affirmer qu'une partie de l'uranium qui peut être mis en solution subit des phénomènes de resorption et/ou précipitation sur les fractions solides du sol. Toutefois, dans le système sol/solution/racine, la présence des racines et notamment leur capacité à absorber la solution du sol a pu empêcher ces phénomènes de se produire en ayant une dynamique d'absorption de la solution plus rapide que la dynamique de resorption et/ou précipitation. C'est en tout cas ce que laisse supposer les résultats d'accumulation sur le rhizotest qui indiquent que plus de 100 % de la quantité d'uranium remobilisable dans les réacteurs fermés continus en 5 jours est retrouvée dans le lupin blanc après le contact des tapis racinaires avec le sol.

À partir des conclusions tirées de l'expérience en réacteurs fermé au jour 1 (2.1 , 3.8 et $8.1 \mu\text{g U}$ remobilisés respectivement en C_0 , C_{10} et C_{40}) et étant donnée l'exsudation relativement faible des rhizotests au moment de la mise en contact avec le sol (en moyenne 40 nmol de citrate g^{-1} de racines h^{-1}), nous pouvons supposer qu'une remobilisation de l'uranium a eu lieu dans le sol des rhizotests rendant l'uranium plus phytodisponible.

Il semble néanmoins peu probable que les quantités d'uranium mises en jeu aient été suffisantes pour influencer directement l'exsudation comme nous avons pu le mettre en évidence en hydroponie. En effet si l'on admet qu'il s'est produit la même désorption d'uranium dans les réacteurs fermés et les rhizotests, la quantité qui a été en contact avec les tapis racinaires équivaut à environ 0.06 % de celle présente dans la solution nutritive en hydroponie ce qui semble dérisoire pour expliquer les hausses d'exsudation mesurées en fin de contact dans les rhizotests. Nos résultats ne nous permettent donc pas de démontrer un effet de l'uranium sur l'exsudation de citrate en rhizotest et ils tendent plutôt à montrer qu'il n'a pas pu y en avoir. L'augmentation de l'exsudation observée sur ce dispositif résulte plus vraisemblablement d'un effet direct du contact avec le sol influencé par les apports différents de phosphore ou bien de paramètres physico-chimiques du sol que nous n'avons pas abordés au cours de nos travaux (pH, autres éléments nutritifs, autres éléments toxiques, etc.)

Cette étude a également permis d'apporter de nouvelles informations quant à l'importance de la présence de phosphore sur la phytodisponibilité de l'uranium. L'expérience en hydroponie a ainsi confirmé une multiplication par quatre de l'accumulation dans les plantes ayant poussé dans un milieu dépourvu de phosphore. Cela a pu être attribué à l'augmentation de formes solubles d'uranium présentes dans le milieu qui ont été internalisées dans les cellules. La présence de phosphore dans la solution nutritive à, au contraire, favorisé la formation de complexes d'uranium qui ont précipité à la surface des racines ce qui a eu pour effet de limiter l'internalisation du contaminant, de stimuler le développement de racines protéoïdes et l'exsudation de citrate, ce qui *in fine* a pu être corrélé à l'augmentation significative de la translocation de l'uranium aux parties aériennes dans ces conditions. Ceci n'a toutefois pas été confirmé dans les rhizotests puisque l'accumulation totale d'uranium est identique dans les deux conditions ce qui n'est finalement pas étonnant dans la mesure où l'expérience en réacteur fermé n'a pas révélé d'effet du phosphore sur la remobilisation d'uranium en solution.

Au final cette thèse a permis d'apporter des éléments de réponse quant à l'effet du lupin blanc sur la phytodisponibilité de l'uranium dans le sol étudié et à l'effet de l'exsudation racinaire sur ce phénomène. La hausse significative de la translocation d'uranium des racines aux parties aériennes observée à la fois en hydroponie et sur les rhizotests chez les plantes présentant de forts niveaux d'exsudation suggère que le citrate joue un rôle dans le transport de l'uranium dans l'organisme. Il pourrait notamment favoriser le chargement de l'uranium dans le xylème comme le soulignent les études de Durrett et collab. (2007) et Richau et collab. (2009) sur le fer et le nickel.

Les moyens mis en œuvre au cours de ces travaux pour faciliter la comparaison entre les différentes expériences ne se sont pas révélés suffisants même si les certitudes apportées par nos observations (effet de l'uranium sur l'exsudation en hydroponie, effet du citrate sur la remobilisation en réacteur fermé, et implication du citrate sur la translocation aux parties aériennes en hydroponie et sur rhizotests) tendent à confirmer l'existence d'une relation entre activité racinaire et phytodisponibilité. Néanmoins certaines zones d'ombre subsistent et de nombreuses perspectives de recherche découlent de notre étude. En hydroponie il serait par exemple intéressant de savoir à partir de quelle concentration en uranium l'effet sur l'exsudation de citrate se fait ressentir afin de déterminer si cela est compatible avec des concentrations qui peuvent être retrouvées dans la solution du sol. En réacteur fermé il serait judicieux de comparer nos résultats avec des données obtenues en réacteurs ouverts grâce auxquels il serait possible de se rapprocher des conditions de prélèvement de solution tels qu'ils se produisent au niveau des racines. Avec les rhizotests il apparaît indispensable de trouver un moyen de limiter le stress physique imposé au

système racinaire qui a faussé les conditions de culture que nous voulions tester. Nous avons déjà pris le parti d'augmenter sensiblement la hauteur du compartiment dans lequel se développent les racines mais cela n'a visiblement pas été suffisant. Enfin, de manière plus générale, il semble important de s'intéresser au rôle du citrate dans le transfert de l'uranium des racines aux feuilles en réalisant des mesures au niveau de l'apoplasme et du xylème, et en s'intéressant aux capacités de complexation des deux éléments dans la plante. Il faudrait également s'intéresser aux autres acides organiques et notamment au malate dans la mesure où les transporteurs impliqués dans l'exsudation de citrate et de malate semblent être sous le même contrôle génétique. Pour terminer, s'intéresser à l'homéostasie du fer semble être une piste de recherche prometteuse dans la mesure où cette dernière est liée à celle du phosphore et parce que le citrate est impliqué dans la stratégie d'acquisition du fer chez le lupin blanc.

PARTIE VIII

Références bibliographiques

Références classées par ordre alphabétique

A

- Adhikari, T. et R. K. Rattan. 2000, «Modelling zinc uptake by rice crop using a Barber-Cushman approach», *Plant and Soil*, vol. 227, p. 235–242.
- Aery, N. C. et G. S. Jain. 1997, «Effect of uranyl nitrate on seed germination and early seedling growth of *Triticum aestivum*», *Biologia Brasiliensis*, vol. 52, n° 1, p. 115–119.
- AIEA. 1994, «Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in temperate environments», rapport technique 364, International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria).
- AIEA. 2009, «Quantification of radionuclide transfer in terrestrial and freshwater environments for radiological assessments», rapport technique, International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria).
- AIEA. 2010, «Handbook of parameter values for the prediction of radionuclide transfer in terrestrial and freshwater environments», rapport technique 472, International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria).
- Aleksahina, R. M. 1985, «Radioekologia oročeanogo zemledinija», Moskva (Russia).
- Amundson, R. G. et E. A. Davidson. 1990, «Carbon dioxide and nitrogenous gases in the soil atmosphere», *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 38, n° 1-2, p. 13–41.
- Ananyev, G. M., A. Murphy, Y. Abe et G. C. Dismukes. 1999, «Remarkable affinity and selectivity for Cs⁺ and uranyl (UO₂²⁺) binding to the manganese site of the apo-water oxidation complex of photosystem II», *Biochemistry*, vol. 38, n° 22, p. 7200–7209.
- April, R. et D. Keller. 1990, «Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States», *Biogeochemistry*, vol. 9, n° 1, p. 1–18.
- Armands, G. 1967, «Geochemical prospecting of a uraniferous bog deposit at Masugnsbyn, northern Sweden», dans *Geochemical prospecting in fennoscandia*, chap. 10, Interscience, New York (United States), p. 127–154.
- Arsenault, J.-L., S. Pouleur, C. Messier et R. Guay. 1995, «WinRHIZOTM, a root-measuring system with a unique overlap correction methode», *HortScience*, vol. 30, p. 906.
- Association Mondiale du Nucléaire. 2011, «World uranium mining 2011», London (United Kingdom). <http://www.world-nuclear.org/info/inf23.html>.
- Atkins, G. L. 1973, *Modèles à compartiments multiples pour les systèmes biologiques*, Gauthier-Villard, Paris (France), 181 p.

B

- Baker, A. J. M. 1981, «Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals», *Journal of Plant Nutrition*, vol. 3, n° 1-4, p. 643-654.
- Barber, S. A. et J. H. Cushman. 1981, «Nitrogen uptake model for agronomic crops», dans *Modeling wastewater renovation : land treatment*, édité par I. K. Iskandar, Environmental Science and Technology, Wiley-Interscience, New York (United States), p. 382-409.
- Barracough, P. B. 1989, «Root growth, macro-nutrient uptake dynamics and soil fertility requirements of a high-yielding winter oilseed rape crop», *Plant and Soil*, vol. 119, n° 1, p. 59-70.
- Bem, H. et F. Bou-Rabee. 2004, «Environmental and health consequences of depleted uranium use in the 1991 Gulf War», *Environment International*, vol. 30, p. 123-134.
- Berthelin, J., B. Gueniot et C. Munier-Lamy. 1987, «In situ bag experimental method studying uranium mobilization and preconcentration in soils : influence of environmental factors», *Uranium*, vol. 3, p. 343-352.
- Bertin, C., X. Yang et L. A. Weston. 2003, «The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere», *Plant and Soil*, vol. 256, n° 1, p. 67-83.
- Bhainsa, K. C. et S. F. D'Souza. 2001, «Uranium (VI) biosorption by dried roots of *Eichhornia crassipes* (water hyacinth)», *Journal of Environmental Science and Health - Part A : Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, vol. 36, n° 9, p. 1621-1631.
- Bitton, G., K. Jung et B. Koopman. 1994, «Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 27, p. 25-28.
- Bleise, A., P. R. Danesi et W. Burkart. 2003, «Properties, use and health effects of depleted uranium (DU) : a general overview», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 64, p. 93-112.
- Bolan, N. S., R. Naidu, S. Mahimairaja et S. Baskaran. 1994, «Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates», *Biology and Fertility of Soils*, vol. 18, n° 4, p. 311-319.
- Bonin, B. et P.-L. Blanc. 2001, «L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine», dans *L'uranium de l'environnement à l'homme*, édité par H. Métivier, chap. 1, EDP Sciences - IPSN Collection, Les Ulis (France), p. 7-41.
- Bontidean, I., A. Mortari, S. Leth, N. L. Brown, U. Karlson, M. M. Larsen, J. Vangronsveld, P. Corbisier et E. Csöregi. 2004, «Biosensors for detection of mercury in contaminated soils», *Environmental Pollution*, vol. 131, n° 2, p. 255-262.
- Boularbah, A., J.-L. Morel, G. Bitton et M. Lench. 1996, «A direct solid-phase assay specific for heavy-metal toxicity. II. Assessment of heavy-metal immobilization in soils and bioavailability to plants», *Soil and Sediment Contamination*, vol. 5, p. 395-404.

- Bourguignon, J., A. Vavasseur, G. Sarret, P. Hurtevent et P. Henner. 2009, «Transfert aux plantes et biodistribution», dans *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*, édité par M.-T. Ménager, J. Garnier-Laplace et M. Goyffon, tec & doc, éditions médicales internationales éd., chap. 6, Lavoisier, Paris (France), p. 99–115.
- Bravin, M. 2008, *Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédents viticoles*, thèse de doctorat, Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier (France).
- Bravin, M. N., A. M. Michaud, B. Larabi et P. Hinsinger. 2010, «RHIZOtest : a plant-based biotest to account for rhizosphere processes when assessing copper bioavailability», *Environmental Pollution*, vol. 158, p. 3330–3337.
- Brown, P. L. et S. J. Markich. 2000, «Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction : extension of the conceptual model», *Aquatic Toxicology*, vol. 51, n° 2, p. 177–194.
- C**
- Calabrese, E. J. et L. A. Baldwin. 2002, «Hormesis and high-risk groups», *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, vol. 35, p. 414–428.
- Calabrese, E. J. et K. J. Howe. 1976, «Stimulation of growth of peppermint (*Mentha piperita*) by phosphon, a growth retardant», *Physiologia Plantarum*, vol. 37, p. 163–165.
- Campbell, P. G. C. 1995, «Interactions between trace metals and aquatic organisms : a critique of the free-ion activity model», dans *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, édité par A. Tessier et D. R. Turner, John Wiley & Sons, New York (United States), p. 45–102.
- Chaignon, V. 2001, *Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées : cas de sols viticoles contaminés par des fongicides*, thèse de doctorat, Université d'Aix-Marseille III, Marseille (France).
- Chaignon, V. et P. Hinsinger. 2003, «Heavy metals in the environment : a biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil», *Journal of Environmental Quality*, vol. 32, p. 824–833.
- Colle, C., J. Garnier-Laplace, S. Roussel-Debet, C. Adam et J. P. Baudin. 2001, «Comportement de l'uranium dans l'environnement», dans *L'uranium de l'environnement à l'homme*, édité par H. Métivier, chap. 6, EDP Sciences - IPSN Collection, Les Ulis (France), p. 187–211.
- Costa, G. et J.-L. Morel. 1994, «Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce», *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 32, n° 4, p. 561–570.

D

- Darrah, P. R. 1991, «Measuring the diffusion coefficient of rhizosphere exudates in soil. II. The diffusion of sorbing compounds», *European Journal of Soil Science*, vol. 42, n° 3, p. 421–434.
- Darrah, P. R. 1993, «The rhizosphere and plant nutrition : a quantitative approach», *Plant and Soil*, vol. 155-156, n° 1, p. 1–20.
- Davison, W., H. Zhang et K. W. Warnken. 2007, «Theory and applications of DGT measurements in soils and sediments», dans *Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring, Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 48, édité par R. Greenwood, G. Mills et B. Vrana, 1^{re} éd., chap. 16, Elsevier, Amsterdam (The Netherlands), p. 353–378.
- Degryse, F., E. Smolders, H. Zhang et W. Davison. 2009, «Predicting availability of mineral elements to plants with the DGT technique : a review of experimental data and interpretation by modelling», *Environmental Chemistry*, vol. 6, p. 198–218.
- Denison, F. et J. Garnier-Laplace. 2003, «The effects of database parameters uncertainty on uranium(VI) equilibrium calculations», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 69, p. 2183–2191.
- Dinkelaker, B., C. Hengeler et H. Marschner. 1995, «Distribution and function of proteoid roots and other root clusters», *Botanica Acta*, vol. 108, p. 183–200.
- Dinkelaker, B., V. Römheld et H. Marschner. 1989, «Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus L.*)», *Plant, Cell & Environment*, vol. 12, n° 3, p. 285–292.
- Dodge, C. J. et A. J. Francis. 1994, «Photodegradation of uranium-citrate complex with uranium recovery», *Environmental Science and Technology*, vol. 28, p. 1300–1306.
- Dominik, J., S. Cuccodoro, L. Gourcy et S. Santiago. 1992, «Uranium enrichment in the surface and groundwaters of the Alpine Rhone watershed», dans *Impact of heavy metals on the environment*, édité par J.-P. Vernet, Amsterdam (The Netherlands), p. 397–416.
- DPHE. 2001, «Depleted uranium: sources, exposure and health effects», rapport technique, Organisation Mondiale de la Santé, Geneva (Switzerland).
- Drever, J. I. et L. L. Stillings. 1997, «The role of organic acids in mineral weathering», *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 120, n° 1-3, p. 167–181.
- Drobkov, A. A. 1951, «Biological effects of naturally radioactive elements», *Sovremennoi Biologii*, vol. 31, p. 82–100.
- Dubois, J.-D. 1991, *Typologie des aquifères du cristallin : exemple des massifs des Aiguilles Rouges et du Mont-Blanc*, thèse de doctorat, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne (Switzerland).

- Dufey, J., J. Genon, B. Jaillard, H. Calba, G. Rufyikiri et B. Delvaux. 2001, «Cation exchange on plant roots involving aluminium: experimental data and modelling», dans *Trace elements in the rhizosphere*, édité par G. R. Gobran, W. W. Wenzel et E. Lombi, chap. 11, CRC Press LLC, London (United Kingdom), p. 227–252.
- Duff, M. C. et C. Amrhein. 1996, «U(VI) sorption on goethite and soil in carbonate solutions», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 60, p. 1393–1400.
- Duffner, A., E. Hoffland et E. J. M. Temminghoff. 2012, «Bioavailability of zinc and phosphorus in calcareous soils as affected by citrate exudation», *Plant and Soil*, vol. 361, p. 165–175.
- Duquène, L., F. Tack, E. Meers, J. Baeten, H. Wannijn et H. Vandenhove. 2008, «Effect of biodegradable amendments on uranium solubility in contaminated soils», *Science of the Total Environment*, vol. 391, n° 1, p. 26–33.
- Duquène, L., H. Vandenhove, F. Tack, M. Van Hees et H. Wannijn. 2010, «Diffusive gradient in thin films (DGT) compared with soil solution and labile uranium fraction for predicting uranium bioavailability to ryegrass», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 101, n° 2, p. 140–147.
- Durrett, T. P., W. Gassmann et E. E. Rogers. 2007, «The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation», *Plant Physiology*, vol. 144, p. 197–205.
- Dushenkov, S., D. Vasudev, Y. Kapulnik, D. Gleba, D. Fleisher, K. C. Ting et B. Ensley. 1997, «Removal of uranium from water using terrestrial plants», *Environmental Science and Technology*, vol. 31, n° 12, p. 3468–3474.

E

- Eapen, S., K. N. Suseelan, S. Tivarekar, S. A. Kotwal et R. Mitra. 2003, «Potential for rhizofiltration of uranium using hairy root cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*», *Environmental Research*, vol. 91, p. 127–133.
- Earl, K. D., J. K. Syers et J. R. McLaughlin. 1979, «Origin of the effects of citrate, tartrate, and acetate on phosphate sorption by soils and synthetic gels», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 43, n° 4, p. 674–678.
- Ebbs, S. D., D. J. Brady et L. V. Kochian. 1998a, «Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants», *Journal of Experimental Botany*, vol. 49, n° 324, p. 1183–1190.
- Ebbs, S. D., D. J. Brady, W. A. Norvell et L. V. Kochian. 2001, «Uranium speciation, plant uptake, and phytoremediation», *Journal of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste*, vol. 5, n° 3, p. 130–135.
- Ebbs, S. D., W. A. Norvell et L. V. Kochian. 1998b, «Soil processes and chemical transport : the effect of acidification and chelating agents on the solubilization of uranium from contaminated soil», *Journal of Environmental Quality*, vol. 27, n° 6, p. 1486–1494.

- Echevarria, G. et J.-L. Morel. 1997, «Étude de coefficient de distribution sol-solution, K_d , de radionucléides dans les sols», rapport technique, ANDRA-ENSAIA-INPL-INRA-LSE.
- Echevarria, G., J.-L. Morel, J. C. Fardeau et E. Leclerc-Cessac. 1998, «Assessment of phytoavailability of nickel in soils», *Journal of Environmental Quality*, vol. 27, p. 1064–1070.
- Echevarria, G., M. I. Sheppard et J.-L. Morel. 2001, «Effect of pH on the sorption of uranium in soils», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 53, p. 257–264.
- Eide, D., M. Broderius, J. Fett et M. L. Guerinot. 1996, «A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, p. 5624–5628.
- Ericsson, T. 1995, «Growth and shoot : root ratio of seedlings in relation to nutrient availability», *Plant and Soil*, vol. 168-169, n° 1, p. 205–214.
- Ericsson, T., L. Rytter et S. Linder. 1992, «Nutritional dynamics and requirements of short rotation forests», dans *Ecophysiology of short rotation forest crops*, édité par C. P. Mitchell, J. B. Ford-Robertson, T. Hinckley et L. Sennerby-Forsse, Elsevier applied science.
- Eschenbach, A., R. Wienberg et B. Mahro. 1998, «Fate and stability of non-extractable residues of ^{14}C PAH in contaminated soils under environmental stress conditions», *Environmental Science and Technology*, vol. 32, p. 2585–2590.

