



HAL
open science

Study of the impact of environmental bacteria on uranium speciation in order to engage bioremediation process

Guillaume Untereiner

► **To cite this version:**

Guillaume Untereiner. Study of the impact of environmental bacteria on uranium speciation in order to engage bioremediation process. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT : . pastel-00004694

HAL Id: pastel-00004694

<https://pastel.hal.science/pastel-00004694>

Submitted on 19 Mar 2009

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

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

C'est l'histoire d'un mec...

Remerciements

A l'issu de ce travail de 3 ans au sein du CEA Saclay, je tiens à remercier les personnes qui m'ont permis de mener à bien cette thèse et surtout qui m'ont soutenu. Je remercie tout d'abord l'AgroParisTech pour son financement et le Professeur Jean Claude Meunier qui a bien voulu prendre la direction de ce travail.

Mes remerciements vont ensuite à Stéphane Lequien et Pascal Berger qui m'ont accueilli au sein du laboratoire Pierre Süe et également à Barbara Gouget, responsable de l'équipe Toxicologie Humaine et Environnementale, pour m'avoir guidé dans ce travail et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de cette recherche. Je remercie également chaudement Marie Carrière qui a su prendre la relève avec brio dans la dernière année, pour sa gestion, ses conseils et ses corrections.

Je remercie mes rapporteurs de thèse, les docteurs Catherine Berthomieu et Christophe Den Auwer pour leurs remarques pertinentes qui ont permis d'enrichir ce manuscrit. Je remercie également le professeur Colin Tinsley pour avoir bien voulu accepter de faire partie de mon jury de thèse ainsi que le docteur Mohamed Merroun pour avoir bien voulu faire le voyage de Dresde.

Je remercie tout le personnel du laboratoire Pierre Süe que j'ai côtoyé pendant trois ans et avec lequel j'ai pu travailler. Merci à Francine Carrot et Clarisse Mariet pour les analyses ICP-MS ; à Jim Hoarau et Eddy Foy pour leur aide et leurs conseils pour l'installation anaérobie et Hervé Martin pour toute la logistique.

Je tiens également à remercier Danielle Jaillard et Jeril Degrouard pour toute leur aide en microscopie électronique. Merci beaucoup pour votre formation mais surtout pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre aide. Il en est de même pour toute l'équipe FAME de l'ESRF qui a su me faire comprendre et aimer la partie EXAFS de mon travail. J'ai pu découvrir cette partie de la physique que je ne connaissais pas et que j'ai beaucoup appréciée. Merci plus particulièrement à Jean Louis Hazemann, Olivier Proux et Denis Testemale pour votre disponibilité et vos conseils.

Cette thèse n'aurait pas eu la même saveur sans la présence des autres chercheurs de l'équipe. Je pense à Céline Thiebault, Estelle Bakkaus et Sarah Milgram qui ont toujours été là pour permettre une ambiance sereine de travail. Un grand merci pour votre aide, votre soutien, vos conseils et votre bonne humeur. Cela a été un grand plaisir de travailler à vos côtés. Vous me manquerez. Je tiens à remercier plus particulièrement Angélique Simon qui a partagé mon bureau pendant 3 ans. Ça n'a pas dû être facile tous les jours mais tu as toujours été là avec ta gentillesse et ton énergie débordante même dans les périodes difficiles. Merci pour tout.

Un bâtiment nous séparait mais contrairement à d'autres, nous avons laissé les à-priori de côté et nous avons pu nous rencontrer. Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. J'ai pu rencontrer des personnes formidables. Je n'ai pas les mots pour vous remercier. Je pense plus particulièrement aux deux Maxime, à Yves, à Eddy, à Charlotte, à Mandana, à Stéphanie L., à Aline mais également à Maïté et à Judith, compagnon(ne)s d'infortune qui s'en sont sorties avec plus que les honneurs ! Vous avez été géniaux my friends!!! (personne n'a un mouchoir ?) Je tiens aussi à faire de la pub pour le collectif SOS Blagues Nulles qui a été créé pour soutenir les thésards en détresse. Des membres sont toujours présents au labo (et même maintenant ailleurs) alors ne le faites pas mourir. Henry Basmati compte sur vous !!!

Un grand merci à ma famille qui a su me soutenir durant ces 3 ans mais surtout qui a essuyé les mauvais moments sans des fois vraiment comprendre. Je suis désolé pour ça. Mais heureusement que vous étiez là aussi.

Je finirais par la personne qui compte le plus pour moi, qui a su me faire aller de l'avant et me donner toute la motivation nécessaire pour finir. Merci Stéphanie.

SOMMAIRE

<u>Liste des Figures</u>	16
<u>Liste des Tableaux, équations et images</u>	22
<u>Glossaire</u>	26
<u>Liste des abréviations</u>	32
<u>Introduction</u>	34
<u>Objectifs et démarches</u>	36
<u>Chapitre 1 : Etude Bibliographique</u>	37
PARTIE A : L'URANIUM	39
I. GENERALITES SUR L'URANIUM	39
<u>1. De sa découverte à nos jours</u>	39
<u>2. Propriétés physico chimiques</u>	40
<i>a. L'uranium élémentaire</i>	40
<i>b. Propriétés physiques de l'uranium</i>	40
<i>c. Propriétés nucléaires</i>	40
<i>d. Chimie de l'uranium en solution</i>	41
II. L'URANIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	45
<u>1. Origine</u>	45
<u>2. Complexation de l'uranium dans la solution du sol</u>	46
<i>a. Influence de la matière organique</i>	47
<i>b. Influence des acides organiques</i>	47

c.	<i>Influence des phosphates</i>	49
d.	<i>Influence des carbonates</i>	50
e.	<i>Influence des oxydes et hydroxydes de fer et d'aluminium</i>	52
f.	<i>Influence des argiles</i>	53
3.	<u>Complexation de l'uranium dans les eaux de surface</u>	53
III.	TOXICITE DE L'URANIUM	54
1.	<u>L'uranium dans la chaine alimentaire humaine</u>	54
2.	<u>Facteurs influençant la toxicité</u>	54
3.	<u>Cibles de l'uranium</u>	55
4.	<u>Radiotoxicité</u>	55
5.	<u>Chimiotoxicité</u>	56
IV.	INTERACTION ENTRE L'URANIUM ET LES MICROORGANISMES	57
1.	<u>Réduction de l'uranium</u>	59
2.	<u>Accumulation/biosorption de l'uranium</u>	62
3.	<u>Précipitation de l'uranium(VI)</u>	64
V.	ETUDE DES COMPLEXES D'URANYLE PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION X	
1.	<u>Les complexes de phosphates d'uranyle</u>	66
2.	<u>Les complexes de carbonate d'uranyle</u>	68
3.	<u>Les complexes d'uranium et d'acides organiques</u>	69
4.	<u>Les complexes d'uranium associés aux membranes bactériennes</u>	71
PARTIE B :	MODELES BACTERIENS ETUDIES	73
I.	MODELE D'ETUDE RESISTANT AUX METAUX : <i>CUPRIAVIDUS METALLIDURANS</i>	
	CH34	73
1.	<u>Description générale</u>	73
2.	<u>Taxonomie de la souche</u>	75
3.	<u>Génome</u>	76
4.	<u>Résistance aux éléments-traces métalliques</u>	77
5.	<u>Mécanismes de résistance aux métaux lourds chez <i>C. metallidurans</i></u>	
	<u>CH34</u>	78
II.	MODELE D'ETUDE RESISTANT AUX RADIATIONS : <i>DEINOCOCCUS</i>	
	RADIODURANS R1	81

1. <u>Description générale</u>	81
a. <i>Structure cellulaire</i>	82
b. <i>Phylogénie et évolution</i>	83
c. <i>Métabolisme</i>	83
2. <u>Génome</u>	84
3. <u>Résistance aux dommages à l'ADN :</u>	85
4. <u>Réparation de l'ADN</u>	86
5. <u>Réduction des métaux et de l'uranium</u>	87
III. MODELE D'ETUDE PHOTOTROPHE ET RESISTANT AUX COMPOSES	
AROMATIQUES : <i>RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS</i>	89
1. <u>Description générale</u>	89
2. <u>Génome et mécanismes de résistance aux toxiques</u>	91
3. <u>Biodégradation de composés organiques</u>	93
<u>Chapitre 2 : Matériel et Méthodes</u>	95
PARTIE A : TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE	97
I. SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEUX DE CULTURE	97
1. <u>Origine des souches bactériennes</u>	97
2. <u>Milieux utilisés pour l'étude de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34</u>	97
3. <u>Milieux utilisés pour l'étude de <i>Deinococcus radiodurans</i> R1</u>	99
4. <u>Milieux utilisés pour l'étude de <i>Rhodopseudomonas palustris</i></u>	100
II. SUIVIS DE LA CROISSANCE DES BACTERIES	102
III. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE	103
IV. EXPOSITION DES BACTERIES A L'URANIUM	103
1. <u>Cultures pour l'étude de la résistance à l'uranium</u>	104
2. <u>Cultures pour l'étude de l'accumulation de l'uranium, pour l'imagerie et la spectroscopie d'absorption des rayons X</u>	104
PARTIE B : TECHNIQUES ANALYTIQUES DE BIOCHIMIE ET DE CHIMIE	
I. DOSAGE DE L'URANIUM PAR ICP-MS	106
II. DOSAGE DE L'URANIUM PAR SPECTROPHOTOMETRIE	109

III. DOSAGE DES PHOSPHATES PAR SPECTROPHOTOMETRIE	112
PARTIE C : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION	115
I. PRINCIPE	115
II. PREPARATION DES ECHANTILLONS	120
1. <u>Fixation et post-fixation chimique</u>	120
2. <u>Déshydratation</u>	121
3. <u>Imprégnation et inclusion</u>	121
4. <u>Ultramicrotomie</u>	122
PARTIE D : SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X	124
I. PRINCIPE	124
II. DESCRIPTION DE LA LIGNE EXPERIMENTALE	128
III. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LES ANALYSES XAS	129
IV. TRAITEMENT DES DONNEES EXPERIMENTALES	131
1. <u>Normalisation des spectres</u>	132
2. <u>Extraction des oscillations</u>	132
3. <u>Transformée de Fourier (FFT)</u>	134
4. <u>Modélisation du signal</u>	134
<u>Chapitre 3 : Résultats et discussions</u>	137
PARTIE A : SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM	139
I. SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE <i>CUPRIAVIDUS METALLIDURANS CH34</i>	139
1. <u>Milieu TSM</u>	139
2. <u>Milieu modifié par ajout de citrate : milieu CSM</u>	142
3. <u>Milieu modifié par ajout de carbonate : Milieu TSM15%</u>	144
4. <u>Milieu anaérobie</u>	147
II. SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE <i>DEINOCOCCUS RADIODURANS R1</i>	148

1. <u>Milieu TYG</u>	148
2. <u>Milieu semi- synthétique</u>	149
III. SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM DANS LE MILIEU DE CULTURE DE <i>RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS</i>	152
CONCLUSION SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM	153
 PARTIE B : CROISSANCE ET RESISTANCE	156
I. CROISSANCE ET RESISTANCE DE <i>C. METALLIDURANS</i> CH34 A DIFFERENTES FORMES D'URANIUM	157
1. <u>Effet de la concentration en citrate, phosphates et carbonates en condition aérobie</u>	157
2. <u>Apport d'uranium dans les milieux de culture et conséquence pour la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34</u>	160
a. <i>Apport d'uranyle en milieu CSM : Influence du citrate d'uranyle</i>	160
b. <i>Apport d'uranium en milieu TSM15% : influence du carbonate d'uranyle</i>	161
c. <i>Suivi de la concentration en phosphates dans les milieux de culture et conséquence sur la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34</i>	163
3. <u>Croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en anaérobie</u>	167
II. CROISSANCE ET RESISTANCE DE <i>D. RADIODURANS</i> R1 A DIFFERENTES FORMES D'URANIUM	168
1. <u>Croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en milieu TYG et effet du citrate</u>	168
2. <u>Croissance en milieu semi-synthétique et effet de l'uranium</u>	170
III. CROISSANCE DE <i>R. PALUSTRIS</i> EN PRESENCE D'URANIUM	172
 CONCLUSION CROISSANCE ET RESISTANCE	174
 PARTIE C : ACCUMULATIONS ET OBSERVATIONS	176
I. ACCUMULATION DE L'URANIUM PAR <i>C. METALLIDURANS</i> CH34	176
1. <u>Accumulation du citrate d'uranyle en aérobie à pH 7,5</u>	176
2. <u>Accumulation du citrate d'uranyle en aérobie à pH 2</u>	179
3. <u>Accumulation du citrate d'uranyle en anaérobie à pH 7,5</u>	183
4. <u>Accumulation du carbonate d'uranyle en aérobie à pH 7,5</u>	185
II. ACCUMULATION DE L'URANIUM PAR <i>D. RADIODURANS</i> R1	188

1. <u>Accumulation du citrate d'uranyle en aérobie à pH 7</u>	188
2. <u>Accumulation du carbonate d'uranyle en aérobie à pH 7</u>	191
III. ACCUMULATION DE L'URANIUM PAR <i>R. PALUSTRIS</i>	194
1. <u>Accumulation de l'uranium en condition anaérobie à pH 7</u>	194
2. <u>Accumulation de l'uranium en anaérobie à pH 1</u>	197

CONCLUSION ACCUMULATION ET OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES

PARTIE D : SPECIATION EXPERIMENTALE DE L'URANIUM	204
I. ETUDES DES COMPOSES DE REFERENCE	205
1. <u>Etudes des oscillations EXAFS</u>	205
2. <u>Ajustement des données des composés de référence</u>	208
II. ETUDE DE LA SPECIATION DE L'URANIUM LORS DE LA CULTURE DE <i>C. METALLIDURANS CH34</i>	211
1. <u>Détermination de la spéciation par combinaisons linéaires.</u>	211
a. <i>Spéciation dans les milieux de culture de C. metallidurans CH34</i>	211
b. <i>Spéciation dans les culots bactériens de C. metallidurans CH34</i>	214
2. <u>Ajustement des données des composés d'uranium.</u>	216
a. <i>Spéciation de l'uranium dans les milieux de culture de C. metallidurans CH34</i>	216
b. <i>Spéciation de l'uranium dans les culots bactériens de C. metallidurans CH34</i>	218
III. ETUDE DE LA SPECIATION DE L'URANIUM LORS DE LA CULTURE DE <i>R. PALUSTRIS</i>	220
1. <u>Détermination de la spéciation par combinaisons linéaires.</u>	220
a. <i>Spéciation dans les milieux de culture de R. palustris</i>	220
b. <i>Spéciation dans les culots bactériens de R. palustris</i>	222
2. <u>Ajustement des données des composés d'uranium.</u>	224
a. <i>Spéciation de l'uranium dans les milieux de culture de R. palustris</i>	224
b. <i>Spéciation de l'uranium dans les culots bactériens de R. palustris</i>	226

CONCLUSION SPECIATION EXPERIMENTALE DE L'URANIUM	229
<u>Conclusion et Perspectives</u>	233
<u>Bibliographie</u>	241
<u>Annexes</u>	267

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Potentiels d'oxydoréduction de l'uranium en solvant HClO₄ 1M à température ambiante. 41
- Figure 2** : Diagramme de Pourbaix de l'uranium à 10μM en solution aqueuse sans ligand à 25°C. 43
- Figure 3** : Diagramme de spéciation de l'uranium à 100nM dans l'eau pure en fonction du pH. 43
- Figure 4** : Diagramme de spéciation de l'uranium à 1mM dans l'eau pure en fonction du pH. 44
- Figure 5** : Diagramme de spéciation de l'uranium VI à 1mM en solution de citrate à 10mM en fonction du pH. 48
- Figure 6** : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 100μM en solution de phosphates à 1mM en fonction du pH. 49
- Figure 7** : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 1mM en solution de phosphate à 5mM en fonction du pH. 50
- Figure 8** : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 100μM en solution de carbonate à 4mM en fonction du pH. 51
- Figure 9** : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 1mM en solution de carbonate à 40mM en fonction du pH. 52
- Figure 10** : Les différents mécanismes de résistance des bactéries contre les métaux. 57
- Figure 11** : Diminution de la concentration en U(VI) en solution en présence de *Desulfovibrio desulfuricans* et d'une eau provenant d'une mine d'uranium. 59
- Figure 12** : Réduction d'uranium VI en solution par *S. putrefaciens* à différentes concentrations en Ca²⁺ en présence de carbonates en aérobie et en anaérobie. 61
- Figure 13** : Observation de précipités d'uraninite à la surface de bactéries par microscopie électronique à balayage. 62
- Figure 14** : Accumulation totale et adsorption de l'uranium par deux souches de *Thiobacillus ferrooxydans* à pH 1,5 et pH 4 en fonction de la concentration initiale en uranium. 63

Figure 15 : Observations au microscope électronique en transmission de précipités d'uranium au contact d'une espèce de <i>Microbacterium</i> .	64
Figure 16 : Représentation schématique d'un complexe de phosphate d'uranyle.	67
Figure 17 : Représentation schématique des sphères de coordination de $(\text{UO}_2)(\text{CO}_3)_3^{4-}$.	68
Figure 18 : Formule semi-développée du l'acétate, du citrate et du malate.	70
Figure 19 : Structure proposée de l'acétate d'uranyle.	70
Figure 20 : Observation de <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 en condition aérobie à 30°C en milieu classique par microscopie électronique en transmission.	73
Figure 21 : Observation de <i>D. radiodurans</i> R1 à 30°C en milieu classique par microscopie électronique en transmission.	82
Figure 22 : Courbe de survie de <i>D. radiodurans</i> R1 (carré) et d' <i>E. coli</i> après irradiation par des rayons gamma.	86
Figure 23 : Observation de <i>R. palustris</i> en milieu classique en anaérobiose par microscopie électronique en transmission.	89
Figure 24 : Vue globale du métabolisme de <i>R. palustris</i> .	90
Figure 25 : Schéma de fonctionnement de l'ICP-MS.	107
Figure 26 : Protocole schématisé de préparation des échantillons pour l'analyse par ICP-MS.	109
Figure 27 : Formule développée du TAC, complexant de l'uranium.	110
Figure 28 : Protocole schématique de préparation des échantillons pour le dosage de l'uranium par spectrophotométrie.	112
Figure 29 : Formule développée du tartrate antimoné de potassium, de l'acide ascorbique, de l'acide phosphomolybdique.	113
Figure 30 : Protocole schématique de préparation des échantillons pour le dosage des phosphates.	114
Figure 31 : Principales interactions entre la matière et les électrons utilisées en biologie.	116

Figure 32 : Schéma d'un microscope électronique en transmission.	117
Figure 33 : Photo du poste de travail du MET du CCME d'Orsay.	118
Figure 34 : Protocole de préparation des échantillons pour le microscope électronique en transmission.	123
Figure 35 : Processus d'excitation de l'atome sondé et d'émission de particules.	125
Figure 36 : Spectre d'absorption X d'un composé d'uranyle au seuil L_{III} de l'uranium.	126
Figure 37 : Transitions de l'électron excité selon l'énergie reçue.	128
Figure 38 : Schéma de principe de la ligne de lumière FAME à l'ESRF.	129
Figure 39 : Montage expérimental utilisé sur la ligne FAME à l'ESRF pour les échantillons liquides d'uranium contenus dans des capillaires.	130
Figure 40 : Protocole de préparations des échantillons pour l'analyse par spectroscopie d'absorption des rayons X.	131
Figure 41 : Protocole de traitement des spectres EXAFS.	136
Figure 42 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu TSM en fonction du pH.	140
Figure 43 : Spéciation théorique de l'uranium à 100 μ M en milieu TSM en fonction du pH.	141
Figure 44 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu CSM en fonction du pH.	143
Figure 45 : Concentration des différentes formes d'uranium à pH 7,5 dans le milieu TSM en fonction de la concentration en carbonates pour une quantité d'uranium initiale de 1mM.	144
Figure 46 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu TSM15% en fonction du pH.	145
Figure 47 : Spéciation théorique de l'uranium à 100 μ M en milieu TSM 15% en fonction du pH.	146
Figure 48 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu Anaérobie + citrate 10mM en fonction du pH.	147

Figure 49 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu synthétique pour <i>D. radiodurans</i> R1 en fonction du pH.	149
Figure 50 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu synthétique + citrate 10mM en fonction du pH.	150
Figure 51 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu synthétique + carbonates 40mM en fonction du pH.	151
Figure 52 : Courbe de croissance bactérienne typique.	156
Figure 53 : Courbes de croissance types de <i>C. metallidurans</i> CH34 en milieu TSM, CSM et TSM15% en fonction de la densité optique à 600 nm.	158
Figure 54 : Vitesses maximales de croissance dans les différents milieux de culture de <i>C. metallidurans</i> CH34.	158
Figure 55 : Courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de citrate d'uranyle à 1mM et dans le témoin CSM sans uranium.	160
Figure 56 : Evolution des vitesses maximales de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de citrate d'uranyle à différentes concentrations.	161
Figure 57 : Courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de carbonate d'uranyle à 1mM et dans le témoin TSM15%.	162
Figure 58 : Evolution des vitesses maximales de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de carbonate d'uranyle à différentes concentrations.	162
Figure 59 : Proportion de phosphates dissous et précipités dans le milieu TSM15% en fonction de la concentration en uranium.	164
Figure 60 : Proportion d'uranium dissous et précipités dans le milieu TSM15% en fonction de la concentration en uranium.	164
Figure 61 : Courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de différentes concentrations en phosphates.	165
Figure 62 : Courbes de croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en milieu TSM en présence de précipités de phosphates d'uranyle.	166

Figure 63 : Courbe de croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en milieu TYG.	168
Figure 64 : Evolution des temps de latence et des vitesses spécifiques de croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en milieu TYG en fonction de la concentration en citrate.	169
Figure 65 : Courbes de croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en milieu semi-synthétique supplémenté en citrate ou en bicarbonate.	170
Figure 66 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de citrate d'uranyle 1mM à pH 7,5 en milieu CSM.	177
Figure 67 : Proportion d'uranium présent dans les surnageants et dans les culots bactériens après mise en contact avec <i>C. metallidurans</i> CH34 en milieu CSM à pH 2 et en aérobie.	179
Figure 68 : Proportion d'uranium présent dans les surnageants et dans les culots bactériens après mise en contact avec <i>C. metallidurans</i> CH34 en milieu CSM à pH 1 et en aérobie.	180
Figure 69 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de citrate d'uranyle 1mM à pH 7,5 en milieu CSM.	183
Figure 70 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34 en présence de carbonate d'uranyle à 300µM à pH 7,5 en milieu TSM15%.	186
Figure 71 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en présence de citrate d'uranyle à 1mM à pH 7 en milieu synthétique + citrate 3mM	188.
Figure 72 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en présence de carbonate d'uranyle à 1mM à pH 7 en milieu synthétique + carbonate 40mM.	192
Figure 73 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium précipité dans le témoin carbonate d'uranyle à 1mM à pH 7 en milieu synthétique + carbonate 40mM sans bactérie.	192
Figure 74 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé et/ou précipité par <i>R. palustris</i> en présence d'uranium à 1mM à pH 7 en anaérobie en milieu Hutner modifié.	194
Figure 75 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé et/ou précipité par <i>R. palustris</i> en présence d'uranium à 1mM à pH 1 en anaérobie en milieu Hutner modifié.	198

Figure 76 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranyle libre, du phosphate d'uranyle, du citrate d'uranyle et du carbonate d'uranyle.	206
Figure 77 : Formule semi-développée du l'acétate, du citrate et du malate.	207
Figure 78 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranyle libre, du citrate, du malate et de l'acétate d'uranyle.	207
Figure 79 : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence carbonate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés et sa modélisation.	208
Figure 80 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium en milieu CSM à pH 1 et à t_0 .	212
Figure 81 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans les culots bactériens de <i>C. metallidurans</i> CH34 à pH 7 et à t_{75} .	214
Figure 82 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'échantillon CSM à pH 7 et à 75h dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés et sa modélisation.	216
Figure 83 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'échantillon de culot bactérien de <i>C. metallidurans</i> CH34 à pH 7 et à 75h dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés et sa modélisation.	218
Figure 84 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium en milieu Hutner modifié à pH 1 et à t_0 .	221
Figure 85 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium des culots bactériens de <i>R. palustris</i> à pH 7 et à t_{75} .	223
Figure 86 : Partie réelle des oscillations EXAFS du milieu de culture Hutner modifié à pH 1 et à t_0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés et sa modélisation.	225
Figure 87 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'échantillon culot bactérien de <i>R. palustris</i> à pH 1 à 24h dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés et sa modélisation.	227

LISTE DES TABLEAUX, EQUATIONS ET IMAGES

Tableau 1 : Périodes radioactives, activités spécifiques et abondance naturelle des principaux isotopes de l'uranium.	40
Tableau 2 : Exemples de bactéries interagissant avec l'uranium.	58
Tableau 3 : Paramètres structuraux, déterminés par EXAFS, des complexes d'uranium avec différents phosphates à différents pH.	67
Tableau 4 : Paramètres structuraux des complexes d'uranium, déterminés par EXAFS, avec différents acides organiques à différents pH.	69
Tableau 5 : Conditions favorables à la croissance de <i>C. metallidurans</i> CH34.	74
Tableau 6 : Historique de la nomenclature de la bactérie <i>Cupriavidus metallidurans</i> .	76
Tableau 7 : Composition des milieux de culture de <i>C. metallidurans</i> CH34.	98
Tableau 8 : Composition des milieux de culture de <i>D. radiodurans</i> R1 en aérobie.	100
Tableau 9 : Composition des milieux de culture de <i>R. palustris</i> .	101
Tableau 10 : Récapitulatif des milieux utilisés et des spéciations associées aux milieux pour chaque bactérie aux pH optimum de croissance.	153
Tableau 11 : Croissance de <i>D. radiodurans</i> R1 en milieu semi-synthétique en présence de carbonate et de citrate d'uranyle après 72h.	171
Tableau 12 : Récapitulatif des résultats de spéciation théorique et de croissance.	175
Tableau 13 : Récapitulatif des résultats de spéciation théorique, de croissance et d'accumulation dans des conditions physiologique	202
Tableau 14 : Récapitulatif des résultats de spéciation théorique, de croissance et d'accumulation à pH 1	202
Tableau 15 : Ajustement des données pour la détermination de la structure de composés d'uranyle de référence utilisés pour les études expérimentales.	209

Tableau 16 : Structures de différents complexes d'uranyle décrits dans la littérature.	210
Tableau 17 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des milieux de culture utilisés pour les expositions de <i>C. metallidurans</i> CH34.	213
Tableau 18 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des échantillons d'uranium dans les culots bactériens de <i>C. metallidurans</i> CH34.	215
Tableau 19 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les milieux de culture de <i>C. metallidurans</i> CH34.	217
Tableau 20 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les culots bactériens de <i>C. metallidurans</i> CH34.	219
Tableau 21 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des échantillons d'uranium en milieu liquide pour <i>R. palustris</i> .	221
Tableau 22 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des échantillons d'uranium des culots bactériens de <i>R. palustris</i> .	223
Tableau 23 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les milieux de culture de <i>R. palustris</i> .	225
Tableau 24 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les culots bactériens d <i>R. palustris</i> .	227
Tableau 25 : Synthèse de la spéciation de l'uranium dans les différents échantillons analysés pour <i>C. metallidurans</i> CH34 et <i>R. palustris</i> .	230
Equation 1 : Expression des oscillations EXAFS à partir du coefficient d'absorption mesuré μ en fonction de l'énergie E.	132
Equation 2 : Expression du vecteur d'onde associé au photoélectron en fonction de son énergie E.	133
Equation 3 : Expression générale décrivant les modulations EXAFS du coefficient d'absorption.	133
Equation 4 : Formule mathématique du facteur R.	227

- Image 1** : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 7,5 en aérobie. 178
- Image 2** : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 1 en aérobie. 182
- Image 3** : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 7,5 en anaérobie. 184
- Image 4** : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de carbonate d'uranyle en milieu TSM15% à pH 7,5 en aérobie. 187
- Image 5** : Observations au microscope électronique en transmission de *D. radiodurans* R1 en phase exponentielle de croissance en milieu synthétique supplémenté en citrate à 3mM à pH 7 en aérobie. 189
- Image 6** : Observations au microscope électronique en transmission de *D. radiodurans* R1 en phase stationnaire de croissance en milieu synthétique supplémenté en citrate à 3mM à pH 7 en aérobie. 190
- Image 7** : Observations au microscope électronique en transmission de *D. radiodurans* R1 en phase stationnaire de croissance en milieu synthétique supplémenté en carbonates à 40mM à pH 7 en aérobie. 193
- Image 8** : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié sans uranium à pH 7 en anaérobie. Les flèches indiquent les thylakoïdes. 195
- Image 9** : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié en présence d'uranium à 1mM à pH 7 en anaérobie. 196
- Image 10** : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié sans uranium à pH 1 en anaérobie. 199
- Image 11** : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié en présence d'uranium à 1mM à pH 1 en anaérobie. 199

GLOSSAIRE

- **Acide dur** : Acide de Lewis dont le centre accepteur d'électron est peu polarisable. Il est donc en général peu volumineux et très chargé, comme Co^{3+} , Pb^{2+} , Ti^{4+} . Les acides durs ont tendance à réagir avec une base dure.
- **Acide teichoïque** : Acide permettant au peptidoglycane de s'attacher à la membrane des bactéries. Il est présent sur les bactéries à Gram positif mais il est absent des bactéries à Gram négatif. Les acides teichoïques sont composés de phosphates associés à du glycérol.
- **Anaérobie** : Condition de culture en absence d'air atmosphérique, c'est-à-dire sans oxygène.
- **Anoxie** : Diminution drastique de l'oxygène.
- **Anthropogénique** : Causé ou généré par l'être humain.
- **ATPase** : Famille d'enzymes liés au métabolisme énergétique. Elles sont, en général, intégrées aux membranes et provoquent, selon leur classe, la formation d'ATP par phosphorylation de l'ADP grâce à un phosphate inorganique, ou la réaction inverse, c'est-à-dire l'hydrolyse de l'ATP en ADP et un phosphate inorganique. Ce sont en majorité des pompes à ions et des transporteurs.
- **Autunite** : Minéral composé de phosphate d'uranium et de calcium hydraté de formule $\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.
- **Bacille** : Bactérie en forme de bâtonnet, par opposition aux coques (ou cocci).
- **Bactéricide** : Qui a une action létale sur une bactérie.
- **Bactéries hétérotrophes** : Se dit de bactéries qui sont capables d'utiliser des molécules organiques comme source de carbone. En opposition aux bactéries autotrophes qui utilisent le CO_2 .
- **Bactériochlorophylle** : Pigment des bactéries photosynthétiques autres que les cyanobactéries.
- **Bactériostatique** : Qui a une action d'inhibition de la prolifération bactérienne. La cellule n'est pas forcément tuée par le composé.
- **Base dure** : Base de Lewis dont le centre donneur d'électron est peu polarisable. Il est donc en général peu volumineux et très chargé, comme CO_3^{2-} , H_2O , OH^- , F^- . Les bases dures ont tendance à réagir avec les acides durs.

- **Bidentate** : Qui se lie à deux molécules.
- **Biosphère** : Ensemble des milieux où l'on retrouve la vie.
- **Bioremédiation** : Ensemble de techniques consistant à augmenter la biodégradation ou la biotransformation de polluants dans l'environnement grâce à des processus biologiques.
- **Capacité d'échange cationique** : Mesure du nombre total de sites disponibles pour l'échange de cations, du nombre total de cations échangeables ou du nombre de sites négatifs dans la matrice du sol. Elle représente la taille du réservoir permettant de stocker, de manière réversible, certains éléments cationiques comme le potassium ou le calcium.
- **Caroténoïdes** : Pigments participant à la photosynthèse.
- **Caséines** : Protéines extraites du lait.
- **Chimioosmotique (Théorie)** : Le gradient de concentration créé à travers la membrane sert de réservoir d'énergie pour la cellule.
- **Chimiotoxicité** : Toxicité provoquée de manière chimique.
- **Cofacteur** : Molécule nécessaire à une enzyme pour catalyser une réaction.
- **Coque (ou cocci)** : Bactérie de forme sphérique, par opposition aux bacilles.
- **Crossover** : Processus de réarrangement génétique de chromosomes homologues.
- **Cyanobactérie** : Famille de bactéries réalisant la photosynthèse.
- **Cycle de Krebs** : Série de réaction permettant la production d'intermédiaires énergétiques pour la cellule. Il fait intervenir, entre autres, le citrate et le malate (également appelé cycle des acides tricarboxyliques).
- **Ferrihydrite** : Oxyhydroxyde de fer de formule $\text{Fe}_5\text{O}_3(\text{OH})_9$.
- **Génotoxicité** : Propriété de certains toxiques de produire des mutations affectant le patrimoine génétique des organismes exposés.

- **Géosphère** : Fraction de masse solide et liquide du globe terrestre comprenant la lithosphère et l'hydrosphère, c'est à dire la partie de la Terre qui sert de support à l'ensemble des êtres vivants, comprenant la couche externe de la lithosphère, l'hydrosphère et l'atmosphère.
- **Glycolyse** : Série de réaction de dégradation du glucose en pyruvate provoquant la formation de molécule d'ATP (également appelée voie d'Embden-Meyerhof-Parnas).
- **Goethite** : Oxyhydroxyde de fer de formule $\alpha\text{-FeOOH}$
- **Gram** : Technique de coloration des bactéries permettant de les classer en deux familles selon la composition de leur paroi. Les bactéries à Gram positif apparaissent mauves et leur paroi est composée d'une épaisse couche de peptidoglycane dans laquelle sont insérés des acides teichoïques. Les bactéries à Gram négatif apparaissent roses et leur paroi est composée d'une mince couche de peptidoglycane entre la membrane interne et la membrane externe. La membrane externe contient des protéines canaux, appelées porines, et les lipopolysaccharides (LPS).
- **Granite** : roche magmatique plutonique à structure grenue. Il est formé de cristaux de quartz, de micas, de feldspaths potassiques et de plagioclases.
- **Hématite** : Minéral formé d'oxyde de fer III de formule $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$.
- **Homéostasie** : Capacité de l'organisme à maintenir un état de stabilité relatif des différentes composantes de son milieu interne et ce, malgré les variations constantes de l'environnement externe.
- **Hydroxyapatite** : Forme naturelle d'apatite de calcium, de formule $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$.
- **Lipopolysaccharide** : Composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif. Comme son nom l'indique, il est constitué de lipides et de glucides, phosphorylés ou non.
- **Métabolisme constitutif** : Métabolisme dont les enzymes sont présentes naturellement. A l'opposé du métabolisme inductif où les enzymes sont synthétisées pour un besoin précis avec la nécessité d'une induction de cette synthèse par une molécule extérieure.
- **Meza** : Zone d'intérêt coupée en microscopie électronique en transmission.
- **Milieu empirique** : Milieu dont la composition exacte n'est pas connue.
- **Monodentate** : Qui se lie à une molécule.

- **NAD⁺ / NADH,H⁺** : Coenzyme d'oxydoréduction indispensable au métabolisme cellulaire.
- **Néoglucogénèse** : Voie de synthèse du glucose à partir de précurseur non glucidique.
- **Niveau de Fermi** : Caractéristique propre à un système traduisant la répartition des électrons en fonction de la température. Il peut être considéré, en première approximation comme une constante, qui équivaldrait alors au niveau de plus haute énergie occupé par les électrons du système à la température de 0 K
- **Pechblende** : Minéral d'uranium. Variété cryptocristalline d'uraninite UO₂.
- **Pentoses phosphate (Voie des)** : Une des quatre voie de dégradation du métabolisme énergétique. Egalement appelé voie de Warburg-Dickens-Horecker, elle génère des coenzymes d'oxydoréduction et des pentoses phosphates, comme son nom l'indique.
- **Peptidoglycane** : Polymère de glycosaminopeptide de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM). Il s'agit du composant principal des parois bactériennes leur conférant leur forme ainsi qu'une protection mécanique et physique.
- **Phospholipide** : Lipide possédant un groupe phosphate et constituant majoritaire des membranes cellulaires.
- **Photoélectron** : Electron émis sous l'effet d'un rayonnement lumineux.
- **Phototrophie** : Type trophique qui permet à des organismes vivants de tirer leur énergie de la lumière, soit par photosynthèse, soit grâce à des protéines comme les bactériorhodopsines.
- **Protéobactéries** : Famille de bactéries à Gram négatif. Elles sont classées en cinq catégories, de α à ε, selon leur séquence du gène codant l'ARNr 16S.
- **Pyrite** : Minéral abondant de sulfure de fer de formule FeS₂.
- **Pyrophorique** : Qui possède une combustion spontanée sous atmosphère oxydante.
- **Radiotoxicité** : Toxicité provoquée de manière radiologique.
- **Saleeite** : Composé minéral d'uranium de formule Mg(UO₂)₂(PO₄)₂·10(H₂O).
- **Schoepite** : Composé minéral d'uranium de formule (UO₂)₈O₂(OH)₁₂·12(H₂O). Produit de l'altération de l'uraninite.

- **Seuil L_{III}** : Désigne l'orbitale atomique qu'occupaient l'électron éjecté lors de l'excitation de l'atome absorbeur. Pour l'uranium, le seuil L_{III} correspond à l'orbital 2p_{3/2}.
- **Spéciation** : Identification des différentes espèces chimiques d'un élément donné. Cela inclue les formes dissoutes ou précipitées, libres ou complexées, particulières ou colloïdales.
- **Synchrotron** : Accélérateur circulaire de particules utilisant à la fois les champs électromagnétiques et les champs électriques.
- **Trimage** : Action de modeler les blocs de résine avant l'ultramicrotomie.
- **Trypsine** : Enzyme digestive du suc pancréatique qui digère les protéines en peptides.
- **Ubiquitaire** : Qui se dit d'un être vivant pouvant coloniser des biotopes variés.
- **Ultrastructure** : Domaine de dimensions qui se situe entre le domaine moléculaire et le domaine accessible au microscope optique. Le microscope électronique est l'instrument de choix pour l'exploration de ce domaine aussi bien en biologie qu'en physique.
- **Uraninite** : Minéral riche en oxyde d'uranium de formule général UO₂.
- **Uranite** : Terme général pour les phosphates naturels d'uranium tels que l'autunite.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADP : Adénosine diphosphate.

ARN : Acide ribonucléique.

ATP : Adénosine triphosphate.

BDMA : Benzyldiméthylamine.

CCME d'Orsay : Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay.

CMB : Concentration Minimale Bactéricide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CSM : Citrate Salt Medium.

CTAB : N-cetyl-N,N,N-triméthylammonium.

CyDTA : 1,2-cyclohexylenedinitro tétracétique.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DO₆₀₀ : Densité Optique à 600nm.

EDTA : Ethylène diamine tétraacétique.

ESRF : European Synchrotron Radiation Facility.

ETM : Elément Trace Métallique.

FAME : French Absorption spectroscopy beamline in Material and Environmental science.

FFT : Transformées de Fourier.

HMPA : Hexamethylphosphoramide.

LPS : Lipopolysaccharide.

MET : Microscopie Electronique en Transmission.

MS : Milieu Synthétique pour *D. radiodurans* R1.

NAD⁺ / NADH,H⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

O_{ax} : Oxygène axial

O_{eq} Oxygène équatorial

PHB : polyhydroxybutyrate.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

SAX : Spectroscopie d'absorption des rayons X

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

TAC : 2-(2-thiazolylazo)-*p*-crésol.

TEA : Triéthanolamine.

TSM : Tris Salt Medium.

TSM15% : Tris Salt Medium avec 15% de phosphate par rapport au TSM et 40mM de bicarbonates.

TYG : Tryptone Yeast Glucose.

XAS : X-ray Absorption Spectroscopy.

INTRODUCTION

L'uranium est un élément à part dans l'histoire de la science et de la société humaine. Il a été découvert au moment de la révolution française mais ce n'est que tardivement que ses propriétés ont été découvertes et son potentiel scientifique et technologique appréhendé. Aujourd'hui encore, l'uranium donne matière à de nombreuses recherches dans ces domaines, particulièrement concernant l'utilisation de l'énergie nucléaire, mais il entre également dans de nombreux débats sur le nucléaire présent ou futur.

L'uranium est le seul élément possédant un noyau naturel fissible que l'on peut utiliser pour des applications civiles et militaires. On le retrouve dans la nature à l'état de traces (2 ppm en moyenne) avec une forte disparité dans sa distribution et sa concentration. Sa teneur dans l'eau de mer est trop faible ($3,3 \mu\text{g L}^{-1}$) pour que l'extraction soit économiquement envisageable. Cependant, le volume des océans est tel qu'il s'agit de la plus grande réserve mondiale d'uranium (4 à 5 milliards de tonnes d'uranium dissous).

L'uranium présent dans l'environnement peut également avoir une origine anthropogénique¹ : par exemple on peut citer l'utilisation en agriculture d'importantes quantités de phosphates naturels, pouvant contenir de fortes concentrations en uranium, pour la fertilisation des cultures et pour l'élaboration des compléments alimentaires pour le bétail. Les activités minières et industrielles peuvent également être à l'origine de rejets de déchets dans l'environnement. Les teneurs dans les sols, eaux et végétaux de ces sites sont plus importantes que les teneurs naturelles. Dans ces deux cas, l'uranium est entré dans la biosphère* et peut causer des problèmes sanitaire et écologique.

Sur l'Homme et l'animal, l'uranium a un effet toxique bien connu. Après contamination, les composés d'uranium solubles atteignent rapidement les organes cibles que sont les reins et les os. Du fait de sa faible radioactivité, l'uranium naturel est considéré plus comme un toxique chimique qu'un toxique radiologique. Cependant, sa demi-vie dans

¹ Les * renvoient au glossaire

les os est proche de 10 ans. De ce fait, l'irradiation, même faible, qu'il engendre dans les os n'est pas négligeable en cas de forte contamination.

La spéciation* de l'uranium, c'est à dire les formes chimiques libres, complexées, dissoutes, précipitées, colloïdales ou encore particulaires présentes dans le milieu, conditionne sa toxicité et sa mobilisation dans l'environnement. Elle est difficile à prévoir en raison de la multitude de paramètres entrant en compte dans son calcul. Le potentiel d'oxydoréduction, le pH, la présence et la concentration de certains complexants (carbonates, phosphates, acides organiques), ou même la présence de végétaux et de microorganismes en sont des exemples.

En effet, certains microorganismes sont capables de fixer, d'accumuler voire de transformer l'uranium. Ainsi, certaines bactéries peuvent accumuler le radionucléide soluble et le réduire, entraînant sa précipitation et le rendant moins mobile et biodisponible pour la faune et la flore. De même, les bactéries peuvent simplement le fixer à leur surface. L'extraction de ces microorganismes permettent ainsi l'élimination de l'uranium des sols et des eaux. Ce processus de biorémediation pourrait être utilisé à des fins de dépollution.

Depuis une quinzaine d'années, de nombreux travaux de recherche démontrent les capacités dépolluantes de certains microorganismes. Ces procédés de réhabilitation par voie biologique pourraient être exploités en complément des techniques physico-chimiques de dépollution déjà existantes. Dans cette optique, trois bactéries sont étudiées dans cette thèse. La première espèce est connue pour être très résistante aux métaux lourds, *Cupriavidus metallidurans* CH34. La deuxième souche est extrêmement résistante aux radiations, *Deinococcus radiodurans* R1. Enfin, la dernière est phototrophe* et capable de dégrader des polluants organiques en anaérobie, *Rhodospseudomonas palustris*.

Pour envisager une application de ces micro-organismes en bioremédiation*, leurs capacités de résistance, d'accumulation et d'immobilisation de différentes formes chimiques de l'uranium pouvant être rencontrées communément dans l'environnement doivent être étudiées. C'est le but de ce travail.

OBJECTIF GENERAL ET ARTICULATION DU MEMOIRE

L'objectif général de cette thèse est d'étudier le comportement de trois microorganismes exposés à différentes formes de l'uranium, qu'elles soient minérales ou organiques. Ces bactéries ont été choisies pour leurs propriétés distinctes et potentiellement intéressantes pour notre sujet d'étude. La démarche expérimentale entreprise vise à déterminer l'impact des ces bactéries sur ces différentes formes d'uranyle grâce à des méthodes à la fois biologique, chimique et physique, pour engager par la suite des processus de bioremédiation. Pour cela, la résistance des microorganismes à différents complexes d'uranium, identifiés par un calcul théorique, sera d'abord examinée afin de déterminer la tolérance de ces souches au radionucléide. La faculté des trois bactéries à accumuler, précipiter ou transformer ces formes de l'uranium pourra ensuite être étudiée. Cette étude sera complétée par la détermination expérimentale de la spéciation de l'uranium en solution et au contact des microorganismes.

Un rappel des connaissances générales sur l'uranium ainsi que sur son comportement dans l'environnement seront présentés en chapitre 1. Un état de l'art sur la structure des différents complexes d'uranium ainsi que les trois modèles bactériens étudiés seront présentés. La démarche expérimentale sera ainsi retenue. Le chapitre 2 présentera les différentes méthodes employées et décrira les expériences réalisées au cours de cette thèse. Les résultats de ces expérimentations seront ensuite examinés et discutés dans le chapitre 3, suivis par les perspectives envisagées pour la suite de ce travail.

Chapitre 1 :

Etude

Bibliographique

PARTIE A : L'URANIUM

I. GENERALITES SUR L'URANIUM

1. De sa découverte à nos jours

L'uranium a été découvert par un chimiste allemand, Martin Heinrich Klaproth (1743-1817), au moment de la révolution française, en 1789, en analysant de la pechblende* provenant de Bohême. Il baptise cet oxyde *urane* en référence à la planète Uranus découverte huit ans plus tôt par l'astronome anglais William Herschel. Mais ce n'est qu'en 1841 que l'uranium à l'état métallique est isolé à partir de l'autunite* par le chimiste français Eugène Melchior Péligot (1811-1890) alors qu'il travaillait pour la cristallerie de Baccarat. En effet, à cette époque, l'uranium était utilisé comme pigment pour la fabrication de verres, de céramiques et pour la peinture sur porcelaine.

En 1896, le physicien français Antoine Henri Becquerel (1852-1908) découvre la radioactivité naturelle par accident alors qu'il fait des études de fluorescence sur les sels d'uranium. Cette découverte peut être considérée comme le point de départ de l'industrie des minerais radioactifs. A partir de la découverte du radium par Pierre et Marie Curie en 1898, l'uranium est considéré durant 40 ans comme un sous-produit de l'extraction du radium.

Depuis 1939, l'uranium est devenu un élément intéressant avec les développements de ses applications, militaires tout d'abord, puis civiles, après la seconde guerre mondiale, avec la production d'énergie électrique.

2. Propriétés physico chimiques

a. *L'uranium élémentaire*

La structure électronique de l'uranium ($[Rn] 5f^3 6d^1 7s^2$, numéro atomique 92) met en évidence six électrons capables de participer à des liaisons chimiques. En plus du degré d'oxydation 0 correspondant à l'uranium métallique, seuls les degrés d'oxydation de +III à +VI sont connus (Weigel, 1986).

b. *Propriétés physiques de l'uranium*

L'uranium est un métal gris blanc malléable et ductile de densité de 18,7 et dont le point de fusion est de 1130°C. Il est fortement électropositif et donc très réactif à l'oxygène. Sous forme de fines particules, l'uranium est pyrophorique* à température ambiante. Lorsqu'il brûle, il donne formation à des oxydes mixtes U_xO_y .

c. *Propriétés nucléaires*

L'uranium est un radioélément qui possède trois principaux isotopes naturels (^{234}U , ^{235}U et ^{238}U) qui se désintègrent principalement par rayonnement alpha. Il possède également plusieurs isotopes artificiels. Le tableau 1 nous indique les périodes, les activités spécifiques et l'abondance naturelle des principaux isotopes de l'uranium utilisé ou étudié par l'homme.

Tableau 1 : Périodes radioactives, activités spécifiques et abondance naturelle des principaux isotopes de l'uranium (Weigel, 1986).

Isotope	Période (ans)	Activité (Bq/g)	Abondance naturelle (%)
^{232}U	68,9	$8,27 \cdot 10^{11}$	0
^{233}U	$1,9 \cdot 10^5$	$3,56 \cdot 10^8$	0
^{234}U	$2,45 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^8$	0,005
^{235}U	$7,04 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^4$	0,720
^{236}U	$2,34 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$	0
^{238}U	$4,47 \cdot 10^9$	$1,24 \cdot 10^4$	99,275

d. Chimie de l'uranium en solution

La chimie de l'uranium en solution est complexe du fait de nombreuses propriétés de réaction du radionucléide et de l'hydrolyse des ses ions avec la formation d'espèces polynucléaires (Madic et Genet, 2001).

Ces différentes propriétés sont principalement régies par le pH et le potentiel d'oxydoréduction du milieu. Ces potentiels d'oxydoréduction dans 1M d' HClO_4 , qui est un solvant neutre, sont présentés en figure 1 :

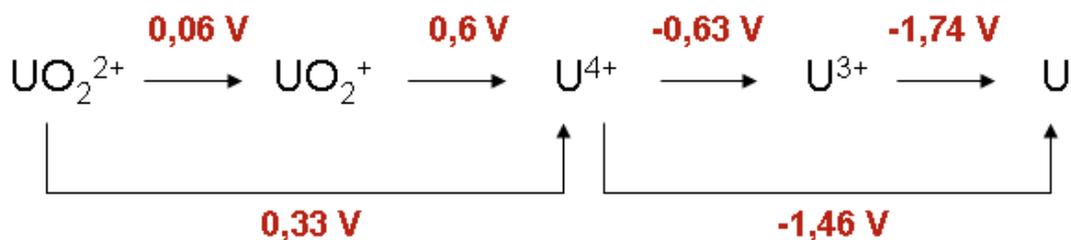


Figure 1 : Potentiels d'oxydoréduction de l'uranium en solvant HClO_4 1M à température ambiante.

L'uranium peut exister en solution aqueuse sous quatre états d'oxydation différents : de U(III) à U(VI) (Ahrlund, 1986 ; Madic et Genet, 2001).

- L'uranium III existe en solution en milieu acide sous forme de cation U^{3+} à un potentiel de -630mV. L'ion U^{3+} est un puissant agent réducteur. Il réduit l'eau H_2O en dihydrogène H_2 . Il est obtenu par réduction de l'uranyle UO_2^{2+} . Les solutions d' U^{3+} sont instables car elles sont rapidement oxydées par l'eau au degré d'oxydation +IV. En milieu alcalin, U^{3+} est hydrolysé en UOH^{2+} et on observe une précipitation de $\text{U}(\text{OH})_3$.
- L'uranium IV existe en milieu très acide sous forme de cation U^{4+} . Ces solutions sont stables en condition anaérobie*. En présence de dioxygène, U^{4+} est oxydé au degré d'oxydation +VI. L'hydrolyse de U^{4+} a lieu dès à pH inférieur ou égal à 1. Le produit d'hydrolyse le plus simple est UOH^{3+} . Des espèces polynucléaires se forment aux pH plus élevés.

- L'uranium V n'existe pas sous forme U^{5+} car cet ion est facilement hydrolysable quel que soit le pH. La forme principale de l'uranium à cet état d'oxydation est UO_2^+ qui est extrêmement sensible à la dismutation en U(IV) + U(VI). Le temps de demi-vie d' UO_2^+ est d'environ trente minutes dans du DMSO qui pourtant le stabilise. L'impossibilité d'obtenir des solutions stables d'U(V) rend la connaissance de la chimie de cet état d'oxydation difficile.
- L'uranium VI n'existe pas en solution sous la forme U^{6+} mais sous forme d'oxocation uranyle UO_2^{2+} quel que soit le pH. Le degré d'oxydation VI est le plus étudié et le mieux connu car il est le plus stable. L'hydrolyse de U(VI) donne des espèces mononucléaires comme UO_2OH^+ ou polynucléaires comme $(UO_2)_2(OH)_2^{2+}$. Le taux d'hydrolyse dépend du pH mais également de la concentration en uranium.

L'hydrolyse* de l'uranium est variable selon l'ion considéré et l'état d'oxydation de cet ion. Le pH de début d'hydrolyse sera d'autant plus bas que la concentration en uranium sera élevée. Des espèces polynucléaires apparaissent à forte concentration avec une probabilité importante de précipitation.

Les ions uranyles UO_2^{2+} sont considérés comme des "acides durs*" au sens de Pearson. En conséquence, ils réagissent préférentiellement avec les "bases dures*" que sont les ligands à atomes donateurs d'électrons comme l'oxygène ou le fluor. La chimie de complexation de l'uranium en solution aqueuse est ainsi dominée par l'interaction avec des ligands oxygénés.

En solution aqueuse et en condition oxydante, l'uranium est majoritairement à l'état d'oxydation +VI comme le montre le diagramme de Pourbaix présenté en figure 2.

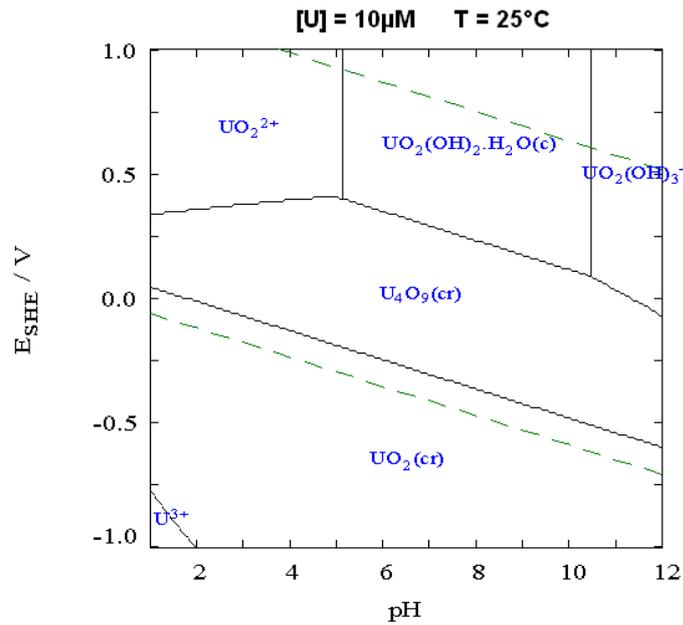


Figure 2 : Diagramme de Pourbaix de l'uranium à 10 μ M en solution aqueuse sans ligand à 25°C. (c) = cristal, (cr) = cristallin. (D'après Vitorge, 1999).

Dans l'eau pure, L'uranium est sous forme UO_2^{2+} à pH acide à faibles concentrations ($\leq 100\text{nm}$). Lorsque le pH augmente, des formes hydroxylées apparaissent : UO_2OH^+ , $\text{UO}_2(\text{OH})_2$, $\text{UO}_2(\text{OH})_3^-$ et $\text{UO}_2(\text{OH})_4^{2-}$ comme le montre la figure 3

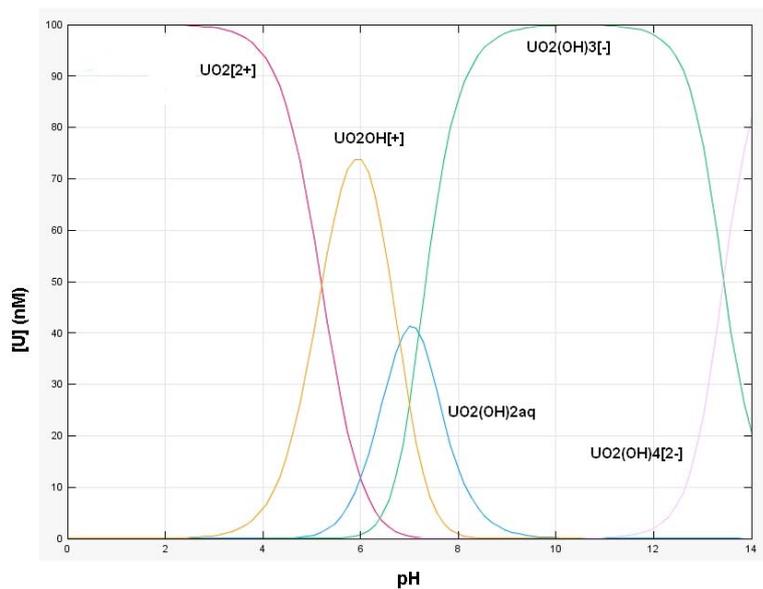


Figure 3 : Diagramme de spéciation de l'uranium à 100nM dans l'eau pure en fonction du pH. Spéciation théorique obtenue grâce au logiciel JCHESS (Van der Lee et de Windt, 2002) et la base de données BASSIST (Bion, 2003).

A plus fortes concentrations, des précipités d'hydroxyle d'uranium, ou schoepite*, se forment dans une gamme de pH s'étendant selon la concentration en uranium. Cette gamme est comprise entre pH 6,5 et 7,5 à 200nM d'uranium et comprise entre pH 4 et 11,5 pour 1mM d'uranium comme présentés dans la figure 4.

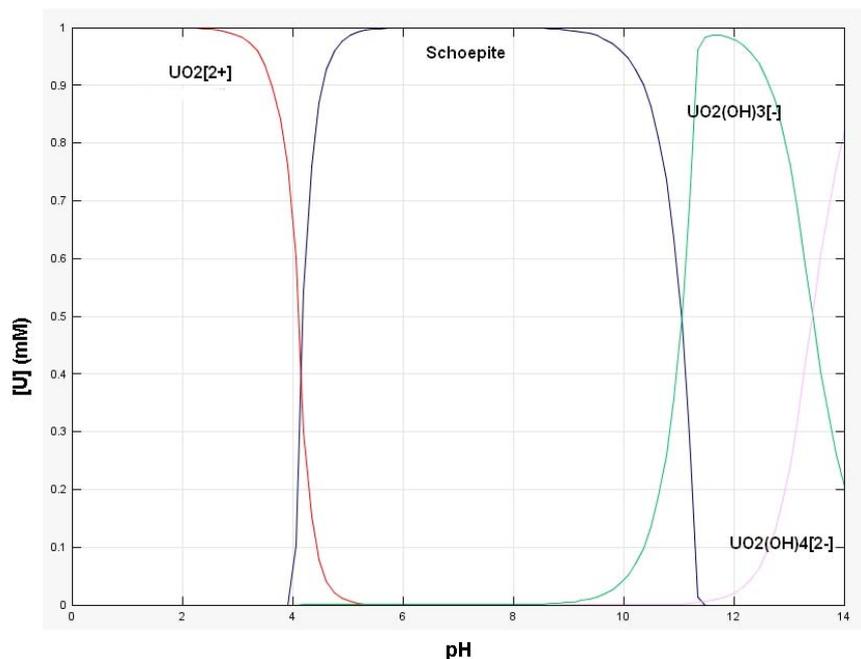


Figure 4 : Diagramme de spéciation de l'uranium à 1mM dans l'eau pure en fonction du pH.

En tant qu'acide dur*, l'ion UO_2^{2+} est susceptible de s'associer en solution avec la matière organique dissoute (acides humiques), les acides organiques (citrate, malate...), les carbonates, les sulfates ou les phosphates.

II. L'URANIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

1. Origine :

L'uranium se trouve à l'état naturel dans un certain nombre de minéraux comme la pechblende et l'uranite* ou dans des roches phosphatées et des granites*.

L'uranium est un constituant trace de la croûte terrestre, sa teneur moyenne (3 à 4ppm) est supérieure à celle de l'argent (100ppb) ou l'or (10ppb) (Plant *et al.* 1999). Il existe cependant une grande variabilité de concentration selon les matériaux (jusqu'à 350 ppm pour les roches phosphatées) (Langmuir, 1978). La concentration moyenne de l'uranium dans les océans est de 14nM (3ppb). Dans les eaux de surface, sa concentration est plus hétérogène allant de quelques nanomolaires à plusieurs milligrammes par litre (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

L'uranium présent dans l'environnement peut de plus avoir une origine humaine (Paulin 1997) : par exemple, l'utilisation en agriculture d'importantes quantités de phosphates naturels qui peuvent contenir de fortes concentrations en uranium. Ceux-ci sont utilisés pour la fertilisation des cultures et pour l'élaboration des compléments alimentaires pour le bétail et ils enrichissent donc les sols agricoles en uranium. Les activités minières et industrielles peuvent également être à l'origine de rejets de déchets dans l'environnement. Les teneurs dans les sols, eaux et végétaux de ces sites sont plus importantes que les teneurs naturelles. L'uranium se complexe avec les autres composants de l'environnement pour donner des espèces plus ou moins solubles et donc plus ou moins mobiles.

2. Complexation de l'uranium dans la solution du sol

La solution du sol est l'eau qui circule dans les espaces libres et les pores du sol. Il existe deux types de milieux géochimiques aqueux où l'on peut trouver de l'uranium et qui diffèrent selon le potentiel d'oxydoréduction.

- Les eaux dites de surface avec un potentiel imposé par le couple O_2/H_2O . Ce potentiel d'oxydoréduction est dépendant du pH et de la pression partielle en O_2 . Les conditions sont oxydantes et l'uranium est retrouvé majoritairement sous le degré d'oxydation +VI dans ces eaux.
- Les eaux dites profondes ou anoxiques* avec un potentiel imposé par le système $Fe(III)/Fe(II)$ et HSO_4^-/HS^- . C'est un système complexe faisant intervenir des oxydes de $Fe(II)$, de la pyrite* (sulfure de $Fe(II)$) et des solides $Fe(III)/Fe(II)$. Les conditions sont réductrices et l'uranium se retrouve principalement sous le degré d'oxydation +IV (Shahandeh *et al.* 2001).

L'uranium IV étant très peu soluble, il est donc peu mobile et indisponible pour les plantes ou la biomasse du sol. Nous nous intéressons donc plutôt aux eaux de surface où l'uranium est soluble et biodisponible.

La mobilité de l'uranium dans les sols et son transport vertical vers les eaux souterraines dépend des propriétés des sols (pH, potentiel d'oxydoréduction, concentrations en anions complexants, porosité, taille des particules, propriétés adsorbantes et quantité d'eau) qui déterminent sa spéciation.

De par ses propriétés de complexation avec les composés oxygénés, l'uranium est susceptible de s'associer avec diverses espèces chimiques dissoutes ou solides (Sheppard et Evenden, 1988). Ce sont ces différents mécanismes de complexation qui conditionnent le comportement de l'uranium dans les sols et qui expliquent la répartition non homogène de l'uranium en profondeur. Généralement, la concentration augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface car l'uranium soluble est lessivé par les eaux de pluie et se retrouve ainsi en profondeur.

L'influence des principales composantes organiques ou minérales des sols sur l'uranium est détaillée dans la suite, en commençant par les plus importants pour finir par les molécules complexantes secondaires.

a. Influence de la matière organique :

La matière organique est une composante majeure dans la dynamique de l'uranium dans les sols car elle représente un des principaux vecteurs de migration et de redistribution de l'uranium (Gueniot *et al.* 1988). Dans la plupart des systèmes aqueux naturels, la matière organique constitue un réservoir important de ligands pour complexer les métaux et les radionucléides. Dans les zones riches en matières organiques, ces complexes seront sa forme majoritaire. Cette matière organique est en fait un amalgame de molécules polyfonctionnelles de différents poids et tailles moléculaires. Les acides humiques et fulviques sont des complexants forts de l'uranium. Les acides humiques sont des composés insolubles et l'uranium qui y est complexé sera donc immobilisé et non disponible alors que les acides fulviques sont des composés solubles et l'uranium qui y est complexé sera alors mobile et biodisponible.

L'étude de l'interaction avec l'uranium est difficile à mettre en place du fait de cette diversité et de la difficulté à identifier les molécules concernées. Ce seraient les groupements carboxyliques qui interagiraient avec l'uranyle alors que le rôle des groupements phénoliques est plus discuté (Schmeide *et al.* 1998 ; Lenhart *et al.* 2000).

b. Influence des acides organiques :

Les acides carboxyliques, comme le citrate, l'acétate ou le malate, sont des espèces chimiques ubiquitaires* dans l'environnement. Leurs concentrations peuvent atteindre plusieurs milligrammes par litre de solution du sol. Les acides organiques sont impliqués dans de nombreux processus du sol incluant la mobilisation et l'absorption de nutriments par les plantes et les microorganismes, la détoxification des métaux par les plantes ou la dissolution des minéraux du sol.

De la même manière que pour les acides humiques et fulviques, l'uranium forme des complexes forts et stables avec une large variété d'acides organiques. Les espèces formées sont mobiles et biodisponibles. Le degré de complexation dépend des

propriétés de l'acide organique considéré (nombre de groupements carboxyliques, proximité des groupements hydroxyles), de la concentration et du pH (Jones, 1998).

Le complexe d'uranium le plus étudié est le citrate d'uranyle. Le citrate est un composant commun des activités domestiques et industrielles. Il est de plus naturellement présent dans la nature de fait de la libération d'exsudats racinaires et de produits du métabolisme microbien (Jones, 1998). Il forme des complexes avec l'uranium dans une gamme étendue de pH (Keiling *et al.* 1991 ; Shahandeh et Hossner, 2002). Il a notamment été déjà utilisé pour mobiliser l'uranium dans les sols contaminés pour de la phytoremédiation (Huang *et al.* 1998 ; Ebbs *et al.* 1998b).

Il existe plusieurs espèces de citrate d'uranyle, dont la répartition dépend du rapport de concentration citrate sur uranium et du pH (Bailey *et al.* 2005 ; Dodge et Francis, 1997). Ils peuvent être bidentates*, tridentates, binucléaires ou même polymériques (Rajan, 1965 ; Dodge, 2002). La figure 5 nous présente la distribution de ces espèces en fonction du pH dans l'eau pure avec une concentration en uranium de 1mM.

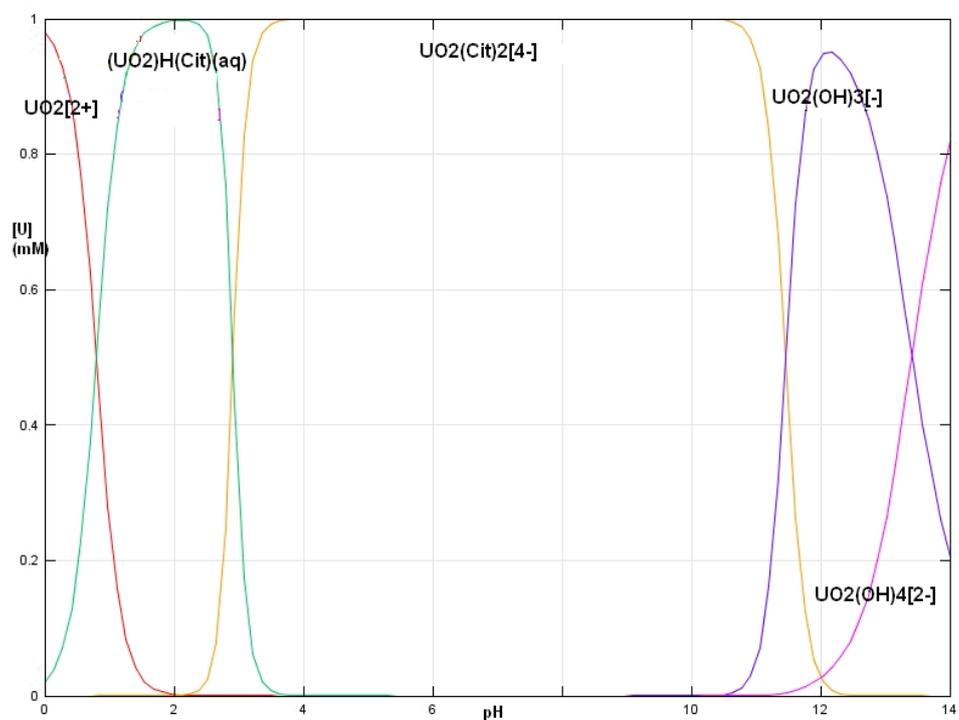


Figure 5 : Diagramme de spéciation de l'uranium VI à 1mM en solution de citrate à 10mM en fonction du pH.

En présence d'autres métaux comme le fer, le citrate peut former des complexes ternaires avec l'uranium (Dodge et Francis, 1997). Ces complexes seraient plus stables que les complexes binaires.

La complexation de l'uranium avec d'autres acides a été beaucoup moins étudiée mais il a été observé des complexes d'acétate d'uranyle (Bailey *et al.* 2003 ; Jiang *et al.* 2002) ou de malate d'uranyle (Markovits *et al.* 1972 ; Allen *et al.*, 1996).

c. Influence des phosphates :

L'ion uranyle forme différents complexes avec les phosphates en fonction du pH : $\text{UO}_2\text{H}_2\text{PO}_4^+$, $\text{UO}_2\text{HPO}_4^{\text{aq}}$ et UO_2PO_4^- (Sandino et Bruno, 1992). Il existe d'autres espèces de phosphate d'uranyle mais ces trois formes prédominent. Les complexes de phosphates d'uranyle sont cependant très peu solubles et précipitent rapidement. La présence de phosphates dans un système contenant de l'U(VI) provoque surtout la formation de précipités à pH supérieur à 6 comme le montrent les figures 6 et 7 où la concentration en uranium et en phosphates varie (la schoepite et le complexe marqué d'un (c) sont des précipités). Il a été ainsi montré que la complexation de l'uranium par les phosphates diminuait sa biodisponibilité (Arey *et al.* 1999).

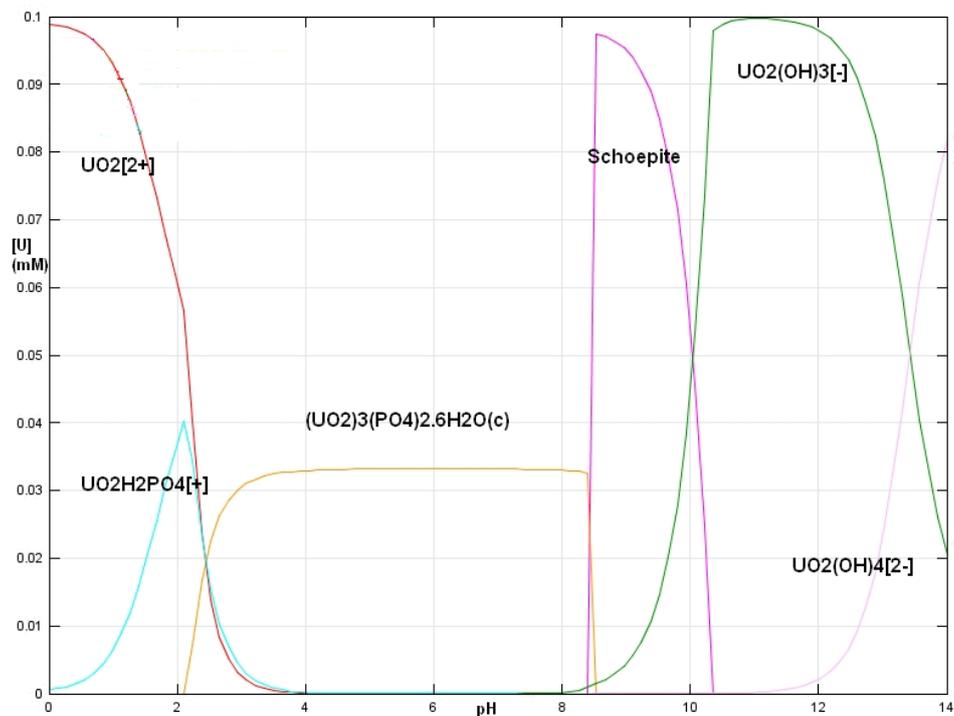


Figure 6 : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 100µM en solution de phosphates à 1mM en fonction du pH.

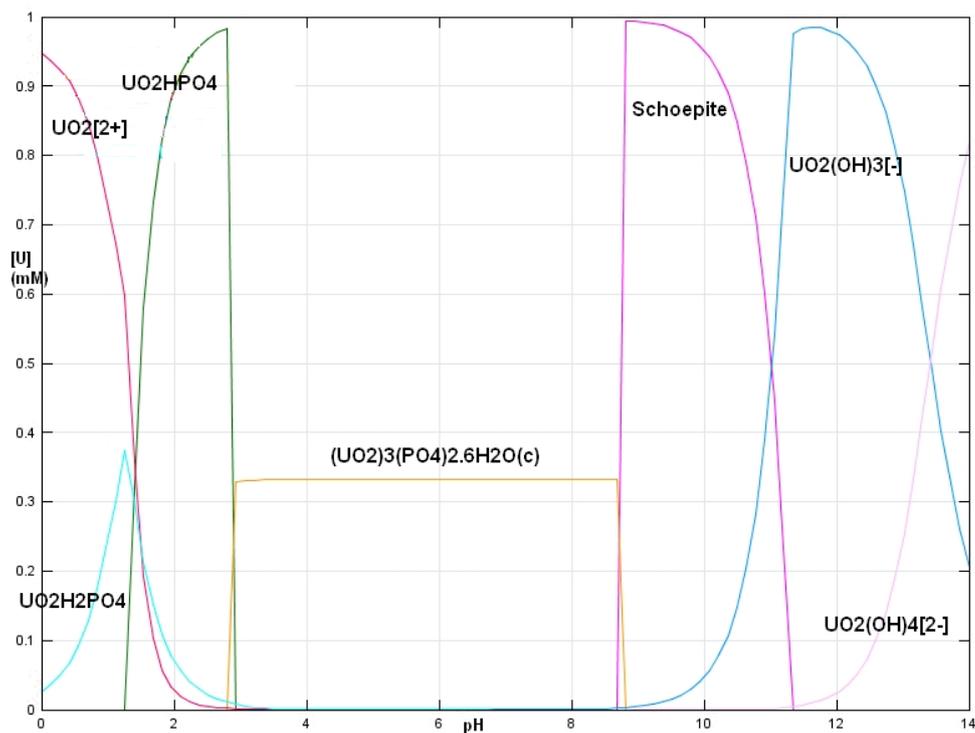


Figure 7 : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 1mM en solution de phosphate à 5mM en fonction du pH.

d. Influence des carbonates :

Du fait de l'abondance du CO_2 et des minéraux carbonatés (calcite et dolomite), les carbonates jouent un rôle primordial dans l'environnement. Expérimentalement, il est difficile de distinguer les formes de carbonates et on considère en général la somme des trois espèces (CO_3^{2-} , HCO_3^- et H_2CO_3). Dans un système ouvert en contact avec l'atmosphère, ces concentrations dépendent du pH et de la pression partielle en CO_2 , celui-ci pouvant se solubiliser dans le milieu.

Dans les solutions carbonatées et dans une gamme de pH rencontrée généralement dans la nature (entre 3 et 10), il existe au moins trois ligands possibles pour l'uranium que sont OH^- , HCO_3^- et CO_3^{2-} . Leurs concentrations sont dépendantes les unes des autres.

En solution, il existe trois complexes monomériques de carbonates d'uranyle : $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_{\text{aq}}$, $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ et $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ et plusieurs complexes polymériques en présence de fortes concentrations en uranium et/ou en présence d'une force ionique importante de la solution. Ces complexes polynucléaires ne sont cependant pas attendus dans l'environnement en raison de la faible concentration en uranium et des

faibles forces ioniques des solutions aqueuses naturelles. Les complexes carbonatés dominant à partir de pH 5 et les espèces hydroxylées à partir de pH 11. En l'absence d'autres ligands compétiteurs, l'uranium sera majoritairement sous forme carbonatée dans la gamme de pH rencontrée le plus souvent dans l'environnement (Ebbs *et al.* 1998a ; Echevarria *et al.*, 2001). Si les concentrations en uranium sont supérieures à 1mM, le trimère $(UO_2)_3(CO_3)_6^{6-}$ apparaît et si la concentration en uranium est supérieure à celle des carbonates, les espèces hydroxylées complètent la spéciation (Clark *et al.* 1995). Les figures 8 et 9 nous présentent la spéciation de l'uranium dans une solution aqueuse carbonatée à différentes concentrations.

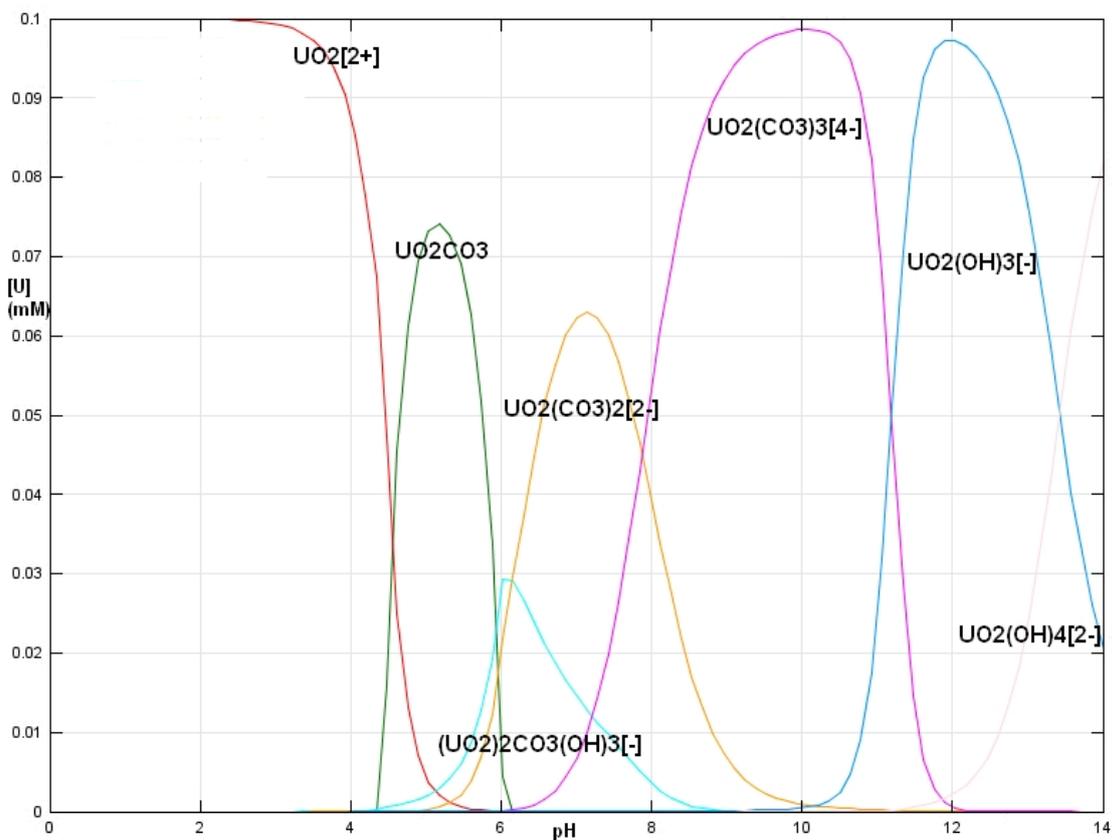


Figure 8 : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 100µM en solution de carbonate à 4mM en fonction du pH.

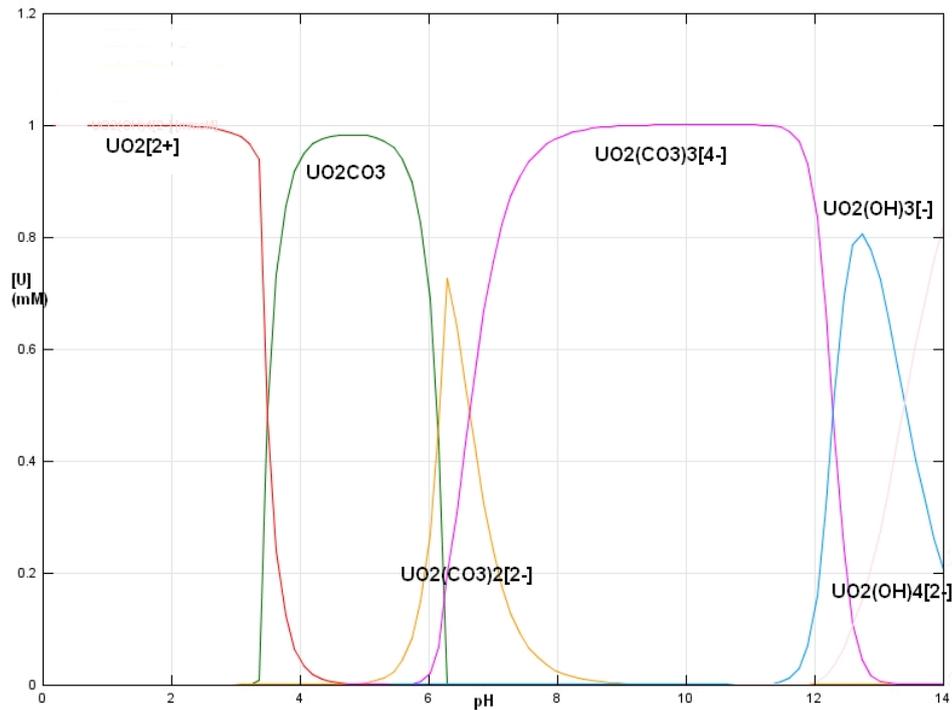


Figure 9 : Diagramme de spéciation de l'U(VI) à 1mM en solution de carbonate à 40mM en fonction du pH.

Ces complexes de carbonate d'uranyle présentent moins d'affinité que l'ion uranyle pour les constituants minéraux. Il en résulte une augmentation de la mobilité de l'uranium dans les sols carbonatés.

En présence de calcium en concentration suffisante, la spéciation de l'uranium est modifiée. Des complexes de $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_{\text{aq}}$ se forment entre les pH 6 et 10 (Bernhard *et al.* 2001 ; Dong *et al.* 2005).

On peut également noter que les complexes de l'uranyle avec le citrate sont plus forts que les complexes avec les carbonates. En présence de ces deux ligands, l'uranium se liera donc plus facilement avec le citrate.

e. Influence des oxydes et hydroxydes de fer et d'aluminium :

Dans les sols formés sous climat chaud principalement, les composés de fer et l'aluminium sont des sites de fixation importants de l'uranium (Barnett *et al.* 2000). Dans ces sols, la matière organique est souvent absente et son rôle y est donc réduit. L'adsorption de l'uranium sur les oxy(hydr)oxydes (ferrihydrite*, goethite*, hématite*...) ne se produit que par complexation de surface (Ragnarsdottir et Charlet, 2000).

f. *Influence des argiles :*

D'un point de vue textural, les argiles sont des particules dont le diamètre ne dépasse pas 2µm. Elles peuvent fixer l'uranium avec des efficacités variables selon leur structure mais contrairement à d'autres métaux comme le césium, elles ne jouent qu'un rôle secondaire dans la rétention de l'uranium dans les sols à la surface de ces particules.

3. Complexation de l'uranium dans les eaux de surface

Le comportement de l'uranium dans les eaux de surface est comparable à son comportement dans la solution du sol. Les mêmes paramètres (pH, potentiel d'oxydoréduction...) régissent les mêmes phénomènes. Seule l'adsorption aux minéraux n'est plus prise en compte mais il existe ici une interaction avec les sédiments.

En rivière, plus de 90% de l'uranium peut être associé à la fraction colloïdale soit par liaison avec les colloïdes de fer soit par association avec les acides humiques (Moulin *et al.*, 1992 ; Porcelli *et al.* 1997 ; Moulin *et al.* 2001). Plus les conditions sont oxydantes et alcalines, plus la rétention de l'uranium par la matière en suspension et les sédiments est faible. A pH acide, la capacité d'échange cationique* des sédiments peut contribuer à la rétention des ions uranyles, qui peuvent, par exemple, entrer en compétition avec les ions Ca^{2+} (Colle *et al.* 2001). Une forte concentration en phosphates peut entraîner la précipitation des ions uranyles et le transfert de l'uranium vers le compartiment sédimentaire.

Dans les eaux anoxiques, l'environnement est réducteur, l'U(VI) est réduit en U(IV), insoluble, qui précipite. Il est considéré comme étant immobilisé dans la géosphère* et il devient indisponible pour les plantes et les microorganismes.

La microflore du sol joue également un rôle important dans la mobilité ou la rétention de l'uranium dans l'environnement comme il est décrit par la suite.

III. TOXICITE DE L'URANIUM

1. L'uranium dans la chaîne alimentaire humaine

Les données de la littérature montrent que la principale source d'ingestion provient des produits végétaux et animaux d'origine agricole avec une faible contribution des produits de la mer (Upton et Linsalata, 1988 ; Colle *et al.* 2001). La teneur en uranium des eaux de boisson est généralement très faible même si des exceptions peuvent être retrouvées.

Comme l'uranium est présent dans les sols, les plantes peuvent l'accumuler. De façon générale, il existe une forte corrélation entre la teneur en uranium des sols et celle des végétaux (Colle *et al.* 2001). L'uranium est absorbé par les racines et il est probable que les ligands citrate, carbonate et phosphate jouent un rôle non négligeable dans le transfert sol-plante. Il n'existe cependant que peu d'information sur la spéciation de l'uranium dans sa translocation dans les végétaux. En règle générale, l'uranium se retrouve en concentration plus importante dans les racines et les feuilles que dans les graines (Morishima *et al.*, 1977 ; Sheppard et Evenden, 1988).

L'uranium présent dans les aliments d'origine animale et destinés à l'alimentation humaine a quatre provenances principales : La nourriture d'origine végétale qui contient l'uranium du sol absorbé par les plantes, les aliments de compléments élaborés à partir de phosphates naturels, les eaux d'abreuvement et l'ingestion de particules du sol par les animaux (Colle *et al.* 2001).

2. Facteurs influençant la toxicité

L'uranium est un toxique à la fois chimique et radiologique. Sa toxicité est influencée par différents facteurs qui déterminent sa dangerosité et ses cibles.

La voie d'entrée du contaminant fait varier son devenir dans l'organisme. Le passage de l'uranium dans le sang est beaucoup plus efficace par les voies respiratoires ou les blessures que par le tractus digestif (Berard *et al.* 1994)

Sa solubilité détermine de plus sa distribution dans les tissus. Un composé très soluble sera dispersé facilement dans l'organisme alors qu'un composé peu soluble

restera au site d'incorporation et sera éliminé plus facilement. La solubilité conditionne ainsi la toxicité de l'uranium, les formes solubles induisant plutôt une toxicité systémique et les formes insolubles favorisant une toxicité localisée au niveau du lieu de dépôt (Hengé-Napoli *et al.* 2001)

On comprend ainsi que la spéciation de l'uranium est un facteur essentiel pour la distribution de l'uranium dans l'organisme mais également pour sa toxicité pour les cellules (Carriere *et al.* 2004).

3. Cibles de l'uranium

Les cibles de l'uranium ont été largement étudiées auparavant. Nous n'y reviendrons pas en détail dans ce travail.

Quelles que soient les voies d'entrées, l'uranium pénètre dans la circulation sanguine et se complexe aux ligands du plasma que sont les carbonates, les acides organiques ou les protéines comme la transferrine (Carriere *et al.*, 2006 ; Scapolan *et al.* 1997). La disparition de l'uranium du compartiment sanguin provient de sa filtration au niveau des glomérules rénaux et de sa fixation osseuse.

En effet, les reins constituent l'organe principal d'excrétion de l'uranium. Une fraction du toxique est ainsi accumulée par les cellules tubulaires proximales (Hengé-Napoli *et al.* 2001).

Le squelette représente l'organe de fixation à long terme de l'uranium. Il remplace le calcium dans les cristaux d'hydroxyapatite*. Sa fixation représente 20 à 30% de l'activité présente dans le plasma (Hengé-Napoli *et al.* 2001).

4. Radiotoxicité

La radiotoxicité* de l'uranium naturel est due aux radiations ionisantes issues de la décroissance physique des isotopes de l'uranium, ainsi que de leurs descendants. Un des paramètres permettant d'estimer l'importance de la radiotoxicité d'une source radioactive est son activité spécifique. Or, la radioactivité spécifique de l'uranium naturel est faible. Il est donc généralement considéré qu'en présence de cet uranium naturel, l'effet des radiations ionisantes est négligeable par rapport à l'effet chimique. Cependant, comme l'élément est capable de remplacer durablement le calcium dans

les structures osseuses, il peut apparaître des dommages sur le long terme à ce niveau. En effet, l'uranium fixé sur l'os ne sera pas relargué et éliminé. Il provoquerait l'apparition d'ostéosarcomes. L'uranium appauvri a montré un pouvoir transformant sur une lignée d'ostéoblastes humains. Les cellules transformées sont notamment caractérisées par l'induction de l'expression d'un oncogène et la réduction de la production d'une protéine suppresseur de tumeur (Hengé-Napoli *et al.* 2001).

La radiotoxicité pulmonaire est négligeable et n'apparaît que lorsque l'organisme est soumis à une exposition importante et longue de particules d'uranium. Le tissu rénal est considéré comme peu radiosensible et l'uranium est éliminé assez rapidement pour ne pas entraîner de tels types de dommages (Hengé-Napoli *et al.* 2001).

5. Chimiotoxicité*

La toxicité chimique de l'uranium est plus importante que sa toxicité radiologique. Comme les reins sont l'organe cible de l'uranium, elle est principalement d'ordre néphrotoxique. L'atteinte rénale due à l'uranium se caractérise par des signes cliniques mais également des atteintes au niveau histologique et cellulaire (Hengé-Napoli *et al.* 2001).

Il est suggéré que l'uranium, après une intoxication aiguë, induit un stress oxydant et de l'apoptose et également de la nécrose aux fortes concentrations avec d'importants dommages à l'ADN. Au contraire, lorsque les cellules sont exposées à de l'uranium de manière chronique à plus faible concentration, il semble que les dommages à l'ADN diminuent avec le temps. La cellule deviendrait plus résistante à l'uranium. Celui-ci serait génotoxique* et induirait des transformations cellulaires (Thiebault *et al.* 2007).

La spéciation de l'uranium est essentielle et contrôle sa toxicité. Il a été montré que la présence de citrate augmentait sa biodisponibilité aux cellules et ainsi sa toxicité (Carriere *et al.* 2006). Il existe également une relation étroite entre le taux d'accumulation de l'uranium et sa toxicité.

Il convient donc de lutter contre ce toxique qui peut atteindre de fortes concentrations dans l'environnement lors de pollution. Nous allons voir les interactions entre l'uranium et les microorganismes et montrer que ceux-ci peuvent être employés à des fins de bioremédiation.

IV. INTERACTION ENTRE L'URANIUM ET LES MICROORGANISMES

Les activités microbiennes peuvent causer la dissolution, la mobilisation ou l'immobilisation de l'uranium dans les sols et les eaux. On peut diviser ces processus selon que la bactérie est directement impliquée ou non. Les interactions indirectes causent un changement de l'environnement local, du pH ou du potentiel d'oxydoréduction par exemple, ce qui peut provoquer un changement dans la spéciation de l'uranium. Les interactions directes, par contre, correspondent à l'action du microorganisme sur l'uranium, par oxydation, réduction, accumulation ou adsorption grâce à la cellule elle-même ou grâce à des molécules membranaires ou capsulaires comme des exopolymères (Panak *et al.* 1998).

La figure 10 schématise ces principales interactions mises en évidence entre les métaux et les microorganismes.

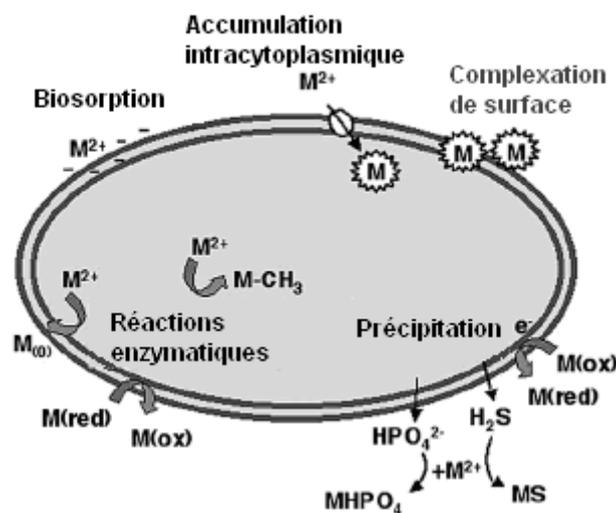


Figure 10 : Les différents mécanismes de résistance des bactéries contre les métaux (M). (D'après Valls et Lorenzo, 2002).

Le tableau 2 répertorie les principales bactéries interagissant avec l'uranium référencées dans la littérature.

Tableau 2 : Exemples de bactéries interagissant avec l'uranium.

	Souche	Référence
Réduction	<i>Desulfosporosinus</i> spp.	Suzuki <i>et al.</i> 2003, Nevin <i>et al.</i> 2003
	<i>Clostridium</i> spp.	Suzuki <i>et al.</i> 2003
	<i>Shewanella oneidensis</i>	Liu <i>et al.</i> 2006
	<i>Shewanella putrefasciens</i>	Abdelouas <i>et al.</i> 1998, Brooks <i>et al.</i> 2003
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Brooks <i>et al.</i> 2003,
	<i>Geobacter metallireducens</i>	Lovley <i>et al.</i> , 1991
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Sani <i>et al.</i> 2004, Panak <i>et al.</i> 1998, Lovley et Phillips 1992
	<i>Salmonella subterranea</i> sp. nov.	Shelobolina <i>et al.</i> 2004
	<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Fredrickson <i>et al.</i> 2000
Accumulation (de surface ou intracellulaire)	<i>Citrobacter freundii</i>	Xie <i>et al.</i> 2007
	<i>Acidithiobacillus ferrooxydans</i>	Merroun <i>et al.</i> 2003
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Francis <i>et al.</i> 2004
	<i>Bacillus subtilis</i>	Fowle <i>et al.</i> 2000, Gorman-Lewis <i>et al.</i> 2005, Francis <i>et al.</i> 2004
	<i>Halobacterium halobium</i>	Francis <i>et al.</i> 2004
	<i>Bacillus cereus</i>	Selenska-Pobell <i>et al.</i> 1999
	<i>Bacillus sphaericus</i>	Pollmann <i>et al.</i> 2005, Merroun <i>et al.</i> 2005
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Li <i>et al.</i> 2004
	<i>Thiobacillus ferrooxydans</i>	Panak <i>et al.</i> 1998
Précipitation	<i>Arthrobacter</i> sp.	Martinez <i>et al.</i> 2007
	<i>Bacillus</i> sp.	Martinez <i>et al.</i> 200
	<i>Rahnella</i> sp.	Martinez <i>et al.</i> 200
	<i>Halomonas</i> sp.	Francis <i>et al.</i> 2004
	<i>Microbacterium oxydans</i>	Nedelkova <i>et al.</i> 2007
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Renninger <i>et al.</i> 2004
	<i>Citrobacter</i> sp.	Macaskie <i>et al.</i> 2000, Jeong <i>et al.</i> 1997

Du fait de leur capacité à transformer des formes chimiques mobiles et toxiques d'uranium en formes insolubles, les microorganismes sont envisagés pour des processus de décontamination, ou bioremédiation.

1. Réduction de l'uranium

Des bactéries hétérotrophes* (voir partie B) peuvent catalyser la réduction enzymatique de l'U(VI) en U(IV) dans certaines conditions de potentiel d'oxydoréduction et de pH. Le point commun à l'ensemble des microorganismes pouvant réduire l'uranium(VI) est leur capacité à croître en condition anaérobie*.

La réduction de l'U(VI) a d'abord été montrée sur *Veillonella alcalescens* (Woofolk et Whiteley, 1962) puis 30 ans plus tard sur *Geobacter metallireducens* et *Shewanella putrefaciens* (Lovley *et al.* 1991). Ces organismes utilisent l'U(VI) comme accepteur d'électrons à la place de Fe(III). Cette réduction n'est pas abiotique et la présence de cellules vivantes est nécessaire pour observer le phénomène (Lovley *et al.* 1991). D'autres bactéries réductrices de sulfates, présentes initialement dans les eaux naturelles, sont également capables de réaliser cette réduction, comme le genre *Desulfovibrio* par exemple (Lovley et Phillips, 1992).

Il a été montré que des bactéries réductrices de sulfates, présentes naturellement dans les eaux provenant d'anciennes mines d'uranium, pouvaient réduire, en anaérobie, l'U(VI) en U(IV) insoluble sous forme d'uraninite* comme le montre la figure 11 (Panak *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 2003, Abdelouas *et al.* 1998).

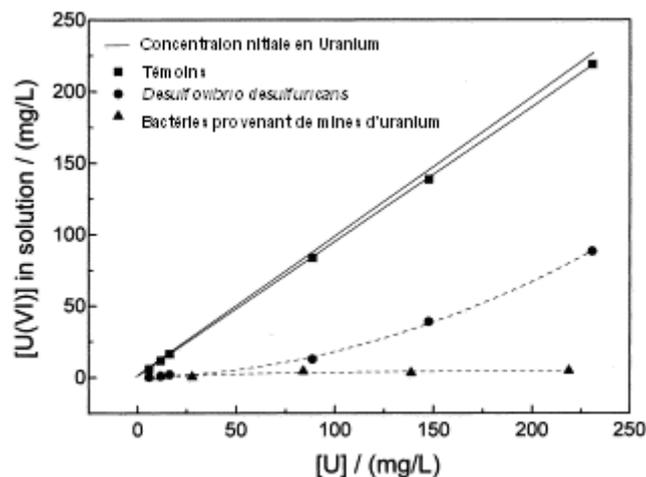


Figure 11 : Diminution de la concentration en U(VI) en solution après 3 jours en présence de *Desulfovibrio desulfuricans* et d'une eau provenant d'une mine d'uranium. (D'après Panak *et al.* 1998).

Il existe une grande diversité de microorganismes pouvant réduire l'U(VI) en U(IV) allant des archéobactéries aux bactéries fermentatives incluant les bactéries réductrices de métaux qui semblent les plus à même de réaliser cette réduction.

En condition anaérobie, les microorganismes utilisent d'autres accepteurs finaux d'électrons que l'oxygène. Le couplage de l'oxydation des composés organiques avec la réduction du nitrate est plus thermodynamiquement favorable que la réduction d'autres accepteurs d'électrons présents dans le milieu (SO_4^{2-} , Mn(IV) ou U(VI)). En ajoutant des nutriments (comme de l'acétate) et/ou des sulfates à des eaux naturelles contaminées par de l'uranium, l'activité de certains microorganismes est stimulée afin de réduire l'U(VI) en U(IV).

Une approche de stimulation *in situ* de bactéries réductrice de métaux dans des eaux contaminées a ainsi été conduite (Anderson *et al.* 2003). Une injection d'acétate, donneur d'électrons, a été réalisée pendant trois mois dans un sol. Après neuf jours, la concentration en uranium VI a commencé à décroître en parallèle avec une augmentation de la concentration en Fe(II) et un enrichissement en espèces de *Geobacter*, connues pour être des bactéries réductrices de Fe(III). Après 39 jours cependant, la composition de la flore bactérienne a commencé à changer avec une dominante de microorganismes réduisant les sulfates. La concentration en U(VI) a commencé à croître avec une diminution de Fe(II), de l'acétate et du sulfate et une accumulation de sulfite. La composition précise de la flore du sol et de l'eau exerce donc un contrôle sur la spéciation de l'uranium. Celui-ci peut également être réoxydé dans ces mêmes sols sous certaines conditions (Wan *et al.* 2005)

Les facteurs qui pourraient améliorer ou inhiber la réduction bactérienne de l'U(VI) sont mal définis. En effet, cette réduction est difficile à prévoir et les résultats obtenus dans des conditions particulières et pour un microorganisme défini ne sont pas nécessairement transférables à d'autres conditions ou à d'autres espèces bactériennes.

La présence de carbonates, par exemple, provoque des réactions différentes selon les espèces bactériennes. Alors que *G. metallireducens* et *S. putrefaciens* sont capables de réduire l'uranium en présence de cet élément (Lovley *et al.* 1991), *Desulfotomaculum reducens* (Tebo et Obratzsova, 1998) et *Desulfosporosinus orientis* (Suzuki *et al.* 2004) en sont incapables. La nature des acides organiques

complexés à l'uranium semble également induire une différence de vitesse de réduction par *D. desulfuricans* (Ganesh *et al.* 1997)

Il a également été montré un effet prononcé de Ca^{2+} sur la réduction bactérienne de l'U(VI) en présence de carbonate. La présence de calcium, à des concentrations de l'ordre du millimolaire, cause une diminution importante de la vitesse de réduction de U(VI) en anaérobie par des bactéries réductrices de métaux comme présenté sur la figure 12 (Brooks *et al.* 2003). L'U(VI) serait un accepteur d'électron moins efficace sous forme de complexes $\text{Ca-UO}_2\text{-CO}_3$. Or, les complexes $\text{CaUO}_2(\text{CO}_3)_3^{2-}$ et $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$ sembleraient être des espèces dominantes dans la nature dans des sols calciques. Ils n'ont été mis en évidence que récemment et les données thermodynamiques présentes dans les tables de calculs de spéciation sont encore discutées.

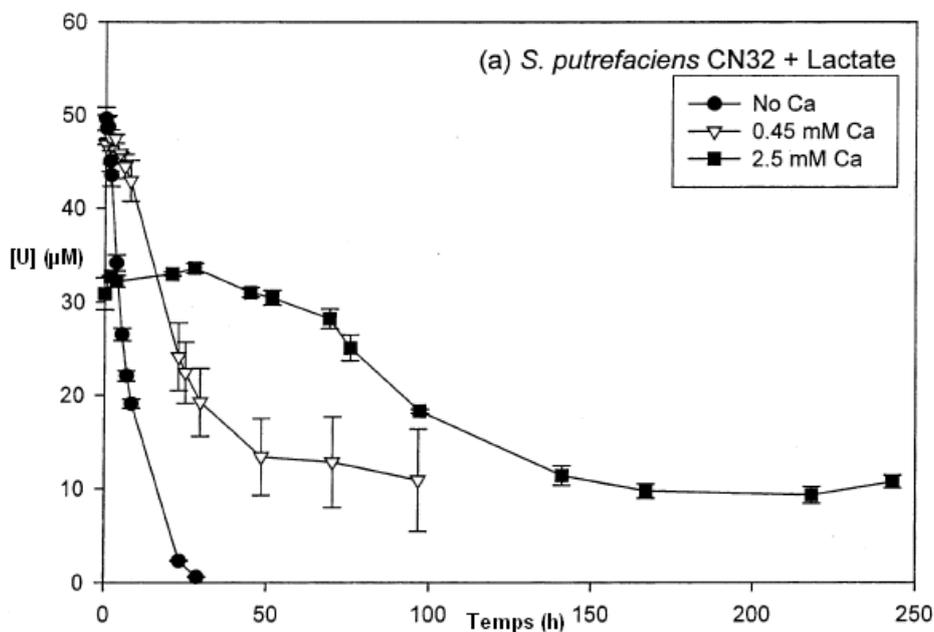


Figure 12 : Réduction d'uranium VI en solution par *S. putrefaciens* à différentes concentrations en Ca^{2+} en présence de carbonates (Brooks *et al.* 2003).

Les imageries par microscopie électronique montrent des précipités d'uraninite en dehors des bactéries (Lovley et Phillips 1992) mais également sur les membranes (Abdelouas *et al.* 1998, Figure 13) et dans le périplasma (Suzuki *et al.* 2004). Ces observations montrent que des réductases seraient présentes dans la membrane plasmique et l'espace intermembranaire.

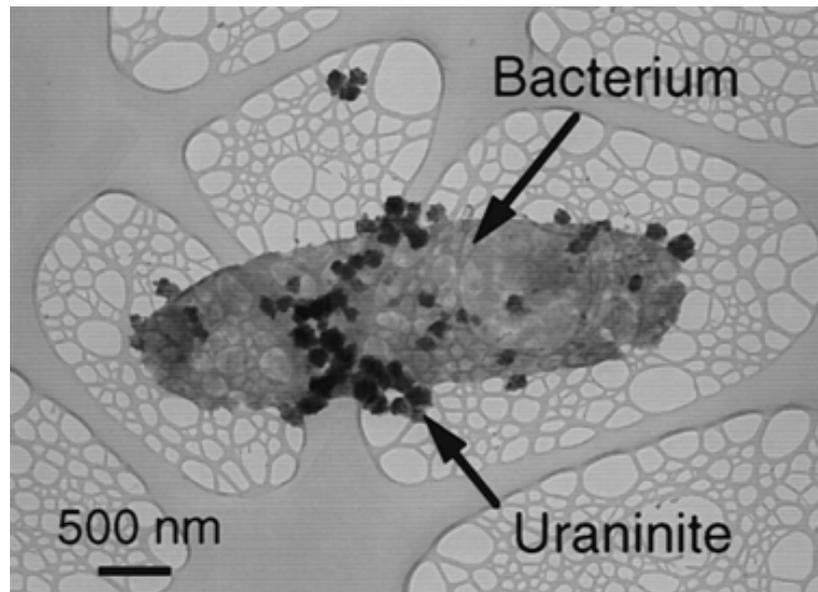


Figure 13 : Observation de précipités d'uraninite à la surface de bactéries par microscopie électronique à balayage. (D'après Abdelouas *et al.* 1998).

La probabilité de réoxydation de l'U(IV) existe. Des réactions abiotiques peuvent être observées en présence de nitrate (Finneran *et al.* 2002). *Thiobacillus denitrificans* a également la capacité de dissoudre les oxydes d'uranium(IV) (Beller, 2005).

2. Accumulation/biosorption de l'uranium

De nombreuses bactéries sont capables d'accumuler l'uranium ou de l'adsorber à la surface de leur paroi bactérienne.

La figure 14 présente l'accumulation et l'adsorption de l'uranium par deux souches de *Thiobacillus ferrooxydans* à différents pH (Panak *et al.* 1998).

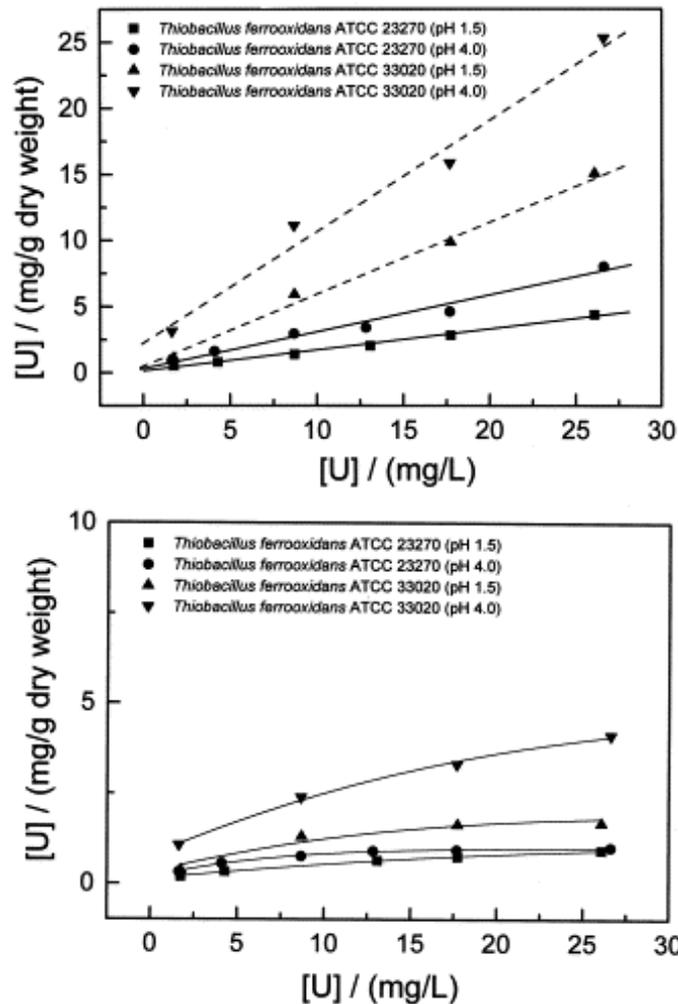


Figure 14 : Accumulation totale (a) et adsorption (b) de l'uranium par deux souches de *Thiobacillus ferrooxidans* à pH 1,5 et pH 4 en fonction de la concentration initiale en uranium. (D'après Panak *et al.* 1998).

Bacillus sphaericus est capable de lier sélectivement des métaux lourds comme le cuivre, le plomb, l'aluminium, le cadmium mais aussi l'uranium. Une souche de cette espèce a été isolée dans une mine d'uranium en Allemagne (Pollmann *et al.* 2005). D'autres espèces de ce même genre bactérien à Gram* positif ont été étudiées pour leur capacité à adsorber l'uranium (Selenska-Pobell *et al.* 1999, Gorman-Lewis *et al.* 2005, Fowle *et al.* 2000). Des bactéries à Gram négatif et des cyanobactéries* sont également capables de lier l'uranium (voir tableau 2).

Une enveloppe de protéines de surface adoptant une structure pseudo-cristalline, dite S Layer, est présente à la surface de certaines bactéries et peut lier l'uranium à de fortes concentrations (jusqu'à 20 mg U / g de protéines) ainsi que des métaux nobles comme le palladium, le platine ou l'or (Merroun *et al.* 2005). Cette structure est commune à de nombreux groupes phylogénétique de bactéries, à la fois chez les

bactéries à Gram positifs et les bactéries à Gram négatifs (Sara et Sleytr, 2000). Elle a un fort potentiel dans les applications biotechnologiques et les applications de bioremédiation. Il a été montré, grâce à des observations par microscopie électronique en transmission et par des techniques de spectroscopie d'absorption des rayons X, que l'uranium se fixait aux groupes phosphates de ces protéines paracrystallines de surface mais également aux groupements phosphates et carboxyles des lipopolysaccharides* (LPS) (Barkleit *et al.* 2007), des acides teichoïques* (Doyle *et al.* 1980) et des molécules présentes à la surface des parois bactériennes (Francis *et al.* 2004).

Le pH semble jouer un rôle important dans la complexation de l'uranium sur ces différents groupes. Un pH très acide ($\text{pH} \leq 2$) favoriserait la liaison aux phosphates alors que la contribution des groupes carboxyles interviendrait à partir de pH 4,5 (Merroun *et al.* 2006). Les observations par microscopie électronique en transmission montrent que les complexes d'uranium à la surface des bactéries sont principalement des précipités. On remarque donc que cette accumulation, déterminée par la diminution de la concentration en uranium dans le milieu de culture, est finalement très proche d'une précipitation et qu'il est complexe de séparer les deux phénomènes qui semblent reliés.

3. Précipitation de l'uranium(VI)

En plus des groupes phosphoryles présents à la surface des bactéries, les microorganismes peuvent relarguer des phosphates dans le milieu qui s'associeront avec l'uranium pour former des espèces peu solubles (Renninger *et al.* 2004).

La figure 15 nous montre des précipités d'uranium à la surface d'une espèce de *Microbacterium* (Nedelkova *et al.* 2007)

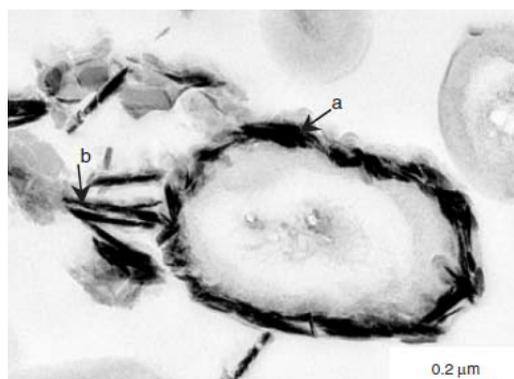


Figure 15 : Observations au microscope électronique en transmission de précipités d'uranium au contact d'une espèce de *Microbacterium* (Nedelkova *et al.* 2007).

Chez *Cupriavidus metallidurans* CH34, le périplasme est naturellement alcalin du fait de la perte de protons provenant de l'efflux des métaux. Le CO₂ est donc converti en carbonate dans l'espace périplasmique et ceux-ci forment des complexes avec les métaux qui peuvent précipiter.

Pour ces raisons, *C. metallidurans* CH34 semble être une souche potentiellement intéressante dans les stratégies de bioremédiation de l'uranium. Il en est de même pour *R. palustris* en anaérobie car dans ces conditions, elle synthétise des thylakoïdes potentiellement riches en phosphates.

V. ETUDE DES COMPLEXES D'URANYLE PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION X

L'association de l'uranium avec la surface des cellules bactériennes est principalement due à des interactions physiques et chimiques impliquant l'adsorption, l'échange d'ion, et la complexation, qui ne dépendent pas directement du métabolisme.

Les parois cellulaires présentent des groupes fonctionnels à leur surface tels que des groupes carboxyles, hydroxyles, amines et phosphates, qui peuvent former des complexes avec l'uranium (Fowle *et al.* 2000).

La résonance magnétique nucléaire (RMN) du ³¹P a montré que l'uranium était lié aux groupes phosphates des phospholipides* de *Mycobacterium smegmatis* et que les groupes phosphates et carboxyles du peptidoglycane* étaient également impliqués dans cette liaison (Andres *et al.* 1994).

La spectroscopie à fluorescence laser résolue en temps a montré des sphères de coordination de l'uranium avec des groupes organophosphates à la surface de différents genres bactériens (*Thiobacillus*, *Bacillus*...). Les polysaccharides, les acides teïchoïques et les couches de phospholipides* sont responsables de ces interactions (Panak *et al.* 1999).

Plusieurs études EXAFS ont été menées sur les complexes d'uranyle associés aux cellules bactériennes. Afin d'identifier la nature des molécules en interaction avec l'ion uranyle, il est nécessaire de connaître les paramètres structuraux des différents

complexes pouvant être présent dans ces interactions. Nous allons donc d'abord réaliser une vue d'ensemble de ces structures avant de nous intéresser aux complexes d'uranyle sur les membranes bactériennes.

L'ion uranyle UO_2^{2+} possède toujours deux oxygènes axiaux (O_{ax}). Cette liaison est très rigide et ainsi, sa longueur varie peu, quel que soit le complexe étudié.

Lorsqu'elle est présente, la longueur de la liaison uranium – oxygène équatorial (U-O_{eq}), dépend fortement de la géométrie de coordination et est différentiable selon les différents types de coordination. Les effets stériques et le nombre de ligands influencent la longueur de la liaison entre l'atome central d'uranium et le nombre d'atomes d' O_{eq} . La moyenne de ces longueurs, qui sont mesurables par EXAFS, nous indique le type de coordination de l'uranium.

L'ion uranyle peut être coordonné par 4, 5 ou 6 atomes d'oxygène dans le plan équatorial formant des polyèdres à géométrie respectivement bipyramidale carrée, pentagonale ou hexagonale. La longueur moyenne des liaisons est : $\text{U-O}_{\text{eq}} \text{ bipy} = 2,26 \text{ \AA}$, $\text{U-O}_{\text{eq}} \text{ pent} = 2,34 \text{ \AA}$ et $\text{U-O}_{\text{eq}} \text{ hexa} = 2,46 \text{ \AA}$ (Bruns *et al.* 1996).

Une troisième sphère de coordination lointaine peut également être mise en évidence. Il s'agit en général d'atomes de carbone ou d'atomes de phosphore.

1. Les complexes de phosphates d'uranyle

Plusieurs complexes de phosphates d'uranyle ont été étudiés par spectroscopie d'absorption X. Les phosphates peuvent être organiques et inorganiques. Le tableau 3 donne les valeurs des longueurs de liaison, du nombre de coordinance et du facteur de Debye-Waller, qui représente le degré de désordre de la liaison.

Tableau 3 : Paramètres structuraux, déterminés par EXAFS, des complexes d'uranium avec différents phosphates à différents pH. R représente la longueur des liaisons, N le nombre de coordination et σ^2 le facteur de debye-Waller. Les incertitudes sont de 0,02 Å pour R et 20% pour N.

Complexe	Liaison	R (Å)	N
UO ₂ (H ₂ PO ₄) ₂ (Panak <i>et al.</i> 2002)	U – O _{ax}	1,78	2
	U – O _{eq}	2,29	3
	U - P	3,60	2
U – AMP (Panak <i>et al.</i> 2002)	U – O _{ax}	1,76	2
	U – O _{eq}	2,32	6
	U - P	3,58	1

Il existe une différence entre les complexes de phosphate d'uranyle organique et de phosphate d'uranyle inorganique. Elle se situe surtout au niveau du nombre d'oxygène équatoriaux. L'uranium pourrait être entouré de groupes phosphates similaires mais dans un arrangement différent que le phosphate d'uranyle inorganique. La distance entre l'atome d'uranium et celui de phosphate d'environ 3,60 Å est typique des liaisons monodentates* des groupes phosphates.

La figure 16 montre une représentation schématique d'un complexe de phosphate d'uranyle.

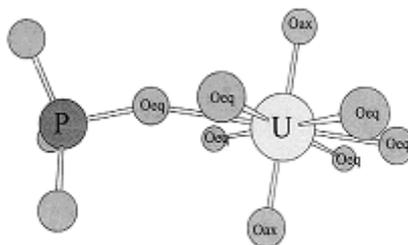


Figure 16 : Représentation schématique d'un complexe de phosphate d'uranyle. (D'après Kelly *et al.* 2002).

2. Les complexes de carbonate d'uranyle

L'ion $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ est l'espèce prédominante en solution carbonatée en absence de calcium. Il possède au moins trois sphères d'atomes autour de l'atome central d'uranium. La première sphère contient les deux oxygènes axiaux à $1,79 \pm 0,02 \text{ \AA}$ de l'atome d'uranium, la deuxième contient les six oxygènes équatoriaux à $2,44 \text{ \AA} \pm 0,02$ et la troisième contient les trois carbones à $2,89 \pm 0,02 \text{ \AA}$ (Bernhard *et al.*, 2001 ; Kelly *et al.*, 2007). Une quatrième sphère éloignée de l'atome d'uranium ($>4\text{\AA}$) contient des atomes d'oxygène distants. Dans l'environnement, les différentes formes de carbonate d'uranyle se distinguent par la nature du contre ion et le degré d'hydratation. Il n'y a cependant pas de différences dans les paramètres des premières sphères de coordination (Amayri *et al.*, 2005). La figure 17 montre une représentation schématique de l'ion $(\text{UO}_2)(\text{CO}_3)_3^{4-}$. La longueur de la liaison U – C est typique des liaisons bidentates, c'est-à-dire qui forme deux liaisons sur le même atome de carbone (voir représentation schématique).

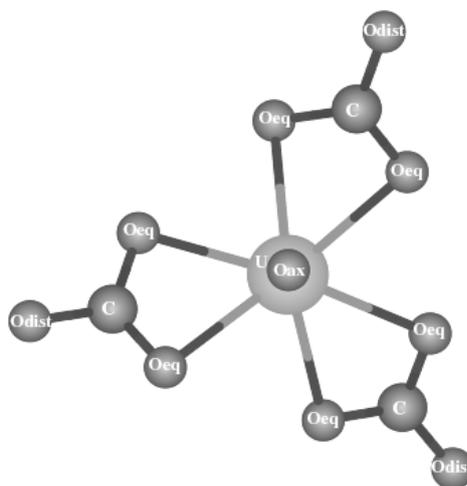


Figure 17 : Représentation schématique des sphères de coordination de $(\text{UO}_2)(\text{CO}_3)_3^{4-}$ (D'après Kelly *et al.*, 2007).

3. Les complexes d'uranium et d'acides organiques

Plusieurs complexes d'acides organiques d'uranyle ont été étudiés en spectroscopie d'absorption X. Le tableau 4 montre les paramètres calculés pour chaque complexe.

Tableau 4 : Paramètres structuraux des complexes d'uranium, déterminés par EXAFS, avec différents acides organiques à différents pH. R représente la longueur des liaisons, N le nombre de coordination et σ^2 le facteur de debye-Waller. Les incertitudes sont de 0,02 Å pour R et 20% pour N.

Complexe	Liaison	R (Å)	N	Référence
(UO ₂)-Acétate pH 2-3 en solution	U – O _{ax}	1,77	2	Bailey <i>et al.</i> 2004
	U – O _{eq}	2,41	4,5	
	U - C	2,92	2	
(UO ₂) ₂ (Malate) ₂ pH 2 en solution	U – O _{ax}	1,78	2,3	Allen <i>et al.</i> 1996
	U – O _{eq1}	2,33	2,7	
	U – O _{eq2}	2,45	2,7	
(UO ₂) ₂ (Citrate) ₂ pH 3,8 en solution	U – O _{ax}	1,78	2,3	Allen <i>et al.</i> 1996
	U – O _{eq}	2,38	5	
	U - C	2,94	2	
(UO ₂)Fe(Citrate) ₂ pH 6 en solution	U – O _{ax}	1,77	2,2	Dodge et Francis, 2003
	U – O _{eq}	2,37	5,3	
	U - C	2,96	2	

Les complexes de citrate et de malate d'uranyle à pH acide donnent des résultats équivalents concernant les longueurs de liaison et le nombre de coordination. La modélisation des oscillations EXAFS du malate d'uranyle fait apparaître deux sphères d'oxygènes équatoriaux. Il est possible de ne faire apparaître qu'une seule sphère. Le résultat serait une liaison de 2,38 Å avec 5 atomes d'oxygène ce qui correspond aux valeurs du citrate d'uranyle. Le citrate et le malate font tous les deux parties du cycle des acides tricarboxyliques (ou cycle de Krebs*) et possèdent des fonctions carboxyliques et hydroxyles proches. Il est donc logique que leur structure complexée à l'uranium soit proche. Les formules développées du malate, du citrate et de l'acétate sont données en annexe A et sur la figure 18. Il a également été montré une influence du pH et du ratio [Citrate]/[Uranium] dans la formation d'espèce monomère UO₂(Cit)⁻ ou d'espèce polynucléaire (UO₂)₂(Cit)₂²⁻ à température ambiante

(Bailey *et al.*, 2005). L'espèce monomère est dominante lorsque le ratio est inférieur à 2 avec en parallèle un pH inférieur à 1,8. Au-delà, l'espèce polynucléaire est majoritaire.

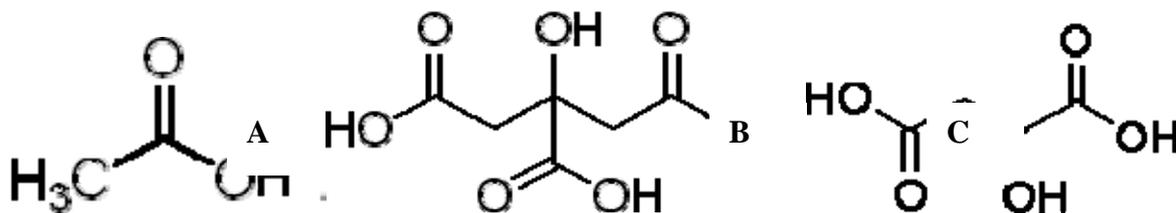


Figure 18 : Formule semi-développée de l'acétate (A), du citrate (B) et du malate (C).

Les résultats pour l'acétate d'uranyle sont peu différents. Ils font apparaître des longueurs plus longues de liaison U – O_{eq}. Cependant, l'incertitude des mesures fait qu'elles ne sont pas significativement différentes.

On peut également noter une différence de longueur des liaisons U – O_{eq} entre les complexes d'acides organiques et les carbonates. La nature de la liaison entre l'uranium et ces composés est pourtant identique car elle fait intervenir un groupement carboxylique. La différence se situe au niveau de la structure plus encombrante des acides organiques qui présente un atome de carbone supplémentaire après le carbone alpha et non pas un oxygène, ce qui est le cas pour le carbonate. La fonction hydroxyle proche du groupement carboxylique pourrait également intervenir dans la stabilité du complexe et les paramètres des liaisons (Bailey *et al.*, 2005).

La figure 19 nous représente une certaine forme d'acétate d'uranyle. Comme pour les carbonates, la liaison aux carbones serait bidentate.

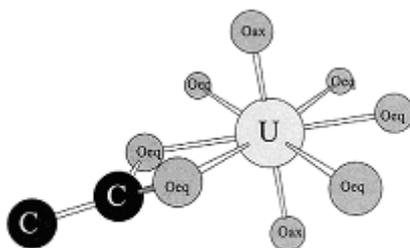


Figure 19 : Structure de l'acétate d'uranyle. (D'après Kelly *et al.* 2002).

4. Les complexes d'uranium associés aux membranes bactériennes

D'après les paragraphes précédents, on peut voir que la détermination des groupements mis en jeu dans les complexes peut être réalisée grâce aux longueurs des liaisons U – O_{eq}. En effet, cette liaison dépendant fortement de la géométrie de coordination, des effets stériques et du nombre de ligand, il est possible de distinguer les différents groupes : complexes de phosphate d'uranyle ($\approx 2,28\text{\AA}$), complexes de carbonate d'uranyle ($\approx 2,44\text{\AA}$) et complexes d'acides organiques d'uranyle ($\approx 2,38\text{\AA}$). Ces complexants de l'uranium peuvent tous être retrouvés chez les microorganismes, que cela soit au niveau intracellulaire ou au niveau membranaire.

Plusieurs complexes d'uranium associés à des bactéries ont été étudiés par spectroscopie d'absorption X. Les spectres des complexes uranium-bactéries ont été comparés aux standards précédemment cités afin de déterminer la nature des liaisons mises en jeu.

Des études sur le genre *Bacillus* ont montré que l'uranium était principalement complexé aux groupes phosphates avec une longueur de liaison U – O_{eq} de $2,28\text{\AA}$ (Hennig *et al.* 2001), complexé à l'AMP (Panak *et al.* 2002) ou aux phosphates des membranes et des parois bactériennes (Merroun *et al.* 2005, Kelly *et al.* 2002). Cette dernière étude montre également une complexation à des groupes carboxyles de façon bidentate alors que la liaison aux phosphates est monodentate. Ces complexes sont visibles par microscopie électronique en transmission. Chez les bactéries à Gram positif, la liaison de l'uranium se ferait par les groupes carboxyles du peptidoglycane et les groupes phosphates des acides teïchoïques* (Doyle *et al.* 1980). Chez les bactéries à Gram négatif, les groupements phosphates des lipopolysaccharides (LPS) seraient responsables de la complexation de l'uranium au microorganisme (Ferris et Beveridge 1986 ; Langley et Beveridge 1999 ; Panak *et al.* 1999 ; Barkleit *et al.* 2007). Ces résultats ont été confirmés sur d'autres bactéries comme *A. ferrooxydans* (Merroun *et al.* 2003), *P. fluorescens* ou *Halomonas sp.* (Francis *et al.* 2004).

Ces études ont été réalisées en général aux pH optimaux de croissance des bactéries. A pH bas, il a été montré que l'uranyle se liait exclusivement aux

phosphates mais qu'un accroissement du pH favorisait la liaison de l'uranium aux groupes carboxyles (Merroun *et al.* 2005, Kelly *et al.* 2002). Plusieurs autres études par spectroscopie d'absorption des rayons X confirment la présence de complexes d'uranium avec ces mêmes groupes.

Même si la bactérie possède une grande variété de groupes fonctionnels, toutes les études montrent que le phosphate est le complexant prédominant de l'uranium chez les bactéries. Cependant, l'uranium associé aux bactéries peut être remobilisé par la mise en contact d'agents chélatants comme l'EDTA, le citrate ou Na_2CO_3 (Panak *et al.* 1999).

Les formes chimiques solubles de l'uranium les plus susceptibles d'être formées dans l'environnement sont donc les carbonates d'uranyle et les acides organiques d'uranyle. Nous allons essayer de les former dans les milieux de culture de nos trois bactéries.

D'autre part, différents comportements bactériens envers l'uranium ont été décrits. Nous allons nous placer dans les conditions permettant de les mettre en évidence, en choisissant les trois souches décrites dans la partie suivante.

PARTIE B : MODELES BACTERIENS ETUDIES

I. MODELE D'ETUDE RESISTANT AUX METAUX : *CUPRIAVIDUS METALLIDURANS* CH34

1. Description générale :

La bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 a été isolée pour la première fois en 1976 dans des sédiments riches en zinc d'une usine en Belgique (Mergeay *et al.* 1978).

Cette bactérie est multirésistante aux métaux lourds et aux métalloïdes (Mergeay *et al.* 1985 ; Roux *et al.* 2001). Elle a d'abord été caractérisée comme résistante à Zn(II), Cd(II) et Co(II) puis, plus tard, à Ni(II), Cu(II), CrO_4^{2-} (Cr(VI)), Hg(II), Pb(II), Se(IV) et Se(VI) (Mergeay *et al.* 1985).

C. metallidurans CH34 est un bacille* à Gram négatif non sporulant de la famille des β -protéobactéries* qui possède une forme circulaire et qui se présente généralement sous forme simple. Elle forme de rares paires ou de courtes chaînes. Sa température optimale de croissance est de 30°C. Elle est mobile grâce à un flagelle péritriche à 30°C mais immobile à 37°C (Mergeay *et al.* 1985). La figure 20 présente une observation de la bactérie en microscopie électronique en transmission.

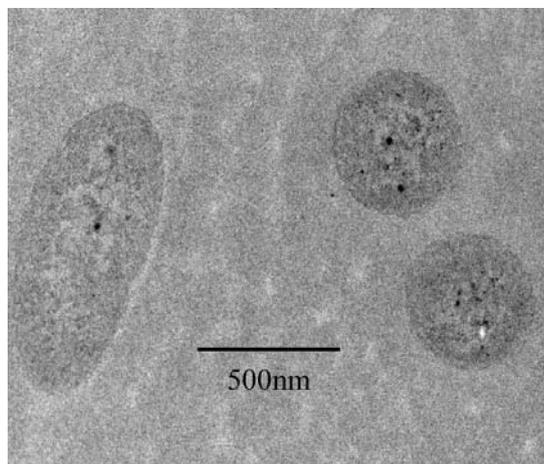


Figure 20 : Observation de *Cupriavidus metallidurans* CH34 en condition aérobie à 30°C en milieu classique par microscopie électronique en transmission (ce travail).

Le métabolisme de *C. metallidurans* CH34 est de type oxydatif. Elle est chimiotrophe (voir tableau 5) car elle utilise l'énergie chimique au contraire des bactéries phototrophe qui tirent leur énergie de la lumière. Elle peut utiliser le CO₂ comme source de carbone et le dihydrogène comme source d'énergie grâce à deux hydrogénases. Elle est aéro-anaérobie facultative, c'est-à-dire qu'elle peut croître en absence de dioxygène sous certaines conditions, en présence de nitrate comme accepteur final d'électron. Elle peut également utiliser une large gamme de substrats comme source de carbone à l'exception notable des sucres. Ainsi, la bactérie n'est pas capable d'utiliser le fructose, ce qui permet de la distinguer de *C. eutrophus* H16 qui, elle, peut dégrader la molécule. Dans ces conditions hétérotrophe, plusieurs molécules sont utilisables comme le gluconate, l'acétate, le lactate, le succinate ou l'azélate. Le tableau 5 résume les différentes conditions favorables à la croissance de la souche.

Tableau 5 : Conditions favorables à la croissance de *C. metallidurans* CH34.

Type trophique	Chimio-litho-autotrophe	Chimio-organo-autotrophe	Chimio-organo-hétérotrophe	Chimio-organo-autotrophe	Chimio-organo-hétérotrophe
Source de carbone	CO ₂	CO ₂	Substrat organique sauf les sucres	CO ₂	Substrat organique sauf les sucres
Source d'énergie	H ₂	Substrat organique sauf les sucres			
Accepteur final d'électron	O ₂	O ₂	O ₂	NO ₃ ⁻	NO ₃ ⁻
Condition d'oxygénation	Aérobie	Aérobie	Aérobie	Anaérobie	Anaérobie

Elle est également capable de synthétiser de longues chaînes polycarbonées, comme le polyhydroxybutyrate (PHB), pour la mise en réserve de sources de carbone. Cette particularité est exploitée par l'industrie pour la fabrication de bioplastique (Pohlmann *et al.* 2006)

Certaines propriétés de *C. metallidurans* CH34 font que la bactérie est un candidat potentiel pour les applications à la biodépollution de l'environnement. En effet, elle est capable de dégrader certaines molécules aromatiques toxiques comme le toluène ou le benzène (Merlin *et al.* 1997 ; Springael *et al.* 1996) ou de séquestrer et de transformer le sélénite toxique en sélénium élémentaire moins nuisible (Sarret *et al.* 2005). La bactérie pourrait ainsi être utilisée pour le traitement de sols ou d'effluents pollués (Diels *et al.*, 1999 ; Diels *et al.*, 1995b).

2. Taxonomie de la souche

La taxonomie de la souche a fortement évolué depuis sa découverte au gré des découvertes biochimiques d'abord puis moléculaires ensuite.

Elle a initialement été apparentée aux bactéries *Alcaligenes* avec la découverte de ses deux hydrogénases (Mergeay *et al.* 1995)

En 1995, une analyse taxonomique basée sur l'ARN 16S couplée à des caractérisations phénotypiques a amené le reclassement de la bactérie dans le genre *Ralstonia* (Yabuuchi *et al.* 1995)

En 1999, différentes souches de cette famille ont été testées pour leur capacité à croître dans un environnement riche en métaux lourds (Brim *et al.* 1999). Elles ont été rassemblées dans un sous groupe appelé "*Ralstonia eutropha*-like metal-resistant strains". En 2001, le nom de *Ralstonia metallidurans* a été donné à la souche CH34 en raison de sa capacité à résister à de nombreux métaux lourds (Goris *et al.* 2001).

En 2004, de nouvelles analyses révèlent une séparation du genre *Ralstonia* en deux sous-groupes. La lignée *Ralstonia eutropha* comprenant la souche CH34 est alors rebaptisée *Wautersia* (Vaneechoutte *et al.* 2004).

Dans la même année, toutes les bactéries appartenant au genre *Wautersia* sont reclassées dans le genre *Cupriavidus* et ceci en raison de différentes règles du code international de nomenclature des bactéries (Vandamme et Coenye, 2004).

Le tableau 6 résume cette succession de dénomination de la bactérie au cours du temps

Tableau 6 : Historique de la nomenclature de la bactérie *Cupriavidus metallidurans*.

Période	Nomenclature
Avant 1995	<i>Alcaligenes eutrophus</i>
1995-1999	<i>Ralstonia eutropha</i>
1999-2001	<i>Ralstonia eutropha-like</i>
2001-2004	<i>Ralstonia metallidurans</i>
2004	<i>Wautersia metallidurans</i>
2004 à aujourd'hui	<i>Cupriavidus metallidurans</i>

3. Génome :

Le génome de *C. metallidurans* CH34 est totalement séquencé et disponible :

http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/ralme/ralme.home.html

<http://genome.ornl.gov/microbial/rmet/>

Son séquençage a débuté en 2000 et a été achevé en 2006 par le Joint Genome Institute. Il est constitué de quatre réplicons : un chromosome de 3,9Mb, un mégaplasmide de 2,6Mb et de deux plasmides géants pMOL28 de 171kb et pMOL30 de 234kb.

La plasticité génomique de *C. metallidurans* CH34 lui permet de s'adapter à des conditions environnementales extrêmes (Taghavi *et al.* 1997). La bactérie cultivée à 37°C exprime de nouvelles fonctions qui proviennent de mutations. La génération de mutants résulte de l'activité d'éléments génétiques mobiles qui provoquent des délétions, des excisions ou des inversions au niveau de l'ADN qui peuvent être létales pour la bactérie. Ces mutations ont également des effets phénotypiques comme des pertes de résistances à certains métaux lourds, en particulier ceux impliquant l'opéron *czc* (Mergeay, 2000).

4. Résistance aux éléments-traces métalliques :

La notion de "métaux lourds" possède plusieurs définitions différentes. Ce terme a été récemment remplacé par celui de "éléments-traces métalliques" (ETM).

Certains auteurs définissent les métaux lourds comme les éléments métalliques ayant une masse volumique supérieure à 4 ou 5g/cm³. Pour d'autres, il s'agit des éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans le tableau périodique des éléments excluant donc le fer et le chrome. A cause du caractère potentiellement toxique de certains métaux lourds comme le mercure, le plomb ou le cadmium, on inclut parfois dans cette catégorie certains éléments toxiques comme l'arsenic, qui est un métalloïde.

Certains métaux sont des cofacteurs* indispensables à la bactérie pour le fonctionnement de ses enzymes mais ils deviennent toxiques à forte concentration. Par exemple, le zinc est un cofacteur des ADN polymérases (Springgate *et al.* 1973) et le nickel est nécessaire à certaines uréases (Dosanjh *et al.*, 2007). Au vue de la grande variété d'ETM (plus de cinquante éléments) et de leurs effets biologiques, la bactérie doit réguler leur concentration intracellulaire et son homéostasie* (Nies, 1999). La concentration de ces éléments doit rester homéostatique sans atteindre des niveaux toxiques.

Les éléments-traces métalliques peuvent entrer dans la cellule bactérienne par deux voies distinctes. Le premier système est rapide et non spécifique. Il fait intervenir des porines exprimées constitutivement et il dépend exclusivement d'un gradient de concentration chimioosmotique* entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. De nombreux substrats empruntent cette voie. Le deuxième système est spécifique de l'élément considéré et consiste en une internalisation à travers un transporteur. Une consommation d'énergie, par hydrolyse de l'ATP par exemple, est nécessaire. Ces transporteurs sont souvent inductibles. Ils sont exprimés en réponse à une exigence particulière comme un besoin en élément trace en cas de carence.

La toxicité intracellulaire des ions métalliques a plusieurs origines :

- Ils peuvent inhiber les enzymes en se fixant sur certains résidus comme la cystéine ou l'acide glutamique qui participent aux sites actifs et à la réaction

enzymatique. Cette inhibition peut également être due à une compétition avec le véritable cofacteur* de l'enzyme. Les oxyanions, de sélénate ou d'arsenate par exemple, peuvent occuper les sites de fixation des phosphates (Moore *et al.* 1983 ; Abernathy *et al.* 1999).

- Ils peuvent altérer la structure des acides nucléiques par fixation sur les groupements phosphates ou provoquer indirectement des mutations sur l'ADN en se fixant sur les protéines de régulation et de réparation. La transcription ou la traduction sont ainsi inhibées, par le cadmium ou le cobalt par exemple (Hengstler *et al.* 2003).
- Ils peuvent être responsables de la formation de radicaux libres qui peuvent entraîner des dommages à l'ADN ou aux protéines. La présence d'arsenic, par exemple, provoque l'apparition de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxylés, toxiques pour la cellule (Wang *et al.* 1996)

5. Mécanismes de résistance aux métaux lourds chez *C. metallidurans* CH34

C. metallidurans CH34 possède de nombreux déterminants de résistance aux métaux lourds. Ils sont majoritairement portés par les plasmides pMOL28 et pMOL30. Au moins 14 éléments sont concernés : le chrome, le manganèse, le cobalt, le nickel, le cuivre, le zinc, l'astate, le sélénium, l'argent, le cadmium, le mercure, le thallium, le plomb et le bismuth.

→ Résistance à l'argent : Un système d'extrusion de type antiport cation/proton est utilisé pour expulser les ions Ag(I) hors de la cellule. L'opéron *si/CBA* qui porte les gènes codant pour les protéines des transporteurs est localisé sur le plasmide pMOL30 (Monchy *et al.* 2007). Cette résistance à l'argent a d'abord été mise en évidence chez *S. typhimurrium* (Gupta *et al.* 1999).

→ Résistance couplée au cadmium, au cobalt et au zinc : La résistance aux ions Cd(II) est due à leur expulsion active via des transporteurs ATP-dépendant codés par l'opéron *cad*. Ces protéines CAD peuvent également rejeter d'autres cations comme Pb(II) et Zn(II) lorsqu'ils sont présents à forte concentration. La protéine CadA est codée par le chromosome bactérien (Mergeay *et al.* 2003 ; Monchy *et al.* 2007).

Il existe un autre système d'extrusion des ions Cd(II), Co(II) et Zn(II) qui est codé par l'opéron *czc* porté par le plasmide pMOL30 (Nies, 1992 ; Nies, 1995 ; Diels *et al.* 1995a). Il s'agit de protéines qui forment à travers les deux membranes bactériennes un complexe qui agit comme un antiport cation-proton et qui utilise donc la force chimioosmotique comme source d'énergie (Anton *et al.* 2004 ; Monchy *et al.* 2007).

→ Résistance à l'ion chromate : Les ions chromate, qui entrent dans la cellule par les perméases à sulfate (Nies *et al.* 1990), sont expulsés par une pompe membranaire ChrA. Les différentes protéines responsables de cette résistance sont codées par le plasmide pMOL28 et par le mégaplasme (Juhnke *et al.* 2002).

→ Résistance au cuivre : Il existe deux formes de cuivre que l'on peut retrouver dans la cellule. Alors que l'espèce majoritaire dans l'environnement est le Cu(II), celui-ci est réduit lors de son transport dans la cellule et l'on retrouve essentiellement du Cu(I), plus toxique, dans le milieu intracellulaire. La plupart de ces ions sont complexés à des protéines chaperonnes. Cependant, lorsque l'ion cuivre est libre dans le milieu intracellulaire, il est toxique pour la cellule. La résistance de la bactérie au cuivre est une nouvelle fois basée sur l'expulsion des cations hors de la cellule via des ATPases* d'efflux ou via des transporteurs chimioosmotiques. L'opéron *cop* est porté par le plasmide pMOL30 mais il existe un autre cluster de gènes de résistance sur le mégaplasme (Mergeay *et al.* 2003 ; Monchy *et al.* 2007).

→ Résistance au mercure : La résistance au mercure est celle qui a été le plus étudiée dans le monde bactérien du fait de la très forte toxicité des ions mercuriques. L'opéron *mer* code des protéines responsables de la captation, du transport et de la réduction des ions Hg(II) en mercure élémentaire Hg(0) qui se volatilise hors du cytoplasme (Misra, 1992). L'opéron *mer* est situé sur le plasmide pMOL28 (Monchy *et al.* 2007).

→ Résistance couplée au nickel et au cobalt : Les ions Ni(II) et Co(II) utilisent des transporteurs identiques pour entrer et sortir de la cellule. Leur expulsion nécessite la présence d'un système d'efflux chimioosmotique à antiport cation/proton porté par

l'opéron *cnr* qui est localisé sur pMOL28 (Liesegang *et al.* 1993 ; Grass *et al.* 2000 ; Tibazarwa *et al.* 2000)

→ Résistance au sélénium : La bactérie est capable de résister au sélénite Se(IV) l'accumulant et en le réduisant en sélénium élémentaire Se(0). Elle est également capable de résister à de fortes concentrations en séléniat Se(VI) mais elle ne semble pas le réduire en sélénium élémentaire (Roux *et al.* 2001). Il est transformé en sélénium organique (sélénométhionine) (Sarret *et al.* 2005).

→ Résistance au plomb : L'opéron *pbr* de *C. metallidurans* CH34 localisé sur le plasmide PMOL30 est le seul à avoir été caractérisé chez les bactéries (Borremans *et al.* 2001). La résistance au plomb est basée sur l'import, la séquestration et l'expulsion du métal. La protéine responsable de l'éjection de Pb(II) est une ATPase de type P similaire à celle expulsant le cadmium (Monchy *et al.* 2007).

C. metallidurans CH34 est donc une souche adaptée à des environnements pollués en métaux. On peut remarquer qu'elle possède une grande quantité de systèmes actifs d'efflux qu'ils soient primaires (l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP) ou secondaires (l'énergie provenant de la force proton motrice) (Nies, 2003). Elle est également capable de résister à certains éléments traces métalliques en modifiant leur spéciation. L'élément toxique pour la cellule devient alors moins dangereux. C'est cette multiplicité des différents mécanismes de résistance qui permet à cette bactérie d'être capable d'être tolérante à de fortes concentrations de nombreux métaux et métalloïdes.

La résistance de *C. metallidurans* CH34 à l'uranium n'a jamais été étudiée. Par ces nombreuses capacités de résistance aux ETM, la bactérie est un candidat potentiel pour la dépollution du radionucléide dans l'environnement. La résistance du microorganisme à différentes formes de ce toxique ainsi que sa possible accumulation sera donc examinée dans ce travail.

II. MODELE D'ETUDE RESISTANT AUX RADIATIONS : *DEINOCOCCUS RADIODURANS R1*

Les bactéries appartenant à la famille des *Deinococcaceae* sont parmi les organismes les plus résistants aux radiations. Malgré leur distribution ubiquitaire, seules sept espèces de *Deinococcaceae* ont été décrites. *Deinococcus radiodurans* R1 a été la première deinobactérie découverte et isolée en 1956 dans de la viande en conserve qui avait été préalablement exposée aux rayons X (Anderson *et al.* 1956).

D. radiodurans R1 est non seulement capable de survivre à une exposition aiguë aux radiations supérieure à 15000 Gy (Battista, 1997) sans mortalité ni mutation induite mais également de croître en présence d'un fort niveau d'exposition chronique (60 Gy/h) sans effet visible sur le taux de croissance (Lange *et al.* 1998). Pour comparaison, une dose de 60Gy/h est létale pour *E. coli* et une dose aiguë de 1000 à 2000Gy est nécessaire pour stériliser une culture (Lange *et al.* 1998). De manière identique, les cellules végétatives de *Bacillus* spp. ne peuvent pas croître à 60 Gy/h et une diminution de la viabilité d'un facteur 5 des spores de *Bacillus* est entraînée par une exposition aiguë de 2000 à 10000 Gy (Makarova *et al.* 2001).

Six autres espèces de deinocoques radiorésistantes ont été identifiées. Ces espèces forment un groupe phylogénétique distinct d'Eubactéries, proches du genre *Thermus*.

1. Description générale

D. radiodurans R1 est une souche pigmentée, non sporulante, non mobile et sphérique. La bactérie est Gram positif mais elle possède une enveloppe cellulaire complexe similaire aux organismes à Gram négatif. Certaines souches possèdent une couche paracrystalline de surface. C'est une bactérie tellurique, strictement aérobie et qui forme des tétrades (Battista *et al.* 1997), comme le montre la figure 21.

Le type trophique de *D. radiodurans* R1 est plus simple que *C. metallidurans* CH34. Elle est chémoorganotrophe avec un métabolisme respiratoire. Elle utilise donc le dioxygène comme accepteur final d'électron et une molécule organique comme source de carbone et d'énergie.

Les cellules se divisent sur deux plans, générant des paires et des tétrades en culture liquide. La température optimale de croissance est de 30°C. La croissance est stoppée en dessous de 4°C et au dessus de 45°C (Battista *et al.* 1997).

La figure 21 présente une observation de *D. radiodurans* R1 en microscopie électronique en transmission en condition classique de culture.

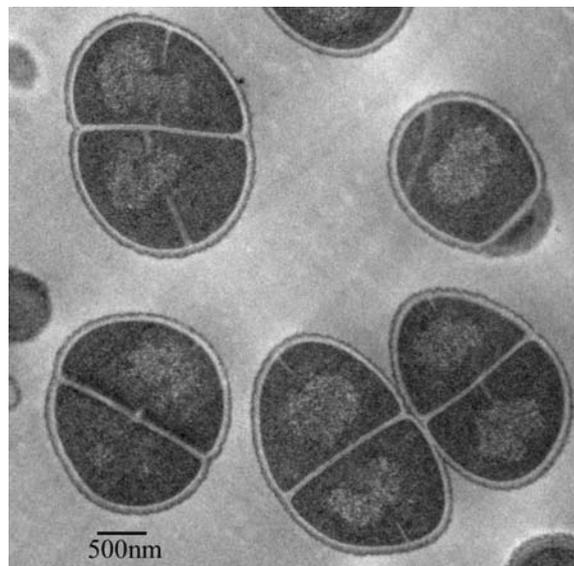


Figure 21 : Observation de *D. radiodurans* R1 à 30°C en milieu classique par microscopie électronique en transmission (ce travail).

a. Structure cellulaire

L'enveloppe cellulaire de *D. radiodurans* R1 a une structure et une composition différente de celles des bactéries classiques. Alors que sa paroi cellulaire évoque celle des organismes à Gram négatif, *Deinococcus* est Gram positif. Son enveloppe cellulaire est constituée d'une membrane plasmique et de membranes extérieures qui sont séparées par une couche de peptidoglycane de 14 à 20 nm d'épaisseur et par un "compartiment" non caractérisé. Seulement la membrane cytoplasmique et la couche de peptidoglycane sont impliquées dans la formation du septum durant la

division cellulaire. Les autres couches font office de gaines et entourent les groupements de cellules filles (Makarova *et al.* 2001 ; Work et Griffiths, 1968)

b. Phylogénie et évolution

Les *Deinococcaceae* étaient tout d'abord classés dans le genre *Micrococcus* mais les études taxonomiques ont montré que cette classification était incorrecte et les études phylogénétiques l'ont confirmé car une relation spécifique a été établie entre les genres *Thermus* et *Deinococcus* (Brooks *et al.* 1980, Brooks et Murray 1981).

Ces bactéries sont aussi largement distribuées que les bactéries du sol, environnement généralement riche en nutriments (Battista *et al.* 1997). Des souches de *Deinococcus* ont également été isolées de sites présentant des conditions limitantes. Les bactéries sont capables de survivre en milieu très sec, avec un environnement pauvre en nutriment comme de la nourriture lyophilisée, de la poussière, des instruments médicaux ou des textiles. Ces isolements montrent que ces organismes ont évolué pour survivre à des stress prolongés. *Deinococcus* est très résistante à la dessiccation (10% de viabilité après 6 ans dans un dessiccateur). Il existe très certainement une relation entre la résistance aux radiations et la résistance à la dessiccation (Mattimore et Battista, 1996).

c. Métabolisme

Le génome de *D. radiodurans* R1 code de manière fonctionnelle les voies de la glycolyse*, de la néoglucogénèse*, des pentoses phosphates* et du cycle tricarboxylique. Quelques gènes sont manquants mais ils ne semblent pas essentiels au bon fonctionnement de ces voies. Cependant, certains intermédiaires du cycle tricarboxylique ne permettent pas la croissance de la bactérie. La bactérie ne peut par exemple pas croître avec le citrate ou le fumarate comme source de carbone (Makarova *et al.* 2001 ; Venkateswaran *et al.* 2000).

D. radiodurans R1 n'est pas capable d'utiliser l'ammonium comme source d'azote malgré la présence de gènes apparemment fonctionnels codant pour des enzymes clés du cycle d'utilisation de l'ammonium. Il a cependant été démontré que *D.*

radiodurans R1 pouvait utiliser les acides aminés comme source d'azote (Makarova *et al.* 2001 ; Venkateswaran *et al.* 2000).

D. radiodurans R1 biosynthétise tous les principaux coenzymes à l'exception de l'acide nicotinique (Makarova *et al.* 2001)

2. Génome

L'organisation structurale du génome de *D. radiodurans* R1 est particulier. Couplée à la présence de mécanismes de réparation différents des autres genres bactériens, elle confère à la bactérie sa résistance aux radiations.

Le génome de *D. radiodurans* R1 est totalement séquencé (White *et al.* 1999). Il comporte deux chromosomes de 2,65 Mbp et de 412 kbp, un mégaplasme de 177 kbp et un plasmide de 46 kbp.

<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?database=gdr>

D. radiodurans R1 est multigénomique (Battista *et al.* 1997 ; Hansen, 1978). Les cellules en phase stationnaire portent 4 équivalents du génome. Les cellules en division, en phase exponentielle, peuvent contenir jusqu'à 10 copies de leur génome. Des plasmides stables naturels sont présents en faible nombre dans la cellule.

L'organisation du génome de *D. radiodurans* R1 est similaire à celle des autres bactéries (White *et al.* 1999). Plusieurs gènes sont organisés en clusters et constituent des opérons.

Plusieurs regroupements inhabituels ont cependant été découverts et certains sont particuliers à notre modèle bactérien. Certaines familles de protéines sont sur-représentées dans le génome de la bactérie comme les amino-acétyltransférases (famille d'enzymes participant à de multiples voies métaboliques et systèmes régulateurs) et les Nudix hydrolases (famille d'enzymes hydrolysant des nucléosides diphosphates liés à une autre molécule **X**) (Bessman *et al.* 1996). L'extension de la famille des Nudix est une des particularités prédominantes dans le génome de *D. radiodurans* R1. La protéine MutT, prototype de cette superfamille, a été identifiée

comme le composant central du système anti mutagène responsable de la prévention de l'incorporation du 8-oxo-dGTP dans l'ADN (Michaels et Miller, 1992). Ce nucléotide est un mutagène puissant, produit par l'action d'agents oxydants, qui peut être incorporé en face d'une cytosine ou d'une adénine. En éliminant la 8-oxo-dGTP, MutT réduit les mutations spontanées dans l'ADN et augmente donc la fidélité de la réplication. Des domaines de cette enzyme ont été retrouvés dans de multiples autres protéines chez *D. radiodurans* R1.

3. Résistance aux dommages à l'ADN :

D. radiodurans R1 se distingue par son extraordinaire capacité à tolérer certains agents endommageant l'ADN et plus particulièrement les radiations ionisantes. Les cellules irradiées ne sont pas protégées passivement des effets des radiations. Au contraire, il a été démontré que les deinocoques souffrent d'importants dommages à l'ADN après une irradiation et qu'une considérable réparation de cet ADN est nécessaire. On peut compter jusqu'à plus de 100 cassures doubles brins sur chaque chromosome de chaque cellule. Au bout de trois heures, les chromosomes sont reformés et réparés sans perte de viabilité pour la cellule et sans signe de mutation induite (Battista *et al.* 1997).

La dose D_{37} (dose requise pour réduire le nombre d'individus à 37% ; correspondant à l'inactivation d'une colonie) est environ de 600 Gy pour *D. radiodurans* R1 et de 30 Gy pour *E. coli*. Une dose de 6000 Gy provoque plus de 1000 dommages à l'ADN dans tout le génome de *D. radiodurans* R1 (Battista *et al.* 1997). La figure 22 présente la différence de résistance aux radiations ionisantes entre ces deux bactéries.

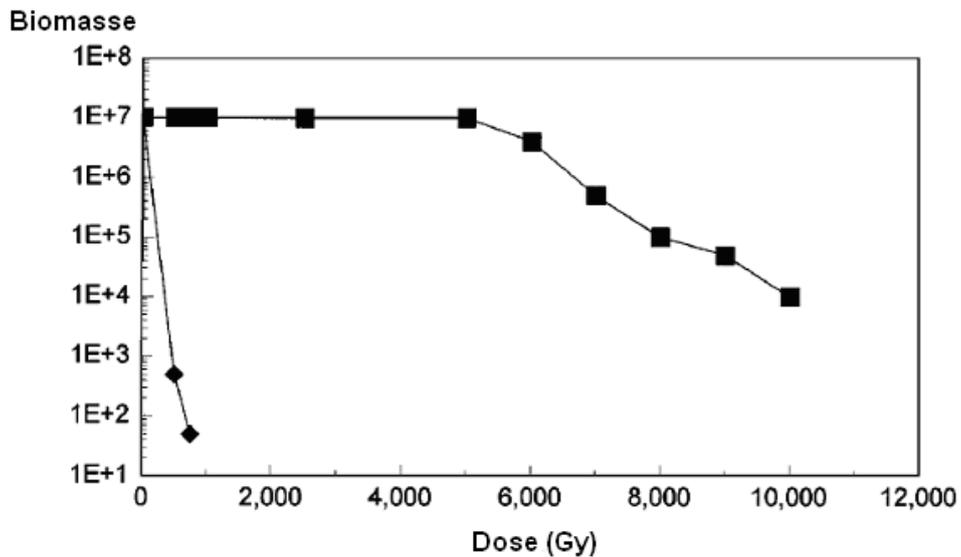


Figure 22 : Courbe de survie de *D. radiodurans* R1 (carré) et d'*E. coli* après irradiation par des rayons gamma. (Battista *et al.* 1997)

D. radiodurans R1 est également extrêmement résistante aux UV (Battista *et al.* 1997), survivant à des doses supérieures à 100J/m². La bactérie est vingt fois plus résistante qu'*E. coli*. Elle est également très résistante aux agents intercalant comme la mitomycine C (Moseley, 1975 ; Kitayama, 1982).