F

- Fang, J., B. Wen, X. Q. Shan, J. M. Lin et G. Owens. 2007, «Is an adjusted rhizosphere based-method valid for field assessment of metal phytoavailability ? Application to non-contaminated soils», *Environmental Pollution*, vol. 150, n° 2, p. 209–217.
- Fardeau, J. C. 1993, «Le phosphore assimilable des sols : sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments», *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 13, p. 317–331.
- 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 mise en œuvre au LRE», rapport technique 46, Institution de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Paris (France).
- Fox, T. R. et N. B. Comerford. 1990, «Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the southeastern USA», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 54, n° 4, p. 1139–1144.
- Fox, T. R. et N. B. Comerford. 1992, «Influence of oxalate loading on phosphorus and aluminum solubility in Spodosols», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 56, n° 1, p. 290–294.

- Fox, T. R., N. B. Comerford et W. W. McFee. 1990a, «Kinetics of phosphorus release from Spodosols : effects of oxalate and formate», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 54, n° 5, p. 1441–1447.
- Fox, T. R., N. B. Comerford et W. W. McFee. 1990b, «Phosphorus and aluminum release from a Spodic horizon mediated by organic acids», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 54, n° 6, p. 1763–1767.
- Francis, A. J., C. J. Dodge et J. B. Gillow. 1992, «Biodegradation of metal citrate complexes and implications for toxic-metal mobility», vol. 356, p. 140–142.
- Fransson, A. M., S. Vinogradoff, D. L. Godbold, P. A. W. Van Hees et D. L. Jones. 2004, «Aluminum complexation suppresses citrate uptake by acid forest soil microorganisms», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 36, n° 2, p. 353–357.
- Frossard, E. et S. Sinaj. 1997, «the isotope exchange kinetic technique : a method to describe the availability of inorganic nutrients. Applications to K, P, S and Zn», *Isotopes in Environmental and Health Studies*, vol. 33, p. 61–77.
- Fry, S. C. 1986, «Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases», dans *Molecular and physiological aspects of plant peroxidase*, édité par H. Greppin, C. Penel et T. Gaspar, University of Geneva, Geneva (Switzerland), p. 169–182.
- Fu, S. L. et W. X. Cheng. 2002, «Rhizosphere priming effects on the decomposition of soil organic matter in C-4 and C-3 grasslands soils», *Plant and Soil*, vol. 238, p. 289–294.

G

- Gabrielli, R., T. Pandolfini, O. Vergnano et M. R. Palandri. 1990, «Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies», *Plant and Soil*, vol. 122, n° 2, p. 271–277.
- Gardner, W. K., D. A. Barber et D. G. Parbery. 1983, «The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced», *Plant and Soil*, vol. 70, p. 107–124.
- Gascoyne, M. 1992, «Geochemistry of the actinides and their daughters», dans *Uranium series disequilibrium : applications to earth, marine and environmental sciences*, édité par M. Ivanovich et R. S. Harmon, 2^e éd., Clarendon Press, Oxford (United Kingdom), p. 34–61.
- Gerke, J. 1994, «Kinetics of soil phosphate desorption as affected by citric acid», *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, vol. 157, n° 1, p. 17–22.
- Gerzabek, M. H., F. Strebl et B. Temmel. 1998, «Plant uptake of radionuclides in lysimeter experiments», *Environmental Pollution*, vol. 99, n° 1, p. 93–103.
- Giblin, A. M., B. D. Batts et D. J. Swaine. 1981, «Laboratory simulation studies of uranium mobility in natural waters», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 45, p. 699–709.

- Goldberg, S. et G. Sposito. 1984, «A chemical model of phosphate adsorption by soils : I. reference oxide minerals», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 48, n° 4, p. 772–778.
- Goswami, S. C., K. L. Gulati et K. K. Nagpaul. 1977, «Estimation of uranium and boron contents in plants and soils by nuclear particle technique», *Plant and Soil*, vol. 48, p. 709–717.
- Grayston, S. J., D. Vaughan et D. Jones. 1997, «Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants : the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability», *Applied Soil Ecology*, vol. 5, n° 1, p. 29–56.
- Gueniot, B., C. Munier-Lamy et J. Berthelin. 1988, «Geochemical behaviour of uranium in soils, part I. Influence of pedogenetic processes on the distribution of uranium in aerated soils», *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 31, p. 21–37.
- Gueniot, B., C. Munier-Lamy, J. Berthelin, B. Guillet et B. Souchier. 1983, «Comportement de l'uranium dans les pédogenèses tempérées», *Sciences Géologiques - Mémoire*, vol. 73, p. 133–142.
- Guinel, F. C. et M. E. McCully. 1986, «Some water-related physical properties of maize root-cap mucilage», *Plant, Cell & Environment*, vol. 9, p. 657–666.
- Gulati, K. L., M. C. Oswal et K. K. Nagpaul. 1980, «Assimilation of uranium by wheat and tomato plants», *Plant and Soil*, vol. 55, p. 55–59.
- Gupta, S. K. et C. Aten. 1993, «Comparison and evaluation of extraction media and their suitability in a simple model to predict the biological relevance of heavy metal concentrations in contaminated soils», *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, vol. 51, p. 25–46.

H

- Harmsen, J., W. H. Rulkens et H. J. P. Eijsackers. 2005, «Bioavailability : concept for understanding or tool for predicting?», *Land Contamination and Reclamation*, vol. 13, n° 2, p. 161–172.
- Harmsen, K. et F. A. M. de Haan. 1980, «Occurrence and behaviour of uranium and thorium in soil and water», *NJAS : wageningen journal of life sciences*, vol. 28, p. 40–62.
- Hawkins, J. L., M. I. Sheppard et S. S. Jorgensen. 1995, «Predicting soil lead migration : how can ancient church roofs help?», *Science of the Total Environment*, vol. 166, n° 1-3, p. 43–53.
- Herbert, B. E. et P. M. Bertsch. 1995, «Characterization of dissolved and colloidal organic matter in soil solution – A review», dans *Carbon forms and functions in forest soils*, édité par W. McFee et J. M. Kelly, Soil Science Society of America, Madison (United States), p. 63–88.

- Hiltner, L. 1904, «Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache», *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft*, vol. 98, p. 59–78.
- Hinsinger, P. 1998, «How do plant roots acquire mineral nutrients?», *Advances in Agronomy*, vol. 64, p. 225–265.
- Hinsinger, P., C. Plassard et B. Jaillard. 2006, «Rhizosphere : a new frontier for soil biogeochemistry», *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 88, n° 1-3, p. 210–213.
- Hinsinger, P., C. Plassard, C. Tang et B. Jaillard. 2003, «Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints : a review», *Plant and Soil*, vol. 248, p. 43–59.
- Ho, C. H. et N. H. Miller. 1986, «Adsorption of uranyl species from bicarbonate solution onto hematite particles», *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 110, p. 165–171.
- Hocking, P. J., G. Keerthisinghe, F. W. Smith et P. J. Randall. 1997, «Comparison of the ability of different crop species to access poorly-available soil phosphorus», dans *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*, édité par T. Ando, 18th International Plant Nutrition Colloquium, Kluwer Academic, p. 305–308.
- Hoffland, E., R. Van Den Boogaard, J. Nelemans et G. Findenegg. 1992, «Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants», *New Phytologist*, vol. 122, n° 4, p. 675–680.
- Hooda, P. S., H. Zhang, W. Davison et A. C. Edwards. 1999, «Measuring bioavailable trace metals by diffusive gradients in thin films (DGT) : soil moisture effects on its performance in soils», *European Journal of Soil Science*, vol. 50, p. 285–294.
- Hopkins, W. G. et N. P. A. Hüner. 2008, «Plants and Inorganic Nutrients», dans *Introduction to plant physiology*, 4^e éd., chap. 4, Wiley.
- Horst, W. J., A. Wagner et H. Marschner. 1982, «Mucilage protects root meristems from aluminium injury toxic effect of cowpea (*Vigna unguiculata*) growth», *Journal of Plant Physiology*, vol. 105, n° 5, p. 435–444.
- Hough, R. L., A. M. Tye, N. M. J. Crout, S. P. McGrath, H. Zhang et S. D. Young. 2005, «Evaluating a 'Free Ion Activity Model' applied to metal uptake by *Lolium perenne* L. grown in contaminated soils», *Plant and Soil*, vol. 270, p. 1–12.
- Hsi, C. K. D. et D. Langmuir. 1985, «Adsorption of uranyl onto ferric oxyhydroxides : application of the surface complexation site-binding model», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 49, p. 1931–1941.
- Hsu, P. H. 1964, «Adsorption of phosphate by aluminium and iron in soils», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 28, n° 4, p. 474–478.
- Huang, J. W., M. J. Blaylock, Y. Kapulnik et B. D. Ensley. 1998, «Phytoremediation of uranium-contaminated soils : role of organic acids in triggering uranium hyperaccumulation in plants», *Environmental Science and Technology*, vol. 32, p. 2004–2008.

I

IRSN. 2009, «Fiche 1 - l'extraction de l'uranium en France : données et chiffres clés», http://www.irsn.fr/FR/base_de_connaissances/Environnement/surveillance-environnement/sites-miniers-uranium/Documents/irsn_mines-uranium_extraction-uranium.pdf.

J

Jenkinson, D. S. 1966, «The priming action», dans *The use of isotope in soil organic matter studies*, Braunschweig, Pergamon Press, New York (United States), p. 199–208. Report for the FAO/IAEA.

Johnson, J. F., D. L. Allan, C. P. Vance et G. Weiblen. 1996a, «Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus* (contribution to organic acid exudation by proteoid roots)», *Plant Physiology*, vol. 112, p. 19–30.

Johnson, J. F., C. P. Vance et D. L. Allan. 1996b, «Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase», *Plant Physiology*, vol. 112, p. 31–41.

Jones, D. L. 1998, «Organic acids in the rhizosphere - a critical review», *Plant and Soil*, vol. 205, p. 25–44.

Jones, D. L. et P. R. Darrah. 1994, «Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere», *Plant and Soil*, vol. 166, n° 2, p. 247–257.

Jones, D. L., P. R. Darrah et L. V. Kochian. 1996a, «Critical evaluation of organic acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root iron uptake», *Plant and Soil*, vol. 180, n° 1, p. 57–66.

Jones, D. L., A. M. Prabowo et L. V. Kochian. 1996b, «Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial-populations – the effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress», *Plant and Soil*, vol. 182, p. 239–247.

Juste, C. 1988, «Appréciation de la mobilité et de la biodisponibilité des éléments traces du sol», *Science du sol*, vol. 26, n° 2, p. 103–112.

K

Kaye, G. W. C. et T. H. Laby. 1986, *Tables of physical and chemical constants and some mathematical functions*, 15^e éd., Longman, London (United Kingdom), 560 p..

Korshunova, Y. O., D. Eide, W. G. Clark, M. L. Guerinot et H. B. Pakrasi. 1999, «The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range», *Plant Molecular Biology*, vol. 40, p. 37–44.

Kuzyakov, Y., J. K. Friedel et K. Stahr. 2000, «Review of mechanisms and quantification of priming effect», *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32, p. 1485–1498.

L

- Lamont, B. 1982, «Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants, with particular reference to mediterranean South Africa abd Western Australia», *The Botanical Review*, vol. 48, p. 597–689.
- Lan, M. U., N. B. Comerford et T. R. Fox. 1995, «Organic anions effect on phosphorus release from spodic horizons», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 59, n° 6, p. 1745–1749.
- Langmuir, D. 1978, «Uranium solution-mineral equilibria at low temperature with applications to sedimentary ore deposits», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 42, p. 547–569.
- Lanno, R., J. Wells, J. Conder, K. Bradham et N. Basta. 2004, «The bioavailability of chemicals in soil for earthworms», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, n° 1, p. 39–47.
- Lapeyrie, F., G. A. Chilvers et C. A. Bhem. 1987, «Oxalate acid synthesis by the mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Battsch. ex. Fr.) Fr.», *New Phytologist*, vol. 106, p. 139–146.
- Laroche, L. 2005, *Transfert racinaire de l'uranium (VI) en solution chez une plante supérieure. Spéciation en solution hydroponique, prise en charge par la plante, microlocalisation et effets biologiques induits*, thèse de doctorat, Aix-Marseille Université, Marseille (France).
- Laurette, J., C. Larue, I. Llorens, D. Jaillard, P.-H. Jouneau, J. Bourguignon et M. Carrière. 2012a, «Speciation of uranium in plants upon root accumulation and root-to-shoot translocation : A XAS and TEM study», *Environmental and Experimental Botany*, vol. 77, p. 87–95.
- Laurette, J., C. Larue, C. Mariet, F. Brissot, H. Khodja, J. Bourguignon et M. Carrière. 2012b, «Influence of uranium speciation on its accumulation and translocation in three plant species : oilseed rape, sunflower and wheat», *Environmental and Experimental Botany*, vol. 77, p. 96–107.
- Lebourg, A., T. Sterckeman, H. Ciesielski et N. Proix. 1998a, «Trace metal speciation in three unbuffered salt solution used to assess their bioavailability in soil», *Journal of Environmental Quality*, vol. 27, n° 3, p. 584–590.
- Lebourg, A., T. Sterckeman, H. Ciesielski, N. Proix et A. Gomez. 1998b, «Estimation of soil trace metal bioavailability using unbuffered sal solution : degree of saturation of polluted soil extracts», *Environmental Technology*, vol. 19, n° 3, p. 243–252.
- Leifeld, J., S. Siebert et I. Kogel-Knaber. 2002, «Biological activity and organic matter mineralization of soils amended with biowaste composts», *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 165, p. 151–159.
- Lenhart, J. J. et B. D. Honeyman. 1999, «Uranium (VI) sorption to hematite in the presence of humic acid», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 63, p. 2891–2901.

Lozano, J. C., P. Blanco Rodríguez, F. Vera Tomé et C. Prieto Calvo. 2011, «Enhancing uranium solubilization in soils by citrate, EDTA and EDDS chelating amendments», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 198, p. 224–231.

Lundström, U. S. 1994, «Significance of organic acids for weathering and the podzolization process», *Environment International*, vol. 20, n° 1, p. 21–30.

M

Marschner, H. 2002a, «Nutrient availability in soils», dans *Mineral nutrition of higher plants*, édité par H. Marschner, 2^e éd., chap. 13, Academic Press - Elsevier Science, London (United Kingdom), p. 483–507.

Marschner, H. 2002b, «The soil-root interface (rhizosphere) in relation to mineral nutrition», dans *Mineral nutrition of higher plants*, édité par H. Marschner, 2^e éd., chap. 15, Academic Press - Elsevier Science, London (United Kingdom), p. 537–595.

Marschner, H., V. Römheld et I. Calmak. 1987, «Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere», *Journal of Plant Nutrition*, vol. 10, p. 9–16.

Marschner, H., V. Römheld, W. J. Horst et P. Martin. 1986, «Root induced changes in the rhizosphere : importance for the mineral nutrition of plants», *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 149, p. 441–456.

Mason, C. F. V., W. R. Turney Jr., B. M. Thomson, N. Lu, P. A. Longmire et C. J. Chisholm-Brause. 1997, «Carbonate leaching of uranium from contaminated soils», *Environmental Science and Technology*, vol. 31, p. 2707–2711.

McBride, M. B. 1989, «Reactions controlling heavy metal solubility in soils», *Advances in Soil Sciences*, vol. 10, p. 1–56.

McBride, M. B. 2001, «Cupric ion activity in peat soil as an indicator of toxicity in maize», *Journal of Environmental Quality*, vol. 30, p. 78–84.

McLaughlin, M., E. Smolders et R. Merckx. 1998, «Soil-Root interface physicochemical processes», dans *Soil chemistry and ecosystem health*, édité par P. M. Huand, D. C. Adriano et R. T. Checkai, chap. 9, Soil Science Society of America Inc., Madison (USA), p. 233–277.

Menzies, N. W., M. J. Donn et P. M. Kopittke. 2007, «Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils», *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 121–130.

Meyer, M. C. et T. McLendon. 1997, «Phytotoxicity of depleted uranium on three grasses characteristic of different successional stages», *Journal of Environmental Quality*, vol. 26, p. 748–752.

Michaud, A. 2007, *Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées - mécanismes physiologiques et rhizosphérique* -, thèse de doctorat, Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques, Montpellier (France).

- Mihalík, J., P. Henner, S. Frelon, V. Camilleri et L. Février. 2012, «Citrate assisted phytoextraction of uranium by sunflowers : study of fluxes in soils and plants and resulting *intra-planta* distribution of Fe and U», *Environmental and Experimental Botany*, vol. 77, p. 249–258.
- Misson, J., P. Henner, M. Morello, M. Floriani, T. D. Wu, J. L. Guerquin-Kern et L. Février. 2009, «Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability», *Environmental and Experimental Botany*, vol. 67, p. 353–362.
- Misson, J., K. G. Raghothama, A. Jain, J. Jouhet, M. A. Block, R. Bligny, P. Ortet, A. Creff, S. Somerville, N. Rolland, P. Doumas, P. Nacry, L. Herrerra-Estrella, L. Nussaume et M.-C. Thibaud. 2005, «A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, n° 33, p. 11 934–11 939.
- Mkandawire, M., K. Vogel, B. Taubert et E. G. Dudel. 2007, «Phosphate regulates uranium(VI) toxicity to *Lemna gibba* L. G3», *Environmental Toxicology*, vol. 22, p. 9–16.
- Morrison, S. J., V. S. Tripathi et R. R. Spangler. 1995, «Coupled reaction/transport modeling of a chemical barrier for controlling uranium (VI) contamination in groundwater», *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 17, p. 347–363.
- Moulin, V., J. Tits et G. Ouzounian. 1992, «Actinide speciation in the presence of humic substances in natural water conditions», *Radiochimica Acta*, vol. 58/59, p. 179.
- Murthy, T. C. S., P. Weinberg et M. P. Measures. 1984, «Uranium effects on the growth of soybean (*Glycine max* (L.) Merr)», *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 32, p. 580–584.

N

- Neumann, G., A. Massonneau, N. Langlade, B. Dinkelaker, C. Hengeler, V. Römheld et E. Martinoia. 2000, «Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.)», *Annals of Botany*, vol. 85, p. 909–919.
- Neumann, G., A. Massonneau, E. Martinoia et V. Römheld. 1999, «Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin», *Planta*, vol. 208, p. 373–382.
- NF ISO 17402. 2008, «Qualité du sol - Lignes directrices pour la sélection et l'application des méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants dans le sol et les matériaux du sol», Geneva (Switzerland).
- Nguyen, C. 2003, «Rhizodeposition of organic C by plants : Mechanisms and control», *Agronomy for Sustainable Development*, vol. 23, n° 5-6, p. 375–396.

Nolan, A. L., H. Zhang et M. J. McLaughlin. 2005, «Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin film, extraction, and isotopic dilution techniques», *Journal of Environmental Quality*, vol. 34, p. 496–507.

O

OECD. 2000, «Absorption - desorption using a batch equilibrium method. Test guidelines 106, Organisation for Economic Co-operation and Development. Updated Guideline, adopted 21st January 2000», .

Oh, N.-H. et D. D. Richter. 2004, «Soil acidification induced by elevated atmospheric CO₂», *Global Change Biology*, vol. 10, n° 11, p. 1936–1946.

Olayinka, A. 2001, «Effect of co-applied cowdung and inorganic nitrogen on microbial respiration in soil under laboratory conditions», *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, vol. 32, p. 3229–3242.

P

Panda, B. B., K. K. Panda, J. P. Patra, G. K. Sahu et R. K. Mitra. 2001, «Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of uranyl nitrate on *Allium* assay system», *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 39, p. 57–62.

Pandolfini, T., R. Babrielli et C. Comparini. 1992, «Nickel toxicity and peroxydase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L.», *Plant, Cell & Environment*, vol. 15, p. 719–725.

Paquet, M., C. Adam-Guillermin, E. Ansoborlo, K. Beaugelin-Seiller, M. Carrière, I. Dublineau, F. Taran et C. Vidaud. 2009, «Uranium», dans *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*, édité par M.-T. Ménager, J. Garnier-Laplace et M. Goyffon, chap. 23, TEC & DOC Lavoisier, Paris (France), p. 411–443.

Parfitt, R. J., R. J. Atkinson et R. S. C. Smart. 1975, «The mechanism of phosphate fixation by iron oxides», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 39, n° 5, p. 837–841.

Parker, D. R. et J. F. Pedler. 1997, «Reevaluating the free-ion activity model of trace metal availability to higher plants», *Plant and Soil*, vol. 196, n° 2, p. 223–228.

Parker, D. R., J. F. Pedler, Z. A. S. Ahnstrom et M. Resketo. 2001, «Reevaluating the free-ion activity model of trace metal toxicity toward higher plants : experimental evidence with copper and zinc», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20, n° 4, p. 899–906.

Payne, T. E., J. A. Davis et T. D. Waite. 1996, «U sorption on ferrihydrite – effets of phosphate and humic acid», *Radiochimica Acta*, vol. 74, p. 239–243.

Peijnenburg, W. J. G. M. et T. Jager. 2003, «Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals : matrix issues», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56, n° 1, p. 63–77.

- Peijnenburg, W. J. G. M., L. Posthuma, H. J. P. Eijsackers et H. E. Allen. 1997, «A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 37, n° 2, p. 163 – 172.
- Perrier, T. 2004, *Etude théorique et expérimentale du comportement biogéochimique de l’Americium-241 en conditions rhizosphériques simplifiées. Application dans un sol agricole calcaire*, thèse de doctorat, Université de Lorraine, Nancy (France).
- Pfeifer, H.-R., M. Vust, N. Meisser, R. Doppenberg, R. Croci Torti, F.-L. Domergue, C. Keller et J. Hunziker. 1994, «Uranium-enrichment in soils and plants in the vicinity of a pitchblende vein at La Creusaz/Les Marécottes (W of Martigny, Valais, Switzerland)», *Ecolgae Geologicae Helvetiae*, vol. 87, n° 2, p. 491–501.
- Plant, J. A., S. Reeder, R. Salminen, D. B. Smith, T. Tarvainen, B. De Vivo et M. G. Peterson. 2003, «The distribution of uranium over Europe : geological and environmental significance», *Applied Earth Science*, vol. 112, p. 221–238.
- Porcelli, D., P. S. Andersson, G. J. Wasserburg, J. Ingri et M. Baskaran. 1997, «The importance of colloids and mires for the transport of uranium isotopes through the Kalix River watershed and Baltic Sea», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 61, n° 19, p. 4095–4113.
- Pradines, C., V. Wiktor, V. Camilleri et R. Gilbin. 2005, «Development of biochemical methods to estimate the subcellular impact of uranium exposure on *Chlamydomonas reinhardtii*», *Radioprotection*, vol. 40, n° 1, p. S163–S168.
- Punshon, T., K. F. Gaines, P. M. Bertsch et J. Burger. 2003, «Bioavailability of uranium and nickel to vegetation in a contaminated riparian ecosystem», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 22, n° 5, p. 1146–1154.

R

- R Development Core Team. 2011, «The R Project for Statistical Computing», Vienna (Austria). <http://www.r-project.org>.
- Ragnarsdottir, K. V. et L. Charlet. 2000, «Uranium behaviour in natural environments», dans *Environmental mineralogy : microbial interactions, anthropogenic influences, contaminated land and waste management, Mineralogical Society Series*, vol. 9, édité par J. D. Cotter-Howells, L. S. Campbell, E. Valsami-Jones et M. Batchelder, Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, Twickenham (United Kingdom), p. 245–289.
- Ratsch, H. C. et D. Johndro. 1986, «Comparative toxicity of six test chemicals to lettuce using two root elongation test methods», *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 6, n° 3, p. 267–276.
- Rauret, G., J. F. Lopez-Sanchez, A. Sahuquillo, R. Rubio, C. Davison, A. Ure et P. H. Quevauviller. 1999, «Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials», *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 1, p. 57–61.

- Ray, T. C., J. A. Callow et J. F. Kennedy. 1988, «Composition of root mucilage polysaccharides from *Lepidium sativum*», *Journal of Experimental Botany*, vol. 39, p. 1249–1261.
- Rensing, C. et R. M. Maier. 2003, «Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 56, n° 1, p. 140–147.
- Reuss, J. O. et D. W. Johnson. 1986, *Acid deposition and the acidification of soils*, Springer-Verlag, New York (United States).
- Rhodes, D. W. 1957, «The effect of pH on the uptake of radioactive isotopes from solution by a soil», *Soil Science Society of America Journal*, vol. 21, n° 4, p. 389–392.
- Richau, K. H., A. D. Kozhevnikova, I. V. Seregin, R. Vooijs, P. L. M. Koevoets, J. A. C. Smith, V. B. Ivanov et H. Schat. 2009, «Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*», *New Phytologist*, vol. 183, p. 106–116.
- Richter, D. D., D. Markewitz, C. G. Wells, H. L. Allen, J. Dunscomb, K. Harrison, P. R. Heine, A. Stuanes, B. Urrego et G. Bonani. 1995, «Carbon cycling in an old-field pine forest: implications for the missing carbon sink and for the concept of soil», dans *Carbon forms and functions in forest soils*, édité par W. McFee et J. M. Kelly, Soil Science Society of America, Madison (United States), p. 233–251.
- Richter, D. d., N.-H. Oh, R. Fimmen et J. Jackson. 2007, «The Rhizosphere and Soil Formation», dans *The Rhizosphere – An Ecological Perspective*, édité par Z. G. Cardon et J. L. Whitbeck, chap. 8, Elsevier Academic Press, Burlington & San Diego (United States), London (United Kingdom), p. 179–200.
- Romero Guzmán, E. T., M. V. Esteller Alberich et E. Ordoñez Regil. 2002, «Uranium and phosphate behavior in the vadose zone of a fertilized corn field», *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 254, p. 509–517.
- Römheld, V. et H. Marschner. 1990, «Different strategies for iron acquisition in higher plants», *Physiologia Plantarum*, vol. 70, p. 231–234.
- Rufyikiri, G., J. Wannijn, L. Wang et Y. Thiry. 2006, «Effects of phosphorus fertilization on the availability and uptake of uranium and nutrients by plants grown on soil derived from uranium mining debris», *Environmental Pollution*, vol. 141, p. 420–427.

S

- Sauvé, S., W. Hendershot et A. H. E. 2000, «Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils : dependence on pH, total metal burden, and organic matter», *Environmental Science and Technology*, vol. 34, p. 1125–1131.
- Schat, H. et W. M. Ten Bookum. 1992, «Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*», *Heredity*, vol. 68, p. 219–229.
- Schultz, M. K., W. C. Burnett et K. G. W. Inn. 1998, «Evaluation of a sequential extraction method for determining actinide fractionation in soils and sediments», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 40, p. 155–174.

- Shahandeh, H. et L. R. Hossner. 2002, «Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium», *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 141, p. 165–180.
- Shen, J., H. Li, G. Neumann et F. Zhang. 2005, «Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system», *Plant Science*, vol. 168, p. 837–845.
- Sheppard, M. I. et W. G. Evenden. 1988, «Critical compilation and review of plant/soil concentration ratios of uranium, thorium and lead», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 8, p. 255–285.
- Sheppard, M. I. et D. H. Thibault. 1988, «Migration of technetium, iodine, neptunium, and uranium in the peat of two minerotrophic mires», *Journal of Environmental Quality*, vol. 17, p. 644–653.
- Sheppard, S. C. et W. G. Evenden. 1989, «Comparison of partition coefficients for ^{54}Mn and soil-extractable Mn, including relationship to plant uptake», *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 69, p. 351–365.
- Sheppard, S. C. et W. G. Evenden. 1992, «Bioavailability indices for uranium : effect of concentration in eleven soils», *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 23, p. 117–124.
- Sheppard, S. C., W. G. Evenden et A. J. Anderson. 2006, «Multiple assays of uranium in soil», *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 7, p. 275–294.
- Sheppard, S. C., M. I. Sheppard, M.-O. Gallerand et B. Sanipelli. 2005, «Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 79, p. 55–83.
- Shishkunova, L. V., S. M. Grashchenko et V. N. Strukov. 1989, «Entry of uranium, thorium, and radium isotopes into plants from soils and fertilizers», *Soviet Radiochemistry*, vol. 30, n° 3, p. 385–391.
- Shu, L., J. Shen, Z. Rengel, C. Tang, F. Zhang et G. R. Cawthray. 2007, «Formation of cluster roots and citrate exudation by *Lupinus albus* in response to localized application of different phosphorus sources», *Plant Science*, vol. 172, p. 1017–1027.
- Smith, M. H., J. J. Alberts, D. C. Adriano, K. W. McLeod et J. E. Pinder. 1983, «Critical pathways of radionuclides to man from agro-ecosystems», rapport technique, Savannah River Ecology Lab., Aiken (USA).
- Stebbing, A. R. D. 1982, «Hormesis - the stimulation of growth by low levels of inhibitors», *Science of the Total Environment*, vol. 22, p. 213–234.
- Sterckeman, T., J. Perrigüey, M. Caël et J.-L. Morel. 2004, «Applying a mechanistic model to cadmium uptake by *Zea mays* and *Thlaspi caerulescens* : consequences for the assessment of the soil quantity and capacity factors», *Plant and Soil*, p. 289–302.
- Stojanović, M. D., D. R. Stevanović, J. V. Milojković, M. S. Grubišić et D. A. Ileš. 2009, «Phytotoxic effect of the uranium on the growing up and development the plant of corn», *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 209, p. 401–410.

- Stoklasa, J. et J. Penkava. 1928, «The biology of uranium», *Biochemische Zeitschrift*, vol. 194, p. 15–76.
- Straczek, A., L. Duquène, D. Wegrzynek, E. Chinea-Cano, J. Wannijn, J. Navez et H. Vandenhove. 2010, «Differences in U root-to-shoot translocation between plant species explained by U distribution in roots», *Journal of Environmental Radioactivity*, vol. 101, n° 3, p. 258–266.
- Strobel, B. W. 2001, «Influence of vegetation on low-molecular-weight carboxylic acids in soil solution-a review», *Geoderma*, vol. 99, n° 3, p. 169–198.

T

- Tessier, A., P. G. C. Campbell et M. Bisson. 1979, «Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals», *Analytical Chemistry*, vol. 51, p. 844–851.
- Thakali, S., H. E. Allen, D. M. Di Toro, A. A. Ponizovsky, C. P. Rooney, F.-J. Zhao et S. P. McGrath. 2006, «A terrestrial biotic ligand model. 1. Development and application to Cu and Ni toxicities to barley root elongation in soils», *Environmental Science and Technology*, vol. 40, p. 7085–7093.

U

- Uren, N. C. 2000, «Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants», dans *The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*, édité par R. Pinton, Z. Varanini et P. Nannipieri, Marcel Dekker, New York (United States), p. 19–40.

V

- Van Assche, F., C. Cardinaels et H. Clijsters. 1988, «Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity : dose-response relations in *Phaseolus vulgaris* L., treated with zinc and cadmium», *Environmental Pollution*, vol. 52, n° 2, p. 103–115.
- Vance, C. P., C. Uhde-Stone et D. L. Allan. 2003, «Phosphorus acquisition and use : critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource», *New Phytologist*, vol. 157, n° 3, p. 423–447.
- Vandenhove, H., K. Antunes, J. Wannijn, L. Duquène et M. V. Van Hees. 2007a, «Method of diffusive gradients in thin film (DGT) compared with other soil testing methods to predict uranium bioavailability», *Science of the Total Environment*, vol. 373, p. 542–555.
- Vandenhove, H., A. Cuypers, M. Van Hees, G. Koppen et J. Wannijn. 2006, «Oxydative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium», *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 44, p. 795–805.

- Vandenhove, H., M. Van Hees, J. Wannijn, K. Wouters et L. Wang. 2007b, «Can we predict uranium bioavailability based on soil parameters ? Part 2 : soil solution uranium concentration is not a good bioavailability index», *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 577–586.
- Vandenhove, H., M. Van Hees, K. Wouters et J. Wannijn. 2007c, «Can we predict uranium bioavailability based on soil parameters ? Part 1 : effect of soil parameters on soil solution uranium concentration», *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 587–595.
- Vandenhove, H., J. Wannijn, L. Duquène et M. V. Van Hees. 2009, «Method of diffusive gradients in thin film (DGT) compared with other soil testing methods to predict phytoavailability of uranium and selected heavy metals from multipolluted soils», *Radioprotection*, vol. 44, n° 5, p. 493–498.
- Van der Lee, J. 1998, «Thermodynamic and mathematical concept of CHESS», rapport technique, École des mines de Paris, Fontainebleau (France).
- Van der Lee, J. et C. Lomenech. 2003, «Towards a common thermodynamic database for speciation models», *Radiochimica Acta*, vol. 92, p. 811–818.
- Vanhoudt, N., H. Vandenhove, K. Smeets, T. Remans, M. Van Hees, J. Wannijn, J. Vangronsveld et A. Cuypers. 2008, «Effects of uranium and phosphate concentrations on oxydative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*», *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 46, p. 987–996.
- Verpoorte, R. 2000, «Plant secondary metabolism», dans *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, édité par R. Verpoorte et A. W. Alfermann, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands), p. 1–29.
- Vert, G., N. Grotz, F. Dédaldéchamp, F. Gaymard, M. L. Guerinot, J.-F. Briat et C. Curie. 2002, «IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth», *The Plant Cell*, vol. 14, p. 1223–1233.
- Viehweger, K. et G. Geipel. 2010, «Uranium accumulation and tolerance in *Arabidopsis halleri* under native versus hydroponic conditions», *Environmental and Experimental Botany*, vol. 69, n° 1, p. 39–46.

W

- Waisel, Y., A. Eshel et U. Kafkafi. 2002, *Plant roots: the hidden half*, 3^e éd., Marcel Dekker Incorporated, New York (United States), 1136 p..
- Waite, T. D., J. A. Davis, T. E. Payne, G. A. Waychunas et N. Xu. 1994, «U(VI) sorption to ferrihydrite : application of the surface complexation model», *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 58, p. 5465–5478.
- Wang, B. L., J. B. Shen, W. H. Zhang, F. S. Zhang et G. Neumann. 2007, «Citrate exudation from white lupin induced by phosphorus deficiency differs from that induced by aluminium», *New Phytologist*, vol. 3, p. 581–589.
- Wang, W. 1985, «Use of millet root elongation for toxicity tests of phenolic compounds», *Environment International*, vol. 11, p. 95–98.

Weigel, F. 1986, «Uranium», dans *The chemistry of the actinide elements*, édité par J. J. Katz, G. T. Seaborg et L. R. Morss, 2^e éd., chap. 5, Chapman and Hall, London (United Kingdom), New York (United States).

Wong, M. H. et A. D. Bradshaw. 1982, «A comparison of the toxicity of heavy metals, using root elongation of rye grass, *Lolium perenne*», *New Phytologist*, vol. 91, n^o 2, p. 255–261.

Y

Yamamoto, T., E. Yunoki, M. Yamakawa et M. Shimizu. 1973, «Studies on environmental contamination by uranium. 3. Effects of carbonate ion on uranium adsorption to and desorption from soils», *Journal of Radiation Research*, vol. 14, n^o 3, p. 219–224.

Z

Zhang, H., E. Lombi, E. Smolders et S. P. McGrath. 2004, «Kinetics of Zn release in soils and prediction of Zn concentration in plants using diffusive gradients in thin film», *Environmental Science and Technology*, vol. 38, p. 3608–3613.

Zhang, H., F. J. Zhao, B. Sun, W. Davison et S. P. McGrath. 2001, «A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants», *Environmental Science and Technology*, vol. 35, p. 2602–2607.

Zhao, F. J., C. P. Rooney, H. Zhang et S. P. McGrath. 2006, «Comparison of soil solution speciation and diffusive gradients in thin-films measurement as an indicator of copper bioavailability to plants», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, n^o 3, p. 733–742.

Zheng, Z., T. K. Tokunaga et J. Wan. 2003, «Influence of calcium carbonate on U(VI) sorption to soils», *Environmental Science and Technology*, vol. 37, p. 5603–5608.

Zuyi, T., C. Taiwei, D. Jinzhou, D. Xiongxin et G. Yingjie. 2000, «Effect of fulvic acids on sorption of U(VI), Zn, Yb, I and Se(IV) onto oxides of aluminum, iron and silicon», *Applied Geochemistry*, vol. 15, n^o 2, p. 133–139.

PARTIE IX

Annexes

La dernière partie du manuscrit consacrée aux annexes regroupe :

- des documents complémentaires évoqués tout au long du propos mais qui n'ont pas été présentés en détails tels que des tableaux et graphiques fournissant un complément d'information (chapitre A) ;
- une liste des publications et participations en congrès ayant permis de partager ces travaux de recherche avec la communauté scientifique, ainsi que l'article publié dans le *Journal of Environmental Radioactivity* (chapitre B) ;
- des informations relatives à l'expérience d'encadrement d'un stagiaire pendant le doctorat (chapitre C) ;
- les résumés de la thèse en version française et anglaise (chapitre D).

A Documents complémentaires

Ci-dessous la liste des tableaux et figures mis à disposition dans ce chapitre :

- page 178 : préparation des solutions stocks ;
- page 179 : accumulation d'uranium dans les racines et parties aériennes ;
- page 188 : K_d désorption de l'uranium en réacteurs fermés ;
- page 180 : comportement des cations majeurs dans les réacteurs fermés ;
- page 181 : comportement des anions majeurs dans les réacteurs fermés ;
- page 182 : flux d'acides organiques mesurés sur les tapis racinaires des rhizotests ;
- page 183 : flux d'acides organiques mesurés sur les rhizotests entiers ;
- page 184 : flux d'anions majeurs mesurés dans la solution de collecte d'exsudats ;
- page 185 : accumulation de cations dans les racines et parties aériennes du lupin cultivé sur rhizotests ;
- page 186 : facteurs de transfert de l'uranium du sol à la plante (page 1) ;
- page 187 : facteurs de transfert de l'uranium du sol à la plante (page 2).

Préparation des macroéléments.

Famille	Composé		Stock		Solution Nutritive (SN)		
	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	Volume (mL)	Concentration (M)	À peser (g)	Concentration (mM)	Volume à ajouter pour xL de SN (mL)
chélatant	FeEDTA	367,10	100	0,04	1,4684	0,02	0,5x
macroélément	KCl	74,56	100	0,10	0,7456	0,10	x
macroélément	K ₂ SO ₄	174,27	200	0,35	12,1989	0,70	2x
macroélément	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,47	100	0,50	12,3235	0,50	x
macroélément	KH ₂ PO ₄	136,09	100	0,10	1,3609	P+ : 0,10 P- : 0,001	P+ : x P- : 0,01x
macroélément	Ca(NO ₃) ₂	164,10	100	1,00	16,4100	2,00	2x

Préparation des microéléments.

Famille	Composé		Stock		Solution Nutritive (SN)		
	Formule chimique	Masse molaire (g/mol)	Volume (mL)	Concentration (M)	À peser (g)	Concentration (mM)	Volume à ajouter pour xL de SN (mL)
microélément	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1235,90	100	0,01	1,2359	0,01	x
microélément	CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,68	100	0,20	4,9936	0,20	x
microélément	H ₃ BO ₃	61,83	100	10,00	61,8300	10,00	x
microélément	MnSO ₄ ·H ₂ O	169,01	100	0,50	8,4505	0,50	x
microélément	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,54	100	0,50	14,3770	0,50	x

TABLE A.1: Détail de la préparation des solutions stocks.