4. Réparation de l'ADN :

A un haut niveau de radiation (1,75 Mrad), *D. radiodurans* R1 est capable de reconstituer son génome à partir de 1000 à 2000 cassures double brins alors que *E. coli* atteint son maximum de possibilité pour 10 à 15 cassures (Makarova *et al.* 2001).

Outre le système classique de recherche d'homologie entre les deux brins d'ADN pour procéder à la réparation, la bactérie a dû développer une méthode que les autres organismes ne possèdent pas car le nombre de combinaisons possibles devient astronomique chez *D. radiodurans* R1. Un modèle de réparation alternatif a été décrit dans lequel les chromosomes sont toujours alignés, ce qui permet de simplifier grandement la recherche d'ADN complémentaire pour la réparation (Daly et Minton 1995 ; Minton et Daly 1995).

Un modèle de survie de *D. radiodurans* R1 après irradiation a été proposé. Immédiatement après l'irradiation, la réplication de l'ADN est inhibée, en parallèle de

la croissance (Venkateswaran *et al.* 2000), et ce, jusqu'à ce que les réparations soient effectuées (Daly et Minton 1995 ; Battista *et al.* 1999). Il existe un délai dose-dépendant qui suggère l'existence de "points de contrôle" qui surveillent l'étendue de la réparation et contrôlent l'initiation de la synthèse d'ADN réplicatif.

La dégradation de l'ADN des chromosomes bactériens par les radiations ionisantes génère de longs fragments simple brin qui pourraient servir de support à la recombinaison homologue. Cette dégradation est accompagnée de l'export de nucléotides endommagés hors de la cellule (Vukovic-Nagy *et al.* 1974).

Les observations au microscope électronique en transmission montrent qu'une structure membranaire délimite les quatre compartiments de la cellule. Des orifices sont présents dans la membrane interne en phase de croissance et en phase stationnaire (voir figure 2). De la chromatine est identifiée dans tous les compartiments et elle adopte une forme toroïdale. Après exposition aux radiations ionisantes ou aux UV (15 kGy et 750J/m²), la forme en anneau de la chromatine est maintenue pendant une heure (Levin-Zaidman *et al.* 2003). Une telle structure n'a été observée que chez les formes de vie inactive comme les spores en dormance et les cellules spermatides. Cet emballage serré et l'ordre conséquent qui caractérise l'ADN toroïdal rend cette structure rigide, dans laquelle la continuité de l'ADN est maintenue même lorsqu'il contient de nombreuses cassures. Dans cette matrice, les extrémités d'ADN libres, générées par la dessiccation ou l'irradiation, sont fermement maintenues grâce à la diffusion réduite des fragments d'ADN.

La bactérie peut ensuite pratiquer la recombinaison interchromosomiale. Il est estimé que plus de 700 crossovers* sont formés par les nucléoïdes de quatre chromosomes quand les cellules sont irradiées à la dose D₃₇ (Daly et Minton, 1995). La structure en anneau des chromosomes facilite ce processus grâce à la rigidité de l'édifice (Levin-Zaidman *et al.* 2003).

5. Réduction des métaux et de l'uranium :

La remarquable capacité à résister à de hautes doses de radiation, à de longues périodes de dessiccation, et à la mitomycine C a fait de *D. radiodurans* R1 un très

bon candidat pour des manipulations génétiques dans le but de dégrader des polluants organiques, qui sont eux-mêmes des agents endommageant l'ADN. Une souche de *D. radiodurans* R1 qui exprime une activité toluène dioxygénase a été créée (Lange *et al.* 1998). La souche résultante est capable d'oxyder le toluène, le chlorobenzène, le 3,4-dichloro-1-butène et l'indole. Elle est capable de pratiquer cette oxydation en présence de radiations (60Gy/h). Une souche possédant le gène de la mercure réductase (*merA*) a également été obtenue (Brim *et al.* 2000).

La souche sauvage couple efficacement l'oxydation du lactate en CO₂ avec la réduction du Fe(III) couplé à l'acide nitrilotriacétique (Fe(III)-NTA) en Fe(II) en absence de dioxygène. La bactérie est en revanche incapable de réduire le citrate de fer et le pyrophosphate de fer (Fredrickson *et al.* 2000).

L'acide 9,10-anthraquinone-2,6-disulfonique (AQDS) est un composé modèle d'acide humique qui peut être utilisé comme accepteur d'électrons pour la respiration et la croissance de bactéries réduisant les métaux comme *Geobacter* spp. et *Shewanella* spp. *D. radiodurans* R1 est également capable de réduire l'AQDS en AH₂DS avant ou sans lactate (avec plus de réduction en présence de lactate). La bactérie peut réduire les oxydes de Fe(III) en présence d'AQDS qui fonctionne comme un tunnel d'électron mais elle en est incapable en l'absence d'acide humique (Fredrickson *et al.* 2000).

En présence de 0,1mM d'AQDS, *D. radiodurans* R1 réduit efficacement 95 à 100% de l'uranium en 21 jours. La bactérie est en revanche incapable de réduire directement l'uranium en absence d'AQDS avec le lactate comme source d'électron (au contraire de CrO₄²⁻) (Fredrickson *et al.* 2000). La spéciation de l'uranium était un mélange d'espèces carbonatées (UO₂(CO₃)₃⁴⁻ et UO₂(CO₃)₂²⁻).

Nous avons vu que *D. radiodurans* R1 était capable de résister à d'importants doses de radiations ionisantes à de fortes concentration en agents endommageant l'ADN grâce à une machinerie de réparation de l'ADN particulière. Elle serait également capable de réduire l'uranium dans certaines conditions. Elle est donc potentiellement utilisable pour la biorémediation du radionucléide dans l'environnement.

III. MODELE D'ETUDE PHOTOTROPHE ET RESISTANT AUX COMPOSES AROMATIQUES : *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS*

1. Description générale :

Rhodopseudomonas palustris est une bactérie pourpre non sulfureuse qui appartient aux α -protéobactéries*. On la retrouve de façon ubiquitaire dans les sols et les eaux comme l'indique sa découverte dans des lisiers de porcs, dans les déjections de vers de terre, dans les sédiments marins côtiers et les eaux usées.

La figure 23 présente une observation de *R. palustris* en microscopie électronique en transmission en condition classique de culture en anaérobiose.

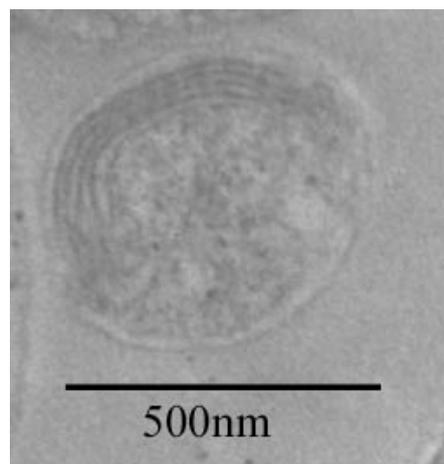


Figure 23 : Observation de *R. palustris* en milieu classique en anaérobiose par microscopie électronique en transmission (ce travail).

R. palustris est l'une des bactéries possédant le métabolisme le plus polyvalent du monde microbien (Lang et Oesterhelt, 1989). Elle est capable de croître suivant les quatre modes de métabolisme du vivant :

→ La photoautotrophie (ou photosynthétisme) : L'énergie provient de la lumière et le carbone du dioxyde de carbone.

→ La photohétérotrophie : L'énergie provient de la lumière et le carbone d'un composé organique.

→ La chimioautotrophie : L'énergie provient d'un composé inorganique et le carbone du dioxyde de carbone.

→ La chimiohétérotrophie : L'énergie et le carbone proviennent de composés organiques.

La bactérie peut utiliser le dioxyde de carbone et convertir le diazote en ammoniacque ainsi que produire du dihydrogène. La bactérie est aéro-anaérobie facultative.

En absence d'oxygène, *R. palustris* produit son énergie à partir de la lumière par photosynthèse et utilise le dioxyde de carbone comme source de carbone pour sa croissance. Elle est également capable de dégrader certains composés organiques tels que des composés toxiques organiques ou la lignine*.

En aérobie, la bactérie utilise une grande variété de composés organiques comme les sucres ou le méthanol comme source d'énergie et source de carbone mais elle peut également utiliser des donneurs inorganiques comme le thiosulfate.

La figure 24 synthétise les différents types trophiques utilisée par la bactérie.

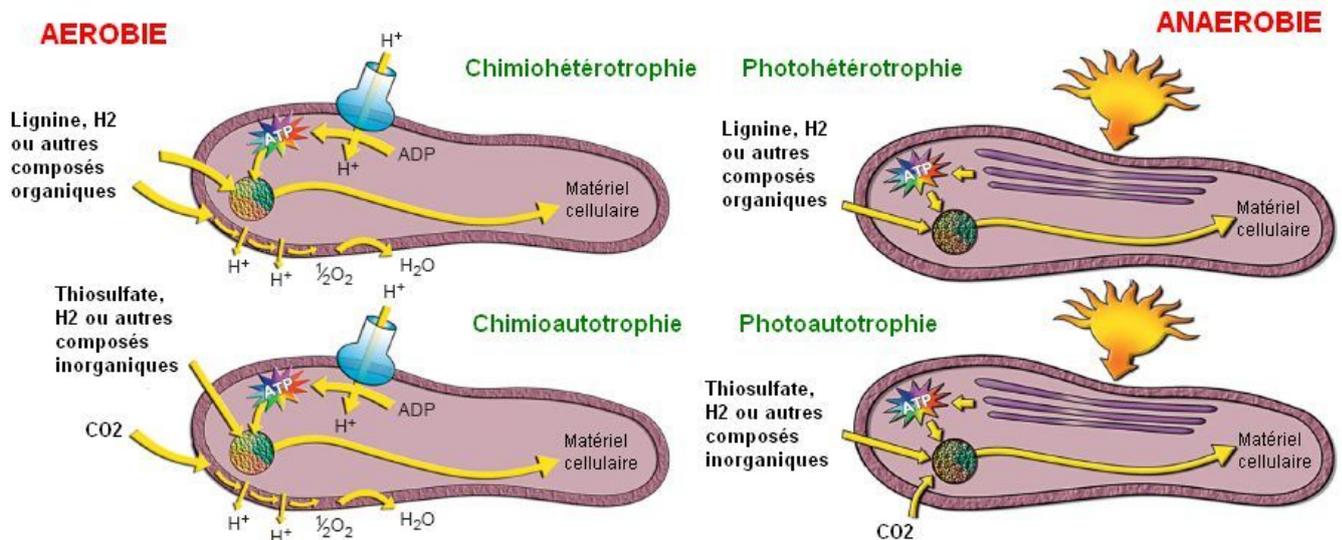


Figure 24 : Vue globale du métabolisme de *R. palustris*. (D'après Larimer *et al.* 2004).

R. palustris se multiplie grâce à une division cellulaire par bourgeonnement. Il en résulte un développement asymétrique en deux cellules filles différentes, l'une mobile et l'autre immobile.

En anaérobie et en présence de lumière, la bactérie entame un processus de différenciation d'un système intracytoplasmique de membranes vésiculaires. Ces membranes forment un thylakoïde et hébergent les pigments photosynthétiques et les protéines associées capables de réaliser la photosynthèse.

Les manipulations génétiques de *R. palustris* sont aisées ce qui permet d'obtenir une réponse rapide sur le génome de la bactérie.

2. Génome et mécanismes de résistance aux toxiques :

Le génome de *R. palustris* comprend un chromosome circulaire de 5,46Mb et un plasmide circulaire de 8,4kb (<http://genome.ornl.gov/microbial/rpal/>)

La bactérie possède plusieurs gènes associés au métabolisme énergétique, reflétant sa polyvalence. Elle dispose de gènes permettant l'oxydation du dihydrogène, du thiosulfate et du monoxyde de carbone comme source d'énergie. Deux complexes de NADH* déshydrogénase sont codés et permettent de cataboliser une grande variété de composés organiques incluant les acides gras, les acides carboxyliques et les monomères de lignine. Des gènes permettant l'utilisation des nitrites et des acides nitrique et nitreux en condition anaérobie sont également présents, ainsi que ceux impliqués dans la photosynthèse (Larimer *et al.* 2004).

L'énergie provenant de la photosynthèse est produite par photophosphorylation grâce à la bactériochlorophylle* et des caroténoïdes*. Des analyses de séquences d'ARNr montrent que *R. palustris* est apparentée à des espèces symbiotique de plante comme *B. japonicum* (van Berkum *et al.* 2003). Cependant, la bactérie n'a jamais été trouvée en association avec les végétaux et aucun gène de nodulation n'a été détecté dans son génome. Comme toutes les autres bactéries pourpres, *R. palustris* est capable d'augmenter le nombre de ses photosystèmes en cas de diminution de l'intensité lumineuse.

Le génome de *R. palustris* code pour deux formes actives de ribulose 1,5 biphosphate carboxylase ou RubisCO, enzyme clé de la voie de fixation du dioxyde de carbone permettant la photosynthèse. Il code également pour trois nitrogénases, permettant de fixer N₂ comme source d'azote pour son métabolisme (Larimer *et al.* 2004).

La bactérie est capable d'utiliser les composés inorganiques comme le thiosulfate et le dihydrogène comme source d'énergie en les oxydant en aérobie et comme réducteur du CO₂ et du N₂ en anaérobie. Pour cela, *R. palustris* code pour de nombreuses hydrogénases et déshydrogénases. Ainsi, la bactérie possède des réserves adaptées à ces différentes conditions de culture (Larimer *et al.* 2003).

R. palustris utilise parfaitement le cycle des acides tricarboxyliques, la voie d'Embden-Meyerhof (glycolyse) et la voie des pentoses phosphates pour sa dégradation des molécules carbonées. Elle est également capable de synthétiser du glycogène comme réserve de carbone. Cependant, sa croissance est limitée en présence de sucres, comme le glucose ou le fructose, car les transporteurs classiques de ces molécules sont absents du génome. La voie d'Entner-Doudoroff, troisième voie de dégradation du glucose en pyruvate, est également non fonctionnelle (Larimer *et al.* 2003).

Il est à noter que la bactérie possède près d'une centaine de systèmes de transport comprenant des ATPases de type P. Nous avons déjà vu que ces transporteurs sont impliqués dans les résistances aux métaux lourds. Elle code également pour plusieurs systèmes d'efflux secondaires connus pour être des pompes à efflux de métaux et de molécules toxiques (Nies, 2003). La présence de ces nombreux transporteurs explique la capacité de *R. palustris* à résister aux antibiotiques mais également à des environnements pollués. A notre connaissance, aucune étude sur la résistance de la bactérie aux métaux lourds n'a été réalisée à ce jour.

3. Biodégradation de composés organiques :

R. palustris survit dans des environnements qui sont souvent pollués par des déchets organiques et exposés à la lumière. Elle est capable d'utiliser ces déchets, comme les résidus de lignine, les acides gras et les composés aromatiques, pour sa croissance (Sasikala et Ramana, 1998).

R. palustris est de plus capable de dépolluer les molécules de benzoate et d'acides gras chlorés (McGrath et Harfoot, 1997 ; Eglund *et al.* 2001). Elle a donc été étudiée pour sa capacité à dégrader ces molécules aromatiques.

Cette dégradation des cycles benzyles a lieu en condition aérobie et anaérobie. En présence d'oxygène, le cycle aromatique est hydroxylé par des oxygénases alors qu'en condition anaérobie, le processus fait intervenir un coenzyme A et des réductases jusqu'à la dégradation de la molécule en acétyl-CoA (Harwood et Gibson, 1986 ; Harwood et Gibson, 1988 ; Geissler *et al.*, 1988). Les protéines régulatrices de cette voie sont proches de celles impliquées dans la résistance aux antibiotiques (Eglund et Harwood, 1999).

R. palustris est donc un candidat potentiel pour la biorémediation du fait de sa résistance aux toxiques mais également grâce à la polyvalence de son génome qui peut s'adapter à des environnements et des conditions extrêmement variés. Sa capacité à accumuler et/ou transformer différentes formes chimiques d'uranium sera ainsi étudiée dans ce travail.

||

||

Chapitre 2 :

Matériels

et

Méthodes

PARTIE A : TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

I. SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEUX DE CULTURE

1. Origine des souches bactériennes

Nos modèles d'étude proviennent de trois sources différentes :

Cupriavidus metallidurans CH34 a été fourni par le Professeur Max Mergey du Centre d'Énergie Nucléaire de Mol en Belgique.

La souche R1 (ATCC 13939) de *Deinococcus radiodurans* provient de la collection bactériologique d'ATTC (LGC Promochem, Molsheim, France).

Rhodopseudomonas palustris a été fourni par le Laboratoire des Interactions Protéine Métal du CEA Cadarache.

2. Milieux utilisés pour l'étude de *Cupriavidus metallidurans* CH34

Le milieu de culture classique de *C. metallidurans* CH34 en condition aérobie est le Tris Salt Medium (TSM, Mergey *et al.* 1985). Le pH est ajusté à 7,5 avant stérilisation par autoclavage. Le milieu est ensuite complété avec une solution d'oligo-élément SL7 (Biebl et Pfenning, 1981) et du citrate de Fer(III) stérilisés par filtration sur membrane (0,22µm, Millipore). La source de carbone utilisée est l'acide gluconique à une concentration finale de 0,2% ou 1% selon les expérimentations. Les cultures solides sont réalisées avec le même milieu dans lequel 20% d'agar est ajouté.

Ce milieu a été modifié pour étudier les effets de différentes spéciations d'uranium (voir Partie A du Chapitre Résultats). Le Tris a été remplacé par du citrate à la même concentration. Ce milieu est appelé Citrate Salt Medium (CSM). La concentration en

phosphates a été diminuée dans le milieu dit TSM15% et 40mM de carbonates ont été ajoutés.

La préparation des milieux est présentée en Annexe B. Le tableau 7 donne la composition du milieu TSM, CSM et TSM15%.

Tableau 7 : Composition des milieux de culture de *C. metallidurans* CH34. Les X indiquent une absence de l'élément correspondant dans le milieu.

<i>Condition</i>	Aérobie			Anaérobie
	TSM	CSM	TSM15%	Anaérobie
Na⁺	98mM	248mM	95mM	50mM
NH₄⁺	21mM	21mM	21mM	13mM
Mg²⁺	2,2mM	2,2mM	2,2mM	830µM
Ca²⁺	270µM	270µM	270µM	90µM
Fe²⁺	X	X	X	66µM
K⁺	X	X	X	1mM
Cl⁻	156mM	106mM	156mM	192µM
SO₄²⁻	3mM	3mM	3mM	896µM
NO₃⁻	X	X	X	12mM
HPO₄²⁻	1,3mM	1,3mM	200µM	1mM
HCO₃⁻	X	X	40mM	40mM (facultatif)
Tris	50mM	X	50mM	50mM
Lactate	X	X	X	1,23g.L ⁻¹ = 11mM
Citrate	18µM	50mM	18µM	10mM (facultatif)
Gluconate	10g.L ⁻¹ = 46mM 2g.L ⁻¹ = 9mM	2g.L ⁻¹ = 9mM	2g.L ⁻¹ = 9mM	2g.L ⁻¹ = 9mM
Fe³⁺	18 µM	18 µM	18µM	X
Zn²⁺	500nM	500nM	500nM	500nM
Mn²⁺	500nM	500nM	500nM	500nM
Co²⁺	800nM	800nM	800nM	800nM
Cu²⁺	100nM	100nM	100nM	100nM
Ni²⁺	100nM	100nM	100nM	100nM
HBO₃⁻	1µM	1µM	1µM	1µM
MoO₄²⁻	150nM	150nM	150nM	150nM
pH	7,5	7,5	7,5	7

Les cultures en condition anaérobie de *C. metallidurans* CH34 sont réalisées dans un milieu synthétique contenant du nitrate comme accepteur final d'électron. Le gluconate à 0,2% reste la source de carbone. Le milieu est tamponné par du Tris. Du citrate et des carbonates sont également ajoutés comme source de carbone additionnel et comme complexant de l'uranium (voir chapitre Résultats). Les oligoéléments sont toujours apportés par la solution de SL7. La préparation du milieu est présentée en annexe B. Le tableau 7 donne la composition détaillée de ce milieu.

3. Milieux utilisés pour l'étude de *Deinococcus radiodurans*

R1

Les cultures liquides sont réalisées classiquement en milieu TYG (Tryptone Yeast Glucose). Ce milieu empirique* contient 1% de glucose comme source de carbone, 5% de tryptones comme des sources d'azote et d'acides aminés et 3% d'extraits de levure comme facteurs de croissance. Le pH du milieu est ajusté à 7 avant stérilisation par autoclavage.

Un milieu semi-synthétique a été créé pour l'étude des effets de l'uranium de manière à obtenir différentes spéciations et à éviter la précipitation du radionucléide. Il contient une base minérale et des oligoéléments apportés par la solution de SL7. La source de carbone reste le glucose à 2%, l'azote et les acides aminés sont apportés par 5% de peptones. Les extraits de levure sont absents mais de l'acide nicotinique à 2‰ est ajouté au milieu comme précurseur de NAD⁺. Le milieu peut être additionné de carbonate ou du citrate pour complexer l'uranium.

Les cultures en milieu solide sont réalisées dans le milieu TYG dans lequel est ajouté 15% d'agar avant autoclavage.

La préparation des ces milieux est présentée en annexe B. Le tableau 8 donne la composition détaillée de ces milieux.

Tableau 8 : Composition des milieux de culture de *D. radiodurans* R1 en aérobie. Les X indiquent une absence de l'élément correspondant dans le milieu. Les ? indiquent une concentration inconnue de l'élément considéré dans le milieu.

	Milieu TYG	Milieu Synthétique
Na ⁺	?	32mM
NH ₄ ⁺	?	194μM
Mg ²⁺	?	430μM
Ca ²⁺	?	135μM
Fe ²⁺	?	66μM
Cl ⁻	?	1,4mM
SO ₄ ²⁻	?	66μM
HPO ₄ ²⁻	?	1mM
Tris	X	50mM
Glucose	1 g.L ⁻¹ = 5,5mM	2g.L ⁻¹ = 11mM
Acide Nicotinique	?	2mg.L ⁻¹ = 16μM
Peptones	X	0,5g.L ⁻¹
Tryptones	5g.L ⁻¹	X
Extraits de levure	3g.L ⁻¹	X
HCO ₃ ⁻ (facultatif)	?	40mM
Citrate (facultatif)	?	9mM
Zn ²⁺	?	500nM
Mn ²⁺	?	500nM
Co ²⁺	?	800nM
Cu ²⁺	?	100nM
Ni ²⁺	?	100nM
HBO ₃ ⁻	?	1μM
MoO ₄ ²⁻	?	150nM
pH	7	7

4. Milieux utilisés pour l'étude de *Rhodopseudomonas palustris*

Les cultures liquides sont réalisées classiquement en milieu Hutner. Ce milieu contient de nombreuses sources de carbone que sont le malate, l'acétate ou l'acide *p*-aminobenzoïque. Le pouvoir tampon est assuré par une concentration élevée de phosphates. Cette souche ne croit qu'en présence de nombreux facteurs de

croissance tels que des extraits de levure mais également des précurseurs vitaminiques comme la biotine et la thiamine. La solubilisation et la stabilité des différents métaux est assurée par la présence d'EDTA et d'acide nitriloacétique. Un milieu Hutner modifié a été créé pour l'étude des effets de l'uranium. Dans ce milieu, la concentration en phosphates a été réduite à 1mM. Le tableau 9 présente la composition détaillée de ces milieux. La préparation de ceux-ci est donnée en annexe B.

Tableau 9 : Composition des milieux de culture de *R. palustris*. Le terme Y correspond à la quantité inconnue de l'élément apporté par les extraits de levure. Les ? indiquent une concentration inconnue de l'élément considéré dans le milieu.

	Milieu Hutner	Milieu Hutner modifié
Na ⁺	12mM + Y	12mM + Y
NH ₄ ⁺	10mM + Y	10mM + Y
Mg ²⁺	2,3mM + Y	2,3mM + Y
Ca ²⁺	450µM + Y	450µM + Y
K ⁺	38mM + Y	38mM + Y
Fe ²⁺	25µM + Y	25µM + Y
Cl ⁻	1mM + Y	1mM + Y
HCO ₃ ⁻	12µM + Y	12µM + Y
SO ₄ ²⁻	2,3mM + Y	2,3mM + Y
HPO ₄ ²⁻	20mM + Y	1mM + Y
Malate	20mM	20mM
Glutamate	8mM	8mM
Acide Nicotinique	16µM	16µM
Acide Nitriloacétique	1mM	1mM
Extraits de levures	1g.L ⁻¹	1g.L ⁻¹
EDTA	7µM	7µM
Acide <i>p</i> -aminobenzoïque	15µM	15µM
Thiamine	3µM	3µM
Biotine	164nM	164nM
Acétate	12mM	12mM
Oligoéléments	?	?
pH	7	7

II. SUIVIS DE LA CROISSANCE DES BACTERIES

Pour les études en aérobie (*C. metallidurans* CH34 et *D. radiodurans* R1), L'oxygénation de la culture est assurée par une agitation de 250rpm à 30°C (Infors, Novotron) avec un volume de culture correspondant à un 1/5^e du volume du flacon de culture. La croissance des cultures est suivie par lecture de la densité optique à la longueur d'onde de 600nm (DO₆₀₀) à l'aide d'un spectromètre (Bioware, Biochrom ou Spectramax M2, Molecular Devices). Le pH peut être contrôlé grâce à du papier indicateur d'une gamme de 6,4 à 8,0 (Merck). L'ajout de NaOH ou de HCl permet d'ajuster le pH aux alentours de 7,5 pour *C. metallidurans* CH34 ou 7 pour *D. radiodurans* R1.

Les précultures pour les études de *C. metallidurans* CH34 en aérobie sont réalisées en milieu TSM comprenant 1% de glucose et celles de *D. radiodurans* R1 en milieu TYG pour obtenir une quantité de biomasse suffisante à l'ensemencement des milieux d'étude. La souche de *C. metallidurans* CH34 est régulièrement contrôlée par un ensemencement sur milieu solide TSM Agar supplémenté de Cd²⁺ à 800µM et de Zn²⁺ à 2mM. Ces concentrations élevées en métaux lourds permettent de sélectionner et d'identifier la souche de *Cupriavidus metallidurans* CH34.

Pour les études en anaérobie (*C. metallidurans* CH34 et *R. palustris*), les cultures s'effectuent en flacons de 40mL fermés hermétiquement par un bouchon et un joint septum. Le milieu anaérobie est dégazé dans ces flacons par bullage d'azote de 30min à 1h avant ensemencement. La croissance de *C. metallidurans* CH34 s'effectue à 30°C sans agitation et celle de *R. palustris* s'effectue à température ambiante sous deux lampes incandescentes 100W sans agitation. Le suivi de la croissance est mesuré par lecture de la DO₆₀₀. L'ensemencement et le prélèvement de la culture s'effectuent grâce à des aiguilles hypodermiques stériles de 7,6cm de longueur (22G x 3", Air Tite)

Les précultures pour les études de *C. metallidurans* CH34 en anaérobie sont réalisées en milieu TSM comprenant 1% de gluconate et celles de *R. palustris* en milieu Hutner pour obtenir une quantité de biomasse suffisante à l'ensemencement des milieux d'étude.

III. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est couramment utilisée pour déterminer la sensibilité d'une souche aux antibiotiques. L'application de cette technique pour d'autres toxiques, comme l'uranium, permet de déterminer le seuil de résistance des bactéries à ces molécules.

La CMI d'un toxique est définie comme la concentration la plus faible de cette molécule capable d'empêcher le développement visible de la bactérie dans des conditions standardisées. La CMI est différente de la Concentration Minimale Bactéricide* (CMB) qui est la concentration la plus faible d'un élément capable de tuer le microorganisme à 99,99%.

Dans ce travail, la CMI sera déterminée en milieu liquide contenant des concentrations croissantes en uranium dans les milieux décrits précédemment. La lecture de la croissance par la mesure de DO_{600} permet de quantifier le seuil de résistance des bactéries à l'uranium. La CMI correspond alors à la plus faible concentration du radionucléide pour laquelle la croissance est nulle. Cette absence de développement se traduit par une vitesse de croissance nulle, c'est-à-dire que la DO_{600} est stable et égale ou inférieure à la valeur initiale de début d'ensemencement.

IV. EXPOSITION DES BACTERIES A L'URANIUM

Les cultures utilisées pour les expériences de résistance, d'accumulation, d'observation microscopique et de spectroscopie d'absorption X sont ensemencées à partir de précultures en phase exponentielle de croissance.

L'uranium utilisé dans l'ensemble de ces travaux est préparé en solution aqueuse concentrée (environ 30mM en moyenne) à partir de cristaux d'acétate d'uranyle. Il est ensuite stérilisé par filtration sur membrane stérile de 0,22 μm (Millipore) et conservé à 4°C.

1. Cultures pour l'étude de la résistance à l'uranium

Les milieux de culture peuvent être additionnés de citrate ou de bicarbonate selon la forme chimique de l'uranium étudiée. Celui-ci est ajouté stérilement dans le milieu de culture avant ensemencement et avant la mise en place de l'anaérobie pour les cultures dans ces conditions.

Une culture témoin dans les mêmes conditions de croissance (milieu, température, pH, oxygénation) est systématiquement réalisée sans uranium pour comparer les développements de la bactérie et déterminer l'effet réel de l'uranium sur la bactérie. La croissance bactérienne est suivie par la lecture de la DO_{600} et des repiquages sur milieu riche solide peuvent être réalisés pour apprécier la revivification des cellules.

La DO_{600} de départ est de 0,2 et elle est suivie pendant des temps variables selon les souches et les conditions : 24h pour *C. metallidurans* CH34 et *D. radiodurans* R1 en aérobie, 120h pour *C. metallidurans* CH34 et *R. palustris* en anaérobie.

2. Cultures pour l'étude de l'accumulation de l'uranium, pour l'imagerie et la spectroscopie d'absorption des rayons X

Les cultures sont réalisées de la même manière que précédemment. L'uranium est ajouté dans le milieu de culture avant ensemencement. Un témoin sans uranium est mis en place pour vérifier la croissance de la souche. Pour les expériences d'accumulation en parallèle de la croissance, la DO_{600} initiale est 0,2. La lecture de la croissance s'effectue par la mesure de cette DO_{600} de 24h à 200h selon les conditions de croissance. Pour les expériences d'accumulation en présence d'une forte densité de cellules, la DO_{600} initiale est de 2 pour *C. metallidurans* CH34 et *D. radiodurans* R1 et de 3 pour *R. palustris*. Dans ces conditions, seule l'accumulation est étudiée.

La quantification de l'accumulation de l'uranium par les bactéries est déterminée par deux mesures complémentaires effectuées en parallèle : le dosage de l'uranium non

consommé par les cellules dans le milieu de culture et le dosage de l'uranium accumulé dans les bactéries. Pour se faire, des prélèvements de cultures sont effectués à des temps définis. Une centrifugation à 6000rpm pendant 10min permet de séparer le culot bactérien et le surnageant de culture, débarrassé des cellules. Ce surnageant est acidifié pour éviter une précipitation de l'uranium et ensuite congelé à -20°C en attendant le dosage de l'uranium par spectrophotométrie. Le culot bactérien est lavé à l'eau ultrapure deux fois et centrifugé à 6000rpm pendant 10min. Il est conservé à -20°C en attendant la lyse des cellules pour le dosage de l'uranium par ICP-MS. La suite des traitements de ces échantillons est présentée dans la partie B de ce chapitre.

La précipitation de l'uranium dans les milieux de culture est suivie grâce à un témoin sans bactérie. Les milieux sont préparés de façon identique, avec l'uranium, mais ils ne sont pasensemencés par les microorganismes. Ils sont ensuite incubés dans les mêmes conditions et l'uranium est dosé dans le surnageant et le culot après centrifugation aux mêmes temps de culture. Les deux fractions sont étudiées de façons identiques que les échantillons en présence de microorganismes. La part d'uranium précipité "naturellement" par le milieu et non par la bactérie peut être ainsi déterminée.

Les cultures pour les observations par microscopie électronique en transmission et pour l'étude de la spéciation de l'uranium sont réalisées de la même manière que précédemment. Les surnageants pour la spectroscopie d'absorption des rayons X sont conservés à -20°C mais ne sont pas acidifiés. La préparation des culots bactériens est présentée dans la partie D de ce chapitre et les traitements utilisés pour les observations sont présentés dans la partie C.

PARTIE B : TECHNIQUES ANALYTIQUES DE BIOCHIMIE ET DE CHIMIE

I. DOSAGE DE L'URANIUM PAR ICP-MS

L'uranium total contenu dans les milieux de culture et accumulé par les bactéries est dosé par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS) selon la méthode de dosage standard réalisé en calibration externe avec un étalon interne. L'ICP-MS est une technique permettant l'analyse simultanée des éléments traces et "ultra-traces", c'est-à-dire des éléments dont la teneur est inférieure à 10^{-6} g/g (ppm). Elle permet également la détermination des rapports isotopiques dans les roches, les sols et les systèmes biologiques.

Les analyses sont effectuées avec l'appareil Thermoelectron X7 (Thermo Electron Corporation) du Laboratoire Pierre Süe. Il est équipé d'un passeur automatique d'échantillon (type AS 90) et d'un détecteur quadripolaire. La figure 25 présente le schéma global de fonctionnement de l'ICP-MS utilisé au laboratoire. Les limites de détection sont très basses (de l'ordre de 0,01 à 0,1 ppb) mais varient selon les éléments en fonction du potentiel d'ionisation et de la matrice étudiée. Dans le cas de l'uranium, la limite de détection de l'appareil est de 1 ppb. L'incertitude moyenne est inférieure à 3% de la valeur calculée.

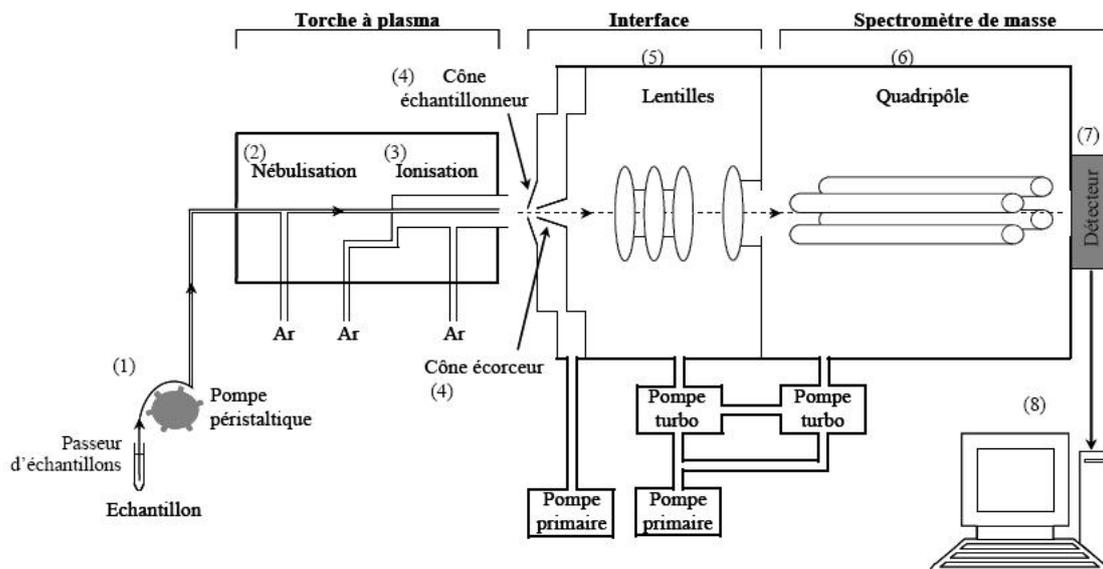


Figure 25 : Schéma de fonctionnement de l'ICP-MS. Les chiffres entre parenthèse renvoient au texte qui suit.

Le principe de l'analyse par ICP-MS est le suivant :

→ Nébulisation : Le passeur automatique d'échantillon couplé à une pompe péristaltique (1) introduit la solution dans la chambre de vaporisation où le nébuliseur la pulvérise en un aérosol de fine gouttelettes à l'aide d'argon gazeux (2). La chambre de nébulisation à impact, qui suit le nébuliseur, est refroidie par effet Peltier à environ 5°C et permet d'effectuer le tri des gouttelettes les plus fines.

→ Ionisation : L'aérosol ainsi formé est envoyé dans la torche à plasma d'argon (15 L.min⁻¹) à très haute température (entre 6 000 et 10 000 °C). Cette température permet la vaporisation, la dissociation et l'ionisation de la plupart des éléments (3). Un système de vide différentiel accélère les ions du plasma à travers l'ouverture de deux cônes en nickel (échantillonneur et écorceur (4)) vers un ensemble de lentilles électrostatiques (5) qui extrait les ions chargés positivement et les transporte vers le filtre de masse quadripolaire.

→ Séparation en masse : La séparation des éléments est fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Le quadripôle (6) est composé de quatre barreaux cylindriques diamétralement appariés auxquels est appliquée une tension. Les deux paires ont des tensions continues opposées et des tensions alternatives de même amplitude mais de signe opposé. Dans le plan formé par la paire positive les ions légers sont trop déviés et heurtent les barres. Ils ne sont ainsi pas dosés. Dans le

plan de paire négative, ce sont les ions lourds qui sont écartés. En combinant ces deux filtres, seuls les ions ayant le rapport m/z désiré sont transmis au détecteur.

→ Détection : La partie détection s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes soumis à une tension négative de plusieurs milliers de volts (7). A la sortie du quadropôle, l'ion positif est attiré par cette tension négative et heurte la surface semi-conductrice de la première dynode. Ceci provoque l'émission d'un ou plusieurs électrons qui heurtent la surface de la deuxième dynode. Il y a ainsi un effet en chaîne multiplicateur. Le signal se traduit en nombre d'impulsion ou "nombre de coups". L'interface informatique Plasma Lab (Thermo Electron Corporation) assure le transfert des données pour leur traitement.

→ Traitement des données (8) : Pour un isotope donné, le nombre d'ions mesuré permet de calculer directement la concentration de l'élément analysé. Les nombres de coups sont convertis en concentrations grâce à l'utilisation de deux types de calibration. L'analyse d'une gamme étalon d'uranium (de 1 à 50 ppb) préparé de la même manière que les échantillons permet une calibration externe. La calibration interne est réalisée grâce à l'introduction dans l'échantillon de rhénium en quantité connue. Ceci permet de corriger la déviation instrumentale propre à l'appareil lors de chaque mesure. Le rhénium est utilisé car il est absent des échantillons. Cette correction est effectuée automatiquement par le programme. Des blancs analytiques composés d'eau ultrapure acidifiée à 2% sont systématiquement analysés au début de chaque procédure mais également régulièrement lors du passage des échantillons pour soustraire le bruit de fond.

En pratique, comme les concentrations dans les milieux de culture et les bactéries sont bien supérieures à celles de la gamme d'étalonnage de l'appareil (de 1 à 50 ppb), il est nécessaire de diluer les échantillons.

Les bactéries, une fois décongelées, sont lysées grâce à une solution de Cell Lytic® à température ambiante puis par du sodium dodécyl sulfate (SDS) à 60°C. La solution est acidifiée pour que l'uranium accumulé ou adsorbé par la cellule soit soluble. La dilution de l'échantillon est réalisée dans de l'eau acidifiée à 2% (vol/vol) par de l'acide nitrique ultrapur 65% (qualité Normaton) pour stabiliser la solution à doser tout en favorisant l'ionisation de l'échantillon. Les milieux, une fois décongelés,

sont acidifiés et dilués comme les échantillons bactériens pour que la concentration en uranium soit dans la gamme d'étalonnage. Les échantillons sont conservés à 4°C en attendant leur analyse. La figure 26 schématise le protocole de préparation des échantillons pour le dosage de l'uranium par ICP-MS

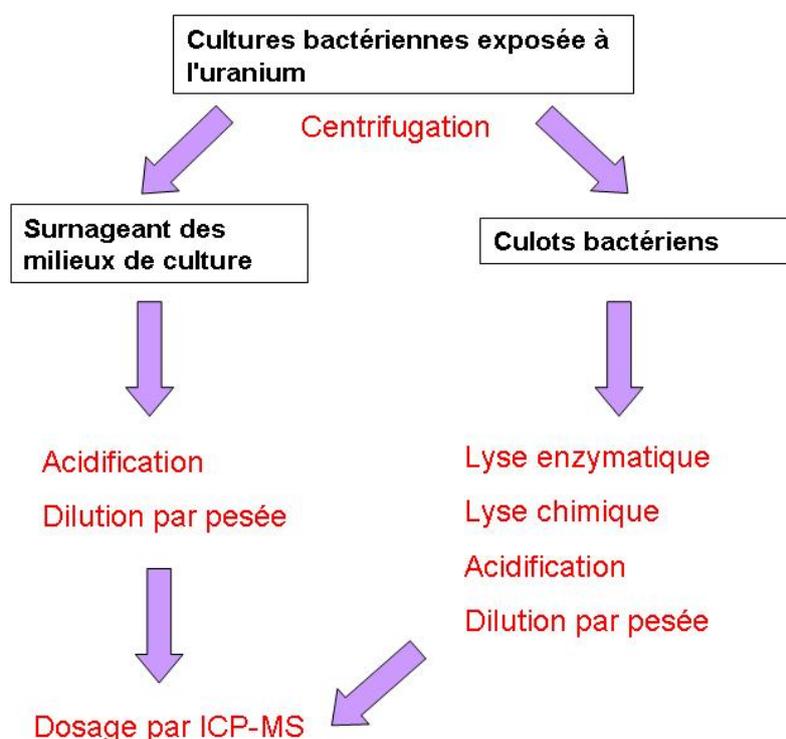


Figure 26 : Protocole schématisé de préparation des échantillons pour l'analyse par ICP-MS.

II. DOSAGE DE L'URANIUM PAR SPECTROPHOTOMETRIE

La détermination de la concentration en uranium dans les milieux de culture est également réalisée par une méthode de spectrophotométrie utilisant le 2-(2-Thiazolylazo)-p-Cresol (TAC) comme complexant en présence de surfactants (Teixeira *et al.* 1999). Afin de diminuer la quantité de réactif et d'augmenter le nombre d'échantillons mesurés, le protocole utilisé par Teixeira *et al.* a été miniaturisé pour être utilisé en plaque 96 puits. Cette méthode est utilisée car elle est

simple, rapide à mettre en œuvre et donne des résultats plus précis que l'ICP-MS à ces concentrations car il n'y a pas de fortes dilutions.

Le réactif TAC est un hétérocycle azo coloré déjà utilisé pour le dosage du vanadium, du titane, du plomb de l'indium et du nickel. La figure 27 présente sa formule semi-développée. En raison de propriétés communes à l'uranium et aux métaux lourds, le TAC est un réactif d'intérêt pour l'analyse de l'uranium en routine.

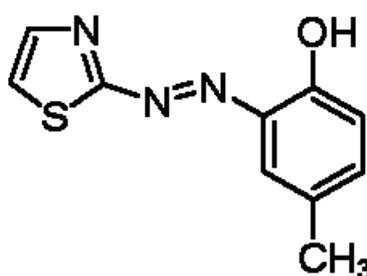


Figure 27 : Formule développée du TAC, complexant de l'uranium.

Les ions uranyles et le TAC forment un complexe bleu qui possède un maximum d'absorption à 588nm. La réaction de complexation est rapide et le composé formé est stable pendant au moins 3h.

En pratique, le réactif TAC est préparé à 0,04% dans de l'éthanol absolu. Une solution complexante constituée d'acide 1,2-cyclohexylenedinitrilo tétracétique (CyDTA, 50g.L⁻¹), de fluorure de sodium (5g.L⁻¹) et d'acide sulfosalicylique (130g.L⁻¹) est ajustée à pH 6,5 dans de l'eau ultrapure.

L'utilisation de surfactant crée des complexes ternaires qui peuvent augmenter le signal d'absorption et ainsi améliorer la sensibilité de la méthode. Ils permettent également la solubilisation de molécules insolubles qui apporteraient un biais dans le dosage par complexation de l'uranium ou par augmentation du signal d'absorbance. Les surfactants utilisés sont le Triton X-100 (0,15mol.L⁻¹) et le bromure de N-cetyl-N,N,N-triméthylammonium (CTAB, 0,05mol.L⁻¹). Un tampon triéthanolamine (TEA) (0,2mol.L⁻¹) est utilisé pour maintenir le pH autour de 6,5. En effet, l'absorbance est maximale et constante entre les pH 6 et 7. L'utilisation de CTAB permet une

augmentation du signal d'absorbance et améliore ainsi la sensibilité. Le triton permet la solubilisation de composés insolubles

Au final, le mélange réactionnel à ajouter aux échantillons est composé de 38% de solution tampon, 38% de solution complexante, 8% de CTAB, 8% de Triton et 8% de TAC.

La solution complexante masque la présence d'ions pouvant interférer dans la réaction et améliore la sélectivité. Il a été montré que les ions Al(II), Ba(II), Be(II), Ca(II), Cd(II), Co(II), Cr(VI), Cu(II), Fe(III), Hg(II), Mg(II), Mn(II), Mo(VI), Sn(IV), Sr(II), Th(IV), W(VI), Cl^- , Br^- , SO_4^{2-} , I^- , NO_3^- , F^- , les carbonates et l'acétate n'interféraient pas dans la réaction à une concentration dix fois supérieure à celle de l'uranium. Seuls les ions Ni(II), Cr(III), V(V) et Zr(IV) peuvent gêner le dosage (Teixeira *et al.* 1999). Ils ne sont cependant soit présents qu'en faibles concentrations dans les échantillons soit complètement absents car ils n'entrent pas dans la composition des milieux de culture.

Une gamme étalon d'uranium est préparée dans le milieu d'analyse adapté aux échantillons dosés. La droite d'étalonnage est constituée de douze points de 0 à 50 μM d'uranium. Les échantillons à doser sont dilués pour que la concentration finale en uranium entre dans la gamme étalon. La concentration initiale est déduite grâce à la droite d'étalonnage. Toutes les mesures sont répétées trois fois par souci statistique.

La figure 28 présente le protocole utilisé pour la préparation des échantillons pour le dosage de l'uranium par spectrophotométrie.

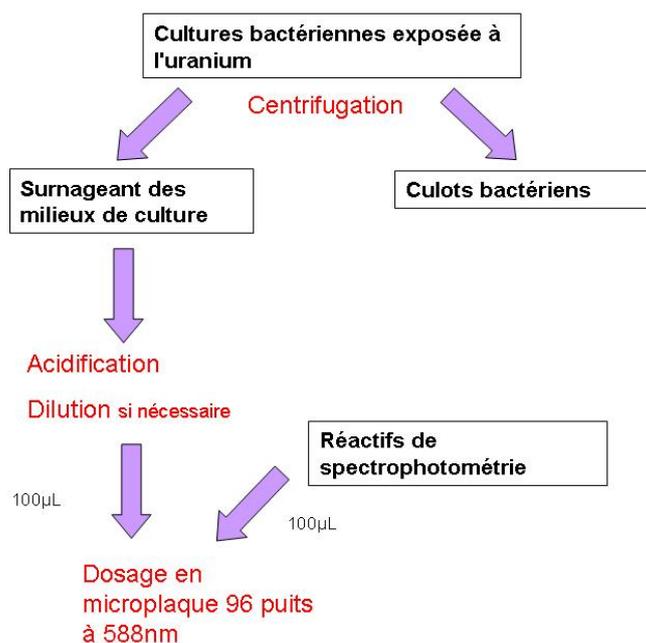


Figure 28 : Protocole schématique de préparation des échantillons pour le dosage de l'uranium par spectrophotométrie.

III. DOSAGE DES PHOSPHATES PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Afin de doser les phosphates, la méthode à l'acide ascorbique (Murphy et Riley, 1962) a été utilisée pour sa simplicité et sa rapidité à mettre en œuvre. Le molybdate d'ammonium $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$ et le tartrate antimonié de potassium $(\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2)$, figure 29a) réagissent en milieu acide avec les phosphates pour former un acide phosphomolybdique $(\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ou $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{Mo}_3)_{12}]\cdot 10\text{H}_2\text{O}$, figure 29c) qui après réduction par l'acide ascorbique $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$, figure 29b) est transformé en bleu de molybdène (formule non fixe, $\text{Mo}_2\text{O}_5 + x \text{Mo}_3$). L'acide phosphomolybdique peut être considéré comme une juxtaposition de 12 MoO_3 , d'un phosphate ammoniacé et d'une molécule d'eau. Les molécules de Mo_3 sont incolores et l'acide ascorbique les réduit peu à peu en Mo_2O_5 de couleur bleu. Le taux de formation et la stabilité du complexe coloré sont améliorés par le tartrate antimonié. L'intensité de la coloration, qui est proportionnelle à la concentration en phosphates, est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Seuls les ions arséniate et nitrite pourraient interférer dans la réaction mais ils sont absents des échantillons car ils n'entrent pas dans la composition du milieu de culture.

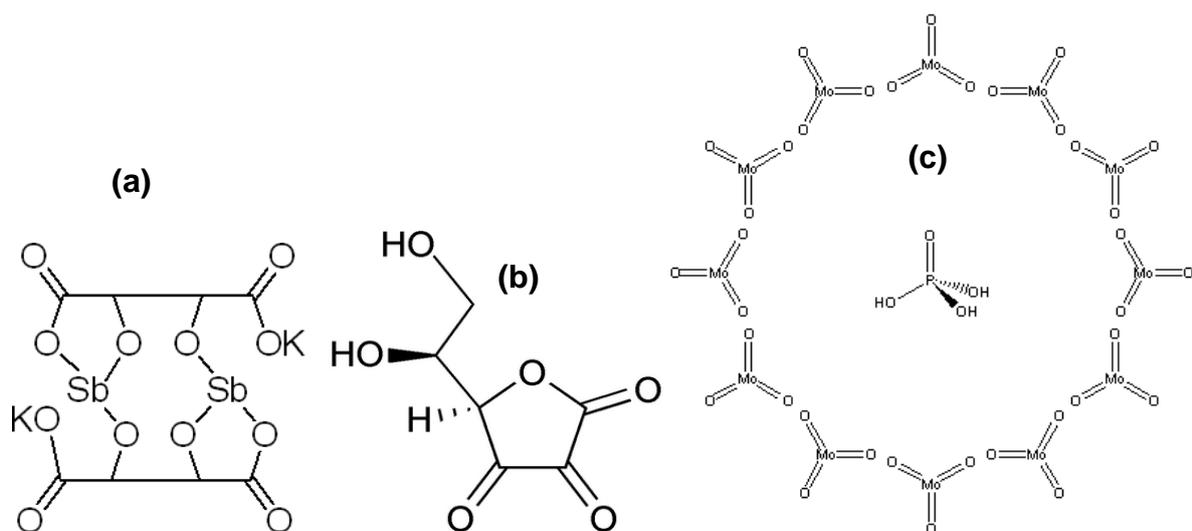


Figure 29 : Formule développée (a) du tartrate antimonié de potassium (b) de l'acide ascorbique (c) de l'acide phosphomolybdique (les contre-ions ne sont pas visibles).

Une gamme étalon de phosphate comprise entre 0 et 2mg.L^{-1} est préparée. Les échantillons sont acidifiés pour dissoudre et libérer les phosphates précipités et complexés, puis dilués afin que la concentration en phosphates entre dans la gamme étalon et déposés dans une plaque 96 puits. Après ajout du réactif et mise en incubation à température ambiante pendant 15min, la concentration initiale en uranium est alors déduite de la droite d'étalonnage.

La figure 30 présente le protocole utilisé pour la préparation des échantillons pour le dosage des phosphates par spectrophotométrie.

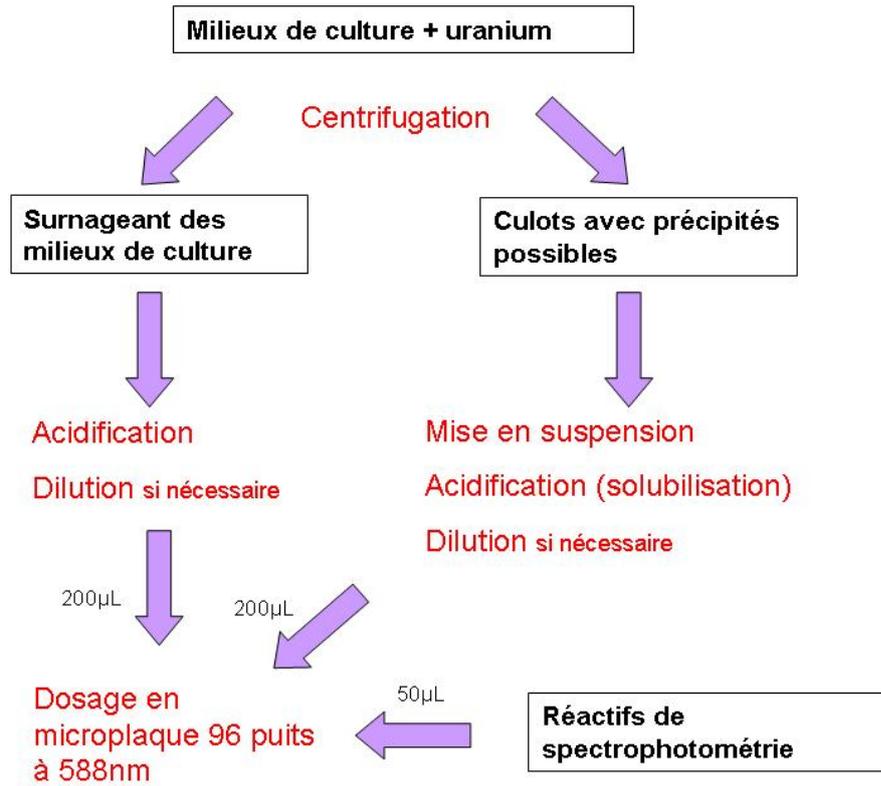


Figure 30 : Protocole schématique de préparation des échantillons pour le dosage des phosphates.

PARTIE C : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION

I. PRINCIPE :

L'imagerie par microscopie électronique est dans le prolongement de l'imagerie par microscopie optique. Là où un microscope optique possède une résolution de 400nm, un microscope électronique en transmission peut séparer deux objets distants de 0,2nm et peut même atteindre l'échelle atomique (imagerie haute résolution). La microscopie électronique a d'autre part la possibilité de combiner l'information obtenue dans l'espace réel en mode image avec l'information obtenue dans l'espace réciproque (ou de Fourier) en mode diffraction et ainsi permet de connaître l'agencement atomique dans une matrice. Ajoutée à cela, la nature de l'interaction électron-matière permet également de coupler les études structurales ou morphologiques à des études de composition chimique. Ainsi la microscopie électronique peut permettre d'obtenir des informations autres qu'une simple observation

L'interaction entre la matière et les électrons est forte du fait de la masse des électrons qui sont légers. Il existe de nombreuses réponses potentielles qui peuvent donner des informations sur l'objet étudié et qui découlent de l'interaction observée. La figure 31 présente les principales interactions étudiées en biologie.

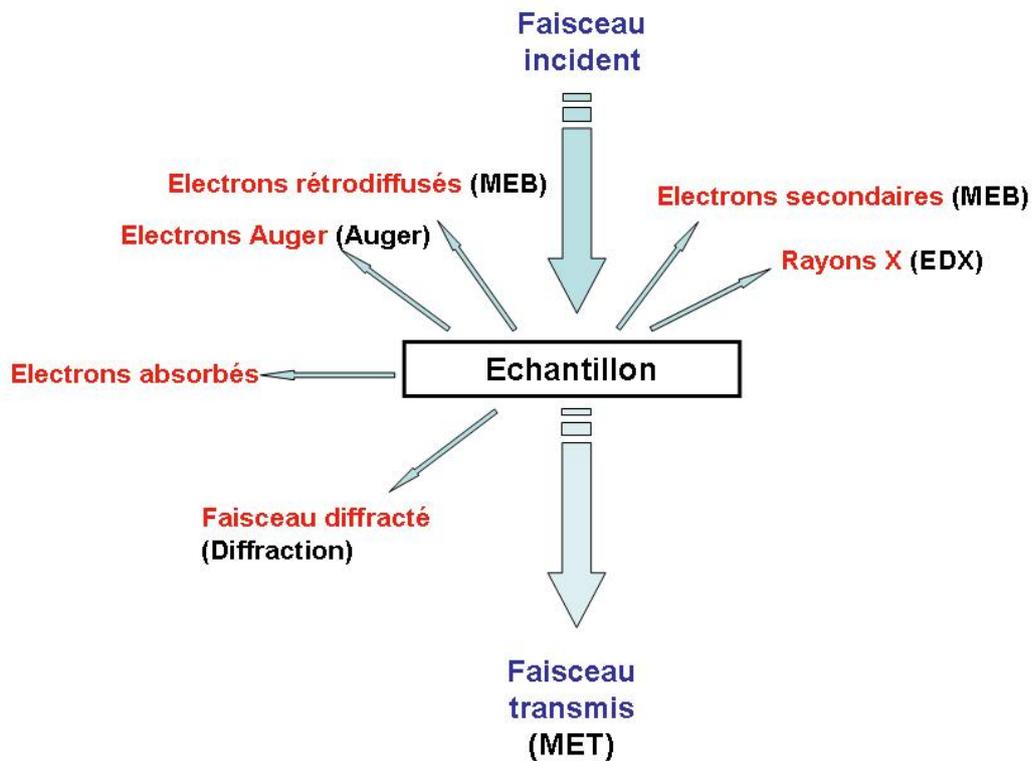


Figure 31 : Principales interactions entre la matière et les électrons utilisées en biologie.

Les figures 32 et 33 présentent le schéma d'un microscope électronique en transmission et le poste de travail au Centre Commun de Microscopie Electronique d'Orsay (CCME d'Orsay) où ont été réalisées les observations de nos échantillons.

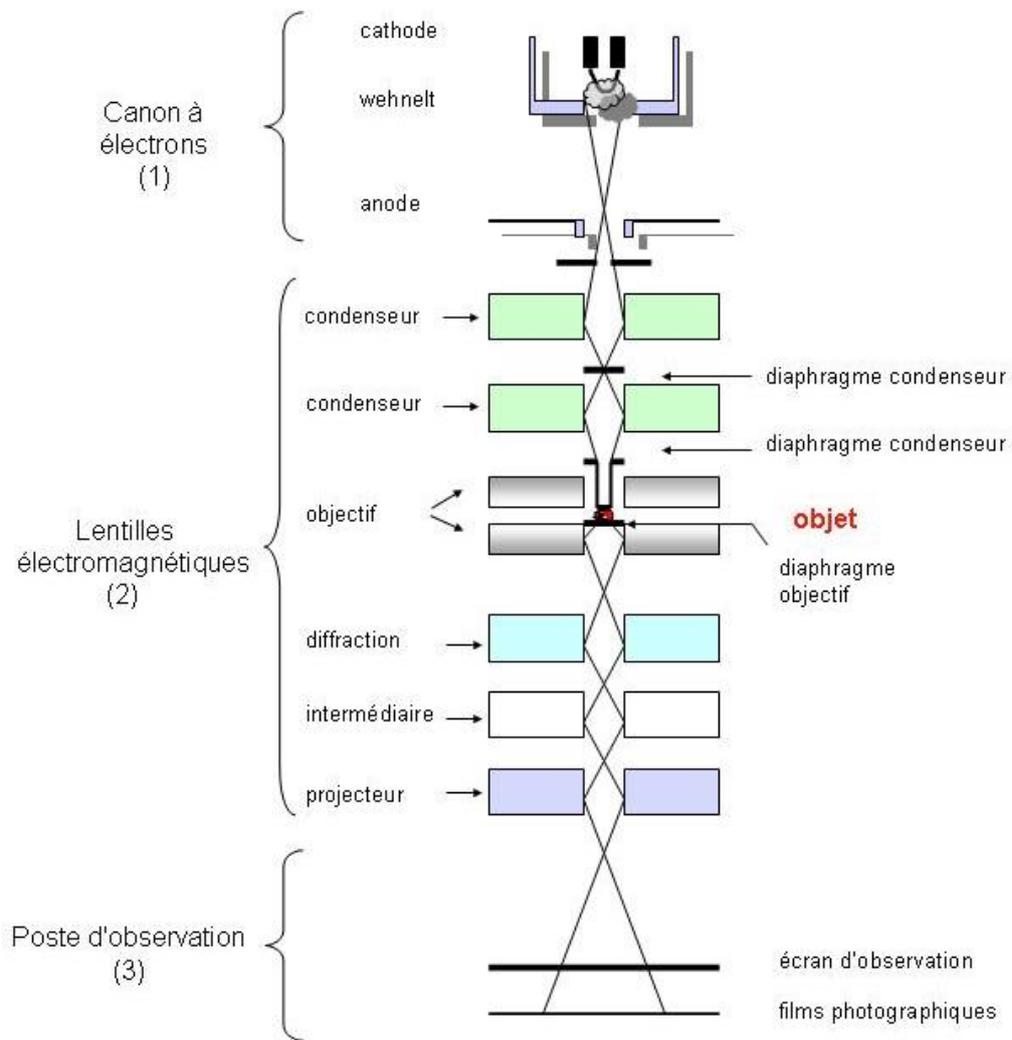


Figure 32 : Schéma d'un microscope électronique en transmission. Les chiffres entre parenthèses renvoient au texte suivant.



Figure 33 : Photo du poste de travail du MET du CCME d'Orsay.

Selon la théorie d'Abbe, la résolution maximale que l'on peut atteindre dépend de la longueur d'onde du faisceau incident et de l'ouverture du système. Ainsi, la possibilité de réaliser des images agrandies d'objets grâce à des électrons résulte de plusieurs propriétés. La première est d'ordre physique et fait intervenir la nature ondulatoire des électrons et leur faible longueur d'onde. Plus la tension d'accélération est forte, plus la longueur d'onde est faible et ainsi le pouvoir résolutif augmente. Les propriétés suivantes sont d'ordre pratique grâce à l'existence de sources d'électrons (1) et de lentilles électromagnétiques (2) qui permettent la focalisation du faisceau d'électrons.

Ce système de lentilles électromagnétiques permet de contrôler la taille du faisceau d'électron et sa focalisation sur l'échantillon. Il existe des aberrations inhérentes aux lentilles (aberrations chromatiques et sphériques) et la résolution pratique est donc diminuée (quelques angströms pour les modes hautes résolution). L'image réelle est obtenue par projection sur un écran fluorescent (3) puis numérisée.

L'image observée grâce au faisceau transmis est le produit de l'interaction entre les électrons du faisceau incident et la matière étudiée. Les différences visibles sont déterminées par l'inhomogénéité de la densité et les dissimilitudes de composition chimique des éléments. Les électrons traversant une région dense ou rencontrant des éléments lourds seront stoppés et cette région apparaîtra claire. A l'inverse, une région peu dense et des éléments légers apparaîtront sombre car la majorité des électrons seront transmis. Il est souvent nécessaire d'utiliser des composés lourds comme l'osmium, le plomb ou l'uranium afin de rehausser le contraste des détails d'un échantillon pour permettre de visualiser des zones d'intérêts comme les noyaux ou les membranes. En pratique, les précipités d'uranium sont très denses aux électrons et sont faciles à repérer au contraire de l'uranium soluble.

Comme l'interaction entre les électrons et la matière est forte, il est indispensable de posséder des objets d'une épaisseur très fine, inférieure à 100nm, afin de posséder un faisceau transmis exploitable en imagerie. Les échantillons doivent donc d'abord être préparés et coupés avec un ultramicrotome.

Les coupes et les observations des échantillons sont réalisées en collaboration avec Jéril Degrouard et Danielle Jaillard du CCME d'Orsay (CCME, UMR 8080, CNRS/Université Paris XI). Les observations sont réalisées sous une tension d'accélération maximale de 80 kV avec une résolution théorique de 0,1 nm et un grossissement maximal de 180000. La numérisation des images est effectuée grâce à une caméra numérique bas niveau de lumière, modèle AMT Advantage HR3 (capteur CCD 1,3 millions de pixels, 1024x1024) pilotée par le logiciel d'acquisition AMT Image Capture Engine.

II. PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Le protocole de préparation des échantillons est présenté en figure 34. Plusieurs étapes sont nécessaires pour obtenir des coupes fines et observables au Microscope Electronique en Transmission (MET). La préparation des échantillons est l'étape clé de l'observation au MET. Elle doit préserver la morphologie et les structures sans former de dégâts ou de défauts dans le matériel étudié.

1. Fixation et post-fixation chimique :

Cette première étape a pour but de stabiliser les structures biologiques fortement hydratées en créant de longues chaînes insolubles par pontage des molécules organiques grâce à des fixateurs. Le glutaraldéhyde est un aldéhyde utilisé dans la première étape de fixation. Il augmente la perméabilité des tissus à l'inclusion et évite les distorsions ce qui permet l'observation de l'ultrastructure*. Son principal inconvénient est son absence d'interaction avec les lipides, constituant majoritaire des membranes. Le tétraoxyde d'osmium est ainsi utilisé en tant qu'oxydant puissant dans une deuxième étape de post-fixation. Il permet la conservation des membranes et contraste également les coupes. Le pH est un paramètre clé pour la conservation des structures. Le tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2 est utilisé pour sa stabilité et pour le fait qu'il ne précipite pas les cations.

Les bactéries sont ainsi immobilisées, avant leur déshydratation ultérieure, dans un état proche de celui du vivant grâce à la réticulation des molécules et au blocage de systèmes enzymatiques.

Les bactéries sont fixées immédiatement après leur prélèvement. Il peut être nécessaire de conserver les cellules quelques jours pour traiter tous les échantillons simultanément. Pour cela, 4,1% de saccharose est ajouté dans l'étape au glutaraldéhyde pour maintenir une osmolarité adaptée aux cellules afin de conserver la structure. Lorsque cette étape est réalisée, les culots sont lavés quinze minutes dans du tampon cacodylate avant l'étape de post-fixation au tétraoxyde d'osmium.

Ces culots sont ensuite enrobés dans de l'agarose, molécule inerte, et découpés en cubes de 1 mm³ pour pouvoir manipuler les échantillons aisément et permettre une déshydratation et une imprégnation efficace. Cette préparation préalable permet également de durcir l'échantillon de façon homogène après la polymérisation afin de pratiquer l'ultramicrotomie à température ambiante.

2. Déshydratation :

Les échantillons sont ensuite plongés dans des bains d'éthanol à concentration croissante afin d'être déshydratés avant l'inclusion dans une résine non hydrosoluble. Lors de cette étape essentielle, l'eau est substituée par de l'éthanol, qui pourra être remplacé efficacement par un solvant organique par la suite. Pour éviter l'extraction des lipides, la déshydratation doit être suffisamment rapide mais progressive. Une mauvaise déshydratation entraînera une mauvaise inclusion car l'eau n'est pas miscible avec les résines utilisées par la suite. On observerait alors des trous dans les coupes.

3. Imprégnation et inclusion :

Des bains intermédiaires de solvant hexaméthylphosphoramide (HMPA) et d'éthanol sont réalisés afin de remplacer l'éthanol qui est non miscible dans la résine. Cette substitution n'aurait pu être effectuée de façon efficace avec des échantillons non déshydratés préalablement.

La résine Epon est une résine époxy apolaire polymérisable à chaud. Elle possède la particularité d'être assez dure pour obtenir des coupes homogènes et d'être très stable sous le faisceau électronique. Comme elle est hydrophobe, elle permet une bonne conservation de l'ultrastructure au contraire des résines acryliques. Ces échantillons sont ensuite imprégnés dans des bains de solvant HMPA et de résine Epon. Ainsi, la résine se substitue progressivement à la molécule organique. Ces imprégnations sont réalisées à température ambiante et sous agitation.

Les échantillons sont ainsi inclus dans l'Epon pur contenant 2,5% d'accélérateur de polymérisation benzyldiméthylamine (BDMA) dans des moules en silicone à 60°C.

4. Ultramicrotomie :

Cette technique permet l'obtention d'une lame mince d'épaisseur constante inférieure à 100 nm sur un ultramicrotome Leica EM FC6. Les blocs de résine sont d'abord trimés* puis une coupe moyenne (300 nm d'épaisseur) au couteau de verre est observée pour pré-localiser le matériel d'intérêt. Les coupes ultrafines sont ensuite effectuées à l'aide d'un couteau diamant Diatome 35° après la réalisation d'une meza* pour limiter la surface de coupe et ainsi diminuer les effets de compression, de déplacement de matériels et de déchirure.

Les coupes sont récupérées sur des grilles en cuivre préalablement ionisées sous UV. Elles ne sont pas contrastées à l'acétate d'uranyle comme l'uranium est l'élément d'intérêt à observer.

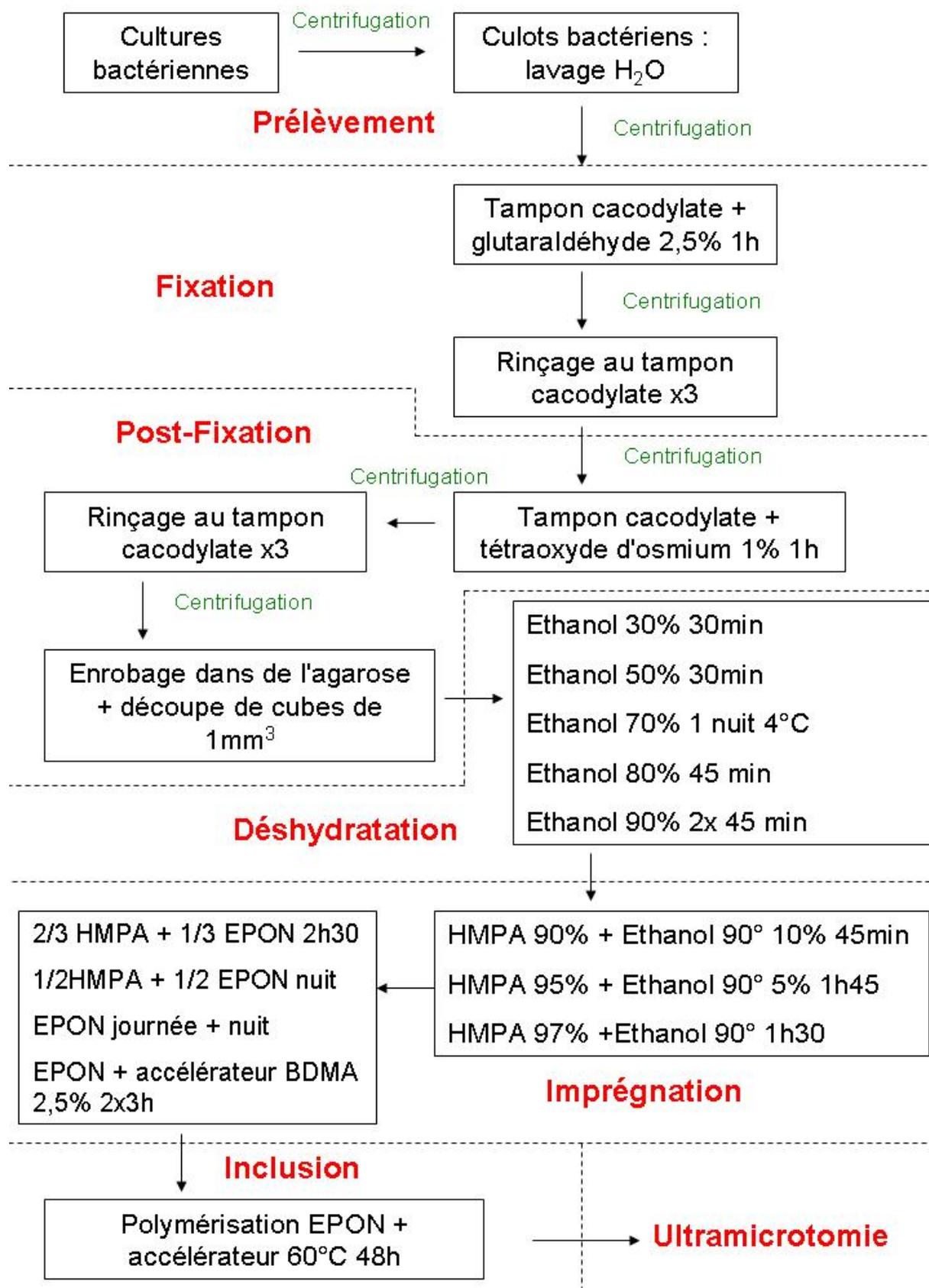


Figure 34 : Protocole de préparation des échantillons pour le microscope électronique en transmission.

PARTIE D : SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X

Les prémices de la spectroscopie d'absorption des rayons X (SAX) remontent aux années 1920 - 1930 mais c'est seulement à la fin des années 1970 que cette technique connaît un essor important grâce au développement du rayonnement synchrotron* produisant une source polychromatique et intense de photons. Les premiers spectres d'absorption de rayons X présentant des modulations au-delà du seuil d'absorption sont publiés au début du siècle mais il faut attendre près de 50 ans pour que la relation entre les oscillations et la structure atomique locale autour de l'élément absorbant considéré soit totalement formalisée.

I. PRINCIPE

La spectroscopie d'absorption X est basée sur l'effet photoélectrique résultant de l'interaction entre un photon X et la matière. Elle correspond à l'éjection d'un électron de cœur d'un atome, c'est-à-dire d'une couche profonde (K, L...) par absorption d'un photon. Le processus d'absorption n'intervient que lorsque l'énergie du photon est suffisante pour que l'électron de cœur transite vers les premiers niveaux vides de l'atome, ce qui définit le seuil d'absorption. A ce seuil E_0 , il y a donc émission d'un photoélectron grâce à la transition électronique réalisée. Les interférences entre l'onde sortante de photoélectron et les ondes diffusées par les atomes voisins sont à l'origine des modulations du signal d'absorption. Parallèlement, l'atome excité se relaxe avec une cascade de transitions des électrons des orbitales externes vers la lacune d'énergie plus faible. Cette relaxation conduit alors à l'émission soit de photons X dits "de fluorescence", soit d'électrons dits "Auger". Les énergies de ces processus d'émission sont caractéristiques de chaque élément et permettent donc son identification. Nous n'avons exploité ici que le mécanisme de désexcitation par fluorescence, l'exploitation du processus Auger nécessitant que l'échantillon soit sous vide.

La figure 35 schématise le processus d'excitation de l'atome absorbant et les émissions de particules qui en résulte.

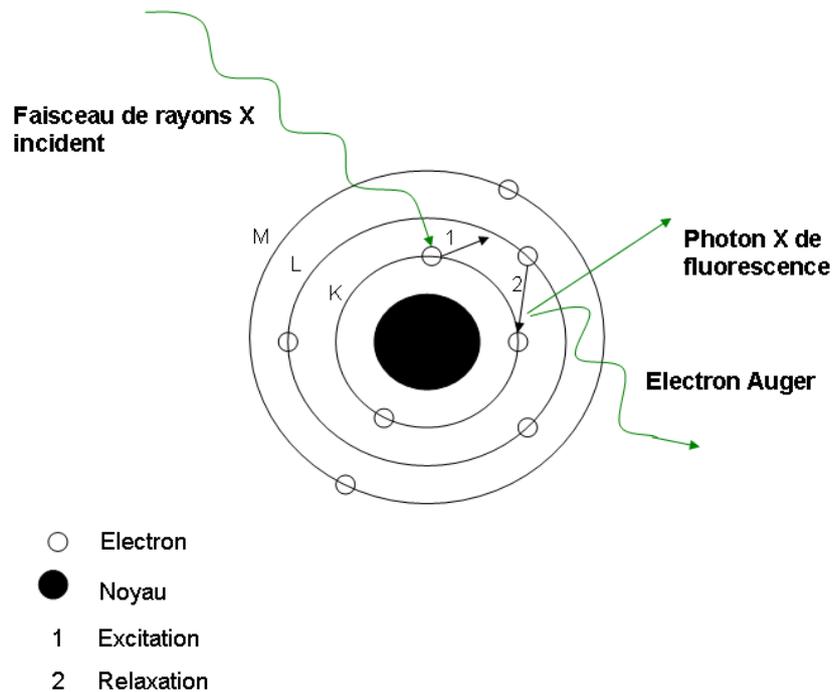


Figure 35 : Processus d'excitation de l'atome sondé et d'émission de particules.

Nous avons donc mesuré les modulations du signal d'absorption par fluorescence X. Ces modulations au-delà du seuil donnent des informations sur l'environnement local de l'atome sondé : le nombre et la nature des voisins et les distances de ceux-ci à l'élément absorbeur.

La figure 36 nous présente un spectre d'absorption typique d'un composé d'uranyle au seuil L_{III}^* de l'uranium. Ce spectre montre trois régions qui se distinguent par le comportement de l'électron excité, appelé photoélectron*, et correspondent à trois gammes d'énergie différentes du photon incident.