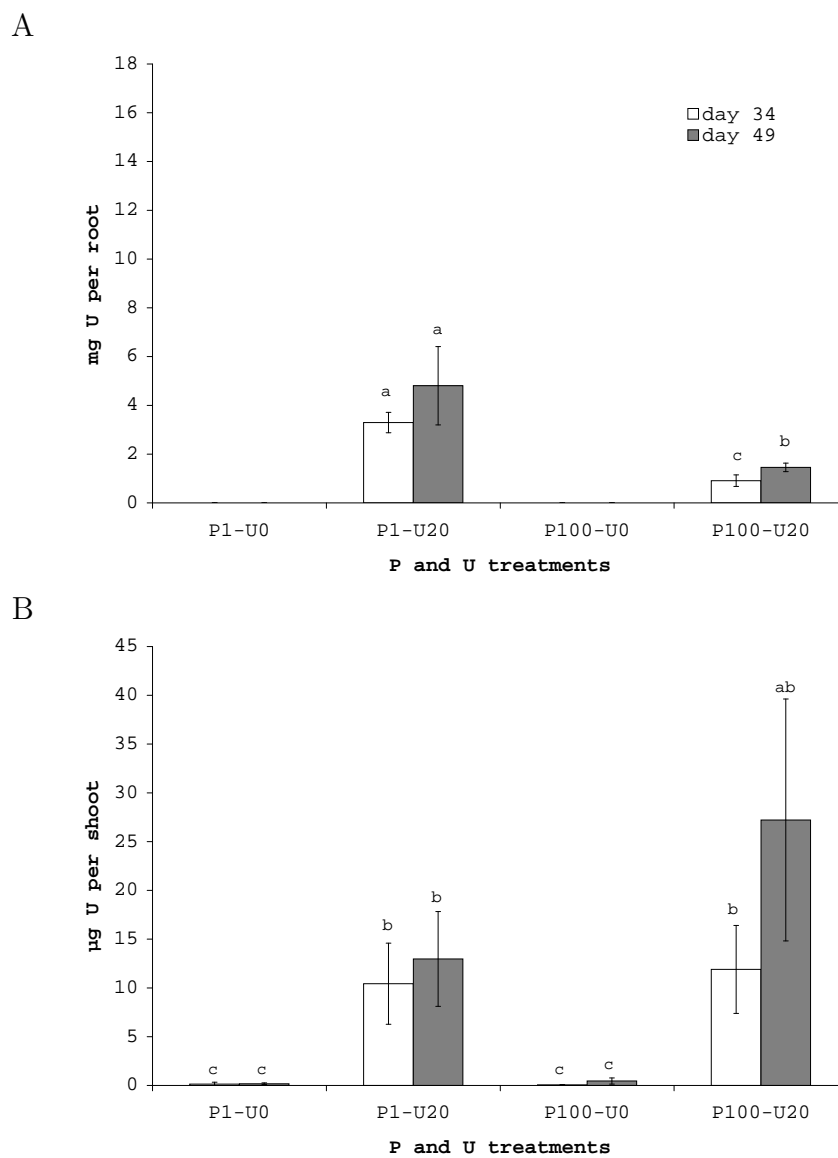


FIGURE A.1: Accumulation d'uranium dans les racines (A) et les parties aériennes (B) après 34 et 49 jours de culture en condition -P (1 μM) ou +P (100 μM) et en absence (0 μM) ou présence (20 μM) d'uranium. Moyennes \pm écart-type ($n=5$). Des lettres différentes indiquent des groupes statistiques significativement différents ($P < 0.05$).

TABLE A.2: Comportement des cations majeurs (Fe, Mg, Ca et K) dans les réacteurs fermés. Détail des quantités d'élément désorbé ou resorbé sur le sol en mg X g^{-1} de sol sec. Les valeurs positives (en noir) indiquent un échange majoritaire du sol vers la solution d'incubation, et les valeurs négatives (en rouge) un échange majoritaire dans le sens inverse (équation 14.1). La colonne P indique l'apport en phosphore (+ : 100 μM ; - 1 μM) et la colonne C indique la concentration en citrate (0 : 0 mg l^{-1} ; 1 : 10.15 mg l^{-1} ; 2 : 40.60 mg l^{-1}). Moyenne \pm écart-type entre parenthèses ($n=3$)

Cation	P	C	mg X g^{-1} de sol sec					
			Continu	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Fe	+	0	-0.00065 (0.00013)	-0.00190 (0.00009)	0.00150 (0.00028)	-0.00026 (0.00013)	0.00022 (0.00007)	0.00051 (0.00009)
	-	0	0.00055 (0.00013)	0.00028 (0.00004)	0.00090 (0.00051)	-0.00035 (0.00011)	0.00010 (0.00003)	0.00033 (0.00017)
	+	1	0.00047 (0.00012)	0.00054 (0.00016)	0.00320 (0.00039)	-0.00059 (0.00008)	0.00020 (0.00017)	0.00048 (0.00016)
	-	1	0.00035 (0.00010)	0.00044 (0.00001)	0.00054 (0.00004)	0.00014 (0.00005)	-0.00003 (0.00004)	0.00032 (0.00005)
	+	2	0.00027 (0.00010)	0.00145 (0.00011)	0.00146 (0.00029)	-0.00015 (0.00009)	0.00074 (0.00008)	-0.00020 (0.00026)
	-	2	0.00032 (0.00011)	0.00129 (0.00012)	-0.00191 (0.00010)	0.00017 (0.00005)	0.00000 (0.00006)	0.00025 (0.00008)
Mg	+	0	0.0273 (0.0022)	0.0432 (0.0041)	-0.00110 (0.0006)	0.0048 (0.0003)	-0.0026 (0.0006)	0.0010 (0.0009)
	-	0	0.0100 (0.0016)	0.0095 (0.0009)	0.0077 (0.0002)	0.0061 (0.0005)	0.0012 (0.0003)	0.0029 (0.0008)
	+	1	0.0158 (0.0014)	0.0147 (0.0040)	0.0056 (0.0032)	0.0063 (0.0028)	0.0004 (0.0016)	0.0030 (0.0014)
	-	1	0.0006 (0.0006)	0.0024 (0.0003)	0.0134 (0.0006)	0.0024 (0.0007)	0.0025 (0.0003)	0.0039 (0.0002)
	+	2	0.0127 (0.0010)	0.0145 (0.0003)	0.0053 (0.0003)	0.0066 (0.0002)	0.0006 (0.0004)	0.0020 (0.0009)
	-	2	0.0055 (0.0046)	0.0016 (0.0007)	0.0087 (0.0013)	0.0059 (0.0007)	0.0014 (0.0004)	0.0040 (0.0002)
Ca	+	0	0.022 (0.016)	0.234 (0.027)	-0.006 (0.002)	0.027 (0.002)	-0.043 (0.005)	-0.013 (0.003)
	-	0	-0.094 (0.006)	-0.053 (0.003)	-0.029 (0.002)	-0.008 (0.002)	-0.046 (0.003)	-0.015 (0.006)
	+	1	-0.092 (0.005)	-0.054 (0.002)	-0.031 (0.003)	-0.010 (0.005)	-0.052 (0.001)	-0.024 (0.002)
	+	1	-0.100 (0.003)	-0.049 (0.006)	-0.025 (0.002)	-0.003 (0.001)	-0.045 (0.001)	-0.016 (0.002)
	+	2	-0.126 (0.007)	-0.069 (0.004)	-0.016 (0.006)	-0.004 (0.001)	-0.040 (0.003)	-0.019 (0.012)
	-	2	-0.088 (0.003)	-0.050 (0.004)	-0.038 (0.001)	-0.012 (0.002)	-0.040 (0.001)	-0.009 (0.001)
K	+	0	-0.118 (0.010)	-0.069 (0.007)	-0.021 (0.006)	-0.016 (0.002)	-0.029 (0.002)	-0.019 (0.007)
	-	0	-0.121 (0.007)	-0.110 (0.004)	-0.026 (0.003)	-0.022 (0.002)	-0.029 (0.000)	-0.049 (0.000)
	+	1	-0.145 (0.006)	-0.116 (0.035)	-0.018 (0.015)	-0.016 (0.010)	-0.027 (0.007)	-0.026 (0.005)
	-	1	-0.136 (0.002)	-0.123 (0.004)	-0.027 (0.003)	-0.017 (0.002)	-0.026 (0.002)	-0.043 (0.000)
	+	2	-0.116 (0.001)	-0.100 (0.003)	-0.046 (0.004)	-0.029 (0.001)	-0.034 (0.002)	-0.043 (0.012)
	-	2	-0.107 (0.006)	-0.099 (0.002)	-0.049 (0.002)	-0.029 (0.002)	-0.033 (0.000)	-0.043 (0.002)

TABLE A.3: Comportement des anions majeurs (chlorure, nitrate, sulfate, phosphate) dans les réacteurs fermés. Détail des quantités d'éléments désorbés ou resorbés sur le sol en mg X g^{-1} de sol sec. Les valeurs positives (en noir) indiquent un échange majoritaire du sol vers la solution d'incubation, et les valeurs négatives (en rouge) un échange majoritaire dans le sens inverse (équation 14.1). La colonne P indique l'apport en phosphore (+ : $100 \mu\text{M}$; - : $1 \mu\text{M}$) et la colonne C indique la concentration en citrate (0 : 0 mg l^{-1} ; 1 : 10.15 mg l^{-1} ; 2 : 40.60 mg l^{-1}). Données pour un seul échantillon par condition.

Anion	P	C	Continu	mg X g^{-1} de sol sec				
				Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Chlorures	+	0	0.01556	0.01098	0.00093	0.00117	-0.00180	0.00032
	-	0	0.01677	0.01842	-0.00082	-0.00192	0.00080	-0.00068
	+	1	0.01433	0.01811	0.00145	-0.00106	0.00070	-0.00040
	-	1	0.01967	0.00983	-0.00042	0.00380	-0.00111	-0.00144
	+	2	0.00800	0.01228	0.00157	0.00119	-0.00023	-0.00036
	-	2	0.01274	0.00187	-0.00133	0.00056	-0.00037	-0.00315
Nitrates	+	0	0.597	0.963	0.036	0.084	-0.127	0.018
	-	0	-0.010	0.288	-0.027	-0.137	0.043	-0.022
	+	1	0.119	-0.131	-0.093	-0.122	0.006	-0.038
	-	1	0.281	-0.112	-0.001	0.214	-0.081	-0.075
	+	2	-0.207	-0.045	0.097	0.044	-0.028	-0.020
	-	2	0.080	-0.377	-0.161	0.021	-0.029	-0.183
Sulfates	+	0	0.010	-0.112	0.034	0.015	-0.114	0.034
	-	0	-0.148	0.082	-0.040	-0.112	0.027	0.001
	+	1	-0.078	-0.160	-0.097	-0.099	0.002	0.009
	-	1	0.039	-0.253	-0.030	0.113	-0.062	-0.064
	+	2	-0.226	-0.123	0.007	0.004	-0.019	-0.010
	-	2	-0.123	-0.326	-0.144	-0.037	-0.035	-0.142
Phosphates	+	0	-0.03123	-0.04134	-0.03822	-0.03519	-0.03879	-0.03592
	-	0	-0.00010	-0.00002	-0.00025	-0.00016	-0.00036	-0.00016
	+	1	-0.03776	-0.04407	-0.04643	-0.04249	-0.03597	-0.03358
	-	1	0.00000	-0.00023	0.00000	-0.00010	0.00000	0.00000
	+	2	-0.04469	-0.04394	-0.04528	-0.04202	-0.03943	-0.03923
	-	2	0.00000	-0.00022	-0.00018	-0.00019	-0.00011	0.00000

TABLE A.4: Flux d'acides organiques ($\text{mmol g}^{-1} \text{MS racinaire h}^{-1}$) mesurés sur les tapis racinaires des rhizotests en fin de période de préculture (jour 38) et après contact avec le sol (jour 43). L'apport en phosphore en présence duquel les plantes ont été cultivées est indiqué par les symboles +P (100 μM) et -P (1 μM). Moyennes \pm écart-type ($n=13$ pour phase de préculture et $n=5$ pour phase de contact avec le sol).

Jour	Condition	Phosphore	Flux en $\text{mmol X g}^{-1} \text{MS racinaire h}^{-1}$									
			Citrate		Oxalate		Lactate		Acétate		Formate	
38	Hydroponie	-P	52.3	\pm 21.6	5.0	\pm 15.1	-9.8	\pm 1.2	-374.9	\pm 129.3	-363.8	\pm 76.8
38	Hydroponie	+P	29.4	\pm 7.6	23.8	\pm 7.9	-8.4	\pm 0.9	-323.3	\pm 103.0	-299.2	\pm 57.4
43	Contact sol	-P	93.1	\pm 20.2	172.4	\pm 38.7	-89.6	\pm 22.6	-22.5	\pm 106.1	-34.3	\pm 75.0
43	Contact sol	+P	193.0	\pm 44.7	192.6	\pm 50.3	-42.8	\pm 26.2	292.9	\pm 172.3	147.1	\pm 98.1

TABLE A.5: Flux d'acides organiques sur les rhizotests entiers (6 plantes) (nmol X par rhizotest h^{-1}) mesurés sur les tapis racinaires des rhizotests en fin de période de préculture (jour 38) et après contact avec le sol (jour 43). L'apport en phosphore en présence duquel les plantes ont été cultivées est indiqué par les symboles +P (100 μM) et -P (1 μM). Moyennes \pm écart-type ($n=13$ pour phase de préculture et $n=5$ pour phase de contact avec le sol).

Jour	Condition	Phosphore	Flux en nmol X par rhizotest h^{-1}									
			Citrate		Oxalate		Lactate		Acétate		Formate	
38	Hydroponie	-P	22.3	\pm 9.3	3.0	\pm 6.0	-3.7	\pm 0.3	-135.3	\pm 51.0	-133.9	\pm 27.2
38	Hydroponie	+P	12.7	\pm 3.4	10.0	\pm 3.5	-3.5	\pm 0.3	-127.5	\pm 48.6	-121.8	\pm 26.1
43	Contact sol	-P	45.7	\pm 11.3	-41.8	\pm 10.5	-89.6	\pm 22.6	-5.5	\pm 54.4	-14.2	\pm 37.3
43	Contact sol	+P	193.0	\pm 44.7	-20.5	\pm 12.6	-42.8	\pm 26.2	138.7	\pm 80.9	70.5	\pm 47.0

TABLE A.6: Flux d'anions majeurs (en $\text{mgX g}^{-1} \text{MS racinaire h}^{-1}$) mesurés dans les solutions de collecte d'exsudat en fin de période de préculture (jour 38) et après contact avec le sol (jour 43). L'apport en phosphore en présence duquel les plantes ont été cultivées est indiqué par les symboles +P (100 μM) et -P (1 μM). Moyennes \pm écart-type ($n=13$ pour phase de préculture et $n=5$ pour phase de contact avec le sol).

Jour	Condition	Phosphore	Flux en $\text{mgX g}^{-1} \text{MS racinaire h}^{-1}$							
			Chlorure	Phosphate	Nitrate	Sulfate				
38	Hydroponie	-P	0.042 \pm	0.014	0.000 \pm	0.001	1.23 \pm	0.43	10.98 \pm	4.28
38	Hydroponie	+P	0.028 \pm	0.013	0.009 \pm	0.012	0.60 \pm	0.44	5.83 \pm	2.18
43	Contact sol	-P	0.021 \pm	0.011	0.004 \pm	0.004	1.21 \pm	0.42	5.16 \pm	1.36
43	Contact sol	+P	0.037 \pm	0.007	0.042 \pm	0.036	0.67 \pm	0.23	5.82 \pm	1.60

TABLE A.7: Accumulation de cations (en mg de X) dans les racines et parties aériennes du lupin blanc mesurée sur rhizotests en fin de période de préculture (hydroponie) et après contact avec le sol (contact sol). L'apport en phosphore en présence duquel les plantes ont été cultivées est indiqué par les symboles +P (100 μM) et -P (1 μM). Moyennes \pm écart-type (n=4 en hydroponie et n=5 après contact avec le sol).

Organe	Condition	Phosphore	Accumulation en mg de X														
			Fe	Mg	Ca	Na	K										
Racines	Hydroponie	-P	0.157	±	0.006	0.551	±	0.076	2.096	±	0.204	1.443	±	0.167	20.451	±	1.762
	Hydroponie	+P	0.216	±	0.023	0.906	±	0.134	1.905	±	0.423	1.451	±	0.258	19.389	±	2.172
	Contact sol	-P	0.195	±	0.035	1.246	±	0.272	1.951	±	0.570	2.076	±	0.310	22.335	±	3.275
	Contact sol	+P	0.248	±	0.034	1.429	±	0.204	2.375	±	0.498	2.686	±	0.549	17.387	±	2.787
Parties aériennes	Hydroponie	-P	0.153	±	0.072	2.167	±	0.646	8.615	±	3.498	0.387	±	0.088	42.211	±	9.181
	Hydroponie	+P	0.099	±	0.066	3.607	±	1.708	11.577	±	10.277	0.622	±	0.204	52.518	±	17.797
	Contact sol	-P	0.183	±	0.045	3.461	±	0.592	14.486	±	3.688	1.057	±	1.002	66.486	±	7.930
	Contact sol	+P	0.240	±	0.067	6.683	±	2.359	24.453	±	7.397	1.122	±	0.402	83.820	±	26.234

TABLE 2. SOIL-TO PLANT TRANSFER FACTOR (F_p) VALUES FOR U

Plant Group	Plant Compartment	Soil	N	GM	GSD	AM	SD	Min	Max	#ref
All			781	2.3×10^{-2}	9.1	2.1×10^1	9.1×10^{-1}	3.0×10^{-5}	1.4×10^1	57
Cereals	Grain	All	59	6.2×10^{-3}	7.7	5.0×10^2	1.4×10^{-1}	1.6×10^{-4}	8.2×10^1	16
		Sand	6	8.9×10^{-3}	1.1×10^1	2.8×10^2	2.5×10^{-2}	1.9×10^{-4}	6.2×10^2	3
		Loam	20	7.7×10^{-3}	5.1	1.8×10^2	1.9×10^{-2}	1.6×10^{-4}	6.2×10^2	7
	Stems and shoots	Clay	11	3.8×10^{-3}	4.0	9.4×10^{-3}	1.5×10^{-2}	7.6×10^{-4}	5.0×10^2	4
		All	55	2.7×10^{-2}	7.5	1.4×10^1	4.8×10^{-1}	3.0×10^{-5}	3.5	13
		Sand	6	3.4×10^{-2}	6.0	7.5×10^2	6.5×10^{-2}	2.1×10^{-3}	1.7×10^1	3
Maize	Grain	Loam	25	5.4×10^{-2}	6.30	2.5×10^1	7.0×10^{-1}	7.4×10^{-4}	3.5	7
		Clay	8	1.0×10^{-2}	3.6	2.3×10^2	3.4×10^{-2}	2.8×10^{-3}	9.8×10^2	2
		All	9	1.5×10^{-2}	1.2×10^1	1.2×10^1	2.3×10^{-1}	5.0×10^{-4}	7.1×10^{-1}	5
Leafy Vegetables	Stems and shoots	All	11	7.8×10^{-3}	1.4×10^1	1.1×10^1	2.9×10^{-1}	1.6×10^{-4}	9.6×10^1	6
		Loam	108	2.0×10^{-2}	7.3	2.2×10^1	1.1	7.8×10^{-5}	8.8	15
		Sand	7	1.7×10^{-1}	1.5×10^1	1.5	3.3	1.5×10^{-3}	8.8	2
	Leaves	Loam	14	4.3×10^{-2}	3.9	8.7×10^2	8.8×10^{-2}	7.7×10^{-3}	2.7×10^1	3
		Clay	9	3.6×10^{-3}	4.2	1.0×10^2	1.6×10^{-2}	7.6×10^{-4}	4.3×10^2	3
		Peat	6	1.8×10^{-1}	9.7	1.5	3.2	7.9×10^{-3}	8.0	2
Non-leafy Vegetables	Fruits, heads, berries, buds	All	38	1.5×10^{-2}	4.2	3.6×10^2	5.3×10^{-2}	5.2×10^{-4}	2.0×10^1	10
		Sand	7	1.9×10^{-2}	5.5	4.9×10^2	6.0×10^{-2}	1.3×10^{-3}	1.6×10^1	2
		Loam	4	2.3×10^{-2}	2.2	2.8×10^2	1.7×10^{-2}	7.6×10^{-3}	4.7×10^2	2
Leguminous Vegetables	Stems and shoots	Clay	7	1.8×10^{-2}	4.2	4.8×10^2	7.4×10^{-2}	5.0×10^{-3}	2.0×10^1	2
		All	6	5.3×10^{-2}	9.9	2.6×10^1	3.5×10^{-1}	4.3×10^{-3}	7.1×10^1	4
		All	19	2.2×10^{-3}	1.2×10^1	2.2×10^2	4.6×10^{-2}	5.4×10^{-5}	1.5×10^1	10
	Pods	Loam	4	3.0×10^{-3}	1.8×10^1	1.5×10^2	2.2×10^2	5.4×10^{-5}	4.7×10^2	3
		Clay	7	5.5×10^{-4}	4.7	1.4×10^3	1.9×10^{-3}	5.7×10^{-5}	5.0×10^3	3

TABLE A.8: Facteurs de transfert de l'uranium du sol à la plante. Valeurs données pour différents types de plante, organe et sol (AIEA, 2009).