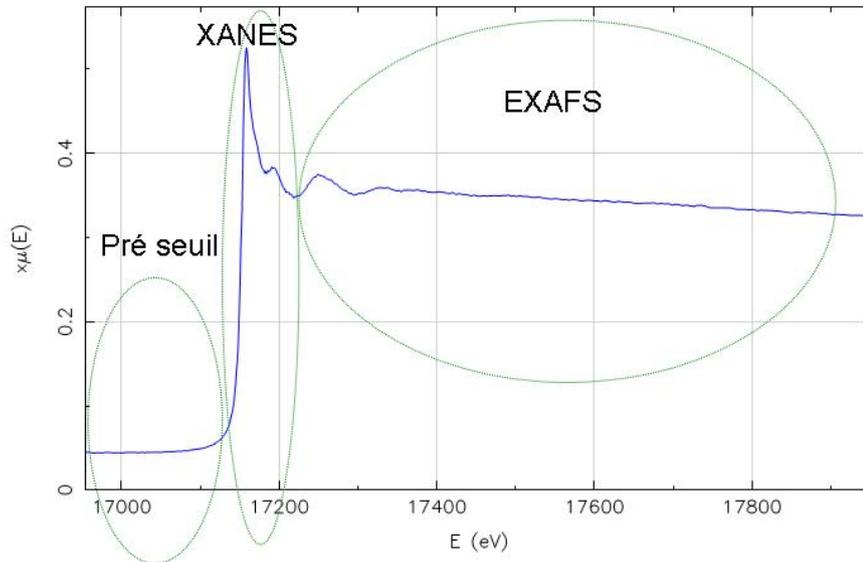


Figure 36 : Spectre d'absorption X d'un composé d'uranyle au seuil L_{III} de l'uranium. Représentation de $\mu(E).x$ en fonction de l'énergie des photons incidents (x est l'épaisseur de l'échantillon).

→ Le pré seuil :

A basse énergie (avant E_0), la transition d'un électron à partir du niveau de cœur $2p$ n'est pas encore possible car les photons n'ont pas l'énergie nécessaire pour créer une transition. Le coefficient d'absorption provient alors des autres couches électroniques de l'atome et des autres éléments de l'échantillon.

→ Le XANES (X-ray absorption near edge structure):

Lorsque l'énergie du photon augmente, mais toujours sans dépasser l'énergie d'ionisation E_0 , une augmentation brutale du coefficient d'absorption est observée. Cela traduit l'accession possible par l'électron à des états vides ou semi-vides de valence. Les règles de transition dipolaires doivent être appliquées quand l'énergie des photons est proche et légèrement supérieure à E_0 (jusqu'à 50eV au-delà du

seuil), le photoélectron est émis avec une énergie cinétique faible ($\Delta E = E_e - E_0 < 50$ eV) et un libre parcours élastique moyen élevé. C'est-à-dire que le photoélectron part "voyager" autour de l'atome absorbeur sur une dizaine d'angströms avant d'être absorbé. Le XANES est donc sensible à un environnement atomique dépassant les premiers voisins. Ainsi, le spectre d'absorption X près du seuil s'interprète en termes d'ordre à moyenne distance ($\leq 10 \text{ \AA}$). Le photoélectron est impliqué dans des phénomènes de diffusions multiples par l'ensemble des atomes environnants, et la symétrie cristalline joue alors un rôle non négligeable. Les structures près du seuil contiennent des informations sur l'ordre local autour de l'atome absorbeur mais aussi sur sa structure électronique. Ainsi, un décalage de la position du seuil est typiquement observé lorsque le degré d'oxydation de l'élément change.

→ L'EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure) :

Dans un domaine allant au-delà des 50 premiers eV jusqu'à quelques centaines d'eV après le seuil, le coefficient d'absorption comporte des modulations d'amplitude décroissante. Dans ce domaine d'énergie, l'électron est envoyé dans le milieu avec une énergie résiduelle E_c égale à celle du photon moins celle du seuil d'absorption. Le libre parcours moyen élastique diminue car l'énergie cinétique augmente et l'électron ne sonde alors que les plus proches voisins de l'atome absorbeur. Les oscillations qui caractérisent cette région sont dues à l'interférence entre l'onde émise associée à l'électron qui a subi la transition électronique et les ondes rétrodiffusées par les atomes voisins. Dans cette gamme d'énergie, les interférences sont correctement décrites par des phénomènes de diffusions simples. Ainsi, les paramètres calculés sont les distances interatomiques locales, la coordinance et le degré de désordre de ces liaisons.

La figure 37 présente le comportement de l'électron dans chaque gamme d'énergie.

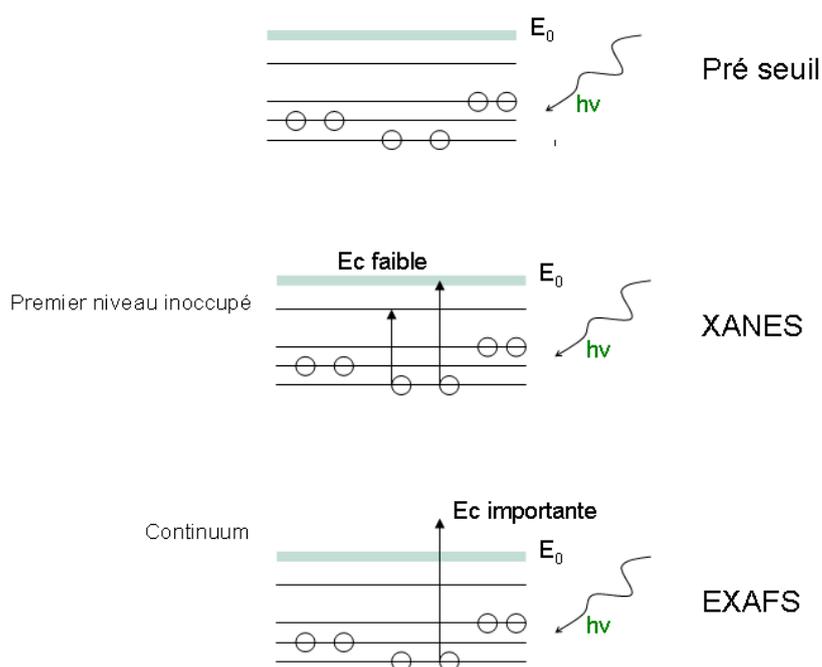


Figure 37 : Transitions de l'électron excité selon l'énergie reçue. E_0 = énergie d'ionisation, E_c = énergie cinétique.

II. DESCRIPTION DE LA LIGNE EXPERIMENTALE :

Les analyses sont réalisées sur la ligne de lumière FAME (pour "*French Absorption spectroscopy beamline in Material and Environmental science*"), à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble. Cette ligne est constituée d'un spectromètre d'absorption des rayons X dédié à la recherche structurale dans des systèmes environnementaux et biologiques dilués. Pour ce type d'études, les caractéristiques principales de la ligne sont un flux de photons important sur l'échantillon, la stabilité dans l'espace et le temps du faisceau, et un bruit statistique réduit le plus possible. Pour une meilleure acquisition des spectres SAX, le faisceau intense de rayons X a de plus besoin d'être associé à un système de détection très sensible. Pour la fluorescence, un détecteur Canberra 30 éléments en germanium est utilisé. La ligne est équipée d'un monochromateur composé de deux cristaux en silicium permettant de sélectionner la gamme d'énergie correspondant au seuil L_{III} de

l'uranium à partir du faisceau de rayon X polychromatique, et d'une optique focalisante permettant de concentrer les photons sur l'échantillon en un spot de 300 μm par 200 μm . Les mesures sont effectuées à température ambiante. Le schéma de principe de l'instrument FAME est représenté dans la figure 38.

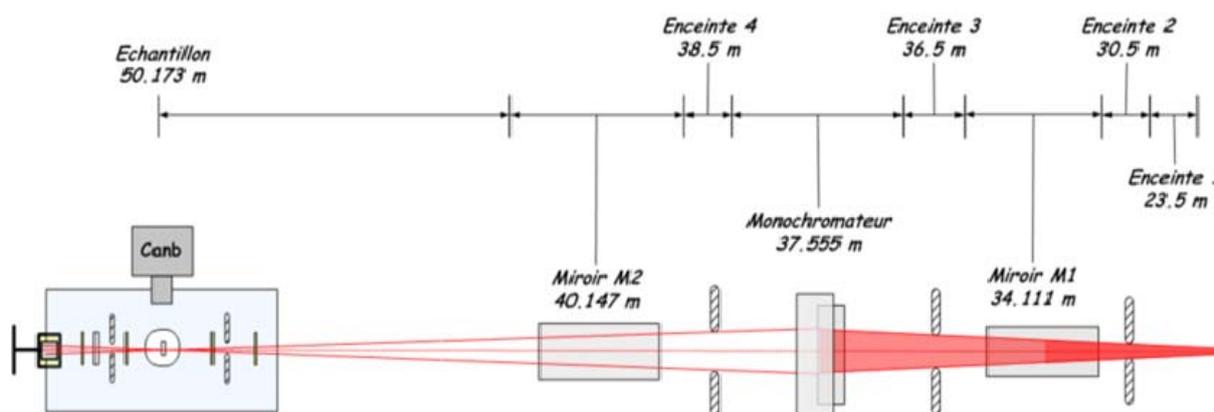


Figure 38 : Schéma de principe de la ligne de lumière FAME à l'ESRF.

III. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LES ANALYSES XAS

Les échantillons analysés sont issus de cultures bactériennes en présence d'uranium. Les culots bactériens sont lyophilisés, homogénéisés, et préparés sous forme de pastille de 5 mm de diamètre. L'homogénéisation de l'échantillon lyophilisé permet l'amélioration du rapport signal sur bruit. Les échantillons liquides de milieu de culture sont congelés à -20°C jusqu'à leur analyse à l'ESRF dans de fins capillaires. La figure 39 présente le montage expérimental utilisé pour un tel échantillon.

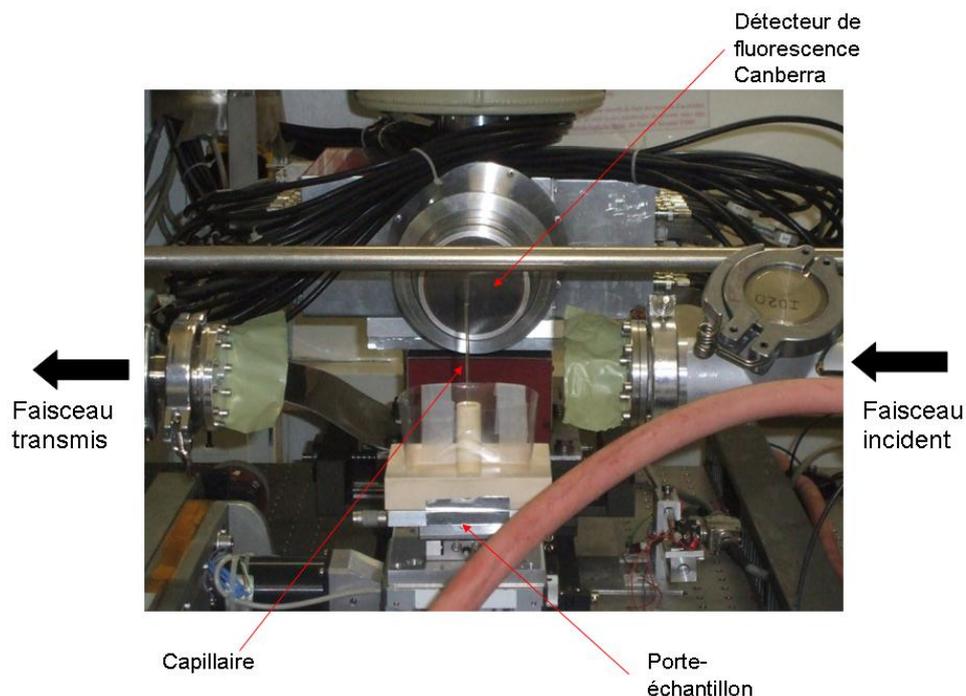


Figure 39 : Montage expérimental utilisé sur la ligne FAME à l'ESRF pour les échantillons liquides d'uranium contenus dans des capillaires.

En fonction de la concentration en uranium dans l'échantillon, plusieurs spectres sont enregistrés et sommés. Plus l'uranium est dilué, plus le temps d'acquisition est important. Le temps de comptage est d'environ 10 minutes pour le domaine XANES et 45 minutes pour la partie EXAFS. Pour éviter une modification de l'échantillon sous le faisceau, la position de celui-ci change entre chaque spectre.

La figure 40 présente le protocole de préparation des échantillons pour l'étude de l'uranium par spectroscopie d'absorptions des rayons X.

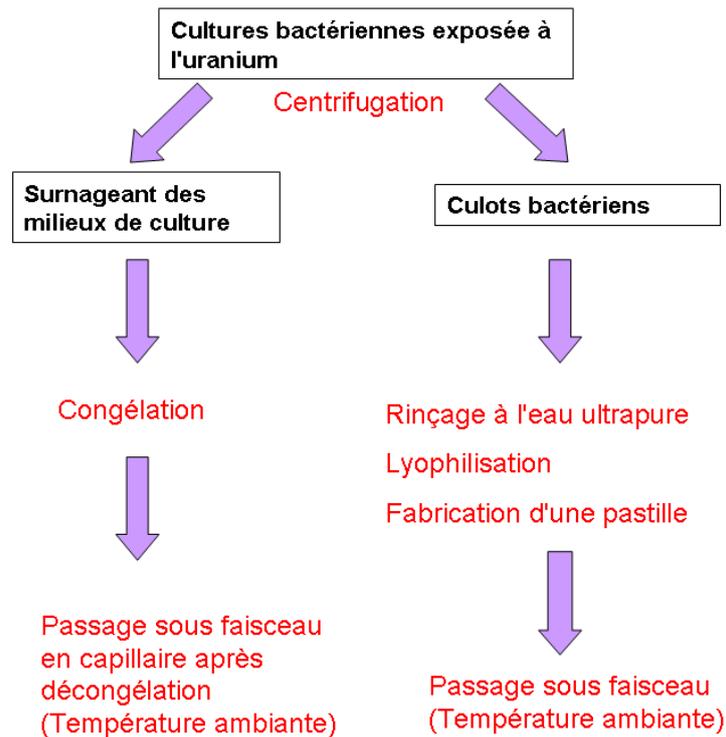


Figure 40 : Protocole de préparations des échantillons pour l'analyse par spectroscopie d'absorption des rayons X.

IV. TRAITEMENT DES DONNEES EXPERIMENTALES :

En mécanique quantique, le coefficient d'absorption est donné par la règle d'or de Fermi. Ce calcul est cependant très compliqué et nécessite de nombreuses approximations. La mise au point récente de codes de calcul, tel que FEF (Ankudinov *et al.*, 1998), a permis la généralisation de la prise en compte des phénomènes de diffusion simple et multiple (avec décomposition en chemins) dans l'analyse des spectres d'absorption X. Ainsi, notamment, la frontière entre XANES et EXAFS n'est plus aussi nette et l'on se rapproche d'un formalisme sinon unifié, du moins similaire.

Pour extraire les oscillations des spectres EXAFS, il est nécessaire de suivre les étapes présentées dans la figure 41 et résumées ci-dessous. Le logiciel ATHENA (Ravel et Newville, 2005) est utilisé pour réaliser ces traitements.

1. Normalisation des spectres:

La normalisation permet de comparer la structure de deux spectres d'amplitude différente en superposant au mieux le saut de seuil. Les spectres XAS sont normalisés en plusieurs étapes.

L'énergie du seuil E_0 est déterminée grâce au maximum de la dérivée du spectre $\chi \cdot \mu(E) = f(E)$

L'élimination du fond continu d'absorption créé par d'autres éléments chimiques que l'atome absorbeur ainsi que par les autres seuils de cet atome est obtenue par une modélisation de la région spectrale avant seuil par une fonction linéaire. Cette courbe est ensuite soustraite au spectre et permet son redressement horizontal. Le même procédé est pratiqué pour redresser la région spectrale après seuil grâce à une fonction non linéaire.

Ainsi, les spectres sont normalisés entre les valeurs de coefficient d'absorption 0 et 1 ce qui permet de les comparer entre eux.

2. Extraction des oscillations :

Le coefficient moyen d'absorption de l'élément est modélisé par une courbe qui est ajustée afin de passer au milieu des oscillations EXAFS grâce à une fonction de type polynomial de degré supérieur à 3.

Le signal EXAFS, noté $\chi(E)$, est ainsi obtenu. Il correspond à la composante oscillante du coefficient d'absorption (Equation 1) :

$$\chi(E) = \frac{\mu(E) - \mu_0(E)}{\mu_0(E)}$$

Équation 1 : Expression des oscillations EXAFS à partir du coefficient d'absorption mesuré μ en fonction de l'énergie E .

$\mu(E)$ est le coefficient d'absorption mesuré et $\mu_0(E)$ est le coefficient d'absorption atomique de l'élément considéré.

Les oscillations EXAFS sont exprimées en fonction du vecteur d'onde k associé au photoélectron émis (Equation 2).

$$k = \sqrt{\frac{2m_e}{\hbar^2} (E - E_0)}$$

Équation 2 : Expression du vecteur d'onde associé au photoélectron en fonction de son énergie E.

Où m_e désigne la masse de l'électron et \hbar la constante de Planck réduite.

En considérant que l'électron éjecté par le photon a une énergie cinétique suffisante pour être assimilé à un électron libre, qu'il subit une rétrodiffusion simple sur les atomes voisins et tout en sachant que ce phénomène d'interférence n'est dû qu'aux atomes diffuseurs proches de l'atome central, la formule simplifiée suivante est utilisée pour décrire les oscillations EXAFS $\chi(k)$.

$$\chi(k) = -\sum_j \frac{1}{kR_j^2} N_j e^{-2\left(\frac{R_j}{\lambda}\right)} e^{-2\sigma_j^2 k^2} |f_j(\pi)| \sin(2kR_j + 2\delta_1 + \Phi_j)$$

Équation 3: Expression générale décrivant les modulations EXAFS du coefficient d'absorption.

L'indice j représente les différents types de voisins qui se distinguent, soit par leur distance à l'atome central, soit par leur nature chimique.

On différencie des termes atomiques que sont son amplitude $|f_j(\pi)|$ et sa phase δ_1 et les termes dépendants de la structure locale que sont le nombre de voisins N_j , les distances interatomiques R_j et leurs fluctuations σ_1 , paramètres que l'on veut connaître.

Les termes atomiques sont uniquement dépendants des potentiels atomiques dans la mesure où l'énergie des photoélectrons est suffisamment élevée pour que les modifications de ces potentiels dues aux liaisons interatomiques soient négligeables.

Les quantités $|f_j(\pi)|$ et $\Phi(k)$ ont été tabulées pour presque tous les éléments.

Le terme $\lambda(k)$ est le libre parcours moyen élastique du photoélectron. Il est fondamental dans le modèle puisqu'il limite le nombre de couches de voisins entrant dans le processus. Dans le domaine de l'EXAFS, ce libre parcours moyen élastique est très faible (quelques Å). Ainsi, l'EXAFS est une sonde structurale locale et seul l'environnement proche de l'atome ayant absorbé le photon est révélé.

3. Transformée de Fourier (FFT) :

L'amplitude et l'argument de chaque terme structural sont des fonctions peu modulées de k . Ainsi, en faisant subir une transformée de Fourier à $\chi(k)$, chaque terme sinusoïdal, et donc chaque couche d'atomes identiques à la même distance R_j de l'atome central donnera un pic à une distance R_j' décalée de la vraie distance interatomique par les termes de phase $2\delta_j + \Phi_j$. Ce pic aura une amplitude proportionnelle au nombre d'atomes concernés.

Dans notre étude, le signal expérimental sera ensuite comparé à des signaux EXAFS de composés modèles de référence, eux-mêmes traités de la même manière que les échantillons expérimentaux. Ce signal expérimental sera reconstruit par combinaison linéaire dans l'espace des vecteurs d'onde k . On pourra ainsi déterminer la proportion de chaque complexe de référence dans l'échantillon considéré.

Par contre, pour obtenir des informations quantitatives sur la structure autour de l'atome considéré, il est nécessaire d'effectuer des simulations de chacune des contributions en ajustant nos données.

4. Modélisation du signal :

Le signal EXAFS partiel obtenu par la transformée de Fourier est modélisé pour extraire les paramètres structuraux N_j (nombre de voisins de nature j), R_j (distance entre l'atome absorbeur et les atomes j diffuseurs de même nature), σ_j (facteur de Debye-Waller ou terme de désordre qui est corrélé au désordre thermique et structural des distances) et ΔE (écart entre le seuil d'absorption de l'élément et la

valeur choisie pour le calcul). Cette simulation a été réalisée en utilisant le logiciel ARTEMIS (Ravel et Newville, 2005). Elle est effectuée en utilisant des fonctions théoriques calculées de la phase $2\delta_1 + \Phi_j$ et l'amplitude $|f_j(\pi)|$ (fonction de la nature des atomes voisins j), mais également le libre parcours moyen élastique $\lambda(k)$ du photoélectron. Ainsi seuls les paramètres structuraux restent à déterminer. Les paramètres des composés de référence étant connus, on retrouve ces valeurs par fit, et cela valide le protocole de traitement utilisé. De plus, ils sont utiles car ils servent de base de départ pour la modélisation de la structure des composés inconnus, celle-ci étant proche de celle des composés de référence. Typiquement, la précision espérée est de $\pm 0,02$ Å sur les distances et 20% sur les nombres de coordination. Les paramètres calculés sont de plus corrélés entre eux. N et σ d'une part et R et ΔE de l'autre ne sont pas indépendants.

Dans notre étude, nous allons ajuster nos données afin d'avoir une première approximation des valeurs de longueurs de liaison et du nombre de voisins sur les deux premières sphères de coordination autour de l'atome d'uranium.

Ces deux méthodes d'analyse, la reconstruction du signal par combinaison linéaire et l'ajustement des données, doivent donner les mêmes résultats.

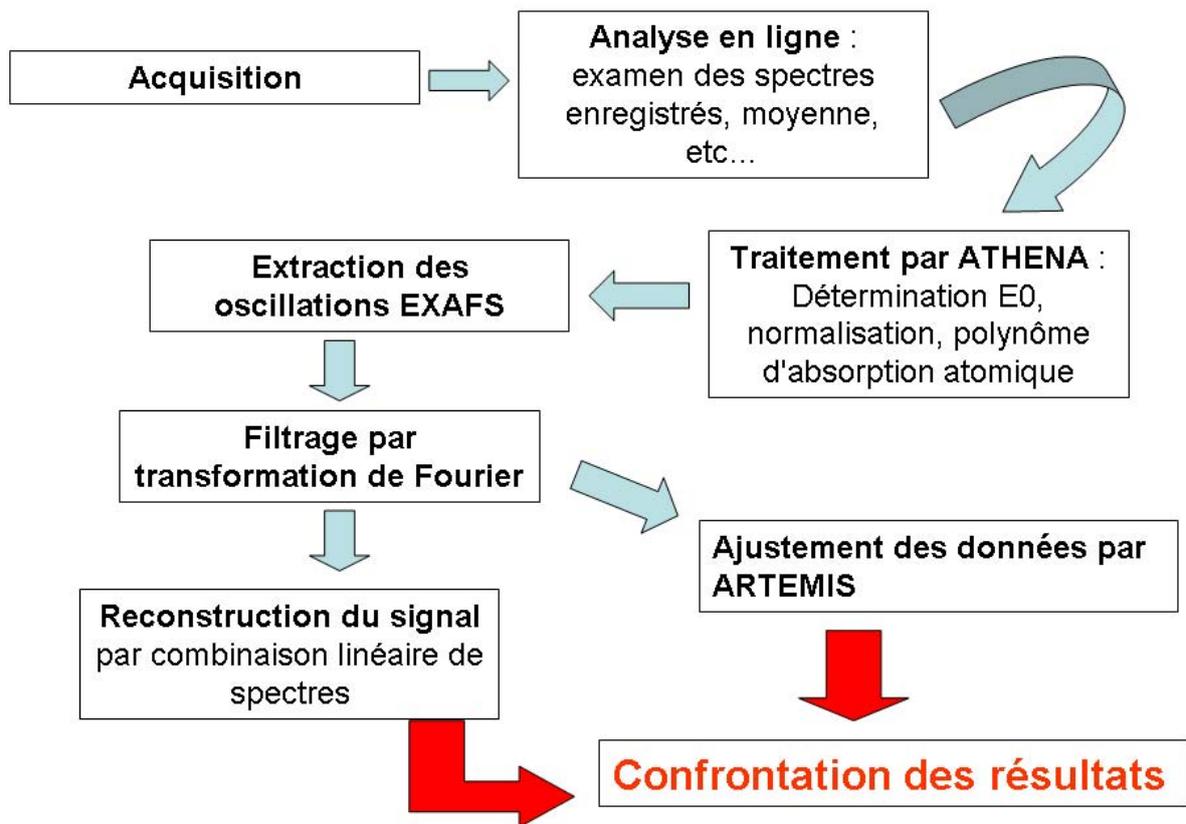


Figure 41 : Protocole de traitement des spectres EXAFS.

Chapitre 3 :

Résultats

et

Discussions

PARTIE A : SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM

Les milieux de culture des bactéries sont des solutions contenant un grand nombre de molécules minérales, tels que les sels, ou organiques, comme les acides aminés ou les sucres. Ils possèdent également, en général, une force ionique importante. Nous avons vu que l'ion uranyle est une molécule très réactive et qu'il n'est jamais libre à un pH proche de 7. Il convient donc de modéliser la spéciation de l'uranium afin de déterminer sa forme dans nos milieux de culture. Ces milieux pourront ensuite être modifiés en conséquence pour obtenir des composés solubles et donc biodisponibles, tout en obtenant une croissance convenable de la souche. En effet, certains éléments sont indispensables à la bactérie, et ils ne peuvent être retirés complètement du milieu. La spéciation de l'uranium a été modélisée grâce au logiciel JCHESS (Van der Lee et De Windt, 2002) à l'aide de la base de données BASSIST développée par le CEA (Bion, 2003)

I. SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE *CUPRIAVIDUS METALLIDURANS* CH34

1. Milieu TSM

Le milieu TSM est le milieu communément utilisé pour la croissance de *C. metallidurans* CH34. La figure 42 présente la spéciation de l'uranium en fonction du pH du milieu en présence d'une concentration en uranyle de 1mM.

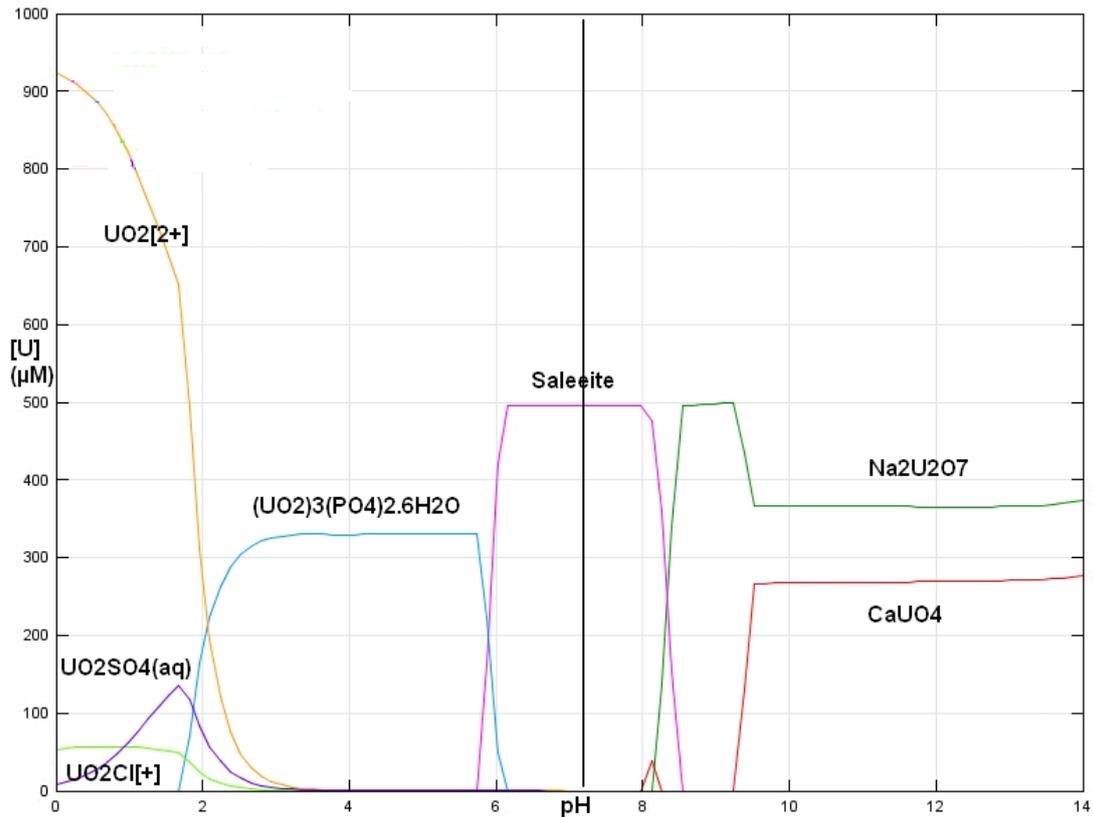


Figure 42 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu TSM en fonction du pH.

Au pH optimum de croissance, à pH 7,5, la spéciation de l'uranium calculée par JCHESS est 100% d'un précipité de phosphate d'uranyle complexé à du magnésium, la saleeite*. De formule $Mg(UO_2)_2(PO_4)_2 \cdot 10(H_2O)$, la saleeite est un minéral que l'on trouve dans les grès dans l'environnement. A pH inférieur à 6, l'uranium est également précipité avec les phosphates sous forme $(UO_2)_3(PO_4)_2 \cdot 6H_2O$ alors qu'à pH supérieur à 8, il précipitera avec le calcium et le sodium sous forme $CaUO_4$ et $Na_2U_2O_7$. Dans ce milieu et à cette concentration, l'uranium n'est soluble qu'à pH inférieur à 2 sous forme d'uranyle UO_2^{2+} , $UO_2SO_4(aq)$ et UO_2Cl^+ .

La spéciation de l'uranium dans ce même milieu mais à une concentration plus faible ($100\mu M$) a été modélisée (fig. 43).

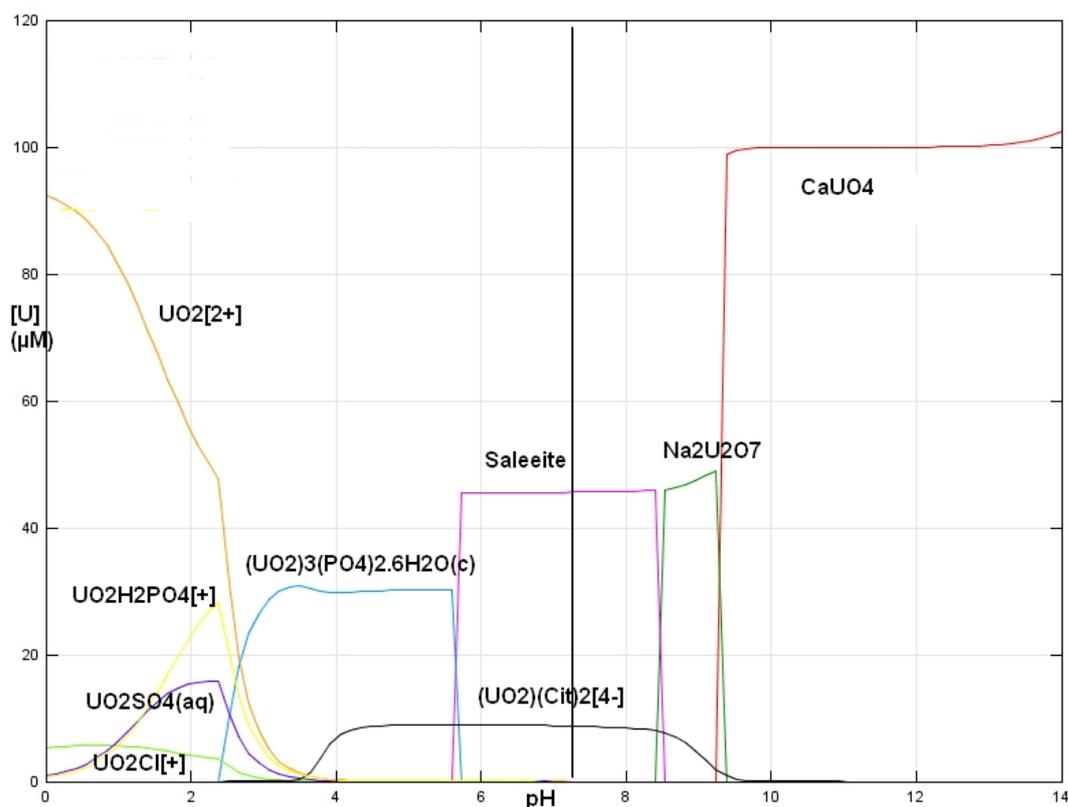


Figure 43 : Spéciation théorique de l'uranium à 100µM en milieu TSM en fonction du pH.

A cette concentration, on retrouve les mêmes précipités et les gammes de pH de ceux-ci sont identiques à part pour $\text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7$ que l'on ne retrouve qu'entre pH 8,5 et 9,5. Le précipité de CaUO_4 devient prédominant à partir de ce pH. On retrouve également une nouvelle forme d'uranium soluble à pH inférieur à 2, un phosphate d'uranyle $\text{UO}_2\text{H}_3\text{PO}_4^+$. Le complexe de citrate d'uranyle $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$ se forme dans la gamme de pH de 4 à 9. Ce complexe est présent à 1mM d'uranium mais en concentration très faible (9µM). On voit ici que le citrate est un complexant fort de l'uranium, plus fort que le phosphate, car même en concentration 70 fois moins importante que celui-ci, des complexes de citrate d'uranyle sont calculés. En revanche, JCHESS ne met pas en évidence de complexe d'acétate d'uranyle.

Expérimentalement, les précipités d'uranium sont bien observés dans ces conditions. Dans ce calcul de spéciation, seuls le tris et le gluconate ne sont pas présents dans la base de données. Les formules développées de ces molécules sont données en annexe A. Le tris possède une fonction amine et trois hydroxyles. A priori il ne devrait pas complexer l'uranium efficacement. L'acide gluconique, par contre, possède une fonction carboxylique et des fonctions hydroxyles voisines mais dans nos conditions

expérimentales d'étude, nous n'observons pas de complexation de l'uranium par ce composé. Ces deux molécules ne sont donc pas indispensables pour les calculs de modélisation et leur absence dans la base de données BASSIST n'est pas limitante pour ce travail.

En résumé, dans le milieu TSM, l'uranium précipite donc avec les phosphates à un pH supérieur à 2. Il convient donc de modifier le milieu de culture de manière à obtenir des formes solubles de complexes d'uranyle à pH 7,5, pH optimum de croissance de *C. metallidurans* CH34.

2. Milieu modifié par ajout de citrate : milieu CSM

Dans le but de mettre en contact les bactéries avec de l'uranium soluble, différents complexants ont été ajoutés au milieu. Ici, le tris a été remplacé par du citrate de sodium. Dans le TSM, les 50mM de tris servent uniquement de tampon afin d'éviter des changements brusques de pH dus à la croissance de la bactérie. Le citrate peut également jouer ce rôle. Le milieu CSM désigne le milieu TSM dans lequel 50mM de citrate remplacent les 50mM de tris. La concentration des autres éléments, dont le phosphate, n'a pas été modifiée. La figure 44 présente la spéciation de l'uranium à 1mM dans le milieu CSM en fonction du pH.

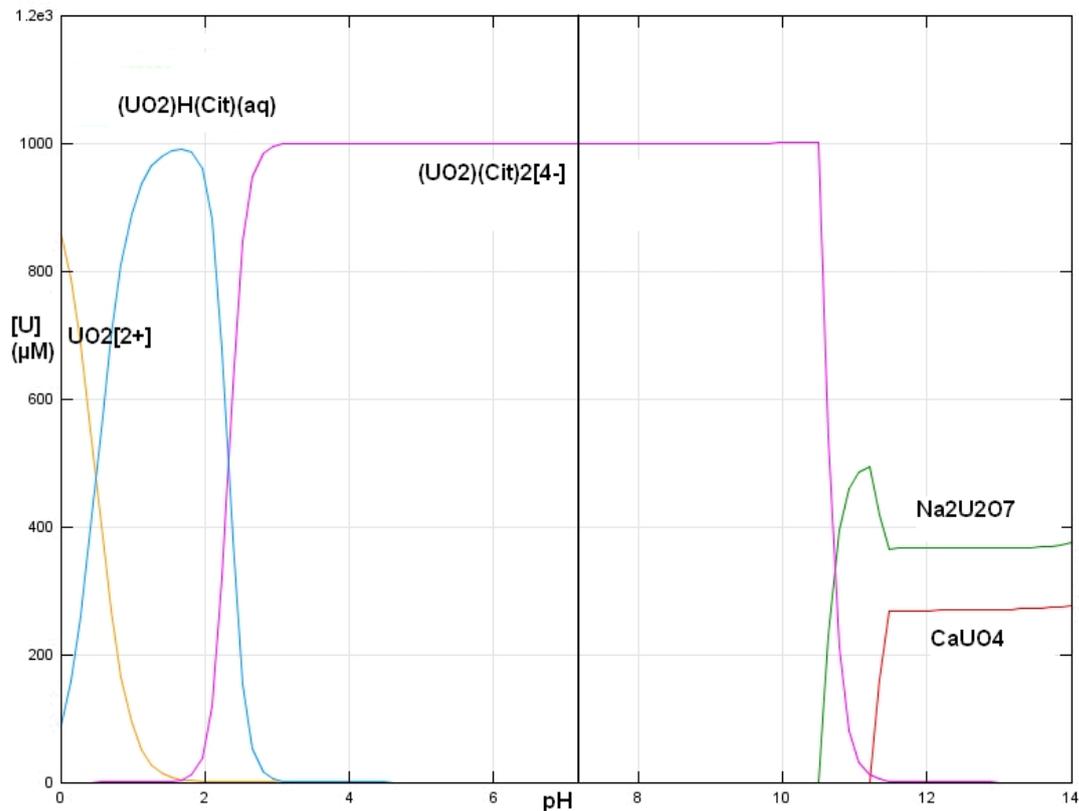


Figure 44 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu CSM en fonction du pH.

D'après la modélisation JCHESS, la spéciation de l'uranium dans le milieu CSM est régie par le citrate. Il n'existerait qu'une seule forme de citrate d'uranyle $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$ entre les pH 3 et 10 plus une autre forme $(\text{UO}_2)\text{H}(\text{Cit})_{\text{aq}}$ entre les pH 1 et 2. L'ion uranyle UO_2^{2+} est retrouvé avec cette dernière forme de citrate d'uranyle à pH inférieur à 2. Les précipités d'uranium aux pH alcalins (>10) sont une nouvelle fois présents. Cependant, aux pH physiologiques, la totalité de l'uranium est sous forme soluble.

A une concentration plus faible en uranium ($100\mu\text{M}$), la seule différence est la prédominance du précipité CaUO_4 par rapport à $\text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7$ à partir de pH 11 de la même manière que dans le milieu TSM.

Aucun précipité d'uranium avec les phosphates à cette concentration en citrate ne sont observés. Ces précipités n'apparaissent que lorsque le citrate n'est plus en excès c'est-à-dire au moins deux fois la concentration en uranium. Ceci montre que le citrate est bien un complexant de l'uranium plus fort que le phosphate.

Ce milieu semble donc adapté pour l'étude des effets du citrate d'uranyle sur *C. metallidurans* CH34.

3. Milieu modifié par ajout de carbonate : Milieu TSM15%

Afin d'étudier le complexe de carbonate d'uranyle, il est nécessaire d'ajouter du bicarbonate dans le milieu TSM car celui-ci n'en contient pas. La figure 45 présente la concentration des différentes formes d'uranium retrouvées en TSM complet à pH 7,5 en fonction de la concentration en carbonates et pour une concentration initiale en uranium de 1mM.

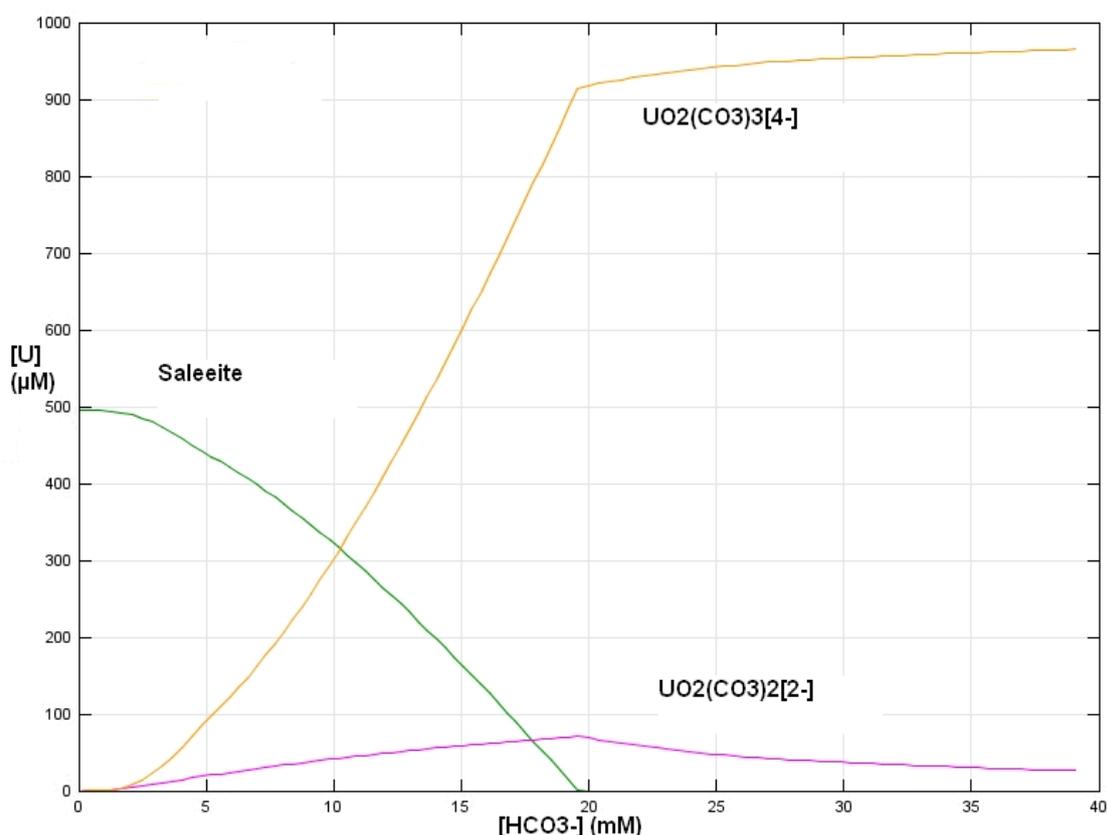


Figure 15 : Concentration des différentes formes d'uranium à pH 7,5 dans le milieu TSM en fonction de la concentration en carbonates pour une quantité d'uranium initiale de 1mM.

Il est nécessaire d'avoir un ratio [carbonates]/[uranium] supérieur à vingt pour faire disparaître les précipités de phosphates d'uranyle. On obtient alors une espèce majoritaire (>90%) de carbonate d'uranyle $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ et une espèce minoritaire $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$.

Cependant, des précipités de phosphates d'uranyle ont été observés expérimentalement à pH 7,5 avec une concentration en carbonate de 40mM pour une concentration en uranium de 1mM. Les phosphates restent la complexant le plus fort de l'uranium dans ces conditions. Nous avons donc diminué la concentration de cet élément dans le milieu. Les phosphates sont indispensables à la croissance de la bactérie et ils ne peuvent être totalement supprimés. Une concentration de 15% de la concentration initiale a été choisie car elle permet une croissance correcte de la souche (voir partie B de ce chapitre). Ce milieu de culture avec une concentration en carbonate de 40mM et une concentration en phosphate de 200µM sera appelé TSM15%. La figure 46 présente la spéciation de l'uranium à 1mM dans ce milieu TSM15%.

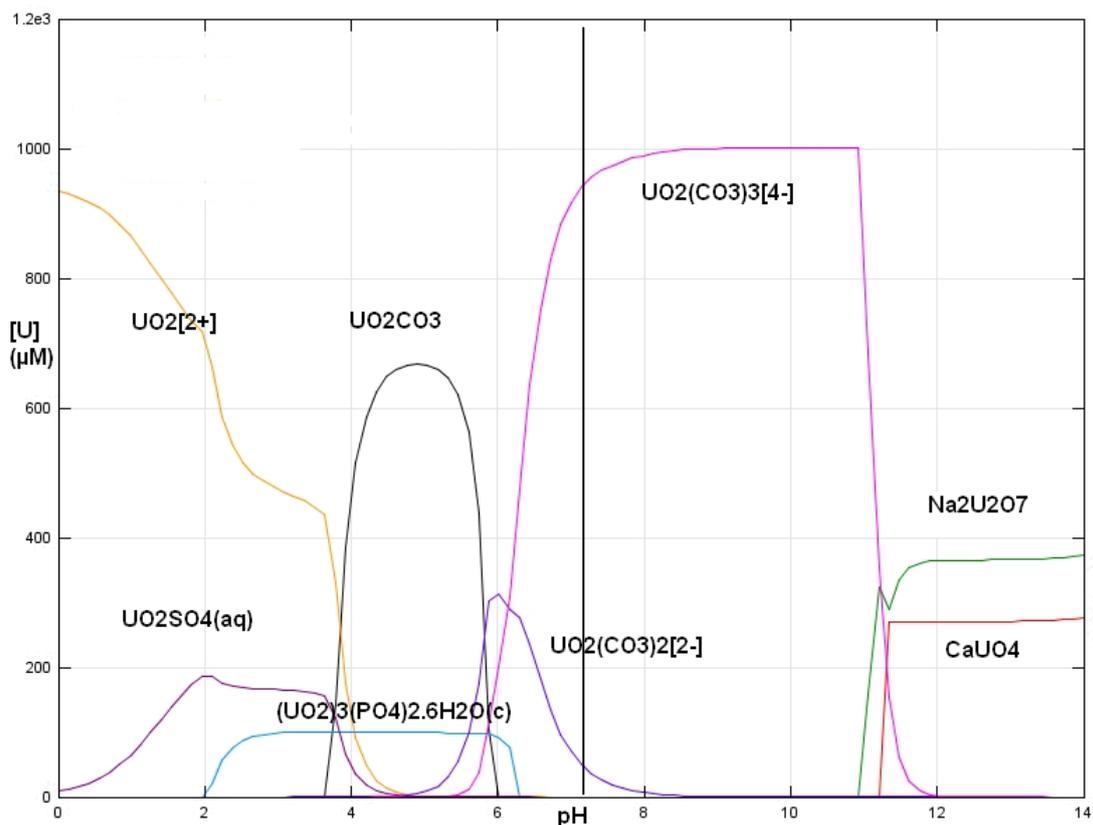


Figure 46 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu TSM15% en fonction du pH.

A pH 7,5, la spéciation de l'uranium calculée avec JCHESS donne toujours une forme majoritaire (95%) de carbonate d'uranyle $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ et une forme minoritaire (5%) $UO_2(CO_3)_2^{2-}$.

Des précipités de phosphate d'uranyle apparaissent entre les pH 2 et 6. Cette gamme de pH s'élargit lorsque la concentration en phosphates augmente. Par

conséquent, il est donc nécessaire de bien contrôler le pH pendant la croissance afin d'éviter une acidification qui entrainerait une précipitation de l'uranium.

La figure 47 présente la spéciation de l'uranium à une concentration plus faible (100µM) pour voir si son comportement est identique.

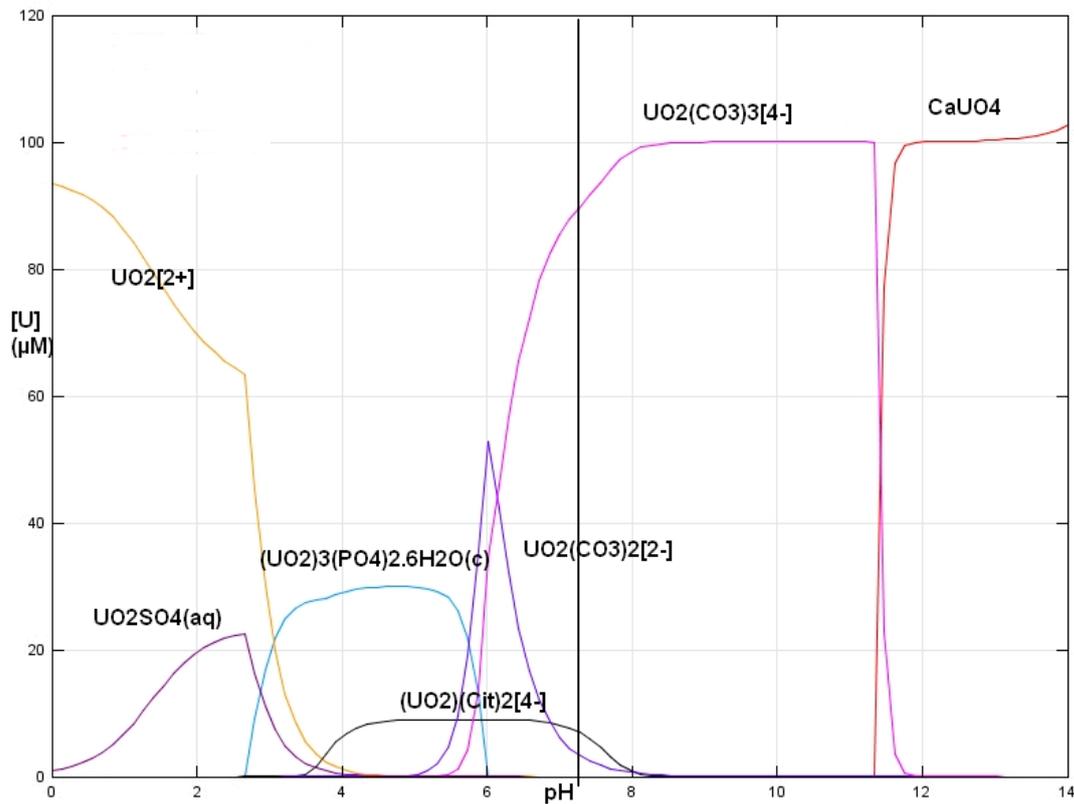


Figure 47 : Spéciation théorique de l'uranium à 100µM en milieu TSM 15% en fonction du pH.

A pH 7,5, le complexe de citrate d'uranyle $UO_2(Cit)_2^{4-}$ est mis en évidence à hauteur de 9µM. La proportion de la forme majoritaire $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ est de 85%. La forme UO_2CO_{3aq} n'est plus présente mais la gamme de pH dans lequel l'uranium précipite est la même (entre les pH 2 et 6). Comme pour les précédents milieux le précipité $CaUO_4$ devient prédominant à partir de pH 11.

Ce milieu semble donc adapté pour l'étude des effets du carbonate d'uranyle sur *C. metallidurans* CH34.

4. Milieu anaérobie

Au vue de la composition du milieu, les calculs de spéciation de l'uranium dans ce milieu anaérobie seront attendues comme identiques à ceux des milieux TSM, CSM et TSM15% car le nitrate est un complexant de l'uranium moins fort que les carbonates et le citrate. De plus, le lactate n'est pas présent dans la base de données BASSIST mais la molécule possède une seule fonction carboxylique comme l'acétate et le gluconate (voir annexe A). Il est donc attendu que le phosphate soit le complexant le plus fort de l'uranium dans le milieu ce qui est démontré expérimentalement. En effet, expérimentalement, le radionucléide précipite dans le milieu anaérobie non supplémenté en citrate ou en carbonate.

Il est ainsi nécessaire d'ajouter un complexant plus fort que les phosphates dans ce milieu pour étudier des formes solubles d'uranium.

La figure 48 présente la spéciation de l'uranium à 1mM dans le milieu anaérobie auquel ont été ajoutés 10mM de citrate de sodium, en fonction du pH.

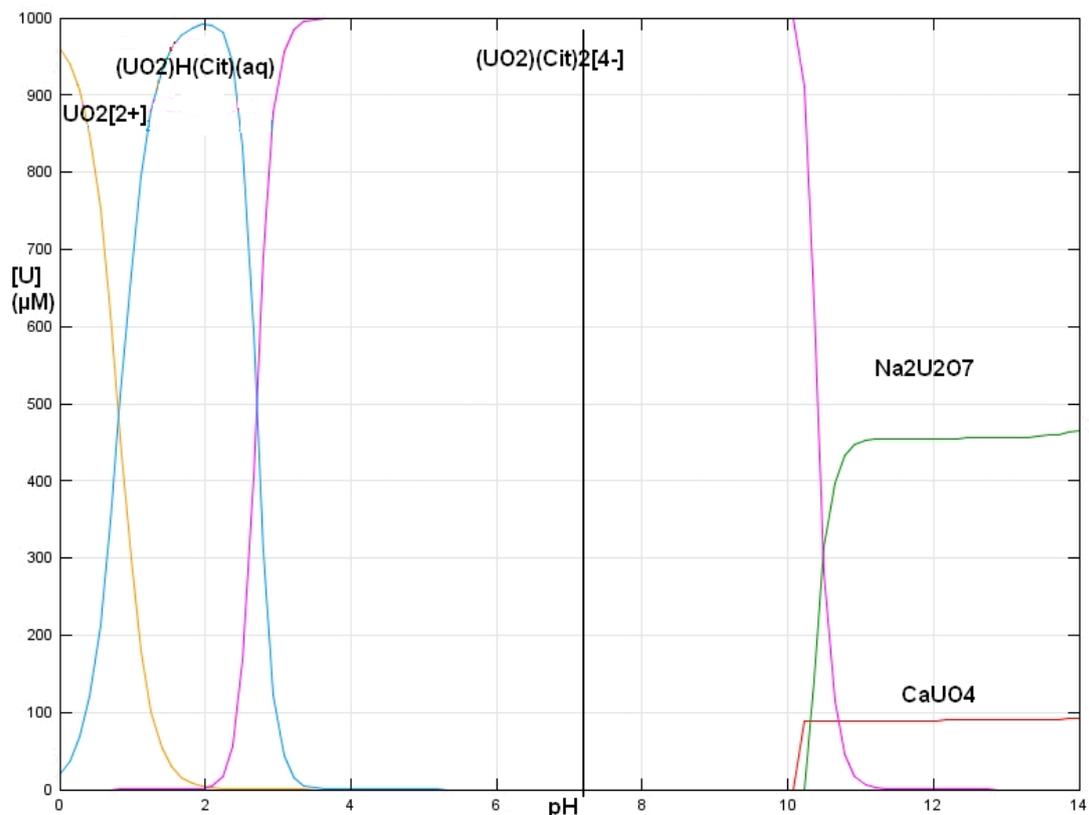


Figure 48 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu Anaérobie + citrate 10mM en fonction du pH.

Le diagramme de spéciation est identique à celui du milieu CSM. La spéciation de l'uranium à pH 7,5 est $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$ à 100%. On observe une autre forme de citrate d'uranyle $(\text{UO}_2)\text{H}(\text{Cit})_{\text{aq}}$ à des pH inférieurs à 4.

La modélisation des espèces chimiques par JCHESS est également similaire pour la spéciation carbonate d'uranyle. Comme dans le milieu TSM, il est nécessaire d'ajouter 40mM de carbonate et de diminuer la concentration en phosphates à 200 μM afin d'éviter la précipitation de l'uranium.

II. SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE *DEINOCOCCUS RADIODURANS R1*

1. Milieu TYG

Le milieu TYG est un milieu semi synthétique car la composition exacte de certains de ces éléments n'est pas connue. Ici, seule la concentration de la source de carbone est connue. Il s'agit du glucose à 1 g.L⁻¹ (ou 5,5 mM). Les tryptones sont un hydrolysats de caséines* digérés par de la trypsine*. Il s'agit donc d'un mélange complexe de peptides de différentes tailles et composition. Les extraits de levure sont la fraction soluble des solutions d'autolyses de levures. Ils sont riches en oligoéléments, phosphates, nucléotides et vitamines entre autres.

Il n'est donc pas possible de modéliser la spéciation de l'uranium dans ce milieu de culture. De plus, nous avons observé expérimentalement que l'uranium précipite dans ce milieu. Un milieu synthétique a ainsi été développé afin de contrôler la spéciation de l'uranium et d'obtenir des formes solubles du radionucléide.

2. Milieu semi- synthétique

Le milieu semi-synthétique contient les éléments indispensables à la croissance de *D. radiodurans* R1 que sont l'acide nicotinique, les oligoéléments et les phosphates à une concentration de 1mM. Une faible quantité de peptones est présente dans ce milieu. Elles sont utilisées comme source d'azote et d'acides aminés pour la bactérie. La source de carbone est toujours le glucose, mais à 2 g.L⁻¹. Le pH du milieu est ajusté à 7 qui est le pH optimum de croissance de la souche.

Comme pour *C. metallidurans* CH34, le complexant le plus fort de l'uranium dans ce milieu est le phosphate et l'uranium précipite à pH 7. La figure 49 présente la spéciation de l'uranium ajouté à une concentration de 1mM dans ce milieu, en fonction du pH.

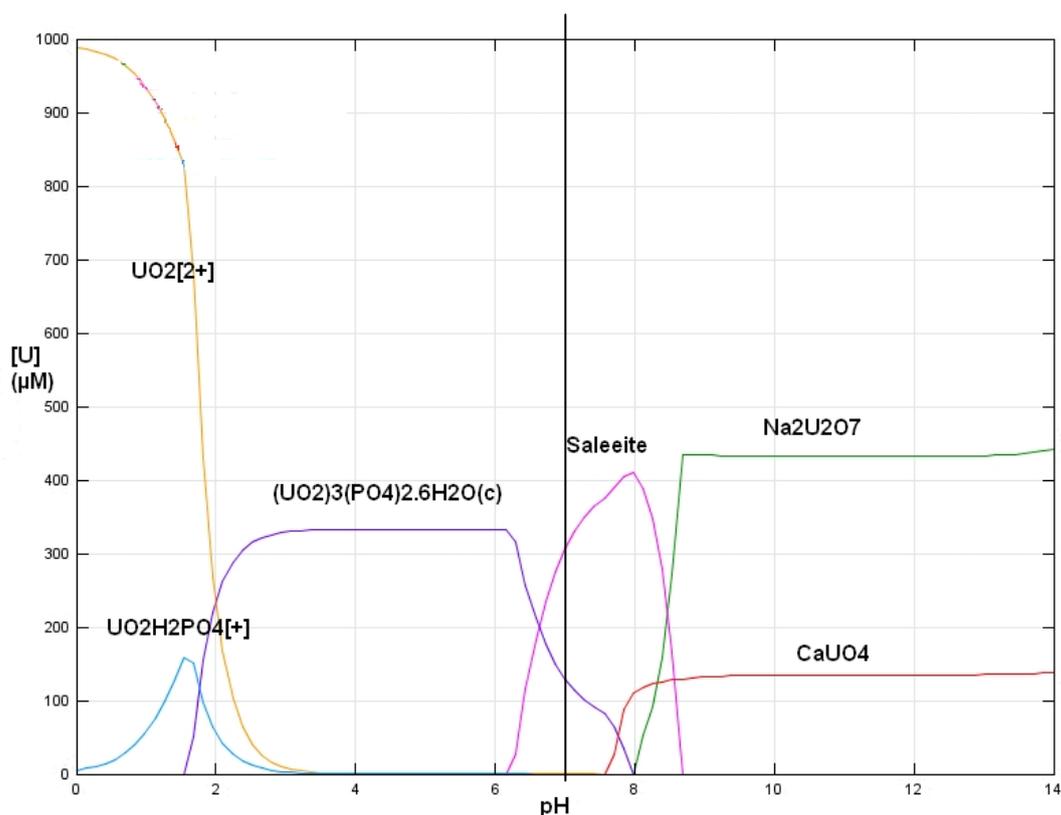


Figure 49 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu synthétique pour *D. radiodurans* R1 en fonction du pH.

L'uranium précipite pour tout pH supérieur à 2. Il est donc nécessaire d'ajouter un complexant dans le milieu pour obtenir une forme chimique soluble d'uranyle.

Comme précédemment, le citrate et le carbonate ont été introduits dans le calcul dans ce but.

La figure 50 présente la spéciation de l'uranium à 1mM dans le milieu synthétique supplémenté en citrate à 9mM.

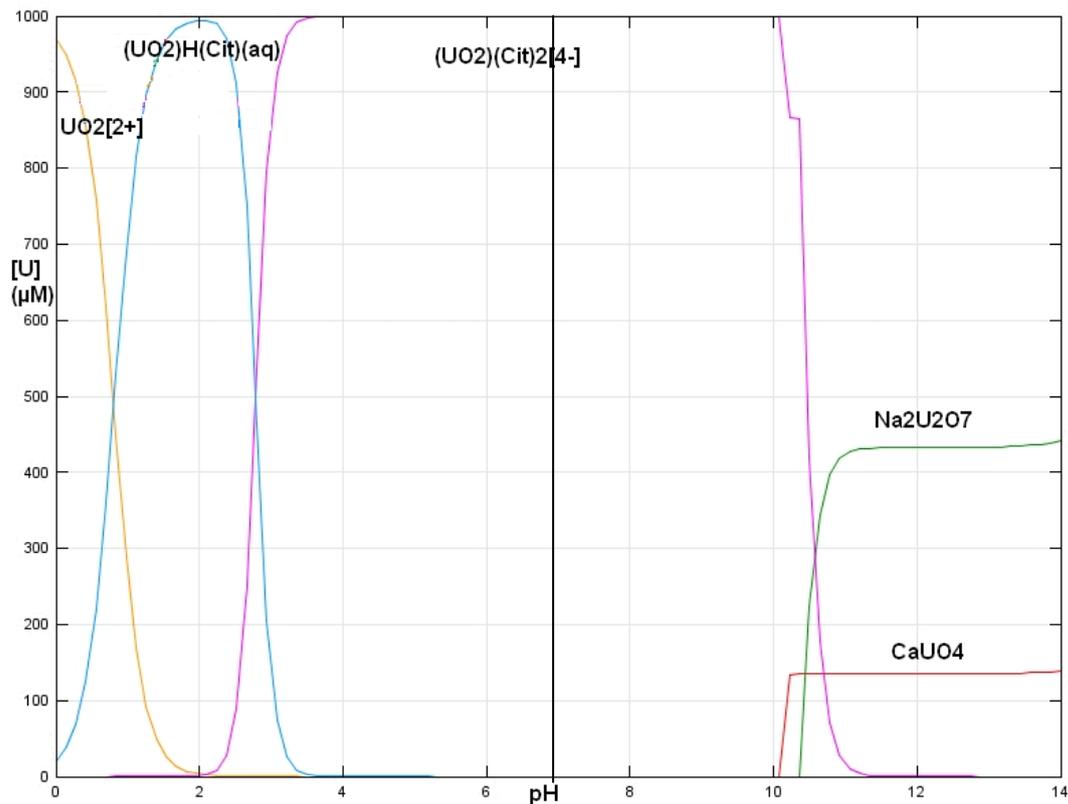


Figure 50 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu synthétique + citrate 10mM en fonction du pH.

Comme dans le milieu CSM, à pH 7, la forme $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$ est le seul complexe d'uranium retrouvé dans le milieu de culture. Ainsi, l'uranium est soluble dans ce milieu.

Pour obtenir le complexe de carbonate d'uranyle, il est nécessaire d'ajouter 40mM de carbonates dans le calcul. La figure 51 présente la spéciation de l'uranium, lorsqu'il est ajouté à hauteur de 1mM dans cette modélisation.

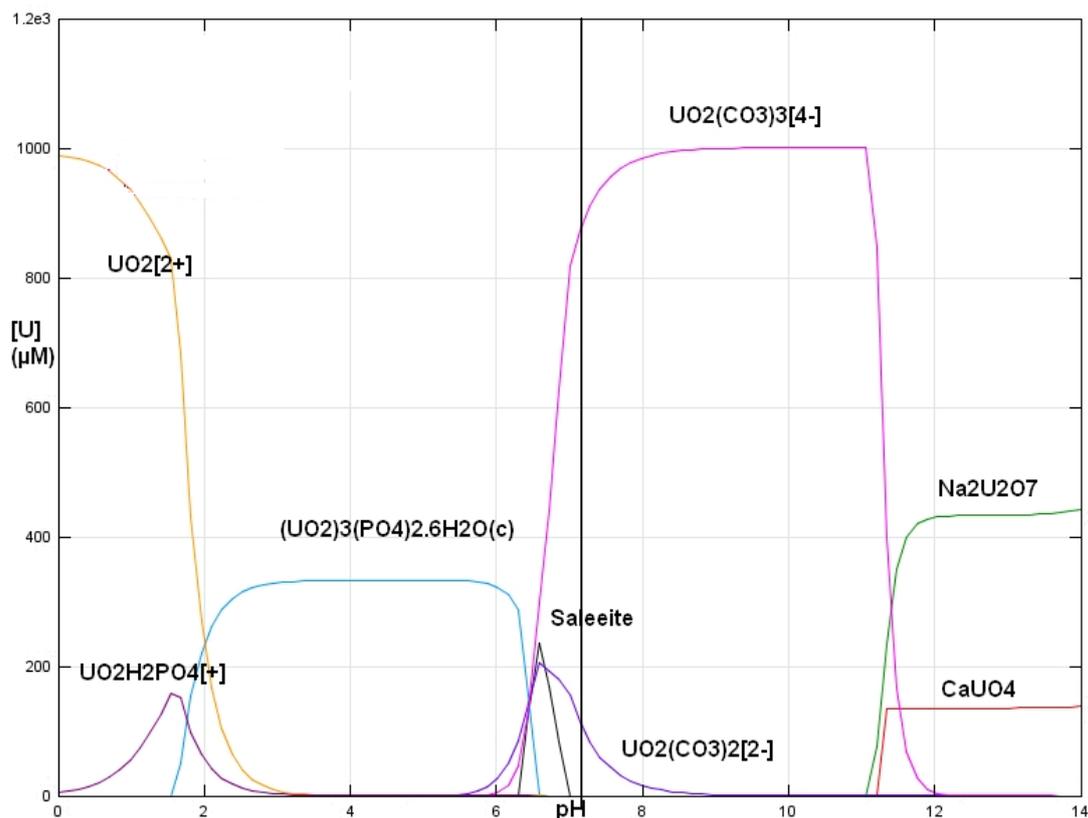


Figure 51 : Spéciation théorique de l'uranium à 1mM en milieu synthétique + carbonates 40mM en fonction du pH.

Des précipités de phosphates d'uranyle sont observés jusqu'à pH 7. Pour étudier l'effet du carbonate d'uranyle soluble, il est donc nécessaire de travailler à pH 7,5, ce qui est toujours compatible avec la croissance de la souche. Nous verrons en deuxième partie de ce chapitre que la diminution de la concentration en phosphates n'est pas possible car la vitesse de croissance de la souche est fortement diminuée.

Nous avons ainsi développé un milieu de culture permettant d'obtenir des formes chimiques connues et solubles de l'uranium. Le comportement de la bactérie dans ces différents milieux est décrit dans la partie B de ce chapitre.

III. SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM DANS LE MILIEU DE CULTURE DE *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS*

Le milieu classiquement utilisé pour la croissance de la bactérie est le milieu Hutner. C'est un milieu semi synthétique et complexe. Il contient des ETM, des facteurs de croissance et différentes sources de carbone. Les extraits de levure rendent la modélisation de la spéciation impossible car nous ne connaissons pas leur composition exacte. Plusieurs éléments sont de plus absents de la base de données BASSIST. C'est le cas du malate qui est présent en forte concentration (20 mM). Cette molécule du cycle de Krebs, comme le citrate, possède deux groupes carboxyliques et une fonction hydroxyle. Sa structure se rapproche de celle du citrate et il pourrait être un complexant fort de l'uranium dans le milieu. Un autre complexant possible présent en forte concentration (7 mM) est le glutamate qui possède également deux fonctions carboxyliques mais une chaîne carbonée plus longue.

La concentration en phosphate est très importante (20 mM), il sert également de tampon. Afin d'éviter la précipitation de l'uranium, il a été nécessaire de diminuer la concentration jusqu'à 1 mM. Le milieu obtenu sera appelé milieu Hutner modifié. La totalité de l'uranium est soluble lorsque 1mM d'acétate d'uranyle est ajouté dans ce milieu.

Malgré plusieurs essais, nous n'avons pu développer un milieu synthétique ou semi-synthétique comme pour *D. radiodurans* R1 car la souche de *R. palustris* est plus exigeante et nécessite beaucoup de facteurs de croissance et de sources de carbone, dont les constantes de complexation avec l'uranium ne sont pas connues.

La spéciation de l'uranium dans le milieu Hutner est donc inconnue. Elle sera déterminée par spectroscopie d'absorption X grâce à des composés de référence (partie D). L'hypothèse principale est une complexation au malate. En effet, ce complexe a déjà été mis en évidence et la molécule de malate présente beaucoup de similitudes avec la molécule de citrate (voir annexe A).

CONCLUSION SPECIATION THEORIQUE DE L'URANIUM

La spéciation de l'uranium a pu être modélisée pour deux modèles bactériens : *C. metallidurans* CH34 et *D. radiodurans* R1. Les milieux de culture ont dû être modifiés ou créés afin d'obtenir le citrate d'uranyle et le carbonate d'uranyle. L'élément limitant des milieux est le phosphate qui précipite l'uranium lorsqu'il est en forte concentration et qu'il n'y a pas de complexant plus fort. Il ne peut être totalement supprimé car c'est un élément indispensable à la croissance des microorganismes.

La spéciation de l'uranium pour *R. palustris* n'est pas connue en milieu Hutner mais le radionucléide est soluble lorsque la concentration en phosphate est diminuée. L'hypothèse serait un complexe de malate d'uranyle. De plus amples modifications du milieu entraînent une perte de croissance de la bactérie.

Le tableau 10 dresse le bilan des milieux utilisés et des spéciations associées pour chaque bactérie au pH optimum de croissance.

Tableau 10 : Récapitulatif des milieux utilisés et des spéciations associées aux milieux pour chaque bactérie aux pH optimum de croissance.

<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 (pH 7,5)		
TSM : Précipités de phosphates d'uranyle	CSM : 100% $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$	TSM15% : 95% $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ + 5% $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$
Anaérobie Citrate (pH 7) : 100% $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$		Anaérobie carbonate (pH 7) : 95% $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ + 5% $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1 (pH 7)		
TYG : Précipités de phosphates d'uranyle	Synthétique Citrate : 100% $\text{UO}_2(\text{Cit})_2^{4-}$	Synthétique Carbonate : 90% $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ + 10% $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (pH 7)		
Hutner : Précipités de phosphates d'uranyle		Hutner modifié : Complexe d'uranium soluble (malate d'uranyle ?)

La spéciation calculée par JCHESS n'est que théorique et les résultats expérimentaux peuvent les infirmer. L'utilisation des bases de données peut être délicate. En effet, les constantes de complexation de différents complexes sont encore discutées et certains ne sont pas encore connus. De plus, certains éléments ne sont pas pris en compte comme le gluconate ou le tris. C'est pourquoi cette spéciation théorique est purement informative et elle doit être confirmée par la détermination de la spéciation expérimentale. Dans ce travail, nous utiliserons la spectroscopie d'absorption X.

Il convient maintenant de déterminer le comportement de ces microorganismes dans ces différents milieux de culture et leurs résistances aux différentes formes de l'uranium.

PARTIE B : CROISSANCE ET RESISTANCE

Les courbes de croissance de bactéries en milieu liquide sont évaluées par le suivi de la densité optique (absorbance à 600 nm) en fonction du temps. Quatre phases distinctes sont observables sur la figure 52, courbe de croissance bactérienne typique. La phase de latence (1), la phase exponentielle de croissance (2), la phase stationnaire (3) et enfin la phase de déclin (4). Ces phases sont des conséquences du mode de culture des bactéries sans apport de milieu frais au cours de l'incubation, appelé également "culture en batch" ou en système fermé. La phase de latence correspond au temps d'adaptation de la cellule au milieu et à la synthèse des éléments nécessaires à l'utilisation des différentes molécules du milieu. La phase exponentielle de croissance correspond à la prolifération bactérienne maximale où les cellules se divisent continuellement. La vitesse de croissance, μ , est à son optimum et est appelée μ_{max} . La phase stationnaire intervient lorsque la quantité d'éléments nutritifs devient trop faible pour assurer la multiplication des bactéries. La quantité de cellules reste stable avant la phase de déclin. Celle-ci intervient lorsque le nombre de divisions devient inférieur au nombre de morts. Cette phase intervient lorsque les nutriments deviennent rares ou que les déchets de croissance sont trop importants et deviennent toxiques pour les bactéries. A partir de ce type de courbes, on peut déterminer les paramètres caractéristiques de la croissance : temps de latence, vitesse maximale de croissance et densité cellulaire maximale.

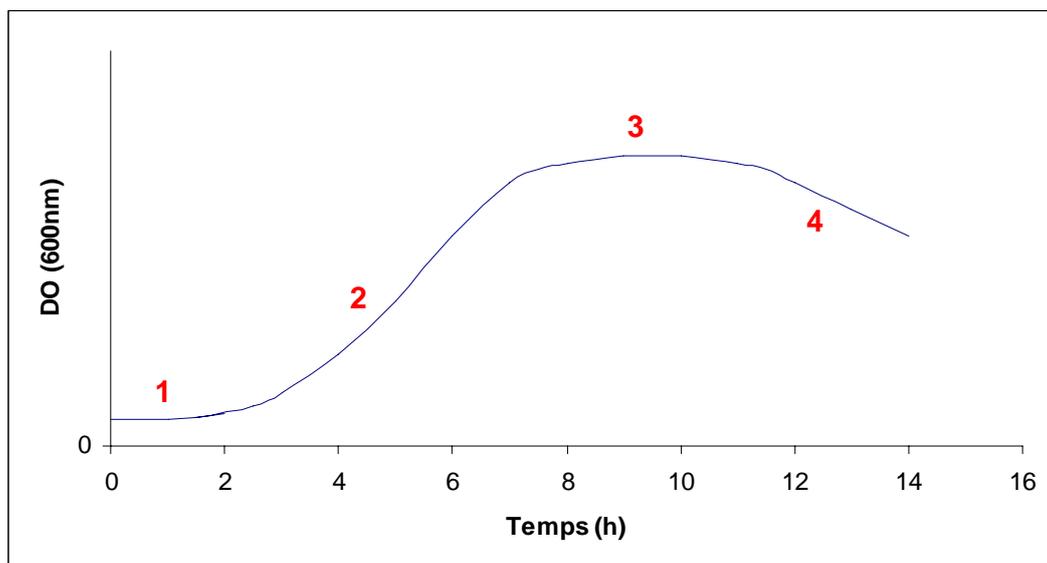


Figure 52 : Courbe de croissance bactérienne typique. (1) Phase de latence (2) Phase exponentielle (3) Phase stationnaire (4) Phase de déclin.

Lorsque les bactéries sont exposées à un toxique, les variations des paramètres caractéristiques de la croissance par rapport à ceux d'une culture témoin, non exposée, permettent de définir les capacités de résistance de la souche à ce toxique. Pour cela, les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34, de *D. radiodurans* R1 et de *R. palustris* ont été suivies après exposition à différentes spéciations et concentrations en uranium et comparées aux courbes de croissance dans les différents milieux utilisés (cultures témoins).

I. CROISSANCE ET RESISTANCE DE *C. METALLIDURANS* CH34 A DIFFERENTES FORMES D'URANIUM

Comme il a été décrit dans la partie A, l'effet du citrate d'uranyle est déterminé par l'étude de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en milieu CSM et celui du carbonate d'uranyle en milieu TSM15%.

Avant d'étudier l'influence des différentes espèces d'uranium sur la croissance de la bactérie, il convient d'abord d'examiner l'influence de la composition des milieux de culture sur la croissance de *C. metallidurans* CH34, c'est-à-dire le citrate en CSM et les carbonates mais également la diminution des phosphates en TSM15%.

1. Effet de la concentration en citrate, phosphates et carbonates en condition aérobie

Les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 dans les milieux CSM et TSM15% ont été déterminées et comparées à la courbe de croissance en condition classique de culture de la souche en milieu TSM. Elles sont présentées sur la figure 53.

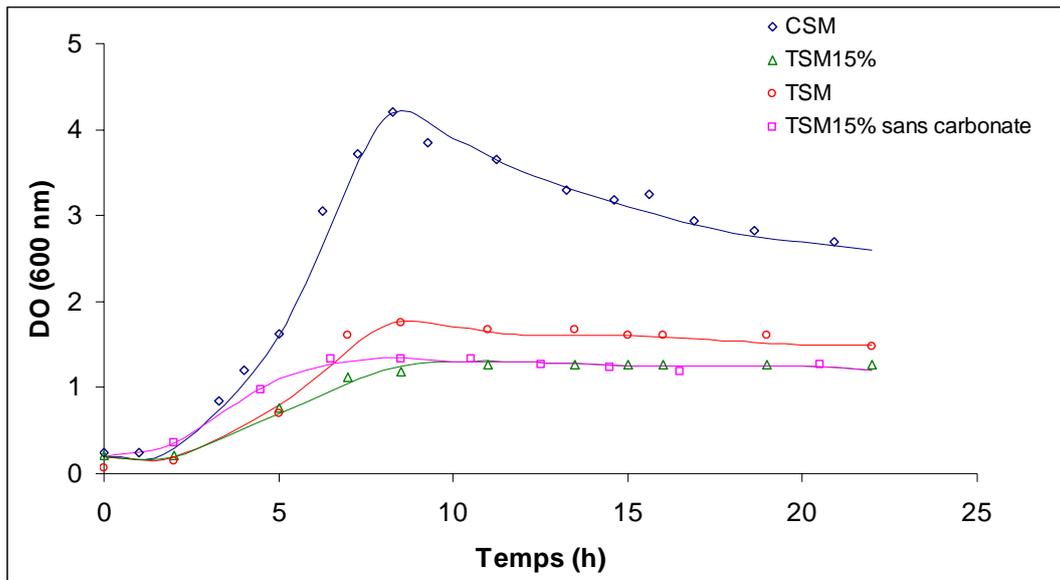


Figure 53 : Courbes de croissance types de *C. metallidurans* CH34 en milieu TSM, CSM et TSM15% en fonction de la densité optique à 600 nm.