TABLE 2. SOIL-TO PLANT TRANSFER FACTOR (F_p) VALUES FOR U (Cont.)

Plant Group	Plant Compartment	Soil	N	GM	GSD	AM	SD	Min	Max	#ref
Leguminous Vegetables	Stems and shoots	All	21	6.4×10^{-2}	1.4×10^1	8.4×10^{-1}	2.0	7.4×10^{-4}	8.7	11
		Sand	6	2.8×10^{-1}	2.0×10^1	2.4	3.5	5.3×10^{-3}	8.7	4
Root Crops	Roots	Loam	6	1.2×10^2	6.2	3.5×10^2	5.1×10^2	7.4×10^{-4}	1.4×10^{-1}	5
		All	46	8.4×10^3	6.2	3.6×10^2	6.5×10^2	4.9×10^{-4}	2.6×10^{-1}	16
		Sand	9	7.8×10^3	5.9	3.8×10^2	7.6×10^2	9.9×10^{-4}	2.3×10^{-1}	6
		Loam	10	2.5×10^2	3.2	4.3×10^2	4.3×10^2	2.6×10^{-3}	1.2×10^{-1}	4
		Clay	5	6.8×10^3	6.2	2.3×10^2	3.9×10^2	7.9×10^{-4}	9.2×10^2	4
		All	37	2.8×10^2	5.4	9.5×10^2	1.6×10^2	2.0×10^{-3}	7.0×10^{-1}	12
Tubers	Tubers	Sand	9	2.5×10^2	5.6	6.7×10^2	8.3×10^2	2.0×10^{-3}	2.4×10^{-1}	5
		Loam	11	5.0×10^2	3.0	8.6×10^2	9.8×10^2	1.3×10^{-3}	3.2×10^{-1}	3
		Clay	5	1.1×10^2	4.3	2.2×10^2	2.3×10^2	2.0×10^{-3}	5.8×10^2	3
		All	28	5.0×10^3	6.4	1.7×10^2	2.4×10^2	1.8×10^{-4}	8.0×10^2	11
		Sand	4	1.9×10^2	3.8	3.3×10^2	3.4×10^2	4.3×10^{-3}	7.8×10^2	3
		Loam	3	2.8×10^2	3.2	4.0×10^2	3.6×10^2	8.2×10^{-3}	8.0×10^2	3
Fruit	Fruits	Clay	6	9.2×10^{-4}	3.0	1.5×10^3	1.7×10^3	1.9×10^{-4}	4.8×10^{-3}	3
		All	1			1.9×10^1				1
		All	11	1.2×10^2	5.9	5.7×10^2	1.2×10^1	1.3×10^{-3}	3.7×10^{-1}	5
		All	66	3.5×10^{-1}	3.6	6.7×10^1	1.1	3.6×10^{-4}	7.5	3
		All	9	3.6×10^2	4.9	1.1×10^1	1.6×10^{-1}	8.6×10^{-3}	4.1×10^{-1}	4
		All	39	7.1×10^2	3.9	3.1×10^1	1.2	8.9×10^{-3}	7.8	3
Herbs	Leaves (sunflower)	Sand	5	4.1×10^{-1}	5.3	1.7	3.4	1.6×10^{-1}	7.8	2
		Loam	22	7.1×10^2	2.9	1.2×10^1	1.4×10^1	1.0×10^{-2}	6.4×10^{-1}	2
		Clay	11	2.7×10^2	2.1	3.5×10^2	2.8×10^2	8.9×10^{-3}	1.0×10^{-1}	1
		All	2	1.5×10^2	2.4	1.8×10^2	1.5×10^2	8.2×10^{-3}	2.9×10^2	1
		All	147	1.7×10^2	9.4	1.2×10^1	4.9×10^1	2.0×10^{-4}	5.5	18
		All	19	1.6×10^2	1.7×10^1	2.5×10^1	5.0×10^1	5.5×10^{-4}	1.8	5
Grasses	Stems and shoots	Loam	34	9.8×10^3	8.4	5.5×10^2	1.0×10^1	3.1×10^{-4}	4.6×10^{-1}	5
		All	53	4.6×10^2	5.3	4.2×10^1	2.0	1.3×10^{-3}	1.4×10^1	9
		Sand	3	2.7×10^3	1.8	3.0×10^3	1.5×10^3	1.3×10^{-3}	3.9×10^3	1
		Loam	7	7.2×10^2	3.3×10^1	2.7	5.2	1.8×10^{-3}	1.4×10^1	3
		All	15	1.5×10^2	4.2	1.2×10^1	4.0×10^1	2.0×10^{-3}	1.6	4
		Sand	12	1.0×10^2	2.0	1.2×10^2	5.9×10^3	2.0×10^{-3}	2.1×10^2	1

TABLE A.9: Facteurs de transfert de l'uranium du sol à la plante. Valeurs données pour différents types de plante, organe et sol (AIEA, 2009).

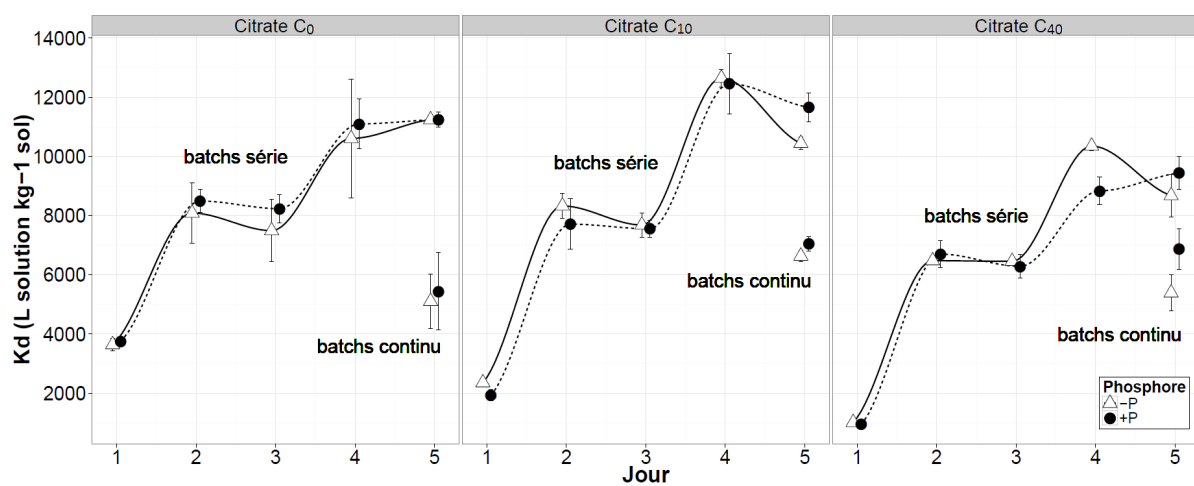


FIGURE A.2: Coefficient de partage solide-liquide (K_d désorption) de l'uranium en réacteurs fermés en L solution kg⁻¹ sol. Moyenne \pm écart-type (n=3).

B Valorisation de la thèse

B.1 Activités au sein de la communauté scientifique

Les travaux de recherche menés pendant cette thèse et les résultats présentés tout au long du manuscrit ont fait l'objet d'une valorisation à l'échelle nationale et internationale. Ils ont été exposés lors de congrès en France, en Allemagne et aux États-Unis. La première partie relative aux expériences réalisées en hydroponie a été acceptée par la communauté scientifique et publiée dans un journal international à comité de relecture. La version finale de cet article est disponible en page 191. Un second article consacré aux résultats des expériences réalisées en réacteurs fermés est actuellement en cours de rédaction et sera prochainement soumis pour revue. Ci-dessous la liste exhaustive des articles et participations en congrès en lien avec la thèse :

- Publications scientifiques :
 - Henner, P., Brédoire, F., **Tailliez, A.**, Pierrisnard, S., Camilleri, V. and Keller C. (in prep.) Influence of root exudation on uranium phytoavailability in soils : study with naturally uranium-rich soils and white lupine (*Lupinus albus* L.)
 - **Tailliez, A.**, Pierrisnard, S., Camilleri, V., Keller, C. and Henner, P. (2013) Do rhizospheric processes linked to P nutrition participate in U absorption by *Lupinus albus* grown in hydroponics? *Journal of environmental Radioactivity*, 124 (255-265)
- Interventions orales en congrès :
 - Henner, P., Brédoire, F., **Tailliez, A.** and Keller, C. (2013) Influence of root exudation on uranium phytoavailability in soils : study with a natural uranium-rich soil and white lupin. *12th International Conference on the Biogeochemistry of Trace elements* (Athens GA, United States)
 - **Tailliez, A.**, Pierrisnard, S., Camilleri, V., Keller, C. and Henner, P. (2012) Could rhizospheric processes linked to P nutrition participate to U phytoavailability? *6th International Conference of Environmental Science and Technology* (Houston TX, United States)
 - **Tailliez, A.**, Pierrisnard, S., Camilleri, V., Keller, C. et Henner, P. (2012) Caractérisation de l'exsudation racinaire du lupin blanc (*Lupinus albus*) en hydroponie et impact du citrate sur la phytodisponibilité de l'uranium dans un sol naturellement riche en uranium. *Journées des thèses de l'IRSN* (Le Croisic, France)
- Présentations de posters en congrès :

- **Tailliez, A.**, Pierrisnard, S., Camilleri, V., Della-Vedova, C., Lecomte-Pradines, C., Keller, C. and Henner, P. (2012) Do rhizospheric processes linked to P nutrition participate to U phytoavailability in hydroponics? *22th annual meeting, Society of Environmental Toxicology and Chemistry* (Berlin, Germany)
- **Tailliez, A.** (2012) La phytodisponibilité de l'uranium est-elle impactée par les processus rhizosphériques liés à la nutrition phosphatée? *Journées de l'école doctorale 251* (Marseille, France)
- **Tailliez, A.**, Keller, C., Février, L. et Henner, P. (2010) Étude de la phytodisponibilité de l'uranium à l'interface sol-racine chez le Blé dur et le Lupin blanc. *Journées des thèses de l'IRSN* (Arles, France)

B.2 Article publié dans le *Journal of Environmental Radioactivity*

Author's Personal Copy

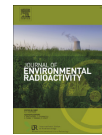
Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Environmental Radioactivity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jenvrad



Do rhizospheric processes linked to P nutrition participate in U absorption by *Lupinus albus* grown in hydroponics?



Antoine Tailliez^{a,*}, Sylvie Pierrisnard^a, Virginie Camilleri^b, Catherine Keller^c, Pascale Henner^a

^aL2BT, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Centre de Cadarache, 13115 St. Paul lez Durance, France

^bLECO, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Centre de Cadarache, 13115 St. Paul lez Durance, France

^cAix-Marseille Université, Centre Européen de Recherche et d'Enseignement en Géosciences de l'Environnement, 13585 Aix en Provence, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2013
Received in revised form
16 May 2013
Accepted 31 May 2013
Available online 5 July 2013

Keywords:

Lupinus albus
Uranium
Toxicity
Bioaccumulation
Microlocalization
Citrate exudation

ABSTRACT

Phosphate (P) is an essential element for plant development but is generally present in limiting amount in the soil solution. Plant species have developed different mechanisms promoting the solubilization of this element in soils to ensure a sufficient supply for their growth. One of these mechanisms is based on the ability of certain species such as *L. albus* to exude large amounts of citrate through specific tertiary roots called cluster-roots. Uranium (U) is an ubiquitous contaminant known firstly for its chemical toxicity and secondly for its high affinity for P with which it forms low-soluble complexes in soils. We highlight the effects of P–U interaction on the physiology of *L. albus* and particularly on citrate exudation, and the impact of this root process on the phytoavailability of U and its accumulation in plants in a hydroponic study. Different levels of P (1 and 100 μM) and U (0 and 20 μM) have been tested.

Our results show no toxicity of U on the development of *L. albus* with an adequate P supply, whereas the effects of P starvation are amplified by the presence of U in the growth medium, except for the production of cluster-roots. Citrate exudation is totally inhibited by U in a low-P environment whereas it increases in the presence of U when its toxicity is lowered by the addition of P. The differences observed in terms of toxicity and accumulation are partly explained by the microphotographs obtained by electron microscopy (TEM-EDX); in the absence of P, U penetrates deep into the roots and causes lethal damages, whereas in presence of P, we observe the formation of U–P complexes which limit the internalization of the pollutant and so its toxicity.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Uranium (U) is an ubiquitous metal found in soils at average concentrations around 3 mg kg⁻¹. Due to anthropogenic activities such as agricultural phosphate fertilization, military industry and mine extraction, U concentrations can reach locally several hundred of mg kg⁻¹ causing contamination of groundwaters and soils (Ribera et al., 1996; Bourrelier and Berthelin, 1998; Ragnarsdottir and Charlet, 2000). Uranium is mainly known for its chemical toxicity in human and various animal species, but little information is available about its phytotoxicity. In plants, deleterious effects were reported by Boileau et al. (1985), Aery and Jain (1997, 1998), Panda et al. (2001) and Sheppard et al. (2005) at macroscopic levels (culture yield, biomass production, photosynthetic activities,

root growth, seed germination and seed production) and by Panda et al. (2001), Vandenhove et al. (2006) and Vanhoudt et al. (2008) at cellular levels (genotoxicity and oxidative stress responses). Nevertheless, it remains difficult to correlate the levels of phytotoxicity to the U content in soils. Indeed, the mobility of U in the environment and hence its bioavailability are governed by various physico-chemical parameters which could explain the important variations in the toxicity thresholds for U when expressed as total U in soil.

Under aerobic conditions, U is found mainly in the (+VI) oxidation state which is the most mobile form. In this oxidation state, its speciation is mainly governed by pH, redox potential and the presence of complexing compounds such as carbonate, organic matter, phosphate or sulfate. Indeed, at low pH the cationic form is predominant as uranyl ion (UO₂²⁺) (Ragnarsdottir and Charlet, 2000), from pH 4.0–7.5 U hydrolysis species prevail (Shahandeh and Hossner, 2002a), and at higher pH U forms stable complexes with carbonate, phosphate or sulfate (Gueniot et al., 1988; Colle

* Corresponding author.
E-mail address: antoine.tailliez@gmail.com (A. Tailliez).

Author's Personal Copy

256

A. Taillez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

et al., 2001; Jerden and Shena, 2003; Zheng et al., 2003). These different chemical forms affect U solubility. For instance, the complexation of U with carbonate causes an increase of U mobility and therefore an increase of its phytoavailability (Shahandeh and Hossner, 2002a, b). In contrast, the complexation of U with phosphate leads to the formation of low phytoavailable precipitates (Misson et al., 2009). Interestingly, U speciation in the environment influences uptake levels by plants but does not seem to have any effect on U speciation inside plants. Indeed, Günther et al. (2003) who exposed lupine plants (*Lupinus angustifolius*) to U have demonstrated using different spectroscopy techniques that U was mainly bound to either inorganic and/or organic phosphate groups in roots, shoot axis and leaves, regardless of the composition of the initial nutrient solution.

Phosphorus (P) is of particular interest to study U toxicity because to compensate for a shortage of P in the soil solution, plants have developed different strategies that promote the remobilization of P from P sorption sites in the soil matrix. *Lupinus albus* is characterized by its specific ability to produce large amounts of citrate via specific tertiary roots (cluster-roots) that develop during P-starvation periods (Gardner et al., 1983; Marschner et al., 1986; Dinkelaker et al., 1989). In this species, the localized P supply in soil affects the formation and function of cluster roots, but it has been demonstrated that citrate exudation is controlled by shoot P concentration rather than by low-P level in the roots. More precisely, the proportion of cluster roots and the rate of citrate exudation is negatively and exponentially correlated with P concentration in the shoot (Shane et al., 2003; Shen et al., 2005). As described by Li et al. (2008), critical levels of shoot P concentration ranging from 2–3 mg P g⁻¹ of dry weight (DW) govern those mechanisms. The specific development of this species in P-deficient conditions and the physico-chemical changes caused by the exudation of citrate in the rhizosphere are well documented in the literature (Marschner et al., 1986, 1987; Neumann et al., 1999, 2000; Shen et al., 2011).

The effect of complexing compounds, including citrate, on the remobilization of U from solid fractions to the soil solution has been studied exhaustively in recent years as part of assisted phytoremediation. Several research teams have shown that the addition of citrate on different soils significantly promotes the dissolution of U and so increases its availability (Ebbs et al., 1998; Huang et al., 1998; Lozano et al., 2011). However, since these studies are based on important exogenous inputs of citrate, the real impact of root exudates on U solubilization remains unknown. More, the effect of contaminants on the exudation of organic acids by roots has rarely been addressed (Wang et al., 2007; Zeng et al., 2008) although exudation mechanisms are essential for plant development (P and Fe nutrition for instance) and their dysregulation can have harmful consequences.

In this study, we first characterize the physiological responses of *L. albus* exposed to water-borne U in a hydroponic system. Then we evaluate how the toxicity of U depends on the level of P in the growth medium. Finally we investigate our ability to provoke and quantify exudation in *L. albus* exposed to U, which could be used in future studies to determine how root activity impacts U phytoavailability in the rhizosphere.

2. Materials and methods

2.1. Seeds calibration, sterilization and imbibition

The seeds of *Lupinus albus* cv. *Amiga* used to carry out these experiments were provided by S.A.S. Florimond-Desprez (Cappelle en Pêvèle, France). The seed lot was previously treated by Wakil XL (Syngenta Agro S.A.S. Guyancourt, France) to prevent the

post-germination development of diseases such as anthracnose or downy mildew.

More than 95% of *L. albus* seeds showed a weight ranging from 200 to 400 mg (tested on 689 randomly selected seeds). To guarantee the homogeneity in the amount of nutrient reserves among seeds, the weight of all the seeds used was restricted to the range 280–320 mg.

Seeds were surface sterilized using a four-step protocol: sonication in deionised water (15 min), soaking in 70% ethanol (4 min), soaking in 30% hydrogen peroxide (8 min) and soaking in 3% calcium hypochlorite (30 min). Seeds were rinsed 3 times during 1 min in deionised water before the sonication step and after the final soaking in calcium hypochlorite. The seeds were quickly dried between each soaking step. The sterilization process was carried out under sterile conditions except for the sonication step.

After sterilization, seeds were immersed in deionised water in darkness during 25 h at 20 °C. This imbibition step was necessary to control the germination and to obtain more than 93% of germination.

2.2. Hydroponic conditions

Germination was carried out in a specific device designed to obtain regular and straight roots, which facilitated the transfer of seedlings in the hydroponic system. This step was performed in deionised water, at 20 °C in darkness and lasted 96 h.

Then, the plants were grown in a growbox under controlled conditions: 16 h light period; 26/20 °C day/night temperature; light intensity of 150 μmol m⁻² s⁻¹; 60% relative humidity in the air. Plants were cultivated in polypropylene pots (5 plants per pot) filled with 1.5 L of nutrient solution with the following composition: 2 mM Ca(NO₃)₂, 0.7 mM K₂SO₄, 0.5 mM MgSO₄·7H₂O, 0.1 mM KCl, 20 μM Fe(III)-EDTA, 10 μM H₃BO₃, 0.5 μM MnSO₄·H₂O, 0.5 μM ZnSO₄·7H₂O, 0.2 μM CuSO₄·5H₂O, 0.01 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O. Phosphorus was supplied as 100 μM or 1 μM KH₂PO₄ in normal (+P) and starved (-P) conditions respectively (G. Neumann, personal communication, 2011). Hereafter, the terms '+P' or '-P' conditions will be used to respectively designate sufficient (100 μM) or deficient (1 μM) inputs of P in the growth medium. Nutrient solution was permanently aerated with sterile air (filtered at 0.2 μm) to ensure the homogeneity of the medium and replaced every 3 days. Since rhizosphere activity modifies the surrounding pH, the nutrient solution was not buffered and the pH was recorded before each renewal.