D'après les courbes de croissance, la phase de latence est courte, elle ne dépasse pas deux heures quel que soit le milieu. Nous pouvons donc en conclure qu'il n'y a pas de temps d'adaptation de la souche à un milieu riche en citrate ni à une concentration plus faible en phosphate. La présence de citrate dans le milieu de culture CSM provoque une forte augmentation de la densité cellulaire. La bactérie semble utiliser le citrate comme source de carbone en plus du gluconate. Au vue de sa phase de latence égale, le métabolisme du citrate est constitutif*.

Les vitesses maximales de croissance ont été déterminées à partir de ces courbes et sont présentées dans la figure 54.

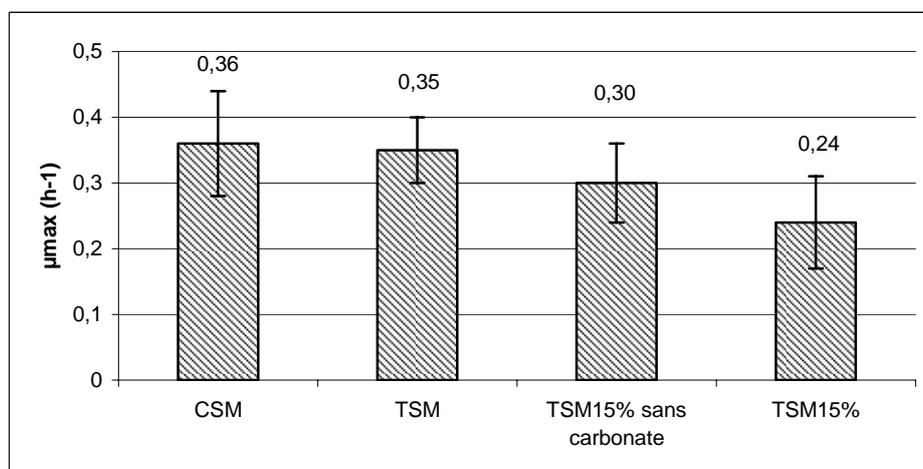


Figure 54 : Vitesses maximales de croissance (h⁻¹) dans les différents milieux de culture de *C. metallidurans* CH34.

Il n'y a pas de différences entre les vitesses maximales de croissance de la souche dans les milieux TSM et CSM. Le citrate n'a pas d'effet sur la vitesse maximale de croissance, au contraire des phosphates. En effet, le μ_{max} en milieu TSM15% sans carbonate est diminuée de 1/6 par rapport aux deux autres milieux. La présence de phosphates en concentration suffisante est essentielle pour une croissance efficace de la souche. Les phosphates sont intégrés dans les molécules constitutives de la bactérie (ADN, ARN, sucres phosphatés, LPS...) mais sont également essentiels au métabolisme énergétique de la cellule. Une concentration plus faible en phosphates provoque une chute importante μ_{max} de *C. metallidurans* CH34 avec une croissance très faible. L'étude de la bactérie ne serait pas pertinente dans ces conditions.

Les carbonates jouent également un rôle non négligeable dans la croissance. On remarque une diminution de 20% de la vitesse maximale de croissance entre les milieux TSM15% et TSM15% sans carbonate. A forte concentration, les carbonates inhibent la croissance de la bactérie. Ils ont également tendance à alcaliniser le milieu et il est nécessaire de contrôler le pH au cours du temps afin de rester dans une gamme de pH optimum pour la croissance. Une concentration plus élevée en carbonates provoque une chute de la vitesse maximale de croissance et le premier chapitre nous a montré qu'une concentration plus faible entraîne un risque plus important de précipitation de l'uranium dans le milieu.

Les écarts-type des vitesses de croissance sont élevés ce qui montre que la croissance de la souche est très dépendante des conditions de culture et qu'il est nécessaire de bien contrôler les différents paramètres de la culture. Les facteurs les plus importants pour cette croissance sont le pH, la température et la concentration en phosphates et en carbonates. Le pH doit être autour de 7,5 en début de croissance. La souche a tendance à alcaliniser le milieu en fin de culture. La température optimale de croissance est de 30°C, une température supérieure augmentant le risque d'apparition de mutations.

Maintenant que les effets du citrate, des carbonates et des phosphates sur la croissance de *C. metallidurans* CH34 sont définis, nous allons voir l'effet de l'ajout d'uranium dans les milieux de culture sur la croissance de la bactérie.

2. Apport d'uranium dans les milieux de culture et conséquence pour la croissance de *C. metallidurans* CH34

a. Apport d'uranyle en milieu CSM : Influence du citrate d'uranyle

D'après les calculs de spéciation théorique (voir chapitre 1), l'apport d'uranium en milieu CSM provoque l'apparition d'un complexe de citrate d'uranyle $UO_2(Cit)_2^{4-}$.

La croissance de *C. metallidurans* CH34 a ainsi pu être étudiée en présence de 100 μ M à 30mM de citrate d'uranyle. La figure 55 présente les courbes de croissance en présence d'1mM du complexe d'uranyle comparativement au témoin CSM sans uranium.

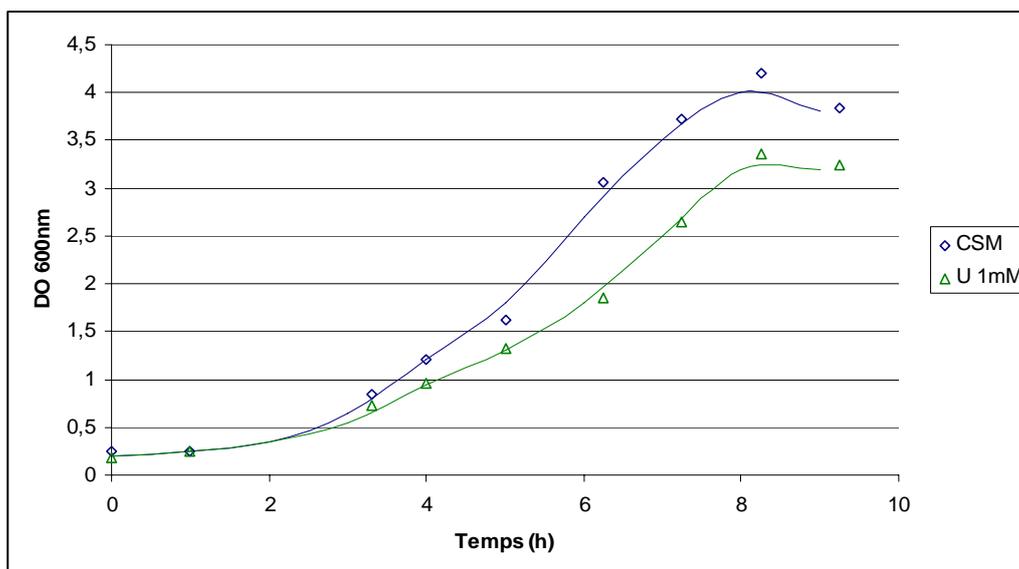


Figure 55 : Courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle à 1mM et dans le témoin CSM sans uranium.

Le temps de latence est identique en présence ou en absence d'uranium. La bactérie n'a pas de temps d'adaptation quelle que soit la concentration initiale en uranyle.

Les vitesses maximales de croissance ont été calculées à partir des phases exponentielles de ces courbes de croissance. La figure 56 présente l'évolution de ces μ_{max} en fonction de la concentration en citrate d'uranyle. Ces vitesses de croissance sont en relatif car elles sont comparées à celles des témoins étudiés en parallèle afin de s'affranchir des différences de culture rencontrées au laboratoire.

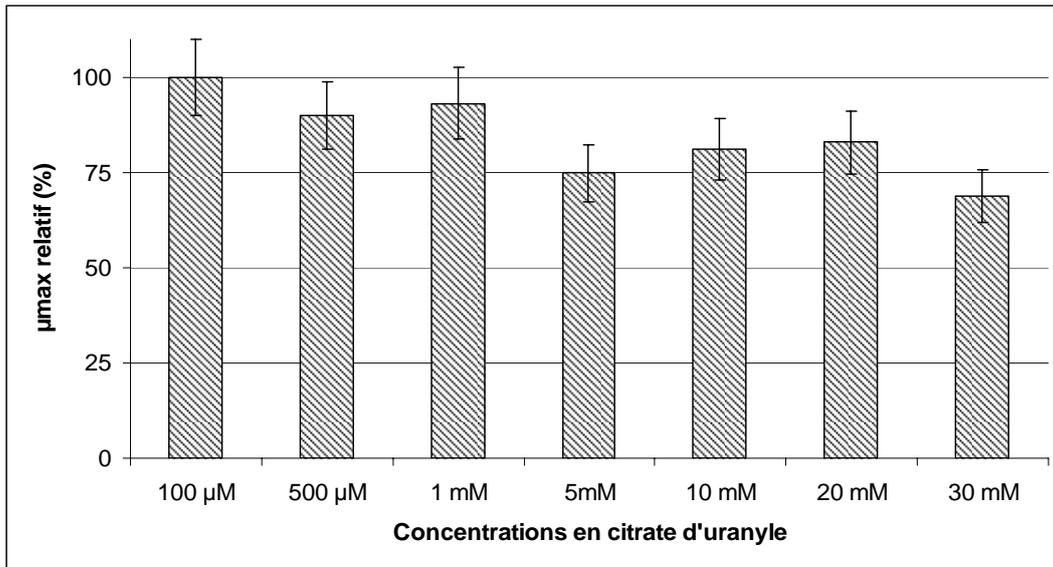


Figure 56 : Evolution des vitesses maximales de croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle à différentes concentrations.

Le citrate d'uranyle n'a pas d'effet sur la vitesse maximale de croissance de *C. metallidurans* CH34 jusqu'à une concentration de 1mM incluse. A partir de 5mM, on peut voir une baisse du μ_{max} , jusqu'à 70% environ du μ_{max} de la souche en CSM pour une concentration de 30mM. Nous n'avons pas réussi à inhiber totalement la croissance de la souche avec de telles concentrations. On peut donc affirmer que la concentration minimale inhibitrice du citrate d'uranyle pour *C. metallidurans* CH34 est supérieure à 30mM.

b. Apport d'uranium en milieu TSM15% : influence du carbonate d'uranyle

D'après les calculs de spéciation théorique (voir chapitre 1), l'apport d'uranium en milieu TSM15% provoque, à pH 7,5, l'apparition de complexe de carbonate d'uranyle $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ (95%) et $UO_2(CO_3)_2^{2-}$ (5%).

La croissance de *C. metallidurans* CH34 a ainsi pu être étudiée en présence de 100μM à 3mM de carbonate d'uranyle. La figure 57 présente les courbes de croissance à 1mM et 3mM d'uranium comparativement au témoin TSM15%.

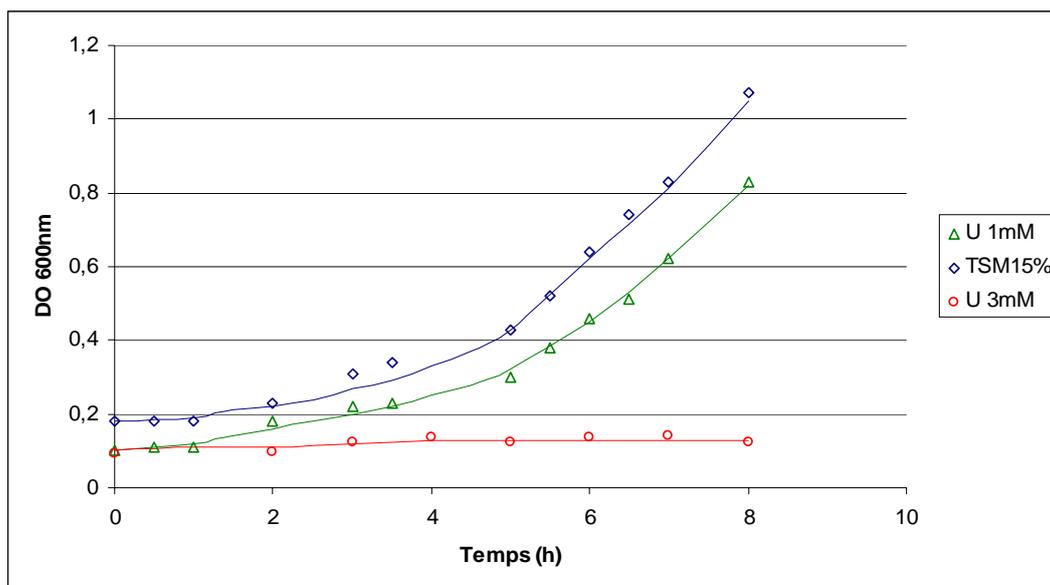


Figure 57 : Courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de carbonate d'uranyle à 1mM et dans le témoin TSM15%.

Le temps de latence est identique en présence ou en absence d'uranium. La bactérie n'a pas de temps d'adaptation quelle que soit la concentration initiale en uranyle.

Les vitesses maximales de croissance ont été calculées à partir des phases exponentielles. La figure 58 présente l'évolution des μ_{max} en fonction de la concentration en carbonate d'uranyle. Comme pour le citrate d'uranyle, les vitesses de croissance sont relatives à celles des témoins étudiés en parallèle afin de s'affranchir des différences de culture rencontrées au laboratoire.

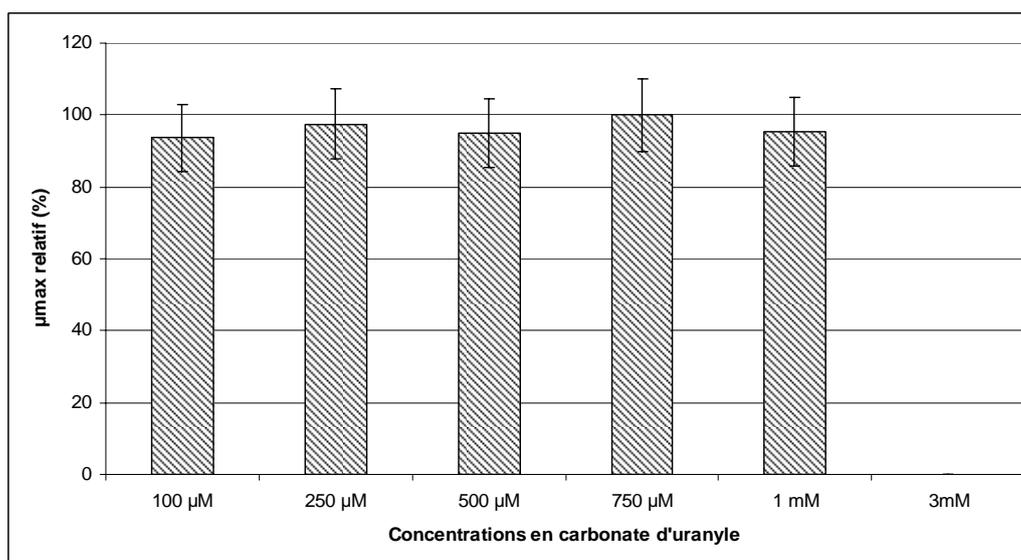


Figure 58 : Evolution des vitesses maximales de croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de carbonate d'uranyle à différentes concentrations.

Le carbonate d'uranyle n'a pas d'effet sur la vitesse spécifique de croissance de la bactérie jusqu'à une concentration de 1mM d'uranium. En revanche, il n'y a plus aucune croissance visible de *C. metallidurans* CH34 à partir de 3mM.

Au vue de ces courbes de croissance et des vitesses maximales de croissance, la concentration minimale inhibitrice du carbonate d'uranyle sur *C. metallidurans* CH34 est donc comprise entre 1 et 3mM.

Cependant, à partir de cette concentration seuil, nous avons observé l'apparition de précipités dans le milieu de culture. Au vue de la modélisation théorique par JCHESS, ces précipités seraient sans doute du phosphate d'uranyle. D'après ces résultats, deux hypothèses peuvent être formulées : soit le carbonate d'uranyle est toxique pour la cellule, soit l'absence de croissance des bactéries est due à une carence en phosphates, ces derniers étant immobilisés dans les précipités de phosphate d'uranyle.

c. Suivi de la concentration en phosphates dans les milieux de culture et conséquence sur la croissance de C. metallidurans CH34

Afin d'étudier la précipitation des phosphates dans le milieu TSM15% en présence de carbonate d'uranyle, les concentrations d'uranium et de phosphates solubles et précipités ont été dosés dans les milieux de culture en l'absence de bactéries. Les figures 59 et 60 présentent la part de chaque fraction dans le milieu de culture en fonction de la concentration en uranium. Les concentrations de chaque élément ont été déterminées par spectrophotométrie après centrifugation, pour séparer les deux fractions, et dissolution des précipités en milieu acide.

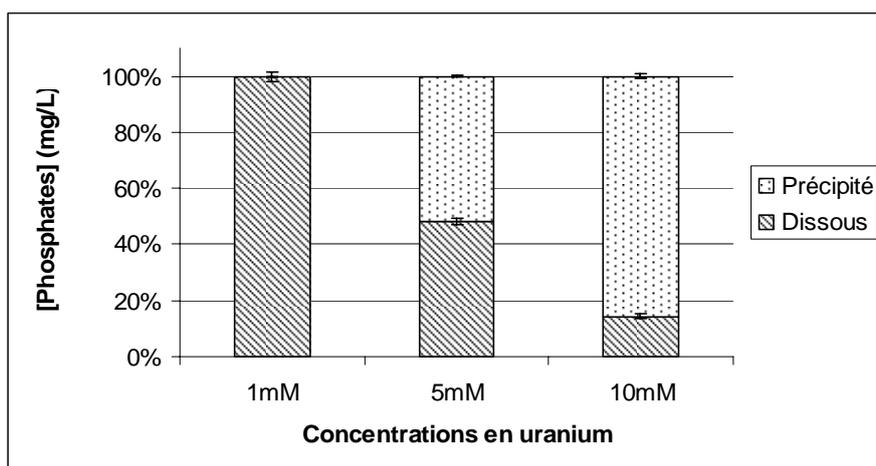


Figure 59 : Proportion de phosphates dissous et précipités dans le milieu TSM15% en fonction de la concentration en uranium.

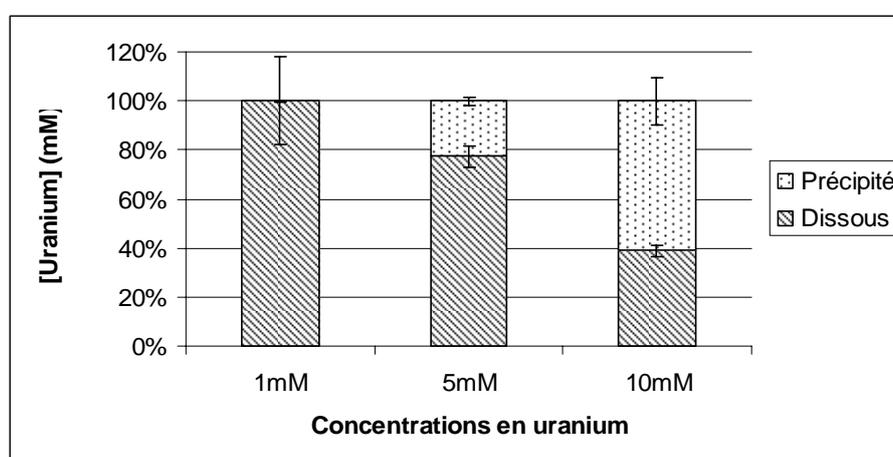


Figure 60 : Proportion d'uranium dissous et précipités dans le milieu TSM15% en fonction de la concentration en uranium.

Lorsque 1mM d'uranium est ajouté au milieu de culture, la quantité de phosphates et d'uranium dissous est égale à la quantité initiale mise en solution. Cependant, lorsque la concentration en uranium augmente et dès 5mM d'uranyle, les phosphates précipitent. La concentration en phosphates solubles diminue à 100 μ M (ou 30mg.L⁻¹) pour 5mM d'uranium et 30 μ M (ou 4,5mg.L⁻¹) pour 10mM d'uranium. Celui-ci précipite également et l'on retrouve respectivement 80 et 20% d'uranium soluble. Ces précipités de phosphates d'uranyle peuvent avoir deux effets sur les bactéries. Ils provoquent la non-biodisponibilité du phosphate pour la bactérie qui se retrouve en carence de cet élément essentiel pour sa croissance. Ils peuvent également avoir un effet direct toxique sur la bactérie.

Des croissances de *C. metallidurans* CH34 en présence de concentrations de 30 μ M et 100 μ M en phosphates sans uranium ont été réalisées afin de déterminer quel effet provoquait ces quantités de phosphates sur le développement de la bactérie.

La figure 61 présente les courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 dans un milieu TSM contenant 30 et 100 μ M de phosphates. En comparaison, la concentration en phosphates en milieu TSM15% est de 200 μ M.

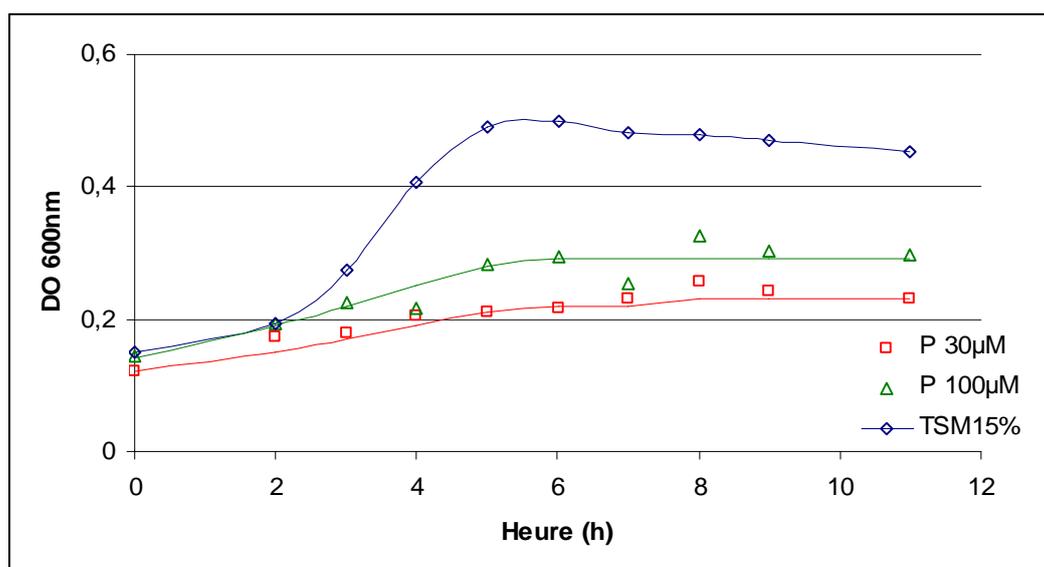


Figure 61 : Courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de différentes concentrations en phosphates.

On remarque une croissance très faible, voire nulle, aux concentrations de 100 μ M et 30 μ M en phosphates. Ces concentrations sont celles retrouvées lors de la précipitation avec l'uranium en présence de 5 et 10mM du radionucléide (voir figure 59 et 60). Aucune vitesse spécifique de croissance ne peut être calculée expérimentalement du fait de la faible biomasse produite. Ces résultats semblent montrer que l'absence de croissance à ces concentrations d'uranium en milieu TSM15% pourrait être due en fait à une concentration trop faible de phosphates dans le milieu et non pas à un effet du radionucléide sur la bactérie elle-même.

Afin d'éliminer l'hypothèse d'un effet toxique des précipités de phosphates d'uranyle, la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de ces complexes a été réalisée en milieu TSM à une concentration de 1mM d'uranium. La concentration des phosphates en milieu TSM est de 1,3mM. La figure 62 présente les courbes de croissance de la bactérie dans ces conditions.

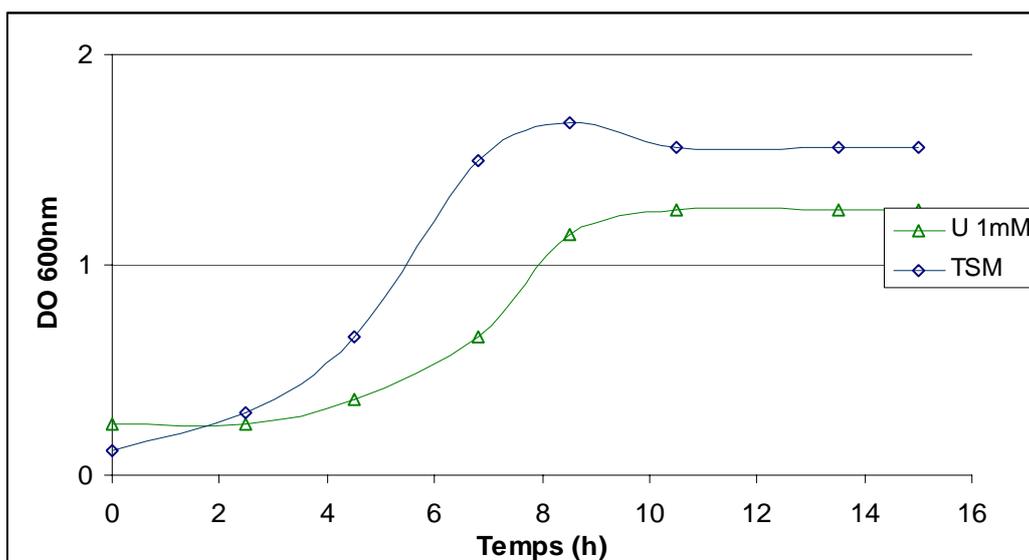


Figure 62 : Courbes de croissance de *C. metallidurans* CH34 en milieu TSM en présence de précipités de phosphates d'uranyle.

Nous pouvons observer une croissance de la souche en présence de précipités de phosphate d'uranyle. La vitesse maximale de croissance est plus faible que celle du témoin non exposées à l'uranium. Les dosages de l'uranium dans le milieu de culture et dans le culot de centrifugation montrent que l'ensemble de l'uranium initialement introduit est sous forme précipité. Cette quantité correspond à celle rencontrée en TSM15% en présence de 5mM d'uranium où aucune croissance n'est visible. La concentration en phosphates a également été déterminée et elle est proche de 500µM, c'est à dire supérieure à sa concentration dans le milieu TSM15%.

Ainsi, l'absence de croissance en milieu TSM15% à des concentrations en uranium supérieures à 1mM est due à la carence en phosphates pour les bactéries. Ils se complexent et précipitent avec l'uranium. La quantité en phosphates disponibles pour la bactérie devient trop faible pour assurer une croissance exponentielle de la souche. Nous pouvons affirmer que les précipités de phosphate d'uranyle ne sont pas toxiques pour la cellule.

3. Croissance de *C. metallidurans* CH34 en anaérobie

La présence de nitrate NO_3^- est essentielle au développement de la bactérie en anaérobie. Cependant, aucune croissance n'est visible lorsque ce composé est ajouté dans les milieux TSM, TSM15% et CSM.

De manière à permettre la croissance de *C. metallidurans* CH34 en anaérobie, dans des conditions permettant de les exposer à l'uranium, un milieu synthétique a été développé. Ce milieu est décrit dans le chapitre Matériel et Méthode. Le milieu synthétique créé permet une croissance de la souche grâce à la présence conjointe du lactate, du gluconate et du nitrate. Le lactate seul ne permet pas le développement de la bactérie. Il est nécessaire d'ajouter une autre source de carbone assimilable par la bactérie. Le citrate ne semble pas pouvoir jouer ce rôle en anaérobie au contraire du gluconate.

La croissance de *C. metallidurans* CH34 en anaérobie est très lente. Il n'y a pas d'augmentation visible de la densité cellulaire avant 48h et la densité optique maximale ne dépasse pas 0,8 après 5 jours, ce qui est équivalent à la DO_{600} maximale en TSM 0,2% de gluconate en aérobie.

Seul le citrate d'uranyle est soluble dans ce milieu de culture. L'uranium précipite lorsqu'il est en présence de 40mM de bicarbonates et avec une concentration en phosphate identique à celle du TSM15%. Ce phénomène peut être dû à une baisse de potentiel d'oxydoréduction avec l'anaérobie ou une alcalinisation trop importante du milieu par le bicarbonate. En effet, il n'est pas possible de contrôler le pH au cours du temps du fait du système d'anaérobiose.

C'est pour cela que seule l'accumulation du citrate d'uranyle sera étudiée en anaérobie. La CMI n'a pu être déterminée ici. Elle est cependant supérieure à 1mM, car une croissance de la souche est observée à cette concentration.

II. CROISSANCE ET RESISTANCE DE *D. RADIODURANS* R1 A DIFFERENTES FORMES D'URANIUM

Les croissances de *D. radiodurans* R1 en présence de citrate et de carbonate d'uranyle seront réalisées en milieu semi-synthétique dans lequel seront ajoutés du citrate en concentration en excès (trois fois la concentration en uranium) ou du carbonate à 40mM.

De la même façon, la croissance de la bactérie dans ce milieu semi-synthétique mais également l'influence des modifications de composition ont été étudiés.

1. Croissance de *D. radiodurans* R1 en milieu TYG et effet du citrate

Le milieu TYG est le milieu classique de culture de *D. radiodurans* R1. Une courbe de croissance typique est présentée en figure 63.

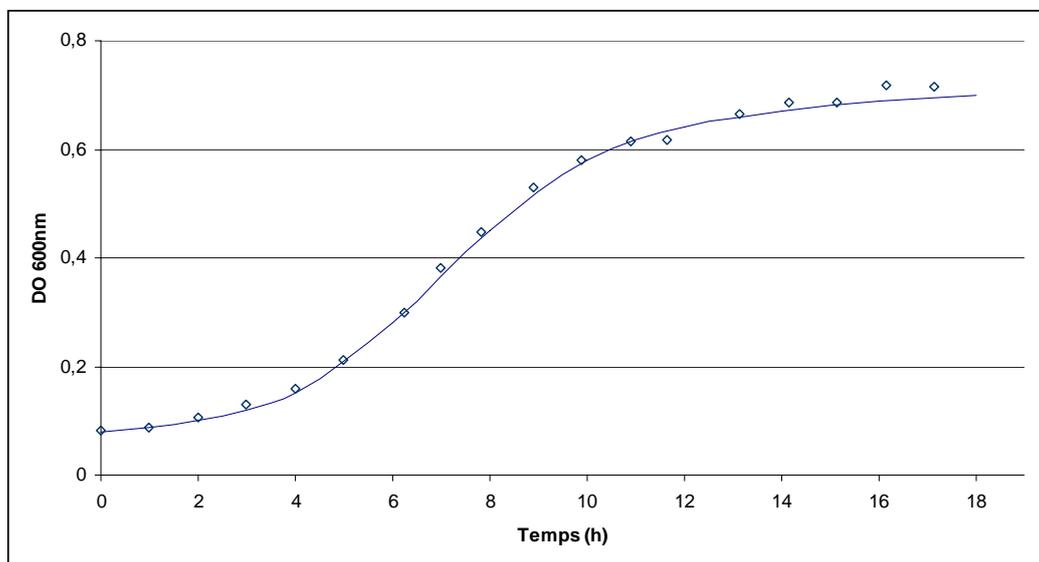


Figure 63 : Courbe de croissance de *D. radiodurans* R1 en milieu TYG.

La vitesse maximale de croissance en milieu TYG est de $0,23 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ avec une phase de latence d'environ 2,5 h.

Il a été décrit que la bactérie n'était pas capable de croître en présence de citrate comme seule source de carbone. Cependant, nous pouvons également observer que l'ajout de cet intermédiaire du cycle tricarboxylique dans le milieu TYG provoque une augmentation de la phase de latence.

La figure 64 présente l'évolution de la vitesse spécifique de croissance et de la phase de latence de *D. radiodurans* R1 en milieu TYG en fonction de la concentration en citrate.

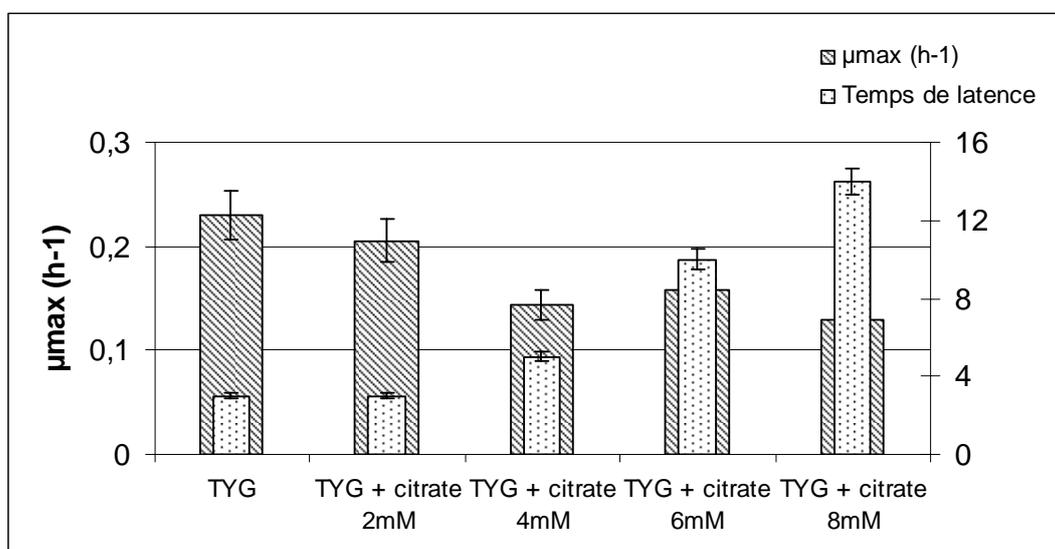


Figure 64 : Evolution des temps de latence et des vitesses spécifiques de croissance de *D. radiodurans* R1 en milieu TYG en fonction de la concentration en citrate.

Suite à l'introduction d'une molécule dans le milieu de culture, l'augmentation de la durée de la phase de latence est un signe d'adaptation de la bactérie. Pendant cette phase, la bactérie synthétise soit les éléments indispensables à l'utilisation de cette molécule soit les mécanismes de défense si celle-ci est toxique pour la cellule.

La bactérie n'a pas la capacité de croître en présence de citrate comme seule source de carbone alors qu'elle code pour les enzymes du cycle tricarboxylique. Le citrate à forte concentration serait donc toxique pour *D. radiodurans* R1 et l'augmentation de la durée de la phase de latence serait le temps nécessaire à la mise en place des systèmes de résistance à la molécule.

Dans ce milieu empirique, la concentration en phosphates n'est pas connue. Nous l'avons donc dosé et sa concentration est voisine de 1mM soit une valeur proche de celle rencontrée en milieu TSM.

Dans ces conditions, l'uranium précipite totalement lorsqu'1mM du radionucléide est ajouté. En conséquence nous avons dû développer un milieu permettant la croissance de la souche et le maintien du radionucléide sous forme soluble.

2. Croissance en milieu semi-synthétique et effet de l'uranium

Le milieu semi-synthétique conçu pour *D. radiodurans* R1 contient tout les éléments nécessaires à sa croissance. En l'absence de facteurs de croissance tels que des acides aminés, que lui apportent les peptones, et de l'acide nicotinique, comme précurseur du NAD, molécule indispensable au métabolisme énergétique de la cellule (Venkateswaran *et al.* 2000), la souche ne se développe pas. Une concentration en phosphates inférieure à 1mM ne permet pas la croissance de la bactérie dans ce milieu.

La figure 65 présente les courbes de croissance de *D. radiodurans* R1 dans ce milieu semi-synthétique (MS), en présence de différentes concentrations en citrate et 40mM de bicarbonate.

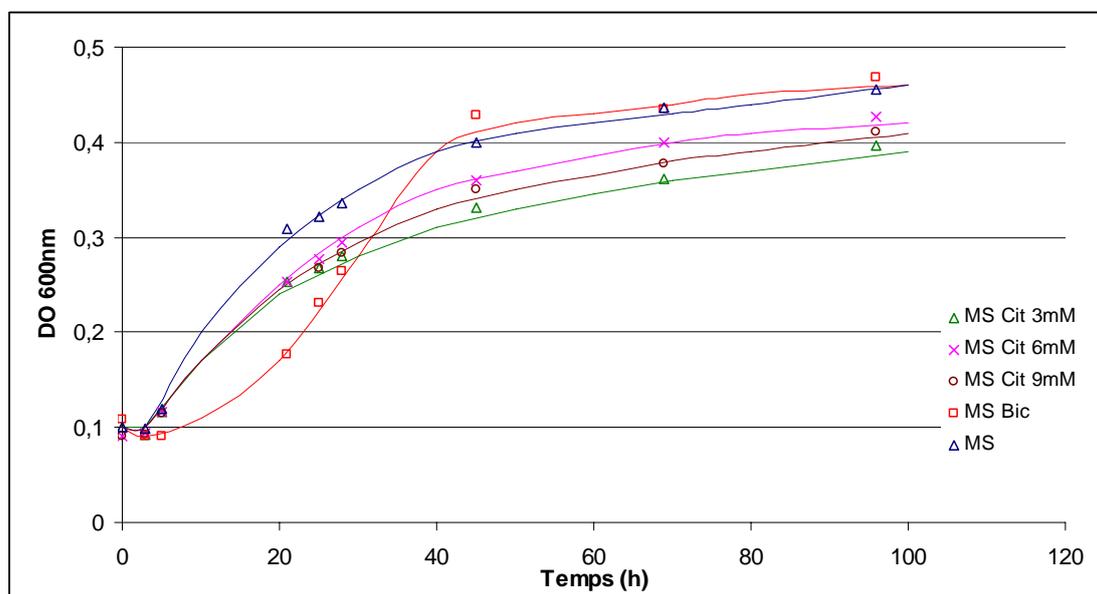


Figure 65 : Courbes de croissance de *D. radiodurans* R1 en milieu semi-synthétique supplémenté en citrate ou en bicarbonate.

La croissance de *D. radiodurans* R1 dans le milieu semi-synthétique est faible. La vitesse maximale de croissance est de $0,11 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$. La durée de la phase de latence est de l'ordre de 5h. L'ajout de citrate jusqu'à 9mM ne rallonge pas ce temps.

Au contraire, l'ajout de 40mM de bicarbonate entraîne une augmentation de la durée de la phase de latence, et la croissance ne débute qu'après 8h.

La concentration en phosphates est élevée et proche de celle du milieu TSM pour *C. metallidurans* CH34. Il est donc probable que l'uranium précipite dans ce milieu semi-synthétique même en présence de 40mM de bicarbonates ou de 9mM de citrate. Ces concentrations sont les valeurs limites afin d'observer une croissance de la souche. Au-delà, le développement de la bactérie est inhibé. Il en est de même pour la concentration en phosphate, qui ne peut être diminuée sans risque d'absence de croissance de la souche, ou du moins une forte diminution de la vitesse maximale de croissance.

Effectivement, nous avons vérifié que l'uranium n'est pas stable dans ce milieu en présence de ces complexants. De manière à perturber le moins possible le milieu et la croissance des bactéries, des cultures en présence de citrate et de carbonate d'uranyle à concentrations 1, 2 et 3 mM ont été suivies pendant 72h sans prélèvement tout en contrôlant le pH qui doit être compris entre 7 et 7,5. Les résultats de la croissance sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Croissance de *D. radiodurans* R1 en milieu semi-synthétique en présence de carbonate et de citrate d'uranyle après 72h. Le signe + représente une croissance visible, le signe ± représente une faible croissance et le signe – représente une absence de croissance.

	Citrate d'uranyle		Carbonate d'uranyle	
	<i>Croissance</i>	<i>Repiquage en TYG agar</i>	<i>Croissance</i>	<i>Repiquage en TYG agar</i>
1mM	+	+	+	+
2mM	±	+	+	+
3mM	-	+	-	+

Un arrêt de la croissance de la bactérie à partir de 2mM d'uranium est observée dans les deux conditions. Les cultures ont été repiquées en milieu TYG agar pour déterminer un effet bactériostatique* ou bactéricide* de l'uranium. L'effet de l'uranium serait bactériostatique et non bactéricide car la croissance est de nouveau visible après repiquage en milieu riche.

Comme pour *C. metallidurans* CH34, on peut se demander si cette inhibition ne serait pas due à un effet indirect de l'uranium sur la cellule.

En effet, le pH du milieu semi-synthétique supplémenté en bicarbonate doit être contrôlé pendant 8h car il s'alcalinise au cours du temps du fait de la présence des carbonates. Cependant, après 8h, le pH se stabilise. C'est à partir de ce moment que l'uranium semble précipiter dans le milieu, probablement avec les phosphates. Ce phénomène pourrait indiquer une disparition des carbonates du milieu, sans doute par dégagement de CO₂. Ainsi, le pH ne s'alcalinise plus et l'uranium précipite avec les phosphates, qui sont devenus les complexants le plus fort de l'uranium disponibles dans le milieu.

Nous aurions donc la même explication pour l'inhibition de la croissance de *D. radiodurans* R1, à partir de 2mM d'uranium, que pour *C. metallidurans* CH34. La précipitation de l'uranium entraînerait une absence de phosphates disponibles pour la croissance de la bactérie.

III. CROISSANCE DE *R. PALUSTRIS* EN PRESENCE D'URANIUM

Le milieu Hutner, utilisé communément pour la croissance de *R. palustris*, est un milieu empirique et complexe. Sa concentration en phosphates est trop importante (20mM) pour espérer être en présence d'uranium soluble.

Un milieu Hutner modifié a donc été mis au point avec une concentration en phosphates de 1mM, comme dans le TSM de *C. metallidurans* CH34 et le milieu semi-synthétique de *D. radiodurans* R1.

La croissance de la bactérie s'effectue en anaérobie et à la lumière blanche. Le temps de latence est long, presque 48h, et la densité optique maximale est atteinte au bout de 4 jours. Ce temps de latence correspond à la synthèse de toute la machinerie nécessaire à l'utilisation de l'énergie lumineuse pour le développement de la cellule et à la consommation du dioxygène résiduel. La diminution de la concentration en phosphate n'augmente pas le temps de latence et ne freine pas la croissance de la souche. Cette concentration élevée de 20mM avait été fixée ainsi pour le pouvoir tampon des phosphates.

La souche résiste parfaitement à une concentration en uranium de 1mM, le radionucléide restant soluble dans ces conditions. L'étude plus approfondie de la

résistance de *R. palustris* à l'uranium n'a pas été réalisée. Nous avons préféré privilégier la mise en évidence d'une accumulation par la bactérie et la détermination de la spéciation inconnue d'uranium dans le milieu Hutner modifié (voir partie C et D).

CONCLUSION CROISSANCE ET RESISTANCE

La croissance des différentes souches est donc possible dans les milieux de culture créés pour obtenir différentes spéciations de l'uranium.

Pour *C. metallidurans* CH34 en milieu CSM, les paramètres de la croissance sont équivalents à ceux observés lorsqu'elle est cultivée dans le milieu classique TSM. La densité optique maximale obtenue est quatre fois supérieure du fait de la présence d'une seconde source de carbone. En milieu TSM15%, la vitesse spécifique de croissance est diminuée de 30%. La croissance de *C. metallidurans* CH34 est inhibée à partir d'une concentration en carbonate d'uranyle supérieure à 1mM et elle est diminuée à partir d'une concentration en citrate d'uranyle supérieure à 20mM. Cependant, en présence de carbonate d'uranyle, cet effet de l'uranium sur la bactérie n'est pas dû à un pouvoir toxique de l'élément. En effet, à ces concentrations et dans ces milieux, il précipite avec les phosphates. Ceux-ci ne sont plus disponibles pour la cellule et elle ne peut croître en absence de cet élément.

En anaérobiose, la croissance de la bactérie est plus lente. Nous n'étudierons par la suite que les conséquences de l'exposition de la bactérie au citrate d'uranyle. En effet, l'uranium précipite en présence d'1mM de phosphates et de 40mM de bicarbonate et aucun développement n'est possible lorsque la concentration en phosphates est diminuée pour obtenir du carbonate d'uranyle stable.

Pour *D. radiodurans* R1 en milieu semi-synthétique, la croissance est fortement diminuée par rapport au milieu classique TYG. Il a de plus été montré que la présence de citrate augmentait la durée de la phase de latence de la bactérie. Cet allongement est le signe soit de la mise en place d'un système inductif du métabolisme du citrate soit d'un système de défense contre cette même molécule. Les effets de l'uranium sont identiques quelle que soit sa spéciation. La croissance de la souche est inhibée à partir de 2mM du radionucléide. Comme pour *C. metallidurans* CH34, il semble que la complexation des phosphates à l'uranium soit responsable de l'arrêt de la croissance à partir de cette concentration.

Pour *R. palustris*, dont la croissance n'é été étudiée qu'en anaérobie, la diminution de la concentration des phosphates de 20mM à 1mM ne semble pas affecter la croissance de la souche. Il n'y a pas d'inhibition de la croissance en présence d'1mM d'uranium.

Le tableau 12 récapitule les conditions étudiées pour chaque bactérie, ainsi que la spéciation théorique de l'uranium dans les différents milieux de culture et la CMI associée.

Tableau 12 : Récapitulatif des résultats de spéciation théorique et de croissance.

Souche	<i>C. metallidurans</i> CH34		<i>D. radiodurans</i> R1	<i>R. palustris</i>		
Condition	pH 7,5 aérobie		pH 7 anaérobie	pH 7,5 aérobie		pH 7 anaérobie
Milieu	CSM	TSM15%	Anaérobie citrate	MS Citrate	MS Bicarbonate	Hutner modifié
Spéciation théorique	100% $UO_2(Cit)_2^{4-}$	95% $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ + 5% $UO_2(CO_3)_2^{2-}$	100% $UO_2(Cit)_2^{4-}$	100% $UO_2(Cit)_2^{4-}$	90% $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ + 10% $UO_2(CO_3)_2^{2-}$	Non calculable Malate d'uranyle ?
CMI	> 30mM	> 1mM	> 1mM	> 2mM	> 2mM	> 1mM

Nous allons maintenant voir l'accumulation de l'uranium par les bactéries pendant la croissance mais également à forte densité cellulaire et à différents pH. La précipitation de l'uranium dans les milieux sans bactérie sera également suivie en parallèle afin de mettre en évidence un possible effet bactérien dans cette complexation aux phosphates.

PARTIE C : ACCUMULATIONS ET OBSERVATIONS

Les cinétiques d'accumulation de l'uranium dans les culots bactériens sont suivies au cours de la croissance. Les résultats sont directement comparés aux cinétiques de consommation de l'uranium présent dans les surnageants des milieux de culture. Dans ces expériences, l'uranium total est dosé par ICP-MS dans les culots bactériens et par spectrophotométrie dans les surnageants de culture. L'utilisation de cette dernière méthode pour le dosage de concentrations élevées en uranium ($\geq 200\mu\text{M}$) est plus adaptée que l'ICP-MS, utilisée plutôt pour le dosage d'éléments trace. A de telles concentrations, l'erreur due aux fortes dilutions peut être importante ($\geq 10\%$).

Afin de déterminer si une possible précipitation de l'uranium dans les milieux est le fait des bactéries ou le fait d'une complexation naturelle avec les phosphates, des témoins de précipitation sont réalisés. Ces témoins ne diffèrent des essais que par l'absence de bactérie dans le milieu. L'uranium est dosé de la même manière (culots et surnageants) et en parallèle des essaisensemencés avec les bactéries.

I. ACCUMULATION DE L'URANIUM PAR *C. METALLIDURANS* CH34

1. Accumulation du citrate d'uranyle en aérobie à pH 7,5

Les bactéries sont exposées à 1mM d'uranium qui, suivant les calculs réalisés sous JCHESS, est sous forme de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 7,5 en aérobie.

La figure 66 présente les proportions d'uranium soluble retrouvé dans le surnageant de culture et de l'uranium précipité et/ou accumulé par la bactérie retrouvé dans le culot.

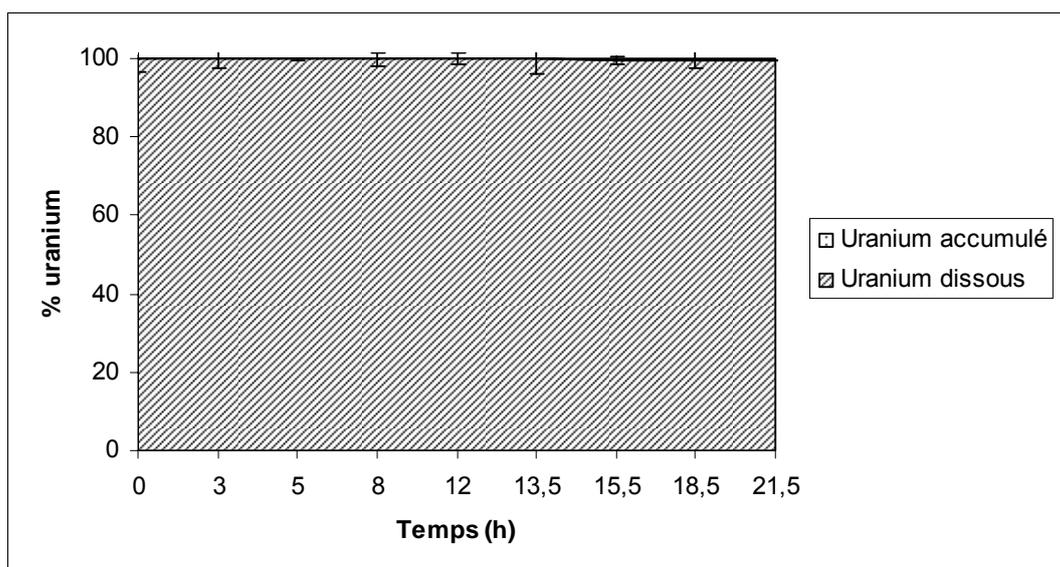


Figure 66 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle 1mM à pH 7,5 en milieu CSM.

Aucun précipité n'est mis en évidence dans le milieu CSM à pH 7,5 en aérobie en absence de bactéries. L'uranium reste complexé au citrate pendant la croissance. On ne remarque cependant aucune accumulation et/ou adsorption significative par la bactérie pendant toute la cinétique. Moins de 2% de l'uranium initialement présent dans le milieu est retrouvé dans le culot bactérien.

Cette observation est corrélée avec celle des courbes de croissance de la partie B. En effet, aucun effet de l'uranium n'était mis en évidence. La bactérie ne semble pas avoir d'interaction significative avec le citrate d'uranyle quel que soit son état physiologique et la phase de la croissance. Il n'est pas exclu que quelques bactéries accumule de l'uranium mais la diminution de concentration dans le surnageant n'est pas significative.

Pour vérifier cette hypothèse, des observations au microscope électronique en transmission ont été réalisées à partir d'une culture identique.

L'apparence des bactéries non exposées et des bactéries exposées à 4mM de citrate d'uranyle dans le milieu CSM en phase de latence et en phase exponentielle de croissance sont présentées en image 1.

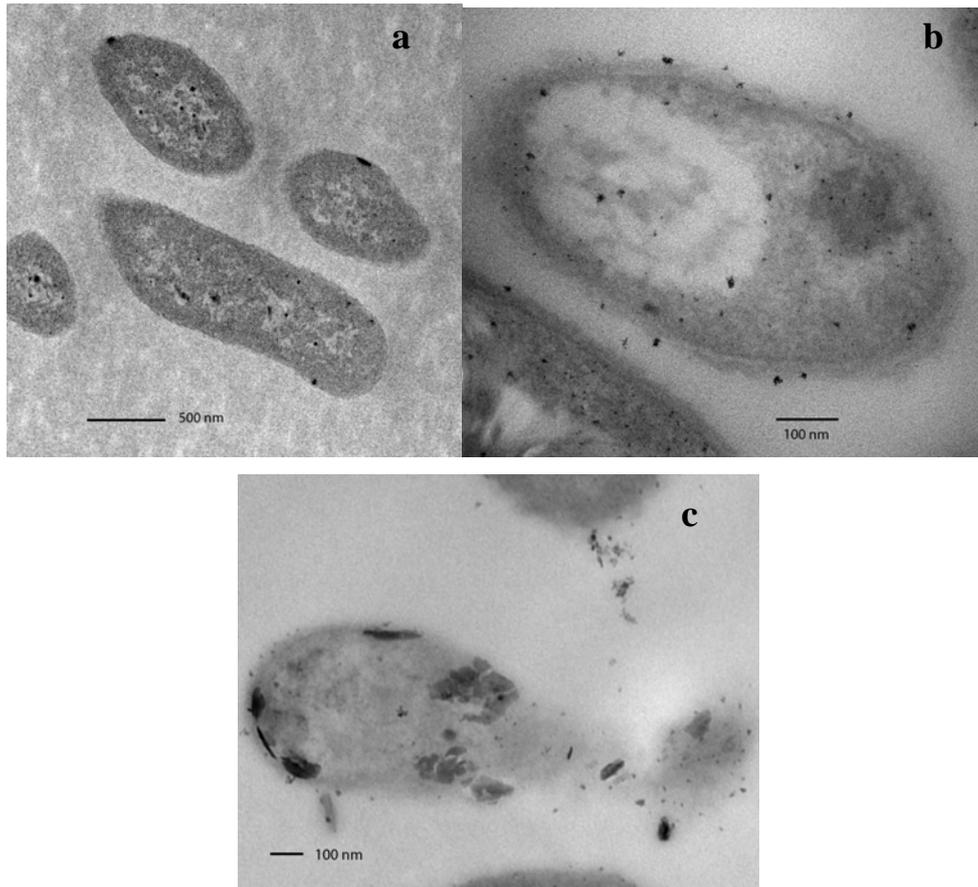


Image 1 : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 7,5 en aérobic. (a) Bactéries non exposées en milieu TSM. (b) Citrate d'uranyle 4mM en phase exponentielle (c) Citrate d'uranyle 4mM en phase de latence.

Les points noirs répartis aléatoirement sur les cellules proviennent du tétraoxyde d'osmium. On peut remarquer que l'état des bactéries est identique en présence ou en absence d'uranium et en phase de latence ou en phase exponentielle de croissance. Les structures cellulaires sont bien conservées. La grande majorité des cellules ne présente pas de précipités d'uranium à la surface ou à l'intérieur. Seules de rares bactéries montrent des plaques d'uranium à leur surface. La proportion de ces cellules est en adéquation avec les résultats des accumulations. Moins de 2% de l'uranium est accumulé et/ou adsorbé.

Il semble donc que *C. metallidurans* CH34 n'accumule pas le citrate d'uranyle à pH 7,5 en condition aérobic.

La spéciation dans le milieu CSM à pH 7,5 est $UO_2(Cit)_2^{4-}$. La modélisation de cette spéciation par JChess montre une autre forme de citrate d'uranyle, $UO_2H(Cit)_{aq}$ à pH 2. On peut se demander si la bactérie accumule, adsorbe ou précipite cette espèce.

Le comportement de la cellule est également différent à ce pH. La même question peut être posée pour la spéciation uranyle UO_2^{2+} majoritaire à pH 1.

2. Accumulation du citrate d'uranyle en aérobie à pH 2

La croissance de *C. metallidurans* à pH 2 n'est pas réalisable. Il n'y a aucun développement visible dans le milieu CSM et à ce pH. L'accumulation de l'uranium par la bactérie a donc été suivie au cours du temps après ensemencement du milieu à forte densité cellulaire ($DO_{600}=2$).

Le dosage de l'uranium dans le surnageant et dans le culot bactérien a été réalisée de la même manière que dans le paragraphe précédent avec une concentration initiale de 1mM.

La figure 67 présente la proportion d'uranium dans le surnageant et le culot bactérien au cours du temps dans le milieu CSM à pH 2 et en aérobie.

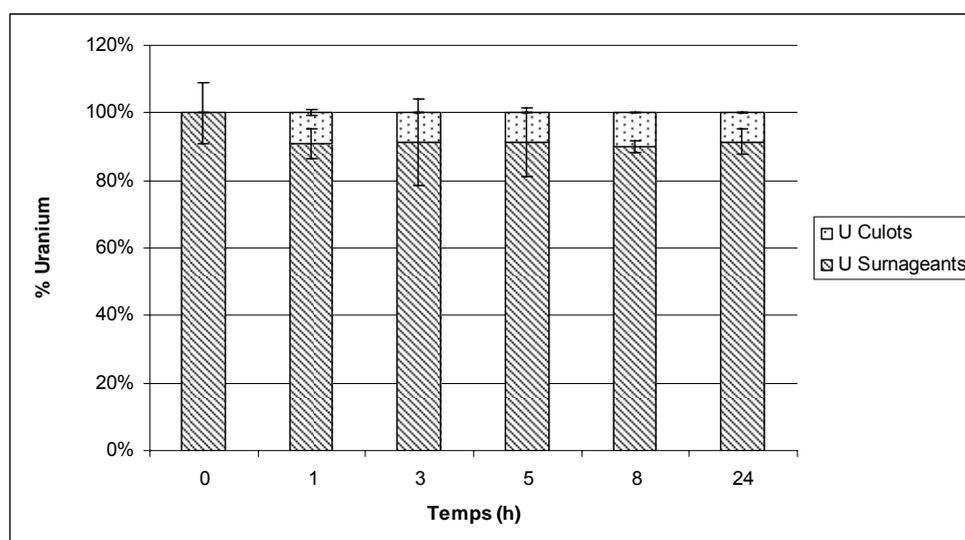


Figure 67 : Proportion d'uranium présent dans les surnageants et dans les culots bactériens après mise en contact avec *C. metallidurans* CH34 en milieu CSM à pH 2 et en aérobie. La concentration initiale en uranium est de 1mM.

Les témoins de précipitation montrent que tout l'uranium reste dissous dans le milieu de culture pendant 24h. On retrouve cependant de l'uranium dans le culot après centrifugation de la culture exposée à l'uranium. Cet uranium peut être soit accumulé par la bactérie soit précipité dans le milieu. Du fait de l'absence d'uranium dans les

culots des témoins constitué du milieu de culture sans bactérie, la bactérie doit accumuler de l'uranium ou provoquer sa précipitation au cours du temps.

La proportion d'uranium retrouvée dans le culot est stable dans le temps et elle est proche de 10% de l'uranium initialement introduit dans le milieu. Cette quantité de radionucléide est déterminée dès la première heure de mise en contact et ne varie plus au cours du temps, jusqu'à 24h.

Ce phénomène ne semble donc pas être d'ordre actif. La revivification des bactéries a été testée à chaque prélèvement et il semble que 100% des cellules soient mortes après 1h dans ces conditions. Aucune croissance n'est observée après repiquage sur milieu LB agar, qui est un milieu riche. L'accumulation ou la précipitation de l'uranium est donc un phénomène passif due à la biomasse morte présente dans le milieu de culture.

Les mêmes résultats sont observés à pH 1 en milieu CSM en condition aérobie. La figure 68 présente la proportion d'uranium dans le surnageant et le culot bactérien au cours du temps avec une concentration initiale de 1mM.

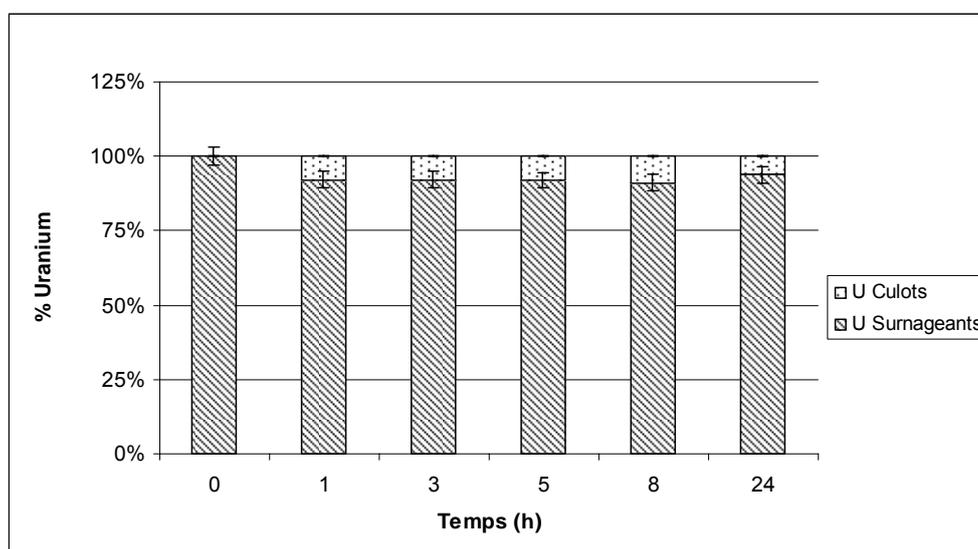


Figure 68 : Proportion d'uranium présent dans les surnageants et dans les culots bactériens après mise en contact avec *C. metallidurans* CH34 en milieu CSM à pH 1 et en aérobie. La concentration initiale en uranium est de 1mM.

La spéciation à pH 1 et pH 2 est théoriquement différente mais les résultats d'accumulation sont strictement identiques. Les conditions sont létales pour la bactérie et la proportion d'uranium accumulée ou précipité, donc migrant avec les

bactéries lors de la centrifugation, est d'environ 10% de la concentration initiale. La spéciation de l'uranium ne semble donc pas jouer un rôle dans ce phénomène.

Une première hypothèse serait que l'uranium se complexe aux groupes phosphates et carboxyles des constituants de la paroi cellulaire. Ces groupements sont devenus libres à ces pH très acides. Seul l'ion H^+ devient un compétiteur de l'uranium pour ces fonctions alors que d'autres molécules avec une affinité plus importantes peuvent se lier aux groupements carboxyles et phosphates à pH 7,5. La charge de du complexe d'uranium a également changé. Les complexes d'uranyle sont chargés négativement à pH 7,5, comme les groupements carboxyles ou phosphates, ce qui est défavorable à la formation de complexes même si l'uranyle lui-même est chargé positivement. A pH 1, l'ion uranyle UO_2^{2+} est libre, ce qui favorise les complexes avec les groupes carboxyles et phosphates, grâce à leur différence de charge. Ce serait pourquoi l'uranium montre un comportement différent à pH 1 et à pH 7 vis-à-vis de la bactérie.

Une autre hypothèse serait la libération de phosphates provoquée par la lyse des bactéries à pH 1 et 2. Dans un environnement local autour de la cellule, la concentration en phosphates deviendrait très importante ce qui provoquerait la précipitation localisée de l'uranium autour des cellules. Par contre, la concentration globale de cet élément dans le milieu n'augmenterait pas de manière significative et ainsi, seule une faible quantité d'uranium se complexerait aux phosphates ce qui expliquerait les 10% d'uranium retrouvé dans le culot bactérien.

L'image 2 présente l'apparence de *C. metallidurans* CH34 dans le milieu CSM à pH 1 après 24h de contact en présence d'uranium à 1mM.

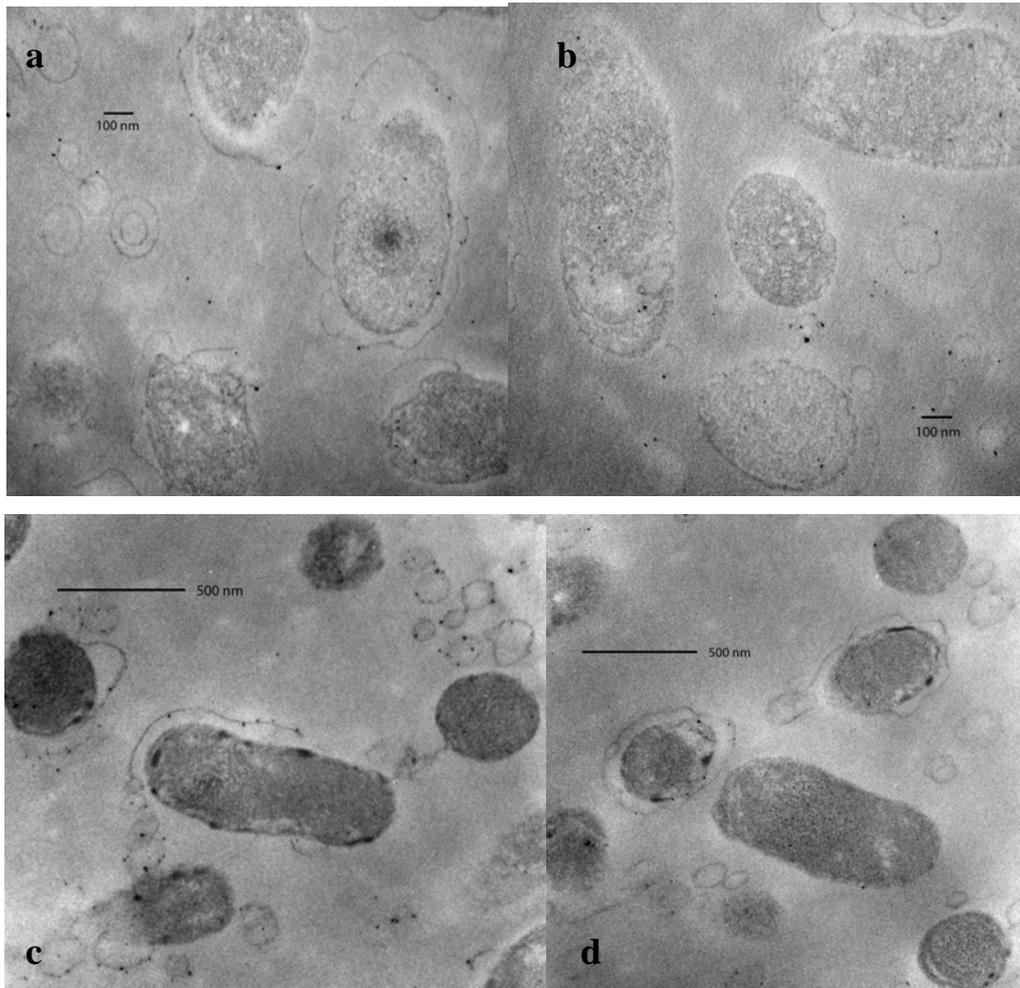


Image 2 : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 1 en aérobie. (a) et (b) Bactéries non exposées. (c) et (d) Citrate d'uranyle 1mM après 24h de contact.

Les bactéries dans le témoin sans uranium ont une apparence différente de celles à pH 7,5. On remarque la présence de cellules vides en grande quantité ce qui indiquerait un taux de lyse élevé. Les parois cellulaires sont également en mauvais état. Certaines bactéries conservent malgré tout une apparence identique que celles vivantes à pH 7,5.

Les bactéries en présence d'uranium présentent des précipités sur leur paroi cellulaire. Ils sont plus nombreux que ceux à pH 7,5 en aérobie ce qui est en adéquation avec les résultats d'accumulation. Aucun précipité de phosphate d'uranyle n'est visible autour des bactéries. L'uranium se fixerait donc sur des groupements libres de structures membranaires.

Nous avons vu dans le chapitre précédant que *C. metallidurans* CH34 pouvait également croître en présence de citrate d'uranyle en anaérobie à pH 7,5. Le métabolisme de la bactérie dans cette condition étant différent de celui en aérobie, il apparaît intéressant d'étudier son comportement vis-à-vis du citrate d'uranyle en absence d'oxygène. Nous allons maintenant voir son accumulation par la bactérie dans ces conditions.

3. Accumulation du citrate d'uranyle en anaérobie à pH 7,5

Les bactéries sont exposées à une concentration de citrate d'uranyle de 1mM en milieu CSM à pH 7,5 et en anaérobie. L'accumulation du citrate d'uranyle est suivie durant la croissance de la souche.

La figure 69 présente les proportions d'uranium soluble retrouvé dans le surnageant de culture et de l'uranium précipité et/ou accumulé par la bactérie retrouvé dans le culot à trois différents temps de culture.

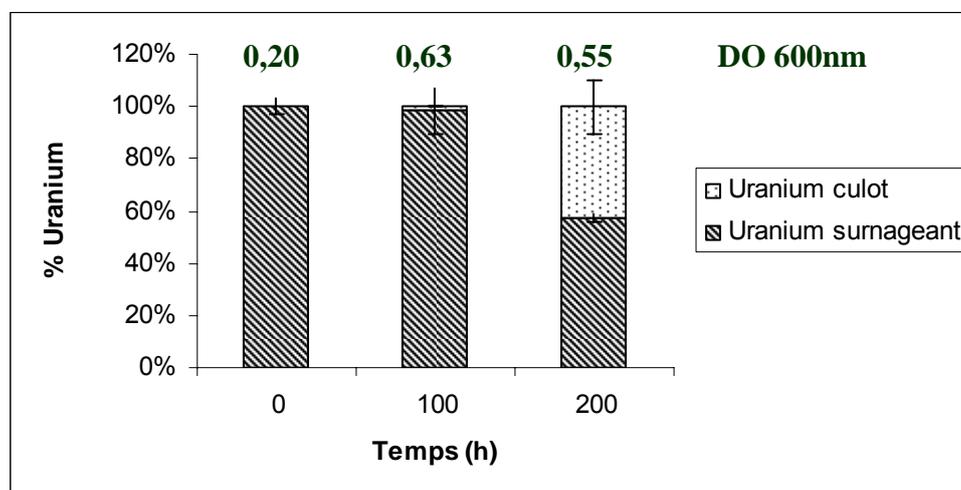


Figure 69 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle 1mM à pH 7,5 en milieu CSM.

Les témoins de précipitation montrent que l'uranium reste totalement soluble pendant 200h en l'absence de bactéries.

On ne remarque aucune accumulation à 100h alors que la croissance de la bactérie a atteint son maximum. Après 200h, 40% de l'uranium initial est retrouvé dans le

culot bactérien. A ce temps de croissance, la densité cellulaire a diminué ce qui montre que la bactérie est entrée en phase de déclin. Le taux de mortalité est supérieur au taux de développement de la bactérie.

En phase de déclin, les bactéries sont lysées et des phosphates sont libérés localement. Pendant quelques instants, la concentration en cet élément ; à cet endroit ; est alors très importante et l'uranium précipite immédiatement. Ce phénomène peut expliquer la proportion de précipitation observée après 200h de culture. L'hypothèse de l'adsorption aux groupes phosphates ou carboxyles des structures cellulaires est également envisageable.

L'image 3 présente les observations de *C. metallidurans* CH34 par microscopie électronique en transmission dans ces conditions après 200h de culture en absence et en présence d'uranium.

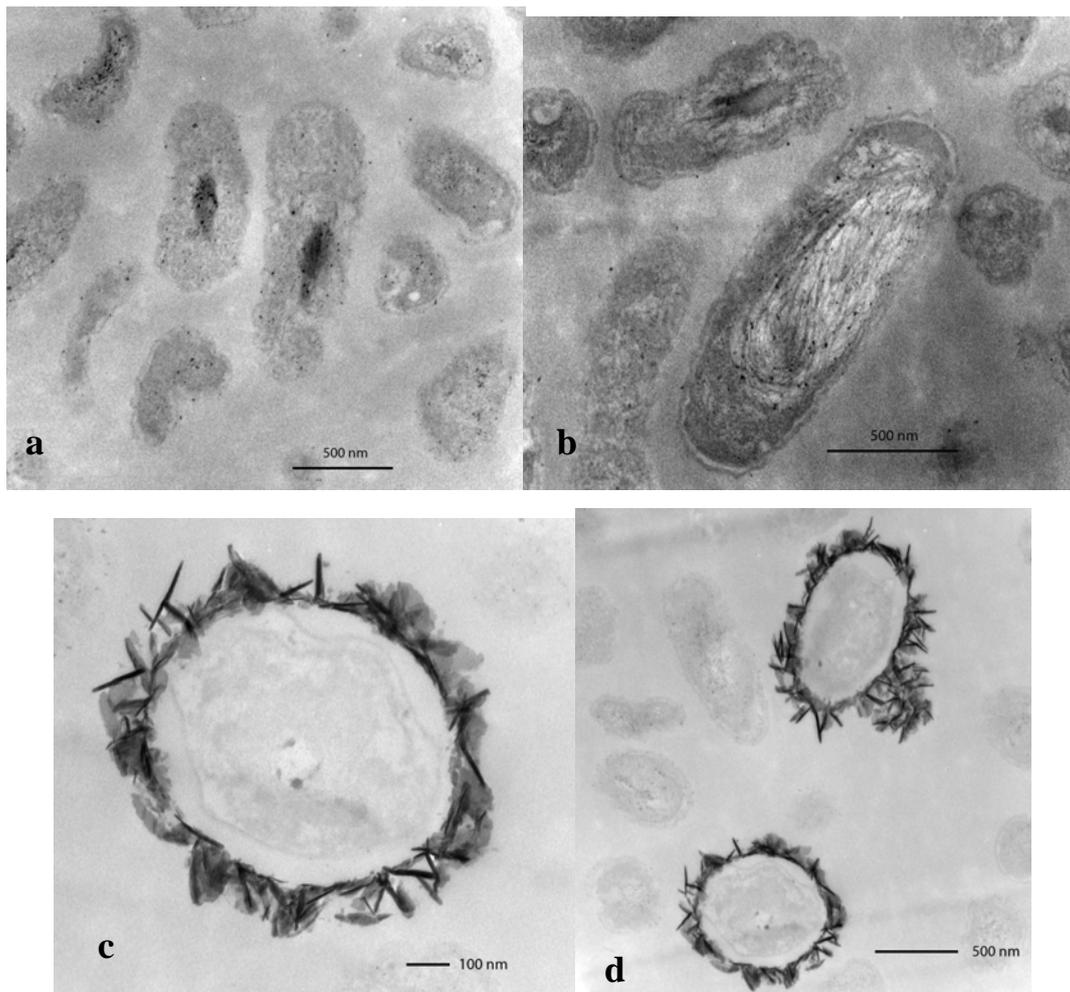


Image 3 : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de citrate d'uranyle en milieu CSM à pH 7,5 en anaérobie. (a) Bactéries non exposées. (b), (c) et (d) Citrate d'uranyle 1mM après 200h de culture.

Les observations des bactéries non exposées à l'uranium montrent une cellule d'apparence différente du témoin à pH 7,5 et en aérobiose. L'anaérobiose semble fragiliser la membrane cellulaire ou la paroi bactérienne. La forme de la bactérie est moins régulière.

Parmi les bactéries observées après exposition au citrate d'uranyle en anaérobiose, on note qu'une majorité est identique aux bactéries non exposées. Cependant, une proportion non négligeable de certaines d'entre elles présente des précipités d'uranium sur leur surface. Ils forment des aiguilles ce qui est caractéristique des précipités de phosphate d'uranyle. On peut également remarquer que le cytoplasme des bactéries semble se rétracter à l'intérieur de la cellule, ce qui peut être un signe de lyse. Les précipités se limitent à la surface de la bactérie et ils ne sont pas retrouvés à l'intérieur. La proportion de cellules touchées est d'environ 10%. Ce résultat peut difficilement être comparé aux résultats des accumulations car il est compliqué de prédire la quantité d'uranium précipité autour d'une bactérie.

L'anaérobiose semble jouer un rôle dans la lyse des bactéries en phase de déclin car aucune précipitation n'est mise en évidence en milieu CSM à pH 7,5 dans cette même phase de déclin. Le passage en anaérobiose semble fragiliser la membrane bactérienne et donc favoriser la lyse et la libération de phosphates.

Nous avons vu l'accumulation du citrate d'uranyle et de l'ion uranyle libre par *C. metallidurans* CH34 dans différentes conditions. Nous allons maintenant nous intéresser au carbonate d'uranyle.

4. Accumulation du carbonate d'uranyle en aérobiose à pH 7,5

Les bactéries sont exposées à une concentration de carbonate d'uranyle de 300µM en milieu TSM15% à pH 7,5 et en aérobiose. Cette concentration faible a été utilisée pour éviter une précipitation naturelle de l'uranium avec les phosphates du milieu. L'accumulation du carbonate d'uranyle est suivie durant la croissance de la souche.

La figure 70 présente les proportions d'uranium soluble retrouvé dans le surnageant de culture et de l'uranium précipité et/ou accumulé par la bactérie retrouvé dans le culot.

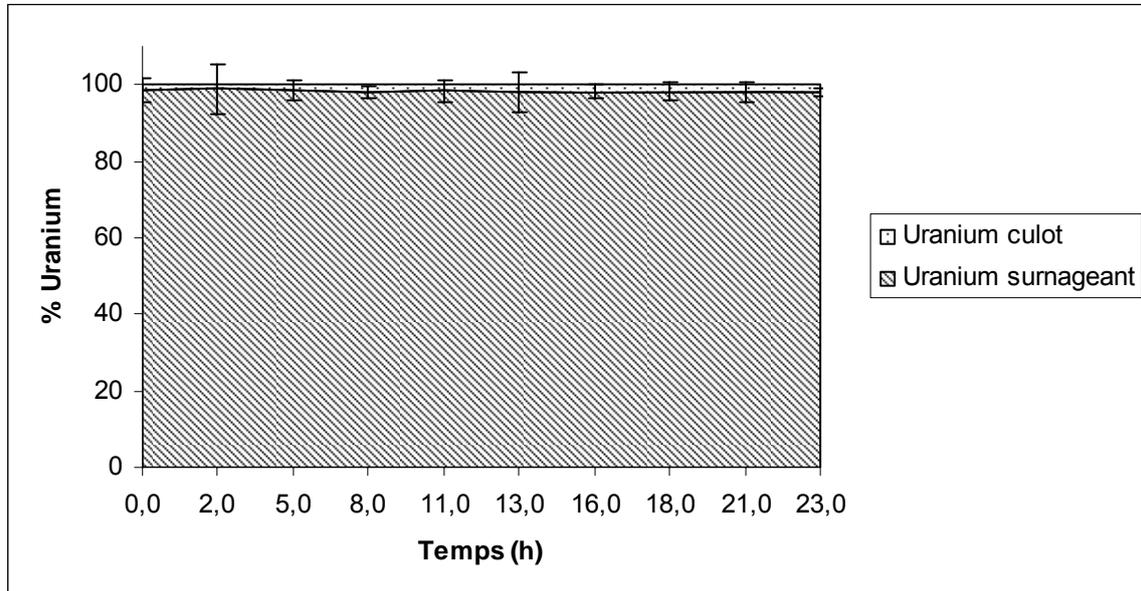


Figure 70 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de *C. metallidurans* CH34 en présence de carbonate d'uranyle à 300µM à pH 7,5 en milieu TSM15%.

Les témoins de précipitation montrent que l'uranium reste totalement soluble pendant toute la durée de la croissance.

Comme pour le citrate d'uranyle dans les mêmes conditions, aucune accumulation n'est mise en évidence. Moins de 5% de l'uranium initialement présent est retrouvé dans le culot bactérien.

Cette observation est corrélée avec celle des courbes de croissance de la partie B. En effet, aucun effet de l'uranium n'était mis en évidence. La bactérie ne semble pas avoir d'interaction avec le carbonate d'uranyle quel que soit son état physiologique et la phase de la croissance.

L'image 4 présente les observations par microscopie électronique en transmission de la bactérie exposée 24h à 100µM de carbonate d'uranyle pendant la phase de latence et pendant la phase exponentielle de croissance.

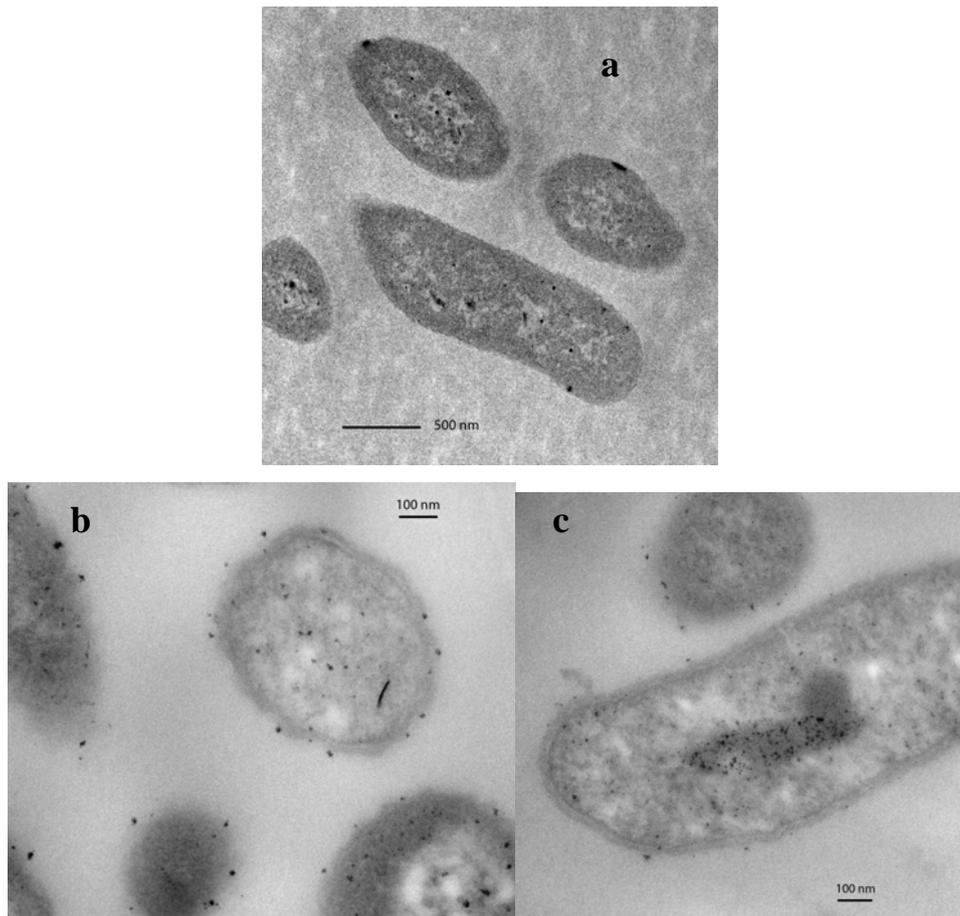


Image 4 : Observations au microscope électronique en transmission de *C. metallidurans* CH34 en présence de carbonate d'uranyle en milieu TSM15% à pH 7,5 en aérobic. (a) Bactéries non exposées en milieu TSM. (b) Carbonate d'uranyle 100µM en phase de latence (c) Carbonate d'uranyle 100µM en phase exponentielle.

On peut remarquer que l'état des bactéries est identique en présence ou en absence d'uranium. Les structures cellulaires sont bien conservées. Aucune bactérie ne montre des précipités d'uranium à sa surface ou à l'intérieur de la cellule.

L'ensemble de ces résultats montre que *C. metallidurans* CH34 n'accumule pas le carbonate d'uranyle à pH 7,5 en aérobic. La bactérie ne provoque pas non plus la précipitation de cette forme chimique de l'uranium dans ces conditions.

II. ACCUMULATION DE L'URANIUM PAR *D. RADIODURANS* R1

1. Accumulation du citrate d'uranyle en aérobie à pH 7

Les bactéries sont exposées à une concentration de citrate d'uranyle de 1mM en milieu semi-synthétique supplémenté à 3mM de citrate à pH 7 en aérobie.

La figure 71 présente les proportions d'uranium soluble retrouvé dans le surnageant de culture et de l'uranium précipité et/ou accumulé par la bactérie retrouvé dans le culot.

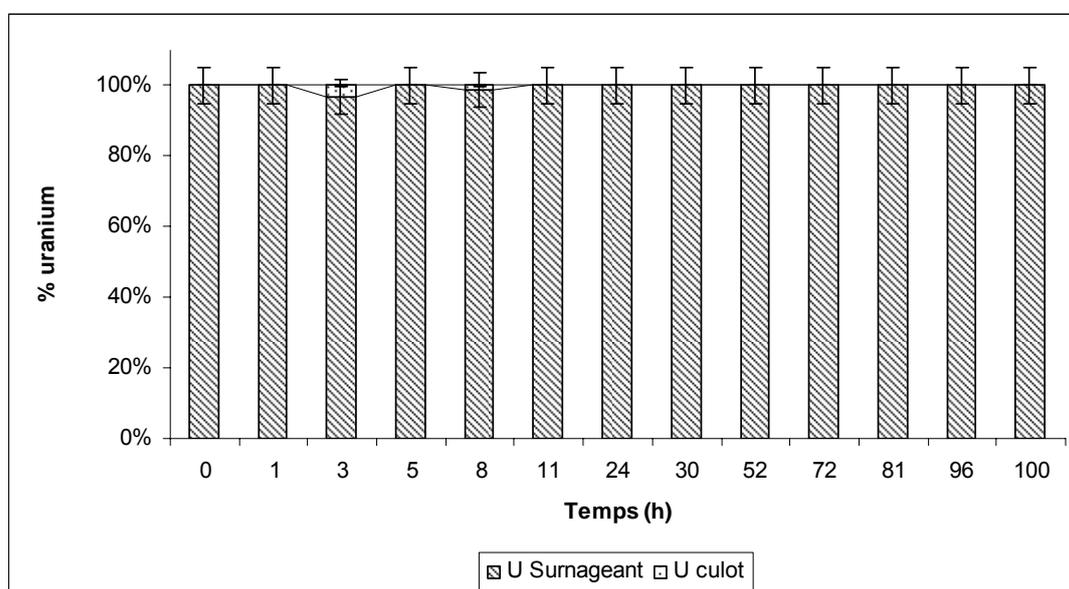


Figure 71 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de *D. radiodurans* R1 en présence de citrate d'uranyle à 1mM à pH 7 en milieu synthétique + citrate 3mM.

Les témoins de précipitation montrent que l'uranium reste totalement soluble pendant toute la durée de la croissance.

Aucune accumulation ou précipitation de l'uranium n'est mise en évidence pendant les 100h de croissance de la bactérie. Cette observation est corrélée avec la croissance de la bactérie qui ne montrait aucun effet du citrate d'uranyle sur son développement. Il ne semble pas avoir d'interaction entre *D. radiodurans* R1 et cette spéciation de l'uranium.

Pour confirmer ce résultat, des observations au microscope électronique en transmissions sont réalisées sur la bactérie en présence de citrate d'uranyle et comparées aux bactéries non exposées (image 5).

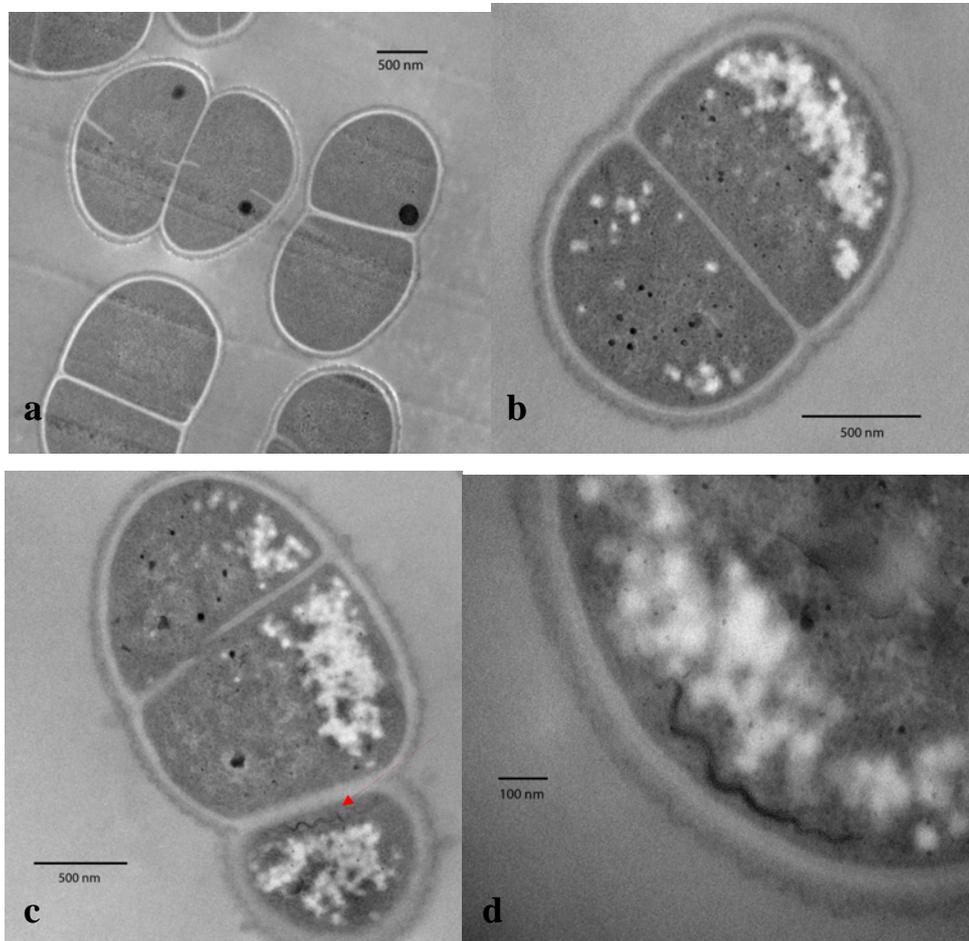


Image 5 : Observations au microscope électronique en transmission de *D. radiodurans* R1 en phase exponentielle de croissance en milieu synthétique supplémenté en citrate à 3mM à pH 7 en aérobie. (a) Bactéries non exposées. (b) et (c) Citrate d'uranyle 1mM. (d) Structure inconnue aussi visible en (c).

Les observations des bactéries non exposées montrent une bactérie organisée en diplocoques. La membrane est très épaisse et lumineuse aux électrons. Ces observations sont en adéquation avec celles de la littérature.

Les bactéries en contact du citrate d'uranyle ne montrent aucun précipité à la surface ou à l'intérieur de la cellule. La forme, la structure et l'intégrité de celles-ci sont identiques au témoin. Il ne semble donc pas y avoir d'interaction entre l'uranium et *D. radiodurans* R1. Cependant, quelques rares bactéries montrent la présence d'une structure particulière à l'intérieur de la cellule et proche de la membrane. Il s'agit d'un ensemble de sinusoïdales ou d'hélices. Est-ce la présence du citrate d'uranyle à forte

concentration qui provoque l'apparition de cette structure non visible dans le témoin ou l'uranium présent initialement permet-il de mieux contraster la coupe et de rendre visible cet objet ? En effet, pour rappel, les coupes observées ne sont pas contrastées lors de leur préparation. A notre connaissance, l'existence de cette structure n'a pas été décrite dans la littérature

L'image 6 présente les observations de *D. radiodurans* R1 en phase stationnaire de croissance en présence d'1mM de citrate d'uranyle dans le milieu semi-synthétique avec 3mM de citrate.

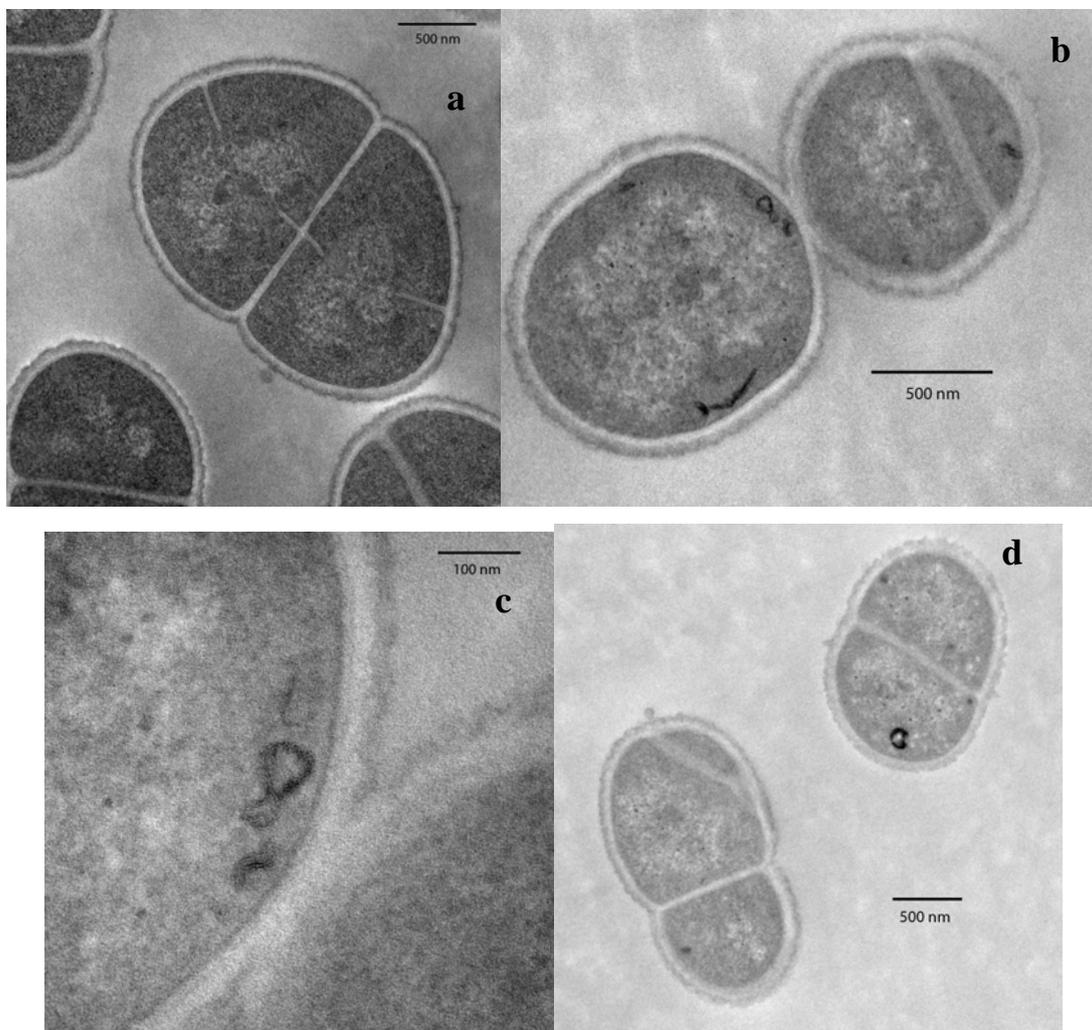


Image 6 : Observations au microscope électronique en transmission de *D. radiodurans* R1 en phase stationnaire de croissance en milieu synthétique supplémenté en citrate à 3mM à pH 7 en aérobic. (a) Bactéries non exposées. (b), (c) et (d) Citrate d'uranyle 1mM.

Les bactéries non exposées montrent une organisation en tétrade avec un partage du chromosome bactérien à travers la membrane bactérienne comme il a été décrit dans la littérature. Comme en phase exponentielle, aucune accumulation ou précipitation n'est mise en évidence. La structure des bactéries est identique au témoin et les cellules ne semblent pas affectées par la présence du citrate d'uranyle dans le milieu de culture.

La structure particulière observée en phase exponentielle est encore présente dans cette condition. Comme le contenu cellulaire des bactéries est difficilement visualisable dans les témoins du fait d'un manque de contraste, il est impossible de conclure sur le rôle de l'uranium dans l'apparition de cet objet dans les essais.

2. Accumulation du carbonate d'uranyle en aérobie à pH 7

Les bactéries sont exposées à 1mM de carbonate d'uranyle en milieu semi-synthétique supplémenté avec 40mM de bicarbonate à pH 7 en condition aérobie.

La figure 72 présente les proportions d'uranium soluble retrouvé dans le surnageant de culture et de l'uranium précipité et/ou accumulé par la bactérie retrouvé dans le culot et la figure 73 montre la précipitation de l'uranium dans ce même milieu en absence de bactéries.

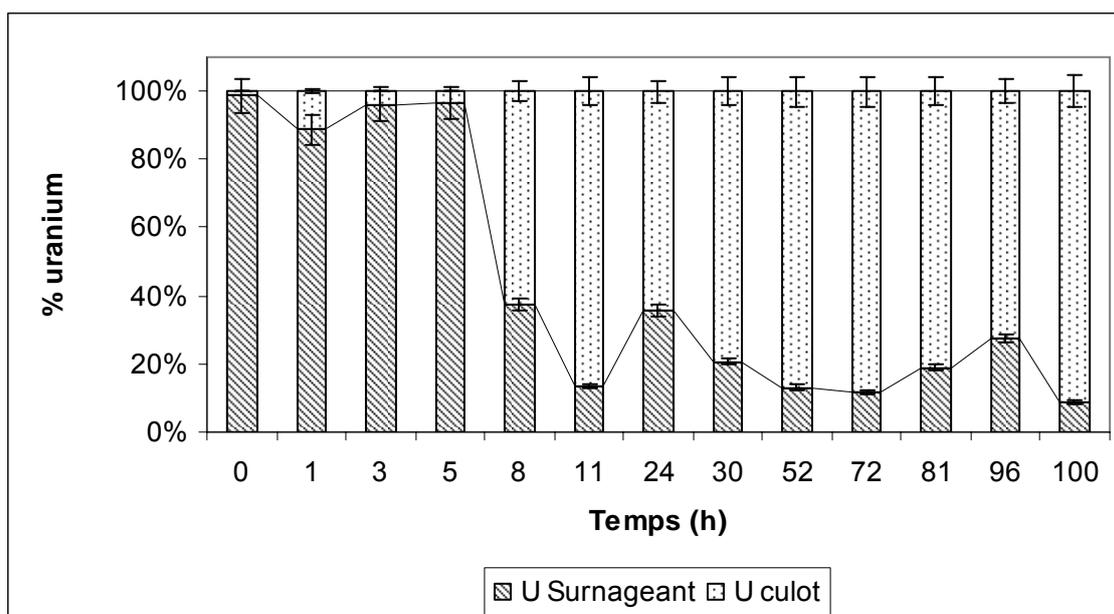


Figure 72 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé au cours de la croissance de *D. radiodurans* R1 en présence de carbonate d'uranyle à 1mM à pH 7 en milieu synthétique + carbonate 40mM.

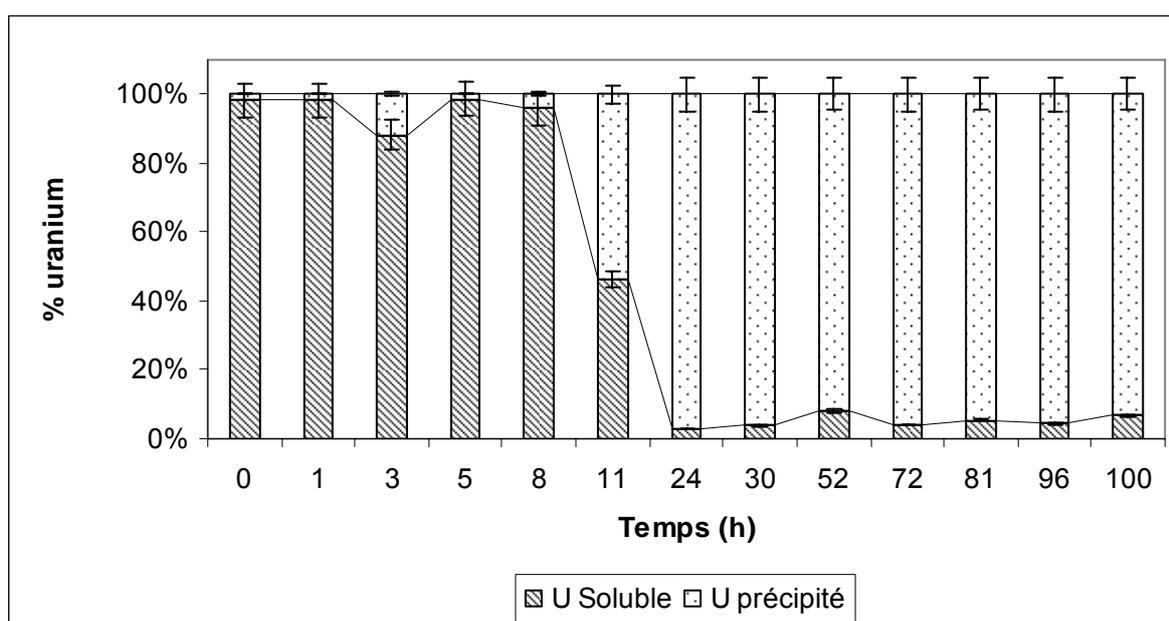


Figure 73 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium précipité dans le témoin carbonate d'uranyle à 1mM à pH 7 en milieu synthétique + carbonate 40mM sans bactérie.

Le témoin de précipitation montre une précipitation de l'uranium dans le milieu de culture après 8h. Environ 50% de l'uranium est précipité après 11h et la totalité après 24h d'agitation à 30°C.

On retrouve le même profil de précipitation en présence de bactéries. Après 8h, environ 60% de l'uranium initial est précipité. C'est à partir de ce moment que le pH

se stabilise à 7 et qu'il ne s'alcalinise plus au cours du temps. Il pourrait y avoir une disparition des carbonates au cours de la croissance avec dégagement de CO_2 , ce qui pourrait expliquer la précipitation observée. L'uranium, privé de carbonates, se complexerait alors avec les phosphates.

On peut également remarquer que la précipitation débute plus tôt en présence de bactéries mais que la proportion d'uranium soluble reste plus élevée au cours du temps.

Aucune accumulation de carbonate d'uranyle par *D. radiodurans* R1 n'est donc observée. Ces résultats peuvent être confirmés par les observations en microscopie électronique en transmission.

L'image 7 présente les bactéries en phase stationnaire de croissance dans le milieu synthétique supplémenté en carbonate à 40mM et en présence de carbonate d'uranyle à 1mM.

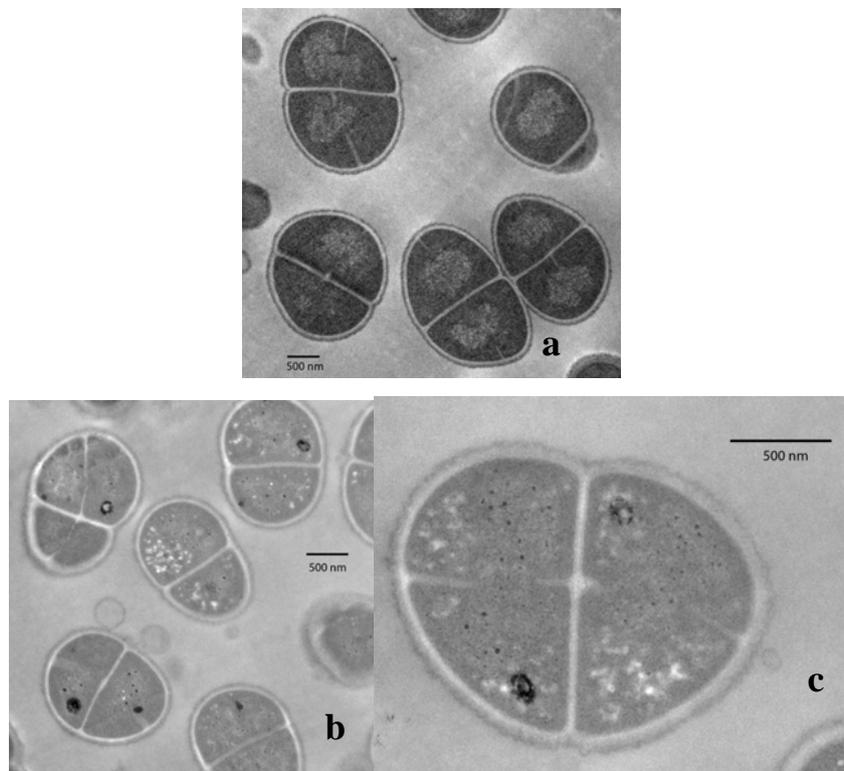


Image 7 : Observations au microscope électronique en transmission de *D. radiodurans* R1 en phase stationnaire de croissance en milieu synthétique supplémenté en carbonates à 40mM à pH 7 en aérobic. (a) Bactéries non exposées. (b), (c) Carbonate d'uranyle 1mM

Comme pour le citrate d'uranyle, l'apparence des bactéries exposées est semblable à celles des bactéries non exposées. La forme et la structure des cellules ne diffèrent pas et l'intégrité de la membrane est complète. Aucune accumulation ni précipitation n'est mise en évidence à la surface ou à l'intérieur de la bactérie. La structure particulière observée en présence de citrate d'uranyle n'est pas visible dans ces conditions.

Il ne semble donc pas y avoir d'interaction entre les différentes spéciations de l'uranium étudiées et *D. radiodurans* R1 à pH 7 et en aérobie.

III. ACCUMULATION DE L'URANIUM PAR *R. PALUSTRIS*

1. Accumulation de l'uranium en condition anaérobie à pH 7

L'accumulation de l'uranium par *R. palustris* a d'abord été étudiée à pH 7 et en anaérobie. L'ensemencement du milieu a été réalisé à forte densité cellulaire ($DO_{600}=3$) en milieu Hutner modifié en présence d'1mM d'uranium. L'effet d'une forte densité de biomasse sur l'accumulation d'uranium est étudié pendant 24h.

La figure 74 présente les proportions d'uranium soluble dans le surnageant et d'uranium accumulé et/ou précipité dans le culot bactérien à différents temps de contact.

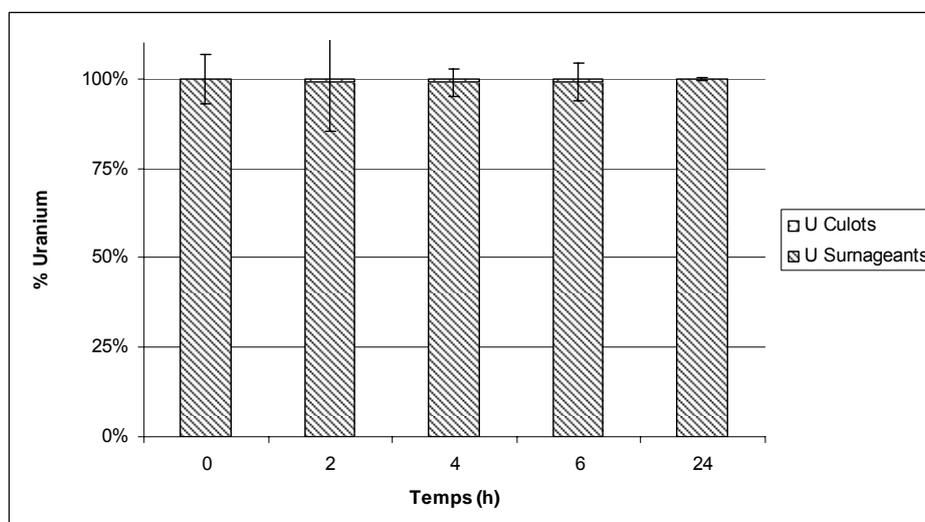


Figure 74 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé et/ou précipité par *R. palustris* en présence d'uranium à 1mM à pH 7 en anaérobie en milieu Hutner modifié.

Les témoins de précipitation montrent que la totalité de l'uranium reste soluble pendant la durée de l'expérience dans le milieu Hutner modifié en absence de bactéries.

Aucune accumulation ni précipitation n'est mise en évidence pendant toute la durée de mise en contact. Moins de 5% de l'uranium initial est retrouvé dans le culot bactérien. Il ne semble pas avoir d'interaction entre *R. palustris* et l'uranium à pH 7.

Pour vérifier cette hypothèse, des observations au microscope électronique en transmission ont été réalisées à partir d'une culture identique.

L'image 8 présente l'apparence de ces bactéries dans le milieu Hutner modifié en absence d'uranium

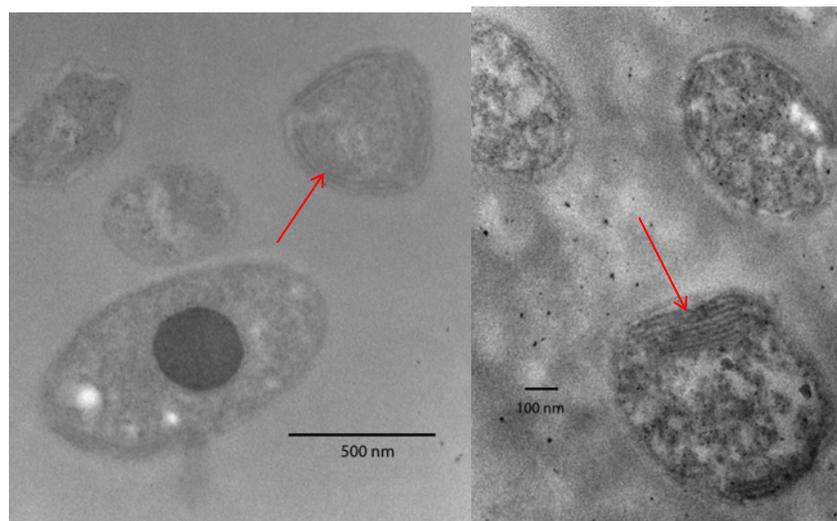


Image 8 : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié sans uranium à pH 7 en anaérobie. Les flèches indiquent les thylakoïdes.

Comme attendu, la bactérie a synthétisé des thylakoïdes (indiqué par les flèches sur l'image 8) afin d'utiliser l'énergie lumineuse pour sa croissance en anaérobie. Ces thylakoïdes sont des structures membranaires riches en photosystèmes et en ATPases. Ces ATPases permettent la synthèse de l'ATP, molécule fournissant l'énergie nécessaire aux réactions cellulaires grâce au gradient de protons créé par les photosystèmes. La concentration en phosphate à proximité de ces thylakoïdes pourrait donc être importante.

L'image 9 présente l'apparence des bactéries dans le milieu Hutner modifié en présence d'uranium à 1mM à pH 7 en anaérobiose après 4h de contact.

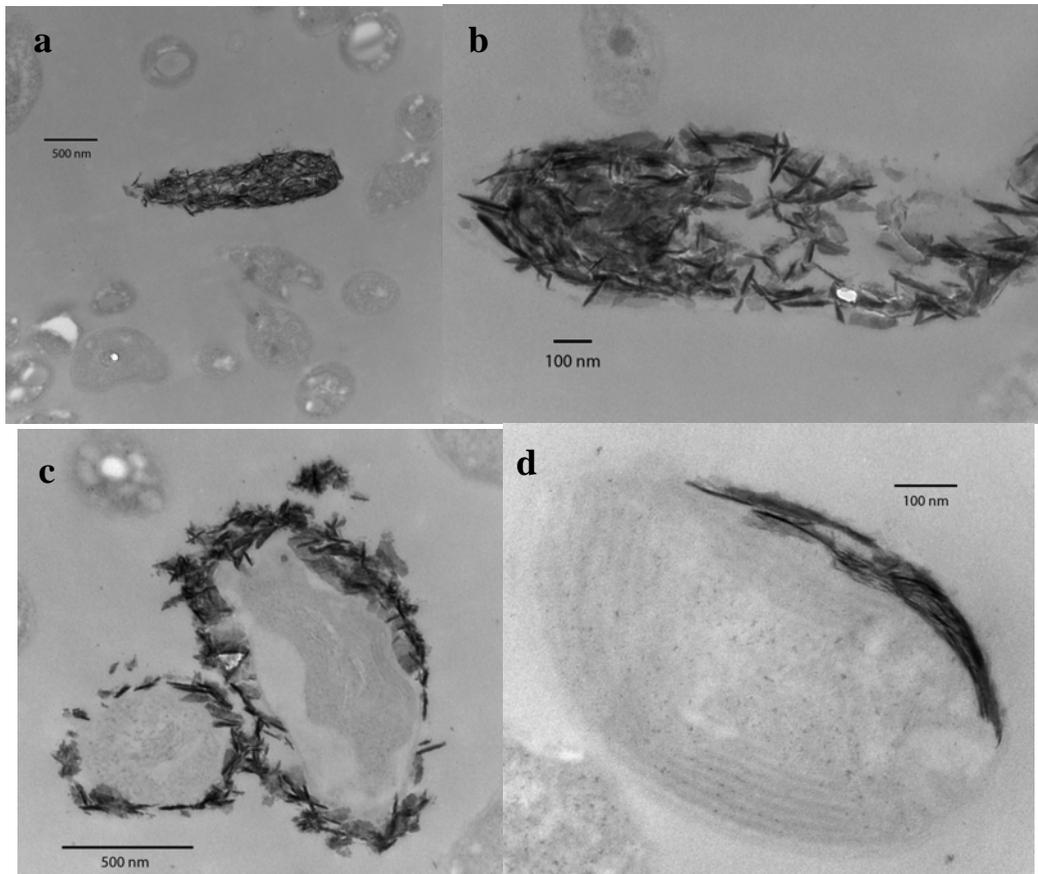


Image 9 : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié en présence d'uranium à 1mM à pH 7 en anaérobiose.

L'état de la grande majorité des bactéries est identique à celui des témoins. Les structures cellulaires, dont les thylakoïdes, sont bien conservées. La majorité des cellules ne présente pas de précipités à la surface ou à l'intérieur. Certaines bactéries comme celle observée sur l'image 9a présentent des précipités sur l'ensemble de la cellule.

L'image 9b présente une bactérie saturée de précipités. Des parties de la cellule sans ces complexes d'uranium peuvent être également aperçues. La bactérie semble être lysée, aucune structure cellulaire ni membrane n'est visible. Les précipités semblent garder la forme des cellules. L'image 9c nous montre une bactérie présentant des précipités seulement à sa surface. Son cytoplasme est réduit par rapport au témoin. Ce phénomène peut être un signe précurseur de mort cellulaire.

L'image 9d montre une cellule typique de *R. palustris* en anaérobie. On aperçoit ses thylakoïdes tout autour de la bactérie. Des précipités d'uranium sont présents le long des membranes de ces structures. Au vue de la composition de ces thylakoïdes, nous pouvons penser que ces précipités sont des complexes de phosphates d'uranyle. En effet, la concentration locale en phosphates autour des membranes des thylakoïdes pourrait être importante. La complexation de l'uranium avec les phosphates serait donc favorisée dans ces conditions. Cependant, il faudrait que l'uranium entre dans la cellule, ce qui pourrait être le cas lorsque la bactérie est morte et lysée.

La proportion de bactéries présentant ce type de précipités n'est pas importante. Ces observations sont en concordance avec les résultats des accumulations. La quantité d'uranium précipité se situe dans l'incertitude des mesures de concentrations.

L'exposition de *R. palustris* entraînant la précipitation d'uranium à pH 7, nous avons recherché une éventuelle augmentation de la quantité d'uranium précipité en se plaçant à pH 1, phénomène déjà observé chez *C. metallidurans* CH34.

2. Accumulation de l'uranium en anaérobie à pH 1

L'accumulation de l'uranium en milieu Hutner modifié à pH 1 a été étudiée à forte densité cellulaire ($DO_{600}=3$) et à concentration de 1mM.

La figure 75 présente les proportions d'uranium soluble et d'uranium précipité et/ou accumulé retrouvé dans le culot bactérien après différents temps de contact.

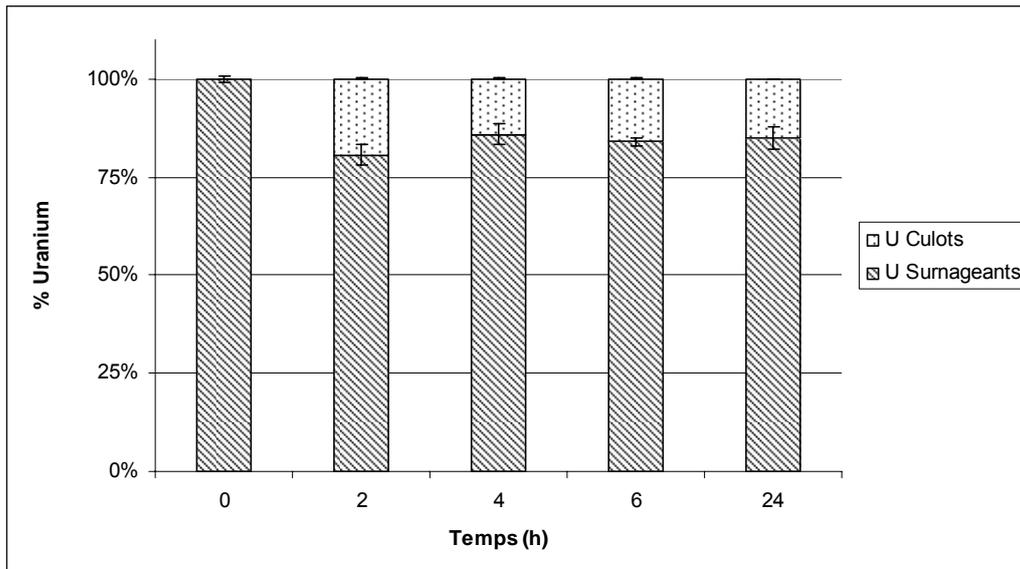


Figure 75 : Proportion d'uranium dissous et d'uranium accumulé et/ou précipité par *R. palustris* en présence d'uranium à 1mM à pH 1 en anaérobie en milieu Hutner modifié.

Les témoins de précipitation montrent que la totalité de l'uranium reste soluble pendant la durée de l'expérience dans le milieu Hutner modifié en absence de bactéries à pH 1.

Nous pouvons voir qu'environ 20% de l'uranium initial est retrouvé dans le culot bactérien dès 2h de contact. Cette proportion n'évolue pas au cours du temps jusqu'à 24h. Le repiquage des cellules en milieu Hutner et en milieu LB montre que les bactéries ne sont pas revivifiables quel que soit le temps de contact. Comme pour *C. metallidurans* CH34, il ne semble pas avoir de processus actif d'accumulation ou de précipitation de l'uranium par la bactérie.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène, comme c'est le cas pour *C. metallidurans* CH34. L'uranium se complexerait aux groupements devenus libres des membranes ou aux débris cellulaires provenant des lyses des bactéries. Il pourrait également précipiter localement en présence d'une forte concentration en phosphates libérés par la destruction des cellules.

L'image 10 présente l'apparence des bactéries dans le milieu Hutner modifié à pH 1 en absence d'uranium

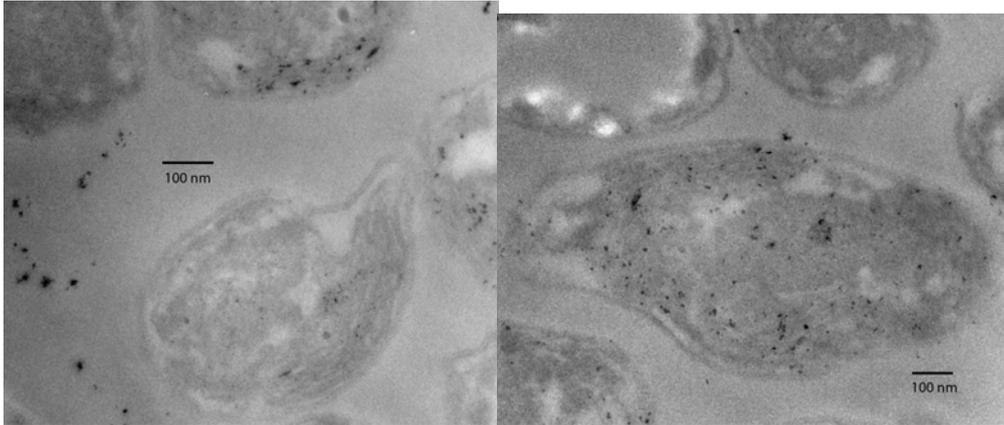


Image 10 : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié sans uranium à pH 1 en anaérobie.

L'apparence des bactéries est différente à pH 1 par rapport à pH 7. La forme des cellules est irrégulière et le cytoplasme est réduit, signes de létalité bactérienne. Les thylakoïdes sont toujours visibles.

L'image 11 montre l'apparence des bactéries dans le milieu Hutner modifié en présence d'1mM d'uranium à pH 1 en condition anaérobie après 4h de contact.

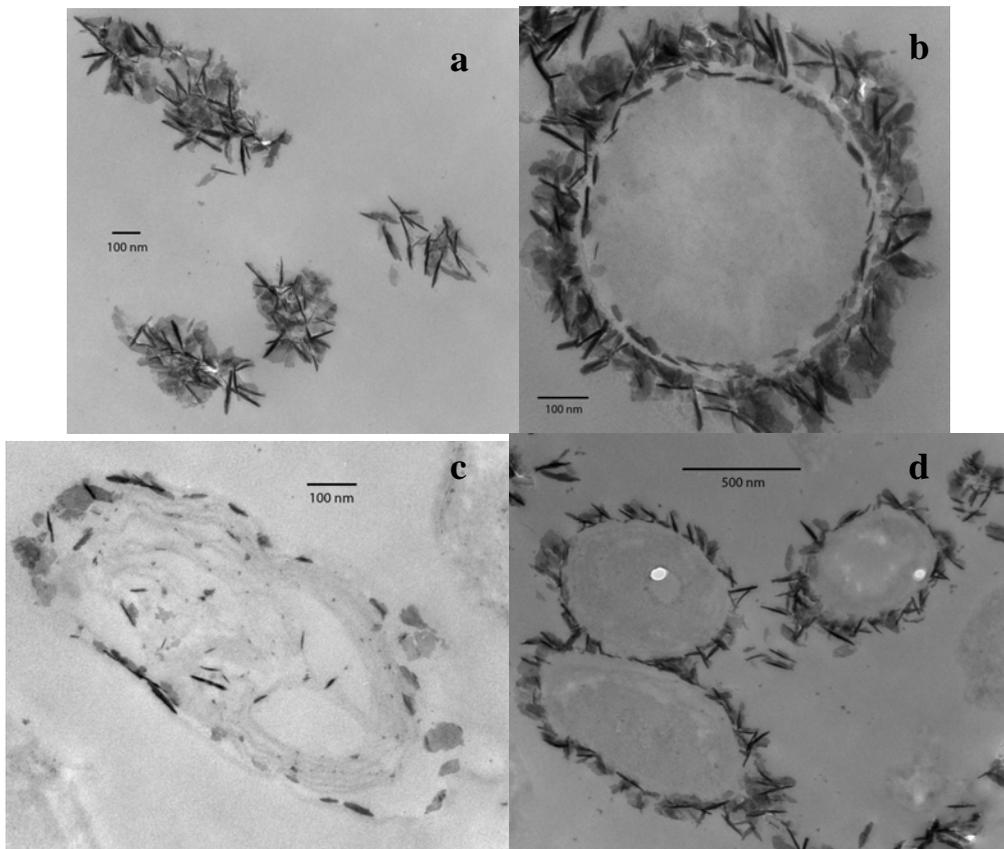


Image 11 : Observations au microscope électronique en transmission de *R. palustris* en milieu Hutner modifié en présence d'uranium à 1mM à pH 1 en anaérobie.

Contrairement aux bactéries à pH 7, de nombreuses cellules présentent des précipités d'uranium au niveau de leur membrane ou dans leur cytoplasme. La proportion de telles bactéries est d'environ 40%. L'image 11a montre des précipités d'uranium qui gardent la forme de la cellule. On peut voir que les membranes ont disparu et le cytoplasme est inexistant. Il apparaît deux cercles de précipités sur l'image 11b, un au niveau de la paroi externe et un au niveau de la membrane interne. Il n'y a pas de présence d'uranium au niveau intra cytoplasmique. Cette organisation des précipités est majoritaire comme le montre l'image 11d. Cependant, d'autres bactéries, comme sur l'image 11c, présentent un faible nombre de précipités à l'intérieur de la cellule.

Plusieurs phénomènes de précipitation de l'uranium en contact des bactéries sont ainsi visibles. On peut penser que les précipités de phosphates d'uranyle se forment d'abord à la surface des bactéries du fait de la fragilité des membranes à ce pH et de la libération de phosphates. Ces précipités peuvent également se former autour des membranes des thylakoïdes riches en phosphates si l'intégrité de la paroi externe a été compromise par le faible pH du milieu. Une fois la bactérie complètement lysée, les précipités d'uranium l'ont complètement envahi et il ne reste que le fantôme de la cellule formé par ces complexes.

L'uranium semble donc précipiter avec la biomasse morte de *R. palustris* à pH 1. Ces précipités sont probablement des complexes de phosphates d'uranyle. Ils se formeraient au moment de la lyse de la cellule provoquée par le pH très acide du milieu. Comme déjà expliqué auparavant, à certains endroits de la cellule, comme au niveau des thylakoïdes, la concentration locale en phosphates est importante et l'équilibre thermodynamique de complexation de l'uranium est modifié. L'apparition des complexes de phosphates d'uranyle est alors favorisée.

L'étude par spectroscopie d'absorption X va nous permettre de vérifier cette hypothèse et la spéciation réelle de l'uranium dans les milieux de culture et dans les précipités.

CONCLUSION ACCUMULATION ET OBSERVATIONS

MICROSCOPIQUES

L'accumulation de l'uranium aux pH optimums de croissance (7,5 et 7) a été étudiée pour les trois bactéries. Aucune accumulation ni précipitation significative ne sont mises en évidence à ces pH. Seul le passage en anaérobie à pH 7,5 de *C. metallidurans* CH34 permet d'observer une précipitation de l'uranium (40% de la concentration initiale).

Ces résultats sont confirmés par les observations en microscopie électronique en transmission. On peut voir quelques bactéries présentant des précipités d'uranium sur leurs parois mais elles sont rares. Les observations en anaérobie de *C. metallidurans* CH34 montrent des précipités d'uranium plus fréquents sur toute la surface des bactéries. La présence de thylakoïdes en anaérobie pour *R. palustris* permet également l'apparition de ces mêmes précipités sur les parois et les membranes des cellules.

Le passage des cultures de *C. metallidurans* CH34 et *R. palustris* à pH 1 permet de provoquer la précipitation et la complexation d'une proportion plus élevée de l'uranium (environ 20% de l'uranium initial) par la biomasse bactérienne. Ce processus est passif car toutes les cellules sont mortes et non revivifiables. Les observations en microscopie électronique en transmission nous montrent des précipités en quantités importantes à la surface mais également à l'intérieur des bactéries. Au final, les précipités d'uranium gardent la forme des cellules qui sont complètement lysées.

L'hypothèse principale de la formation de ces précipités est la concentration locale élevée en phosphates provoquée par la lyse des bactéries. A cet endroit, la formation des complexes de phosphate d'uranyle est favorisée par rapport à la spéciation globale du milieu et il y a précipitation de l'uranium.

La seconde hypothèse serait la libération des groupements phosphates et carboxyles des constituants des membranes à ce pH très bas au contraire du pH neutre où de nombreux ligands et compétiteurs de l'uranium sont présents. La formation de complexe est également plus favorable car la charge de l'uranyle devient positive à ce pH alors qu'elle est majoritairement négative à pH neutre.

Les tableaux 13 et 14 récapitulent les conditions étudiées pour chaque bactérie, ainsi que la spéciation théorique de l'uranium dans les différents milieux de culture, la CMI et l'accumulation associée.

Tableau 13 : Récapitulatif des résultats de spéciation théorique, de croissance et d'accumulation dans des conditions physiologique.

Souche	<i>C. metallidurans</i> CH34			<i>D. radiodurans</i> R1		<i>R. palustris</i>
Condition	pH 7,5 aérobie		pH 7 anaérobie	pH 7,5 aérobie		pH 7 anaérobie
Milieu	CSM	TSM15%	Anaérobie citrate	MS Citrate	MS Bicarbonate	Hutner modifié
Spéciation théorique	100% $UO_2(Cit)_2^{4-}$	95% $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ + 5% $UO_2(CO_3)_2^{2-}$	100% $UO_2(Cit)_2^{4-}$	100% $UO_2(Cit)_2^{4-}$	90% $UO_2(CO_3)_3^{4-}$ + 10% $UO_2(CO_3)_2^{2-}$	Non calculable Malate d'uranyle ?
CMI	> 30mM	> 1mM	> 1mM	> 2mM	> 2mM	> 1mM
Accumulation	-	-	±	-	-	±

Tableau 14 : Récapitulatif des résultats de spéciation théorique, de croissance et d'accumulation à pH 1.

Souche	<i>C. metallidurans</i> CH34	<i>R. palustris</i>
Condition	pH 1 aérobie	pH 1 anaérobie
Milieu	CSM	Hutner modifié
Spéciation théorique	100% Uranyle	Non calculable Uranyle ?
Accumulation	+	+

Il convient maintenant de vérifier les hypothèses précédentes en déterminant expérimentalement la spéciation de l'uranium complexé aux bactéries mais également la spéciation initiale et finale de l'uranium soluble dans le milieu de culture par spectroscopie d'absorption X.

PARTIE D : SPECIATION EXPERIMENTALE DE L'URANIUM

Nous avons montré dans les paragraphes précédents que les trois bactéries étudiées résistent à de fortes concentrations en uranium ($\geq 1\text{mM}$). *C. metallidurans* CH34 et *R. palustris* sont de plus capables de précipiter l'uranium à pH 1. Ce même phénomène est mis en évidence dans une moindre mesure en anaérobie à pH 7,5.

Afin de caractériser les formes d'uranium précipitées et complexées par les bactéries mais également afin de vérifier la spéciation théorique, la spectroscopie d'absorption des rayons X est utilisée pour identifier les espèces d'uranium présentes dans les milieux de culture et dans les culots bactériens. Ces informations pourront permettre de valider la spéciation de l'uranium que nous avons déterminée grâce au logiciel JCHESS et de déterminer les phénomènes de précipitation et de complexation de l'uranium par les bactéries. Les spectres obtenus sont étudiés de deux manières. Tout d'abord le signal EXAFS est reconstruit par combinaisons linéaires des signaux de composés de référence grâce au logiciel Athena. Cette étape nous permet de déterminer la proportion des différentes espèces en présence. Ensuite, un ajustement des données en utilisant la méthode par couches d'atomes successives grâce au logiciel Artemis nous permet de calculer les paramètres structuraux autour de l'atome d'uranium et de les comparer à ceux des composés de référence. Cette analyse nous donne une première idée des données structurales autour de l'atome d'uranium. Une analyse plus approfondie serait nécessaire pour modéliser la structure exacte autour du radionucléide. L'utilisation combinée de ces deux méthodes d'analyse des spectres EXAFS nous permet cependant d'orienter la spéciation de l'uranium dans nos échantillons vers une certaine forme chimique du radionucléide. Ainsi, nous serons capables d'identifier l'espèce majoritaire en présence mais également de confronter ces résultats avec ceux de la spéciation théorique.

Nous allons d'abord nous intéresser à ces composés de référence qui seront ensuite utilisés et comparés aux spectres des échantillons expérimentaux.

I. ETUDES DES COMPOSES DE REFERENCE

1. Etudes des oscillations EXAFS

Les expériences de spectroscopie d'absorption X sont réalisées sur la ligne de lumière FAME de l'ESRF, ligne dédiée à l'analyse d'échantillons dilués, en collaboration avec Olivier Proux (Laboratoire de Géophysique Interne et Tectonophysique, Grenoble), Denis Testemale (Institut Néel, Grenoble) et Jean-Louis Hazemann (Institut Néel, Grenoble), responsables de l'instrument.

Les spectres XANES au seuil L_{III} de l'uranium apportent des informations sur l'état d'oxydation et la forme chimique de cet élément. Au vue de leur profil, quasi-identique pour l'ensemble des composés, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de changement d'état d'oxydation de l'uranium. Tous les composés sont à l'état d'oxydation +VI.

Les oscillations EXAFS apportent quand à elles des informations sur la structure locale autour de l'atome d'uranium.

La figure 76 présente les oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranyle libre à pH 1, du citrate d'uranyle et du carbonate d'uranyle en solution liquide à 1mM et mesurées en fluorescence. Le phosphate d'uranyle a été analysé sous forme de pastilles, car il est précipité.

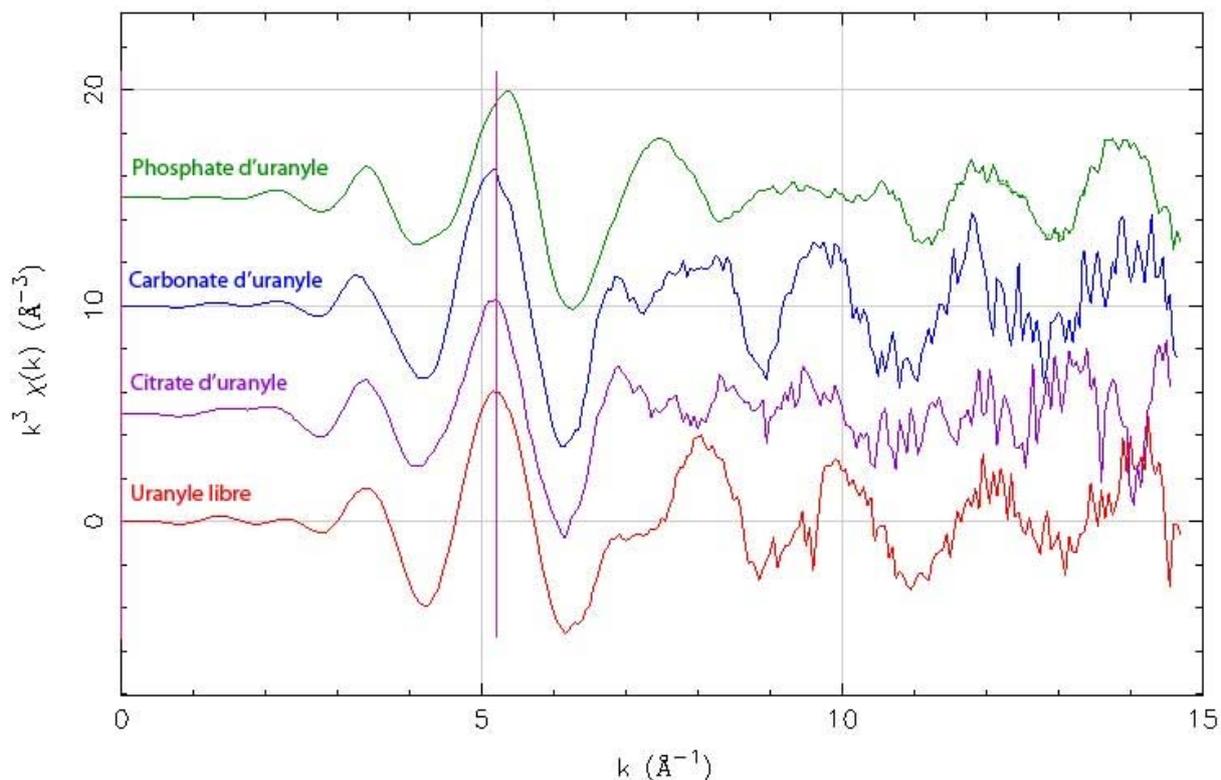


Figure 76 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranyle libre, du phosphate d'uranyle, du citrate d'uranyle et du carbonate d'uranyle.

Les quatre profils diffèrent les uns des autres. On remarque un décalage du maximum de l'oscillation aux alentours de 5 \AA^{-1} pour le phosphate d'uranyle par rapport aux trois autres composés. Des différences beaucoup plus significatives se situent ensuite entre 7 et 10 \AA^{-1} . Il est donc possible de distinguer les espèces d'uranyle grâce aux profils EXAFS. Les structures locales autour de l'atome d'uranium sont suffisamment différentes pour créer des oscillations ou des interférences caractéristiques de chaque espèce d'uranium. Les spectres sont également bruités après 10 \AA^{-1} .

Les formules développées de l'acétate, du citrate et du malate sont présentées en annexe A et en figure 77. Les structures du citrate et du malate sont très proches. Ils font tous les deux partie du cycle des acides tricarboxyliques et ils possèdent des fonctions carboxyles avec une fonction hydroxyle proche. L'acétate ne possède pas cette fonction $-\text{OH}$ à proximité de la fonction $-\text{COOH}$.

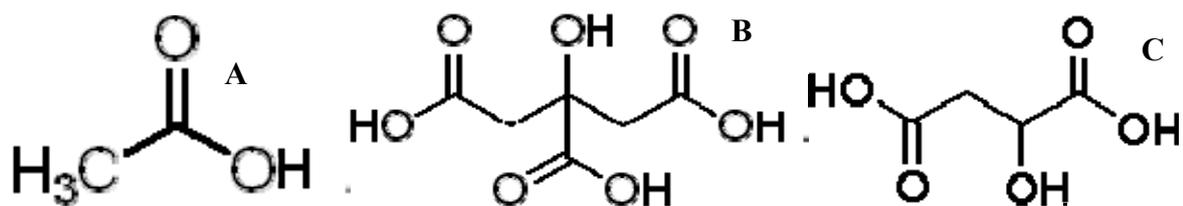


Figure 77 : Formule semi-développée de l'acétate (A), du citrate (B) et du malate (C).

La figure 78 présente les oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de ces trois composés complexé à l'uranium et celui de l'uranyle libre pour comparaison.

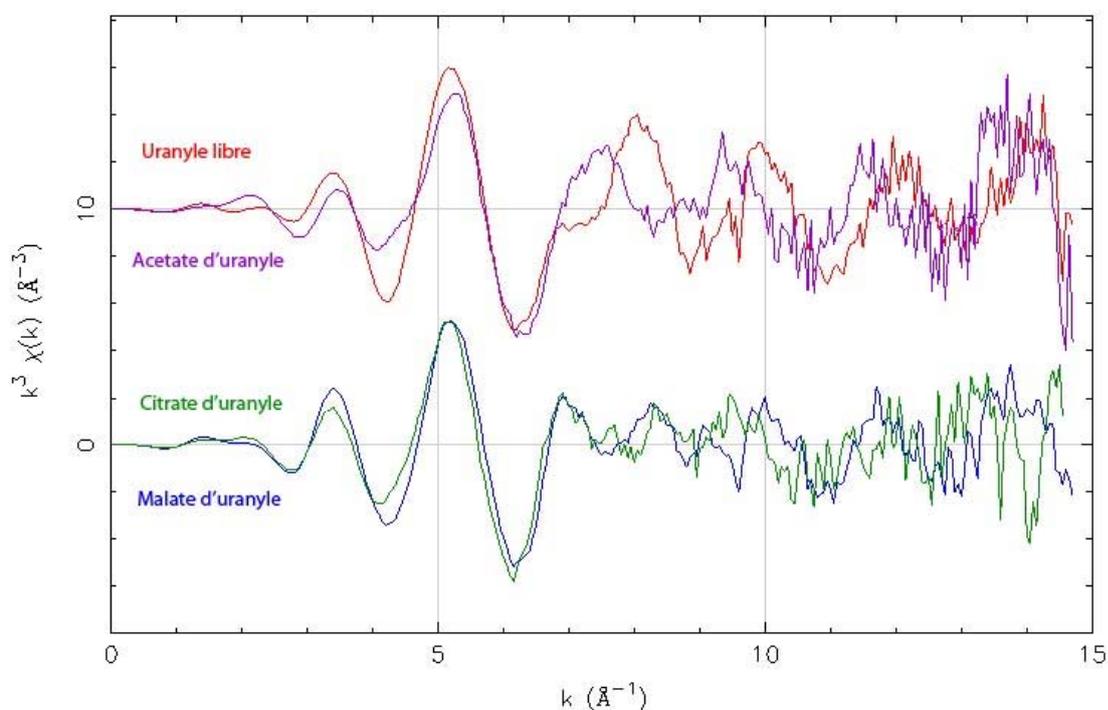


Figure 78 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranyle libre, du citrate, du malate et de l'acétate d'uranyle.

Comme attendu, les oscillations EXAFS de l'acétate d'uranyle sont différentes de celles du citrate et du malate d'uranyle. Elles sont également différentes des oscillations de l'uranyle libre ce qui montre que l'uranium est bien complexé à l'acétate à pH 7.

Les oscillations EXAFS du citrate et du malate d'uranyle sont très proches. Les structures locales autour de l'atome d'uranium doivent être presque identiques. On peut cependant observer (fig78) qu'il existe de légères différences entre 7,5 et 10 Å⁻¹. La molécule de citrate est plus volumineuse que celle du malate qui contient une fonction carboxyle de moins. L'encombrement stérique est donc plus important et il peut ainsi y avoir des différences dans le nombre de voisins ou la longueur des liaisons.

2. Ajustement des données des composés de référence

L'ajustement de nos données EXAFS par la méthode des couches d'atomes successives nous permet de déterminer les paramètres suivants : nature chimique des voisins, longueurs de liaison (R), nombres de coordination (N) et facteurs de Debye-Waller (σ^2), ce dernier caractérisant le désordre dans le cas où il n'est pas trop important (approximation harmonique). La figure 79 présente la partie réelle des oscillations EXAFS du carbonate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'ondes k, filtrées pour ne conserver que les contributions des premières couches de coordination, et l'ajustement des données par le logiciel.

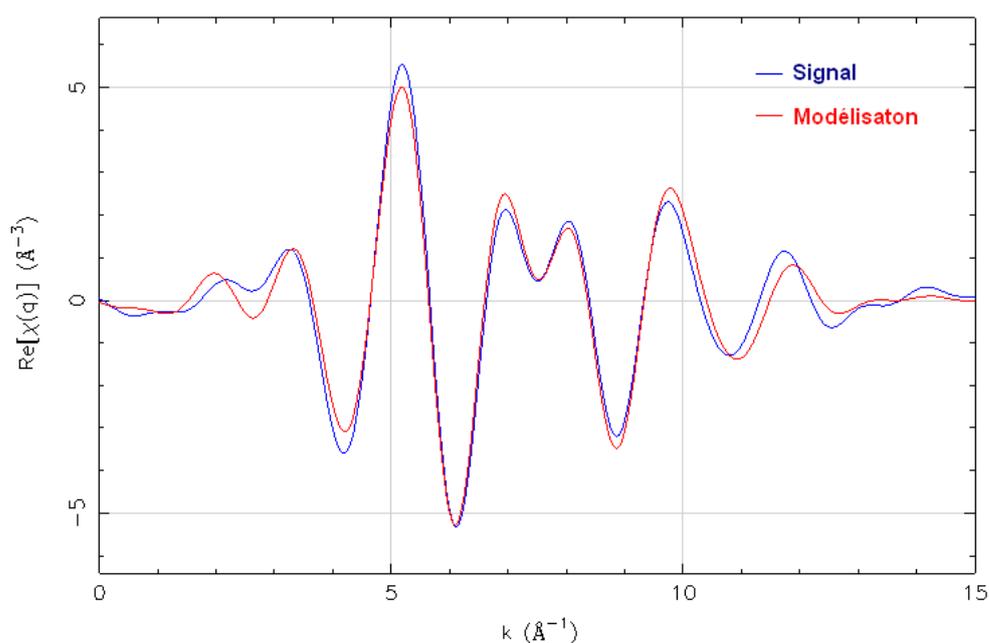


Figure 79 : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence carbonate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés (bleu) et l'ajustement des données (rouge).

L'ajustement des données par la méthode des couches d'atomes successives suggère l'existence de plusieurs sphères de coordination. En pratique, l'expérimentateur fixe, dans le logiciel, la nature des atomes proches et les valeurs probables de longueur de liaison et de nombre de coordination. Les oscillations sont ensuite simulées par Artemis qui optimise ces valeurs pour ajuster les courbes le plus finement possible dans un domaine de vecteur d'onde k prédéfini.

Les grandeurs qui ont été utilisées pour l'ajustement des données de l'ensemble des espèces de l'uranium sont présentées dans le tableau 12. Les résultats des paramètres calculés pour nos composés de références sont présentés dans ce même tableau 15. La zone de simulation est comprise entre 2 et 12 \AA^{-1}

Tableau 15 : Ajustement des données pour la détermination de la structure de composés d'uranyle de référence utilisés pour les études expérimentales. O_{ax} : Oxygène axial. O_{eq} : Oxygène équatorial. Les incertitudes sont de 0,02 \AA pour R et 20% pour N.

Espèces	Couches modélisées R (\AA)	U- O_{ax}	U- O_{eq}	U-C ou U-P
		N R (\AA) σ^2 (\AA^2)	N R (\AA) σ^2 (\AA^2)	N R (\AA) σ^2 (\AA^2)
UO ₂ ²⁺ (pH 1)	O_{ax} 1,78 \AA	2 (fixé)	5,6	
	O_{eq} 2,38 \AA	1,74	2,42	
		0,002	0,009	
Carbonate d'uranyle (pH 7)	O_{ax} 1,78 \AA	2 (fixé)	7	2,5
	O_{eq} 2,46 \AA	1,78	2,44	2,86
	C 2,95 \AA	0,002	0,001	0,007
Citrate d'uranyle (pH 7)	O_{ax} 1,78 \AA	2 (fixé)	6,9	2,8
	O_{eq} 2,38 \AA	1,79	2,39	2,92
	C 2,94 \AA	0,005	0,01	0,01
Malate d'uranyle (pH 7)	O_{ax} 1,78 \AA	2 (fixé)	6,9	1,2
	O_{eq} 2,38 \AA	1,77	2,37	2,95
	C 2,90 \AA	0,007	0,01	0,0005
Acétate d'uranyle (pH 7)	O_{ax} 1,74 \AA	2 (fixé)	7	2,5
	O_{eq} 2,46 \AA	1,78	2,44	2,86
	C 2,95 \AA	0,002	0,01	0,007
Phosphate d'uranyle (pH 7)	O_{ax} 1,78 \AA	2 (fixé)	5,2	1,4
	O_{eq} 2,28 \AA	1,75	2,26	2,87
	P 3,30 \AA	0,005	0,009	0,006

La troisième couche d'atomes après les oxygènes axiaux (O_{ax}) et équatoriaux (O_{eq}) est dans certains cas essentielle pour permettre un ajustement correct des données. Cette troisième couche peut être constituée d'atomes de carbone, pour le carbonate et les acides d'uranyle, ou d'atomes de phosphore, pour le phosphate d'uranyle. En revanche, Lorsque le programme converge vers $N=0$, ou lorsque le terme de Debye-Waller est négatif, cette couche est exclue de la simulation.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux de la littérature présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Structures de différents complexes d'uranyle décrits dans la littérature.

Espèces	Référence	U-O_{ax}	U-O_{eq}	U-C ou U-P
		N R (Å)	N R (Å)	N R (Å)
Carbonate d'uranyle	Bernhard <i>et al.</i> 2001	2 1,78	6 2,46	3 2,90
Citrate d'uranyle	Allen <i>et al.</i> 1996	2 1,78	5 2,38	2 2,94
Malate d'uranyle	Allen <i>et al.</i> 1996	2 1,78	2 couches : 2,7 O _{eq1} à 2,33Å 2,7 O _{eq2} à 2,45Å	2 2,94
Acétate d'uranyle	Bailey <i>et al.</i> 2004	2 1,77	4,5 2,41	2 2,92
Phosphate d'uranyle	Panak <i>et al.</i> 2002	2 1,78	3 2,29	2 3,60

De légères différences sont observées entre les résultats expérimentaux et les résultats de la littérature. Nous ne sommes pas capables d'obtenir un ajustement des données correctes pour la liaison U-P avec notre méthode. Les différences dans les secondes couches entre nos composés de référence et les résultats de la littérature peuvent provenir de conditions différentes tels que la concentration du radionucléide et du complexant, le pH ou la température. L'acétate d'uranyle, étudié par Bailey *et al.*, par exemple, est mis en solution à pH acide, aux alentours de 3, alors que notre échantillon est préparé à pH neutre. Il est donc possible que nous n'ayons pas obtenu, par ce protocole, le même composé de référence.

Des différences significatives dans nos références sont observables entre le carbonate d'uranyle, les acides organiques d'uranyle et le phosphate d'uranyle. Le carbonate d'uranyle se distingue par la longueur U-O_{eq} élevée ($2,44 \pm 0,02 \text{ \AA}$) au contraire du phosphate d'uranyle qui possède une distance courte entre l'atome central d'uranium et ses oxygènes équatoriaux ($2,26 \pm 0,02 \text{ \AA}$). Les paramètres structuraux du malate et du citrate d'uranyle sont proches, ce qui pourrait montrer que les mêmes groupements sont concernés dans la liaison à l'uranium, c'est-à-dire la fonction carboxylique et la fonction hydroxyle voisine. L'acétate, qui ne possède pas cette fonction hydroxyle proche de la fonction carboxylique, montre des paramètres structuraux équivalents au carbonate d'uranyle mais avec un nombre d'O_{eq} plus faible.

II. ETUDE DE LA SPECIATION DE L'URANIUM LORS DE LA CULTURE DE *C. METALLIDURANS* CH34

1. Détermination de la spéciation par combinaisons linéaires.

Après normalisation des spectres, les oscillations EXAFS ont été extraites. Ce signal a été reconstruit par combinaison linéaires des oscillations extraites des spectres de référence.

*a. Spéciation dans les milieux de culture de *C. metallidurans* CH34*

Ces traitements ont été réalisés sur les milieux de culture CSM à pH 1 et à pH 7, dans lesquels 1mM d'uranium ont été ajoutés. Ces milieux de culture ont été analysés en phase liquide. Pour mettre en évidence une possible transformation de la spéciation de l'uranium durant la culture, ces milieux ont été analysés à des temps différents après l'ajout d'uranium. Il s'agit des temps initiaux t_0 et des temps de fin d'exposition, 75h à pH 7 et 24h à pH 1.

La figure 80 présente les oscillations EXAFS en $k^3 \cdot \chi(k)$ du milieu de culture CSM à pH 1 à t_0 et sa reconstruction par combinaison linéaire des composés de références présentés dans les paragraphes précédents (uranyle libre à pH 1, citrate d'uranyle, phosphate d'uranyle, acétate d'uranyle et carbonate d'uranyle à pH 7, voir figure 76 et 78). La zone de calcul est comprise entre 3,6 et 10 \AA^{-1} pour tous les échantillons par souci d'homogénéité et pour éviter le bruit important après 10 \AA^{-1} .

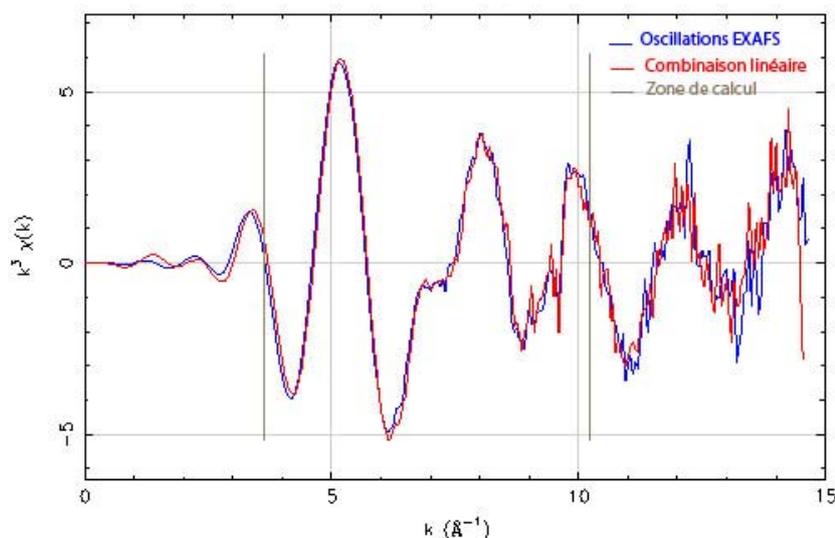


Figure 80: Oscillations EXAFS $k^3 \chi(k)$ de l'uranium en milieu CSM à pH 1 et à t_0 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes grises.

Dans la zone définie de simulation, les oscillations reconstituées se superposent parfaitement à celles obtenues expérimentalement. Ici, le spectre recomposé étant le plus proche du spectre expérimental est obtenu par combinaison de 95% d'uranyle libre et 5% de citrate d'uranyle.

Le tableau 17 présente les résultats des combinaisons linéaires optimales obtenues lors de l'analyse des oscillations EXAFS pour chaque échantillon ainsi que le facteur R qui représente l'accord entre le spectre reconstruit et le spectre expérimental. Plus le facteur R est bas, plus la simulation est bonne. La formule mathématique du facteur R est la suivante (Equation 4) :

$$R = \frac{\sum \left[\left(k^3 \chi(k)_{\text{expérimental}} - k^3 \chi(k)_{\text{comb. lin.}} \right)^2 \right]}{\sum \left[\left(k^3 \chi(k)_{\text{expérimental}} \right)^2 \right]}$$

Equation 4 : Formule mathématique du facteur R.

Tableau 17 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des milieux de culture utilisés pour les expositions de *C. metallidurans* CH34 comparé à la spéciation théorique estimée par le logiciel JCHESS.

Echantillon	Combinaison linéaire optimale	Facteur R	Spéciation théorique
Milieu CSM pH 7 t_0	31% Uranyle 48% Phosphate d'uranyle 21% Citrate d'uranyle	0,048	100% Citrate d'uranyle
Milieu CSM pH 7 t_{75}	100% Carbonate d'uranyle	0,028	Non calculable
Milieu CSM pH 1 t_0	95% Uranyle 5% Citrate d'uranyle	0,021	100% Uranyle
Milieu CSM pH 1 t_{24}	95% Uranyle 5% Acétate d'uranyle	0,019	Non calculable

La reconstruction du signal à pH 1 permet de vérifier la spéciation théorique modélisée par JCHESS. A t_0 et à t_{24} , l'uranium est totalement sous la forme uranyle libre avec une faible proportion de formes complexées à du citrate ou de l'acétate. Les deux facteurs R sont également très bas, les combinaisons linéaires étant donc de bonne qualité.

La spéciation à pH 7 au temps initial de mise en solution de l'uranium dans le milieu CSM est différente de la spéciation théorique calculée par JCHESS. La spéciation expérimentale révèle la présence d'un mélange de différentes formes chimiques comprenant environ 50% de phosphate d'uranyle soluble et une proportion identique d'uranyle libre et de citrate d'uranyle. Ce mélange de formes est difficilement explicable sachant que le phosphate d'uranyle est très peu soluble et que le composé de référence était un précipité. L'ion uranyle n'est de plus pas théoriquement libre à un tel pH avec de tels complexants. Seulement, si l'on retire ces espèces du calcul, le facteur R augmente fortement. Cette combinaison linéaire des composés de référence, pourtant optimale, ne peut donc refléter la réalité.

Après 75h de croissance de la bactérie dans ce milieu, 100% de l'uranium est sous la forme de carbonate d'uranyle. Il y aurait donc un changement de spéciation au cours du temps et une association aux carbonates qui proviendraient de la dissolution du CO₂ dans le milieu de culture lors de la croissance bactérienne : cette dernière a lieu à l'air, sous agitation. Les facteurs R sont très bas, ce qui montre que

l'accord entre le spectre reconstruit et le spectre expérimental est important. Si l'on réalise la reconstruction du signal à t_{75} sans les complexes carbonatés de l'uranium, car les carbonates devraient être minoritaire dans le milieu, la spéciation devient 60% de citrate d'uranyle et 40% d'uranyle libre pour un facteur R de 0,088, ce qui est bien plus élevé qu'en présence de carbonate d'uranyle. L'ion uranyle ne pouvant, de plus, être libre à un tel pH, cette combinaison linéaire n'est donc pas réaliste. La spéciation de l'uranium dans ces conditions est donc du carbonate d'uranyle mais il pourrait également nous manquer des références.

b. Spéciation dans les culots bactériens de C. metallidurans CH34

Les mêmes traitements ont été appliqués aux oscillations EXAFS des culots bactériens après de longs temps de contact entre la bactérie et l'uranium (75h à pH 7 et 24h à pH 1 à 1mM d'uranium).

La figure 81 présente les oscillations EXAFS en $k^3 \cdot \chi(k)$ et sa reconstruction par combinaison linéaire de l'échantillon à pH 7 à t_{75} grâce aux mêmes composés de référence.