2.3. Experimental design: P starvation and U exposure

The concentration of U exposure was chosen based on results of a preliminary sequential exposure of *L. albus* to U. The technique of sequential exposure, developed by Schat and Ten Bookum (1992), aimed at the determination of the minimal concentration causing a total stop of root growth. For that purpose, exposure to the pollutant starts with a low concentration of exposure, and then the concentration is doubled every 2 days until no additional growth of roots is recorded during the 2 days exposure. Applied to U, the technique had shown that the root of *L. albus* stopped growing at a U concentration of 40 μM in the -P condition (data not shown). Thus, the concentration of 20 μM U chosen for this experiment was shown sufficient to induce some toxicity without being directly lethal. Likewise, '+U' or '-U' will be used to designate presence (20 μM) or absence of U in the growth medium.

Four experimental conditions have been tested: +P-U (control), +P+U, -P-U and -P+U. Uranium exposure of plants was performed by addition of 750 μL of a 40 mM uranyl nitrate stock solution (prepared in deionised water) to reach an initial

Author's Personal Copy

A. Tailliez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

257

concentration of 20 mM in the nutrient solution described above (4.76 mg U L^{-1}). These initial nutrient solutions spiked with U showed no significant difference in terms of pH values, around 5.4 and 5.5 in +P and -P conditions respectively.

Speciation of U and P in the nutrient solution was simulated using the geochemical speciation code J-CHESS (Java Chemical Equilibrium with Species and Surfaces (Van der Lee, 1988)) and nominal concentrations. The thermodynamic database was based on Van der Lee and Lomenech (2003) and completed by the last compilation of thermodynamic data for U (Denison and Garnier-Laplace, 2003). The predicted solubility of U and P in the different media is reported in Table 1 and the calculations indicate the preponderant role of P on U speciation. This implies that the plants were grown in the presence of different U contamination despite the same 20 μM U added in the nutrient solution. Indeed, in +P condition 3% of the total U added was assumed to be present in soluble form (essentially complexed with $-\text{CO}_3$) whereas this value reaches 53% in -P condition (22% as free ion, 17% complexed with $-\text{OH}$ and 14% complexed with $-\text{SO}_4$). These data are based on the assumption of thermodynamic equilibrium and the simulations were performed assuming the possible occurrence of precipitation events in the nutrient solution. Making the calculations for a steady state, it was not possible to take into account the kinetics of precipitation and/or dissolution nor the possible evolution of the nutrient solution in the presence of root activity (exudation, uptake).

To test the impact of U on the development of *L. albus* and on citrate exudation by cluster-roots, the U exposure started when each individual had developed at least one cluster-root in +P and -P conditions. A preliminary experiment had shown that this step was achieved in both P conditions 19 days after initiation of germination (data not shown). In order to compare the citrate exudation and the different phenotypic traits over time, the plants were exposed during 15 and 30 days after the appearance of the first cluster-root corresponding respectively to 34 and 49 days after initiation of germination. Nutrient solutions with or without U were renewed every 3 days and the two time conditions were grown in separate pots.

2.4. Characterization of U exposure and P starvation effects

The potential deleterious effect of U exposure, P starvation or both on the development of *L. albus* was evaluated through the measure of the following endpoints on 5 replicates (or specified if different) of each P/U condition.

2.4.1. Uranium bioaccumulation: mineralization and ICP quantification

The number of leaves and cluster-roots was counted every 3 days throughout the experiment. After harvest, the roots and shoots samples were dried separately in a ventilated hood at 60°C during 4 days until constant weight and the biomass production (roots and shoots) was measured (weighed on a precision balance, $\pm 0.1 \text{ mg}$). The samples were then mineralized with 70% HNO_3 and 30% H_2O_2 on a sand bath at 120°C and evaporated to dryness. This procedure was repeated as many times as necessary to obtain white residues. The

mineralisates were redissolved in 2% (v/v) HNO_3 before analysis with Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, OPTIMA 4300DV, Perkin-Elmer, quantification limit = $10 \mu\text{g L}^{-1}$ for each metal). The lowest concentrations of U were determined by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS, PQ Excell, ThermoElectron with S-Option, detection limit = 0.11 ng L^{-1}).

2.4.2. Citrate exudation: collection and ILC analysis

Prior to harvest, roots were rinsed for 15 min in deionised water. Then the whole root system was submerged for 3 h into 100 mL of an aerated solution specifically designed for exudate collection while maintaining the integrity of biological membranes, and containing 0.25 mM CaSO_4 , 10 μM H_3BO_3 , 0.5 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and 0.01 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (W. Horst, personal communication, 2011). Subsamples (10 mL) of the solutions of exudates (named 'root exudates' hereafter) were collected, filtered with a 0.2 μm sterile filter (polyethersulfone, VWR) and then frozen at -20°C after addition of NaN_3 (final concentration: 10^{-4} M) to ensure the preservation of the samples.

Root exudates subsamples were evaporated to dryness using a Speedvac concentrator (Jouan, Paris, France). The residues were redissolved in 150 μL of deionised water and then used for analysis. The concentration of citrate and of inorganic anions were analysed using Ionic Liquid Chromatography (Dionex autosampler ICS 3000, AS 11 HC column, eluent generator: KOH (1–45 mM), flow rate: 1 mL min^{-1} , suppressor ASRS 4 mm, detection by conductivity) with 100 μL injection volume.

2.4.3. Root cells ultrastructure: sampling and TEM-EDX analysis

At harvest time, after exudates collection, *L. albus* root tips (3 replicates per condition) were sampled and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 48 h at 4°C . After washing 3 times with 0.1 M sodium cacodylate buffer, the samples were postfixed in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer during 1 h, dehydrated in successive baths of ethanol and propylene oxide and finally embedded in EPON 812 resin (TAAB). Ultra-thin 140 nm sections were collected with an ultramicrotome (UCT, Leica). Sections were mounted on copper grids and observed with a Tecnai G2 Biotwin (FEI) TEM using a 100 kV accelerating voltage. Damage in ultrastructure of root tissues of U-exposed plants as a function of P nutrition were looked for. Uranium was analysed inside the samples with an EDX microanalyzer equipped with a Super Ultra thin Windows model SAPPHIR (counting time: 2 min). At least three sections were analyzed per replicate and per condition. The electron probe was first focused on several points within cells to investigate U accumulation in different structures and then on specific spots where U could be analysed. These punctual analyses are highly sensitive but did not allow for the mapping of U in the root tissues.

2.5. Statistical analysis

All statistical analysis were performed with R software (R Development Core Team, 2011). Results were subjected to one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-

Table 1
Simulated U and Pi distribution in the growth medium calculated with CHESS software taking into account the complete composition of the nutrient solution. Soluble U is shown as free ion and complexed forms (with $-\text{OH}$, $-\text{CO}_3$, $-\text{PO}_4$, $-\text{SO}_4$). Pi corresponds to assimilable inorganic phosphate (HPO_4^- and H_2PO_4^-).

P added in culture medium (μM)	Simulated Pi in culture medium (μM)	U added in culture medium (μM)	Simulated U free ion in solution (μM)	Simulated U complexed in solution (μM)	Simulated U precipitated (μM)
1	0.98	0	–	–	–
1	0.05	20	4.32	6.30	9.38
100	43.00	0	–	–	–
100	39.20	20	$\leq 10^{-3}$	0.59	19.41

hoc tests. Normal distribution and homogeneity of variance were tested graphically on residuals. Heteroscedasticity was corrected when necessary by variance modeling. Significance between groups with $P = 0.05$ are represented by different letters. Presented data are mean values of five plants \pm standard deviation.

3. Results

3.1. Evolution of pH in the growth medium

As shown in Fig. 1, during the first week of the culture period in hydroponics, the pH values of the nutrient solution remained low (between 4.5 and 5), with little variation in the four different P/U combinations. Then, the pH values of the +P and -P media started to evolve differently.

In +P conditions, the pH increased up to 7 between day 13 and day 28, and remained at this value until the end of the experiment. In contrast, in -P conditions, the increase in pH value was less steep, with a plateau at a pH value of 5.5 at day 16 or day 19. These observations were consistent with the work of Neumann et al. (1999) and validated our experimental conditions. No differences have been observed between +U and -U conditions in both P conditions.

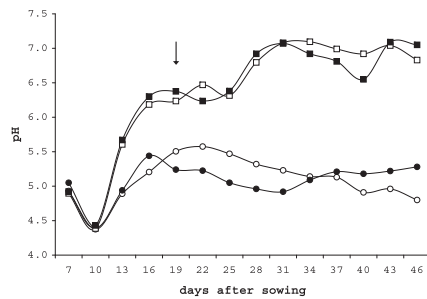


Fig. 1. Evolution of growth medium pH during seedling development in hydroponic culture under -P-U (white circle), -P+U (black circle), +P-U (white square) and +P+U (black square) conditions. The black arrow indicates the beginning of U exposure.

3.2. Growth pattern and development

3.2.1. Biomass production and allocation

Total root dry weight was affected neither by P deficiency nor by U exposure at day 34 after sowing, but was inhibited by U on P starved plants at 49 days (Fig. 2A).

Shoot dry weight tended to be limited by P-starvation at day 34 and was significant at day 49. It was clearly affected by the presence of U in -P conditions, for which no significant increase was observed between day 34 and 49. Uranium had no effect in +P conditions (Fig. 2B).

Uranium did not impact total biomass production when P was non limiting. On the other hand, the negative impact of P limitation on total biomass production between days 34 and 49 was further aggravated by the presence of U (data not shown).

In non limiting P conditions, the root:shoot ratio of dry weight remained on average 0.4 throughout the experiment. The -P-U plants responded by increasing root:shoot ratios of dry weight from 0.55 to 0.7 between day 34 and 49. The -P+U plants further

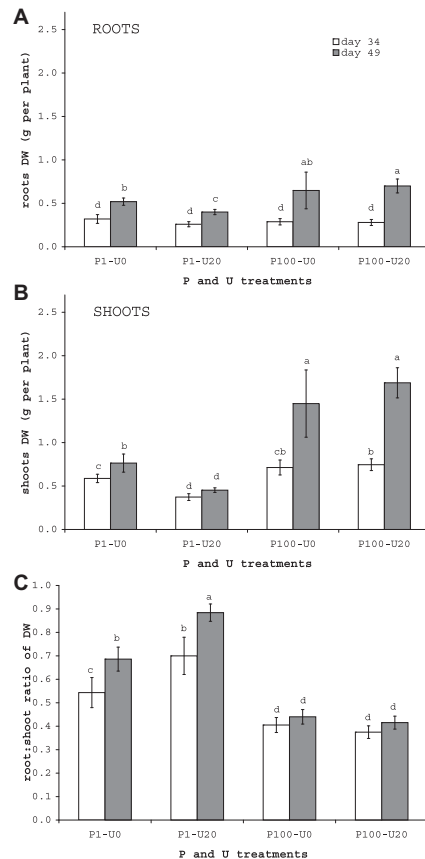


Fig. 2. *Lupinus albus* roots (A) and shoots (B) production (dry weight) after 34 and 49 days of growth under -P (1 μ M) or +P (100 μ M) conditions and in absence (0 μ M) or presence (20 μ M) of U. The root:shoot ratios of dry weight are also presented (C). Means \pm SD ($n = 5$). Bars with different letters are significantly different ($P = 0.05$).

increased root:shoot ratios of dry weight from 0.7 to 0.9 between day 34 and 49 (Fig. 2C).

3.2.2. Shoots development

As shown in Figs. 3A and 4, whatever the treatment, the production of leaves was constant until 19 days after initiation of germination (which corresponds to the time when first cluster-roots were observed and U exposure began). Later on, a significant difference occurred between +P and -P plants.

In the +P conditions, with or without U, the production of leaves remained constant throughout the experiment and reached a mean of 20 leaves at harvest. In these conditions, the leaves showed a normal deep green color.

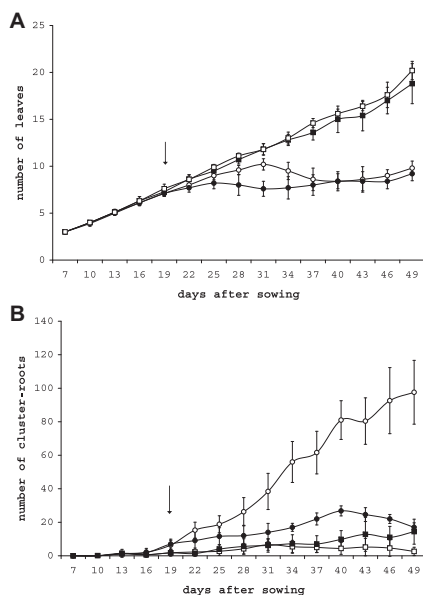


Fig. 3. Number of leaves (A) and cluster-roots (B) after 34 and 49 days of growth under -P-U (white circle), -P+U (black circle), +P-U (white square) and +P+U (black square) conditions. The black arrow indicates the beginning of U exposure. Means \pm SD ($n = 5$).

In -P conditions without U, the number of leaves still increased until day 31, decreased until day 40 and reached a plateau of 8 leaves in the last 9 days. From day 40, leaf color turned to an intense green and few necrotic stains were visible. In -P conditions exposed to U, the number of leaves remained constant around 8 from day 19 till

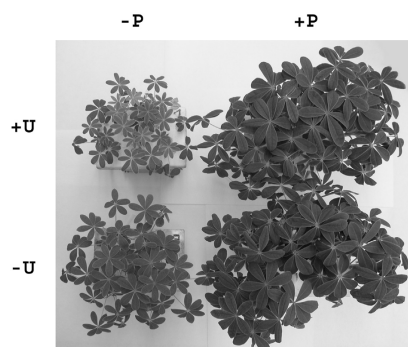


Fig. 4. Pictures of *L. albus* 49 days after the initiation of the germination. The different pots correspond to -P-U, +P-U, -P+U and +P+U conditions, respectively at left bottom, right bottom, top left and top right.

the end of the exposure and the same change of leaf color has been observed. However this phenomenon appeared earlier (around day 34) and was more pronounced than in non-exposed plants.

The addition of 20 μ M U was not sufficient to induce disturbances in shoot development in +P condition. Under low-P condition, the average number of leaves was limited compared to +P plants and lack of P also caused the death of oldest leaves. The additional presence of U in the nutrient solution did not affect significantly the number of leaves still alive at the end of the exposure but seemed to accelerate the occurrence of senescence after which the balance between initiation of new leaves and death of old leaves started to occur.

3.2.3. Development of cluster-roots

Production of cluster-roots was an other visible symptom of P deficiency, as shown in Fig. 3B. At day 19, in each P/U condition, every plant had produced at least one cluster-root, which determined the moment when U exposure was initiated.

Under -P-U and +P-U conditions, as well as in +P+U plants, the cluster-roots were successively white, grey and brown, with a high density of proteoid rootlets. They remained a long time on the roots, enough to complete their life cycle. In comparison, the cluster-roots in -P+U conditions rapidly took a brown hue with a low density of proteoid rootlets. In this condition, the initiation of cluster-roots development was maintained but they died prematurely after 1 or 2 days which prevents them to reach a normal size.

From day 22 to the end of the experiment, -P plants produced significant, constant and important amounts of cluster-roots compared to +P plants. In -P plants, the presence of U in the nutrient solution inhibited the production of cluster-roots with a 3–5 times decrease in their number compared to non-exposed plants. The rate of cluster-roots production was slower in -P+U condition and started to decrease at day 40. In +P conditions, the production of cluster-roots was extremely limited, almost null. The evolution of the number of cluster-roots showed different trends between -U and +U plants from day 34. Finally, a significant difference was observed at day 49 where +U plants had more cluster-roots than non-exposed ones.

3.3. Citrate exudation

At day 34 (15 days after first cluster-roots appearance), the roots of *L. albus* exudated a mean of 153, 23, 298 and 29 nmol of citric acid g^{-1} root (DW) h^{-1} in -P-U, -P+U, +P-U and +P+U respectively. The levels of exudation differed depending the U exposure, but the differences were not significant. Measurements varied slightly between plants exposed to U compared to non-exposed ones (Fig. 5A).

At day 49 (30 days after first cluster-roots appearance), the roots of *L. albus* exudated a mean of 384, 41, 202, 712 nmol of citric acid g^{-1} root (DW) h^{-1} in -P-U, -P+U, +P-U and +P+U respectively. Inter-plants variation in citric acid exudation was large except for the -P+U condition. The statistical analysis demonstrated that citric acid exudations were similar in -P+U and +P-U conditions, similar in -P-U and +P+U conditions with the former pair of conditions exhibiting lower values than the latter pair (Fig. 5B).

This experiment showed that low-P environment tended to promote root citric acid exudation over time (the mean value at day 49 was 2.5 times higher than the mean value at day 34) and that sufficient P input tended to limit this phenomenon (the mean value at day 49 was 1.5 times the mean value at day 34). The presence of U in -P conditions tended to inhibit the exudation (6.7 and 9.4 times decrease in the mean exudation values at day 34 and day 49 respectively). In contrast, the presence of U in +P conditions tended to promote citric acid exudation by roots (10.3 and 3.5 times increase in the mean values at day 34 and day 49 respectively).

Author's Personal Copy

260

A. Tailliez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

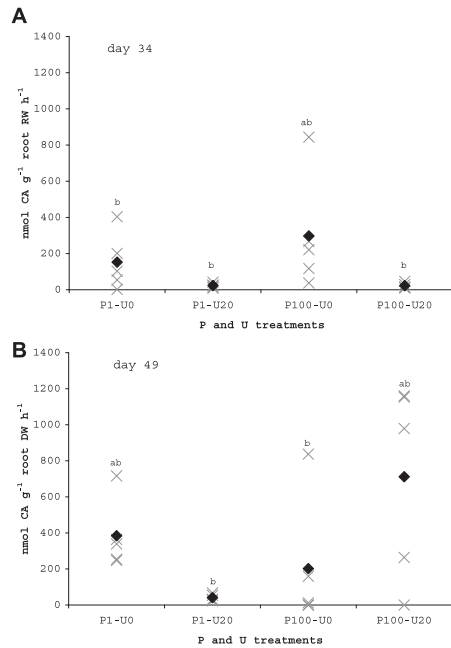


Fig. 5. Root exudation of citric acid after 34 (A) and 49 (B) days of growth under $-P$ (1 μM) or $+P$ (100 μM) conditions and in absence (0 μM) or presence (20 μM) of U. Means (black diamonds) and replicates (gray crosses) are shown. Different letters indicate significantly different groups ($P = 0.05$).

3.4. Uranium uptake

3.4.1. Uranium accumulation in plants

Uranium concentration in roots depended on whether or not P was limiting in the nutrient solution (Fig. 6A). The average concentrations measured in $-P$ plants were 3.8 and 5.8 times higher than in $+P$ ones, respectively at day 34 and day 49. Uranium concentration in roots of $+P$ plants decreased significantly between day 34 and day 49.

Uranium concentration in shoots was not impacted by P availability in the nutrient solution (Fig. 6B). The average concentrations measured in $-P$ plants were 1.7 and 1.8 times higher than in $+P$ ones, respectively at day 34 and at day 49, but no distinct groups appeared within the statistical analysis.

The same conclusions can be derived regarding the combined effect of U and P on the total amounts of U found in roots and shoots to account for the differences in biomass. Total amounts of U in roots tripled after 34 and 49 days of exposure when P was limiting. In shoots, the total amounts of U measured in $+P$ plants were 1.1 and 2.0 times higher than in $-P$ ones, respectively at day 34 and day 49.

3.4.2. Uranium root-to-shoot transfer

Based on average U accumulations in roots and shoots, the results showed that shoot:root ratios were significantly different

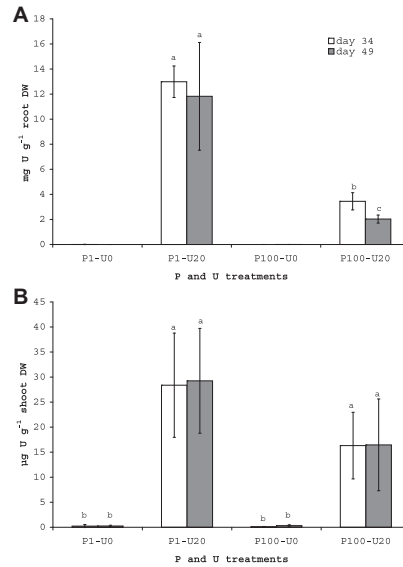


Fig. 6. Uranium concentration in roots in $\text{mg U g}^{-1}\text{DW}$ (A) and shoots in $\mu\text{g U g}^{-1}\text{DW}$ (B) after 34 and 49 days of growth under $-P$ (1 μM) or $+P$ (100 μM) conditions and in absence (0 μM) or presence (20 μM) of U. Means \pm SD ($n = 5$). Bars with different letters are significantly different ($P = 0.05$).

depending on P inputs (Table 2). In $-P$ plants, the ratio reached $3.16 \times 10^{-3} (\pm 1.30)$ and $2.70 \times 10^{-3} (\pm 1.40)$ at day 34 and day 49 respectively. The values were multiplied by 4 and 7 in $+P$ conditions, up to $13.06 \times 10^{-3} (\pm 6.00)$ and $18.66 \times 10^{-3} (\pm 8.78)$ at day 34 and day 49 respectively. Despite lower accumulation in their roots, the non P-starved plants transferred more U in their shoots.