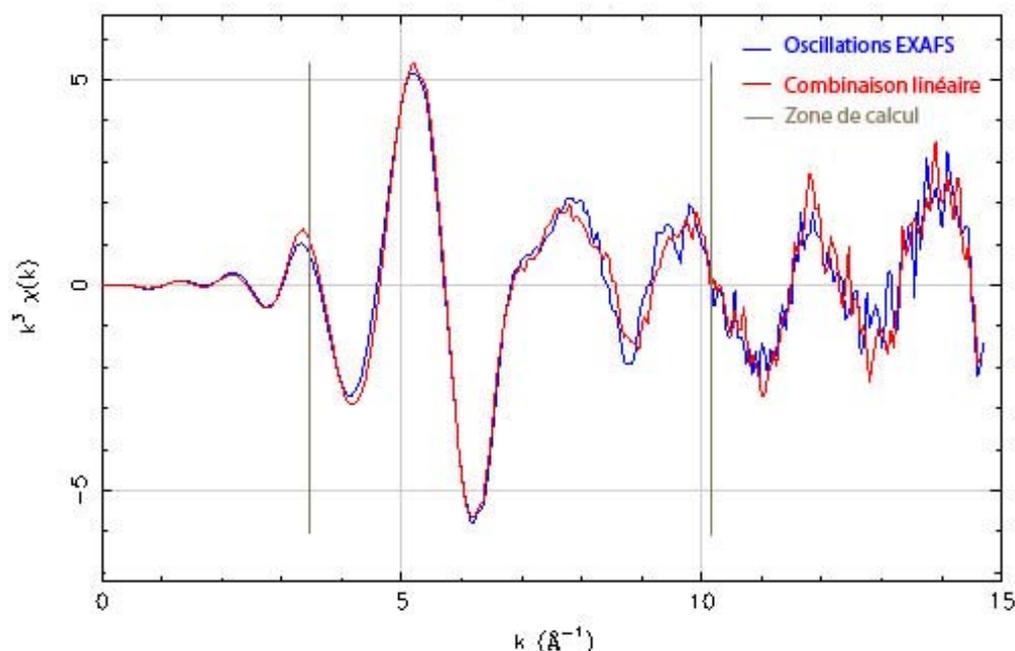


Figure 81 : Oscillations EXAFS $k^3 \chi(k)$ de l'uranium dans les culots bactériens de *C. metallidurans* CH34 à pH 7 et à t_{75} (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes grises.

Dans la zone définie de simulation, les oscillations reconstituées se superposent à celles obtenues expérimentalement. Les différences entre la courbe expérimentale et la courbe calculée sont légèrement plus importantes que pour le profil présenté dans la partie précédente à partir de 7 \AA^{-1} . Le facteur R reste malgré tout très bas ce qui montre la bonne reconstruction du signal.

Le tableau 18 présente les résultats des combinaisons linéaires optimales obtenues lors de l'analyse des oscillations EXAFS pour chaque échantillon de culots bactériens ainsi que le facteur R associé.

Tableau 18 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des échantillons d'uranium dans les culots bactériens de *C. metallidurans* CH34.

Echantillon	Combinaison linéaire optimale	Facteur R	Spéciation théorique
Culots bactérien pH7 t_{75}	44% Carbonate d'uranyle 13% Uranyle 44% Phosphate d'uranyle	0,032	Non calculable
Culots bactérien pH1 t_{24}	45% Uranyle 55% Phosphate d'uranyle	0,032	Non calculable

La spéciation de l'uranium dans les culots bactériens à pH 7 semble également être un mélange d'espèces. Les formes principales sont les carbonates d'uranyle et les phosphate d'uranyle avec une faible concentration d'uranyle libre, ce qui n'est théoriquement pas possible car dans ces conditions, seules des formes complexées de l'uranyle devraient être présentes. Les précipités mis en évidence au microscope électronique en transmission pourraient donc être des formes carbonatées et phosphatées de l'uranium associées aux groupes carboxyles et phosphates des molécules de la paroi bactérienne.

La spéciation dans les culots bactériens à pH 1 montre un mélange de complexe de phosphates d'uranyle et d'uranyle libre. Le facteur R est toujours très bas. Les précipités mis en évidence au microscope électronique en transmission seraient donc des précipités de phosphates d'uranyle.

2. Ajustement des données des composés d'uranium.

Les résultats des ajustements des données sont comparés aux résultats théoriques que l'on devrait retrouver en présence des mélanges obtenus par les combinaisons linéaires.

*a. Spéciation de l'uranium dans les milieux de culture de *C. metallidurans* CH34*

La figure 82 présente l'ajustement des données par la méthode des couches d'atomes successives du spectre EXAFS de l'échantillon CSM à pH 7 et à t_{75} dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés.

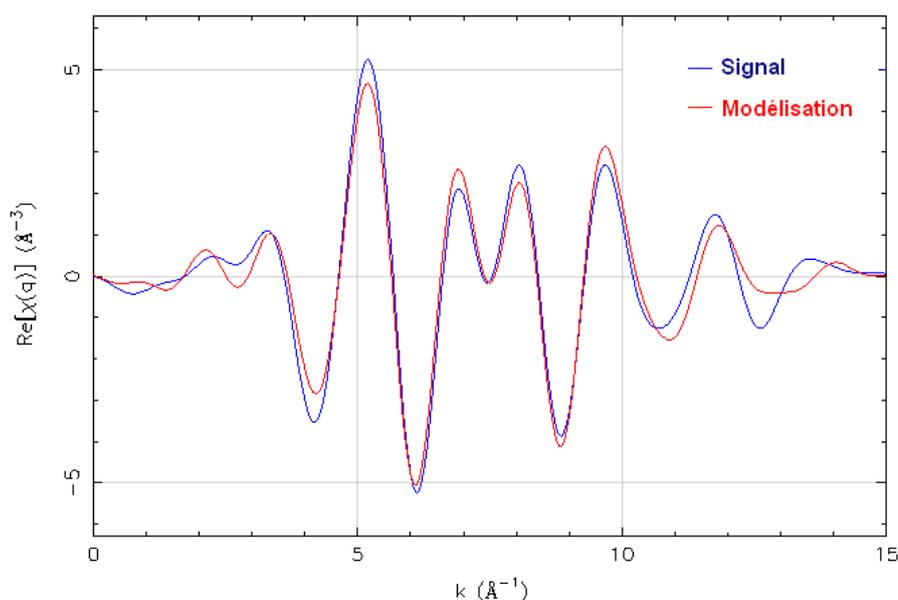


Figure 82 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'échantillon CSM à pH 7 et à 75h dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés (bleu) et l'ajustement des données (rouge).

Les paramètres utilisés pour l'ajustement des données font toujours apparaître trois couches d'atomes différentes. Une première couche d'oxygènes équatoriaux à 1,78 Å, une deuxième couche d'oxygènes équatoriaux à 2,38 Å et une troisième couche de carbone à 2,90 Å ou de phosphate à 3,30 Å. Le tableau 19 présente les paramètres structuraux calculés après la reconstruction du signal.

Tableau 19 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les milieux de culture de *C. metallidurans* CH34.

	U-O_{ax}	U-O_{eq}	U-C	Résultats théoriques selon la combinaison linéaire
CSM pH 7 t₀	N = 2 (fixé) R = 1,77 Å $\sigma^2 = 0,004 \text{ \AA}^2$	N = 6,5 R = 2,37 Å $\sigma^2 = 0,010 \text{ \AA}^2$	N = 1 R = 2,88 Å $\sigma^2 = 0,004 \text{ \AA}^2$	U-O_{ax} : 1,76 Å U-O_{eq} : 4,2 à 2,35 Å
CSM pH 7 t₇₅	N = 2 (fixé) R = 1,79 Å $\sigma^2 = 0,002 \text{ \AA}^2$	N = 5,5 R = 2,46 Å $\sigma^2 = 0,007 \text{ \AA}^2$	N = 1,8 R = 2,89 Å $\sigma^2 = 0,001 \text{ \AA}^2$	U-O_{ax} : 1,78 Å U-O_{eq} : 6 à 2,46 Å
CSM pH 1 t₀	N = 2 (fixé) R = 1,75 Å $\sigma^2 = 0,002 \text{ \AA}^2$	N = 5,6 R = 2,42 Å $\sigma^2 = 0,010 \text{ \AA}^2$	N = 0,9 R = 2,91 Å $\sigma^2 = 0,001 \text{ \AA}^2$	U-O_{ax} : 1,74 Å U-O_{eq} : 5,6 à 2,42 Å
CSM pH 1 t₂₄	N = 2 (fixé) R = 1,75 Å $\sigma^2 = 0,002 \text{ \AA}^2$	N = 5,6 R = 2,42 Å $\sigma^2 = 0,010 \text{ \AA}^2$	N = 0,7 R = 2,91 Å $\sigma^2 = 0,001 \text{ \AA}^2$	U-O_{ax} : 1,74 Å U-O_{eq} : 5,6 à 2,42 Å

Les ajustements des données qui correspondent le mieux aux oscillations sont celles qui font intervenir une couche de carbone à environ 2,90 Å. Une couche de phosphate à 3,30 Å ne permet pas de reconstruire correctement le signal et les valeurs du nombre de coordination sont négatives ce qui montre qu'il n'y a pas d'atome de phosphate dans un environnement proche de l'atome d'uranium. Cependant, la modélisation avec une troisième couche d'atomes, qu'elle soit de carbone ou de phosphate, donne des résultats équivalents sur les deux premières couches ce qui semble valider les paramètres de ces deux sphères de coordination. Seules ces sphères seront donc prises en compte dans l'analyse des résultats, et ce, pour tout le chapitre.

Au temps initial dans le milieu CSM à pH 7, l'ajustement des spectres montre la présence d'acides organiques d'uranyle. Le nombre d'oxygènes équatoriaux et la longueur de la liaison U-O_{eq} est en adéquation avec celle du citrate d'uranyle qui est la spéciation théorique dans ce milieu. Cependant, les combinaisons linéaires faisaient apparaître des complexes de phosphates d'uranyle solubles qui ne sont jamais calculés sous JCHESS. Les résultats des simulations semblent donc plus proches de la spéciation théorique attendue et des observations expérimentales.

Dans ce même milieu CSM à pH 7 et à 75h, la présence de complexes carbonatés d'uranium en grande majorité semble être confirmée par le calcul de 5,5 atomes d' O_{eq} à 2,46Å.

Les résultats en milieu CSM à pH 1 concordent totalement avec les combinaisons linéaires. La présence d'une grande majorité d'ions uranyle libres est donc confirmée.

b. Spéciation de l'uranium dans les culots bactériens de C. metallidurans CH34

Les ajustements des données ont été effectués de la même manière pour les culots bactériens.

La figure 83 présente l'ajustement du spectre EXAFS par la méthode par couches d'atomes successives de l'échantillon à pH 7 et à t_{75} dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés.

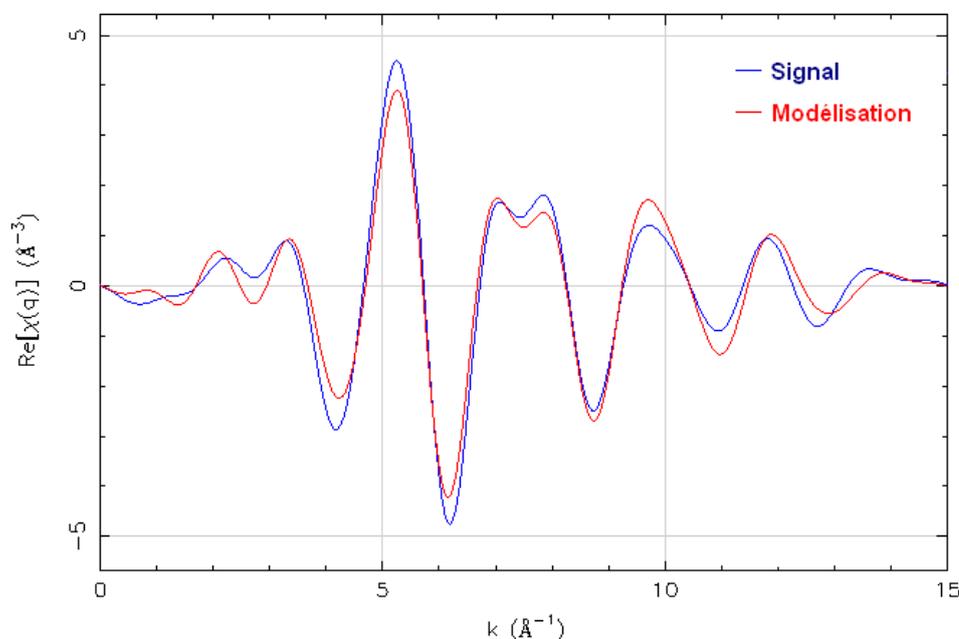


Figure 83 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'échantillon de culot bactérien de *C. metallidurans* CH34 à pH 7 et à 75h dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés (bleu) et l'ajustement des données (rouge).

L'ajustement des données se superpose bien aux oscillations EXAFS sur toute la zone de simulation, comprise entre 2,5 et 11,5 Å⁻¹.

Les paramètres de modélisation sont les mêmes que précédemment. Le tableau 20 présente les paramètres structuraux calculés après la reconstruction du signal.

Tableau 20 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les culots bactériens de *C. metallidurans* CH34.

	U-O_{ax}	U-O_{eq}	U-C	Résultats théoriques selon la combinaison linéaire
Culot bactérien pH 7 t₇₅	N = 2 (fixé) R = 1,79 Å $\sigma^2 = 0,01$	N = 7,2 R = 2,45 Å $\sigma^2 = 0,02$	N = 2,5 R = 2,90 Å $\sigma^2 = 0,007$	U-O_{ax} : 1,78 Å U-O_{eq} : 4,6 à 2,38 Å
Culot bactérien pH 1 t₂₄	N = 2 (fixé) R = 1,76 Å $\sigma^2 = 0,003$	N = 5,0 R = 2,37 Å $\sigma^2 = 0,01$	N = 0,7 R = 2,92 Å $\sigma^2 = 0,002$	U-O_{ax} : 1,76 Å U-O_{eq} : 4,2 à 2,35 Å

Comme pour les milieux de culture, les ajustements qui simulent le mieux le signal sont celles qui font intervenir une couche d'atomes de carbone à environ 2,90 Å. Une couche d'atome de phosphate ne permet de pas de reconstruire efficacement les oscillations et les résultats donnent des nombres de coordination nuls et un facteur de Debye-Waller négatif, signe d'une erreur de nature de voisin ou d'une absence de troisième couche.

Les ajustements dans les culots bactériens à pH 7 ne semblent faire apparaître que des complexes de carbonate d'uranyle. La présence de phosphate d'uranyle aurait dû faire diminuer le nombre d'O_{eq} ainsi que la longueur de la liaison U-O_{eq}. Il est cependant difficile de modéliser un mélange de carbonate et de phosphate d'uranyle car les troisièmes sphères sont éloignées et la nature des atomes est également différente. Cela peut être une explication à l'absence de phosphate d'uranyle dans ces modélisations. Une autre explication pourrait venir du facteur de Debye-Waller élevé pour la liaison U-O_{eq}. Ceci peut être provoqué par la différence de longueur importante entre les complexes de carbonate et de phosphate d'uranyle. Les phosphates d'uranyle seraient bien présents mais l'ajustement des données ne le fait pas apparaître.

Les ajustements des culots bactériens à pH 1 sont également en adéquation avec les combinaisons linéaires. Il y aurait donc un mélange d'ion uranyle libre et de complexes de phosphate d'uranyle dans les bactéries exposées à l'uranium dans cette condition.

Après avoir ainsi déterminé la spéciation de l'uranium en contact avec *C. metallidurans* CH34, nous allons réaliser la même étude pour *R. palustris*.

III. ETUDE DE LA SPECIATION DE L'URANIUM LORS DE LA CULTURE DE *R. PALUSTRIS*

Les études ont été réalisées sur les milieux de culture Hutner modifié à pH 1 et à pH 7, dans lesquels 1mM d'uranium ont été ajoutés. Pour mettre en évidence une possible transformation de la spéciation de l'uranium durant la culture, ces milieux ont été analysés à des temps différents après l'ajout d'uranium. Il s'agit des temps initiaux t_0 et des temps de fin de contact, 75h à pH 7 et 24h à pH 1.

1. Détermination de la spéciation par combinaisons linéaires.

De la même manière que pour *C. metallidurans* CH34, la spéciation de l'uranium dans les milieux de culture et les culots bactériens a été calculée par reconstruction du signal EXAFS grâce aux composés de référence.

*a. Spéciation dans les milieux de culture de *R. palustris**

La figure 84 présente les oscillations EXAFS en $k^3 \cdot \chi(k)$ et sa reconstruction par combinaison linéaire en milieu Hutner modifié à pH 1 à t_0 .

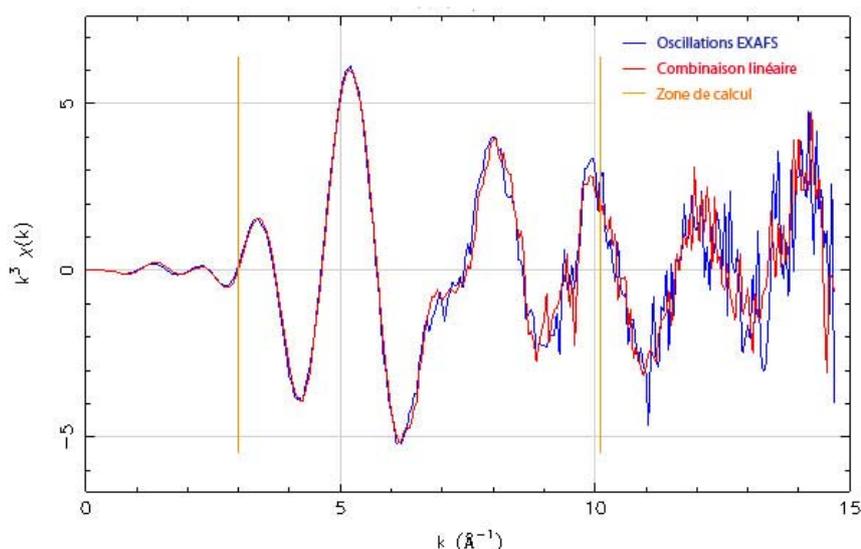


Figure 84 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium en milieu Hutner modifié à pH 1 et à t_0 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes jaunes.

Dans la zone définie de simulation, les oscillations reconstituées se superposent à celles obtenues expérimentalement. Le bruit est plus important que pour les milieux de *C. metallidurans* CH34 à partir de 9 \AA^{-1} . Le facteur R reste, malgré tout, très bas ce qui montre la bonne reconstruction du signal.

Le tableau 21 présente les résultats obtenus pour chaque échantillon ainsi que les facteurs R. La spéciation théorique n'est pas représentée car elle n'est pas modélisable et calculable du fait que le milieu ne soit pas totalement défini.

Tableau 21 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des milieux de culture utilisés pour les expositions de *R. palustris*.

Echantillon	Combinaison linéaire optimale	Facteur R
Milieu Hutner modifié pH 7 t_0	64% Malate d'uranyle 36% Acétate d'uranyle	0,034
Milieu Hutner modifié pH 7 t_{75}	88% Malate d'uranyle 12% Acétate d'uranyle	0,21
Milieu Hutner modifié pH 1 t_0	100% Uranyle	0,028
Milieu Hutner modifié pH 1 t_{24}	25% Carbonate d'uranyle 75% Uranyle	0,029

Conformément aux attentes, la spéciation de l'uranium en milieu Hutner modifié à pH 7 et à t_0 est majoritairement du malate d'uranyle. Le facteur R est bas ce qui montre la justesse de la combinaison linéaire. Tout l'uranium ne serait pas complexé au malate, une part moins importante resterait associée à l'acétate. Cette proportion d'acétate d'uranyle est moins importante après 75h de culture mais le facteur R est très élevé du fait du bruit important des spectres dans ces conditions.

La spéciation dans le milieu Hutner modifié à pH 1 montre que la totalité de l'uranium est sous forme d'uranyle libre à t_0 . Après 24h de contact, un quart de l'uranium est complexé aux carbonates, les trois quarts restants toujours libres. Ce résultat est surprenant car il n'y a pas de carbonates dans le milieu. Ces carbonates peuvent provenir des débris cellulaires provenant de la lyse des bactéries provoquée par le pH très acide ou du métabolisme bactérien. Seulement, il a été montré que la totalité des bactéries étaient mortes dans ces conditions.

*b. Spéciation dans les culots bactériens de *R. palustris**

Les mêmes traitements ont été réalisés pour les signaux EXAFS des culots bactériens de *R. palustris* après de longs temps de contact entre la bactérie et l'uranium (75h à pH 7 et 24h à pH 1).

La figure 85 présente les oscillations EXAFS en $k^3 \cdot \chi(k)$ et sa reconstruction par combinaison linéaire de l'échantillon à pH 7 à t_{75} .

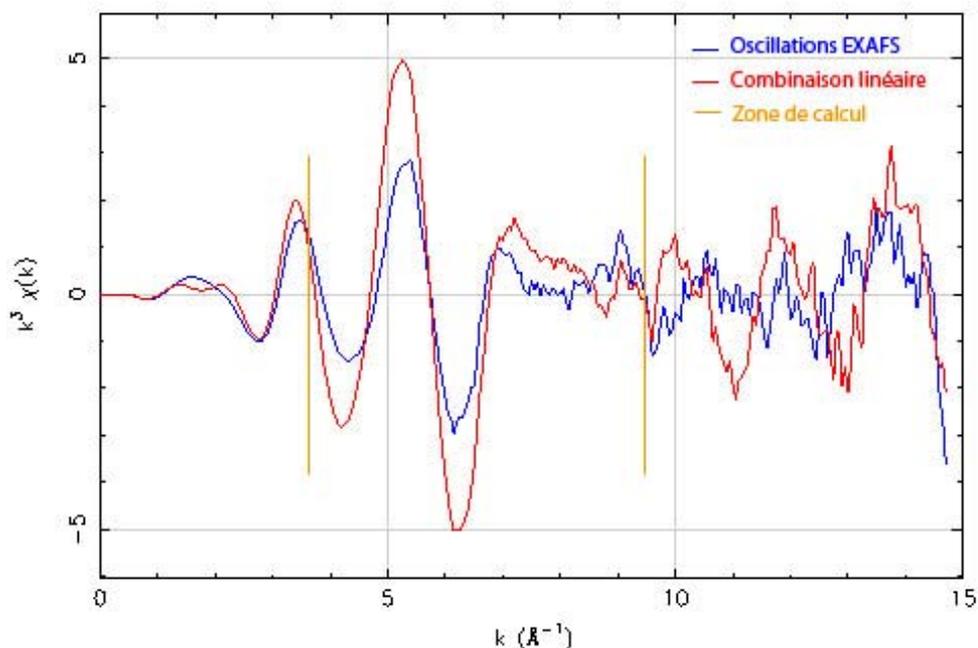


Figure 85 : Oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium des culots bactériens de *R. palustris* à pH 7 et à t_{75} (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes jaunes.

La reconstruction du signal par combinaisons linéaires n'ajuste pas le signal. Une différence d'amplitude peut être notée sur les premières oscillations de la zone de simulation ainsi qu'un léger déphasage.

Le tableau 22 présente les résultats des combinaisons linéaires optimales obtenues lors de l'analyse des oscillations EXAFS pour chaque échantillon de culots bactériens ainsi que le facteur R associé.

Tableau 22 : Résultats des combinaisons linéaires optimales des oscillations EXAFS des échantillons d'uranium des culots bactériens de *R. palustris*.

Echantillon	Combinaison linéaire optimale	Facteur R
Culots bactérien pH7 t_{75}	58% Malate d'uranyle 42% Phosphate d'uranyle	0,88
Culots bactérien pH1 t_{24}	45% Uranyle 55% Phosphate d'uranyle	0,37

Dans les culots bactériens à pH 7, on retrouve deux sortes d'espèces d'uranium avec environ 40% de phosphate d'uranyle et le reste de malate d'uranyle. Le facteur R est élevé car la reconstruction du signal est difficile. Nous n'avons pas de spectres adéquats qui simulent cette forme d'uranium dans notre base de données de spectres de référence. On a vu qu'il existait une différence importante dans les amplitudes des sinusoïdes et un léger déphasage. Les résultats semblent montrer une précipitation de l'uranium avec les phosphates comme il était supposé après les observations au microscope électronique en transmission.

Les résultats de la spéciation de l'uranium dans les culots bactériens à pH 1 sont identiques à ceux à pH 7. Une proportion importante de l'uranium est complexée aux phosphates. Il semble que le même phénomène de précipitation soit présent à pH 1 et à pH 7 pour *R. palustris*. Le facteur R est également important ici comme à pH 7 du fait d'une différence d'amplitude et d'un léger déphasage.

Les combinaisons linéaires n'apportent donc pas de réponse à la détermination de la spéciation de l'uranium. Afin de déterminer la structure locale autour de l'atome d'uranium dans les complexes en présence, nous avons donc modélisé les oscillations EXAFS.

2. Ajustement des données des composés d'uranium.

Les ajustements des données ont été réalisés de la même manière que pour les spectres faisant intervenir *C. metallidurans* CH34. Les résultats sont comparés aux résultats théoriques que l'on devrait retrouver en présence des mélanges obtenus par les combinaisons linéaires.

a. Spéciation de l'uranium dans les milieux de culture de R. palustris

La figure 86 présente l'ajustement du signal EXAFS par couches d'atomes successives de l'échantillon Hutner modifié à pH 1 et à t_0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés.

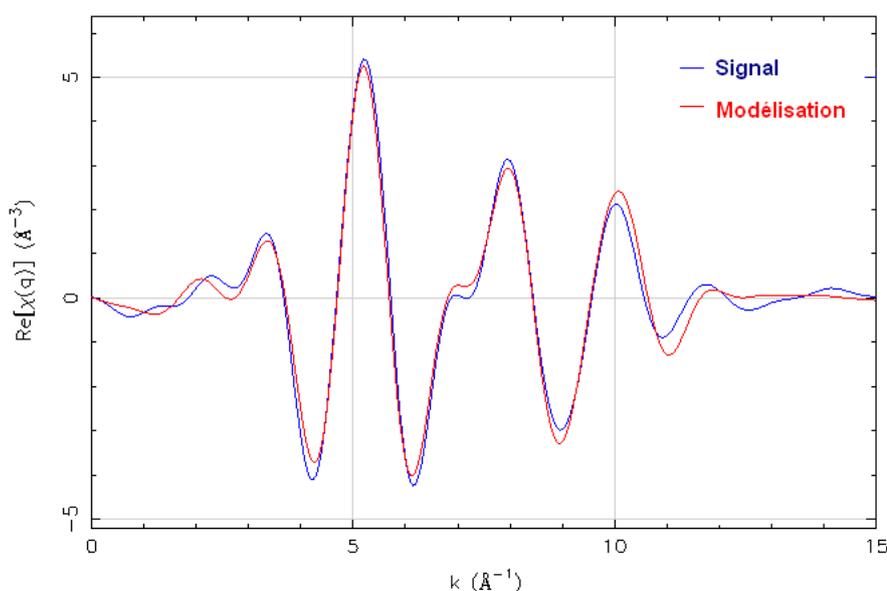


Figure 86 : Partie réelle des oscillations EXAFS du milieu de culture Hutner modifié à pH 1 et à t_0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés (bleu) et l'ajustement des données (rouge).

Les paramètres des ajustements sont identiques à ceux utilisés pour le traitement des données de *C. metallidurans* CH34.

Le tableau 23 présente les paramètres structuraux calculés après la reconstruction du signal.

Tableau 23 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les milieux de culture de *R. palustris*.

	U-O_{ax}	U-O_{eq}	U-C	Résultats théoriques selon la combinaison linéaire
Hutner modifié pH 7 t_0	N = 2 (fixé) R = 1,77 Å $\sigma^2 = 0,006$	N = 6,7 R = 2,35 Å $\sigma^2 = 0,010$	N = 1,3 R = 2,95 Å $\sigma^2 = 0,001$	U-O_{ax} : 1,77 Å U-O_{eq} : 5,4 à 2,37 Å
Hutner modifié pH 7 t_{75}	N = 2 (fixé) R = 1,75 Å $\sigma^2 = 0,010$	N = 7,2 R = 2,34 Å $\sigma^2 = 0,010$	N = 1 (fixé) R = 2,90 Å $\sigma^2 = -0,004$	U-O_{ax} : 1,78 Å U-O_{eq} : 5,5 à 2,38 Å
Hutner modifié pH 1 t_0	N = 2 (fixé) R = 1,78 Å $\sigma^2 = 0,001$	N = 5,3 R = 2,43 Å $\sigma^2 = 0,009$	N = 0,8 R = 2,94 Å $\sigma^2 = 0,001$	U-O_{ax} : 1,74 Å U-O_{eq} : 5,6 à 2,42 Å
Hutner modifié pH 1 t_{24}	N = 2 (fixé) R = 1,74 Å $\sigma^2 = 0,002$	N = 6,1 R = 2,43 Å $\sigma^2 = 0,010$	N = 1,2 R = 2,96 Å $\sigma^2 = 0,003$	U-O_{ax} : 1,75 Å U-O_{eq} : 5,9 à 2,43 Å

Comme précédemment, c'est l'introduction d'atomes de carbone dans une troisième sphère de coordination qui donne les meilleures simulations.

Le calcul des paramètres structuraux autour de l'atome d'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 7 montre des valeurs de longueurs de liaison U-O_{eq} et de nombre de coordination proche de celles du malate d'uranyle et non pas d'un mélange d'acétate et de malate d'uranyle. Le nombre d'atomes d'oxygène équatoriaux est plus élevé et la longueur de la liaison plus courte qu'attendu. L'ensemble de l'uranium serait donc complexé au malate dans le milieu Hutner à pH 7 jusqu'à 75h de culture.

Comme dans le cas de *C. metallidurans* CH34, l'ajustement à pH 1 confirme les résultats obtenus par reconstruction du signal EXAFS par combinaison linéaire. Au temps initial, tout l'uranium présent dans le milieu de culture est sous forme libre UO₂²⁺. Après 24h de contact, une partie de cet uranyle soluble semble être complexé à des groupements carboxyles car le nombre d'O_{eq} a augmenté. Ces groupements carboxyles pourraient provenir des débris cellulaires des bactéries lysées par le faible pH.

b. Spéciation de l'uranium dans les culots bactériens de R. palustris

Les ajustements des données ont été effectués de la même manière pour les culots bactériens.

La figure 87 présente l'ajustement du signal par la méthode des couches d'atomes successives de l'échantillon à pH 1 et à t₂₄ dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés.

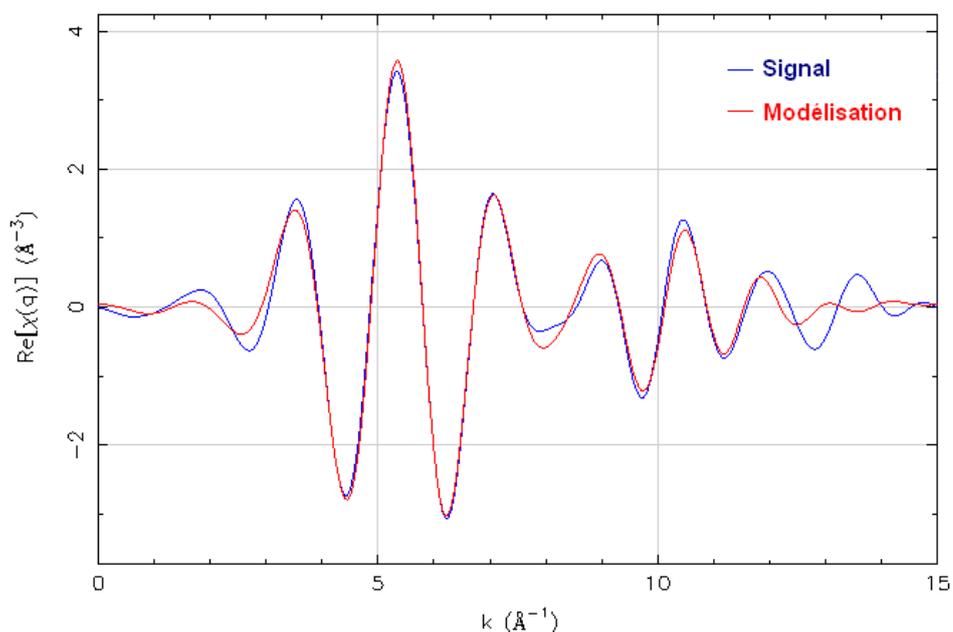


Figure 87 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'échantillon culot bactérien de *R. palustris* à pH 1 à 24h dans l'espace des vecteurs d'onde filtrés (bleu) et l'ajustement des données (rouge).

L'ajustement du signal se superpose bien aux oscillations EXAFS sur toute la zone de simulation, comprise entre 2,5 et 11,5 Å⁻¹.

Les paramètres des ajustements sont les mêmes que précédemment. Le tableau 24 nous présente les paramètres structuraux calculés après l'ajustement du signal.

Tableau 24 : Paramètres structuraux de l'uranyle calculés après ajustement des données dans les culots bactériens de *R. palustris*.

	U-O_{ax}	U-O_{eq}	U-C	Résultats théoriques selon la combinaison linéaire
Culot bactérien pH 7 t₇₅	N = 2 (fixé) R = 1,79 Å σ ² = 0,01	N = 7,2 R = 2,45 Å σ ² = 0,02	N = 2,5 R = 2,90 Å σ ² = 0,007	U-O_{ax} : 1,78 Å U-O_{eq} : 4,45 à 2,34 Å
Culot bactérien pH 1 t₂₄	N = 2 (fixé) R = 1,72 Å σ ² = 0,02	N = 5,3 R = 2,30 Å σ ² = 0,009	N = 1,1 R = 2,88 Å σ ² = 0,001	U-O_{ax} : 1,78 Å U-O_{eq} : 4,45 à 2,34 Å

L'ajustement dans le culot bactérien à pH 7 fait apparaître des paramètres structuraux très proches du carbonate d'uranyle. Selon les combinaisons linéaires, du phosphate d'uranyle devrait être observé. Seulement, le nombre d' O_{eq} et la longueur de la liaison n'ont pas diminué comme cela devrait être le cas en présence de phosphate d'uranyle. Comme pour *C. metallidurans* CH34, seul du carbonate d'uranyle est modélisé alors que les combinaisons linéaires faisaient apparaître du phosphate d'uranyle. On peut cependant remarquer que le facteur de Debye-Waller de la liaison U- O_{eq} est important ce qui pourrait montrer qu'il existe d'autres sites de fixation de l'uranium et donc un autre composé qui pourrait être du phosphate d'uranyle. D'autre part, l'observation des spectres obtenus après ajustement laisse apparaître que le signal n'est pas correctement ajusté.

Les calculs des paramètres structuraux autour de l'atome d'uranium dans les culots bactériens à pH 1 font apparaître une longueur de liaison U- O_{eq} courte et caractéristique du phosphate d'uranyle. Là encore, la spéciation calculée par le logiciel Athena est confirmée, l'uranium se complexe aux phosphates autour et dans les bactéries.

CONCLUSION SPECIATION EXPERIMENTALE DE L'URANIUM

Nous avons pu étudier la spéciation de l'uranium dans les milieux de culture et les bactéries chez *C. metallidurans* CH34 et *R. palustris* grâce à la spectroscopie d'absorption des rayons X. Les spectres obtenus ont été analysés de deux façons différentes et complémentaires. Dans la grande majorité, les déterminations des spéciations sont identiques. C'est le cas pour tous les échantillons à pH 1. Les combinaisons linéaires dans les milieux de culture à pH 7 laissent apparaître des mélanges d'espèces qui ne sont pas théoriquement attendu dans de telles conditions. Par exemple, les phosphates d'uranyle, insoluble, ne doivent pas être retrouvés dans les milieux de culture à pH 7 comme l'ion uranyle libre, qui est obligatoirement complexé à un pH physiologique avec les molécules en présence. Cette analyse des spectres EXAFS nous a permis d'avoir une idée de la spéciation de l'uranium dans nos échantillons. Une analyse plus poussée, en utilisant des chemins de diffusion simples et multiples, est nécessaire pour valider ces résultats et surtout mieux préciser la spéciation lorsque celle-ci est discutable, comme à pH 7. Cependant, cette analyse des spectres EXAFS semble confirmer les résultats théoriques calculés par le logiciel JCHESS.

Les différences les plus notables entre les deux études se situent au niveau de la spéciation de l'uranium dans les culots bactériens à pH 7. Les combinaisons linéaires montrent la présence de phosphates d'uranyle qui ne sont pas retrouvés lors l'ajustement des données EXAFS. Une seule forme est déterminée par ces ajustements et il s'agit du carbonate d'uranyle et ceci pour les deux espèces bactériennes. Cependant, il est possible que la modélisation n'arrive pas à faire apparaître le phosphate d'uranyle mais qu'il soit tout de même présent, en faible quantité et/ou avec une structure désordonnée. Le facteur de Debye-Waller associé à la liaison U-O_{eq} dans ces échantillons est en effet élevé ce qui pourrait indiquer la présence d'une autre forme d'uranium. Les précipités observés dans ces conditions par microscopie électronique en transmission ne sont pas abondant et il a été montré qu'un tel pH favorisait les interactions de l'uranium avec les groupements carboxyles membranaires plutôt qu'avec les groupements phosphates (Merroun *et al.* 2006)

Le tableau 25 synthétise les différentes spéciations de l'uranium retrouvées dans les différents échantillons.

Tableau 25 : Synthèse de la spéciation de l'uranium dans les différents échantillons analysés pour *C. metallidurans* CH34 et *R. palustris*.

<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34			
pH 7	<u>Milieu de culture t₀</u> 100% Citrate d'uranyle	<u>Milieu de culture t₂₄</u> 100% carbonate d'uranyle	<u>Culots bactériens</u> Mélange carbonate d'uranyle + phosphate d'uranyle ou 100% Carbonate d'uranyle
pH 1	<u>Milieu de culture t₀</u> 100% UO ₂ ²⁺	<u>Milieu de culture t₂₄</u> 100% UO ₂ ²⁺	<u>Culots bactériens</u> 50% UO ₂ ²⁺ + 50% Phosphate d'uranyle
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>			
pH 7	<u>Milieu de culture t₀</u> 100% malate d'uranyle	<u>Milieu de culture t₂₄</u> 100% malate d'uranyle	<u>Culots bactériens</u> Mélange malate d'uranyle + phosphate d'uranyle ou 100% Carbonate d'uranyle
pH 1	<u>Milieu de culture t₀</u> 100% UO ₂ ²⁺	<u>Milieu de culture t₂₄</u> 75% UO ₂ ²⁺ + 25% carbonate d'uranyle	<u>Culots bactériens</u> 50% UO ₂ ²⁺ + 50% Phosphate d'uranyle

La spéciation de l'uranium dans les milieux de culture est bien contrôlée. Les spéciations attendues sont bien retrouvées ce qui montre que le logiciel JCHESS semble être un bon outil de modélisation de la spéciation et que les valeurs de constantes thermodynamiques de la base de données BASSIST sont bonnes. Le malate semble également être un complexant fort de l'uranium, au même titre que le citrate. Après un long temps de contact entre les bactéries et l'uranium, la spéciation de celui-ci peut être modifiée avec une complexation aux carbonates. Alors que la présence de carbonate d'uranyle dans le milieu CSM à 75h est difficilement explicable, la présence de cette même espèce à pH 1 en milieu Hutner modifié à 24h peut être due aux débris cellulaires des cellules lysées par le faible pH. Des groupements carboxyles libres pourraient alors complexer l'ion uranyle. Dans les autres cas, aucun changement de spéciation n'est visible.

On peut remarquer une différence de complexation de l'uranium aux bactéries à pH 7 et à pH 1. Il est cependant difficile de déterminer la spéciation exacte de l'uranium dans les culots bactériens à pH 7. L'élément pourrait se complexer aux groupes carboxyles comme aux groupes phosphates. La présence de phosphate d'uranyle dans les bactéries à pH 1 est par contre sans équivoque. La confirmation de ces précipités va dans le sens de l'hypothèse principale expliquant la formation de ces complexes à un tel pH. Les bactéries sont lysées facilement à pH 1 et des phosphates sont libérés en grande quantité. Dans un environnement local, la concentration en cet élément devient très importante et les équilibres thermodynamiques régissant la complexation de l'uranium sont modifiés. Il précipite alors avec les phosphates au contact des membranes bactériennes. Ces précipités sont retrouvés en plus grande quantité chez *R. palustris* ce qui pourrait être expliquée par le fait qu'elle possède des thylakoïdes riches en phosphates.

Conclusions
et
Perspectives

CONCLUSION

1. Les calculs de spéciation par le logiciel JCHESS sont confirmés expérimentalement par spectroscopie d'absorption X.

Cette étude commençait par une modélisation de la spéciation de l'uranium dans les milieux de cultures des bactéries. Ce calcul, purement théorique, est basé sur l'utilisation d'une base de données thermodynamique qui contient les constantes de complexation connues de nombreux composés. Ainsi, le logiciel JCHESS permet de calculer les espèces en solution selon de nombreux paramètres comme la concentration des différents éléments en présence, la température et le pH.

Cependant, ces bases de données sont généralement incomplètes, et c'est également le cas de BASSIST, utilisée dans ce travail. Par exemple, la constante du malate d'uranyle n'est pas connue. Certains éléments ne sont pas utilisables dans les modélisations, comme les extraits de levure, car leur composition est inconnue. La modélisation de la spéciation devient, dans ce cas, impossible.

Ces problèmes d'absence de données thermodynamiques dans les bases de données ne touchent pas que l'uranium et des biais peuvent provenir d'autres éléments qui complexeraient des molécules préférentiellement au radionucléide, mais qui ne seraient pas calculés.

Pour ces raisons, la spéciation théorique calculée grâce à ces bases de données thermodynamique peut donc être erronée.

Ainsi, dans cette étude, les molécules de malate, de gluconate et de lactate, présentes quelquefois en fortes concentrations dans les milieux de culture, ne pouvaient pas être prises en compte dans les calculs de la spéciation. Certains milieux contenaient également des extraits de levure ou des peptones et il était impossible de modéliser les espèces en présence.

La question de la justesse des résultats de la spéciation théorique s'est donc posée. La nature des espèces d'uranium en présence a donc été étudiée par spectroscopie d'absorption X de deux manières complémentaires. Dans un milieu où toutes les espèces sont présentes dans la base de données, la spéciation théorique a été confirmée expérimentalement à deux pH différents.

Nous pouvons donc affirmer que malgré ses limites, cette méthode de calcul de la spéciation, grâce aux bases de données thermodynamiques, est un moyen facile et rapide pour évaluer la spéciation de l'uranium dans un milieu de culture, sous réserve de connaître sa composition exacte, ou du moins la concentration des principaux complexants du radionucléide que sont les acides organiques type citrate, les phosphates et les carbonates.

Bien que la plupart des complexants les plus forts de l'uranium soient connus et soient présents dans les bases de données, nous avons mis en évidence un complexe de malate d'uranyle dans un milieu riche contenant d'autres molécules pouvant potentiellement réagir avec le radionucléide. Il serait donc intéressant de déterminer sa constante de complexation afin de pouvoir l'introduire dans les bases de données. Ainsi, le malate pourrait être pris en compte dans les calculs de spéciation, ce qui n'est pas le cas aujourd'hui.

2. La résistance à l'uranium des souches étudiées est élevée.

La résistance à l'uranium des trois modèles bactériens que nous avons utilisés a été étudiée et nous avons montré que les bactéries se développaient en présence de fortes concentrations en radionucléide.

La littérature reporte des concentrations en uranium inhibant la croissance des bactéries de l'ordre de 2mM. Par exemple, *P. putida* ne croît pas à une concentration supérieure à 1,7mM (Ruggiero *et al.* 2005) et *E. coli* au-dessus de 2mM (Nies, 1999). Ruggiero *et al.* ont également déterminé une CMI de l'uranium complexé à la desferrioxamine B, complexant plus fort que le citrate, pour *D. radiodurans* de 2,5mM. Cette CMI est équivalente à celle déterminée ici, ce qui confirme nos

résultats. Pour *C. metallidurans* CH34, par contre, nous avons déterminé une CMI du citrate d'uranyle supérieure à 30mM, c'est à dire 15 fois supérieure à celle inhibant la croissance d'*E. coli*.

Nous avons également montré que l'uranium pouvait rendre les phosphates indisponibles pour la bactérie et ainsi provoquer une inhibition de la croissance. La CMI de l'uranium que nous avons identifiée serait donc erronée car l'uranium n'est pas le responsable direct de l'arrêt du développement cellulaire. C'est l'absence de phosphates en concentration suffisante, et qui devient l'espèce limitante, qui inhibe la croissance. La littérature ne détermine jamais la part d'uranium et de phosphates précipités lors de la détermination des CMI et il est donc finalement difficile de comparer ces valeurs.

De manière générale, cependant, ces concentrations d'inhibition sont plus fortes que celles d'autres métaux comme le cadmium ou les ions chromates, dont les CMI sont de l'ordre de la centaine de μ molaire, ce qui montre que l'uranium est peu toxique pour les bactéries. Les ions et les complexes d'uranyle ne doivent pas être internalisés dans les cellules, peut être par manque de transporteur adéquat ou simplement car il est précipité ou fortement chélaté. Les bactéries n'ont pas évolué pour utiliser cet élément.

Quelle que soit la forme chimique du radionucléide, aucune différence de croissance n'a été observée. Cette différence de toxicité selon la spéciation est rarement étudiée dans la littérature.

3. Les bactéries précipitent l'uranium à pH très bas.

L'accumulation de l'uranium aux pH optimaux de croissance des trois modèles bactériens utilisés est presque nulle. Cette observation a été confirmée par microscopie électronique en transmission. En aérobie, de rares bactéries présentent des précipités au niveau de leur paroi et aucune au niveau intracytoplasmique. En anaérobie, quelques bactéries présentent d'importants précipités à leur surface mais

elles sont minoritaires. La spectroscopie d'absorption X a montré que l'uranium était principalement complexé aux groupements carboxylates de manière bidentate.

Lorsque le pH diminue fortement, l'accumulation est plus importante. Jusqu'à 20% de la quantité initiale d'uranium est retrouvé complexé au culot bactérien. Les observations par MET montrent qu'il s'agit principalement de biosorption à la surface bactérienne. Les analyses XAS ont montré que cet uranium précipité était majoritairement du phosphate d'uranyle. A ce pH très acide, les bactéries ne sont pas revivifiables. Ce phénomène de précipitation n'est donc pas un processus actif, tributaire du métabolisme cellulaire. L'uranium se complexe à la biomasse morte. Il a déjà été montré un rôle de certains agents, comme l'acide chlorhydrique ou l'acétone, dans l'amélioration de la biosorption de métaux par les bactéries (Hu *et al.* 2000, Godlewska-Zylkiewicz, 2006). Les parois bactériennes sont fragilisées et l'uranium peut entrer dans la cellule. Dans le cas de cette étude, au niveau de ces liaisons membranaires, des phosphates sont également libérés en grande quantité et l'équilibre thermodynamique régissant la complexation de l'uranium est modifié. Celui-ci peut ainsi précipiter localement avec les phosphates. L'existence de ces complexes de phosphates d'uranyle à pH acide a déjà été démontrée (Merroun *et al.* 2006, Nedelkova *et al.* 2007).

L'effet du pH sur la biosorption des éléments traces métalliques par les bactéries est difficilement prédictible. S'il est vrai, qu'en général, on peut attendre que les pH extrêmes diminuent la capacité de complexation des parois bactériennes, d'autres phénomènes peuvent entrer en jeu incluant la chimie de l'élément considéré ou le métabolisme cellulaire. Dans cette étude, la modélisation de la spéciation montre que l'uranium précipite à pH élevé. Il est attendu que la charge de surface des bactéries soient positive en dessous du point isoélectrique, à pH bas, et négative, au dessus du point isoélectrique, à pH neutre et alcalin. Les complexes d'uranium chargés négativement seraient donc complexés plus facilement à pH bas alors que les formes chargées positivement réagiraient avec la paroi aux pH physiologiques. Cependant, la charge des espèces d'uranium à pH 7 est négative, ce qui expliquerait la quasi-absence de biosorption du radionucléide par les bactéries à de tel pH. Les complexes de phosphate d'uranyle observés à pH 1 proviendraient donc bien de la

libération soudaine et en quantités importantes de phosphates au niveau de membranes lésées par le faible pH.

L'étude de l'effet du temps de contact entre l'uranium et les bactéries sur l'accumulation du radionucléide a montré que la biosorption de l'élément était rapide, inférieure à 1h, et qu'il n'y avait pas de variation sur 24h. Ces observations sont en adéquation avec ceux de la littérature sur d'autres métaux (Godlewska-Zylkiewicz, 2006).

4. Des processus de bioremédiation peuvent-ils être envisagés ?

L'objectif des actions de rémédiation est de réduire le risque à des niveaux acceptables pour l'environnement et la santé humaine en supprimant le toxique du sol ou, du moins, en le rendant non disponible en l'immobilisant. L'élimination de l'uranium n'est cependant pas réalisable car c'est un composé inorganique qui ne peut être dégradé. Il faut donc l'immobiliser par précipitation ou réduction ou l'accumuler dans des matrices, qui elles, peuvent être supprimées.

Pour dépolluer des sols, différentes méthodes de rémédiation sont connues et peuvent être engagées. Elles ont toutes leurs inconvénients et elles ne peuvent être toujours utilisées du fait de nombreux facteurs décisionnels comme le coût ou l'impact sur l'environnement.

En général, les techniques *in situ* sont privilégiées par rapport aux techniques *ex situ* car elles causent le moins de perturbations pour l'environnement et il n'y a pas d'exposition au polluant. Les méthodes biologiques de rémédiation sont les plus économiques et les plus simples à mettre en œuvre. Elles font intervenir les microorganismes ainsi que les plantes, qui peuvent œuvrer en parallèle et ou en synergie.

Ainsi, plusieurs espèces bactériennes ont déjà été étudiées pour leur capacité à réduire l'uranium VI mobile en uranium IV immobile (voir tableau 1). Ces bactéries peuvent être stimulées par l'ajout de donneur d'électrons organique comme l'acétate

ou l'éthanol directement dans les sols (Anderson *et al.* 2003). Cependant, l'uranium peut être réoxydé dans ces mêmes sols et redevenir mobile sous certaines conditions (Wan *et al.* 2005).

La biosorption de l'uranium par des bactéries a également déjà été étudiée (Hu *et al.* 2000, Merroun *et al.* 2001). Nous avons pu mettre en évidence ce phénomène chez *C. metallidurans* CH34 et *R. palustris* à pH bas, où l'intégrité des membranes et des parois est compromise. Cette biomasse, non viable, pourrait être ainsi utilisée comme complexant de l'uranium dans des eaux polluées. Elle est facilement récupérable par simple centrifugation ou filtration. Dans les sols, cette biomasse permettrait d'immobiliser l'uranium sous forme de phosphate d'uranyle. Cependant, les conditions de pH peuvent être limitantes. Afin de ne pas acidifier les sols, les bactéries peuvent être tuées et fragilisées avant l'injection.

Cet ajout de biomasse morte dans les sols est moins perturbant pour l'environnement qu'un simple amendement de phosphates qui pourrait également provoquer la précipitation de l'uranium. Seulement, du fait de leur nature et de la présence d'impuretés dans leurs compositions, les phosphates sont des polluants de l'environnement à fortes concentrations.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

Abdelouas A., Lu Y., Lutze W., Nuttall H.E. (1998) Reduction of U(VI) to U(IV) by indigenous bacteria in contaminated ground water. *Journal of Contaminant Hydrology*. **35**: 217-233.

Abernathy C.O., Y.P. Liu, D. Longfellow, H.V. Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson, L. Waalkes (1999) Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ Health Perspect* **107**: 593-597

Ahrland S. (1986) "Solution Chemistry and Kinetics of Ionic Reactions" in: The Chemistry of the Actinide Elements, Vol. 2, Chapter 21, 2nd edition, Katz J.J., Seaborg G.T., Morss L.R., Eds. Chapman and Hall, London, New York. pp. 1480-1546.

Allen P.G., D.K. Shuh, J.J. Bucher, N.M. Edelstein, T. Reich, M.A. Denecke and H. Nitsche (1996) EXAFS determinations of uranium structures : the uranyl ion complexed with tartaric, citric and malic acids. *Inorg. Chem.* **35**:784-787.

Amayri S., T. Reich, T. Arnold, G. Geipel and G. Bernhard (2005) Spectroscopic characterization of alkaline earth uranyl carbonates. *Journal of Solid State Chemistry* **178** : 567–577.

Anderson A., Nordan H., Cain R., Parrish G., Duggan D. (1956) Studies on a radioresistant *Micrococcus*. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol.* **10**:575-78.

Anderson R.T., Vrionis H.A, Bernad I.O., Resch C.T., Long P.E., Dayvault R., Karp K., Marutzky S., Metzler D.R., Peacock A., White D.C., Lowe M., Lovley D.R. (2003) Stimulating the In Situ Activity of Geobacter Species To Remove Uranium from the Groundwater of a Uranium-Contaminated Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 5884-5891.

Andres Y., J. MacCordick, J.C. Hubert (1994) Binding sites of sorbed uranyl ion in the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**:27

Ankudinov A.L., Ravel B., Rehr J.J., Conradson S.D. (1998) Real Space Multiple Scattering Calculation and Interpretation of X-ray Absorption Near Edge Structure. *Phys. Rev. B* **58**: 7565.

Anton A., Weltrowski A., Haney C.J., Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H. (2004) Characteristics of Zinc Transport by Two Bacterial Cation Diffusion Facilitators from *Ralstonia metallidurans* CH34 and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**: 7499-7507.

Arey J.S.; Seaman J.C.; Bertsch P.M. (1999) Immobilization of uranium in contaminated sediments by hydroxyapatite addition. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 37-342

Bailey E.H., J.F.W. Mosselmans, P.F. Schofield (2004) Uranyl-acetate speciation in aqueous solutions – an XAS study between 25 and 250°C. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **68**:1711-1722

Bailey E.H., J.F.W. Mosselmans, P.F. Schofield (2005) Uranyl-citrate speciation in acidic aqueous solutions – an XAS study between 25 and 200°C. *Chemical Geology* **216**:1-16

Barkleit A., H. Moll, G. Bernhard (2007) Interaction of uranium(VI) with lipopolysaccharide. *Dalton Transactions*. 2879-2886

Barnett M.O., Jardine P.M., Brooks S.C., Selim H.M. (2000). Adsorption and transport of uranium(VI) in subsurface media. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **64**: 908-917

Battista J.R. (1997) Against all odds: The survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:203 -224

Battista J.R., Earl A.M., Park M.J. (1999). Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? *Trends Microbiol.* **7**:362-365

Beller H.R. (2005) Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of U(IV) oxide minerals by the chemolithoautotrophic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology.* **71**: 2170-2174.

Berard P., Quesne B., Auriol B., Chalabreysse J. (1994) Cutaneous contamination after uranyl nitrate skin burn : incident report. *Radiat. Prot. Dosim.* **53**: 269-272.

Bernhard G., G. Geipel, T. Reich, V. Brendler, S. Amayri, H. Nietsche (2001) Uranyl(VI) carbonate complex formation: Validation of the $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq.})$ species. *Radiochimica Acta.* **89**:511-518

Bessman M.J., Frick D.N., O'Handley S.F. **(1996)** The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes. *J Biol Chem* **271**:25059-25062

Biebl H., Pfennig N. **(1981)** Isolation of members of the family *Rhodospirillaceae*. p.267-273. In M. P. Starr, J. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows and H. G. Schlegel (ed.), *The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*, vol. A. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Bion L. **(2003)**. BASSIST: an applied thermodynamic database for radionuclides chemistry. *Radiochimica Acta*. **91**: 633-638.

Borremans B., Hobman J. L., Provoost A., Brown N.L., van Der Lelie D. **(2001)**. Cloning and functional analysis of the *pbr* lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* **183**: 5651-5658

Brim H., Heyndrickx M., de Vos P., Wilmotte A., Springael D., Schlegel H., Mergeay M. **(1999)**. Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metalresistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs. *Syst Appl Microbiol* **22**: 258-268

Brim H., McFarlan S.C., Fredrickson J.K., Minton K.W., Zhai M., Wackett L.P., Daly M.J. **(2000)** Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.* **18**:85–90

Brooks B.W., Murray R.G.E., Johnson J.L., Stackebrandt E., Woese C.R., Fox G.E. **(1980)** Red-pigmented micrococci: a basis for taxonomy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**:627-646

Brooks B.W., Murray R.D.E. **(1981)** Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. Nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**:353-360

Brooks S.C, Fredrickson J.K., Carroll S.L., Kennedy D.W., Zachara J.M., Plymale A.E, Kelly S.D., Kemner K.M., Fendorf S. **(2003)** Inhibition of bacterial U(VI) Reduction by Calcium. *Environmental Science and Technology.* **37**: 1850-1858.

Bruns P.C., M.L. Miller and R.C. Ewing. **(1996)** U⁶⁺ minerals and inorganic phases: a comparison and hierarchy of crystal structures. *Can. Min.* **34**: 1839-1894.

C arriere M., Avoscan L., Collins R., Carrot F., Khodja H., Ansoborlo E., Gouget B. **(2004)** Influence of Uranium Speciation on Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cell Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **17**: 446-452

Carrière M., Thiebault C., Milgram M., Avoscan L., Proux O., Gouget B. **(2006)** Citrate Does Not Change Uranium Chemical Speciation in Cell Culture Medium but Increases Its Toxicity and Accumulation in NRK-52E Cells. *Chem. Res. Toxicol.*, **19** (12), 1637 -1642

Clark D.L., Hobart D.E., Neu M.P. **(1995)** Actinide Carbonate Complexes and Their Importance in Actinide Environmental Chemistry. *Chemical Reviews* **95**: 25-48

Colle C., Garnier-Laplace J., Roussel-Debet S., Adam C., Baudin J.P. **(2001)** "Comportement de l'uranium dans l'environnement" In: L'uranium, de l'environnement à l'Homme, Chapter 6, Metivier H., IPSN, Eds. EDP Science. pp 187-211

D

aly M.J. and Minton K.W. **(1995)** Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **177**:5495-5505

Diels L., Dong Q., van der Lelie D., Baeyens W., Mergeay M. **(1995a)**. The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology* **14**: 142-153

Diels L., Van Roy S., Somers K., Willems I., Doyen W., Mergeay M., Springael D., Leysen R. **(1995b)**. The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics. *Journal of Membrane Science* **100**: 249-258

Diels L., De Smet M., Hooyberghs L., Corbisier P. **(1999)**. Heavy metals bioremediation of soil. *Molecular Biotechnology* **12**: 149-158

Dodge C.J., Francis A.J. **(1997)** Biotransformation of Binary and Ternary Citric Acid Complexes of Iron and Uranium. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 3062-3067

Dodge C.J., Francis A.J. **(2003)** Structural characterization of a ternary Fe(III)-U(VI)-citrate complex. *Radiochimica Acta* **91**:525-532.

Dong W, Ball WP, Liu C, Wang Z, Stone AT, Bai J, Zachara JM. **(2005)** Influence of calcite and dissolved calcium on uranium(VI) sorption to a hanford subsurface sediment. *Environ Sci Technol.* **39**: 7949-55

Dosanjh N.S., Hammerbacher N.A., Michel S.L. **(2007)**. Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA). DNA Interaction: Metal Ion Requirements and Sequence Specificity. *Biochemistry* **46**: 2520-2529

Doyle R.J., T.H. Matthews, U.N. Streips **(1980)** Chemical basis for selectivity of metal ions by *Bacillus subtilis* cell wall. *Journal of Bacteriology.* **143**:471-480

Ebbes S.D., Brady D.J., Kochian L.V. (1998a). Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *J. Exp. Bot.* **49**: 1183-1190

Ebbs S.D., Norvell W.A., Kochian L.V. (1998b). Soil processes and chemical transport: The effect of acidification and chelating agents on the solubilization of uranium from contaminated soil. *J. Environ. Qual.* **27**: 1486-1494

Echevarria G., Sheppard M.I., Morel J.L. (2001) Effect of pH on the sorption of uranium in soils. *Journal of Environmental Radioactivity.* **53**: 257-264

Egland P.G., Harwood C.S. (1999) BadR, a New MarR Family Member, Regulates Anaerobic Benzoate Degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr Family Member. *Journal of Bacteriology.* **181**:2102-2109.

Egland P.G., Gibson J., Harwood C.S. (2001) Reductive, coenzyme A-mediated pathway for 3-chlorobenzoate degradation in the phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**: 1396-1399.

Ferreira A.C., Nobre M.F., Rainey F.A., Silva M.T., Wait R., Burghardt J., Chung A.P., Da Costa M.S. (1997) *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:939-947

Ferris F.G., T.J. Beveridge (1986) Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *Canadian Journal of Microbiology*. **32**:52-55.

Finneran K.T., Housewright M.E., Lovley D.R. (2002) Multiple influences of nitrate on uranium solubility during bioremediation of uranium-contaminated subsurface sediments. *Environmental Microbiology*. **70**: 413-420.

Fowle D.A., J.B. Fein, A.M. Martin (2000) Experimental Study of Uranyl Adsorption onto *Bacillus subtilis*. *Environ. Sci. Technol.* **34** : 3737-3741

Fowle D.A., Fein J.B., Martin A.M. (2000) Experimental Study of Uranyl adsorption onto *Bacillus subtilis*. *Environmental Science and Technology*. **34**:3737-3741.

Francis A.J., J.B. Gillow, C.J. Dodge, R. Harris, T.J. Beveridge, H.W. Papenguth (2004) Uranium association with halophilic and non-halophilic and archaea. *Radiochimica Acta* **92**:481-488.

Fredrickson J.K., Kostandarithes H.M., Li S.W., Plymale A.E., Daly M.J. (2000) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2006-2011

Ganesh R., Robinson K.G., Reed G.D., Sayler G.S. (1997) Reduction of hexavalent uranium from organic complexes by sulphate- and iron-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 4385-4391.

Geissler J.F., Harwood C.S., Gibson J. (1988) Purification and Properties of Benzoate-Coenzyme A ligase, a *Rhodopseudomonas palustris* Enzyme Involved in the Anaerobic Degradation of Benzoate. *Journal of Bacteriology*. **170**: 1709-1714.

Godlewska-Zylkiewicz B. (2006) Microorganisms in organic chemical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **384**: 114-123.

Goris J., De Vos P., Coenye T., Hoste B., Janssens D., Brim H., Diels L., Mergeay M., Kersters K., Vandamme P. (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* (Steinle et al. 1998). *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1773-1782

Gorman-Lewis D., Elias P.E., Fein J.B. (2005) Adsorption of aqueous uranyl complexes onto *Bacillus subtilis* cells. *Environmental Science and Technology*. **39**: 4906-4912.

Grass G., Große C., Nies D.H. (2000) Regulation of the *cnr* Cobalt and Nickel Resistance Determinant from *Ralstonia* sp. Strain CH34. *Journal of Bacteriology*. **182**: 1390-1398.

Gueniot B., Munier-Lamy C. (1988) Geochemical behavior of uranium in soils, part II. Distribution of uranium in hydromorphic soils and soil sequences. Applications for superficial prospecting. *J. Geochem. Explor.* **31**: 39-55

Gupta A., Matsui K., Lo J.F., Silver S. (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* **5**:183-188

Hansen M.T. (1978) Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **134**:71-75

Harwood C.S, Gibson J. (1986) Uptake of Benzoate by *Rhodospseudomonas palustris* Grown Anaerobically in Light. *Journal of Bacteriology*. **165**: 504-509.

Harwood C.S, Gibson J. (1988) Anaerobic and Aerobic Metabolism of Diverse Aromatic Compounds by the Photosynthetic Bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 712-717.

Hengé-Napoli M.H., L'azou B., Bérard P., Cambar J. (2001) "Toxicité de l'uranium" In: L'uranium, de l'environnement à l'Homme, Chapter 8, Metivier H., IPSN, Eds. EDP Science. pp 239-260

Hengstler J.G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Gotte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S., Bienfait H.G., Schlink K., Dietrich C., Faust D., Epe B., Oesch F. (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* **24**: 63-73

Hennig C., P.J. Panak, T. Reich, A. Rossberg, J. Raff, S. Selenska-Pobell, W. Matz, J.J. Bucher, G. Bernhard, H. Nitsche. (2001) EXAFS investigation of uranium(VI) complexes formed at *Bacillus cereus* and *Bacillus sphaericus* surfaces. *Radiochimica Acta* **89**:625-631.

Hu M.Z.C., Norman J.M., Faison B.D., Reeves M.E. (2000) Biosorption of uranium by *Pseudomonas aeruginosa* strain CSU: Characterization and comparison studies. *Biotechnology and Bioengineering*. **51**: 237-247.

Huang, F.Y.C., Brady, P.V., Lindgren, E.B., Guerra, P. (1998) Biodegradation of uranium-citrate complexes: implications for extraction of uranium from soils. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 379–382

Jiang J., Rao L., Di Bernardo P., Zanonato P. L., Bismondo A. (2002) Complexation of uranium(VI) with acetate at variable temperatures. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1832–1838.

Jones D.L. (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* **205**: 25-44

Juhnke S., Peitzsch N., Hubener N., Grosse C., Nies D. H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch Microbiol* **179**: 15-25.

Keiling C., Marx G. (1991) Investigations into the influence of organic complexing agents on the leaching behaviour and mobility of radionuclides solidified in ILW forms. *Radiochimica Acta*, **52/53**: 287-290

Kelly S.D., K.M. Kemner, J.B. Fein, D.A. Fowle, M.I. Moyanov, B.A. Bunker, N. Yee (2002) X-ray absorption fine structure determination of pH-dependent U-bacterial cell wall interactions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66**:3855-3871

Kelly S.D., K.M. Memner, S.C. Brooks (2007) X-ray absorption spectroscopy identifies calcium-uranyl-carbonate complexes at environmental concentrations. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**:821-834.

Kieft T.L., Fredrickson J.K., Onstott T.C., Gorby Y.A., Kostandarithes H.M., Bailey T.J., Kennedy D.W., Li S.W., Plymale A.E., Spadoni C.M., Gray M.S. (1999) Dissimilatory reduction of Fe(III) and other electron acceptors by a *Thermus* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1214-1221

Kitayama S. (1982) Adaptive repair of cross-links in DNA of *Micrococcus radiodurans*. *Biochim. Biophys. Acta* **697**:381-384

Lang F.S., Oesterhelt D. (1989) Microaerophilic growth and induction of the photosynthetic reaction center in *Rhodospseudomonas viridis*. *Journal of Bacteriology.* **171**: 2827-2834

Lange C.C., Wackett L.P., Minton K.W., Daly M.J. (1998.) Engineering a recombinant *Deinococcus radiodurans* for organopollutant degradation in radioactive mixed waste environments. *Nat. Biotechnol.* **16**:929–933

Langley S., T.J. Beveridge (1999) Effect of O-side-chain lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Applied Environmental Microbiology.* **65**:489-498.

Langmuir D. (1978) Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, **42**: 547-69

Larimer F.W., Chain P., Hauser L., Lamerdin J., Malfatti S., Do L., Land, M.L., Pelletier D.A., Beatty J.T., Lang, A.S., Tabita F.R., Gibson J.L., Hanson T.E., Bobst C., Torres y Torres J.L., Peres C., Harrison F.H., Gibson J., Harwood C.S. (2004) Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology.* **22**: 55-61.

Lenhart J.J., Cabaniss S.E., MacCarthy P., Honeyman B.D. (2000) Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acids. *Radiochim. Acta* **88**: 345-353

Levin-Zaidman S., Englander J., Shimoni E., Sharma A.K., Minton K.W., Minsky A. (2003) Ringlike structure of the *Deinococcus radiodurans* genome: a key to radioresistance? *Science.* **299**:254-256

Li P.F., Mao Z.Y., Rao X.J., Wang X.M., Min M.Z., Qiu L.W., Liu Z.L. (2004) Biosorption of uranium by lake-harvested biomass from a cyanobacterium bloom. *Bioresource Technology.* **94**: 193-195.

Liesegang H., Lemke K., Siddiqui R.A., Schlegel H.G. (1993). Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J Bacteriol* **175**: 767-778

Liu C., Jeon B.H., Zachara J.M., Wang Z., Dohnalkova A., Fredrickson J.K. (2006) Kinetics of Microbial Reduction of Solid Phase U(VI). *Environmental Science and Technology*. **40**: 6290-6296.

Lovley D.R., Phillips E.J.P., Gorby Y.A., Landa E.R. (1991) Microbial reduction of uranium. *Nature* **350**: 413-416.

Lovley D.R., Phillips E.J.P. (1992) Bioremediation of Uranium Contamination with Enzymatic Uranium Reduction. *Environmental Science and Technology*. **26**: 2228-2234.

Macaskie L.E., Bonthron K.M., Yong P., Goddard D.T. (2000) Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology*. **146**: 1855-1867.

Madic C., Genet M. (2001) "Propriétés physiques et chimiques de l'uranium" In: L'uranium, de l'environnement à l'Homme, Chapter 2, Metivier H., IPSN, Eds. EDP Science. pp 43-81.

Makarova K.S., Aravind L., Wolf Y.I., Tatusov R.L., Minton K.W., Koonin E.V., Daly M.J. (2001). Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**:44-78

Markovits G., Klotz P., Newman L. (1972) Formation Constants for the Mixed-Metal Complexes between Indium(III) and Uranium(VI) with Malic, Citric, and Tartaric Acids. *Inorganic Chemistry* **11**: 2405

Martinez R.J., Beazley M.J., Taillefert M., Arakaki A.K., Skolnick J., Sobecky P.A. (2007) Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide and metal-contaminated subsurface soils. *Environmental Microbiology* **9**: 3122–3133

Mattimore V., Battista J.R. (1996) Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**:633–637

McGrath J.E., Harfoot C.S. (1997) Reductive dehalogenation of halocarboxylic acids by the phototrophic genera *Rhodospirillum* and *Rhodopseudomonas*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**: 3333-3335.

Mergeay M., Houba C., Gerits J. (1978). Extrachromosomal inheritance controlling resistance to cadmium, cobalt, copper and zinc ions: evidence from curing in a *Pseudomonas*. *Arch Int Physiol Biochim* **86**: 440-442.

Mergeay M., Nies D., Schlegel H.G., Gerits J., Charles P., Van Gijsegem F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol* **162**: 328-334.

Mergeay M. (2000) Bacteria adapted to industrial biotopes: metal-resistant *Ralstonia*. In: Bacterial stress responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis (Eds). American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 403-414

Mergeay M., Monchy S., Vallaeyts T., Auquier V., Benotmane A., Bertin P., Taghavi S., Dunn J., van der Lelie D., Wattiez R. (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews*. **27**: 385-410.

Merlin C., Springael D., Mergeay M., Toussaint A. (1997). Organisation of the *bph* gene cluster of transposon Tn4371, encoding enzymes for the degradation of

biphenyl and 4-chlorobiphenyl compounds. *Molecular & General Genetics: MGG* **253**: 499-506

Merroun M.L., Selenska-Pobell S. **(2001)** Interactions of three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxydans* strains with U(VI). *BioMetals*. **14**: 171-179.

Merroun M.L., C. Henning, A. Rossberg, T. Reich and S. Selenska-Pobell **(2003)** Characterization of U(VI)-*Acidithiobacillus ferrooxydans* complexes using EXAFS, transmission electron microscopy, and energy-dispersive X-ray analysis. *Radiochimica Acta*. **91**:583-591.

Merroun M.L., J. Raff, A. Rossberg, C. Henning, T. Reich and S. Selenska-Pobell **(2005)** Complexation of Uranium by Cells and S-Layer Sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**:5532-5543.

Merroun M.L., Nedelkova M., Rossberg A., Hennig C., Selenska-Pobell S. **(2006)** Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium. *Radiochimica Acta*. **94**: 723-729.

Michaels M.L., Miller J.H. **(1992)** The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J. Bacteriol.* **174**:6321-6325

Minton K.W., Daly M.J. **(1995)** A model for repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in the extreme radiophile *Deinococcus radiodurans*. *Bioessays* **17**:457-464

2

Misra T.K. **(1992)** Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*. **25**: 4-16

Monchy S., Benitmane M.A., Janssen P., Vallaeyts T., Taghavi S., van der Lelie D., Mergey M. **(2007)** Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* Are

Specialized in the Maximal Viable Response to Heavy Metals. *Journal of Bacteriology*. **189**: 7417-7425.

Moore S.A., D.M. Moennich, M.J. Gresser (1983) Synthesis and hydrolysis of ADParzenate by beef heart submitochondrial particles. *Journal of Biological Chemistry* **258**: 6266-6271

Morishima H., Koga T., Kawai H., Honda Y. , Katsurayama K. (1977) Studies on the movement and distribution of uranium in the environment – distribution of uranium in agricultural products. *Journal of Radiation Research*. **18**: 139-150.

Moseley B.E., Copland H.J. (1975) Isolation and properties of a recombination-deficient mutant of *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **121**:422-428

Moulin V., Tits J., Ouzounian G. (1992) Actinide speciation in the presence of humic substances in natural water conditions. *Radiochimica Acta*. **58/59**: 179.

Moulin V., Moulin C. (2001) Radionuclide speciation in the environment: a review. *Radiochim. Acta*, **89**: 773-778

Murphy J., Riley J.P. (1962) A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Analytical Chimica Acta* **27**: 31-36

Nedelkova M., Merroun M.L., Rossberg A., Hennig C., Selenska-Pobell S. (2007) *Microbacterium* isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium. *FEMS Microbiology Ecology*. **59**: 694-705.

Nevin K.P., Finneran K.T., Lovley D.R. (2003) Microorganisms Associated with Uranium Bioremediation in a High-Salinity Subsurface Sediment. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3672-3675.

Nies A., Nies D.H., Silver S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J Biol Chem* **265**: 5648-5653

Nies D.H. (1992). CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **174**: 8102-8110.

Nies D.H. (1995). The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 2707-2712.

Nies D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 730-750

Nies D.H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 313-339

Panak P., B. C. Hard, K. Pietzsch, S. Kutschke, K. Röske, S. Selenska-Pobell, G. Bernhard, H. Nitsche (1998) Bacteria from uranium mining waste pile: interactions with U(VI). *Journal of Alloys and Compounds*, **271-273** : 262-266

Panak P., S. Selenska-Pobell, S. Kutschke, G. Geipel, G. Bernhard, H. Nitsche (1999) Complexation of U(VI) with cells of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiomonas cuprina* of different geological origin. *Radiochim. Acta* **84** : 183-190

Panak P., J. Raff, S. Selenska-Pobell, G. Geipel, G. Bernhard, H. Nitsche (2000) Complex formation of U(VI) with *Bacillus*-isolates from a uranium mining waste pile *Radiochimica Acta* **88**:71-76

Panak P.J., R. Knopp, C.H. Booth, H. Nitsche (2002) Spectroscopic studies on the interaction of U(VI) with *Bacillus sphaericus*. *Radiochimica Acta* **90**:779-783.

Paulin R. (1997) "Radionucléides naturels" in: Toxiques Nucléaires, Galle P., 2^e édition (Masson Ed.) pp 3-22.

Plant J.A., Simpson P. R., Smith B., Windley B. F. (1999). Uranium ore deposits - products of the radioactive earth. *Reviews in Mineralogy* 255-319

Pohlmann A., Fricke W.F., Reinecke F., Kusian B., Liesegang H., Cramm R., Eitinger T., Ewering C., Potter M., Schwartz E., Strittmatter A., Voss I., Gottschalk G., Steinbuchel A., Friedrich B., Bowien B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat Biotechnol* **24**:1257-1262.

Pollmann K., Raff J., Merroun M., Fahmy K., Selenska-Pobell S. (2005) Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnology Advances*. **24**: 58-68.

Porcelli D., Andersson P.S., Wasserburg G.J., Ingri J., Baskaran M. (1997) The importance of colloids and mires for the transport of uranium isotopes through the Kalix River watershed and Baltic Sea. *Geochimical and Cosmochimical Acta*. **61**: 4095-4113.

Ragnarsdottir K.V., Charlet L. (2000). Uranium behaviour in natural environments. In "Environmental Mineralogy : Microbial interactions, anthropogenic influences. Contaminated land and waste management". *Mineralogical Society of Great Britain and Ireland*, **9**: 333-377.

Rajan K.S., Martell A.E. (1965) Equilibrium studies of uranyl complexes. III. Interaction of uranyl ion with citric acid. *Inorg. Chem.*, **4**: 462-469

Ravel B., Newville M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *J Synchrotron Rad* **12**, 537-541

Renninger N., Knopp R., Nitsche H., Clark D.S., Keasling J.D. (2004) Uranyl Precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via Controlled Polyphosphate Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 7404-7412.

Roux M., Sarret G., Pignot-Paintrand I., Fontecave M., Covès J. (2001) Mobilization of selenite by *Ralstonia metallidurans* CH34. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 769-773

Ruggiero C.E., Boukhalfa H., Forsythe J.H., Lack J.G., Hersman L.E., Neu M.P. (2005) Actinide and metal toxicity to prospective bioremediation bacteria. *Environmental Microbiology*. **7**: 88-97.

Sandino M.C.A., J. Bruno (1992) The solubility of $(\text{UO}_2)_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ and the formation of U(VI) phosphate complexes: Their influence in uranium speciation in natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* **56**: 4135–4145

Sani R.K., Peyton B.M., Amonette J.E., Geesey G.G. (2004) Reduction of uranium(VI) under sulphate-reducing conditions in the presence of Fe(III)-(hydr)oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **68**: 2639-2648.

Sara M., Sleytr U.B. (2000) S-Layer Proteins. *Journal of Bacteriology*. **182**:859-868.

Sarret G., Avoscan L., Carriere M., Collins R., Geoffroy N. Carrot F., Coves J., Gouget B. (2005) Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**: 2331-2337.

Sasikala C., Ramana C.V. (1998) Biodegradation and metabolism of unusual carbon compounds by anoxygenic phototrophic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 339-377.

Scapolan S., Ansoborlo E., Moulin C., Madic C. (1997) Uranium speciation in biological medium by means of capillary electrophoresis and time-resolved laser-

induced fluorescence. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. **226**: 145--148

Schmeide K., Sachs S., Bubner M., Reich T., Heise K.H., Bernhard G. **(1998)** Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. *Inorganica Chimica Acta*, **351**: 133-140

Selenska-Pobell S., Panak P., Miteva V., Boudakov I., Bernhard G., Nitsche H. **(1999)** Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiology Ecology*. **29**: 59-67.