3.5. Uranium microlocalization and effects on root tissue ultrastructure

Fig. 7 illustrates the main results obtained for root apices at day 34. Root tissues in control conditions ($-U$) for both P nutrition levels showed little damages in the tissues (Fig. 7A,C). In $-P$ condition, cortical root cells showed a higher level of vacuolization and a higher number of starch grains than in $+P$ condition, a feature related to P starvation. In $+P+U$ condition, the first layers of cells of root tips showed some signs of internal disaggregation. Lamella-shaped precipitates of U associated with P, Ca and K were found at the root surface, associated with a layer of fibrous material identified as the mucigel, or, in some cases within the root cell walls of the epidermis (Fig. 7B). No U was found within the cells of main

Table 2

Uranium shoot:root ratios \pm relative uncertainty based on average U concentrations in $-P$ and $+P$ conditions at day 34 and day 49. Means with different letters are significantly different ($P = 0.05$).

	Day 34	Day 49
$-P+U$	$3.16 \times 10^{-3} \pm 1.30$ (a)	$2.70 \times 10^{-3} \pm 1.40$ (a)
$+P+U$	$13.06 \times 10^{-3} \pm 6.00$ (b)	$18.66 \times 10^{-3} \pm 8.78$ (b)

Author's Personal Copy

A. Tailliez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

261

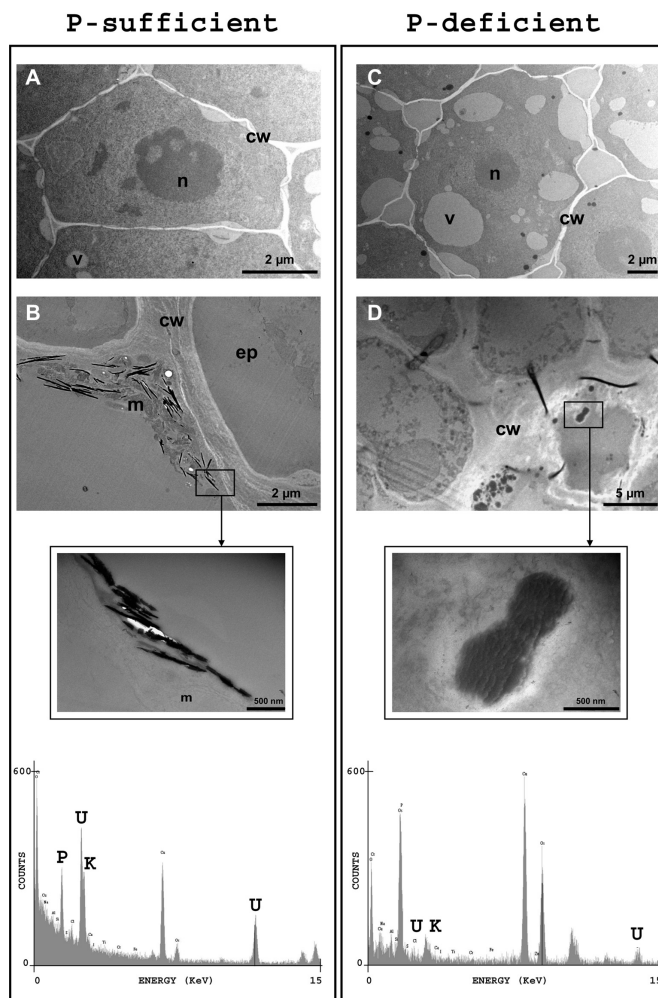


Fig. 7. Root tissue ultrastructure and U microlocalization as revealed by TEM-EDX analysis in root cells of root apices of *L. albus* exposed in hydroponics to 20 μM U as a function of the level of phosphates (1 μM: -P, 100 μM: +P). A: +P-U, B: +P+U, C: -P-U, D: -P+U, cw: cell wall, ep: epidermis, m: mucigel, n: nucleus, v: vacuole. Scale bar is indicated on each photograph. Spectra from point of interest obtained with TEM-EDX analysis are displayed showing U and the colocalized elements.

root apices. In -P+U condition, a high level of internal damage was found on at least the four first layers of cortical root cells. These cells showed a lot of dense precipitates of U and K together with P and low levels of Ca. Deeper cell layers showed a higher starch grain density than in the control -P-U condition. No precipitates were found at the root surface.

4. Discussion

In this study, the results were obtained working with high levels of U (20 μM total U corresponding to 4.86 mg L⁻¹) compared with environmental conditions. Indeed, most of the soils contain a mean of 3 mg U kg⁻¹ and thus U concentrations in the soil solution should

Author's Personal Copy

262

A. Tailleux et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

be quite low (0.002–0.25 mg L⁻¹ depending on the type of soil (IAEA, 2010)).

Concerning P inputs in the growth medium, the lower concentration (1 μM) was consistent with a situation of deficiency as noted by Marschner (2002). The higher concentration (100 μM) was sufficient to ensure a normal growth. Indeed, as it was demonstrated in another dicotyledon species, *Brassica napus*, the presence of 10 μM of P in soil solution did not limit uptake by the roots and permitted an adequate supply to the plants (Barraclough, 1989).

4.1. Uranium contamination limits the development of cluster-roots in a low-P environment and causes a shift in leaf color

The development pattern of *L. albus* confirmed the patterns obtained in previous studies in terms of physiological adaptation of *L. albus* to P deficiency. The appearance of cluster-roots along the oldest lateral roots was the first visible symptom of P deficiency (Fig. 3B). Yet, proteoid roots were also formed, to a lesser extent than in -P conditions, at sufficient P levels as shown by Marschner et al. (1986, 1987) and Johnson et al. (1996). Their production seems to be induced by the level of internal P concentration rather than P concentration in the growth medium (Dinkelaker et al., 1995). In the present study, cluster-root formation started 19 days after the initiation of germination in -P and +P conditions, i.e. a few days later than in the work of Neumann et al. (1999).

The cluster-roots shape in -P-U, +P-U and +P+U conditions suggests that they completed their life cycle and reached an active state. On the contrary, in -P+U conditions, clusters degenerated after one or two days, which, given the normal dynamics of cluster development and cycle of activity means they degenerated before being active (Dinkelaker et al., 1995; Neumann et al., 2000; Marschner et al., 2002).

As expected, cluster-roots development was inhibited at 100 μM of P. In -P condition, in the presence of 20 μM of U in the nutrient solution, the number of cluster-roots rapidly decreased due to the cessation of the induction of new clusters. The higher induction of cluster-roots in the presence of U in +P condition suggests that the plant is sensing a shortage of P, thus inducing the specific response in root system architecture.

At shoots level, the effect of P deficiency was also observed. While the leaves of +P plants kept a normal dark green color throughout the experiment, an intense green color along with few necrotic stains appeared in -P-U plants, symptoms that have been described as the most characteristic demonstration of P deficiency by Hopkins and Hüner (2008). In -P+U plants, more pronounced symptoms were observed earlier in the development of *L. albus* which suggest a toxic effect of the contaminant at this level. As suggested by Viehweger and Geipel (2010) in *Arabidopsis halleri*, this could be due to a deleterious effect of U on chlorophyll content resulting from a lack of iron in the leaves.

4.2. The increase in root:shoot ratio caused by the lack of P is amplified by U contamination

In comparison with Wang et al. (2007) who used similar nutrient solutions except for the phosphate concentration (50 μM), the observed differences in root and shoot biomass production between +P and -P conditions were less pronounced (Fig. 2A and B). Indeed, Wang et al. (2007) described a significant inhibition of both root and shoot biomass production upon P starvation at day 30 after sowing, while in our experiment only shoot biomass was affected by P deficiency at day 49. However, we noted significant differences in the root:shoot ratio of dry weight between +P and -P plants (Fig. 2C). P-starved plants showed a larger ratio to +P ones and this ratio increased between day 34 and 49. As described

by Ericsson et al. (1992) and Ericsson (1995), this is commonly observed under P-limiting conditions. Furthermore, the increase of the root:shoot ratio of dry weight is the consequence of a well-known response of plants to P-limitation, which occurs sooner than proteoid root induction. In the event of P-starvation, most plants modify their root architecture to increase the volume of soil explored by the roots and thus the probability to reach a zone of high concentration (Misson et al., 2005). In these conditions, the growth of primary root(s) is stopped and branching increases, together with the reallocation of growth toward roots at the expense of shoots, thus resulting in a higher root:shoot ratio of dry weight. In the meantime, shoot inorganic phosphate (Pi) stock are redirected toward roots to sustain the synthesis of new root structures (Raghothama, 1999).

The Fig. 2A and B show no effect of U in presence of P on both root and shoot biomass production compared to +P controls, whereas the contaminant inhibited shoot production in absence of P at day 34 and 49, and root production at day 49 compared to -P controls. As a consequence, the root:shoot ratios of dry weight between +P-U and +P+U plants were similar and lower than -P ratios, and in this -P condition plants exposed to U showed the most important root:shoot ratio of dry weight. With these observations, it is clear that an inappropriate P-supply has a negative impact on biomass allocation and disturbs physiological behavior of *L. albus*. Under such conditions, the presence of U enhances the dysfunction due to the lack of P, as already shown by the study of Misson et al. (2009) on *Arabidopsis thaliana*.

4.3. Uranium stimulates citrate exudation in +P plants at day 49

Lupinus albus was chosen because of its high performance for citrate exudation since this organic acid may enhance U bioavailability. For instance, in soil solution citric acid solubilized 100–1000 times more U than other amendments (Huang et al., 1998; Ebbs et al., 2001; Duquène et al., 2008; Lozano et al., 2011). Due to the important variability between individuals, the observations made in different conditions and at different times showed tendencies rather than clear contrasts. As shown in Fig. 5A, controls (-P-U and +P-U) had similar exudation rates at day 34 (around 200 nmol of citric acid g⁻¹ root (DW)) which is not in agreement with some results in the literature (Neumann et al., 1999; Wang et al., 2007). Those authors demonstrated significant differences in citrate exudation between -P and +P plants around day 20. The fact that our plants showed a delay in the appearance of the first visible symptom of P deficiency could explain it. In addition, one individual in +P condition had a high exudation rate compared with others and it clearly influenced the mean value and the statistical analysis. At day 49 (Fig. 5B), citrate exudation doubled in -P conditions whereas it showed a 50% decrease in +P conditions which is consistent with the fact that *L. albus* exudes more in -P conditions when starvation is effective. Moreover, it should be noticed that the observed values followed the same order of magnitude as in the work of Wang et al. (2007).

The effect of U on citrate exudation (Fig. 5A,B) was extremely contrasted. Without P in the nutrient solution, no citrate exudation was measured during the experiment with U. This result confirmed the strong toxicity of U on root development (growth) and physiology (exudation of citrate) in this condition. Indeed, according to Aery and Jain (1997) who studied the impact of U on wheat (*Triticum aestivum*), the presence of this pollutant in the growth medium induces an increase of soluble proteins content together with a decrease of insoluble structure proteins content. More, U induces the synthesis of phenolic compounds which is accompanied by an increase of peroxidase activity (Fry, 1986). These phenomena cause the alteration of plasmamembranes and lead to a decrease of cell

Author's Personal Copy

A. Tailliez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

263

wall extensibility, a leakage of potassium ions and a reduction of turgescence (Gabbrielli et al., 1990). It is likely that the degeneration observed on cluster-roots development in $-P+U$ plants may be a consequence of that. The fact that maturity was not reached implies that the cluster-roots were not able to establish the physiological process leading to the exudation of citrate.

Interestingly, in presence of P, no citrate was exudated by the roots of *L. albus* at day 34 but the mean of citrate exudation at day 49 reached 700 nmole citric acid g^{-1} root (DW). In contrast with the observations of Wang et al. (2007) who worked with aluminium contamination (50 μM) and observed a significant increase of exudation only on P-starved plants (± 600 nmole citric acid g^{-1} root (DW)), our results demonstrate that even with an adequate P-supply *L. albus* is able to synthesize and exudate significant amounts of citric acid in the presence of U. However, although citrate exudation may be a physiological response of *L. albus* in the presence of U in the environment, we cannot ignore the possible occurrence of a low-P deficiency in $+P$ conditions. Indeed, despite an initial supply of 100 μM in the growth medium, P and U have a strong affinity which causes the formation of soluble complexes. This complexation phenomenon theoretically reduces available forms of P to around 40 μM (Table 1). However, the normal appearance of U exposed plants in $+P$ conditions does not suggest P-starvation (Fig. 4) as well as the conclusions of Barraclough (1989) mentioned above in this discussion (normal growth of *Brassica napus* in presence of 10 μM of P in soil solution). Finally, the combined effect of U and P-shortage is difficult to disentangle. Some of the plant specific responses to low-P level depend on the sensing at the root interface (and are thus linked to P in the medium) and others depend on the internal sensing of P-stock levels. In addition, U at low concentrations, such as those for $+P+U$ conditions (0.6 μM), had been responsible for hormetic response to plant growth in *Arabidopsis thaliana* (Misson et al., 2009).

4.4. Phosphorus supply influences U internalization into roots

Concerning U accumulation, this study demonstrated the importance of P-supply in the growth medium as it has already been suggested by Rufyikiri et al. (2006), Mkandawire et al. (2007) and Misson et al. (2009) in *Trifolium subterraneum*, *Hordeum vulgare*, *Lemna gibba* and *Arabidopsis thaliana*. Analysis performed by TEM-EDX showed clear differences in terms of U distribution at the root level in both conditions of P nutrition.

In the presence of P, U did not penetrate easily into the roots, it remained adsorbed outside the cells, precipitated in the mucigel and in the intracellular space of epidermis in particular (Fig. 7B). Likewise U was associated with P, Ca and K in these dense precipitates. Yet, as these precipitates resist the preparation treatment for inclusion into resin, they are tightly associated to roots and as a consequence, these forms are taken into account in the root U analysis. Likely, the availability of U and P contained in those precipitates was low which could mean that a significant part of U in $+P$ roots was probably not available for internalization. Additional analysis such as diffraction would be interesting to confirm the nature of these precipitates. Unfortunately, micro XRF could not be used on root samples because the protocol used for TEM-EDX analysis requires the addition of osmium (Os), a compound that interferes with micro XRF techniques.

In absence of P in the nutrient solution, U penetrated into the roots (Fig. 7D). In these conditions, CHESS predicted the presence of significant quantities of U in solution as free ions or soluble complexes (associated with $-OH$, $-CO_3$, $-PO_4$, $-SO_4$) so it is likely that these chemical forms promoted U internalization. The precipitates of U that colocalized with smaller amounts of P were sparse and it could be

assumed that they formed after being accumulated in the cells with plant material (potentially DNA or phospholipids residues).

4.5. The increase of U translocation may be correlated to an increase of citrate exudation in $+P$ plants

Accumulation in shoots was similar in $-P$ and $+P$ conditions, around one thousandth the amount found in the roots. However, because U accumulation in roots was lower in $+P$ conditions, the translocation factor (also called 'Uranium shoot:root ratio' in Table 2) of U from roots to shoots was 4–7 times higher in this condition than in $-P$ plants and increased significantly with time, up to $13 \cdot 10^{-3}$ and $19 \cdot 10^{-3}$ at day 34 and 49 respectively. These rates of translocation are consistent with the results obtained by Straczek et al. (2010) in a dicotyledon species, *Brassica juncea* ($14 \cdot 10^{-3}$), but higher than in *Pisum sativum* (dicot), in *Zea mays* (monocot) and in *Triticum aestivum* (monocot) which presented ratios around $1.4 \cdot 10^{-3}$, $0.6 \cdot 10^{-3}$ and $0.5 \cdot 10^{-3}$ respectively. In their study, the authors concluded that the transport of U from roots to shoots was not significantly governed by binding to the CECR (Cation Exchange Capacity in Roots) but more certainly due to the difference in efficiency of radial and longitudinal transports among species. Unfortunately, these authors did not work with different P inputs (200 μM $NH_4H_2PO_4$) which would have been of great interest to compare with our results.

By combining these observations with results obtained by Mihalik et al. (2012) who demonstrated a correlation between the presence of citric acid in soil and the increase of U translocation to shoots, we can suppose that the increase of citrate exudation observed at day 49 by *L. albus* in $+P$ conditions could explain why we observed a significant increase of U translocation. Indeed, it seems likely that an increase of citrate exudation is linked to an increase of root citrate concentration (directly or indirectly via an input of citrate into the root vasculature through the root tips or by diffusion across membranes as suggested by Durrett et al. (2007)) yet this phenomenon is correlated with an improvement of metals xylem loading and transfer to the leaves. This has especially been demonstrated for iron in *Arabidopsis thaliana* (Durrett et al., 2007) and for nickel in *Thlaspi caerulescens* (Richau et al., 2009). In accordance with the statement that U-citrate complexes are bioavailable, citrate exudated by $+P+U$ plants must have been the element that promoted the mobility of U in the apoplast leading to an increase of translocation rates between day 34 and day 49.

5. Conclusion

This study highlights the important toxicity of U and the importance of the presence of P in the growth medium (nutrient solution, soil solution) during U contamination on physiological responses, U accumulation and toxicity, and citrate exudation of *L. albus*. In the presence of P in solution, transfer of U was limited by P–U precipitation at the root interface. Because citrate exudation is always controlled by shoot P concentration, U is suspected to be a signal to stimulate the carboxylate exudation, which particularly facilitate the transporting process. Indeed, exudation of citrate can be linked to higher root-to-shoot translocation of U. On the contrary, in low-P medium, U transfer to roots was high and induced damages, which interfered with the responses of plants to low P (exudation, root architecture response, ...). This research has been carried out in the broader framework of the study of U phytoavailability in the rhizosphere and the role of plant exudate on its variability. Indeed, it contributes to determine if environmentally consistent concentrations of citrate produced by roots may be sufficient to increase the solubilization of U in soil and thus promote its transfer to the plants.

Author's Personal Copy

264

A. Tailliez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

Acknowledgment

The authors wish to thank C. Della Vedova (Magelis) for her great help with the design of appropriate methods of statistical analysis, P. Devaux (Florimond-Desprez) for the gift of the seeds, S. Augustine, R. Gilbin and P. Hurtevent for the critical reading of the manuscript, and G. Neumann, W. Horst, C. Lecomte-Pradines and S. Shen for their valuable assistance during the development of experiments. This study is a part of the ENVIRHOM research program supported by the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety.