Shahandeh H., Lee J.H., Hossner L.R., Loeppert R.H. **(2001)**. Bioavailability of uranium and plutonium to plants in soil-water systems and the potential of phytoremediation. In "Trace elements in the rhizosphere", Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E. Eds, Chap I.5, 93-124, CRC Press, Boca Raton London, New York, Washington D.C

Shahandeh H., Hossner L. R. **(2002)** Enhancement of uranium phytoaccumulation from contaminated soils. *Soil Science*, **167**: 269-280

Shelobolina E.S., Sullivan S.A., O'Neill K.R., Nevin K.P., Lovley D.R. **(2004)** Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranean* sp. Nov. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 2959-2965.

Sheppard S.C., Evenden W.G. **(1988)** Critical compilation and review of plant/soil concentration ratios for uranium, thorium and lead. *J. Environ. Radioactivity*, **8**: 255-285

Springael D., Diels L., Hooyberghs L., Kreps S., Mergeay M. (1993). Construction and characterization of heavy metal-resistant haloaromatic-degrading *Alcaligenes eutrophus* strains. *Appl. Envir. Microbiol.* **59**: 334-

Springgate C.F., Mildvak A.S., Abramson R., Engle J.L., Loeb L.A. (1973) *Escherichia coli* Deoxyribonucleic Acid Polymerase I, a Zinc Metalloenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **248**: 5987-5993.

Suzuki Y., Kelly S.D., Kemner K.M., Banfield J.F. (2003) Microbial Populations Stimulated for Hexavalent Uranium Reduction in Uranium Mine Sediment. *Applied and Environmental Microbiology.* **69**: 1337-1346.

Suzuki Y., Kelly S.D., Kemner K.M., Banfield J.F. (2004) Enzymatic U(VI) reduction by *Desulfosporosinus* species. *Radiochimica Acta.* **92**:11-16.

T Aghavi S., Mergeay M., Nies D, van der Lelie D. (1997) *Alcaligenes eutrophus* as a model system for bacterial interactions with heavy metals in the environment. *Research in Microbiol.* **148**: 536-551

Tebo B.M., Obraztsova A.Y. (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters* **162**: 193-198.

Teixeira L.S.G., Costa A.C.S., Ferreira S.LC., Freitas M.L, de Carvalhi M.S. (1999) Spectrophotometric Determination of Uranium Using 2-(2-Thiazolylazo)-p-Cresol (TAC) in the Presence of Surfactants. *J. Braz. Chem. Soc.* **10**:519-522.

Thiebault C., Carriere M., Milgram S., Simon A., Avoscan L., Gouget B. (2007) Uranium Induces Apoptosis and Is Genotoxic to Normal Rat Kidney (NRK-52E) Proximal Cells. *Toxicological Sciences* **98**: 479–487

Tibazarwa, C., Wuertz S., Mergeay M., Wyns L., van der Lelie D. **(2000)**. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol* **182**: 1399-1409

Upton A.C., Linsalata P. **(1988)** "Long-Term Health Effects of Radionucleides in Foods and Water Supplies" in: Radionucleides in the food chain, M.W. Carter ed., pp. 218-235.

Valls M, de Lorenzo V. **(2002)** Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev.* **26** : 327-38

Van Berkum P., Terefework Z., Paulin L., Suomalainen S., Lindstrom K., Eardly B.D. **(2003)** Discordant phylogenies within the *rrn* loci of *Rhizobia*. *Journal of Bacteriology.* **185**: 2988-2998.

Van der Lee J., De Windt L. **(2002)**. CHES Tutorial and cookbook/version 3.0. Users Manuel LHM/RD/02/13, Ecole des Mines de Paris, Fontainebleau

Vandamme P., Coenye T. **(2004)**. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2285-2289

Vaneechoutte M., Kampfer P., De Baere T., Falsen E., Verschraegen G. **(2004)**. *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.* 1990) comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 317-327

Venkateswaran A., McFarlan S.C., Ghosal D., Minton K.W., Vasilenko A., Makarova K., Wackett L.P., Daly M.J. (2000) Physiologic determinants of radiation resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2620–2626

Vitorge P. (1999) Chimie des actinides, Techniques de l'ingénieur, Article B3520 (juillet 1999) et formulaire (octobre 1999).

Vukovic-Nagy B., Fox B.W., Fox M. (1974). The release of DNA fragments after X-irradiation of *Micrococcus radiodurans*. *Int. J. Radiat. Biol.* **25**:329-337

Wan J., Tokunaga T.K., Brodie E., Wang Z., Zheng Z., Herman D., Hazen T.C., Firestone M.K., Sutton S.R. (2005) Reoxidation of bio-reduced uranium under reducing conditions. *Environmental Science and Technology.* 39:6162-6169.

Wang T.S., C.F. Kuo, K.Y. Jan, H. Huang (1996) Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol* **169**: 256-268

Weigel F. (1986) "Uranium" in: *The Chemistry of the Actinide Elements*, Chapter 5, 2nd edition, Katz J.J., Seaborg G.T., Morss L.R., Eds. Chapman and Hall, London, New York.

White O., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Hickey E.K., Peterson J.D., Dodson R.J., Haft D.H., Gwinn M.L., Nelson W.C., Richardson D.L., Moffat K.S., Qin H., Jiang L., Pamphile W., Crosby M., Shen M., Vamathevan J.J., Lam P., McDonald L., Utterback T., Zalewski C., Makarova K.S., Aravind L., Daly M.J., Minton K.W., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Nelson K.E., Salzberg S., Smith H.O., Venter J.C., Fraser C.M. (1999) Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science* **286**:1571–1577

Woofolk C.A., Whiteley H.R. (1962) Reduction of inorganic compounds with molecular hydrogen by *Micrococcus lactilyticus*. I. Stoichiometry with compounds of arsenic, selenium, tellurium, transition and other elements. *Journal of Bacteriology*. **84**: 647-658.

Work E., Griffiths H. (1968) Morphology and chemistry of cell walls of *Micrococcus radiodurans*. *J. Bacteriol* **95**: 641-57

Xie S., Yang J. Chen C., Zhang X., Wang Q., Zhang C. (2007) Study on biosorption kinetics and thermodynamic of uranium by *Citrobacter freudii*. *Journal of Environmental Radioactivity*. 99: 126-133

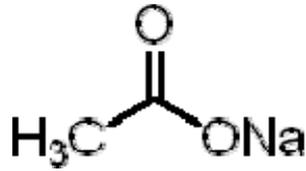
Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol* **39**: 897-904.

Annexes

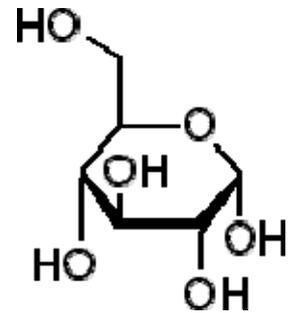
ANNEXE A

FORMULES DEVELOPEES

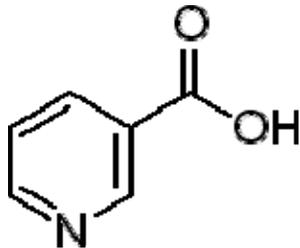
Acétate de sodium
(82,0 g.mol⁻¹)



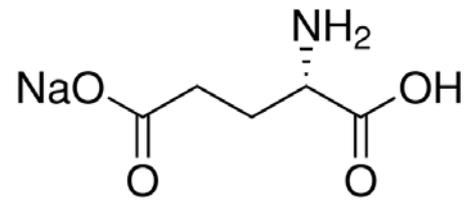
Glucose
(180,2 g.mol⁻¹)



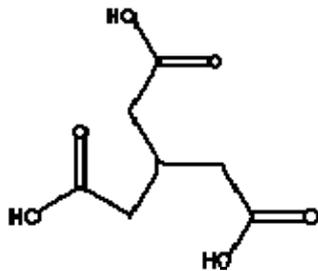
Acide nicotinique
(123,1 g.mol⁻¹)



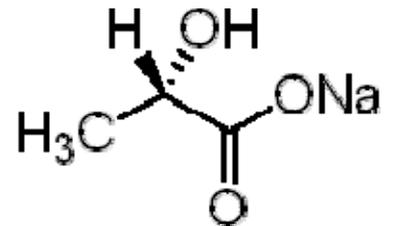
Glutamate de sodium
(169,1 g.mol⁻¹)



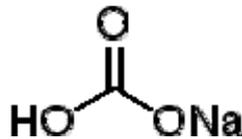
Acide nitriloacétique
(191,2 g.mol⁻¹)



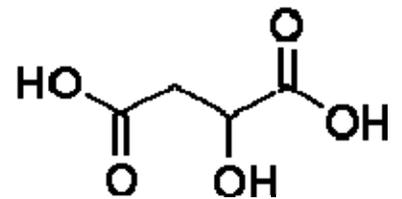
Lactate de sodium
(112,1 g.mol⁻¹)



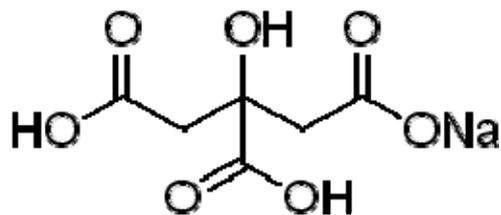
Hydrogénocarbonate de sodium
(84,0 g.mol⁻¹)



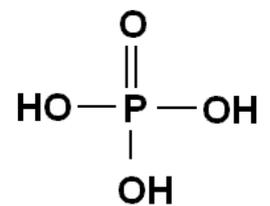
Malate
(134,09 g.mol⁻¹)



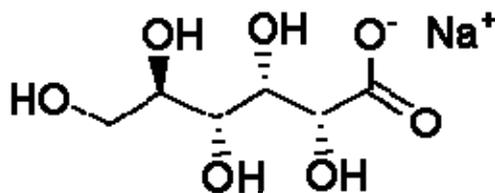
Citrate de sodium monobasique
(214,1 g.mol⁻¹)



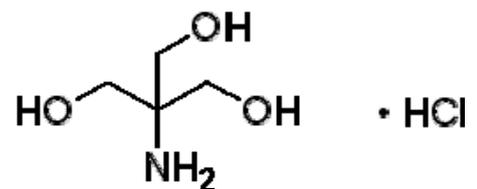
Orthophosphate
(106 g.mol⁻¹)



Gluconate de sodium
(218,1 g.mol⁻¹)



Tris, HCl
(157,6 g.mol⁻¹)



ANNEXE B :

PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

1. Milieux de culture de *C. metallidurans* CH34

- Pour 1L de milieu :

	TSM	CSM	TSM15%	Milieu Anaérobie
Tris	7,88g	X	7,88g	7,88g
KCl	1,49g	1,49g	1,49g	X
NH ₄ Cl	1,07g	1,07g	1,07g	X
(NH ₄)NO ₃	X	X	X	1g
Na ₂ SO ₄	430mg	430mg	430mg	X
MgCl ₂ .6H ₂ O	205mg	205mg	205mg	X
CaCl ₂ .2H ₂ O	30mg	30mg	30mg	X
MgSO ₄	X	X	X	100mg
KH ₂ PO ₄	X	X	X	136mg
Na ₂ HPO ₄	185mg	185mg	37mg	X
Citrate de Sodium tribasique	X	14,7g	X	X
Acide gluconique	1% = 10g 0,2% = 2g			
pH 7,5				pH 7
Autoclavage				
SL7	1mL	1mL	1mL	1mL
CaCl ₂ .2H ₂ O 1%	X	X	X	1mL
FeSO ₄ .7H ₂ O 1%	X	X	X	1mM
Lactate de sodium	X	X	X	1,23g
Citrate de fer ammoniacé 2%	240µL	240µL	240µL	X

- *Préparation de la solution SL7 :*

→ Solutions mères 100mM : Dans 10mL d'eau ultrapure

ZnCl ₂	136mg
MnCl ₂ , 4H ₂ O	198mg
H ₃ BO ₃	62mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	238mg
CuCl ₂ , 2H ₂ O	170mg
NiCl ₂ , 6H ₂ O	238mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	242mg

→ Fabrication du SL7 :

ZnCl ₂	5mL
MnCl ₂ , 4H ₂ O	5mL
H ₃ BO ₃	10mL
CoCl ₂ , 6H ₂ O	8mL
CuCl ₂ , 2H ₂ O	1mL
NiCl ₂ , 6H ₂ O	1mL
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1,5mL
HCl 37%	680µL

Filtration sur membrane 0,22µm

Dilution de la solution concentrée : 1mL dans 29mL d'eau stérile.

Stockage à 4°C à l'abri de la lumière

2. Milieux de culture de *D. radiodurans* R1

- *Milieu TYG (pour 1L)*

Tryptone	5g
Extraits de levure	3g
Glucose	1g
Autoclavage	
pH 7	

- *Milieu synthétique : (pour 1L)*

Tris	7,88g
Na ₂ HPO ₄	142mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	41mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	15mg
Peptones	500mg
Glucose	2g
pH 7	
Autoclavage	
SL7	1mL
FeSO ₄ .7H ₂ O 1%	1mL
NH ₄ Cl 1%	1mL
Acide nicotinique 1g.L ⁻¹	2mL

3. Milieux de culture de *R. palustris*

- *Solutions Stocks (pour 1L). A préparer dans l'ordre.*

Métal 44

EDTA tétrasodique	2,5g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	11g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5g
MnSO ₄ .4H ₂ O	2g
CuCl ₂ .2H ₂ O	270mg
H ₃ BO ₃	120mg
CO(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	250mg
H ₂ SO ₄ 6N	1,5mL

Base concentrée

Acide nitriloacétique	10g
MgSO ₄	29g
CaCl ₂ .2H ₂ O	3,3g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	9,2mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	100mg
Métal 44	50mL
pH 6,2	

Facteurs de croissance

Biotine	20mg
NaHCO ₃	500mg
Acide nicotinique	1g
Thiamine-HCl	500mg
Acide <i>p</i> -aminobenzoïque	1g

Tampon Phosphate

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	114g
KH_2PO_4	68g
pH 7	

Malate d'ammonium 1M

Acide malique	134g
Ammoniaque concentré	140mL
pH 6,7	

Glutamate acétate

Acide glutamique	120g
Acétate de sodium anhydre	100g

Toutes les solutions sont filtrées sur membrane 0,22 μ m

- *Milieu Hutner (pour 1L). A préparer dans l'ordre.*

Tampon phosphate 1M pH 7	20mL
Base concentrée	20mL
Malate d'ammonium 1M	20mL
Glutamate acétate	10mL
Facteurs de croissance	2mL
Extraits de levure	1g (ajouté stérilement après filtration)
Eau ultrapure	qsp 1L

Le milieu Hutner modifié est préparé de manière identique avec un volume de tampon phosphate de 1mL pour 1L de milieu.

ANNEXE C :

SPECTRES DE SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION DES RAYONS X

1. Combinaisons linéaires des oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$

a. Etude de *C. metallidurans* CH34

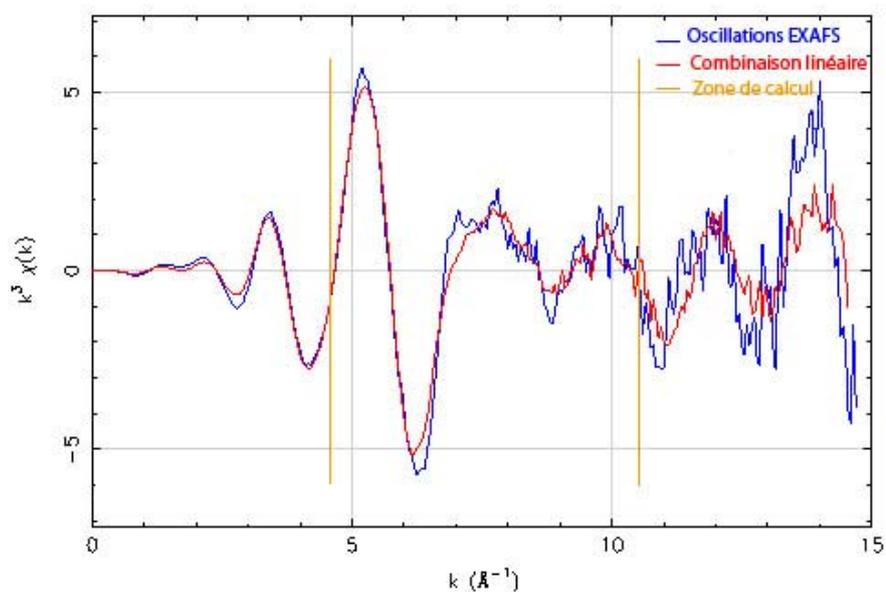


Figure 1 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu CSM à pH 7,5 et à t0 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

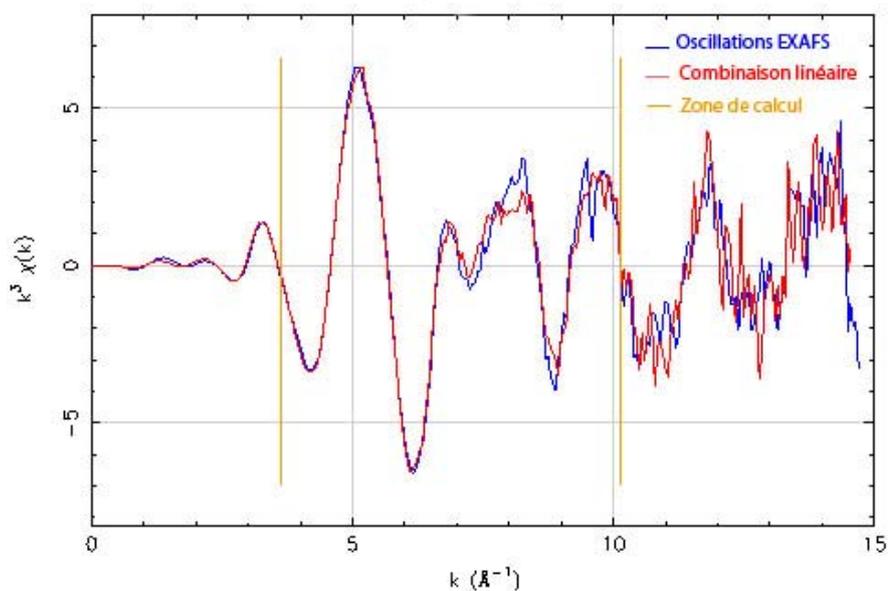


Figure 2 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu CSM à pH 7,5 et à t75 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

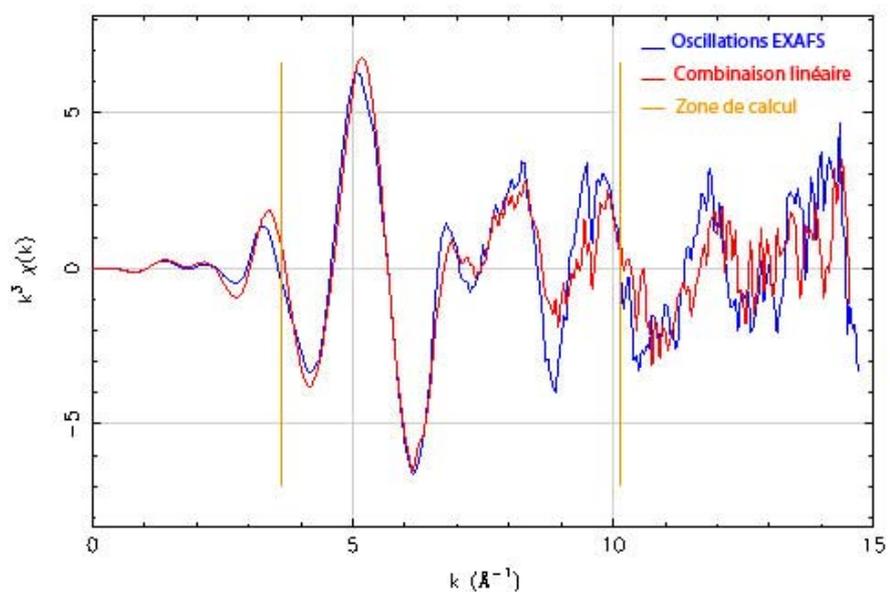


Figure 3 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu CSM à pH 7,5 et à t75 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et ne prend pas en compte le carbonate d'uranyle. La zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

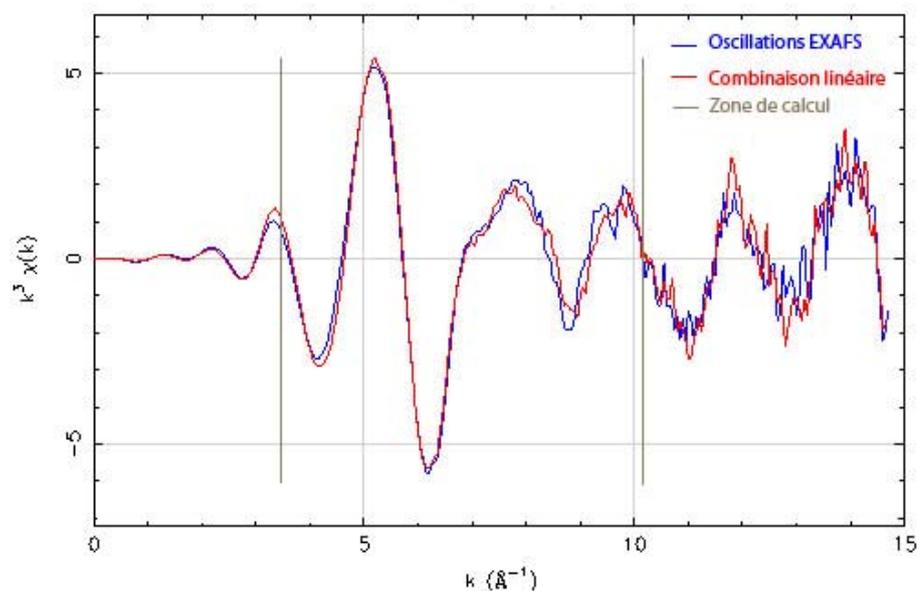


Figure 4 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans les culots bactériens de *C. metallidurans* CH34 après 75h de culture en milieu CSM à pH 7,5 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes grises.

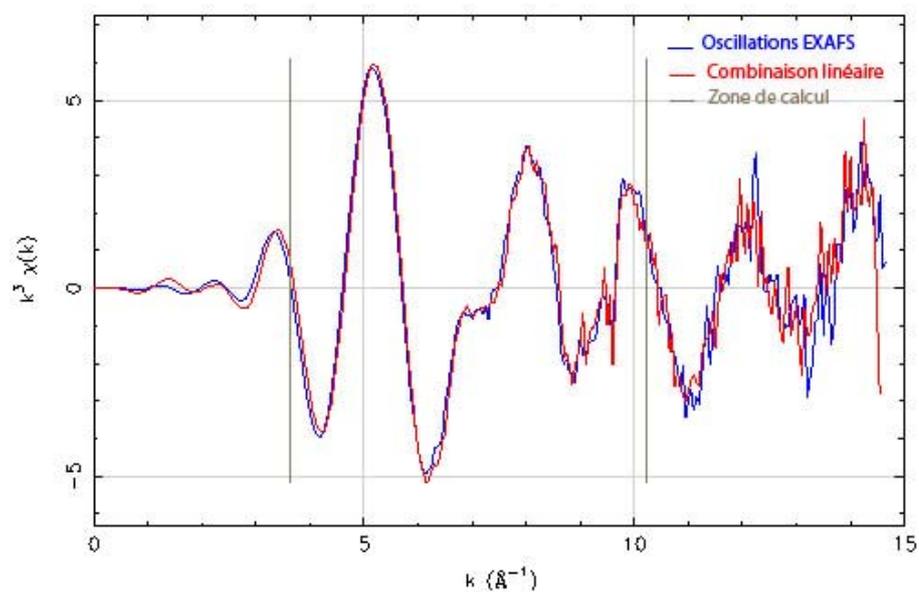


Figure 5 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu CSM à pH 1 et à t0 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes grises.

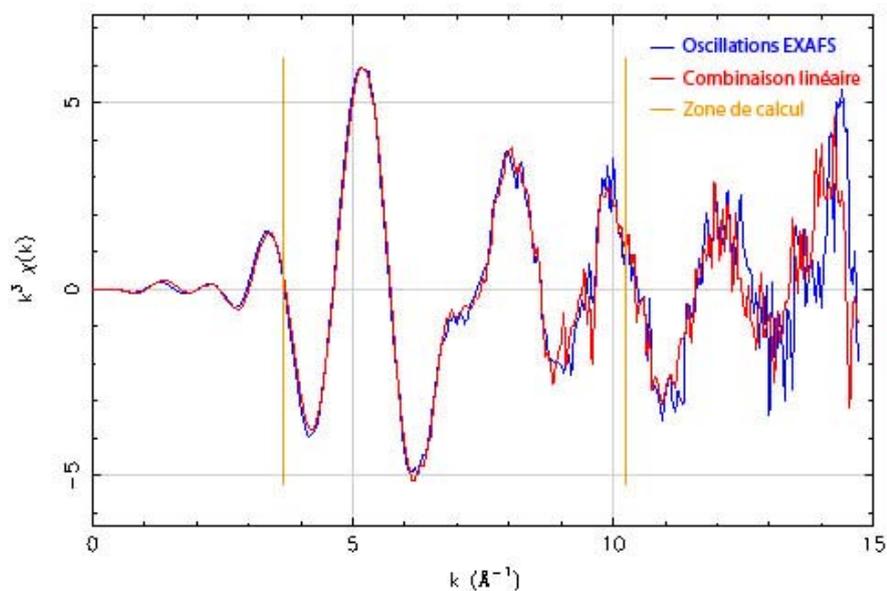


Figure 6 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu CSM à pH 1 et à t24 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

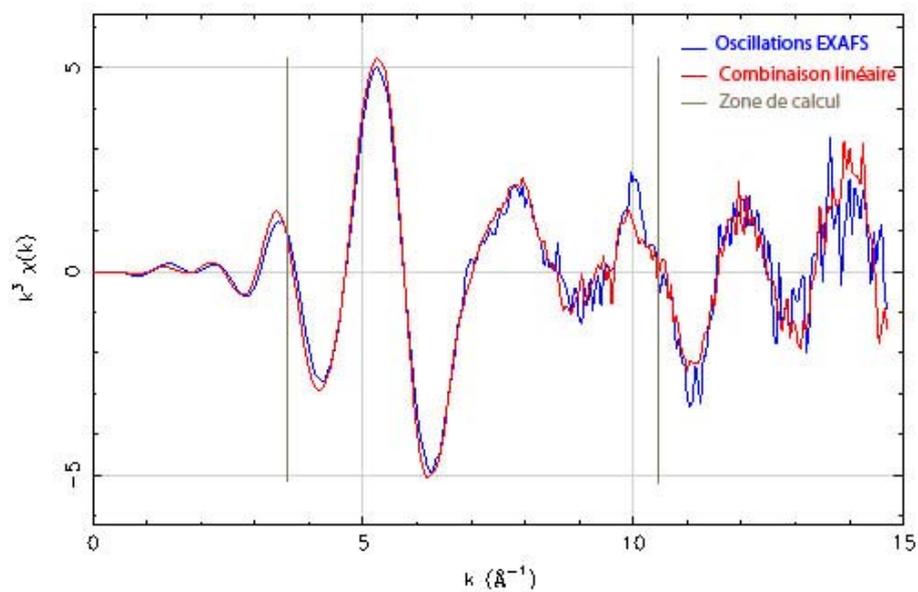


Figure 7 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans les culots bactériens de *C. metallidurans* CH34 après 24h de culture en milieu CSM à pH 1 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes grises.

b. Etude de *R. palustris*

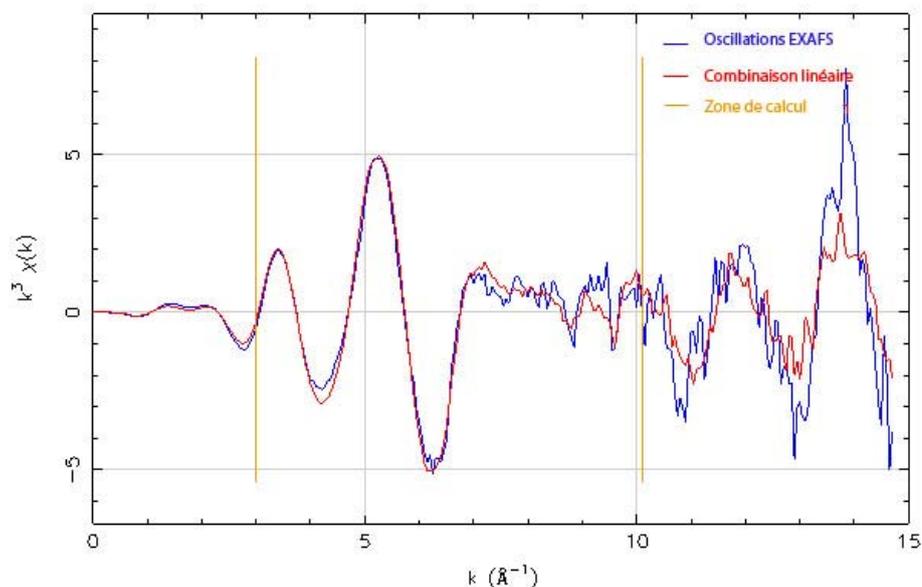


Figure 8 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 7 et à t0 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

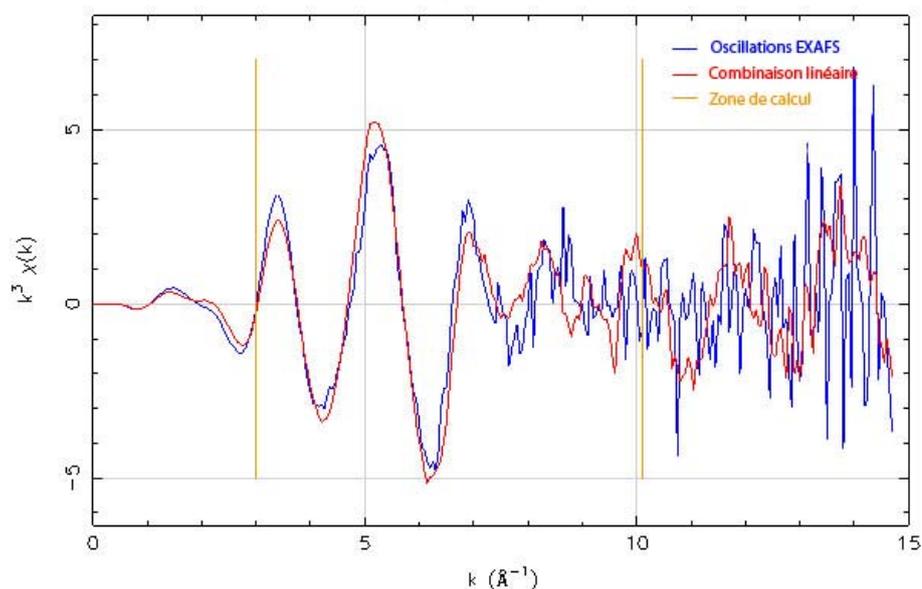


Figure 9 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 7 et à t75 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

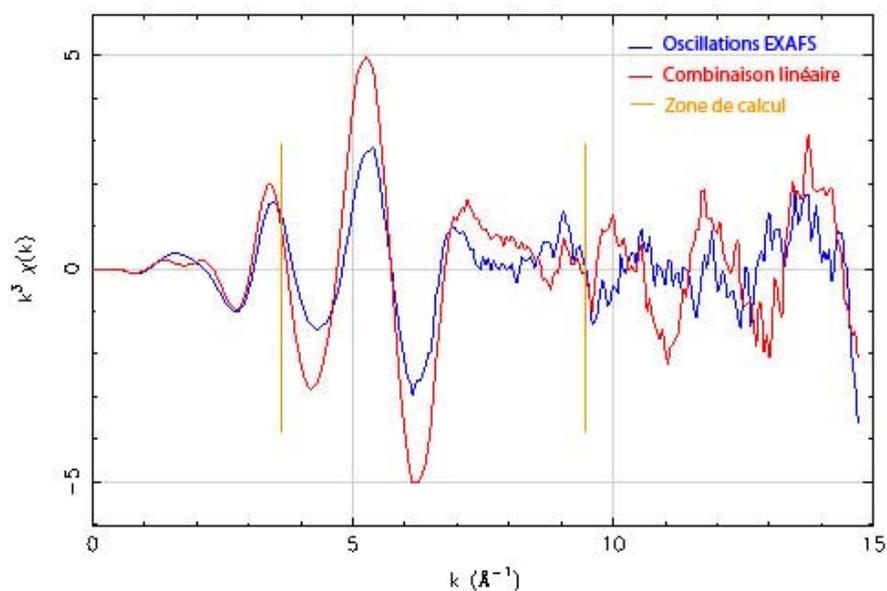


Figure 10 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans les culots bactériens de *R. palustris* après 75h de culture en milieu Hutner modifié à pH 7 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

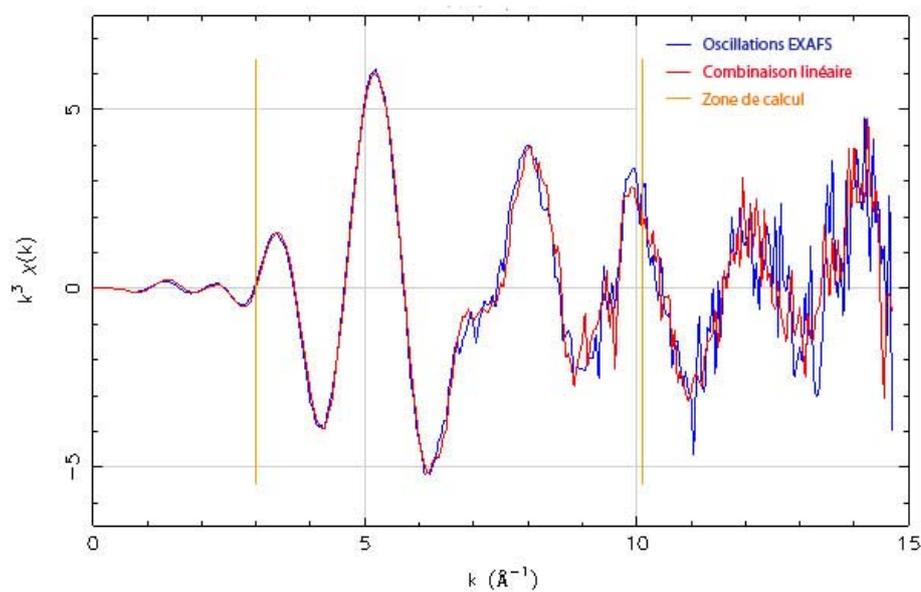


Figure 11 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 1 et à t0 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

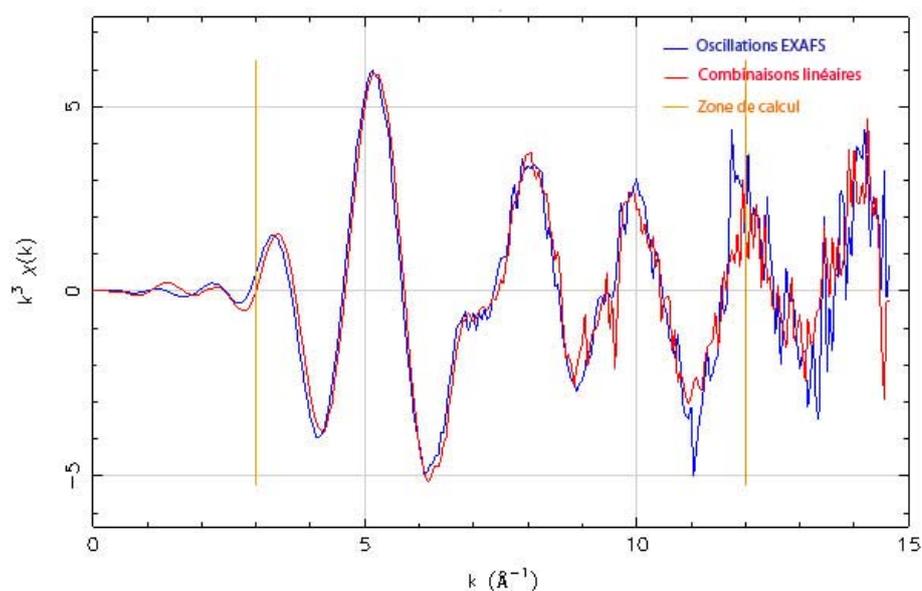


Figure 12 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 1 et à t24 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

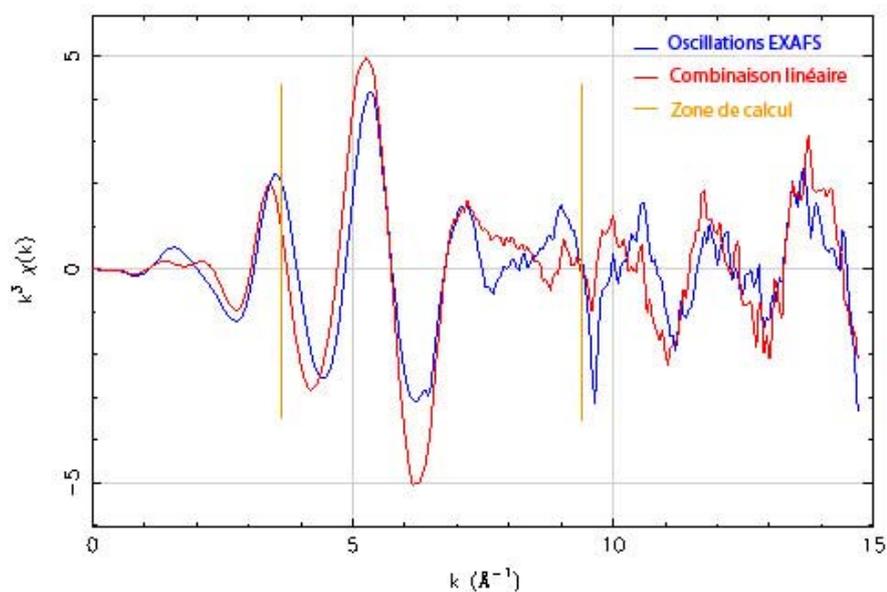


Figure 13 : Oscillation EXAFS $k^3\chi(k)$ de l'uranium dans les culots bactériens de *R. palustris* après 24h de culture en milieu Hutner modifié à pH 1 (bleu). La reconstruction du signal par combinaison linéaire est en rouge et la zone de calcul est représentée par les deux bornes orange.

2. Modélisation de la structure à partir des oscillations EXAFS $k^3\chi(k)$

a. Etude des composés de référence

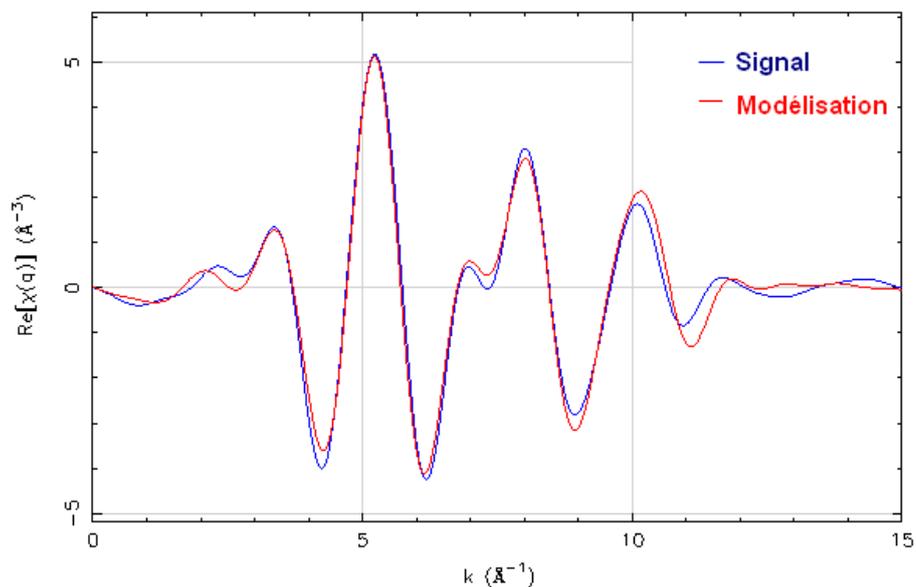


Figure 14 : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence UO_2^{2+} dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

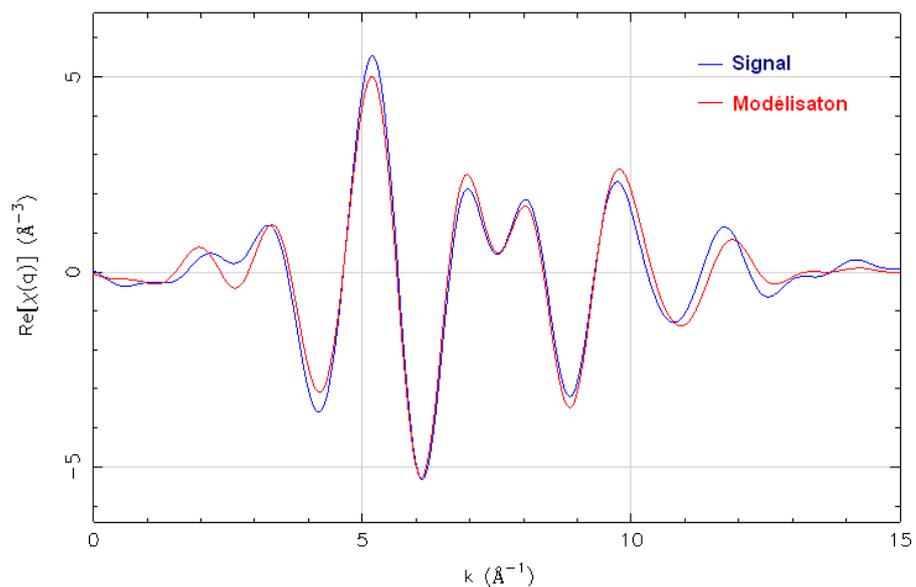


Figure 15 : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence carbonate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

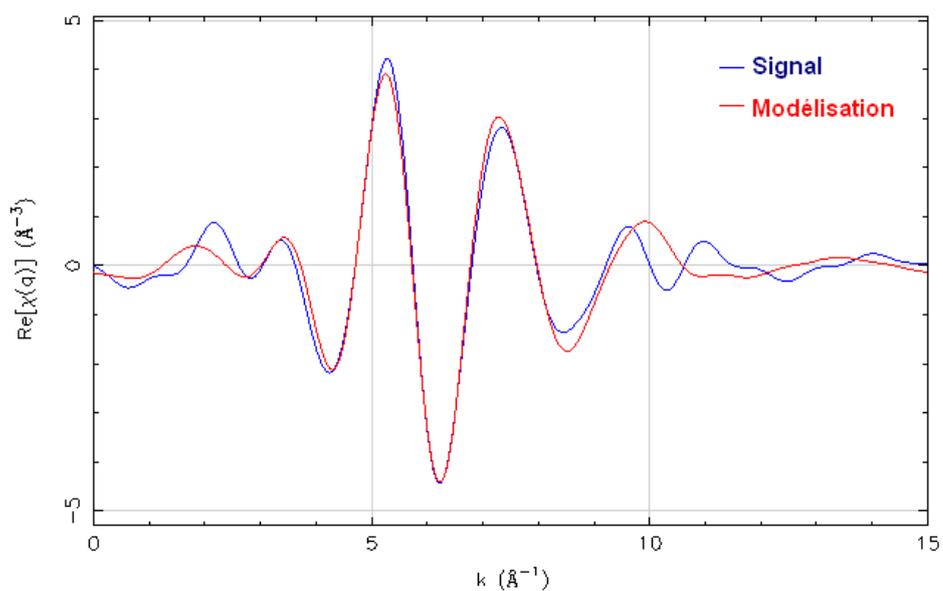


Figure 16 : : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence acétate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

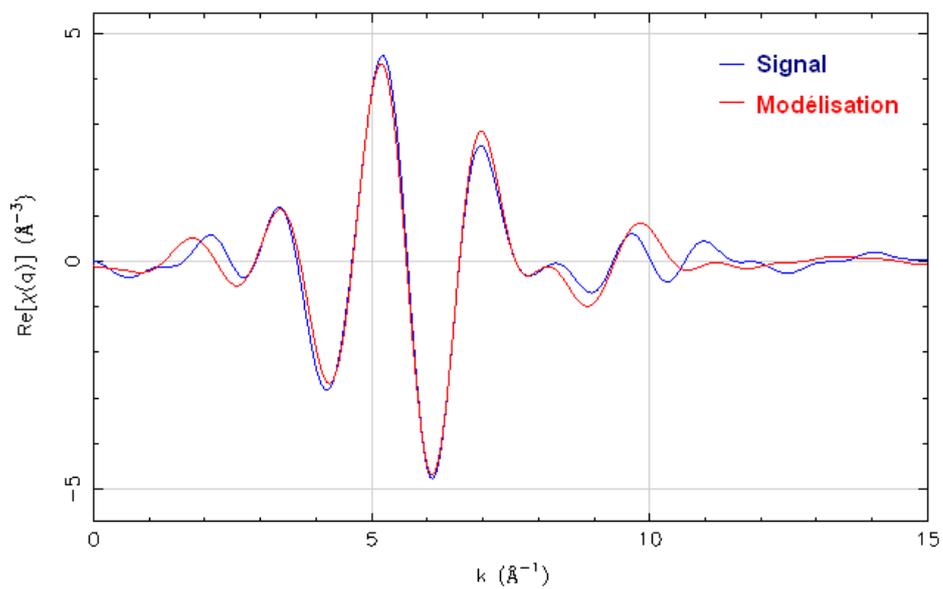


Figure 17 : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence citrate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

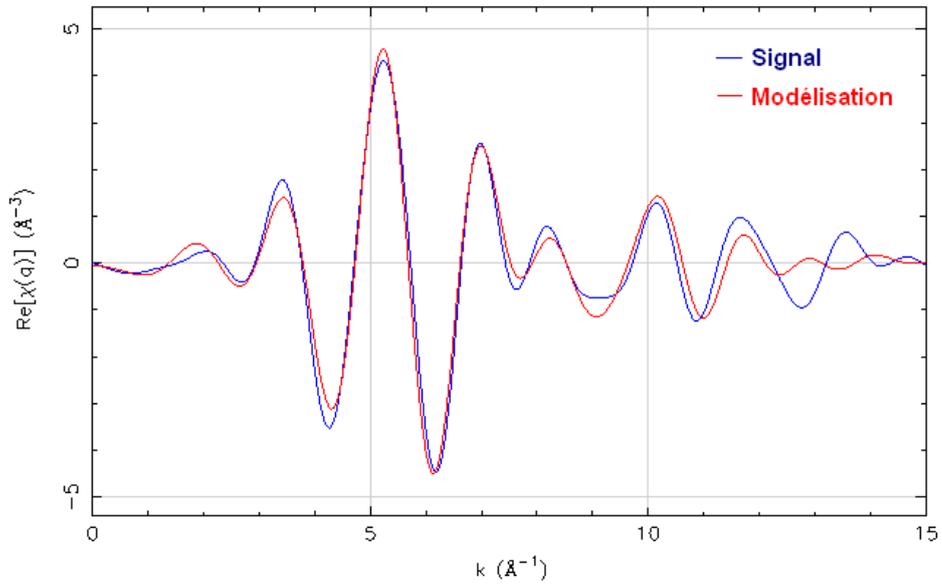


Figure 18 : : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence malate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

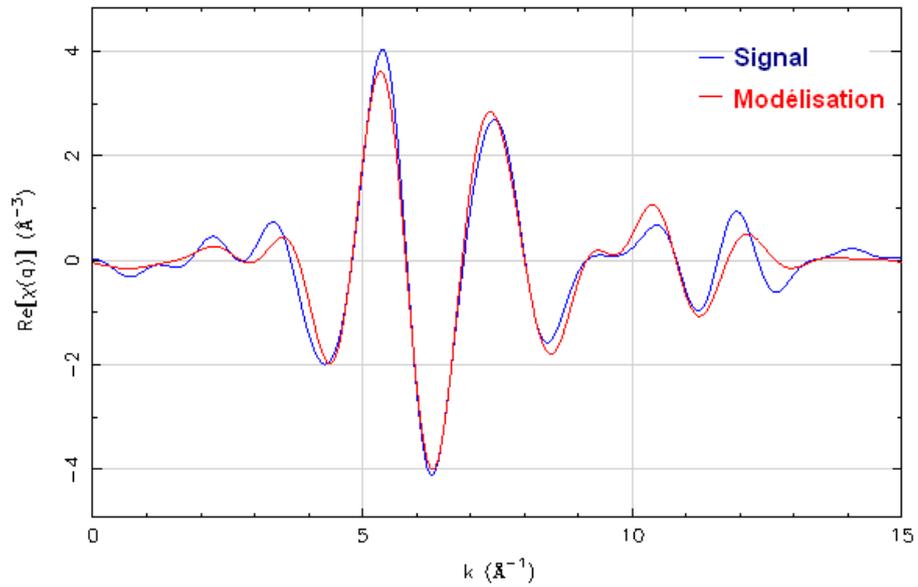


Figure 19 : Partie réelle des oscillations EXAFS de la référence phosphate d'uranyle dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

b. Etude de *C. metallidurans* CH34

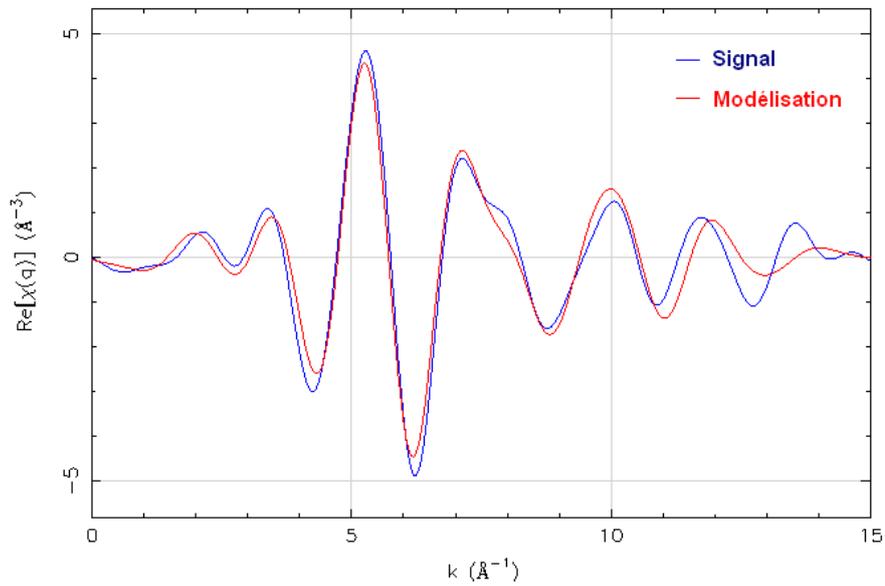


Figure 20 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu CSM à pH 7,5 et à t0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

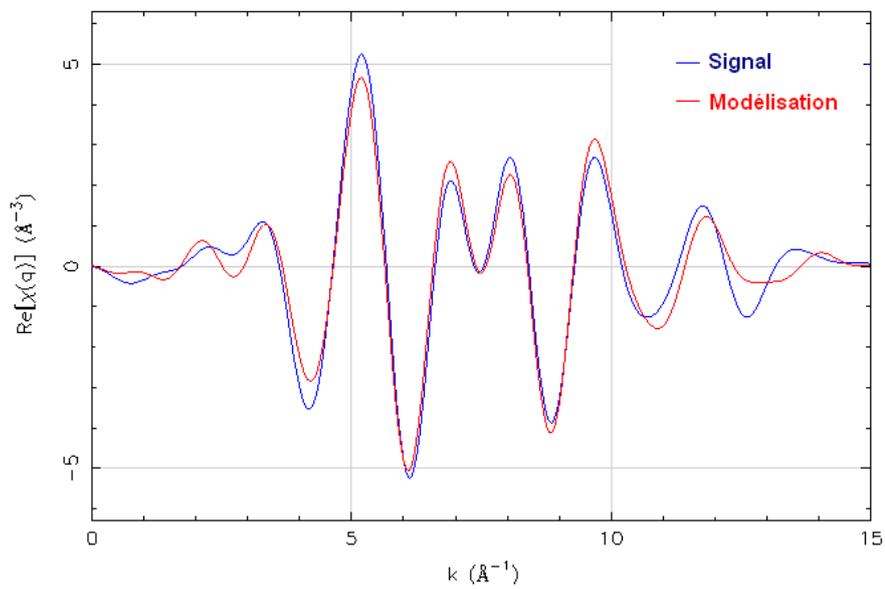


Figure 21 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu CSM à pH 7,5 et à t75 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

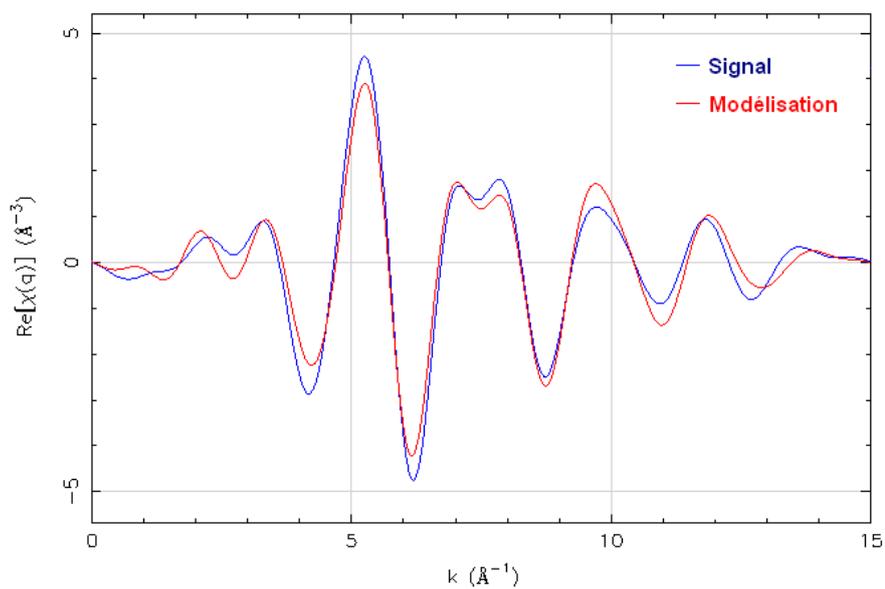


Figure 22 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le culot bactérien de *C. metallidurans* CH34 après 75h de culture en milieu CSM à pH 7,5, dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

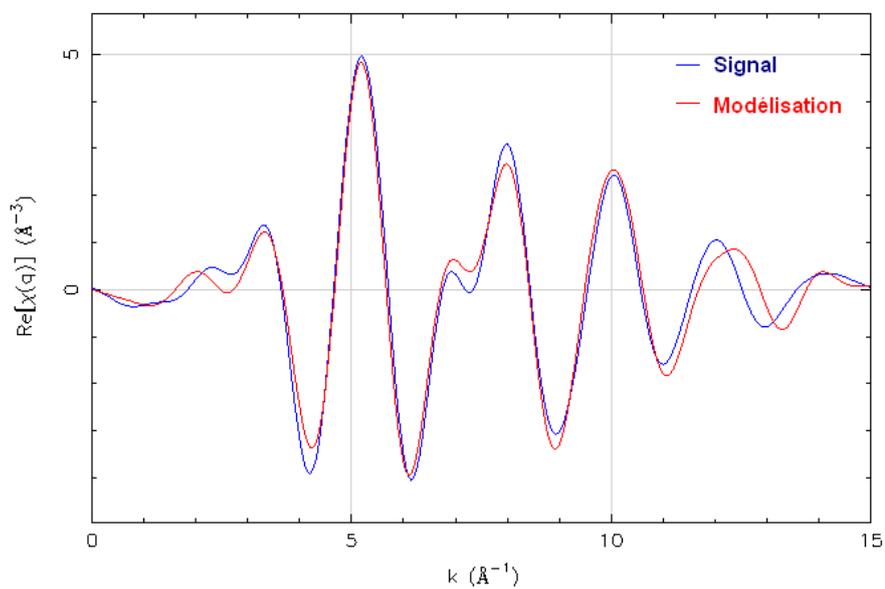


Figure 23 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu CSM à pH 1 et à t0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

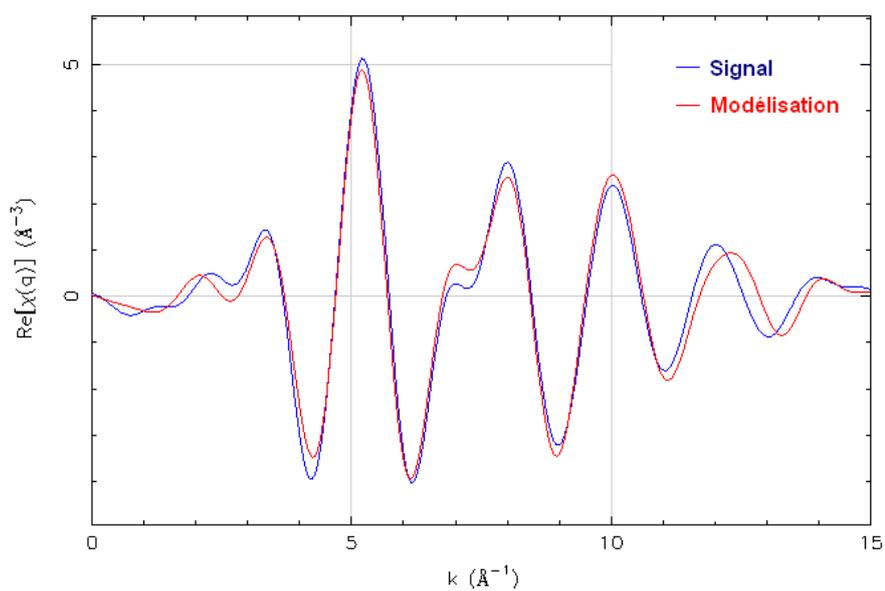


Figure 24 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu CSM à pH 1 et à t24 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

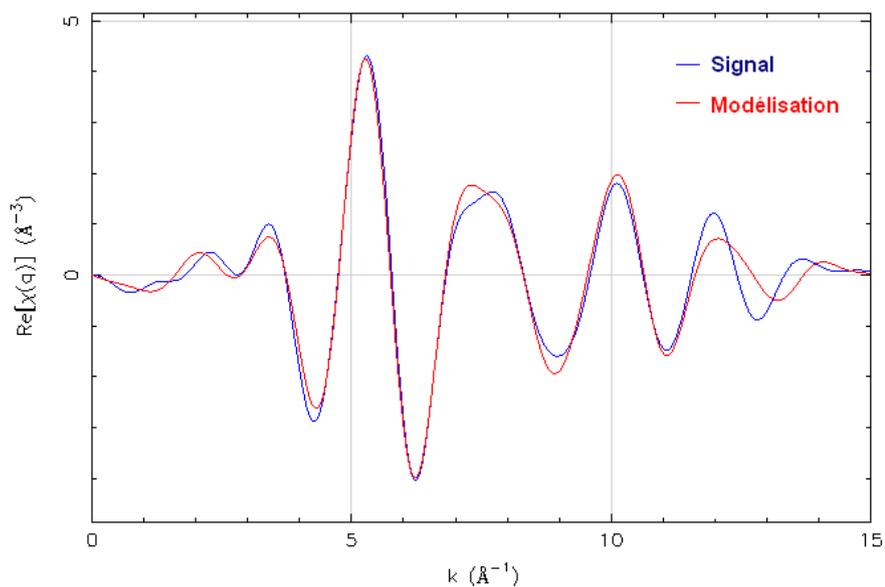


Figure 25 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le culot bactérien de *C. metallidurans* CH34 après 24h de culture en milieu CSM à pH 1, dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

c. Etude de *R. palustris*

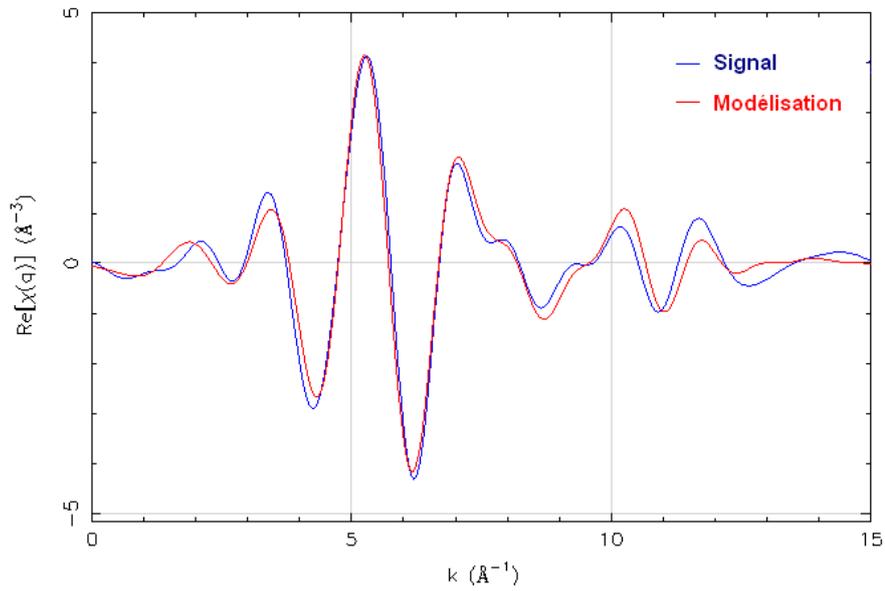


Figure 26 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 7 et à t0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

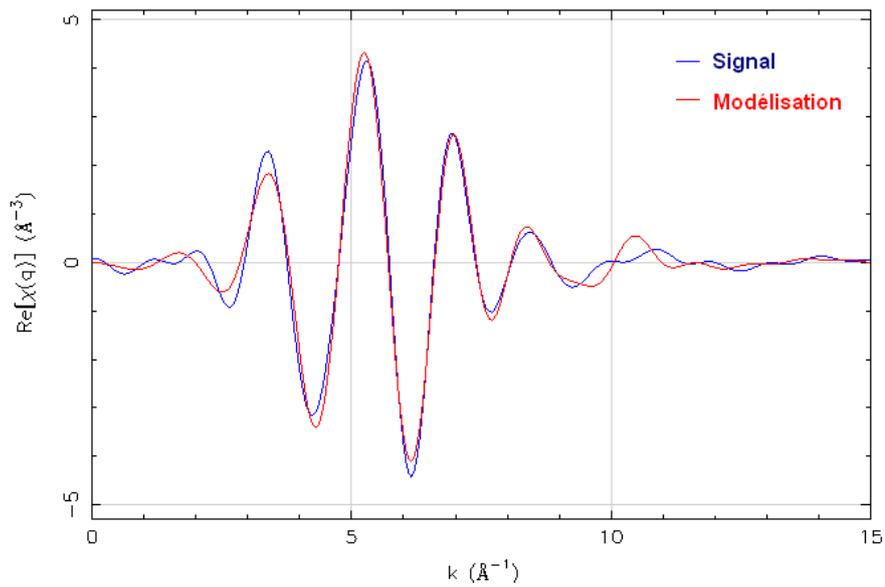


Figure 27 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 7 et à t75 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

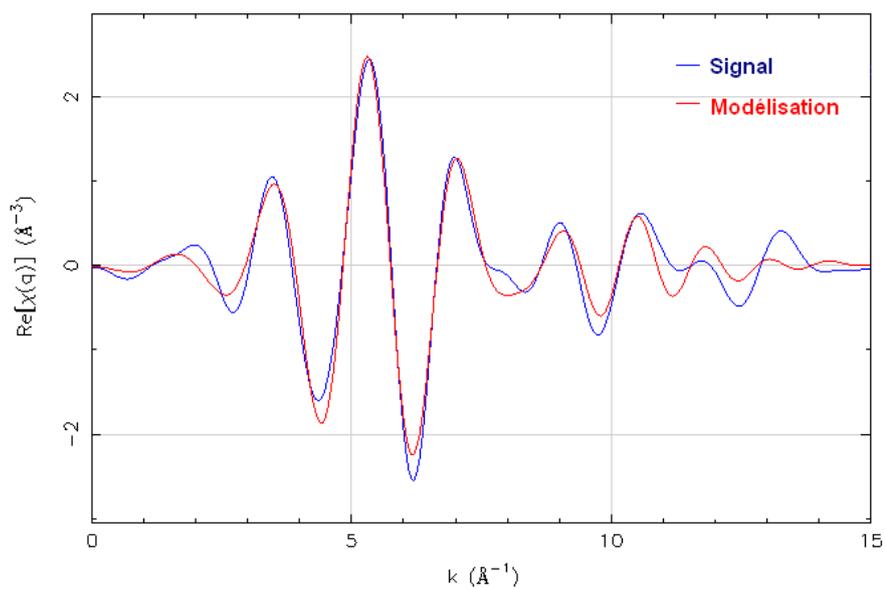


Figure 28 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le culot bactérien de *R. palustris* après 75h de culture en milieu Hutner modifié à pH 7, dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

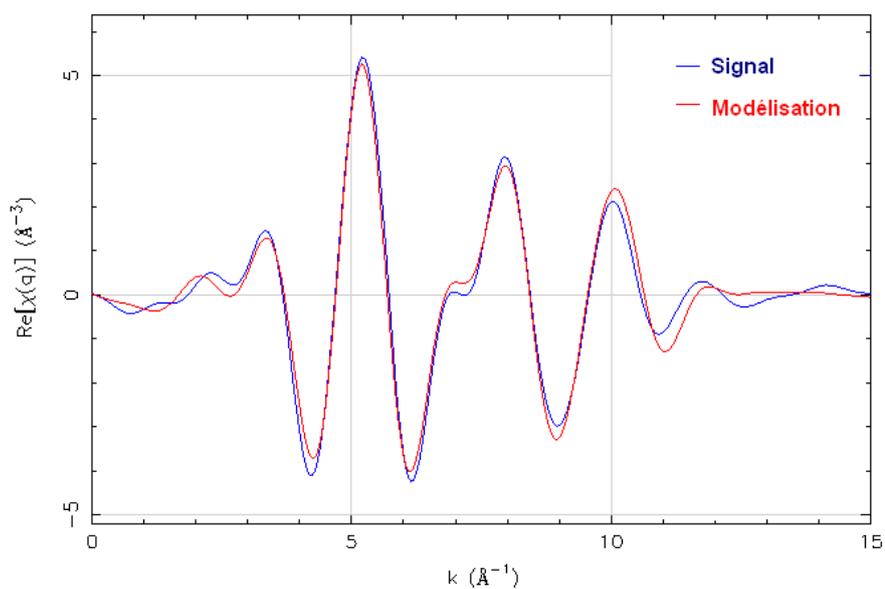


Figure 29 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 1 et à t0 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

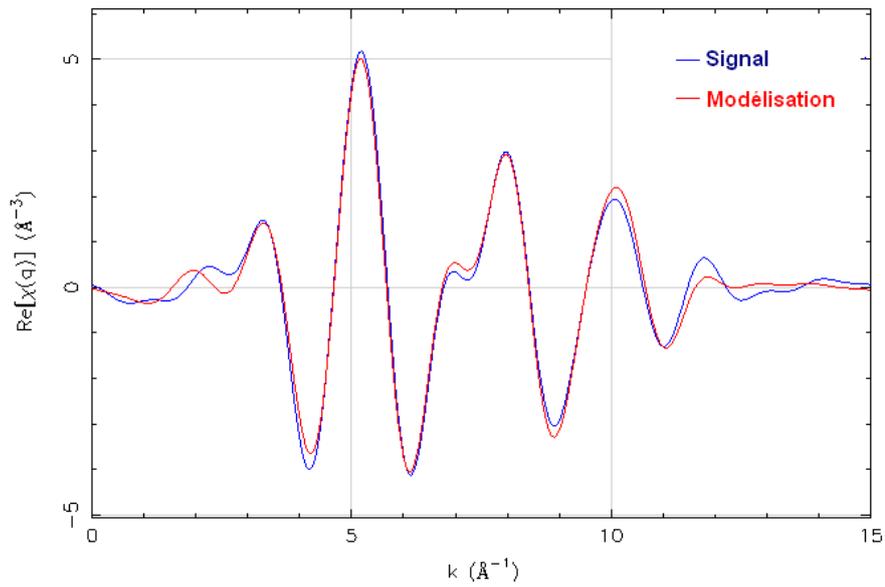


Figure 30 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le milieu Hutner modifié à pH 1 et à t24 dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

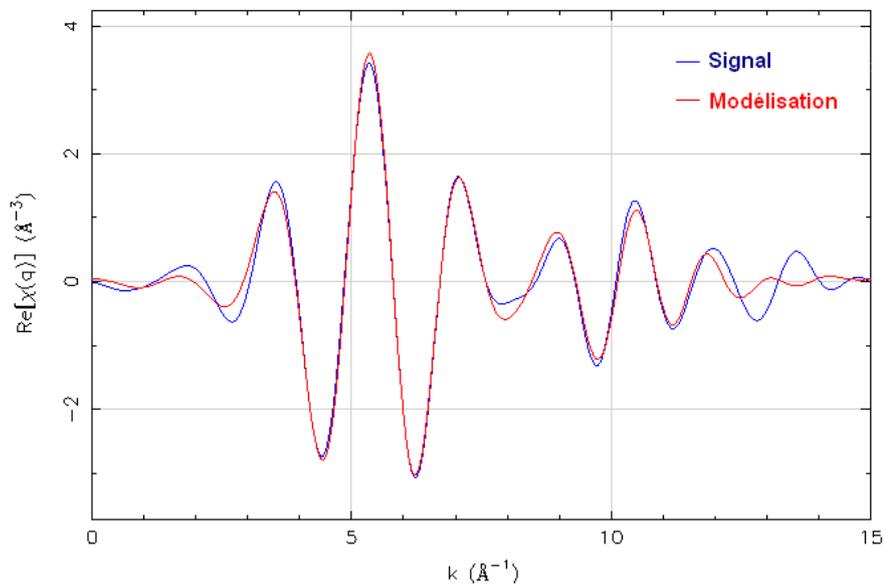


Figure 31 : Partie réelle des oscillations EXAFS de l'uranium dans le culot bactérien de *R. palustris* après 24h de culture en milieu Hutner modifié à pH 1, dans l'espace des vecteurs d'onde filtré (bleu) et sa modélisation (rouge).

ANNEXE D

CONSTANTES DE COMPLEXATION

Liste des principales constantes de complexation des composés utilisés dans
cette étude

CaUO₄

composition = -4 H[+], 1 Ca[2+], 1 UO₂[2+], 2 H₂O
logK = -18.0525(0), -15.942(25), -13.5257(60), -11.3234(100)\
-9.1414(150), -7.3972(200), -5.938(250), -4.6538(300)

Na₂U₂O₇

composition = -6 H[+], 2 Na[+], 2 UO₂[2+], 3 H₂O
logK = -25.3769(0), -22.5917(25), -19.4539(60), -16.6549(100)\
-13.9584(150), -11.8891(200), -10.2415(250), -8.8763(300)

Saleeite

composition = -2 H[+], 1 Mg[2+], 2 HPO₄[2-], 2 UO₂[2+]
logK = 17.7959(0), 19.4575(25), 21.628(60), 23.8545(100)\
26.3936(150), 28.8133(200),

Schoepite

composition = -2 H[+], 1 UO₂[2+], 3 H₂O
logK = -5.6598(0), -4.8333(25), -3.9236(60), -3.1255(100)\
-2.4029(150), -1.9408(200), -1.5692(250), -1.3827(300)

UO₂CO₃

composition = -1 H[+], 1 HCO₃[-], 1 UO₂[2+]
logK = 3.8216(0), 4.1267(25), 4.4868(60), 4.8247(100)\
5.1863(150), 5.513(200),

(UO₂)₃(PO₄)₂·6H₂O(c)

composition = 3 UO₂[2+], 2 HPO₄[2-], 6 H₂O, -2 H[+]
logK = 25.4951(25)

(UO₂)(CIT)[-]

composition = 1 UO₂[2+], 1 CIT[3-]
logK = 8.4(25),
radius = 5e-10

(UO₂)(CIT)₂[4-]composition = 1 UO₂[2+], 2 CIT[3-]

logK = 19.5(25),

radius = 5e-10

(UO₂)H(CIT)(aq)composition = 1 UO₂[2+], 1 H[+], 1 CIT[3-]

logK = 15.15(25),

radius = 5e-10

UO₂(CO₃)₂[2-]composition = -2 H[+], 1 UO₂[2+], 2 HCO₃[-]

logK = -3.7(25)

radius = 4e-10

UO₂(CO₃)₃[4-]composition = -3 H[+], 1 UO₂[2+], 3 HCO₃[-]

logK = -9.4(25)

radius = 4e-10

UO₂(OH)₂(aq)composition = -2 H[+], 1 UO₂[2+], 2 H₂O

logK = -12.0(25),

radius = 3e-10

UO₂(OH)₃[-]composition = -3 H[+], 1 UO₂[2+], 3 H₂O

logK = -19.2(25),

radius = 4e-10

UO₂(OH)₄[2-]composition = -4 H[+], 1 UO₂[2+], 4 H₂O

logK = -33.0(25),

radius = 4e-10

UO₂Cl[+]composition = 1 Cl[-], 1 UO₂[2+]

logK = 0.16(25)

radius = 4e-10

UO₂H₂PO₄[+]composition = 1 H[+], 1 HPO₄[2-], 1 UO₂[2+]

logK = 10.5(25),

radius = 4e-10

UO₂OH[+]

composition = -1 H[+], 1 H₂O, 1 UO₂[2+]
logK = -5.2(25)
radius = 4e-10

UO₂SO₄(aq)

composition = 1 SO₄[2-], 1 UO₂[2+]
logK = 2.8036(0), 3.15(25), 3.51(60), 4.0444(100)\
4.8197(150), 5.7785(200),
radius = 3e-10

Résumé

L'uranium est un toxique à la fois chimique et radiologique. C'est un élément que l'on retrouve à faible concentration dans l'environnement sauf lors de pollutions causées par les activités humaines. Du fait de sa forte réactivité, l'ion uranyle peut se complexer à de nombreux constituants du sol, qu'ils soient minéraux ou organiques. Ces différentes formes peuvent être ainsi plus ou moins biodisponibles pour les microorganismes et les plantes et peuvent ensuite rentrer dans la chaîne alimentaire de l'homme.

La connaissance et la compréhension des mécanismes de transfert et du devenir d'éléments toxiques chimiques et radiologiques dans la biosphère constituent donc un enjeu capital pour permettre une bonne estimation des risques sanitaires et écologiques. La connaissance de la spéciation est capitale pour engager des processus de biorémédiation. Ici, c'est l'effet des microorganismes sur la spéciation de l'uranium dans l'environnement qui nous intéresse. Selon les formes initiales de l'uranium, les bactéries peuvent l'accumuler et/ou le transformer et ainsi modifier sa biodisponibilité.

Les modèles utilisés dans cette étude sont *Cupriavidus metallidurans* CH34, bactérie tellurique résistante aux métaux lourds, *Deinococcus radiodurans* R1, bactérie connue pour être une des espèces les plus radio-résistantes et *Rhodopseudomonas palustris*, bactérie pourpre autotrophe capable de dégrader les composés aromatiques en anaérobie.

Ces bactéries sont cultivées en présence de deux formes d'uranium retrouvées dans l'environnement : une forme minérale, le carbonate d'uranyle et une forme organique, le citrate d'uranyle. Ces formes ont d'abord été modélisées et les milieux de culture ont été modifiés pour pouvoir travailler avec ces espèces. La capacité des bactéries à résister, à transformer et/ou accumuler l'uranium a été étudiée. On observe une différence entre les concentrations minimales inhibitrices des deux spéciations mais celle-ci est en fait due à une différence de biodisponibilité des phosphates. Aucune accumulation ne semble être mise en évidence aux pH environnementaux par dosage de l'uranium et par observation au microscope électronique à transmission alors qu'une précipitation est observée à pH 1. La spéciation de l'uranium a été étudiée par spectroscopie d'absorption X (EXAFS). La spéciation est bien maîtrisée dans les milieux de culture et les précipités observés aux pH très acide sont ces complexes de phosphates d'uranyle.

Abstract

Uranium is both a radiological and a chemical toxic. Its concentration in the environment is low except when human activities have caused pollution. Uranium is a heavy reactive element, and thus it is easily complexed with soil component like minerals or organic molecules. These different complexes can be more or less bioavailable for microorganisms and plants, and then get in the human food chain.

The knowledge and the understanding of transfer mechanisms and also the fate of toxic elements in the biosphere are a key issue to estimate health and ecological hazards. The knowledge of the speciation is very important for bioremediation processes. Here, we focused on the microorganisms effects onto uranium speciation in environment. Bacteria can accumulate and/or transform uranium depending on the initial form of the element. Thus, its bioavailability could be changed.

The species used in this work are *Cupriavidus metallidurans* CH34, which is an environmental bacteria with a high resistance to heavy metal, *Deinococcus radiodurans* R1, which is known for his radiological resistance, and *Rhodopseudomonas palustris*, which is a purple phototrophic bacteria capable of degrading aromatic compounds.

Two forms of uranium were used with these bacteria, a mineral one, uranyl carbonate, and an organic one, uranyl citrate. In a first step, the growth media were modified in order to stabilize uranium complexes thanks to a simulation program. Then, the capacity of the bacteria to accumulate or transform uranium was studied. We saw a difference between minimal inhibition concentrations of these two speciation which is due to a difference between phosphate bioavailability. No accumulation was observed with environmental pH but uranium precipitation was observed with acidic pH (pH 1). Uranium speciation seemed to be well controlled in the growth media and the precipitates were uranyl phosphate.