References

- Aery, N.C., Jain, G.S., 1997. Effect of uranyl nitrate on seed germination and early seedling growth of *Triticum aestivum*. *Biologia Bratislava* 52 (1), 115–119.
- Aery, N.C., Jain, G.S., 1998. Influence of uranium on the growth of wheat. *J. Environ. Biol.* 19, 15–23.
- Barraclough, P.B., 1989. Root growth, macro-nutrient uptake dynamics and soil fertility requirements of a high-yielding winter oilseed rape crop. *Plant Soil* 119 (1), 59–70.
- Boileau, L.J.R., Nieboer, E., Richardson, D.H.S., 1985. U accumulation in the lichen *Cladonia rangiferina*. Part II. Toxic effects of cationic, neutral and anionic forms of the uranyl anion. *Can. J. Bot.* 63, 390–397.
- Bourrellet, P.-H., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion. TEC & DOC Lavoisier, Paris (France).
- Colle, C., Garnier-Laplace, J., Roussel-Debet, S., Adam, C., Baudin, J.P., 2001. Comportement de l'uranium dans l'environnement. In: Métivier, H. (Ed.), L'uranium de l'environnement à l'homme. EDP Sciences – IPSN Collection, Les Ulis (France) vol. 6, pp. 187–211.
- Denison, F., Garnier-Laplace, J., 2003. The effects of database parameters uncertainty on uranium(VI) equilibrium calculations. *Geochim. Cosmochim. Acta* 69, 2183–2191.
- Dinkelaker, B., Hengeler, C., Marschner, H., 1995. Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot. Acta* 108, 183–200.
- Dinkelaker, B., Römheld, V., Marschner, H., 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ.* 12 (3), 285–292.
- Duquène, L., Tack, F., Meers, E., Baeten, J., Wannijn, H., Vandenove, H., 2008. Effect of biodegradable amendments on uranium solubility in contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 391 (1), 26–33.
- Durrett, T.P., Gassmann, W., Rogers, E.E., 2007. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol.* 144, 197–205.
- Ebbs, S.D., Brady, D.J., Norvell, W.A., Kochian, L.V., 2001. Uranium speciation, plant uptake, and phytoremediation. *Journal of Hazardous. Tox. Radioact. Waste* 5 (3), 130–135.
- Ebbs, S.D., Norvell, W.A., Kochian, L.V., 1998. Soil processes and chemical transport: the effect of acidification and chelating agents on the solubilization of uranium from contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 27 (6), 1486–1494.
- Ericsson, T., 1995. Growth and shoot: root ratio of seedlings in relation to nutrient availability. *Plant Soil* 168–169 (1), 205–214.
- Ericsson, T., Rytter, L., Linder, S., 1992. Nutritional Dynamics and Requirements of Short Rotation Forests. In: Ford-Robertson, J.B., Hincley, T., Sennerby-Forsse, L. (Eds.), *Ecophysiology of Short Rotation Forest Crops*. Elsevier applied science, Mitchell, C. P.
- Fry, S.C., 1986. Polymer-bound phenols as natural substrates of peroxidases. In: Greppin, H., Penel, C., Gaspar, T. (Eds.), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase*. University of Geneva, Geneva (Switzerland), pp. 169–182.
- Gabriele, R., Pandolfi, T., Vergano, O., Palandri, M.R., 1990. Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant Soil* 122 (2), 271–277.
- Gardner, W.K., Barber, D.A., Parbery, D.G., 1983. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant Soil* 70, 107–124.
- Gueniot, B., Munier-Lamy, C., Berthelin, J., 1988. Geochemical behaviour of uranium in soils, part I. Influence of pedogenic processes on the distribution of uranium in aerated soils. *J. Geochem. Explor.* 31, 21–37.
- Günther, A., Bernhard, G., Geipel, G., Reich, T., Rossberg, A., Nitsche, H., 2003. Uranium speciation in plants. *Radiochimica Acta* 91, 319–328.
- Hopkins, W.G., Hüner, N.P.A., 2008. Plants and inorganic nutrients. In: *Introduction to Plant Physiology*, fourth ed. Wiley, Ch. 4.
- Huang, J.W., Blaylock, M.J., Kapulnik, Y., 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.
- IAEA, 2010. *Handbook of Parameter Values for the Prediction of Radionuclide Transfer in Terrestrial and Freshwater Environments*. Technical Report 472. International Atomic Energy Agency, Vienna (Austria).
- Jerden, J.L., Sinha, A.K., 2003. Phosphate based immobilization of uranium in an oxidizing bedrock aquifer. *Appl. Geochem.* 18, 823–843.
- Johnson, J.F., Vance, C.P., Allan, D.L., 1996. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 112, 31–41.
- Li, H., Shen, J., Zhang, F., Tang, C., Lambers, H., 2008. Is there a critical level of shoot phosphorus concentration for cluster-root formation in *Lupinus albus*? *Funct. Plant Biol.* 35, 328–336.
- Lozano, J.C., Blanco Rodríguez, P., Vera Tomé, F., Prieto Calvo, C., 2011. Enhancing uranium solubilization in soils by citrate, EDTA and EDDS chelating amendments. *J. Hazard. Mater.* 198, 224–231.
- Marschner, H., 2002. Nutrient availability in soils. In: Marschner, H. (Ed.), *Mineral Nutrition of Higher Plants*, second ed., Ch. 13 Academic Press – Elsevier Science, London (United Kingdom), pp. 483–507.
- Marschner, H., Römheld, V., Calmak, I., 1987. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *J. Plant Nutr.* 10, 9–16.
- Marschner, H., Römheld, V., Horst, W.J., Martin, P., 1986. Root induced changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 149, 441–456.
- Marschner, P., Neumann, G., Kania, A., Weiskopf, L., Lieberei, R., 2002. Spatial and temporal dynamics of the microbial community structure in the rhizosphere of cluster roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Soil* 246, 167–174.
- Mihalik, J., Henner, P., Frelon, S., Camilleri, V., Février, L., 2012. Citrate assisted phytoextraction of uranium by sunflowers: study of fluxes in soils and plants and resulting *intra-planta* distribution of Fe and U. *Environ. Exp. Bot.* 77, 249–258.
- Misson, J., Henner, P., Morello, M., Floriani, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Février, L., 2009. Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. *Environ. Exp. Bot.* 67, 353–362.
- Misson, J., Raghothama, K.G., Jain, A., Joubert, J., Block, M.A., Bligny, R., Ortet, P., Creff, A., Somerville, S., Rolland, N., Doumas, P., Nacry, P., Herrera-Estrella, L., Nussaume, L., Thibaud, M.-C., 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 102 (33), pp. 11934–11939.
- Mkandawire, M., Vogel, K., Taubert, B., Dudel, E.G., 2007. Phosphate regulates uranium(VI) toxicity to *Lemma gibba* L. *G3. Environ. Toxicol.* 22, 9–16.
- Neumann, G., Massonneau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Römheld, V., Martinoia, E., 2000. Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Ann. Bot.* 85, 909–919.
- Neumann, G., Massonneau, A., Martinoia, E., Römheld, V., 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208, 373–382.
- Panda, B.B., Panda, K.K., Patra, J.P., Sahu, G.K., Mitra, R.K., 2001. Evaluation of phytotoxicity and genotoxicity of uranyl nitrate on *Allium* assay system. *Indian J. Exp. Biol.* 39, 57–62.
- R Development Core Team, 2011. *The R Project for Statistical Computing*. URL: <http://www.r-project.org>.
- Raghothama, K.G., 1998. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 665–693.
- Ragnarsdottir, K.V., Charlet, L., 2000. Uranium behaviour in natural environments. In: Cotter-Howells, J.D., Campbell, L.S., Valsami-Jones, E., Batchelder, M. (Eds.), *Environmental Mineralogy: Microbial Interactions, Anthropogenic Influences, Contaminated Land and Waste Management*. Vol. 9 of Mineralogical Society Series. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, Twickenham (United Kingdom), pp. 245–289.
- Ribera, D., Labrot, F., Tisnerat, G., Narbonne, J.F., 1996. Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 146, 53–89.
- Richau, K.H., Kozhevnikova, A.D., Seregin, I.V., Vooijs, R., Koevoets, P.L.M., Smith, J.A.C., Ivanov, V.B., Schat, H., 2009. Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 183, 106–116.
- Rufyikiri, G., Wannijn, J., Wang, L., Thiry, Y., 2006. Effects of phosphorus fertilization on the availability and uptake of uranium and nutrients by plants grown on soil derived from uranium mining debris. *Environ. Pollut.* 141, 420–427.
- Schat, H., Ten Bookum, W.M., 1992. Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*. *Heredity (Edinb)* 68, 219–229.
- Shahandeh, H., Hossner, L.R., 2002a. Enhancement of uranium phytoaccumulation from contaminated soils. *Soil Sci.* 167, 269–280.
- Shahandeh, H., Hossner, L.R., 2002b. Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium. *Water Air Soil Pollut.* 141, 165–180.
- Shane, M.W., De Vos, M., De Roock, S., Lambers, H., 2003. Shoot P status regulates cluster-root growth and citrate exudation in *Lupinus albus* grown with a divided root system. *Plant. Cell Environ.* 26, 265–273.
- Shen, J., Li, H., Neumann, G., Zhang, F., 2005. Nutrient uptake, cluster root formation and exudation of protons and citrate in *Lupinus albus* as affected by localized supply of phosphorus in a split-root system. *Plant Sci.* 168, 837–845.
- Shen, J., Yuan, L., Zhang, J., Li, H., Bai, Z., Chen, X., Zhang, W., Zheng, F., 2011. Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol.* 156, 997–1005.
- Sheppard, S.C., Sheppard, M.L., Gallerand, M.-O., Sanipelli, B., 2005. Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J. Environ. Radioact.* 79, 55–83.
- Straccek, A., Duquène, L., Wegrzynek, D., China-Cano, E., Wannijn, J., Navez, J., Vandenove, H., 2010. Differences in U root-to-shoot translocation between plant species explained by U distribution in roots. *J. Environ. Radioact.* 101 (3), 258–266.

Author's Personal Copy

A. Tailliez et al. / Journal of Environmental Radioactivity 124 (2013) 255–265

265

- Van der Lee, J., 1988. Thermodynamic and Mathematical Concept of CHES. Tech. rep., Ecole des mines de Paris, Fontainebleau (France).
- Van der Lee, J., Lomenech, C., 2003. Towards a common thermodynamic database for speciation models. *Radiochimica Acta* 92, 811–818.
- Vandenhove, H., Cuypers, A., Van Hees, M., Koppen, G., Wannijn, J., 2006. Oxidative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 795–805.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Smeets, K., Remans, T., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2008. Effects of uranium and phosphate concentrations on oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 987–996.
- Viehweger, K., Geipel, G., 2010. Uranium accumulation and tolerance in *Arabidopsis halleri* under native versus hydroponic conditions. *Environ. Exp. Bot.* 69 (1), 39–46.
- Wang, B.L., Shen, J.B., Zhang, W.H., Zhang, F.S., Neumann, G., 2007. Citrate exudation from white lupin induced by phosphorus deficiency differs from that induced by aluminium. *New Phytol.* 3, 581–589.
- Zeng, F., Chen, S., Miao, Y., Wu, F., Zhang, G., 2008. Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environ. Pollut.* 155 (2), 284–289.
- Zheng, Z., Tokunaga, T.K., Wan, J., 2003. Influence of calcium carbonate on U(VI) sorption to soils. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5603–5608.

C Encadrement

Ce doctorat a été l'occasion de participer à différentes activités d'encadrement de techniciens de laboratoire et d'un stagiaire. En effet les expériences menées en réacteurs fermés et sur rhizotests ont fait l'objet d'un stage de niveau bac +5 de janvier à juillet 2012. J'ai personnellement participé au processus de recrutement en rédigeant et diffusant une offre de stage (cf. document page 204), en organisant les entretiens d'embauche, et en donnant mon avis sur le choix du candidat.

Ce choix s'est porté sur Félix Brédoire, alors élève en dernière année de cycle ingénieur à l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Nancy. Avec l'aide de Pascale Henner, j'ai participé à son encadrement au quotidien :

- formation scientifique : définition du domaine d'étude, des enjeux scientifiques et de la théorie associée au sujet de stage ;
- formation technique : explication et démonstration des protocoles et techniques analytiques à mettre en œuvre ; vérification des acquis et de la bonne pratique en laboratoire ;
- réflexion scientifique : discussion sur les expériences et protocoles, leur intérêt, leur ajustement, leur adéquation avec les résultats recherchés ;
- interprétation de données : participation à l'élaboration des tests statistiques et aux conclusions à tirer des résultats obtenus ;
- valorisation du travail : conseils pour la rédaction du mémoire et la préparation de la soutenance orale.

Au terme de son stage et de la soutenance, Félix Brédoire a validé sa dernière année de cursus ingénieur et a décidé de poursuivre ses études dans le domaine de la recherche en doctorat.

Sujet de stage de Master 2
Sciences de la Vie, du Sol et de l'Environnement
Janvier à Juin 2012 (6 mois)

1 Titre du stage

Caractérisation de l'impact de l'exsudation de citrate par les racines protéoïdes du lupin blanc (*Lupinus albus cv. amiga*) sur la phytodisponibilité de l'uranium naturellement présent dans un sol.

2 Mots-clés

Phytodisponibilité, rhizosphère, uranium, extraction séquentielle, *Lupinus albus cv. amiga*

3 Contexte

Le développement industriel intensif et la récurrence de catastrophes d'origine anthropique conduisent à la dégradation générale de notre environnement. Au même titre que l'atmosphère et l'eau, les sols contaminés par les métaux lourds font l'objet d'une surveillance accrue qui se justifie par leur position à l'interface entre de nombreux produits alimentaires et les consommateurs.

Dans le cadre du projet ENVIRHOM démarré en 2001, l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire s'est fixé pour objectif de mieux appréhender les risques écologiques et sanitaires liés à l'exposition chronique aux radionucléides par le biais de méthodes d'expertise efficaces.

En Novembre 2009, une thèse de doctorat traitant de la phytodisponibilité de l'uranium à l'interface sol-racine a vu le jour au sein du Laboratoire de Radioécologie et d'Écotoxicologie basé sur le centre de Cadarache (Saint Paul lez Durance, Bouches du Rhône). Deux années plus tard, les recherches se sont focalisées sur une espèce végétale modèle ayant la particularité de modifier la composition chimique de sa rhizosphère lors de carence en phosphore, le lupin blanc. L'hypothèse sur laquelle s'appuie ce travail est que les modifications physico-chimiques induites par les plantes dans le sol au voisinage des racines, notamment dans le cadre de stratégies de nutrition, sont susceptibles d'influer de manière non négligeable la disponibilité des radionucléides présents dans le sol et par voie de conséquence leur absorption par les végétaux.

4 Description du projet

Le sujet de stage proposé s'inscrit dans la dernière phase expérimentale de la thèse évoquée ci-dessus. Une première série d'expériences en hydroponie a permis de mettre en évidence les exsudations différentielles de citrate en présence et absence de phosphore et d'uranium appauvri. Les concentrations d'uranium utilisées, de l'ordre de 25 mg l^{-1} , représentent une dose inférieure au seuil provoquant un arrêt total de la croissance racinaire. Les informations ainsi collectées nous ont permis d'appréhender la physiologie de la plante soumise à un stress important mais non létal.

Les travaux menés par le candidat choisi auront deux objectifs principaux qui sont (1) l'évaluation de l'effet de l'exsudation de citrate sur la distribution entre phases porteuses solides et solution du sol de l'uranium présent naturellement dans un sol et (2) la quantification du transfert du radionucléide du sol à la plante. Pour parvenir à ses fins, le candidat utilisera un dispositif de type RHIZOtest permettant d'une part de reproduire des conditions proches de celles retrouvées dans un sol rhizosphérique et d'autre part de séparer facilement le sol, le système racinaire et les parties aériennes pour les analyses ultérieures.

Le stage s'articulera autour de manipulations (environ 2 mois) et d'analyses variées (minéralisation d'échantillons, quantification par ICP-AES, ICP-MS et chromatographie ionique, extractions séquentielles). Un temps non-négligeable devra être consacré à la revue bibliographique ayant trait au sujet, à l'interprétation des résultats obtenus, aux analyses statistiques et à la rédaction d'un rapport.

5 Compétences requises

Le candidat sélectionné possèdera un solide bagage en Biologie végétale et en Sciences du sol. Il devra avoir l'esprit d'initiative ainsi qu'un goût prononcé pour la recherche et les expérimentations. La maîtrise de l'anglais, l'esprit d'équipe et le sens du relationnel seront des plus appréciés.

6 Contacts

Pour obtenir des informations complémentaires relatives à cette proposition de stage, veuillez contacter Antoine TAILLIEZ ou Pascale HENNER par courrier électronique ou téléphone. L'établissement d'un premier contact avant l'envoi de vos curriculum vitae et lettre de motivation sera apprécié.

Antoine TAILLIEZ ☎ 04 42 19 96 32
✉ 06 21 72 54 91
✉ antoine.tailliez@irsn.fr

Pascale HENNER ☎ 04 42 19 95 61
✉ pascale.henner@irsn.fr

D Résumés de la thèse

D.1 Version française

La rhizosphère, fraction du sol soumise à l'influence des racines, est une zone dans laquelle se déroulent d'importants processus physico-chimiques gouvernant les transferts de nutriments du sol à la plante. Elle constitue donc un lieu d'entrée privilégié pour les contaminants parmi lesquels les éléments-traces métalliques. Etant données les ressemblances existant entre nutriments et contaminants, il n'est pas rare que les mécanismes physiologiques mis en place au niveau des racines pour subvenir aux besoins nutritifs des végétaux soient détournés de leur fonction d'origine favorisant ainsi l'absorption d'éléments toxiques néfastes pour leur développement.

L'étude proposée s'inscrit dans un contexte de contamination croissante de la pédosphère et fait le choix d'appréhender cette problématique au travers d'une approche centrée sur la rhizosphère et sur les mécanismes qui gouvernent son évolution. Ces travaux se focalisent plus particulièrement sur la relation entre l'uranium – un métal naturel ubiquiste non-essentiel – et le citrate – un acide organique de faible poids moléculaire exsudé par certaines espèces végétales lorsqu'elles poussent sur un milieu carencé en phosphore. Parmi ces espèces particulières le lupin blanc (*Lupinus albus*) fait office de plante modèle et a donc été choisi en tant que tel. Afin de replacer le travail dans un contexte environnemental, un sol naturellement riche en uranium prélevé à l'affleurement d'une veine de pechblende a été utilisé.

L'objectif principal de cette thèse a donc été de savoir si l'activité racinaire du lupin blanc est suffisante pour provoquer la remobilisation de l'uranium dans la solution du sol et favoriser son transfert à l'organisme. Pour répondre à cette problématique, le système sol/plante a été étudié dans son ensemble sur rhizotest et de manière découplée en hydroponie et en réacteurs fermés.

Il a ainsi été démontré que la présence d'uranium dans un milieu de culture contrôlé (hydroponie) stimule l'exsudation de citrate chez les lupins blancs qui ne sont pas carencés en phosphore et que cette exsudation de citrate favorise la solubilisation de l'uranium dans la solution du sol sous certaines conditions en réacteur fermé. Ces résultats ont pu être confirmés par les observations faites sur rhizotest même si les valeurs obtenues dans ce cas étaient plus nuancées, vraisemblablement à cause de la complexité du sol. Ceci justifie les approches utilisées et met en évidence leur cohérence et leur complémentarité.

Les résultats obtenus ont également permis d'apporter des informations concernant la toxicité de l'uranium, son internalisation dans les cellules racinaires ainsi que sur son transfert des racines aux parties aériennes.

Mots-clés : uranium, phytodisponibilité, citrate, phosphore, rhizosphère, spéciation, lupin blanc (*Lupinus albus*)

D.2 English version

The rhizosphere, a soil fraction influenced by roots, is an area in which occur important physico-chemical processes that govern the transfer of nutrients from soil to plant. It is therefore an ideal entry point for many contaminants including metals. Indeed, given the similarities between nutrients and contaminants, it is not uncommon that the physiological mechanisms involved in crop nutrition are diverted from their original function to enhance the absorption of toxic and harmful elements.

The present study is related to the context of pedosphere contamination increasing and chose to consider this issue through a focus on rhizosphere and mechanisms that govern its evolution. This work will be oriented on the relation between uranium – a non-essential ubiquitous metal – and citrate – a low molecular weight organic acid exudated by specific species when grown on a phosphorus-deficient environment. Among these particular species white lupine (*Lupinus albus*) is considered as a model species which explains why it was chosen to carry out this work. Furthermore, a natural soil containing huge amounts of uranium has been collected at the outcrop of a pitchblende vein and used during some experiments.

The main aim of this PhD thesis was to determine if the root activity of white lupine is sufficient to cause the remobilization of uranium into soil solution and so to promote the transfer of this contaminant to the plant. To answer this problematic, the soil/plant system has been studied with rhizotests (whole system) and by combining datas obtained with hydroponics experiments and closed reactors tests (decoupled system).

Thereby, it has been demonstrated that the presence of uranium in a controlled growth medium (hydropony) stimulates citrate exudation in P-sufficient white lupine. More, this citrate exudation enhances uranium solubilization in soil solution under specific conditions in batches. These results have been confirmed by observations on rhizotest even if the values in this case were more nuanced, probably because of soil complexity. This justifies the employed approaches and highlights their coherence and complementarity.

The results also allowed to provide additional information concerning uranium toxicity, its internalization in root cells as well as its transfer from roots to aerial parts.

Keywords : uranium, phytoavailability, citrate, phosphorus, rhizosphere, speciation, white lupine (*Lupinus albus*)